



HAL
open science

Influence de l'histone de liaison sur la dynamique de fibres de chromatine individuelles

Pierre Recouvreux

► **To cite this version:**

Pierre Recouvreux. Influence de l'histone de liaison sur la dynamique de fibres de chromatine individuelles. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2009. Français. NNT : . tel-00547228

HAL Id: tel-00547228

<https://theses.hal.science/tel-00547228>

Submitted on 15 Dec 2010

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

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

UNIVERSITE PARIS 7 - DENIS DIDEROT

LABORATOIRE PHYSICO-CHEMIE CURIE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Interfaces Physique-Biologie

présentée par :

Pierre RECOUVREUX

**Influence de l'histone de liaison
sur la dynamique de fibres
de chromatine individuelles**

Sous la direction de Jean-Louis VIOVY

soutenue le 27 Novembre 2009 devant le jury composé de :

Mme Cendrine FAIVRE-MOSKALENKO	Rapporteur
M. Olivier HYRIEN	Rapporteur
M. Jean-Marc DI MEGLIO	Président
Mme Geneviève ALMOUZNI	Examinatrice
M. Jean-Marc VICTOR	Examinateur
M. Jean-Louis VIOVY	Directeur de thèse

Remerciements

Après avoir longuement chercher une idée pour apporter une touche d'originalité dans cette partie, j'ai décidé d'arrêter de chercher et de remercier. Ce ne sera pas rapide, tant sont nombreuses les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse. Et d'abord merci à toi, lecteur attentif, qui pose tes yeux sur mon travail (ceci est une incitation à lire plus que ces quelques lignes...). Un grand merci à tous ceux qui suivent et aussi à ceux que je pourrais avoir oublié, c'est possible.

Merci aux membres du jury d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et d'assister à ma présentation. Et aussi d'avoir rendue très plaisante et enrichissante la séance de questions! Je remercie en particulier mes deux rapporteurs, Cendrine Faivre-Moskalenko et Olivier Hyrien pour leur travail de relecture. Je tiens à souligner ici la responsabilité que Cendrine a eu dans ce travail puisque c'est elle qui m'a donné envie de me tourner vers la biophysique lorsque j'étais un jeune et naïf étudiant de l'ENS Lyon!

Merci, beaucoup, à Jean-Louis de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir proposé ce sujet. Merci à Giulia, qui se démène tous les jours pour faire en sorte que tout se passe pour le mieux dans l'équipe, Grazie mille! Merci aussi à Giovanni et Laurent de faire voguer la barque (le paquebot?).

Merci à Jean-Francois Joanny, Jacques Malthête et Patrick Keller de tous leurs efforts pour faire de ce laboratoire un lieu où il est très agréable et enrichissant de travailler.

Merci, beaucoup, à Gaudeline, de m'avoir transmis son savoir sur la chromatine et les pinces. Merci beaucoup pour ton honnêteté, ton soutien et ta patience. Tu es à l'origine de tout le travail que j'ai pu effectuer durant ces quatre années. J'ai aussi énormément apprécié nos discussions vins et rugby. Je regrette de ne pas avoir eu le temps de venir vous voir pour que tu m'enseignes la planche à voile et la confection de rhum arrangé! Merci.

Merci aux biologistes : Ariel Prunell, pour ces longues et passionnantes discussions sur la chromatine et pour m'avoir accueilli temporairement dans son équipe. Merci à Natalia Conde e Silva pour avoir pris le temps d'enseigner à une physicien les rudiments de la bio mol de la chromatine. Merci à Christophe Lavelle (au fait t'es biologiste ou physicien ou cuisinier, je sais plus) d'avoir été l'un de mes interlocuteurs privilégié pour parler chroma-

tine, topologie et vin !

Merci aux théoriciens : Jean-Marc Victor, Maria Barbi et Julien Mozziconacci pour avoir accepté de travailler sur mes quelques données expérimentales ! Données expérimentales que je n'aurais pas pu obtenir sans l'aide de Vincent Croquette que j'ai souvent appelé au secours ! Merci ! Au passage je remercie un autre spécialiste des pinces magnétiques, Jean-François Allemand, avec qui j'ai beaucoup discuter chromatine, enseignement, rugby et vin (ce sont deux de mes sujets favoris !). Merci à toi et à toute l'équipe pédagogique que j'ai croisée sous ta responsabilité.

Merci aux nombreux membres de l'équipe Viovy. Je sais que je n'ai pas été très facile à vivre de nombreuses fois mais j'ai vraiment apprécié votre compagnie. Je tiens à remercier plus particulièrement Ludovic avec qui j'ai beaucoup partagé ! Bureau, manip, chambres d'hôtel. Merci de ta patience !

Merci, pour clore le côté professionnel tout en faisant la transition vers le côté plus privé, aux anciens camarades qui ont eux aussi été pris de passion pour la chromatine : Elise Praly et Fabien Montel. Vous trouverez les références de leurs thèses respectives dans la bibliographie en fin de cet ouvrage ! Merci beaucoup à vous deux d'avoir éclairé le chemin tortueux de ma thèse, ouvert quelques portes, préparé de jolies figures et partagé ensemble quelques bons verres ! (Quelle belle transition !)

Merci, beaucoup, à tous ceux qui ont rendu le quotidien au labo rigolo et agréable. Je vais commencer par les gonz' historiques de l'équipe : Anne, Aurélie, Laure, Rafaele, Sandrine, Virginie (ordre alphabétique pour ne pas heurter les sensibilités). Merci pour les pauses, les discussions soldes, les engueulades, les pauses cafés, les pauses boulangeries, les soirées et les pauses. Il y a aussi les gonz' moins historiques : Anais (je te remercie pas vraiment pour les karaokés), Francesca et Paolo pour l'accent italien (ah, Paolo !). Merci aux mecs de l'équipe : Ludo, Fabio (quelle barbe !), Stefano (quels cheveux !), Paolo (ah Paolo...), Velan, Guillaume, Guillaume, Olivier (enfin un rugbeux), Julien H., Julien A. (quelle blague !), Reza... et les autres.

Merci aussi aux non membres de l'équipe Viovy et non moins bons camarades Johnatan, Léa-Laetitia, Benoit, Simon, John, Jérémie, Mahassine, Pierre-Yves, Guillaume, Mathieu (pas à curie mais presque), Elyes... et bien d'autres.

Il y a aussi beaucoup de gens en dehors de Curie que je vais remercier car ils m'accompagnent depuis bien longtemps et de fort belle manière :

Merci, au légendaire *C*lub Anatole : Anatole et Flo, Euzeb (l'autre problème que je partage avec Elise) et Elise, Chris et Steph, Rufus et Manue, Jésus et Florine, Garga et Scoubi, Framboisier et Marjo, Bouli et Phulbert, Simoun et Emilie. Merci eux internes du Parc : Riri, David, Serge, Poupix, Guillaume, Martin, Nadim.

Merci à mes potes du Jura, qui m'ont permis de garder les pieds dans le terroir de notre superbe région. Merci, donc, à Rachel et Seb et Julia, Matthias et Manu.

Un grand merci, à toute ma famille. En particulier mon papa (pour les heures de labour et de moissons), ma maman (merci pour l'apprentissage de la lecture et la correction orthographique de ce manuscrit), à mes frangines (pour avoir été plus grandes), mes beaux frères (pour le vin et la poire et les neveux et les nièces) et à ma grand mère (pour le chocolat et le sirop). Merci beaucoup à ceux qui ont fait un long voyage pour m'écouter parler pendant des heures de mon obscur sujet : Denise, Norbert, Michel, Véro, Claude, Catherine et Stéphane.

Enfin, merci à Anne-Claire, pour tout ! et bien plus encore, puisque je n'aurais rien pu faire sans toi. Merci.

Table des matières

1	Organisation et dynamique de la chromatine	13
1	La structure de la chromatine	14
1.1	De l'ADN à la chromatine	14
1 -	L'ADN, support de l'information génétique	14
2 -	Détails structuraux de la double hélice d'ADN	15
3 -	Les histones : principaux constituants de la chromatine	17
4 -	Détails structuraux des histones de coeur	18
5 -	Les histones de liaison	19
6 -	Les variants des histones	19
1.2	Le nucléosome : motif élémentaire de la chromatine	21
1 -	La chromatine est constituée d'un motif élémentaire répété	22
2 -	Le nucléosome	22
3 -	Le chromatosome	25
4 -	Effet de la séquence d'ADN	25
5 -	Assemblage de la particule de coeur	27
6 -	Dynamique du nucléosome	28
2	Hiérarchisation de la compaction de la chromatine	30
2.1	Le chapelet de nucléosomes	30
2.2	La fibre de 30 nm	32
1 -	Effet du sel sur la compaction	32
2 -	Effet de la longueur de l'ADN de liaison	35
3 -	Les différents modèles de la fibre de 30 nm	36
4 -	Niveau de compaction supérieur de la fibre	38
3	Dynamique de l'organisation chromatiniennne	39
3.1	Les modifications covalentes des histones	39
3.2	Insertion de variants d'histones	42
3.3	Les facteurs de remodelage	45
1 -	Les différentes familles de facteurs de remodelage	45
2 -	Rôle <i>in vivo</i> des facteurs de remodelage	46
3 -	Modes d'action des facteurs de remodelage	49

2	Descriptions physiques de la chromatine	59
1	Approches physiques de la chromatine	60
1.1	Les ordres de grandeur mis en jeu	60
1.2	Les techniques d'analyses de molécules uniques	62
	1 - Visualisation de molécules uniques	62
	2 - Manipulations de molécules uniques	67
1.3	Expériences de molécules uniques sur la chromatine	72
	1 - Dynamique d'un mononucléosome	72
	2 - Réponse mécanique d'une fibre de nucléosomes	74
	3 - Dynamique à basse force d'une fibre de 30 nm	75
1.4	Les modèles de fibres	76
	1 - Modèles d'élasticité de la molécule d'ADN nu	76
	2 - Les modèles de fibres de chromatine	82
2	La topologie de l'ADN	86
2.1	Notions de topologie	86
	1 - Définitions mathématiques	87
	2 - Topologie de l'ADN	87
2.2	Techniques d'analyse de la topologie	89
	1 - La technique des minicercles	89
	2 - Les pinces magnétiques	91
2.3	La topologie du nucléosome	101
2.4	La topologie du tétrasome	106
3	Manipulation de fibres individuelles de chromatine	109
1	Les fibres de chromatine étudiées	110
1.1	La séquence positionnante 601	110
1.2	Reconstitution d'une fibre de nucléosomes	111
1.3	Reconstitution d'une fibre de chromatosomes	114
1.4	Déstabilisation chimique des histones de liaison	117
1.5	Déroulement des expériences de pinces magnétiques	117
2	Elasticité rotationnelle des fibres	119
2.1	Réponse extension-rotation de la fibre de nucléosomes	119
	1 - Décalage topologique par rapport à l'ADN	119
	2 - Equilibre conformationnel	121
2.2	Réponse extension-rotation de la fibre de chromatosomes	126
	1 - Un autre équilibre conformationnel	126
	2 - Comparaison entre la fibre avec et sans l'histone de liaison	128
3	Transition structurale des nucléosomes et chromatosomes	130
3.1	Comportement hystérétique de la fibre de nucléosomes	131
3.2	Comportement hystérétique de la fibre de chromatosomes	135
3.3	Modèle de ce comportement hystérétique	136
4	Pertinence biologique	138
5	Comportement en traction des fibres de chromatine	142

5.1	Réponses force extension de la chromatine	142
5.2	Extension en fonction du temps de la fibre de chromatine	144
1 -	Extension des fibres de nucléosomes	144
2 -	Extension des fibres de chromatosomes	146
A	PDMS et traitement de surfaces	153
1	Fabrication des cellules	153
1.1	Réalisation de la cellule	153
1 -	Préparation du moule	153
2 -	Réticulation du PDMS	155
2	Traitement des surfaces	156
B	Préparation des fibres de chromatine	157
1	Préparation de l'ADN	157
1.1	Fragment central	157
1.2	Fragment espaceur et extrémités collantes	158
1 -	Fragments espaceurs	158
2 -	Fragments digoxygénine et biotine dits "collants"	160
1.3	Construction totale	161
2	Reconstitution des fibres de chromatine	161
2.1	Fibres de nucléosomes	161
2.2	Fibres de chromatosomes	162
3	Analyse des fibres	162
3.1	Migration sur gel d'agarose	162
3.2	Migration sur gel d'acrylamide	163
C	Protocoles de PCR et de purification d'ADN	165
1	PCR	165
1.1	Produits utilisés	165
1.2	Programmation des cycles	166
2	Purification de l'ADN	167
2.1	Reprécipitation à l'éthanol	167
2.2	Sevag	167
D	Expériences de pinces magnétiques	169
1	Fixation de la chromatine aux billes magnétiques	169
2	Recherche des molécules	170
E	Ajustement des réponses extension-rotation	171
1	Equations mises en jeu	171
2	Ajustement des données expérimentales	173

Introduction

Les cellules eucaryotes contiennent entre 10 millions et 100 milliards de paires de bases d'ADN. Cette molécule, dont l'extension peut atteindre quelques mètres, est contenue dans le noyau des cellules, noyau qui a une taille typique de quelques micromètres. Pour que la très longue molécule d'ADN tienne à l'intérieur du noyau, elle doit être compactée dans une structure dense, appelée *chromatine*.

La chromatine est un assemblage nucléoprotéique constitué par l'ADN et des protéines nommées *histones*. La condensation de l'ADN est réalisée par la répétition d'un motif élémentaire : le *nucléosome*. Cette particule est formée par l'enroulement de 146 paires de bases enroulées autour d'un octamère d'histones. Les nucléosomes sont répétés régulièrement le long de l'ADN, donnant naissance à une fibre qui peut se replier pour accéder à des structures d'ordre supérieur.

L'organisation tridimensionnelle des nucléosomes les uns par rapport aux autres au sein de cette structure définit le niveau de compaction de la molécule. Ce dernier peut atteindre un facteur 10 000 pour l'état le plus condensé : le chromosome mitotique.

L'ADN est le support physique de l'information génétique de la cellule. A ce titre, la molécule doit rester accessible, afin, par exemple, de pouvoir être "lue", lors de la transcription, ou bien "recopiée", lors de la réplication. La structure très dense qu'est la chromatine possède une dynamique de condensation/décondensation pour permettre l'accessibilité de certaines parties du code génétique, à certains moments du cycle cellulaire.

Les histones semblent être des acteurs majeurs dans les processus de régulation. En effet, ces protéines subissent de nombreuses modifications liées à la transcription, qui affectent les propriétés dynamiques de la fibre. Par ailleurs, de nombreuses voies de régulation de la structure chromatinienne ont été mises en évidence. Par exemple, des complexes protéiques appelés *facteurs de remodelage* ont pour rôle de modifier les positions des nucléosomes, affectant ainsi l'organisation supérieure de la fibre. La chromatine joue donc un rôle dans la régulation de l'expression génétique.

Ces mécanismes conduisent à l'établissement de différents domaines chromatiniens au sein du noyau. On distingue principalement deux organisations : (i) l'hétérochromatine, fortement condensée tout au long du cycle cellulaire et pauvre en gènes activement transcrits ; (ii) l'euchromatine, moins condensée et riche en gènes activement transcrits.

Des processus biologiques sont responsables de l'établissement et du maintien de ces domaines chromatiniens. Ces mécanismes sont indispensables à la cellule car l'organisation de la fibre peut être déstabilisée par l'action des enzymes des métabolismes de l'ADN. En effet, ces protéines sont capables de générer des contraintes de tension et de torsion. Ces complexes protéiques ne se déplacent pas le long de la molécule, mais transloquent l'ADN vers eux pour avoir accès à la séquence nucléotidique.

Pour cette raison, nous avons choisi de nous intéresser au comportement de la chromatine soumise à ces contraintes mécaniques. Le développement des expériences dites de "molécules uniques", au cours de la dernière décennie, a offert la possibilité de manipuler une fibre unique de chromatine. Ces systèmes allient une résolution spatiale de l'ordre de la dizaine de nanomètres, la possibilité d'exercer des forces de l'ordre du piconewton et un suivi en temps réel.

Nous avons choisi d'utiliser un dispositif de *pinces magnétiques* qui offre en outre la possibilité d'exercer une contrainte de rotation. Ce système nous a permis de manipuler une fibre de nucléosomes et d'étudier sa réponse lorsqu'elle est soumise à une contrainte de rotation. Au cours de leurs thèses, Aurélien Bancaud et Gaudeline Wagner avaient mis en évidence une élasticité en rotation remarquable de la fibre de nucléosomes en comparaison de la molécule d'ADN nu.

Leurs résultats ont été établis sur des fibres de nucléosomes auxquelles il manquait une histone : *l'histone de liaison*. Cette protéine, présente au sein du noyau des cellules eucaryotes, a un rôle majeur dans l'accès à un degré de condensation supérieur de la chromatine. L'histone de liaison se lie aux ADN entrants et sortants des nucléosomes. Cette fixation modifie les propriétés topologiques des particules. Il nous a donc semblé important de caractériser le comportement mécanique des fibres de chromatines contenant cette histone.

Mon travail a consisté en la préparation de fibres de chromatine contenant l'histone de liaison H5 pouvant être analysées sous pincés magnétiques. L'analyse du comportement de ces fibres nous a donné accès à l'influence de l'histone de liaison dans la réponse mécanique de la fibre de chromatine.

Ce manuscrit de thèse décrira dans un premier temps l'état des connaissances concernant la structure et la dynamique de la chromatine. Dans le deuxième chapitre nous introduirons les outils physiques permettant l'analyse et la description de l'ADN et de la chromatine. Enfin, la dernière partie présentera les résultats obtenus sur les fibres de chromatine contenant l'histone de liaison.

CHAPITRE 1

Organisation et dynamique de la chromatine

Sommaire

1	La structure de la chromatine	14
1.1	De l'ADN à la chromatine	14
1.2	Le nucléosome : motif élémentaire de la chromatine	21
2	Hiérarchisation de la compaction de la chromatine	30
2.1	Le chapelet de nucléosomes	30
2.2	La fibre de 30 nm	32
3	Dynamique de l'organisation chromatinienne	39
3.1	Les modifications covalentes des histones	39
3.2	Insertion de variants d'histones	42
3.3	Les facteurs de remodelage	45

1 La structure de la chromatine au sein du noyau des cellules eucaryotes

1.1 De l'ADN à la chromatine

Désormais l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) a quitté le champ unique de la science et des laboratoires pour s'inviter dans des débats de sociétés.

1 - L'ADN, support de l'information génétique

L'ADN est une longue molécule contenue dans le noyau des cellules eucaryotes et dans le nucléoïde des cellules bactériennes. Elle a été l'objet de recherche pendant plus d'un siècle afin d'en élucider composition et structure. Au milieu du *XIX^{eme}* siècle F. Miescher isole une substance riche en phosphore qu'il nomma *nucléine* (pour noyau en grec).

En 1889 Altmann sépare à partir de la nucléine des protéines et un acide qu'il nomme alors acide nucléique. Rapidement l'Allemand Kossel découvre dans cet acide les 4 bases azotées Adénine (A), Cytosine (C), Thymine (T) et Guanine (G), leurs structures chimiques sont indiquées sur la figure (Figure 1.2a). Ce n'est que dans les années 1930 qu'un autre constituant de l'ADN est découvert par les Américains Levine et Jacobs, le *désoxyribose*, on parle à partir de cette date d'*Acide DésoxyriboNucléique* (Figure 1.2b).

Si la composition chimique de l'ADN est connue, sa structure et sa fonction sont alors toujours ignorées. En 1944, Avery, MacLeod et MacCarthy ont mis en évidence le fait que l'ADN est bien le support de l'information héréditaire (Figure 1.1), en se basant sur l'expérience réalisée par Griffith quelques années plus tôt. Leur découverte resta controversée de nombreuses années, c'est pourquoi ils n'obtinrent pas le Prix Nobel.

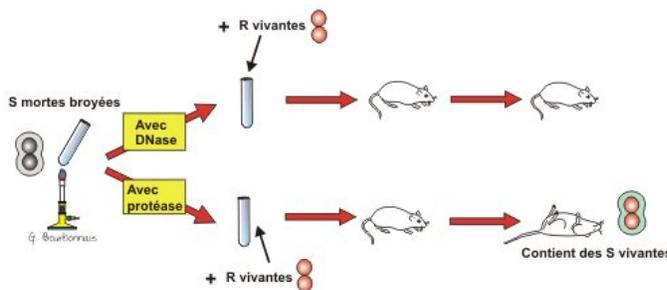


FIGURE 1.1 – Expérience d'Avery, MacLeod, MacCarthy. La transmission de l'information héréditaire se fait par l'ADN [Avery *et al.*, 1944].

La plupart des biologistes de l'époque pensait que l'ADN était une molécule trop simple pour contenir l'information nécessaire au vivant, alors que les protéines semblaient des candidates plus convaincantes puisque plus complexes... Même si les protéines ont été écartées en tant que support de l'information héréditaire, nous verrons dans la suite de ce manuscrit qu'il existe des modifications héréditaires de l'expression des gènes qui ne sont associées à aucune modification de l'ADN, c'est le

cadre de l'épigénétique.

La dernière contribution majeure en ce qui concerne l'ADN revient à Watson, Crick, Wilkins et Franklin pour la découverte de la structure de cette molécule

[Watson et Crick, 1953]. Grâce à des expériences de diffraction des rayons X en 1953, ils découvrent que l'ADN est formée de deux brins qui s'enroulent l'un autour de l'autre en une double hélice, l'association entre les deux brins est stabilisée par la complémentarité entre les bases azotées (A avec T, G avec C) (Figure 1.2c). L'idée d'une telle complémentarité est issue des observations de Chargaff (1949) qui avait mis en évidence que les bases azotées A et T (resp. G et C) étaient présentes en quantités sensiblement égales dans l'ADN. Par conséquent, l'enchaînement des bases sur un brin impose la séquence sur l'autre brin, on dit alors que A/T et G/C forment des paires de bases, que l'on notera *pb* par la suite.

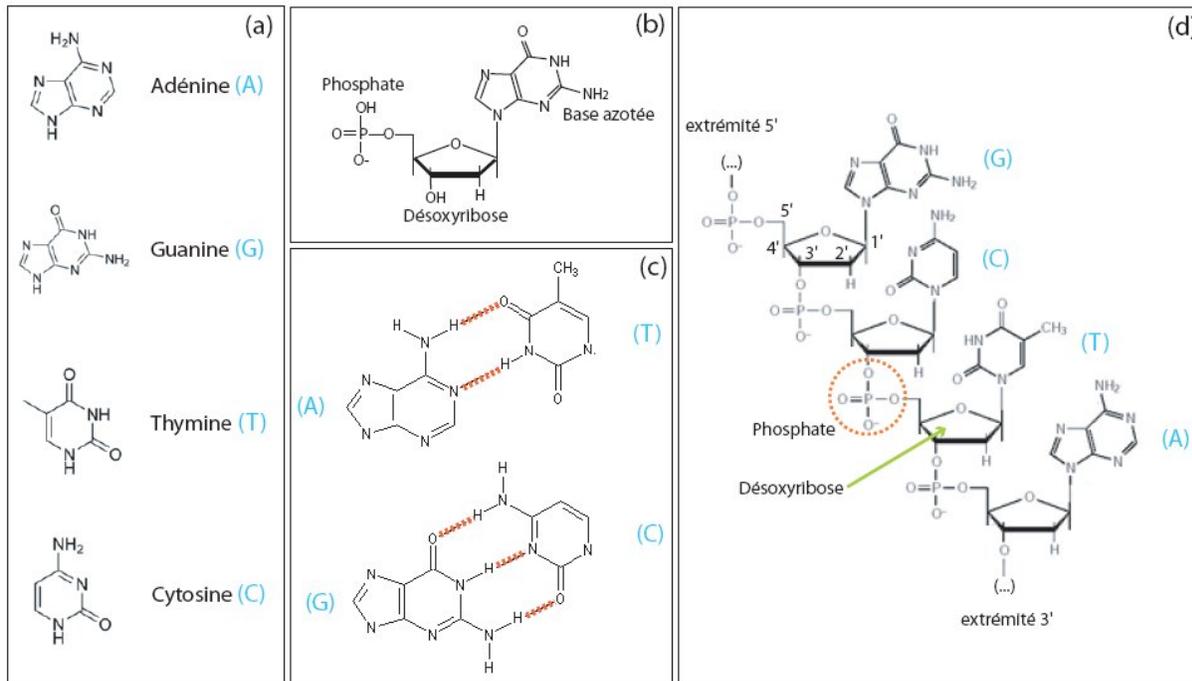


FIGURE 1.2 – Formules chimiques des constituants de l'ADN. (a) Structures chimiques des quatre bases azotées accrochées au squelette sucrophosphate de l'ADN. (b) Structure d'un nucléotide : le désoxyribose porte sur le carbone 5' un groupement phosphate et sur le carbone 1' une base azotée (ici la guanine). (c) Appariement des paires de bases. A et T interagissent en formant deux liaisons hydrogène, G et C en forment trois. (d) Enchaînement des nucléotides sur un brin d'ADN par l'intermédiaire de ponts phosphodiester.

2 - Détails structuraux de la double hélice d'ADN

Revenons plus en détail sur la structure de la molécule d'ADN. Comme l'ont démontré Watson et Crick les deux brins complémentaires sont composés d'un squelette sucrophosphate (chargé négativement) sur lequel s'enchaînent A, C, G et T (cf (Figure 1.2d). Le brin est donc formé d'une succession de *nucléotides*, constitués d'un désoxyribose auquel est lié un groupement phosphate sur le carbone 5', la base azotée est, elle, portée par le carbone 1' (Figure 1.2b). Le lien entre chaque nucléotide consiste en la liaison du groupement phosphate avec la fonction hydroxyle (en 3') du nucléotide suivant, formant une

liaison *phosphodiester*. En ce sens, les deux brins complémentaires se font face de façon antiparallèle. Par convention la séquence d'une molécule d'ADN est donnée dans le sens 5' vers 3'.

Les bases azotées interagissent entre elles en formant des liaisons hydrogène (Figure 1.2c). En particulier la paire A/T est stabilisée par 2 liaisons H alors que la paire G/C l'est par 3 liaisons H. On comprend dès à présent que la stabilité de la molécule d'ADN dépendra de sa composition en bases azotées, autrement dit de sa séquence.

La structure de la molécule d'ADN dépend de nombreux paramètres environnementaux, comme par exemple le solvant, la salinité, la température... Dans les conditions physiologiques à 37°C la forme prédominante est l'ADN-B. Dans ces conditions, la molécule s'enroule en une double hélice droite, c'est à dire qu'elle tourne dans le sens trigonométrique. Cette hélice présente un diamètre de 24 Å, avec un pas de 36 Å (Figure 1.3b). Un tour d'hélice contient en moyenne 10.5 pb (avec des variations selon la séquence entre 9.9 et 11.1 pb/tour). La présence de charges sur les groupements phosphate confère à l'ADN une densité linéique de charges, qui est de l'ordre de deux charges élémentaires pour 3,4 Å.

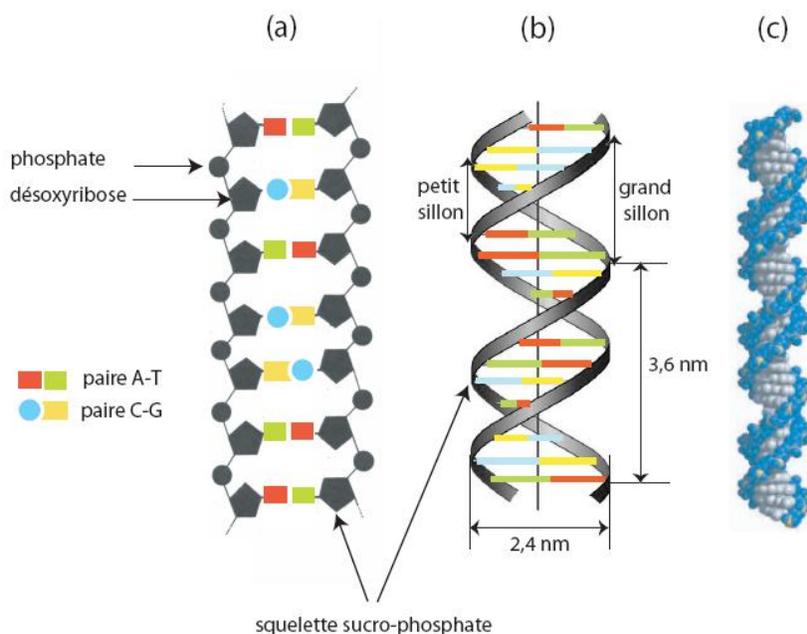


FIGURE 1.3 – Structure de la forme B de l'ADN : (a) représentation de l'interaction entre deux brins complémentaires. (b) Représentation de la structure en double hélice droite. (c) Structure atomique de la double hélice d'ADN-B.

La dépendance en température de la structure de l'ADN est mise à profit dans de nombreuses expériences lorsque l'on veut obtenir deux simples brins à partir d'un double brin. Pour ce faire il suffit d'augmenter la température de l'échantillon jusqu'à 95°C. Un refroidissement rapide sur glace permet de stabiliser l'état simple brin. Un autre paramètre qui dépend de la température est le pas de la double hélice. En effet celui-ci a tendance à être

plus court à basse température et plus long à plus haute température, il n'est pas possible de donner des valeurs précises pour ces variations puisqu'elles sont fortement dépendante de la séquence nucléotidique [Sivolob et Prunell, 2003].

En ce qui concerne les propriétés mécaniques de l'ADN, ce sont celles d'un polymère. On peut définir sa *longueur de persistance*. C'est la longueur qu'il faut parcourir le long de la molécule pour perdre toute corrélation entre les directions de l'axe de la double hélice. Cette perte de corrélation est liée à l'agitation thermique. Un polymère qui aurait une longueur égale à sa longueur de persistance aurait alors la forme d'un petit bâtonnet, tandis que si sa longueur est bien plus importante alors il apparaîtra sous la forme d'une pelote entremêlée.

Un polymère synthétique tel que le polystyrène a une longueur de persistance de 9.2 Å [Degiorgio *et al.*, 1991]. En ce qui concerne l'ADN-B sa longueur de persistance ξ_{dsDNA} vaut environ 50 nm [Smith *et al.*, 1996] [Allemand, 1997], ce qui en fait un polymère beaucoup plus rigide. Lorsque l'ADN est sous forme simple brin sa longueur de persistance diminue alors grandement et se rapproche de celle du polystyrène, $\xi_{ssDNA} \sim 7.5$ Å. Dans toute la suite de l'exposé, nous ne ferons plus référence qu'à l'ADN-B.

Les propriétés mécaniques de l'ADN peuvent être modifiées par les conditions salines [Schlick *et al.*, 1994] et bien évidemment par l'interaction avec de nombreuses protéines [McCaughey *et al.*, 2005] [van Noort *et al.*, 2004]. Sa réponse à des contraintes mécaniques lorsqu'elle est sous forme de chromatine demande de connaître plus exactement la nature de ce complexe nucléoprotéique afin de mieux décrire l'état de l'ADN au sein du noyau des cellules eucaryotes. C'est pourquoi nous allons nous intéresser dans la suite à ce qu'est la chromatine.

3 - Les histones : principaux constituants de la chromatine

La chromatine est un assemblage nucléoprotéique entre la double hélice et des protéines : les histones. Ces protéines ont été découvertes en 1884 par Kossel et ont été tout d'abord considérées comme les éléments porteurs de l'information génétique. Ce sont de petites protéines basiques dont on peut définir cinq types différents : H1, H2A, H2B, H3 et H4 (voir table 1.1 pour leur caractéristiques physico-chimiques). On les retrouve en même quantité (en masse) que l'ADN dans le noyau des cellules eucaryotes.

Ces protéines sont indispensables aux cellules eucaryotes et font partie des protéines les mieux conservées au cours de l'évolution, comme le montre la comparaison entre les histones H4 du veau et du petit pois [DeLange *et al.*, 1969], 100 des 102 acides aminés de cet histone sont identiques.

Nous verrons ci-dessous que le premier niveau de compaction de la chromatine consiste en l'enroulement de ~ 146 pb d'ADN autour d'un coeur protéique de huit histones : cet octamère se compose de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4. C'est pourquoi

Histone	Masse Moléculaire (kDa)	Acides aminés ($\frac{\text{basiques}}{\text{acides}}$)	% Résidus basiques	
			Lysine	Arginine
H1	21,13	223 (5,4)	29,5	1,3
H2A	13,96	129 (1,4)	10,9	9,3
H2B	13,77	125 (1,7)	16	6,4
H3	15,27	135 (1,8)	9,6	13,3
H4	11,24	102 (2,5)	10,8	13,7

TABLE 1.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des différentes histones.

ces dernières sont appelées *histones de coeur*. L'histone H1 est quant à elle appelée *histone de liaison*.

4 - Détails structuraux des histones de coeur

L'octamère d'histones de coeur est en fait constitué de deux dimères (H2A,H2B) et d'un tétramère (H3,H4)₂. En absence d'ADN et en conditions physiologiques (~100 mM de cations monovalents), les histones s'associent sous forme de ces dimères et tétramères. L'interaction histone-histone se fait grâce à un motif structural particulier en "poignée de main" (Figure 1.4c) [Arents *et al.*, 1991]. Ce motif est rendu possible par la structure particulière que partagent les histones nommée *histone fold* [Arents et Moudrianakis, 1995].

Ce domaine *histone fold* constitue la partie centrale de l'histone, d'une longueur d'environ 70 acides aminés (Figure 1.4a). Il comprend, dans l'ordre, 3 à 4 tours en hélice α (α 1), une boucle de 7-8 acides aminés (L1), 8 tours en hélice α (α 2), une boucle de 6 acides aminés (L2) et pour finir, 2 à 3 tours en hélice α (α 3) (Figure 1.4b). En bordure de cet *histone fold*, certaines histones présentent des éléments structuraux moins uniformes que ce motif particulier (Figure 1.4a), on les nomme *extension du domaine histone fold*.

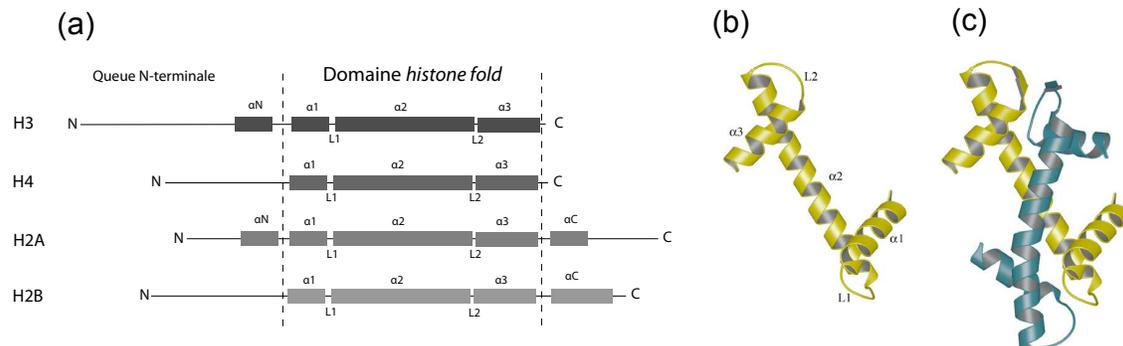


FIGURE 1.4 – Structure de l'"*histone fold*" à gauche. A droite : motif en "poignée de main"

L'extrémité N-terminale¹ des histones est un domaine non structuré qui contient la majorité des résidus chargés positivement de la protéine. Ce domaine, appelé *queue N-terminale*, n'est pas directement impliqué dans la stabilisation de l'octamère (des mutants d'histones privés de cette partie forment encore un octamère [Gordon *et al.*, 2005]), mais semble soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles², comme l'acétylation³ ou la phosphorylation [Jenuwein et Allis, 2001].

Les *queues C-terminales* des histones H3 et H4 sont très courtes alors que celles de H2A et H2B sont plus longues et contiennent une partie structurée en hélice α notée αC . Il a été proposé que l'ensemble des modifications post-traductionnelles de la chromatine puisse constituer un "code des histones". Chaque combinaison de modifications pourrait conférer des propriétés (chimiques ou mécaniques) particulières à la chromatine et ainsi modifier l'expression génétique [Jenuwein et Allis, 2001, Strahl et Allis, 2000]. C'est le domaine d'investigation de l'épigénétique. Il convient d'apporter une précision, l'épigénétique concerne l'étude des modifications héréditaires de phénotypes qui n'impliquent pas de modifications de la séquence d'ADN. La question est de savoir si ces modifications de la chromatine transmettent l'information épigénétique ou bien si elles la mettent en oeuvre. Dans le cas d'une transmission de l'information, il doit exister des mécanismes de transmission des modifications au moment de la réplication d'ADN. Un tel mécanisme n'a été identifié pour l'instant que pour la méthylation de H3K9 [Kouzarides, 2007].

Nous reviendrons par la suite plus en détails sur les conséquences structurelles de ces modifications post-traductionnelles.

5 - Les histones de liaison

L'histone de liaison canonique H1 ne possède ni analogie de séquence ni analogie de structure avec les histones de coeur. Les histones de liaison sont de plus grosses protéines (~ 21 kDa pour H1) qui présentent trois domaines : les deux extrémités N et C terminales (~ 20 et ~ 100 acides aminés respectivement) sont peu structurées et riches en Lysine et Sérine. La partie centrale d'environ 80 acides aminés est un domaine globulaire structuré (Figure 1.5.) Dans la plupart des cas, il est composé de 3 hélices α et de deux à trois feuilletts β .

A nouveau de nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent être portées par les parties non structurées de cette histone [Godde et Ura, 2008].

6 - Les variants des histones

En plus des cinq histones *conventionnelles* (ou *canoniques*) présentées ci-dessus un certain nombre de variants ont été identifiés. Les variants sont des isoformes non-alléliques

1. C'est l'extrémité de la protéine qui se termine par un groupement amine NH_2 . L'autre extrémité, appelée C-terminale, se termine par un groupement acide carboxylique COOH .

2. C'est l'ensemble des modifications chimiques que peut subir la chromatine lorsque sont exprimés les gènes qu'elle contient.

3. L'acétylation neutralise des charges positives, donc diminue la charge globale des histones.

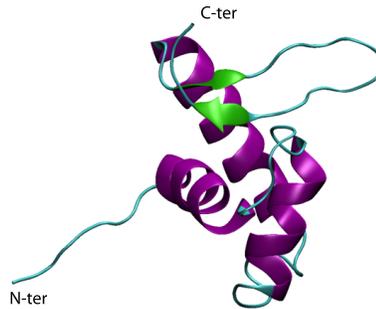


FIGURE 1.5 – Structure du domaine globulaire de l’histone H1 de la levure *Sacharomyces Cerevisiae*. (PDB : 1UHM)

des histones conventionnelles, c’est à dire que ce sont des protéines dont la séquence peptidique est proche de celle d’une histone et dont le gène correspondant est situé à une autre position dans le génome.

Le degré d’homologie entre une histone canonique et ses variants peut aller de 48% à 99.9% [Sarma et Reinberg, 2005]. Certains sont très conservés dans le règne eucaryote, comme H2A.Z, alors que d’autres ne sont présents par exemple que chez les mammifères, comme H2A.Bbd [Malik et Henikoff, 2003].

Des variants ont été identifiés pour chaque classe d’histones, toutefois H2B et H4 n’en présentent que très peu alors que H2A et H3 se déclinent sous de nombreuses formes, tout comme l’histone de liaison H1.

Variants de H3 L’histone H3 présente cinq isoformes chez les mammifères : H3.1, H3.2, H3.3, H3t et CENP-A. Les différences sont minimales entre les variants et l’histone conventionnelle bien que leurs fonctions et leur distribution dans la chromatine soient spécifiques. Par exemple le variant H3.3 est enrichi dans les zones de transcriptions actives chez l’homme, il est dans ce cas soumis à des modifications post-traductionnelles spécifiques [Hake et al., 2006].

Un variant très important de H3 est CENP-A (pour Centromeric Protein A), qui est un variant centromérique impliqué dans la structure du centromère⁴. CENP-A est apparu comme étant le porteur de l’information épigénétique du centromère [Black et Bassett, 2008]. Son *histone fold* est homologue à 60% à celui de H3, et il est supposé que CENP-A remplace l’histone canonique dans la chromatine centromérique. Toutefois le mécanisme de localisation spécifique de ce variant n’est toujours pas connu avec précision.

Variants de H2A L’histone H2A est celui qui compte le plus grand nombre de variants. Certains sont présents chez tous les eucaryotes, H2A.X et H2A.Z par exemple,

4. Le centromère est le domaine du chromosome par lequel sont liés les deux chromatides et sur lequel s’assemble les kinétochores, complexes protéiques responsables de la ségrégation équitable des deux chromatides soeurs entre les deux cellules filles.

d'autres ne le sont que chez les vertébrés, comme macroH2A, tandis que quelques uns n'existent que chez les mammifères, H2ABbd en est un exemple [Malik et Henikoff, 2003].

H2A.Z est celui dont la fonction a été la plus étudiée. Son implication dans l'activation [Allis *et al.*, 1986] et la répression des gènes [Rusche *et al.*, 2003] et dans la ségrégation des chromosomes [Krogan *et al.*, 2004] a été mise en évidence.

H2A.X est aussi très étudiée. Ce variant joue un rôle crucial dans la détection des dommages causés à l'ADN. H2A.X est très semblable à l'histone conventionnelle⁵, il se distingue principalement par un motif SQ au niveau de sa queue terminale. Lors d'une cassure double brin de l'ADN les variants H2A.X localisés au voisinage de ce dommage vont subir une phosphorylation de ce motif SQ, et c'est cette forme phosphorylée γ H2A.X qui va être reconnue par la machinerie de réparation [Stucki *et al.*, 2005].

MacroH2A est un variant de grande taille (comme son nom l'indique) spécifique des vertébrés. Il comporte un domaine identique à 65% à H2A et se termine en partie C-terminale par un large domaine (~ 20 kDa [Pehrson et Fried, 1992]) qui compte pour les deux tiers de la protéine. On pense que macroH2A exerce une activité de répression en agissant sur la structure de la chromatine [Angelov *et al.*, 2003] et sur l'initiation de la transcription [Doyen *et al.*, 2006].

H2ABbd est lui spécifique des mammifères, il n'a été identifié que très récemment, en 2001 [Chadwick et Willard, 2001]. Son homologie avec H2A est de 48%, ce qui en fait le variant le plus spécifique découvert jusqu'à maintenant. Il ne compte que 115 acides aminés, donc est plus petit que l'histone conventionnelle (voir table 1.1). Ce variant a pour spécificité d'être exclu du chromosome X inactif.

Variants de H1 L'histone de liaison également se présente sous différentes formes. En particulier chez les vertébrés, on rencontre au cours du développement des variants de H1 différents, que l'on retrouve spécifiquement dans les tissus. Par exemple H1t est un variant spécifique des testicules chez les mammifères [Khochbin et Wolffe, 1994].

Un autre variant majeur de l'histone de liaison est H5, que l'on trouve dans les érythrocytes aviaires⁶. H5 présente une interaction plus forte que les autres variants au sein de la chromatine, c'est pourquoi il a été très étudié et constitue une protéine de choix dans des expériences de biochimie. Nous reviendrons plus loin sur ce variant particulier de l'histone de liaison.

1.2 Le nucléosome : motif élémentaire de la chromatine

Nous avons vu dans la partie précédente que d'un point de vue chimique la chromatine est composée d'ADN et d'histones. Nous allons voir dans la suite comment interagissent ces histones avec l'ADN pour former l'unité de base de la chromatine : le *nucléosome*.

5. Chez *S. Cerevisiae* H2A.X est la forme prédominante.

6. Les érythrocytes sont les globules rouges. Chez les aviaires cette cellule ne subit pas la perte de son noyau, donc contient encore de la chromatine.

1 - La chromatine est constituée d'un motif élémentaire répété

L'organisation de l'ADN sous forme ordonnée au sein des noyaux eucaryotes est restée mystérieuse de nombreuses années. Aujourd'hui encore peu de certitudes sont acquises, la chromatine est loin d'avoir révélé tous ses mystères. Même si les composants chimiques ont été identifiés, ce n'est qu'au début des années 70 que des avancées significatives ont été faites en ce qui concerne la façon dont s'organisent intimement ADN et histones. En 1973 Hewish et Burgoyne ont démontré que l'action de certaines nucléases⁷ sur la chromatine conduisait à la formation de fragments d'ADN de 200 pb environ, ou bien de multiples de 200 pb, associés à des histones [Hewish et Burgoyne, 1973]. Ce qui laisse à penser que la chromatine s'organise en une structure répétitive.

R.D. Kornberg⁸ a, à la même époque, prouvé que les histones s'organisent en oligomères. Il proposa alors l'existence d'un motif élémentaire, constitué d'environ 200 pb et d'un octamère d'histone (H2A, H2B, H3 et H4 répétées deux fois) [Kornberg et Thomas, 1974, Kornberg, 1974]. Il propose également que cette particule se répète le long de la fibre d'ADN, pour former ce que l'on nomme un *collier de perles*. En 1975 Oudet et coll. ont proposé d'appeler cette particule *nucléosome* [Oudet et al., 1975].

Les recherches menées depuis ont permis de définir avec précisions l'interaction entre l'ADN et les histones au sein de cette particule.

2 - Le nucléosome

Définissons tout d'abord ce que l'on nomme *particule de cœur du nucléosome* (ou PCN). Il s'agit de l'enroulement de 147 ± 2 pb d'ADN autour d'un octamère d'histones (constitué de 2 copies de chaque histone). L'ADN engagé dans cette particule est nommé *ADN nucléosomal*⁹, il s'enroule en une *superhélice* gauche d'environ 1.65 tours¹⁰.

L'ADN qui entre dans le nucléosome est appelé *ADN entrant*, l'ADN qui sort du nucléosome est appelé *ADN sortant*. L'ADN qui relie deux nucléosomes successifs est *l'ADN de liaison*.

On nomme *longueur de répétition*¹¹ la somme des longueurs de l'ADN nucléosomal et de l'ADN de liaison. On utilisera par la suite indifféremment longueur de répétition et

7. Les nucléases sont des enzymes qui coupent les liaisons phosphodiester des brins d'acide nucléique entre deux nucléotides.

8. qui a reçu le prix Nobel de chimie pour son travail sur l'ARN polymérase.

9. C'est cet ADN nucléosomal qui était moins soumis à l'action de la nucléase dans l'expérience de Burgoyne et Hewish. Conduisant ainsi à la formation de fragment de longueur plus importante.

10. On parle de *superhélice* quand une structure hélicoïdale effectue des croisements avec elle-même. Nous reviendrons plus loin dans le manuscrit sur la topologie de cet enroulement.

11. En anglais on parle de Nucleosome Repeat Length (NRL).

longueur de l'ADN de liaison.

La structure cristallographique de la particule de cœur du nucléosome a été obtenue en 1997 par Luger et coll. [Luger *et al.*, 1997] avec une résolution de 2.8 Å^{12 13} (Figure 1.6), il s'agissait d'une particule formée avec des histones recombinantes et une séquence d'ADN palindromiques¹⁴. La structure contient la totalité du fragment d'ADN et environ 80% des chaînes peptidiques de chaque histone. En particulier le domaine histone fold est visible et ce sont les queues non structurées des histones qui sont invisibles¹⁵.

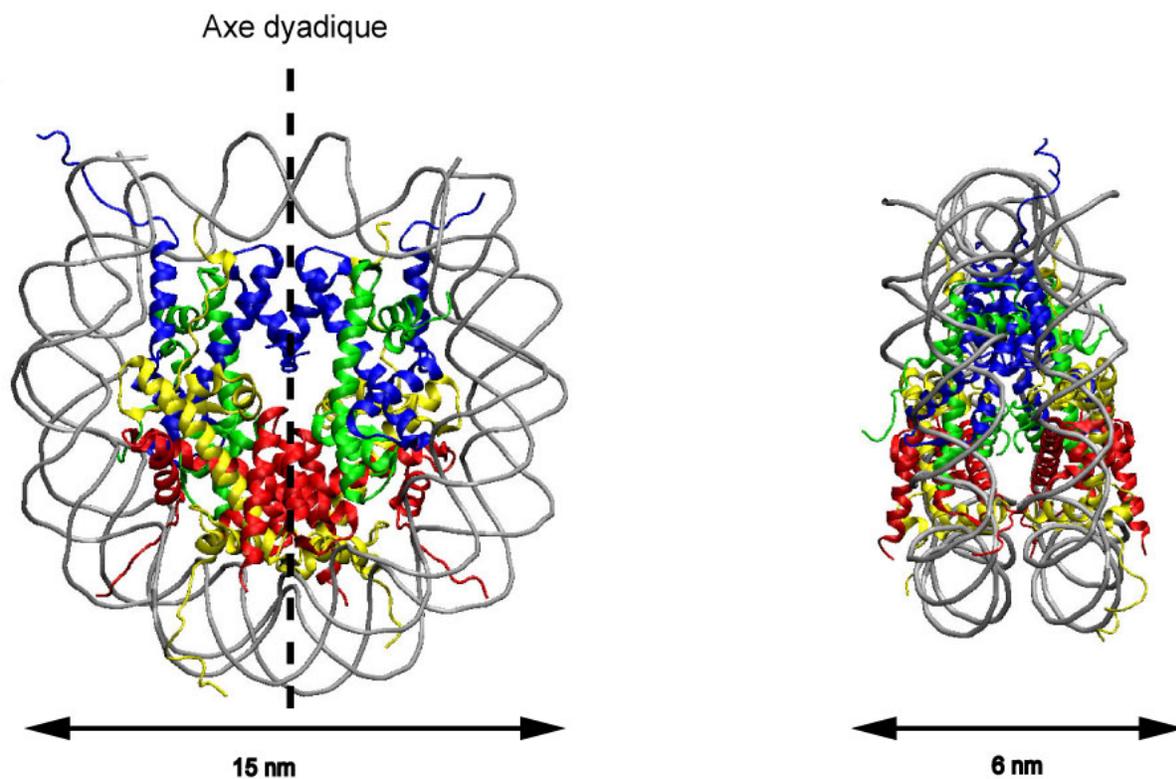


FIGURE 1.6 – Structure cristallographique de la particule de cœur du nucléosome à 2.8 Å (PDB : 1AOI)

L'octamère d'histones s'organise par l'interaction des deux dimères (H2A,H2B) sur chacune des faces du tétramère (H3, H4)₂, via des interactions de types électrostatiques entre les surfaces des protéines. En ce qui concerne le tétramère, sa structure consiste en l'association de deux dimères (H3,H4) liés entre eux par un motif à quatre hélices (*four-helix bundle*) (Figure 1.7.)

12. référencé dans la Protein DataBank sous le numéro 1AOI.

13. En 2003 a été proposée une structure avec une résolution de 1.9 Å [Richmond et Davey, 2003].

14. Il s'agit d'une séquence qui se lit indifféremment dans le sens 5' vers 3' ou bien 3' vers 5'.

15. N'ayant pas de structure ces queues d'histones ne sont pas organisées dans le cristal donc non visible.

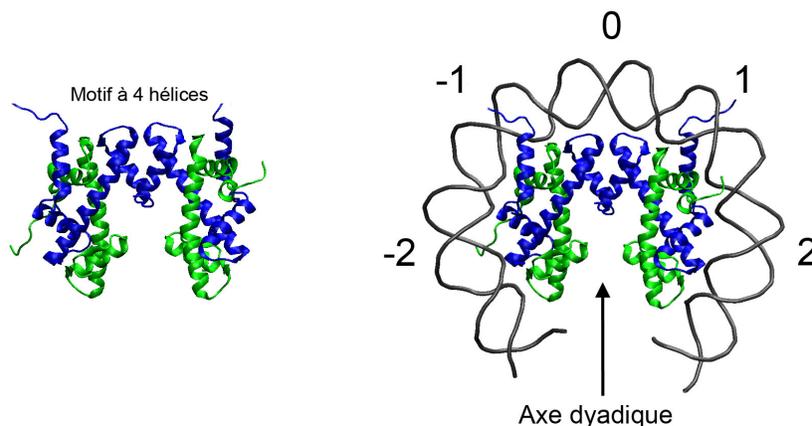


FIGURE 1.7 – Structure cristallographique du tétramère $(H3,H4)_2$ à gauche. A droite, enroulement de l'ADN autour du tétramère. Les SHL 0, ± 1 et ± 2 sont indiqués, ainsi que la position de l'axe dyadique.

Organisation de l'ADN nucléosomal L'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histone est le premier degré de compaction de cette longue molécule. D'un point de vue géométrique, la molécule effectue 1,65 tours en hélice gauche, avec un pas hélical de 25.9 Å, le rayon de courbure moyen est de 41.9 Å [Richmond et Davey, 2003]. Le diamètre de cette particule est de 15 nm, sa hauteur est de 6 nm.

La particule de cœur possède un axe de symétrie binaire, nommé *axe dyadique*. Il est indiqué en pointillé sur la figure 1.6. Par rapport à cet axe les ADN entrant et sortant sont symétriques.

Les queues non structurées des histones H2B et H3 interagissent avec l'ADN nucléosomal. La queue de H2B s'intercale entre les tours d'ADN, et celle de H3 interagit avec les ADN entrant et sortant.

La stabilisation de l'ADN nucléosomal autour de l'octamère d'histones se fait par des points d'interactions très particuliers nommés *SuperHelix Locations* ou SHL [Luger et Richmond, 1998]. Il s'agit de l'interaction entre l'arginine, un acide aminé très chargé, et le petit sillon de l'ADN. On compte 14 SHL dans la particule de cœur, lorsque le petit sillon de l'ADN fait face à l'octamère d'histones. Les SHL sont numérotés ± 0.5 , ± 1.5 , ± 2.5 , ± 3.5 , ± 4.5 , ± 5.5 , ± 6.5 . Le point de référence 0 est défini par l'intersection entre l'axe dyadique et l'ADN nucléosomal au niveau du motif à 4 hélices de l'interface H3-H3 (Figure 1.7) et correspond à un petit sillon tourné vers l'extérieur, c'est pourquoi les SHL sont demi-entiers.

Lorsque l'on regarde précisément l'ADN nucléosomal, on s'aperçoit que sa périodicité n'est pas la même que pour un ADN libre de toute interaction. Les points d'ancrage sur l'octamère d'histones contraignent la double hélice, et c'est l'espacement entre ces SHL qui donne la nouvelle périodicité. [Luger *et al.*, 1997] donne comme pas hélical 10.2 pb et [Richmond et Davey, 2003] donne 10.3 pb, à comparer avec la valeur moyenne pour

un ADN libre de 10.5. Les valeurs obtenues sont des moyennes du pas le long de l'ADN nucléosomal, car cette périodicité change le long de l'octamère. Elle est en effet plus élevée au centre et plus faible aux extrémités de l'ADN nucléosomal.

Il faut noter que la différence entre les deux valeurs obtenues vient du fait que Luger et coll. ont utilisé un ADN de 146 pb alors que Richmond et Davey ont utilisé un ADN de 147 pb. La structure cristallographique donne donc de très précieuses indications, mais est très dépendante du substrat utilisé. Il convient donc de garder à l'esprit que ce n'est qu'une des architectures que peut prendre la particule de cœur *in vivo*.

3 - Le chromatosome

Chromatosome est le nom que l'on donne à un nucléosome qui contient l'histone de liaison [Simpson, 1978]. Il n'existe malheureusement aucune structure cristallographique du chromatosome, cette particule n'ayant jamais été cristallisée. La position exacte de l'histone de liaison est donc inconnue. Toutefois on commence à avoir une idée assez précise de cette localisation.

La présence de l'histone de liaison protège 20 pb d'ADN supplémentaires lors de la digestion de la chromatine par la micrococcale [Puigdomènech *et al.*, 1983]. On en déduit donc que l'histone de liaison se localise en périphérie de la particule de cœur du nucléosome au niveau de l'axe dyadique. Même si les premiers modèles décrivaient un attachement symétrique par rapport au dyade [Allan *et al.*, 1980], des données plus récentes ont mis en évidence une interaction assymétrique [Zhou *et al.*, 1998, Pruss *et al.*, 1996].

La localisation précise de l'histone de liaison est toujours l'objet de nombreuses recherches, beaucoup d'équipes s'intéressent pour cela au positionnement de la partie globulaire de H1 ou de H5. Il en résulte que la partie structurée de cette histone se lie avec deux hélices d'ADN [Draves *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 1992]. Des expériences de mutagénèses dirigées ont également mis en évidence la présence de deux sites indispensables à l'incorporation de GH5¹⁶ dans le chromatosome [Goytisolo *et al.*, 1996].

Zhou et coll. ont montré que GH5 est non pas en contact avec les ADN entrants et sortants mais avec l'ADN participant au tour central de la superhélice et avec un seul des deux brins entrants ou sortants [Zhou *et al.*, 1998]. Quant à la queue C-terminale de l'histone de liaison, elle pourrait interagir avec les ADN entrants/sortants. En effet il a été montré que la morphologie de ces deux brins était dépendante de la longueur de cette queue C-terminale [Hamiche *et al.*, 1996b]. En particulier des expériences de microscopie électronique ont mis en évidence une structure particulière impliquant les ADN entrants et sortants. Ceux-ci forment une *tige* en sortie de la particule de cœur lorsque la queue C-terminale de H5 est présente (Figure 1.8c).

4 - Effet de la séquence d'ADN

Certaines séquences d'ADN ont plus d'affinités que la moyenne pour l'octamère d'histones. On les nomme *séquences positionnantes*. Par exemple, le gène de l'ARN ribosomique

16. Il s'agit de la partie globulaire de l'histone H5.

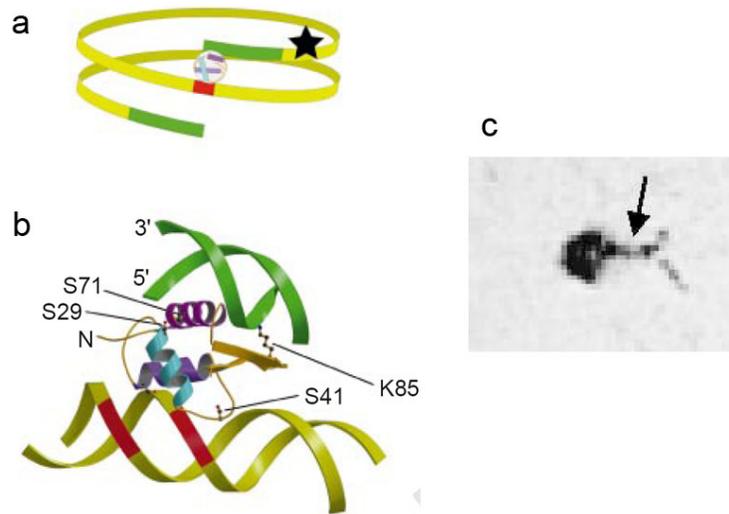


FIGURE 1.8 – Localisation de l'histone de liaison. (a) Modèle de localisation proposé par [Zhou *et al.*, 1998]. (b) Détail de l'interaction entre la partie globulaire de H5 et l'ADN d'un brin entrant/sortant (en vert) et l'ADN du tour central de la PCN (en rouge), d'après [Zhou *et al.*, 1998]. (c) Cliché de microscopie électronique montrant le chemin des ADN entrant et sortant contraints par la partie C-terminale de l'histone de liaison H5 [Hamiche *et al.*, 1996b].

5S a une séquence qui favorise énergétiquement l'assemblage d'un nucléosome. Par rapport à une séquence aléatoire, la stabilisation énergétique est de l'ordre de 3 à 5 $k_B T$ par nucléosome en faveur de 5S [Gottesfeld et Luger, 2001]. Dans le cas de 5S, une explication possible peut être le fait que cette séquence possède une courbure intrinsèque, ce qui peut rendre l'enroulement autour de l'octamère d'histones plus aisé [Hayes *et al.*, 1990].

S'il existe d'autres exemples de séquences positionnantes naturelles (comme dans les régions centromériques α satellites par exemple), des séquences artificielles ont été très largement utilisées ces dernières années pour étudier le nucléosome. En 1998, Widom et coll. ont créé la séquence positionnante la plus couramment utilisée : la séquence 601 [Lowary et Widom, 1998, Thastrom *et al.*, 1999]. Cette séquence a été conçue par sélection successive à partir d'un ensemble de séquences aléatoires. Cette méthode, dénommée *SELEX*, est une méthode itérative qui permet de sélectionner, à chaque cycle, les 10% de séquences avec le plus d'affinités pour le nucléosome. En ce qui concerne la séquence 601, la sélection a été faite sur un fragment central de 72 pb, qui correspondent au tour central d'ADN nucléosomal. Cette séquence synthétique présente une constante d'équilibre environ 150 fois plus élevée que celle de la séquence 5S, en terme d'énergie cela représente une stabilisation supplémentaire d'environ 5 $k_B T$.

Les séquences positionnantes possèdent des caractéristiques communes quant à leurs séquences nucléotidiques. On retrouve très souvent des motifs particuliers avec une périodicité proche du pas hélical de l'ADN nucléosomal. Certains de ces motifs sont connus pour faciliter la courbure de l'ADN, permettant ainsi son enroulement autour de l'octa-

mère d'histones. C'est par exemple le cas des motifs AA/TT/TA répétés toutes les 10 pb environ (Figure 1.9) [Lowary et Widom, 1998, Segal *et al.*, 2006].

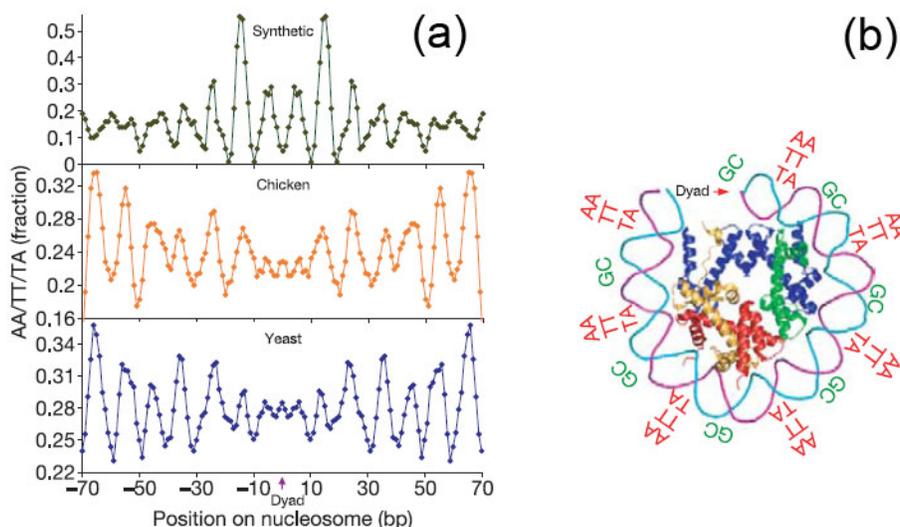


FIGURE 1.9 – (a) Moyenne glissante sur 3 pb de la composition en dinucléotides AA/TT/AT, pour 3 séquences (synthétique, poulet, levure) centrées sur le dyad. On retrouve la périodicité de 10 pb environ. (b) Les dinucléotides clés mis en évidence sur la structure tridimensionnelle de la particule de cœur, seul le tour central d'ADN est représenté. Adapté de [Segal *et al.*, 2006].

5 - Assemblage de la particule de cœur

Des études biochimiques ont mis en évidence que l'assemblage de la particule de cœur du nucléosome se fait de manière séquentielle aussi bien *in vivo* [Worcel *et al.*, 1978], que *in vitro* [Dilworth *et al.*, 1987, Nakagawa *et al.*, 2001]. En particulier, il a été montré que, dans chacun de ces cas, la première étape de formation d'un nucléosome était la déposition sur l'ADN d'un tétramère (H3,H4)₂, pour ainsi former une particule que l'on nomme *tétrasome*. Puis, dans un second temps, sont incorporés individuellement chaque dimères (H2A,H2B) (Figure 1.10).

L'incorporation *in vivo* des histones implique des protéines, que l'on nomme *chaperonnes*. Elles prennent en charge les histones lorsqu'elles ne sont pas encore incorporées dans le nucléosome. Plusieurs familles de chaperonnes ont été mises en évidence, comme par exemple N1 et Np (nucléoplasmine), présentes dans les extraits d'oocytes de Xénope¹⁷, dans lesquels ces protéines sont en quantité suffisante pour prendre en charge les histones nécessaires à la compaction de la chromatine contenue dans environ 10 000 cellules

17. Les extraits d'oeufs de Xénope (grenouille) contiennent une gigantesque quantité de matériel nucléaire et toute la machinerie nécessaire au fonctionnement des futures cellules créées. Il s'agit d'un matériel très utilisé pour étudier le métabolisme de l'ADN.

[Akey et Luger, 2003, Woodland et Adamson, 1977]. Un autre type de chaperonnes est NAP-1 (pour *Nucleosome Assembly Protein-1*), qui joue un rôle essentiel dans la déposition des dimères (H2A, H2B) [Nakagawa *et al.*, 2001]. Grâce à l'interaction entre (H2A, H2B) et NAP-1, la formation du nucléosome est réversible, ce qui permet d'enlever un ou les deux dimères. Ce processus est fréquent au cours du cycle cellulaire [Levchenko et Jackson, 2004].

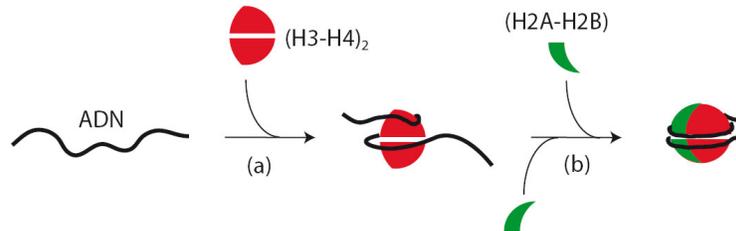


FIGURE 1.10 – Assemblage séquentiel d'une particule de cœur de nucléosome. Un tétramère (H3, H4)₂ est d'abord assemblé sur l'ADN, puis les dimères (H2A, H2B) sont incorporés séquentiellement. Les histones qui n'interagissent pas avec l'ADN sont pris en charge par des chaperonnes.

L'incorporation de nucléosomes sur une fibre d'ADN peut se faire *in vitro* sans l'aide de chaperonnes [Germond *et al.*, 1976]. On parle alors de *reconstitution* de chromatine. Si l'on mélange sans précautions ADN et histones, il va se produire une agrégation des protéines sur l'ADN à cause des interactions électrostatiques très fortes (ADN et histones étant fortement chargés). Pour obtenir une particule de cœur proprement organisée, il faut mélanger ADN et histones à haute concentration saline (~ 2 M NaCl), afin d'écranter les interactions électrostatiques. Puis en diluant ou en dialysant lentement les interactions conventionnelles s'établissent, la dernière étape pouvant être une dilution contre du TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=7,5) afin de pouvoir conserver les nucléosomes sous une forme très stable (dans ce tampon à très bas sel les interactions entre ADN et histones sont très fortes).

6 - Dynamique du nucléosome

Contrairement à ce qui a été longtemps proposé et à ce que peut suggérer la structure cristallographique du nucléosome, cette particule n'est pas figée, et est loin de ressembler à une *boite de thon*¹⁸ sans dynamique autour de laquelle est enroulé très fortement un ADN de 147 pb.

Il existe une forte dynamique du nucléosome, aussi bien de son ADN nucléosomal que de ses histones. Le tout ayant pour conséquence que la particule, soumise aux fluctuations thermiques, peut par exemple se déplacer le long de l'ADN ou bien rompre des contacts avec l'octamère. En particulier les SHL ± 6.5 peuvent être rompus et donner accès à une partie de l'ADN nucléosomal, comme cela est mis en évidence par des expériences de digestion de l'ADN par les nucléases qui peuvent envahir une partie de l'ADN nucléosomal. Des

18. Terme introduit en 1981 par Kornberg et Klug [Kornberg et Klug, 1981].

expériences récentes de *single pair FRET*¹⁹ [Li *et al.*, 2005, Li et Widom, 2004] ont montré que l'ADN nucléosomal était accessible dans son intégralité à des protéines qui ont pour cible cet ADN nucléosomal. La configuration totalement enroulée n'existe que pendant ~ 250 ms avant qu'un déroulement ne se produise. La phase de ré-enroulement prend entre 10 et 50 ms (Figure 1.11).

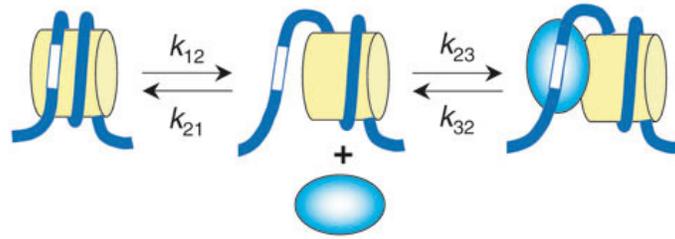


FIGURE 1.11 – Modèle pour l'exposition de sites au sein de l'ADN nucléosomal. A gauche le nucléosome est complètement enroulé, survient alors un déroulement partiel (centre), l'ADN ainsi exposé est complexé par une protéine reconnaissant son site d'interaction (droite).

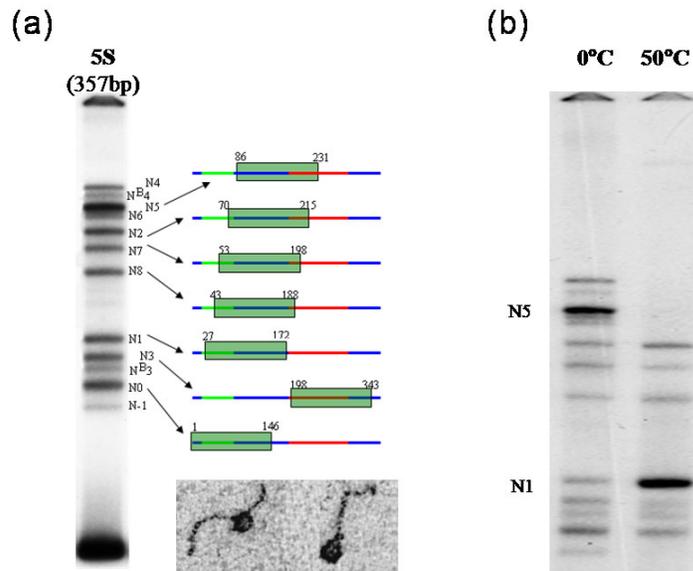


FIGURE 1.12 – Migration sur gel d'acrylamide en conditions natives de mononucléosomes reconstitués sur une séquence positionnante 5S. Reconstitution à température ambiante (a), à 0°C et 50°C (b). D'après [Lavelle, 2002].

Le nucléosome présente en outre une dynamique de positionnement. Sur une séquence positionnante telle que la séquence 5S il existe plusieurs positions où l'on peut trouver le

19. FRET pour Förster Resonance Energy Transfer.

nucléosome. On peut distinguer ces positions par migration sur gel d'acrylamide en conditions natives²⁰ (Figure 1.12a). On peut voir sur cette figure que chaque bande correspond à une conformation particulière, par exemple l'état pour lequel le nucléosome se situe à l'extrémité du fragment d'ADN est noté N0. L'état N5 correspond à un nucléosome quasiment centré. On peut voir en encart des clichés de microscopie électronique de ces deux états.

Lorsque la reconstitution se fait à des températures différentes, les distributions entre les différentes conformations sont modifiées. Par exemple, l'état N5 est favorisé à basse température alors que l'état N1 l'est à haute température. Le nucléosome peut donc adopter différentes positions sur l'ADN 5S, la distribution entre chaque état est guidée par l'énergie d'interaction entre l'octamère d'histones et la séquence mise en jeu. L'agitation thermique est alors en mesure de faire bouger le nucléosome le long du fragment. On verra dans la suite que cela peut s'apparenter à un *remodelage* du nucléosome.

2 Hiérarchisation de la compaction de la chromatine

Nous venons de voir dans la partie précédente que la chromatine consiste en l'interaction de l'ADN avec les histones. L'assemblage nucléoprotéique fondamental est le nucléosome qui est la particule formée par l'enroulement de 1.65 tours d'ADN autour d'un octamère (H2A,H2B,H3,H4)₂. Cette particule est répétée le long de la longue molécule d'ADN pour achever une condensation organisée. La chromatine se trouve au sein du noyau sous différents niveaux de condensation qui vont de l'ADN nu décondensé à la structure la plus compacte, le chromosome.

2.1 Le chapelet de nucléosomes

En 1974, R.D. Kornberg proposa que le nucléosome se répète le long de la fibre pour donner ce que l'on nomme un *collier de perles* ou *chapelet*. C'est effectivement la structure que l'on observe à faible force ionique (Figure 1.14), c'est à dire avec une concentration en NaCl de 0 à 5 mM environ. Les nucléosomes sont reliés les uns aux autres par les ADN de liaisons, dont la taille peut varier entre 10 et 80 pb. On voit bien sur les images de microscopie électronique que des petites particules globulaires se positionnent le long de l'ADN, ce sont les nucléosomes.

On remarque sur ces clichés l'importance de l'angle entre les ADN entrants et sortants en ce qui concerne l'architecture de la fibre. En effet, cet angle α varie pour chaque nucléosome, ce qui définit une trajectoire en zig-zag irrégulière. A basse force ionique

20. Cela signifie que la structure nucléoprotéique n'est pas détruite durant la migration sur le gel. En ce qui concerne les mononucléosomes, il s'agit de la migration dans un gel dont le tampon est par exemple le TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM), pour lequel les conditions ioniques stabilisent la particule, pour plus de détail voir annexes 162.

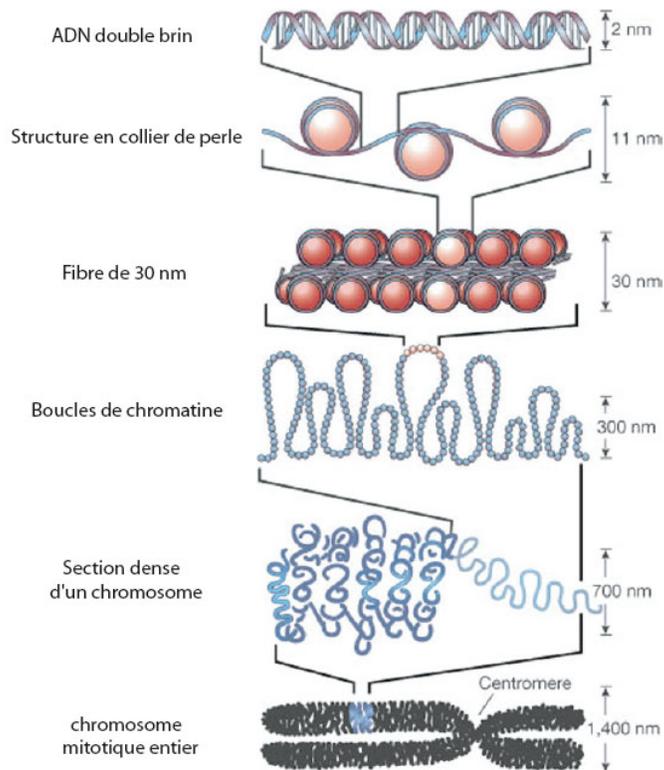


FIGURE 1.13 – Organisation de la chromatine à l’intérieur des noyaux, depuis l’ADN nu non condensé jusqu’au chromosome, l’état le plus compact. La chromatine adopte ces différentes structures en fonction du cycle cellulaire, de l’activité transcriptionnelle du locus considéré,...

les répulsions électrostatiques sont importantes entre les deux brins entrants et sortants [Hamiche *et al.*, 1996b], ce qui tend à écarter les nucléosomes les uns des autres. Pour rapprocher les ADN entrants et sortants il faut écranter la répulsion électrostatique, c’est le rôle du sel (comme nous le verrons ci-dessous), mais aussi des queues des histones H3 [Luger *et al.*, 1997] et de l’histone de liaison [Hamiche *et al.*, 1996b].

On peut observer sur les clichés de la figure 1.15 la modification de l’organisation d’une fibre après incorporation de l’histone de liaison H5. Les fibres présentées sont reconstituées sur une séquence positionnante 601 répétée 19 fois. En (a) on voit la structure de la fibre de nucléosome, en (b) celle d’une fibre de chromatosome à basse force ionique. On observe alors la structure en tige caractéristique de la présence de l’histone de liaison. Une telle orientation parallèle des brins entrants et sortants a deux conséquences majeures. D’une part la distance entre chaque nucléosome est réduite, ce qui entraîne une compaction supérieure de la fibre, d’autre part l’attachement de l’histone de liaison supprime la variabilité sur l’angle α , ainsi les fibres de chromatosomes semblent organisées plus régulièrement.

A basse force ionique la chromatine adopte une structure linéaire²¹, dans laquelle les

21. On donne souvent à ce type de structure le nom de *fibre de 10 nm*, nous n’utiliserons pas dans ce

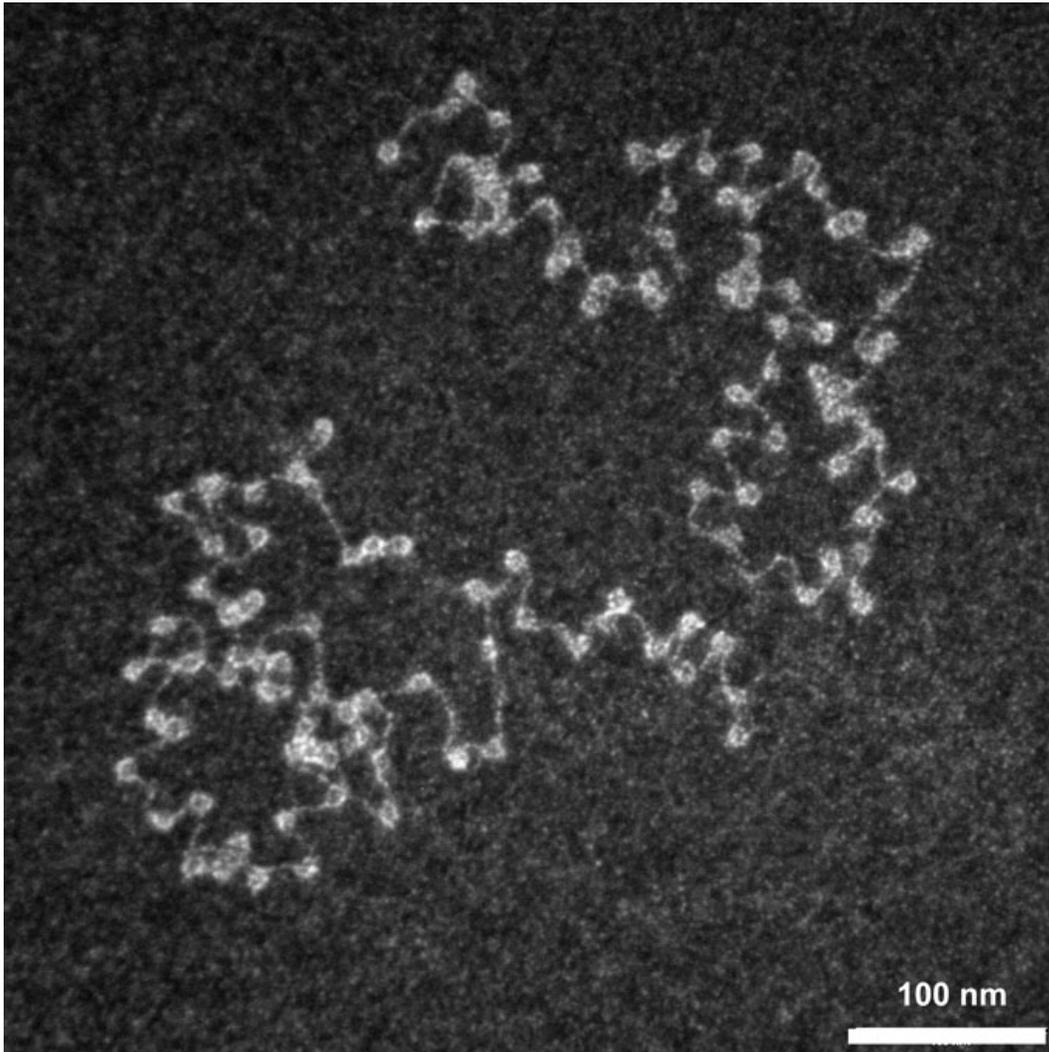


FIGURE 1.14 – Cliché de microscopie électronique sur fond sombre. Fibre native de chromatine purifiée à partir de cellules de hamster. Ces fibres ne contiennent pas d’histone de liaison. *C. Lavelle, IGR, Villejuif.*

nucléosomes se succèdent sans interagir entre eux. L’incorporation de l’histone de liaison entraîne une légère compaction associée au rapprochement des ADN entrants/sortants. Dans ces conditions l’ADN est condensé d’un facteur ~ 5 .

2.2 La fibre de 30 nm

1 - Effet du sel sur la compaction

Pour que l’ADN puisse être contenue dans le noyau des cellules, il faut atteindre un niveau de compaction bien plus important que celui que nous venons de décrire. Cette

manuscrit cette appellation qui peut conduire à de nombreuses confusions.

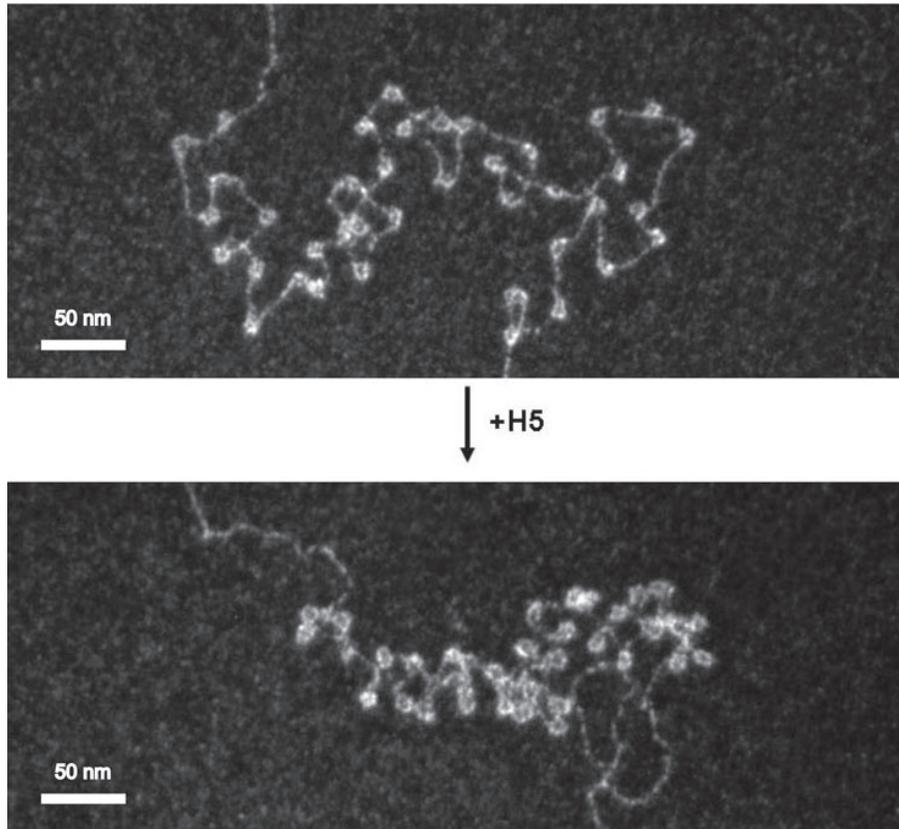


FIGURE 1.15 – Cliché de microscopie électronique de chromatine reconstituée sur une répétition en tandem de la séquence positionnante 601 de 200 pb (répétée 19 fois). En haut, fibre de nucléosomes. En bas fibre de chromatosomes.

condensation est permise par l'ajout de sels monovalents ou divalents [Thoma *et al.*, 1979]. L'écrantage des répulsions électrostatiques permettant d'accéder à une plus grande compaction (Figure 1.16).

On constate que des fibres qui étaient initialement étendues (sous forme d'un chapelet de nucléosome (Figure 1.16a et e) se condensent de plus en plus quand la concentration en sel augmente comme on peut le voir sur les panneaux (b, c) et (f, g) de la figure 1.16. Les fibres avec l'histone de liaison et celles sans cet histone ne répondent pas de la même façon à une augmentation de la concentration en sel monovalent. Les fibres avec H1 semblent être plus sensibles à l'effet du sel. Une forme complètement condensée, dans laquelle on ne distingue plus ni nucléosomes ni ADN de liaison est atteinte pour une concentration en NaCl de l'ordre de 40 mM, alors que le même type de structure est atteinte pour environ 100 mM NaCl pour des fibres déplétées des histones de liaison [Thoma *et al.*, 1979]. Ces observations sont confirmées par des analyses de la vitesse de sédimentation sur gradient de sucrose [Routh *et al.*, 2008][Carruthers *et al.*, 1998][Huynh *et al.*, 2005] (Figure 1.17).

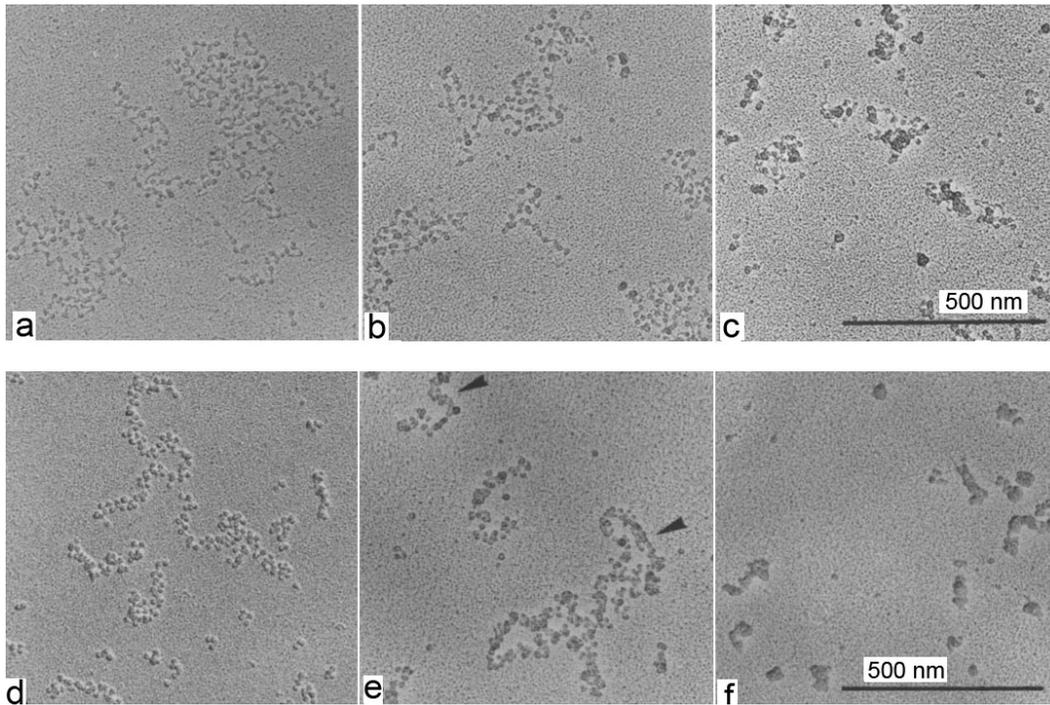


FIGURE 1.16 – Effet sur la condensation de la salinité en cation monovalent pour des fibres sans H1 (a, b et c) et pour des fibres avec H1 (d, e et f). La fixation a été faite sur 15h dans 0.1% glutaraldéhyde, 5 mM Chlorure de triéthylammonium (pH 7.0), 0.2 mM EDTA et (a) 10 mM NaCl, (b) 40 mM NaCl, (c) 100 mM NaCl, (d) 0 mM NaCl, (e) 10 mM NaCl, (f) 40 mM NaCl. *Adapté de [Thoma et al., 1979].*

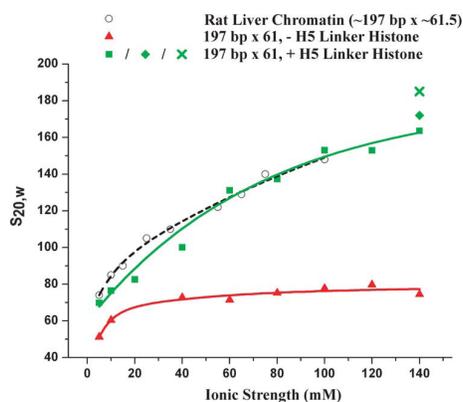


FIGURE 1.17 – Vitesse de sédimentation en ultracentrifugation sur gradient de sucrose en fonction de la salinité pour des fibres de chromatine. D'après [Routh et al., 2008].

Le même type d'effet a été observé lorsque les fibres sont soumises à des cations divalents, en particulier le magnésium. Dans ces conditions, il s'agit moins d'un écrantage de la répulsion électrostatique que de l'établissement d'interactions entre nucléosomes médiées par le cation divalent. En effet, les concentrations en ions divalents utilisées sont beaucoup plus faibles que dans le cas d'ions monovalents. Par exemple, il suffit de 0.5 mM Mg^{2+} pour obtenir une condensation équivalente à celle de la figure 1.16f (100 mM NaCl) pour une fibre de chromosomes (Figure 1.18).

L'effet du magnésium est très important dans la condensation de la fibre. Il est important de noter que cela peut avoir des conséquences sur la solubilité de la fibre de chromosomes. En effet l'ajout de quelques mM de magnésium dans une solution contenant de la chromatine avec l'histone de liaison conduit à la précipitation par oligomérisation des fibres [Schwarz et al., 1996, Huynh et al., 2005]. Ce processus étant réversible, par exemple en

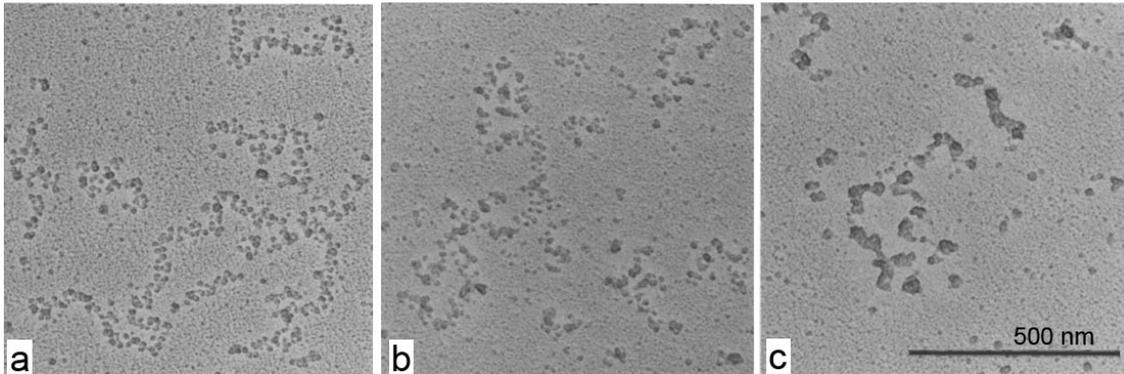


FIGURE 1.18 – Effet de la concentration en magnésium sur la condensation d’une fibre de chromatosomes. Les fibres ont été fixées dans 5 mM Chlorure de triéthylammonium et (a) 0 mM MgCl_2 , (b) 0.2 mM MgCl_2 , (c) 0.5 mM MgCl_2 . D’après [Thoma *et al.*, 1979]

dialysant contre un tampon ne contenant pas de magnésium, on peut l’utiliser pour purifier des fibres de chromatosomes.

Les fibres de chromatine qui ne font plus apparaître individuellement les particules de cœur et l’ADN de liaison ont en général un rayon proche de 30 nm. Même si l’on ne peut accepter qu’il existe qu’une seule structure de fibre condensée, on fait en général référence à une fibre de chromatine compacte en la nommant *fibre de 30 nm*.

Les figures extraites de [Thoma *et al.*, 1979] (Figures 1.16 et 1.18) illustrent la réponse de fibres de chromatine natives purifiées à partir de cellules de foie de rats. Ce comportement a bien entendu également été mis en évidence sur des fibres de chromatine reconstituées sur des ADN synthétiques positionnants, en particulier avec la séquence 601 [Robinson et Rhodes, 2006, Huynh *et al.*, 2005]. Ce type de substrat constitue donc un substrat de choix pour l’étude de la structure de la fibre de 30 nm.

2 - Effet de la longueur de l’ADN de liaison

Outre les cations monovalents et divalents, la longueur de l’ADN de liaison a une importance quant à la structure adoptée par la fibre de 30 nm [Routh *et al.*, 2008, Robinson *et al.*, 2006]. Suivant la "densité linéique" de nucléosomes, la fibre sera plus ou moins compacte. Sachant que 147 pb sont enroulées autour de l’octamère d’histones, la connaissance de la longueur de répétition (NRL) donne la longueur de l’ADN de liaison. Routh et coll. ont utilisé deux types de fibres, l’une avec un nucléosome toutes les 167 pb et l’autre avec un nucléosome toutes les 197 pb [Routh *et al.*, 2008]. Des expériences de cryomicroscopie électronique ont montré que ces deux longueurs de répétition donnent des architectures de fibres complètement différentes, aussi bien avec que sans l’histone de liaison H5 (Figure 1.19).

Ces fibres diffèrent tout d’abord par leur diamètre apparent, celle avec une répétition

de 197 pb a un diamètre d'environ 34 nm (atteint avec H5) alors que la seconde a un diamètre de 21 nm. De plus l'architecture de la fibre est manifestement différente, l'une présente un enroulement de deux colonnes de nucléosomes (NRL=167 pb) et l'autre semble bien plus compacte avec une densité de nucléosomes plus grande (11 nucléosomes par 11 nm, contre 6 nucléosomes par 11 nm).

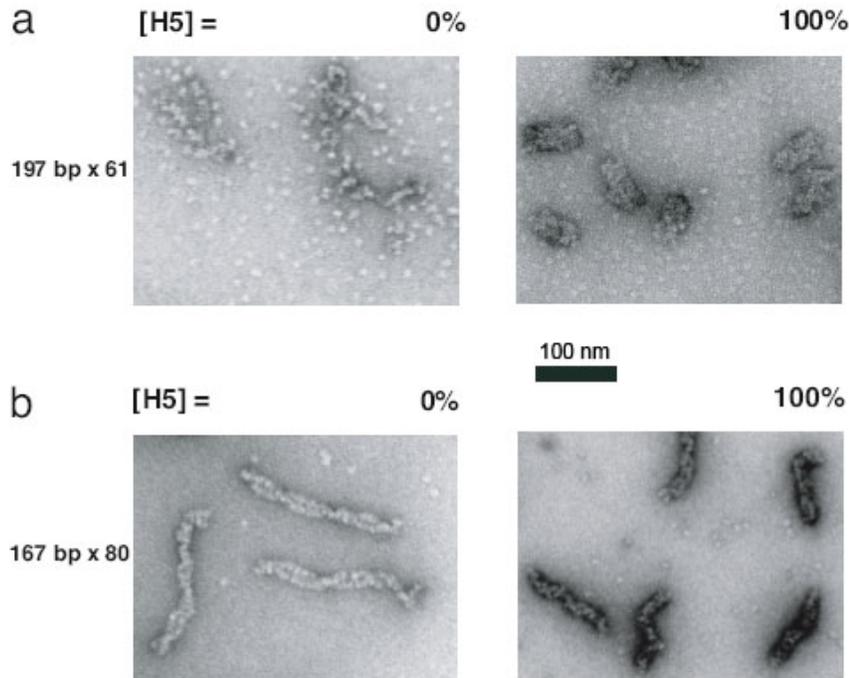


FIGURE 1.19 – Effet de la longueur de l'ADN de liaison sur la structure de la fibre de 30 nm en absence (panneaux de gauche) ou en présence (panneaux de droite) de l'histone de liaison H5. Les fibres ont été reconstituées sur un multimères de la séquence ultrapositionnante 601. Les longueurs des ADN de liaison sont (a) 50 pb (61 répétitions) et (b) 30 pb (80 répétitions). D'après [Routh *et al.*, 2008].

Ces observations mettent bien en évidence la variabilité des structures accessibles à la fibre de 30 nm. Cette appellation ne donne donc qu'une simple indication sur la compaction de la fibre qui ne fait plus apparaître une structure étendue, mais qui a déjà atteint un niveau de compaction supérieure.

3 - Les différents modèles de la fibre de 30 nm

Dès 1976 Finch et Klug ont proposé un modèle pour la fibre de 30 nm [Finch et Klug, 1976]. Il s'agissait d'un modèle en solénoïde dans lequel les nucléosomes successifs étaient en contact et le ruban formé s'enroulait en une hélice dont le pas hélicial avoisinait les 11 nm. Toutefois ils ne proposaient pas de valeurs pour le nombre de nucléosomes par tour. Un second modèle est apparu rapidement, le modèle en *zig-zag* [Worcel *et al.*, 1981, Woodcock *et al.*, 1984]. Dans ce cas les nucléosomes voisins sur le chapelet nucléosomal ne sont plus en contact dans la fibre de 30 nm (Figure 1.20). La

principale différence entre ces deux organisations réside dans le chemin suivi par les ADN de liaison. Dans le cas du modèle du solénoïde, l'ADN entre chaque nucléosome est courbé, alors que le modèle en zig-zag permet aux ADN de liaison de rester droits, donc moins défavorisés énergétiquement²².

Aucune donnée expérimentale n'a permis de conclure pour l'un ou l'autre modèle. Par

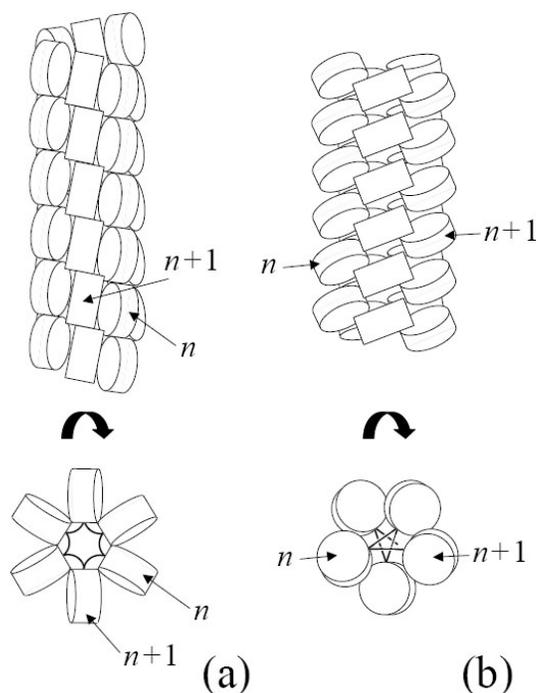


FIGURE 1.20 – Représentation schématique des deux modèles pour la fibre de 30 nm. (a) Modèle en solénoïde. (b) Modèle en zig-zag. D'après [Schiessel, 2003].

exemple, l'existence de stries d'environ 11 nm tendent à favoriser le modèle du solénoïde [Finch et Klug, 1976], tandis que des travaux ont montré que les ADN de liaison semblent être droits [Pehrson, 1989], ce qui soutient les fibres en zig-zag. En 2005 l'équipe de Richmond a réussi à cristalliser un tetranucléosome. A partir de cette structure ils ont développé un modèle de fibre de 30 nm sous la forme d'une double hélice de nucléosomes (Figure 1.21B) [Schalch *et al.*, 2005].

Des affinements ont été apportés à ce dernier modèle. En effet, il est désormais courant de considérer que les ADN de liaison peuvent être courbés au sein de la structure, ce qui donne accès à de nombreuses autres variétés d'architecture de fibre [Wong *et al.*, 2007] qui diffèrent entre elles par leurs longueurs de répétition par exemple (Figure 1.21A).

Comme on peut le voir, il est illusoire de vouloir attribuer à la fibre de 30 nm une et une seule structure. Il est possible que tous les modèles proposés correspondent à un état accessible pour la chromatine, sachant en outre que l'inhomogénéité au sein du chapelet

²². Rappelons que les ADN de liaison font entre 20 et 80 pb alors que la longueur de persistance de l'ADN est de 50 nm soit environ 150 pb.

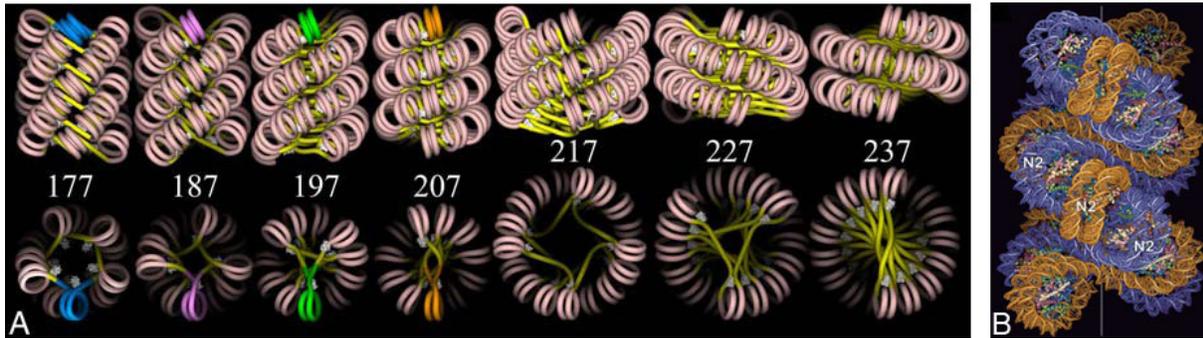


FIGURE 1.21 – (A) Modèles de fibres compactes de chromosomes pour différentes longueurs de répétitions. Ces modèles valident les résultats expérimentaux obtenus par [Routh *et al.*, 2008, Robinson *et al.*, 2006]. D’après [Wong *et al.*, 2007]. (B) Modèle de fibre en double hélice (modèle en zigzag) issu de la structure cristallographique d’un tetranucléosome. D’après [Schalch *et al.*, 2005].

nucléosomal doit avoir pour conséquence de désorganiser la fibre. C’est peut-être pour cela que de nombreuses fibres différentes ont été observées *in vitro* mais que pour le moment aucune fibre de 30 nm n’a été identifiée dans le noyau des cellules eucaryotes.

4 - Niveau de compaction supérieur de la fibre

Nous avons décrit jusqu’à présent les deux premiers niveaux de compaction de la fibre : le chapelet de nucléosome et la fibre de 30 nm. Le premier donne accès à un facteur de compaction de l’ADN d’environ 5, et le second d’environ 40. Néanmoins ces structures sont encore loin d’expliquer les niveaux de compaction atteints dans le noyau des cellules [Daban, 2000] qui sont eux-mêmes pour le moment non élucidés. En effet cette compaction considérable constitue un obstacle à l’observation de ces structures.

Il est avant tout primordial de retenir que la chromatine au sein du noyau est une structure multi-échelle (Figure 1.13) dont le premier niveau de repliement est le nucléosome. On observe d’ailleurs dans le noyau deux types de domaines chromatiniens : l’*hétérochromatine*, dans laquelle l’ADN est très condensé, et l’*euchromatine* qui est moins compacte et qui regroupe la quasi-totalité des gènes transcrits de façon active.

Même au sein de ces deux domaines la structure de la chromatine doit être régulée, pour donner ou interdire l’accès à tels ou tels gènes, ou bien pour s’organiser d’une façon propre à la phase du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule. Des paramètres tels que la concentration saline ou la longueur de répétitions des nucléosomes agissent sur les états de condensations. Toutefois une régulation active de la compaction de l’ADN est indispensable. Nous allons voir ci-dessous les stratégies qui permettent ce contrôle efficace.

3 Dynamique de l'organisation chromatinienne

La structure de la chromatine est un paradoxe intéressant. Elle doit à la fois permettre la compaction, forte, de l'ADN au sein du noyau des cellules eucaryotes, et rendre le substrat nucléique accessible de façon dynamique aux machineries de la réplication, de la transcription, de la réparation aux dommages... Lorsqu'un gène doit être exprimé, l'ARN polymérase a besoin d'avoir accès à la séquence d'ADN. Pourtant le substrat auquel elle a affaire est bien la chromatine et pas l'ADN. Pour que la séquence puisse être lue, il faut nécessairement une réorganisation de la chromatine avec une décondensation, au moins locale, de la fibre. Il a ainsi été montré que les gènes actifs sont plus accessibles aux nucléases que les gènes inactifs [Weintraub et Groudine, 1976].

Les mécanismes de régulations doivent certainement agir sur différents niveaux d'organisation. Pourtant les complexes protéiques identifiés ont pour cible le nucléosome. Sachant que ces complexes ont pour taille caractéristique quelques dizaines de nanomètres, le nucléosome est le seul substrat accessible à cette échelle. Les modifications qui lui sont apportées sont de natures diverses et variées. Ce peut être (i) l'introduction de modifications covalentes sur les histones qui le composent, (ii) l'insertion de variants d'histones à la place d'histones conventionnelles, ou bien (iii) le recrutement de complexes appelés *facteurs de remodelage* qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour déplacer ou bien même enlever les nucléosomes. Le but étant de décondenser la chromatine et de donner accès à la séquence d'ADN qui peut être cachée par son interaction avec l'octamère d'histones.

3.1 Les modifications covalentes des histones

Les histones peuvent être soumis à plus d'une soixantaine de modifications qui correspondent à huit classes différentes [Kouzarides, 2007]. La plupart de ces modifications ont été identifiées sur les queues N-terminales des histones de cœur par des techniques de spectrométrie de masse ou bien d'anticorps dirigés contre des modifications spécifiques. Quelques-unes des modifications les plus classiques sont présentées dans la table 1.2.

Les histones canoniques ainsi que les variants d'histones sont modifiables, et ceci de façon réversible par interaction avec des enzymes qui catalysent l'ajout ou le retrait de groupements [Bonenfant *et al.*, 2006]. A titre d'exemple, on peut citer les *acétyltransférase* (HAT1), les *déacétylases* (SirT2), les *Lysine méthyltransférase* (SUV39H1)... L'équilibre entre toutes ces enzymes définit l'état de modification de la chromatine. Il est important de noter que ce ne sont pas toujours les mêmes histones qui sont modifiées au même moment, mais c'est bien la phase du cycle cellulaire et l'endroit sur la chromatine qui sont caractéristiques d'une modification.

Ainsi il existe des modifications particulières qui sont la signature d'une activité ou d'une inactivité de transcription. Ces modifications sont appelées *modifications post-traductionnelles* (MPT). Celles-ci sont classées en deux catégories corrélées à l'état de transcription du gène :

- les modifications associées à une transcription active, telles que l'acétylation des

Modifications de la chromatine	Résidus modifiés	Fonctions
Acétylation	K-ac	Transcription, réparation, réplication, condensation
Méthylation (lysines)	K-me1, K-me2, K-me3	Transcription, réparation
Méthylation (arginines)	R-me1, R-me2a, R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph, T-ph	Transcription, réparation, condensation
Ubiquitilation	K-ub	Transcription, réparation
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Déimination	R > cit	Transcription
Isomérisation de la proline	P-cis > P-trans	Transcription

TABLE 1.2 – Tableau de différentes classes de modifications des histones. Sont indiqués les résidus modifiés ainsi que la fonction régulée associée.

histones H3 ou H4, ou bien la di- ou triméthylation de H3K4²³ sont considérées comme des marques de l'euchromatine.

- les modifications observées sur les gènes réprimés, comme H3K9me3 ou H3K27me3, sont référencées comme des signatures de l'hétérochromatine.

Il existe énormément de possibilités de modifications sur les nucléosomes, ce qui rend très complexe l'interprétation que l'on peut donner à un état de la chromatine. Comme on l'a vu dans la table 1.2, la transcription est associée à de très nombreuses modifications, mais la réparation, elle aussi, contribue à définir l'état de la chromatine, en agissant sur des résidus différents, sur des histones différentes... Il a été proposé que l'ensemble de ces modifications constitue un code, *le code des histones*, qui se superpose au code génétique et qui caractérise l'état d'une région donnée [Jenuwein et Allis, 2001]. Les modifications étant réversibles²⁴, ce niveau d'information peut évoluer au cours du cycle cellulaire et en particulier au cours de la différenciation cellulaire. Cette hypothèse est aujourd'hui encore largement discutée [Ruthenburg *et al.*, 2007].

Pour l'instant on considère que les modifications covalentes des histones agissent en tant que régulateurs de deux façons distinctes :

- elles sont des marques pour le recrutement de complexes protéiques
- elles agissent sur la structure de la chromatine

Revenons sur la première hypothèse. La protéine humaine TAF1 possède un site de reconnaissance qui lui permet de se lier à deux lysines acétylées de l'histone H4 (H4K5ac

23. Ceci désigne la lysine positionnée en 4ème position de l'histone H3.

24. Pour l'instant seul la méthylation des arginines ne semble pas avoir de déméthylase.

et H4K12ac) (Figure 1.22a). On peut également citer des complexes qui peuvent se lier à des résidus modifiés sur des histones différentes, appartenant ou non au même nucléosome (Figure 1.22a et b). On voit donc la richesse d'un code basé sur les modifications covalentes des histones. Les complexes protéiques engagés auront alors des rôles spécifiques. Ils peuvent être l'initiateur d'une cascade de régulation ou bien porter une activité enzymatique particulière (polymérisation, remodelage de la fibre...).

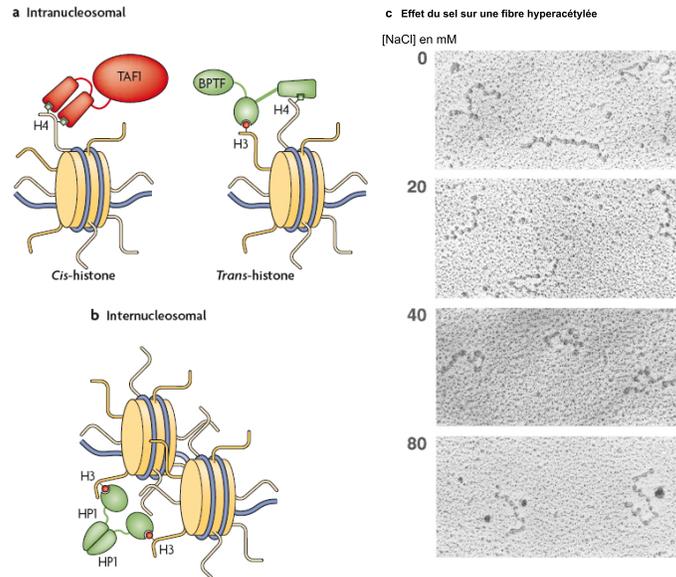


FIGURE 1.22 – (a) Interaction entre un nucléosome et un complexe reconnaissant des modifications covalentes des histones. L'interaction peut avoir lieu sur une même histone (interaction *cis*) par exemple TAF1, ou bien sur deux histones différentes d'un même nucléosome (interaction *trans*) par exemple BPTF. (b) Deux nucléosomes différents peuvent être reconnus par l'intermédiaire des modifications covalentes des histones qu'ils contiennent, par exemple le HP1 reconnaît H3K9me3. Adaptées de [Ruthenburg *et al.*, 2007]. (c) Effet du sel sur des fibres hyperacétylées. On n'observe dans ce cas aucune condensation avec l'ajout de cations monovalents, contrairement au cas observé sur la figure 1.16. D'après [Garcia-Ramirez *et al.*, 1995].

Intéressons-nous à présent à la seconde hypothèse. On a vu que les queues des histones sont très importantes pour accéder à des niveaux de compaction supérieurs. Garcia-Ramirez et coll. ont étudié l'influence sur la compaction de l'acétylation [Garcia-Ramirez *et al.*, 1995] des queues des histones, en l'occurrence toutes les queues des histones ont été hyperacétylées. Ils ont mis en évidence que dans de telles conditions les fibres obtenues²⁵ ne changeaient pas avec l'augmentation de la concentration en cation monovalent (Figure 1.22c), contrairement à ce que nous avons vu sur la figure 1.16. Quelle que soit la concentration en sel, les fibres restent étendues. Il est utile de rappeler que l'acétylation est en général une marque de l'activité transcriptionnelle, donc de l'euchromatine qui doit rester accessible. L'acétylation a pour conséquence de rendre moins chargées positivement les queues des histones. Les interactions électrostatiques respon-

²⁵. Les octamères d'histones hyperacétylées ont été assemblés sur une répétition en tandem de 12 séquence positionnante 5S.

sables de la condensation sont donc moins fortes. Il a été montré qu'une seule acétylation sur l'histone H4 (H4K16ac) a pour effet de prévenir la formation d'une fibre compacte [Shogren-Knaak *et al.*, 2006].

Remarquons que ces modifications covalentes agissent au niveau de la structure de la fibre et pas au niveau du nucléosome individuel. En effet une structure du nucléosome à 2,5 Å a été obtenue avec des octamères purifiés à partir de chromatine d'érythrocytes de poulet [Harp *et al.*, 2000] qui ont donc subi toute une variété de modifications. Celle-ci n'a révélé aucune différence significative avec la structure obtenue par Luger et coll. en 1997 avec des histones recombinantes (donc sans modification).

Les modifications covalentes de la chromatine ont donc une importance capitale pour le développement cellulaire puisqu'elles donnent accès à des niveaux de régulation de l'expression des gènes ou bien de la réparation des dommages à l'ADN supérieurs. Leur diversité est à l'origine d'une complexification des processus de régulation. C'est pourquoi le code des histones est encore un sujet d'étude très riche et très controversé. Par ailleurs ces modifications peuvent être transitoires, et apparaître et disparaître dans les quelques minutes suivant un stimulus, ce qui rend une caractérisation exhaustive impossible.

3.2 Insertion de variants d'histones

Nous avons déjà évoqué l'existence des variants d'histones qui peuvent être très similaires (par exemple H3.1) ou bien très différents (macroH2A) des histones conventionnelles. Ces variants ont un rôle très important dans l'organisation de la chromatine et dans la régulation de son architecture.

Des variants peuvent remplacer au sein du nucléosome une histone conventionnelle, modifiant ainsi sa structure et ses partenaires d'interactions. En effet, un variant, du fait de sa séquence différente, peut interagir avec d'autres complexes protéiques ou bien subir des modifications particulières au niveau de ses propres queues. Ainsi les variants sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'activité ou la répression de la transcription d'un gène, l'identification des dommages de l'ADN, ou bien l'établissement des centromères. Nous allons donner dans la suite quelques exemples pour des variants classiques.

H2A.Z Les variants homologues à H2A.Z ont été très conservés au cours de l'évolution et sont présents chez quasiment tous les eucaryotes [Raisner et Madhani, 2006]. Les propriétés physiques du nucléosome contenant H2A.Z ont été étudiées, elles ont abouti à des interprétations différentes concernant sa stabilité suivant la technique d'étude. La structure d'un nucléosome avec H2A.Z a été obtenue [Suto *et al.*, 2000] et a montré quelques différences avec le nucléosome canonique qui ne permettent cependant pas de trancher pour un comportement ou pour un autre. En ce qui concerne les études *in vivo*, il a été démontré chez les ciliés *tetrahymena* que H2A.Z est préférentiellement incorporée dans le macronucleus transcriptionnellement actif que dans le micronucleus inactif. Cette tendance

de H2A.Z à être impliquée dans l'établissement de l'euchromatine semble être commune aux eucaryotes, même si cela reste un sujet de débat.

Une caractéristique de la distribution sur le génome du variant H2A.Z a été mise en évidence grâce aux techniques de puces et de séquençages à haute définition (20 pb). Il semble que chez la levure *S. Cerevisiae*, H2A.Z soit déplétée des régions subtélomériques inactives et soit plutôt enrichi au niveau des promoteurs. Plus précisément, il semble que les nucléosomes qui flanquent les régions sans nucléosome du promoteur (ou *nucleosome free region* (NFR)) contiennent ce variant (Figure 1.23) [Raisner *et al.*, 2005]. Cela a permis d'identifier une séquence de 22 pb qui semble être suffisante pour diriger l'incorporation de H2A.Z et la formation de NFRs. Une autre étude montre que la chromatine est enrichie en H2A.Z aux extrémités 5' de nombreux gènes actifs dans les érythrocytes de poulet [Bruce *et al.*, 2005].

L'incorporation des histones H2A.Z se fait de plusieurs façons. En particulier chez la levure cela peut être guidé par une séquence spécifique, ou bien par des marques d'acétylation sur les histones [Raisner *et al.*, 2005]. Un complexe protéique semble prendre en charge cette incorporation, il s'agit de SWR1 [Mizuguchi *et al.*, 2004].

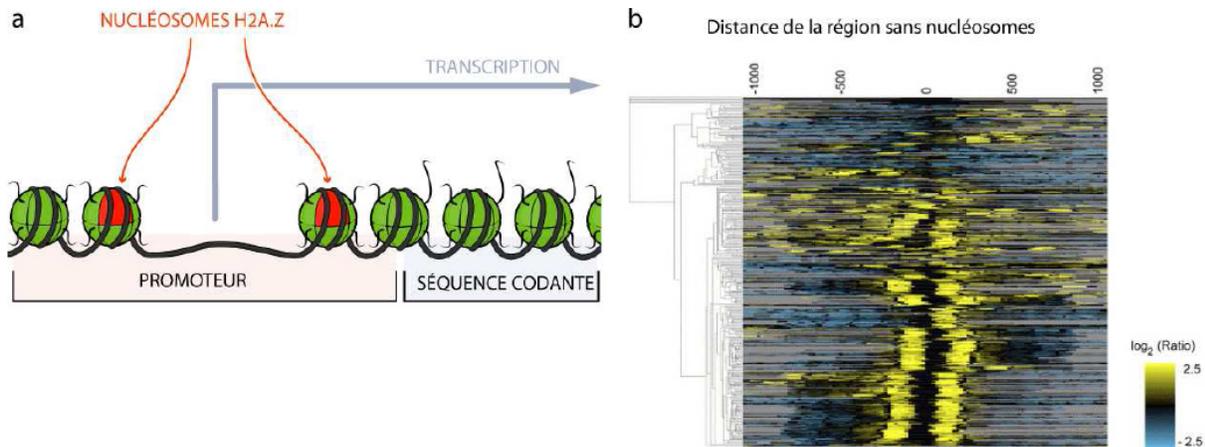


FIGURE 1.23 – Implication de H2A.Z dans l'architecture des nucléosomes. (a) H2A.Z est présent de part et d'autre d'une région sans nucléosome au niveau des promoteurs. (b) Enrichissement de H2A.Z au niveau des promoteurs. On remarque la présence de deux maxima locaux de probabilité de présence autour d'une zone appauvrie (*Nucleosome Free Region*). Adapté de [Montel, 2008] et [Raisner *et al.*, 2005].

H2A.X Ce variant est présent chez tous les eucaryotes, il représente en général 10% des histones de la famille H2A. Un motif en particulier est remarquablement conservé, il s'agit d'une sérine sur la queue C-terminale du variant, le résidu S139. Ce variant est au cœur du processus de signalisation des dommages de l'ADN et en particulier des cassures double brins²⁶. En réponse aux dommages de l'ADN, le variant H2A.X est phosphorylé

26. Ce type de lésion de l'ADN est très dangereux pour la cellule qui doit prendre garde de reformer une

sur sa sérine 139 autour de la région lésée. Cette modification se fait par des kinases telles que ATM, ATR ou DNA-PK. On nomme alors le variant phosphorylé γ H2A.X. Chez les mammifères cette phosphorylation peut s'étaler sur 2 Mb entourant la cassure. S'il semble que la phosphorylation de H2A.X ne soit pas l'initiateur de l'action de la machinerie de réparation, γ H2A.X est en revanche à l'origine de l'accumulation de cette machinerie au niveau de la cassure [Celeste *et al.*, 2003]. Les cellules dans lesquelles H2A.X a été déplété ou bien modifié au niveau de S139 présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes (qui provoquent des cassures de l'ADN). Pour revue [van Attikum et Gasser, 2009].

CENP-A (CENtromeric Protein A) Ce variant de H3 est un des plus spécialisés. Il diffère énormément de l'histone conventionnelle au niveau de sa queue N-terminale. Il est retrouvé chez tous les eucaryotes même s'il est assez divergent suivant les espèces [Malik et Henikoff, 2003]. CENP-A est un déterminant critique de la chromatine centromérique. Ce variant est indispensable à l'établissement d'un centromère actif. Cela en fait une protéine essentielle au bon déroulement des divisions cellulaires donc également au développement.

Ce variant remplace l'histone canonique H3 au niveau des centromères et assure le recrutement des composants du kinétochore²⁷. Il est remarquable que, quand bien même divergent, le variant de la levure peut remplacer fonctionnellement le variant humain [Wieland *et al.*, 2004].

Une question majeure concernant CENP-A est de savoir quel est le processus qui dirige ce variant vers les centromères. Pour l'instant aucune réponse claire n'a émergé. Plusieurs hypothèses ont été avancées, elles concernent en général la stabilité du nucléosome qui contient CENP-A. Des groupes avancent que ce nucléosome est moins stable à cause d'un déroulement de l'ADN nucléosomal d'environ 7 pb [e Silva *et al.*, 2007] ou bien d'un enroulement non canonique [Furuyama et Henikoff, 2009]. La séquence de ce variant montre des mutations près des SHL ± 6.5 , ce qui a des conséquences sur les points d'ancrage de l'ADN nucléosomal.

CENP-A a pour cible le centromère qui est caractérisé chez l'homme par une séquence répétée de 171 pb, la séquence α satellite, sur des domaines allant de 0.5 à 5 Mb. Il vient d'être mis en évidence [Foltz *et al.*, 2009, Dunleavy *et al.*, 2009] que l'incorporation du variant en phase G1 nécessitait un chaperon spécifique de CENP-A, *HJURP*. Toutefois même si de nombreux complexes semblent associés, comme par exemple Mis18, aucun lien direct entre ces complexes et les nucléosomes contenant CENP-A n'a pu être établi et aucun mécanisme précis proposé.

molécule intacte afin de la transmettre à ses cellules filles. Si cette lésion est mal réparée la cellule choisit alors de passer en apoptose. Un processus de réparation des cassures double brins très important est la *recombinaison homologue*.

27. Le kinétochore est un assemblage supramoléculaire de protéines au niveau des régions centromériques des chromosomes mitotiques. Les microtubules s'attachent aux kinétochores pour aligner les chromosomes dans le plan équatorial et pour séparer les chromatides soeurs.

La chromatine centromérique semble aussi avoir des propriétés mécaniques particulières. Au cours de la mitose, les deux chromatides soeurs, reliées par les centromères sont fréquemment séparées de façon réversible de quelques centaines de nanomètres, ce qui suggère un état de condensation transitoire assez faible, quand bien même la chromatine centromérique est riche en hétérochromatine.

Nous venons de voir deux mécanismes de modification de la structure et de la dynamique chromatinienne : les modifications covalentes des histones et la substitution d'histones conventionnelles par des variants. Bien souvent ces deux processus sont des marques placées sur la chromatine pour le recrutement de complexes protéiques qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour modifier l'organisation de la chromatine : les *facteurs de remodelage*. Nous allons décrire plus précisément leur nature et leur mode d'action ci-dessous.

3.3 Les facteurs de remodelage

Nous avons vu précédemment que la condensation de la chromatine est influencée par des paramètres environnementaux et structuraux. En particulier nous avons mis en évidence que l'augmentation de la concentration en cations (aussi bien divalents que monovalents) *in vitro* conduit à la condensation de la chromatine sous forme de fibre de 30 nm (Figure 1.18), mais nous avons aussi vu que la longueur de répétition nucléosomale affectait l'état de condensation (Figure 1.19). Cependant *in vivo* ces paramètres sont difficilement modifiables. D'autres stratégies ont dû être développées pour contrôler l'organisation de la chromatine. Pour cela la cellule utilise une machinerie dédiée : les *facteurs de remodelage*. Les facteurs de remodelage sont des complexes protéiques capables de déplacer les nucléosomes en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Ils organisent ainsi la fibre et lui permettent d'accéder à des états condensés ou bien décondensés.

1 - Les différentes familles de facteurs de remodelage

De nombreux facteurs de remodelage ont été identifiés chez les eucaryotes. Le premier complexe ayant une activité de remodeleur identifié est SWI/SNF (pour mating type SWItching/Sucrose Non Fermenting) chez la levure. Il s'agit d'un complexe de 1.15 MDa, impliquant pas moins de 11 partenaires (Figure 1.28a). Son activité de remodelage peut être mise en évidence en analysant les profils de digestion de la chromatine par une nucléase lorsque SWI/SNF est actif et lorsqu'il ne l'est pas [Owen-Hughes *et al.*, 1996]. L'analyse des sous-unités de ce complexe a permis de prouver la présence d'une sous-unité ATPase qui présente des similarités avec celle des hélicases²⁸. Plus précisément le polypeptide *swi2/snf2* contient 5 motifs également présents dans un grand nombre de protéines, telles que les hélicases de l'ADN.

28. Enzyme qui catalyse de manière processive la séparation des deux brins d'ADN.

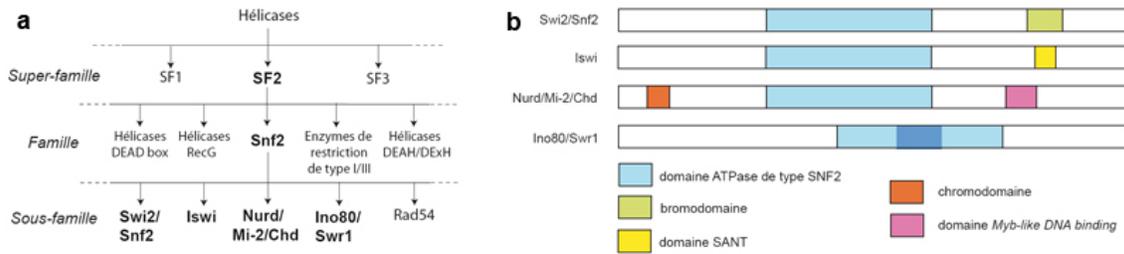


FIGURE 1.24 – (a) Diagramme schématique illustrant la classification hiérarchique des super-familles, familles et sous-familles contenant des motifs hélicases. (b) Résumé des traits caractéristiques des sous-unités ATPases des différentes classes de facteurs de remodelage.

Les protéines qui présentent le même type de similarités sont regroupées au sein de la famille *Snf2*, elle-même faisant partie de la super-famille SF2. Des études ont prouvé que les membres de la famille *Snf2* sont des facteurs de remodelages et qu'ils peuvent être séparés en 4 sous-familles²⁹ : *Swi2/Snf2*, *Iswi*, *Nurd/Mi-2/Chd* et *Ino80/Swr1* (Figure 1.24a). Bien que présentant beaucoup de similarités avec les hélicases, aucun membre de ces familles ne présente une activité de séparation des brins d'ADN, à l'exception du complexe de la levure *INO80* [Shen *et al.*, 2000]. Les traits caractéristiques des sous-unités ATPases des différentes classes de facteurs de remodelage sont résumés sur la figure 1.24b. Il faut remarquer que :

- les membres de la sous-famille *Swi2/Snf2* contiennent un bromodomaine³⁰ qui leur permet de se lier aux histones acétylées.
- les membres de la sous-famille *Iswi* contiennent un domaine SANT qui est un domaine de liaison à l'ADN fréquemment trouvé chez les protéines liées à la chromatine.
- les membres de *Nurd/Mi-2/Chd* présentent un chromodomaine³¹ qui leur permet de se lier aux histones méthylées, ainsi qu'un domaine de fixation à l'ADN (Myb-like DNA binding).
- la sous-famille *Ino80/Swr1* est caractérisée par la présence d'une séquence supplémentaire qui sépare le domaine ATPase en deux.

L'appellation facteur de remodelage pourrait être étendue à la protéine *Rad54* qui est capable d'altérer *in vitro* la structure de la chromatine et qui est susceptible de repositionner les nucléosomes lors de la réparation de l'ADN [Jaskelioff *et al.*, 2003], toutefois il lui manquerait des domaines interagissant de manière spécifique avec les nucléosomes [Cairns, 2007].

2 - Rôle *in vivo* des facteurs de remodelage

Famille *Swi2/Snf2*

La perte de fonction de *SWI/SNF* se traduit par des phé-

29. Les noms de ces sous-familles sont donnés par leur membres les plus emblématiques.

30. C'est un domaine structural particulier composé de 4 hélices α qui permet la reconnaissance et la fixation sur les formes acétylées des lysines des histones.

31. C'est un domaine structural particulier composé de 4 hélices α qui permet la reconnaissance et la fixation sur les formes méthylées des lysines des histones.

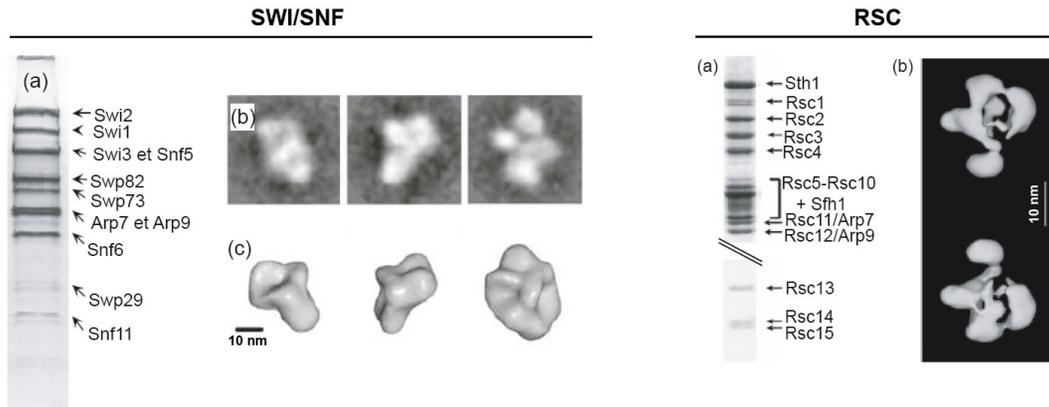


FIGURE 1.25 – SWI/SNF (a) Gel SDS-PAGE montrant la composition du complexe SWI/SNF purifié. (b) Clichés de microscopie électronique du complexe. (c) Structures tridimensionnelles créées à partir des clichés. Adapté de [Smith *et al.*, 2003]. **RSC** gel SDS-PAGE montrant la composition du complexe RSC purifié. Structure tridimensionnelle du complexe RSC obtenu par microscopie électronique. Adapté de [Asturias *et al.*, 2002]

notypes très variés. Des études récentes par puces à ADN ont montré que SWI/SNF n'a pas un rôle général dans la transcription. Il n'est requis (directement ou indirectement) pour la transcription que de 3 à 6 % des gènes selon les études [Holstege *et al.*, 1998, Sudarsanam *et al.*, 2000]. De plus, *in vivo* SWI/SNF a un rôle positif et négatif sur la transcription. Ceci indique que ce complexe contribue à rendre l'ADN plus ou moins accessible selon les gènes. Les effets transcriptionnels observés sont la résultante d'effets directs et indirects (via des régulateurs pour ces derniers). Une partie des dérégulations observées est due non pas à l'action de SWI/SNF au niveau d'un gène particulier, mais à l'action de SWI/SNF sur la transcription de certains régulateurs. En dehors de ces fonctions transcriptionnelles, le complexe SWI/SNF semble également impliqué dans d'autres phénomènes cellulaires comme la réplication de l'ADN [Flanagan et Peterson, 1999], probablement à travers la stimulation de certains gènes mitotiques. Ces homologues humains sont quant à eux liés à un grand nombre de processus de développement et de croissances tumorales [Roberts et Orkin, 2004].

En ce qui concerne RSC, ce complexe est lui aussi impliqué dans la régulation de la transcription. En particulier RSC semble essentiel au maintien de la répression du gène *CHA1* de *S. Cerevisiae*. Des études d'accessibilité de l'ADN aux nucléases ont permis de mettre en évidence le positionnement des nucléosomes, et ainsi de montrer le rôle de RSC dans le maintien d'une structure chromatinienne répressive [Moreira et Holmberg, 1998].

Dans les conditions normales, un nucléosome est placé sur la boîte TATA du promoteur, l'induction de la transcription déplace ce nucléosome. Lorsque RSC est muté, ce déplacement est observé quelles que soient les conditions. RSC joue lui aussi un rôle dans la recombinaison homologue, processus de réparation des cassures double brins, toutefois son rôle est différent de celui de SWI/SNF puisqu'ils ne sont pas recrutés au même stade de la recombinaison homologue.

Famille Iswi Les complexes ISWI peuvent jouer le rôle de répresseur ou d'activateur de la transcription : ils répriment ainsi l'expression de gènes spécifiques au cours des premiers stades de développement larvaire de la Drosophile [Smith et Peterson, 2005], mais activent les gènes FTZ ou HSP70 [Okada et Hirose, 1998, Tsukiyama *et al.*, 1994]. ISWI1a et ISWI1b peuvent s'associer à l'ARN polymérase II (RNAPolII) pour réguler l'expression d'un gène. yISW1a s'associe à la RNAPolII au niveau du promoteur avant l'activation du gène, maintenant la transcription du gène dans un état réprimé grâce à un réseau de nucléosomes positionné sur la région du promoteur. Lors de l'activation du gène, yISW1a se dissocie et yISW1b s'associe à son tour à la RNAPolII [Morillon *et al.*, 2003]. yISW1b coordonne l'élongation, la terminaison et la production d'ARNm.

Des études ont également montré l'implication des complexes ISWI dans le développement. Chez des drosophiles déficientes en ces complexes les larves mâles présentent un chromosome X fortement décondensé, suggérant un rôle dans le maintien de la structure des chromosomes [Deuring *et al.*, 2000].

Un autre comportement important est le suivant. Des mutants de la Drosophile pour la sous-unité Acf1 présentent trois phénotypes qui sont reliés : (i) la chromatine extraite de ces mutants présente une structure sans périodicité et l'espacement entre les nucléosomes est réduit, (ii) les gènes contenus dans l'hétérochromatine ne sont plus réprimés, (iii) la durée de la phase S de la mitose est plus courte. Ces observations, complétées par le fait que Acf1 interagit avec la chaperonne NAP-1, ont permis de préciser le rôle *in vivo* des complexes contenant la sous-unité Acf1 : ils assurent l'assemblage régulier de chapelets de nucléosomes contribuant à la répression de la transcription ou de la réplication de l'ADN [Fyodorov *et al.*, 2004]. Par ailleurs de nombreuses données *in vitro* cette fois ont confirmé la capacité de ACF à assembler des nucléosomes sur une fibre de façon régulière avec un espacement de 50 pb environ [Gemmen *et al.*, 2005]. D'autres complexes, tels que CHRAC, ACF, ISWI1a et ISWI2, en sont capables alors que NURF et ISWI1b ne montrent pas cette activité [Varga-Weisz *et al.*, 1997]. Dans le cas de ISW2 et ISW1a, il a été postulé que cette capacité de régularisation était liée à la nécessité pour ces derniers de s'attacher à la fois au nucléosome et à l'ADN extranucléosomal [Dang *et al.*, 2007]. Cette propriété est également à associer à la faculté des complexes ISWI à déplacer les nucléosomes du centre vers les extrémités du substrat, alors que les complexes CHRAC peuvent catalyser la réaction inverse en transférant les nucléosomes des extrémités vers le centre [Längst *et al.*, 1999].

Famille Nurd/MI-2/Chd A nouveau les facteurs de remodelage de cette famille sont impliqués dans les processus de régulation de la transcription. En particulier le complexe de la drosophile dCHD1 a été localisé sur les chromosomes polyténiques³² au niveau de régions diffuses et relâchées (interbands) et dans les régions de forte activité

32. Les chromosomes polytènes (ou polyténiques) sont présents dans les cellules de certains organes de larves de diptères (dont la drosophile), par exemple dans les glandes salivaires. Ils correspondent à un grand nombre de chromatides soeurs (jusqu'à 1000) qui sont restés soudés entre eux. Leur coloration fait apparaître des bandes très foncées qui correspondent à des régions de chromatine condensée, et des bandes plus claires, les régions moins condensées de la chromatine activement transcrites.

transcriptionnelle (puffs) [Stokes *et al.*, 1996]. En outre, il existe une forte colocalisation de ce complexe avec les formes actives de la RNAPolII [Srinivasan *et al.*, 2005]. Il a été montré que le chromodomaine de CHD interagissait avec les queues des histones méthylées en K4 [Flanagan *et al.*, 2005, Pray-Grant *et al.*, 2005], cette méthylation étant considérée comme une marque de la chromatine activement transcrite [Kouzarides, 2007].

Enfin il a été démontré que les complexes de cette famille jouent un rôle dans le développement et la différenciation cellulaire [Smith et Peterson, 2005]. Des mutations de la protéine Mi-2 de la Drosophile sont létales pour les embryons, et, dans *C. Elegans*, LET-418/Mi-2 est nécessaire pour le maintien de la différenciation cellulaire des cellules somatiques³³, une étape cruciale dans les premiers stades du développement embryonnaire [Unhavaithaya *et al.*, 2002].

Famille Ino80/Swr1 γ INO80 joue un rôle lors de la réparation de cassures de l'ADN. En effet, l'une des premières étapes de la réponse de la cellule à un dommage causé à l'ADN est une phosphorylation rapide de l'histone H2AX adjacent au site de cassure de l'ADN, la forme phosphorylée est notée γ H2AX. Or des études ont montré qu'il existait une forte interaction entre γ INO80 et γ H2AX, ceci suggère un mode de recrutement de γ INO80 au niveau des cassures double-brin de l'ADN [van Attikum et Gasser, 2009]. SWR1 est nécessaire à l'incorporation du variant H2A.Z à approximativement 25 sites différents dispersés sur l'ensemble du génome de la levure [Meneghini *et al.*, 2003]. Ces complexes sont également impliqués dans l'activation de la transcription. La protéine Htz1 joue un rôle dans la transcription et peut aussi jouer le rôle de barrière empêchant les régions télomériques réprimées de déborder sur les régions de la chromatine où la transcription est activée. Il a été observé que la déposition de Htz1 au niveau des télomères était dépendante de SWR1 [Zhang *et al.*, 2004]. Des analyses biochimiques ont montré que la sous-unité Swc2 de SWR1 se liait physiquement à Htz1 et était nécessaire au dépôt de Htz1 sur les télomères [Wu *et al.*, 2005].

3 - Modes d'action des facteurs de remodelage

Les facteurs de remodelage, quelque soit leur famille, sont impliqués dans des processus de régulations liés à des réarrangements de la structure chromatinienne. Aussi bien au niveau du nucléosome individuel, comme le fait RSC en déplaçant un nucléosome au niveau du gène CHA1 chez la levure, qu'au niveau du chromosome entier, comme le suggère l'implication d'Iswi dans le maintien de la condensation du chromosome X chez les larves mâles de drosophile. Ils peuvent également agir sur des fibres de nucléosomes plus ou moins longues, et permettre le contrôle de la position de régions plus ou moins denses (hétérochromatine et euchromatine).

Le remodelage de la chromatine est donc un processus multi-échelle, dont le premier niveau d'action est une altération de la structure du nucléosome, sans que l'on ne connaisse

33. Ce sont les cellules qui ne seront pas différenciées en tant que cellules germinales.

précisément la nature du changement et le mécanisme d'action des facteurs de remodelage.

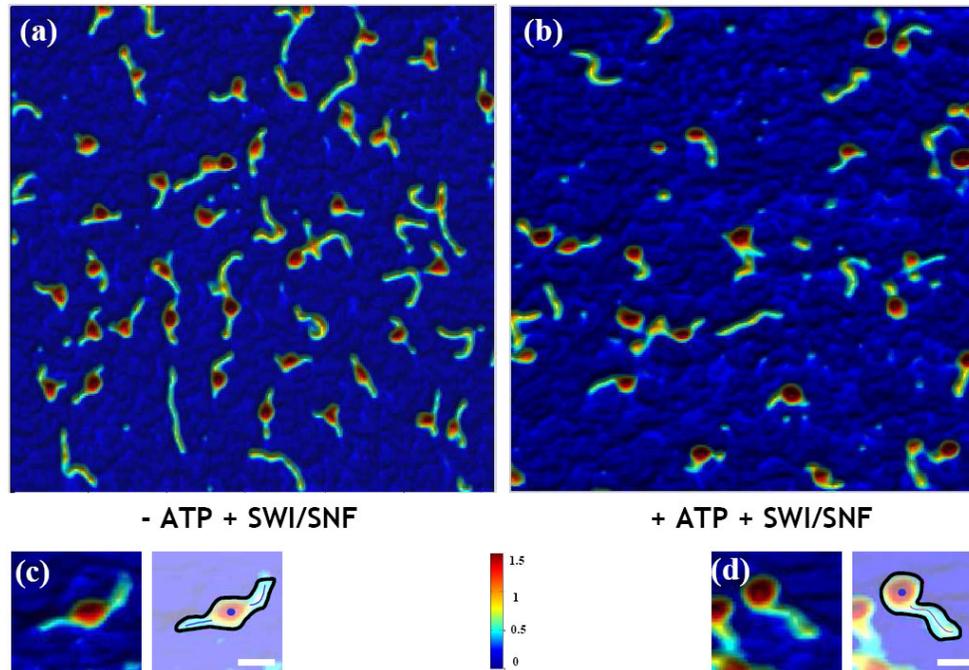


FIGURE 1.26 – Images AFM des nucléosomes avant et après réaction avec SWI/SNF Images $1 \times 1 \mu\text{m}$ de topographie AFM de mono-nucléosomes reconstitués sur une séquence positionnante 601 centrée sur un fragment d'ADN de 255 pb. Echelle Z : de 0 (bleu) à 1.5 nm (rouge). Les nucléosomes ont été incubés pendant 1h avec le facteur de remodelage SWI/SNF (a) en l'absence et (b) en présence d'ATP. Zoom des images de topographie AFM d'un nucléosome (c) centre et (d) en position extrême ainsi que le résultat de l'analyse d'image (ligne noire : contour du nucléosome, point bleu : centroïde de la particule de cœur du nucléosome, ligne bleue : squelette des bras d'ADN). Barre d'échelle : 20 nm. D'après [Montel *et al.*, 2007]

a. Remodelage d'un mononucléosome

Nous avons vu page 29 qu'un nucléosome pouvait se déplacer spontanément le long de l'ADN, sous l'effet de la température par exemple. Il se déplace afin de se positionner sur la séquence pour laquelle il a le plus d'affinités. On peut ainsi faire apparaître sur une séquence positionnante 5S plusieurs positions d'équilibre [Lavelle, 2002].

Les facteurs de remodelage ont eux la propriété de déplacer les mononucléosomes vers des sites préférentiels qui peuvent être différents des sites d'équilibre thermodynamique. Deux déplacements sont possibles que l'on nomme *cis* et *trans*. Les déplacements *cis* correspondent à un glissement de l'octamère d'histones le long d'un même fragment d'ADN alors que les déplacements *trans* correspondent à l'échange d'un octamère entre deux fragments d'ADN différents. Les facteurs de la famille Iswi sont connus pour effectuer des déplacements *cis* avec une directionnalité : les complexes ACF, NURF et CHRAC déplacent le nucléosome d'une extrémité d'un fragment d'ADN vers le centre, alors que DISWI procède à l'inverse et déplace un nucléosome central vers les extrémités. Les complexes de

la famille Swi2/Snf2 génèrent une variété de produits de remodelage avec une préférence pour les formes où l'octamère se retrouve à une extrémité du fragment (Figure 1.26). De plus ces complexes catalysent l'échange de dimères (H2A,H2B) et même d'octamères entiers déplaçant alors les nucléosomes de façon *trans*.

Pour mettre en évidence les modifications de positionnement des nucléosomes après action des facteurs de remodelage il existe de nombreuses expériences. Une méthode d'imagerie est la *microscopie à force atomique*³⁴ (AFM³⁵) comme on peut le voir sur la figure 1.26 tirée de la thèse de Fabien Montel [Montel, 2008]. On peut y voir des mononucléosomes déposés sur une surface de mica avant et après action de SWI/SNF. La mesure des longueurs des fragments d'ADN non complexés à l'octamère donne accès au positionnement du nucléosome. On peut donc observer la mobilité des nucléosomes soumis aux remodeleurs. D'autres expériences de biochimie plus classiques donnent accès à la position du nucléosome. Il s'agit de techniques de migration sur gel d'acrylamide comme nous l'avons vu page 29. Rappelons brièvement que la migration d'un mononucléosome dépend de la position de l'octamère sur le fragment d'ADN.

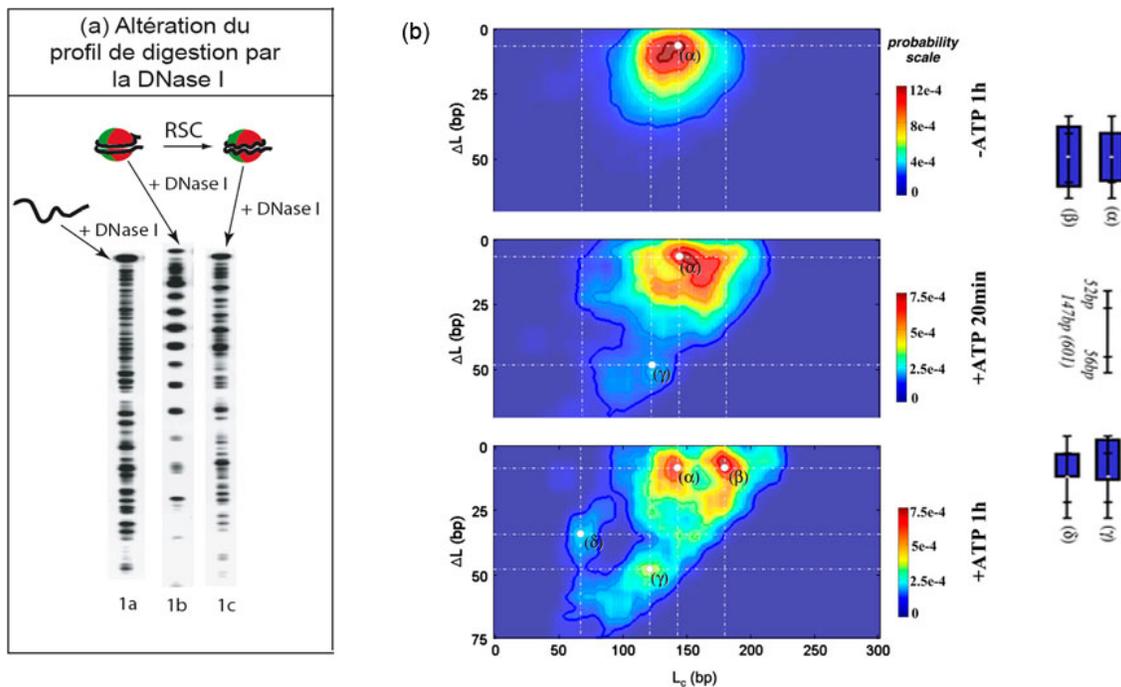


FIGURE 1.27 – (a) Profil de digestion à la DNase I de l'ADN positionnant 5S sans nucléosome (1a), avec un nucléosome (1b) et avec un nucléosome soumis à l'action de RSC (1c) [Cairns *et al.*, 1996]. (b) Analyse par AFM des structures de mononucléosomes soumis à l'action du facteur de remodelage RSC. Cette carte $L_c/\Delta L$ représente la longueur d'ADN complexée autour de l'octamère (L_c) en fonction de la différence de longueur des "bras" d'ADN libre (ΔL) qui donne la position du nucléosome. Ces cartes sont présentées en fonction de l'activité du facteur de remodelage. Les états du nucléosome sont présentés à droite. *D'après* [Montel *et al.*, 2007].

34. Nous reviendrons dans la suite plus en détail sur cette microscopie.

35. Pour Atomic Force Microscopy.

Une autre information importante issue de ces expériences est l'état du nucléosome soumis à l'application des remodeleurs que l'on peut appeler état *remodelé*. Les données biochimiques indiquent que le chemin de l'ADN autour de l'octamère d'histones est profondément modifié. En particulier, il semble que de nombreux points de fixation soient supprimés. Pour évaluer ces changements, il est possible de regarder la modification du profil de digestion de la nucléase DNase I. Cette exonucléase coupe l'ADN en fonction de l'accessibilité du sillon mineur de la molécule : un profil de digestion de l'ADN positionnant 5S est présenté sur la figure 1.27a-1a. Dans le cas d'un ADN enroulé autour de l'octamère d'histones ce sillon mineur n'est exposé que toutes les 10 pb environ. Le profil de digestion d'un mononucléosome reconstitué sur une séquence 5S présente donc une périodicité de 10 pb comme on peut le voir sur la figure 1.27a-b. Lorsque le mononucléosome est soumis à l'action du facteur de remodelage, le profil de digestion est complètement modifié (Figure 1.27a-1c), et la périodicité de 10 pb est supprimée [Cairns *et al.*, 1996]. Ce profil se rapproche de celui de l'ADN nu, prouvant ainsi que l'ADN du nucléosome remodelé est profondément modifié et que les contacts entre l'octamère et l'ADN nucléosomal sont rompus. Des données d'AFM confirment également que la structure de l'état remodelé est modifiée (Figure 1.27b) [Montel, 2008]. Il semble que dans l'état *remodelé* par RSC (noté β dans la figure 1.27b) une plus grande longueur d'ADN soit complexée (~ 185 pb) que dans le nucléosome canonique (147 pb), sans que le nucléosome ne soit déplacé.

Des études structurales par microscopie électronique ont permis de mettre en évidence le fait que des facteurs de remodelage tels que RSC ou SWI/SNF possèdent des "poches" permettant d'englober totalement un nucléosome [Leschziner *et al.*, 2007, Dechassa *et al.*, 2008]. Le substrat de ces facteurs de remodelage est donc un nucléosome unique, putativement modifié par le mouvement des sous-unités du complexe (Figure 1.28 I et II).

Les facteurs de remodelage sont capables de déplacer des nucléosomes vers des positions qui ne sont pas les plus stables thermodynamiquement. Pour faire cela ils déstabilisent la particule, rendant les contacts entre l'ADN nucléosomal et l'octamère d'histones plus faibles.

b. Remodelage d'une fibre de nucléosomes

Nous venons de regarder l'action des facteurs de remodelages sur un mononucléosome. Toutefois nous avons déjà précisé que ces complexes étaient aussi capables de prendre en charge le remodelage de la fibre de chromatine. L'action des facteurs de remodelage sur un chapelet de nucléosome dépend du type de remodeleurs (Figure 1.29). Les complexes du type SWI/SNF sont capables de désorganiser un chapelet de nucléosome au préalable régulier [Schnitzler *et al.*, 2001]. Au contraire plusieurs complexes de la famille ISWI sont capables de régulariser une fibre désorganisée, par exemple ACF, CHRAC ou γ ISWI1a. Même si le mécanisme de régularisation est inconnu il faut remarquer que tous les complexes

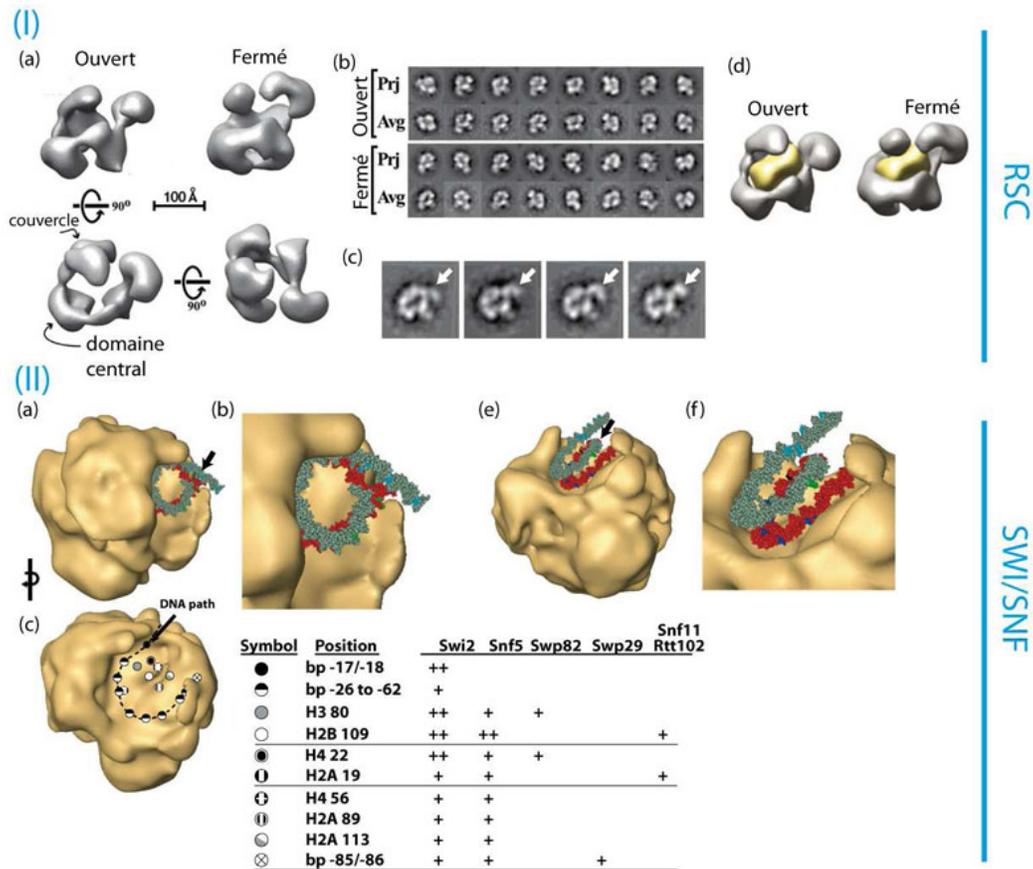


FIGURE 1.28 – Reconstruction à haute résolution des complexes de remodelage RSC et SWI/SNF par cryoEM. (I) RSC est formé de plusieurs lobes entourant une cavité centrale de la taille d'un nucléosome. L'un d'entre eux est flexible et présente une configuration ouverte et une configuration fermée. D'après [Leschziner *et al.*, 2007]. (II) SWI/SNF forme une structure compacte autour d'une cavité centrale dont la taille correspond, elle aussi, à celle du nucléosome. D'après [Dechassa *et al.*, 2008]

qui possèdent cette propriété possèdent également la faculté de faire glisser de manière *directionnelle* les nucléosomes. En effet γ ISWI1b qui ne provoque pas de déplacement *cis* avec une directionnalité claire n'a pas d'activité de régularisation.

Lors d'une régularisation, l'espacement entre les nucléosomes dépend du facteur utilisé. Avec γ ISWI2 les nucléosomes sont positionnés toutes les 200 pb environ, alors qu'avec γ ISWI1a l'espacement est de 175 pb. Cette distance pourrait dépendre de la façon dont le facteur de remodelage interagit avec le nucléosome et avec l'ADN de liaison. Pour γ ISWI2 il a été montré que la sous-unité Itc1 avait une très forte affinité avec l'ADN extranucléosomal, alors que γ ISWI1a semble interagir plus particulièrement avec les ADN entrants et sortants du nucléosome [Gangaraju *et Bartholomew*, 2007].

Enfin, les facteurs de remodelage semblent également capables de prendre en charge la déposition d'octamères d'histones le long d'un ADN. Par exemple ACF (de famille ISWI)

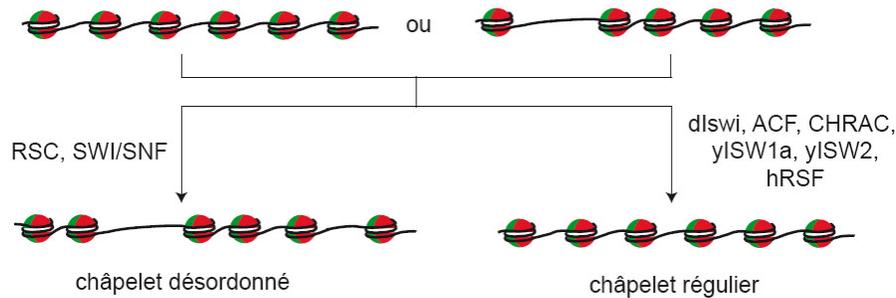


FIGURE 1.29 – Régularisation, ou au contraire, désorganisation d'un chapelet de nucléosomes en présence de différents facteurs de remodelage.

peut former de façon processive de longues répétitions périodiques de nucléosomes. Cette activité d'assemblage nécessite toutefois la présence du chaperon d'histones NAP-1 (pour *Nucleosome Assembly Protein 1*) [Gangaraju et Bartholomew, 2007].

Le glissement de nucléosomes paraît être la première étape du remodelage de la chromatine par les différents complexes. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène et rendre compte des évidences expérimentales comme l'augmentation de l'accessibilité de l'ADN nucléosomal. Tous ces modèles s'appuient sur une caractéristique commune des facteurs de remodelage, à savoir leur capacité à se déplacer le long de l'ADN.

c. Modèles mécanistiques

Même si les états finaux des nucléosomes après remodelage sont bien connus, il n'en est pas du tout de même en ce qui concerne l'état *remodelé*, c'est-à-dire l'état du nucléosome au cours du remodelage. La connaissance de cet intermédiaire permettrait de connaître le mécanisme d'action des remodeleurs. Pour le moment les informations obtenues ne sont pas suffisantes pour choisir entre les modèles mécanistiques proposés. Les deux plus classiques sont le modèle de *diffusion de boucles* et le modèle de *diffusion de torsion*. Tous deux sont basés sur l'hypothèse que les facteurs de remodelage ont une activité de *translocation*³⁶. Par exemple, le complexe RSC est capable de se déplacer le long d'un double brin d'ADN nu [Lia et al., 2006]. En mesurant en temps réel et à force constante la longueur du fragment en interaction avec RSC, les auteurs mettent en évidence pour la première fois de manière directe, la capacité de cet enzyme à transloquer efficacement plusieurs centaines de paires de base d'ADN en quelques secondes (Figure 1.30).

Diffusion d'une boucle d'ADN à la surface de l'octamère ou *Bulging model*

Ce modèle propose qu'un facteur de remodelage puisse se positionner au niveau d'un nucléosome (en interagissant par exemple avec l'une des histones) et interagir avec l'ADN à l'entrée ou à la sortie du nucléosome. Il pourrait alors se servir de son activité de translocation pour "pomper" un peu d'ADN à la surface de l'octamère, détruisant ainsi quelques

³⁶. Capacité d'un complexe à se déplacer le long de l'ADN en consommant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP.

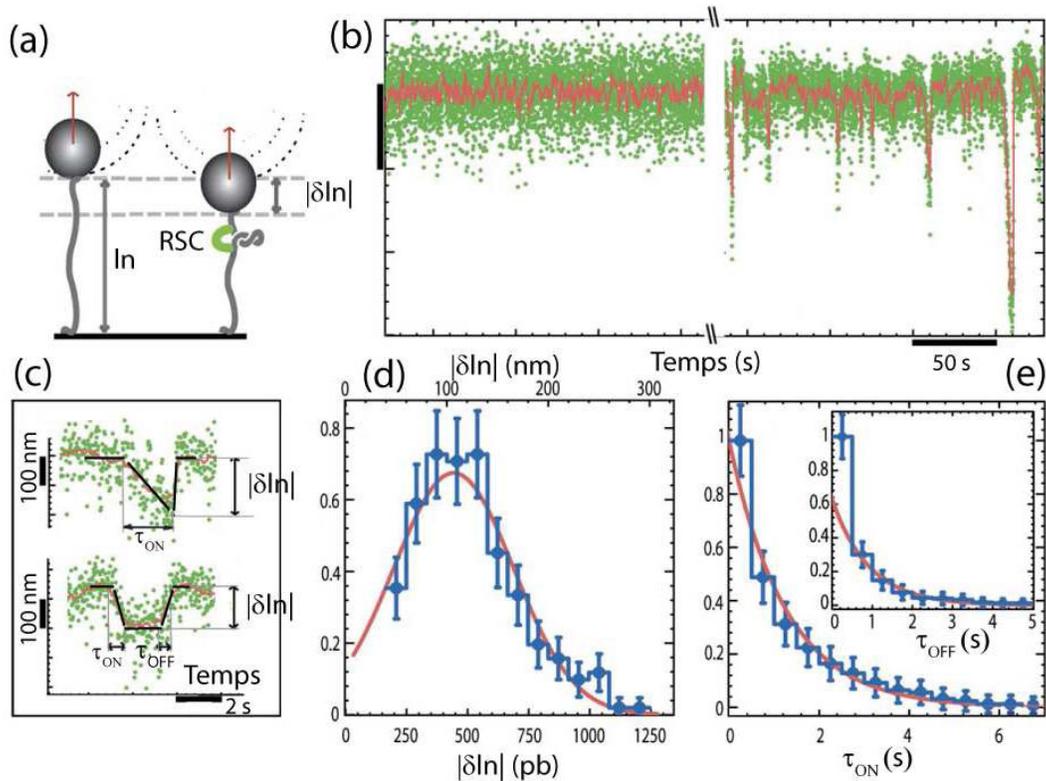


FIGURE 1.30 – (a) et (b) L'action de RSC sur un fragment d'ADN est suivie par le raccourcissement de l'ADN. (c), (d) et (e) En moyenne, RSC est capable de transloquer 400 pb en 2 secondes. Cette action est ATP-dépendante. D'après [Lia *et al.*, 2006]

contacts ADN-histones. Les fluctuations thermiques permettraient ensuite dans certains cas de recréer les contacts détruits mais de manière imparfaite en formant une boucle d'ADN ou une bulle (Figure 1.31a). Ceci aurait pour conséquence de créer un nucléosome possédant un défaut à l'entrée. Ce dernier serait alors susceptible de diffuser rapidement puisque lorsque le défaut se déplace, il produit autant de contacts qu'il en détruit. La bulle se propagerait ainsi tout autour de la surface de l'octamère modifiant alors la position de l'ADN par rapport à l'octamère d'histones et permettant donc le glissement de celui-ci le long de l'ADN. Il est souvent proposé que le moteur ait une action de type "pince à sucre" comme le décrit le schéma de la figure 1.31c [Saha *et al.*, 2006].

Diffusion de torsion à la surface de l'octamère ou *Twisting model*

Il a été montré que plusieurs facteurs de remodelage étaient capables de modifier la torsion de l'ADN et de modifier ainsi les interactions entre l'ADN et les histones [Havas *et al.*, 2000]. Ce modèle propose qu'un facteur de remodelage puisse se positionner au niveau d'un nucléosome et appliquer un couple sur l'ADN entrant ou sortant du nucléosome (par translocation le long d'un des brins de celui-ci par exemple). L'application de ce couple induirait une altération locale du degré d'enroulement de l'ADN rompant ainsi quelques contacts entre celui-ci et la surface de l'octamère. Cette petite région d'ADN al-

térée pourrait ensuite diffuser spontanément autour de la surface de l'octamère, modifiant ainsi le positionnement global de l'octamère par rapport à l'ADN (Figure 1.31b).

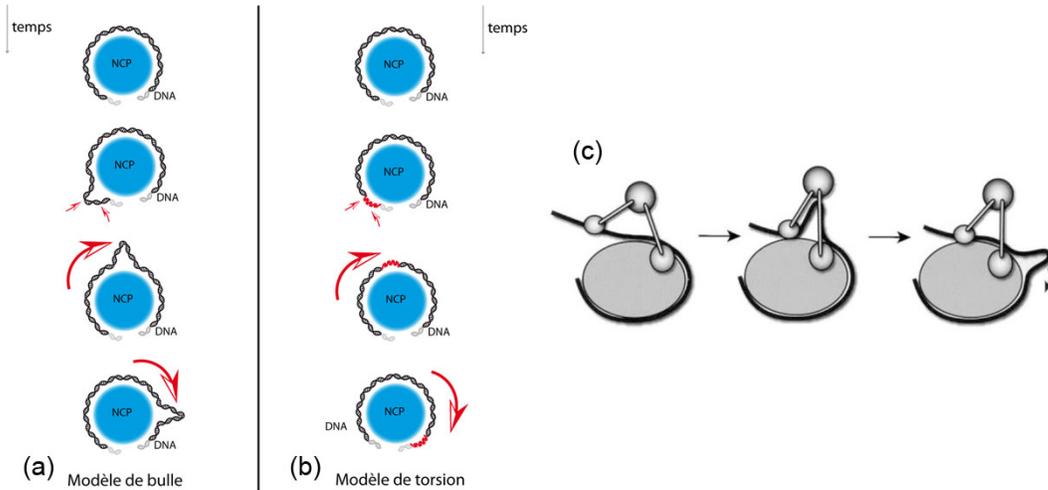


FIGURE 1.31 – (a) *Bulging Model* : modèle dans lequel une bulle d'ADN est créée à l'entrée du nucléosome par un facteur de remodelage et/ou les fluctuations thermiques, puis se propage pour ressortir de l'autre côté du nucléosome. (b) *Twisting Model* : modèle de torsion dans lequel une déformation angulaire (twist) se propage le long de l'ADN nucléosomal, sous l'action d'un facteur de remodelage et/ou de l'agitation thermique. D'après [Montel, 2008]. (c) Dans le cas de dISWI, il a été proposé que le facteur de remodelage soit capable de former à l'entrée du nucléosome une boucle à la manière d'une "pince à sucre". Cette boucle serait ensuite propagée par diffusion le long de l'ADN nucléosomal. D'après [Längst et Becker, 2001]

Ces deux modèles ne sont pas exclusifs l'un de l'autre et la situation réelle peut tout à fait correspondre à un intermédiaire entre ces deux propositions. En effet, il a été montré pour RSC ou SWI/SNF que l'induction d'un défaut de torsion est, en partie seulement, nécessaire à la translocation de l'ADN à l'intérieur du nucléosome [Saha *et al.*, 2002]. De plus les expériences réalisées à l'heure actuelle n'ont pas réussi à identifier de pas de glissement communs à tous les facteurs de remodelage. Par exemple le bulging model contient en lui même une distance minimale de déplacement du nucléosome de 10 pb (c'est la distance entre deux points de fixation de l'ADN nucléosomal), alors que la diffusion de torsion peut se faire sur une distance de 1 pb. On a observé jusqu'à maintenant des valeurs de déplacements élémentaires de 1 à 50 pb [Saha *et al.*, 2005, Zofall *et al.*, 2006]. Même si ces différences peuvent être liées au caractère indirect des mesures effectuées, il doit exister entre les familles de remodeleurs des particularités mécanistiques [Becker et Hörz, 2002].

Résumé

Nous venons de donner les éléments qui permettent de connaître la composition de la fibre de chromatine, substrat dans lequel est compacté la molécule d'ADN au sein des

noyaux des cellules eucaryotes.

La sous-unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il s'agit de l'enroulement de 146 pb d'ADN autour d'un octamère d'histones. Le repliement de la fibre de nucléosomes permet l'accès à des états de condensation très importants. Toutefois, la fibre doit pouvoir être réorganisée afin de rendre accessible le code génétique porté par l'ADN.

Des mécanismes de régulation ont pour rôle de modifier ou de maintenir l'architecture chromatinienne. Ces processus font intervenir des complexes protéiques, appelés facteurs de remodelage, ou bien des modifications des histones, afin de modifier le positionnement ou les propriétés dynamiques des nucléosomes.

Dans le contexte nucléaire, la fibre est soumise à une dynamique très importante. Nous avons choisi de nous intéresser à la description d'une fibre de chromatine lorsqu'elle est soumise à des contraintes physiques. Nous allons présenter dans le prochain chapitre les outils qui vont nous permettre de réaliser cette étude sur le substrat très complexe qu'est la chromatine.

CHAPITRE 2

Descriptions physiques de la chromatine

Sommaire

1	Approches physiques de la chromatine	60
1.1	Les ordres de grandeur mis en jeu	60
1.2	Les techniques d'analyses de molécules uniques	62
1.3	Expériences de molécules uniques sur la chromatine	72
1.4	Les modèles de fibres	76
2	La topologie de l'ADN	86
2.1	Notions de topologie	86
2.2	Techniques d'analyse de la topologie	89
2.3	La topologie du nucléosome	101
2.4	La topologie du tétrasome	106

Nous avons vu dans le chapitre précédent les propriétés de la chromatine. Cet assemblage nucléoprotéique a été l'objet de nombreuses investigations biochimiques qui ont permis de mettre en évidence la plupart de ses caractéristiques. La chromatine condense la molécule d'ADN très fortement, grâce à la formation d'un motif répété, le nucléosome. Des expériences de biochimie ont souligné une forte dynamique de cette particule, aussi bien au niveau de l'état d'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones, que de la position de cet octamère sur le fragment qui le porte ou bien de l'éjection et la réincorporation des dimères (H2A,H2B). Toutefois, ces expériences font intervenir en général de l'ordre de 10^{12} molécules (les concentrations typiques sont la dizaine de nM et le volume d'une expérience de l'ordre de $100 \mu L$). Dès lors toute mesure sur le contenu de ce tube donnera accès à une

moyenne d'ensemble de la grandeur mesurée. Les molécules du mélange, qui peuvent être dans le cas qui nous intéresse des nucléosomes ou bien des fibres de nucléosomes, sont très hétérogènes du fait des propriétés dynamiques particulières qui viennent d'être évoquées. La moyenne mesurée rendra donc peut être compte d'une propriété qui n'existe pas dans le mélange.

Il en est de même pour la dynamique temporelle des molécules au sein du mélange. Comme elles sont toutes désynchronisées, les fluctuations dans le temps d'une propriété mesurée sur l'ensemble de la population ne reflètent en rien la dynamique d'une seule molécule.

Très longtemps seules les valeurs d'ensemble étaient accessibles. Des techniques, développées dans les dernières décennies, permettent désormais de sonder une molécule à la fois et ainsi d'avoir accès à une dynamique individuelle. Ce sont les techniques de molécules uniques. Ces méthodes sont basées sur l'imagerie ou bien sur la mesure de propriétés physiques des objets étudiés (longueur, raideur,...). C'est pourquoi ce champ d'investigation s'est développé par le travail de physiciens à l'interface avec la biologie. Les grandeurs mesurées sont en général des paramètres physiques dont nous allons premièrement donner les ordres de grandeurs.

1 Approches physiques de la chromatine

1.1 Les ordres de grandeur mis en jeu

Distances Lorsque l'on s'intéresse à une molécule unique, les échelles mises en jeu sont en général très loin de ce que l'on est habitué à manipuler. Une molécule telle que l'ADN possède un diamètre de $2,4 \cdot 10^{-9}$ m soit 2,4 nm. Cependant nous avons vu que cette molécule est un long polymère, qui peut aller jusqu'au mètre. En général les molécules d'ADN étudiées font quelques micromètres de longueur.

Durées Les durées des événements biologiques se répartissent sur tous les ordres de grandeurs. Lorsque l'on s'intéresse aux protéines et en particulier à leur dynamique moléculaire¹ l'échelle de temps est la ps. Les changements conformationnels de plus grande ampleur se déroulent sur des ns. Un cycle d'activité d'une enzyme peut prendre de 1 ms à 1s et les étapes biochimiques élémentaires s'effectuent sur une durée de 1 μ s à 1 ms.

Energies Intéressons-nous aux échelles d'énergie mises en jeu au niveau d'une molécule unique. Les cellules tirent leur énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Chaque molécule d'ATP peut ainsi fournir une dizaine de $k_B T$, où k_B est la constante de Boltzmann et T la température exprimée en Kelvin. Cette grandeur vaut $4 \cdot 10^{-21}$ J. $k_B T$ constitue l'échelle

1. Il s'agit de la réorganisation de résidus ou de domaines protéiques soumis à l'agitation thermique. Classiquement les simulations de dynamique moléculaire se déroulent sur 1 ns avec un pas de temps de la ps.

d'énergie pertinente au niveau de la molécule unique puisqu'elle permet de juger de la stabilité d'une liaison. Une liaison covalente a une énergie de l'ordre de $100 k_B T$, alors qu'une liaison faible met en jeu quelques $k_B T$. Par exemple, l'énergie nécessaire pour séparer deux bases complémentaires de l'ADN est de l'ordre de $6 k_B T$.

Forces Nous utilisons donc comme échelle d'énergie $k_B T$. En ce qui concerne la force, les changements conformationnels des protéines étant de l'ordre du nm, cela conduit à une échelle caractéristique de l'ordre de $4 \cdot 10^{-21} / 10^{-9} = 4 \cdot 10^{-12} N$ soit le piconewton. L'échelle de force utilisée dans les expériences de molécules uniques s'étend de 0,1 pN à 100 pN.

Nous venons de voir plus haut les énergies mises en jeu dans les liaisons covalentes et dans les liaisons faibles. Sachant qu'une liaison covalente correspond à une centaine de $k_B T$ et que leur distance caractéristique est la centaine de picomètres, la force correspondante est de l'ordre du nanonewton (nN). En ce qui concerne une liaison faible telle que celle qui lie deux bases complémentaires dans le double hélice d'ADN, comme ces deux bases sont séparées d'environ 1 nm et que leur énergie est de l'ordre de $k_B T$, la force pour séparer ces deux bases est de l'ordre de 10 pN. Par contre une autre liaison faible très importante², celle qui lie la biotine à la streptavidine, met en jeu une force caractéristique de l'ordre de 160 pN [Florin *et al.*, 1994].

A cette échelle, l'agitation thermique a une importance capitale. Chaque molécule d'eau du milieu d'étude qui entre en collision avec la particule étudiée exercent une force instantanée, mais comme la particule reçoit statistiquement autant de chocs dans toute les directions, elle subit en moyenne une force nulle. Toutefois, si on l'observe sur un temps suffisamment court, les fluctuations statistiques des chocs peuvent devenir importantes et alors la force ressentie n'est plus négligeable. La force nette exercée par les chocs avec les molécules d'eau dépend donc crucialement du temps d'observation de la particule.

Une modélisation mathématique a été proposée par Langevin. Il s'agit d'une force, ou plutôt *densité de force* qui a les propriétés suivantes : sa valeur moyenne est nulle et sa valeur instantanée est aléatoire. Elle peut être représentée par une variable aléatoire gaussienne dont la fonction de corrélation (indépendante du temps) vaut $F_L(t)F_L(t + \tau) = 12\pi\eta dk_B T \delta(\tau)$, où d représente le diamètre de la particule considérée, η désigne la viscosité du milieu, et δ la distribution de Dirac. Cette définition permet de calculer l'amplitude F_L de la force ressentie par une particule durant un temps Δt , c'est-à-dire observée avec une bande passante $\Delta f \equiv \frac{1}{\Delta t}$ (exprimée en Hz) :

$$F_L(\Delta f) = \sqrt{12\pi\eta dk_B T \Delta f}$$

Si on applique cette formule à une sphère de diamètre 1 μm dans de l'eau à température ambiante, observée sur 1 s, on obtient une force de l'ordre de 0.01 pN.

2. Nous verrons dans la suite que le couple biotine/streptavidine est utilisé pour l'accrochage d'un ADN sur des surfaces.

1.2 Les techniques d'analyses de molécules uniques

Les techniques modernes d'études de molécules uniques sont nombreuses, elles concernent la visualisation de molécules individuelles ou bien leur manipulation.

Il est possible de faire une image directe de la molécule étudiée, par exemple à l'aide d'un AFM ou bien d'un microscope électronique. La visualisation indirecte d'une seule molécule à l'aide d'un marqueur fluorescent est également désormais réalisable à l'aide d'un microscope optique.

Pour manipuler une molécule unique (rappelons que l'ordre de grandeur caractéristique est le nanomètre) il faut pouvoir la "saisir". Les outils développés font en général appel à des objets eux mêmes visualisables et manipulables pour médier la manipulation d'une seule molécule.

Nous allons décrire ces deux approches différentes et les outils actuellement utilisés pour l'étude de molécules uniques.

1 - Visualisation de molécules uniques

a. La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique a été développée dans les années 1980 par Binnig et coll. [Binnig *et al.*, 1986]. Le principe de ce microscope est le suivant (Figure 2.1) : une pointe de dimensions nanométriques située à l'extrémité libre d'un micro-levier (ou cantilever) est approchée au voisinage immédiat d'une surface. L'interaction entre la pointe et la surface se traduit par l'apparition de forces, aussi bien répulsives qu'attractives en fonction de la distance pointe-surface (Figure 2.1d). Les déflexions du levier sous l'action de ces forces sont mesurées par un système de détection optique constitué d'un faisceau laser et d'une photodiodes à quatre quadrants. Le faisceau laser, centré sur l'extrémité supérieure du levier, est réfléchi vers les photodiodes qui délivrent une tension électrique proportionnelle à la déflexion du levier (Figure 2.1a).

La déflexion en un point donne donc accès à la dimension verticale en ce point. Pour obtenir une image de la surface, l'échantillon est déplacé sous la pointe grâce à des céramiques piézoélectriques X-Y-Z. Lors de ce balayage, un système de rétroaction permet de garder un paramètre de contrôle constant comme la déflexion du levier ou la hauteur du levier selon l'information recherchée. Dans la grande majorité des cas le paramètre de consigne/contrôle est la déflexion exercée sur le micro-levier et donc la force ressentie par ce dernier. Comme la force exercée dépend de la distance pointe-surface, les déplacements imposés dans ce cas donnent accès à la topographie de la surface.

Les micro-leviers ont pour dimensions entre 50 et 300 μm de longueur, 5 μm de largeur environ et sont constitués de silicium, d'oxyde de silicium ou bien de nitrure de silicium. La pointe réalisée à son extrémité est en général faite de carbone diamant et a un rayon de

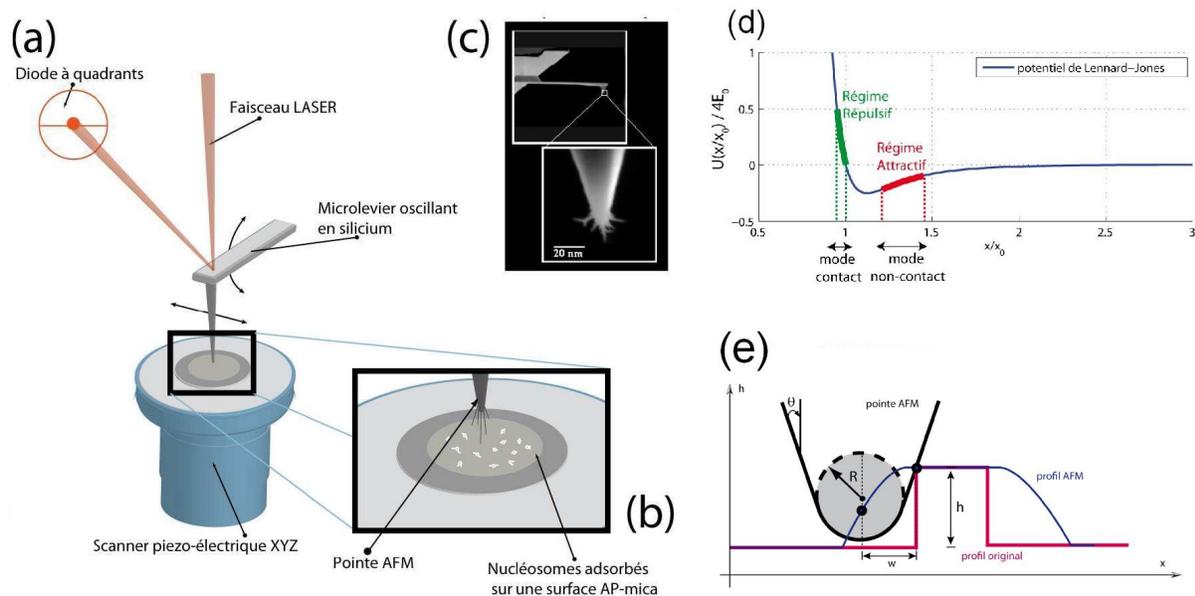


FIGURE 2.1 – Principe général du microscope à Force Atomique. (a) Vue générale. (b) Zoom sur le contact pointe-surface dans le cadre de l’observation de mononucléosomes. (c) images en microscopie électronique d’un micro-levier et de sa pointe. (d) Potentiel d’interaction entre la pointe et la surface. (e) Limite de la résolution latérale de l’AFM. La pointe ne peut pas accéder à certaines zones de l’échantillon. *D’après [Montel, 2008].*

courbure final de 1 à 3 nm [Montel, 2008]. C’est la qualité de la pointe et du cantilever qui détermine la résolution accessible. En particulier, la résolution latérale de l’AFM n’est pas imposée par le système piezo ou l’électronique du système mais par la pointe elle-même. En effet, comme on peut le voir sur la figure 2.1e, il est impossible pour la pointe d’accéder à certaines zones de l’échantillon. Il en résulte un élargissement apparent des objets de très petites dimensions.

Les dispositifs les plus performants permettent l’observation du réseau d’atomes de la surface analysée. Dans le cas de l’imagerie de protéines ou d’assemblages nucléoprotéiques comme la chromatine, la résolution classique est de l’ordre du rayon de courbure de la pointe, c’est à dire d’environ 3 nm.

Pour observer des complexes biologiques il faut les fixer sur une surface. Pour cela on utilise en général des surfaces de mica. Ce matériau présente deux avantages très importants. Tout d’abord il est facilement clivable selon des plans atomiques, on peut donc très facilement produire des surfaces planes, à l’atome près, ce qui est un avantage indéniable dans le cas de la microscopie à force atomique. Le second avantage est que ce type de surface est facilement modifiable chimiquement pour permettre l’adsorption de molécules sur la surface. Pour obtenir une meilleure résolution, les échantillons sont ensuite séchés avant d’être imagés. Deux exemples d’images obtenues par AFM pour des substrats d’origines biologiques sont présentés sur la figure 2.2. On y voit sur le panneau de gauche une membrane biologique contenant des porines³ et à droite une fibre de chromatine

3. Les porines sont des complexes membranaires jouant le rôle de canaux ioniques afin d’échanger des

purifiée à partir d'érythrocytes de poulet. On obtient de ces images des informations sur la structure des complexes étudiés. Toutefois il faut garder à l'esprit que la déposition des objets étudiés sur la surface de l'échantillon peut avoir des conséquences sur la structure même de l'objet.

Pour le moment, il est difficile de réaliser en AFM des mesures sur la dynamique en temps réel d'un échantillon, même s'il est possible de réaliser des images en conditions physiologiques, la résolution est nettement inférieure au cas précédent. De plus il est toujours nécessaire de faire un balayage, en général assez lent (plusieurs secondes), pour réaliser une image. Ces dernières années a été développée une nouvelle technique de balayage rapide, sur une durée de l'ordre de la centaine de ms, qui permet de faire des mesures dynamiques en conditions physiologiques sur des macromolécules biologiques [Ando *et al.*, 2001].

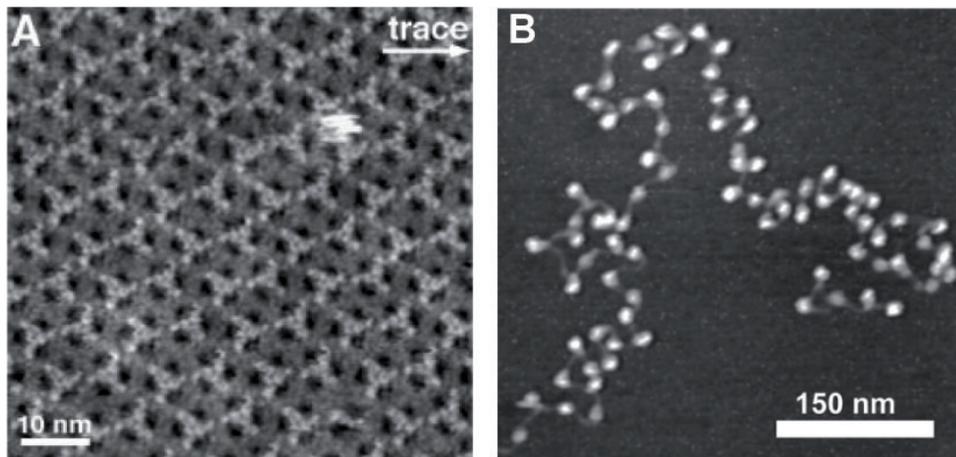


FIGURE 2.2 – Exemples d'images obtenues par microscopie à forces atomiques. (a) Porines observées sur une membrane périplasmique [Müller *et al.*, 1999]. (b) Fibre de chromatine observée en cryoAFM [Shao, 1999].

b. Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission a été développée au cours du XX^{ème} siècle. Elle consiste aussi en la visualisation d'objets de taille nanométrique fixés sur une surface. Le principe est le même que pour un microscope optique, sauf que ce sont avec les électrons que l'image est réalisée. Un faisceau d'électrons vient frapper un objet biologique déposé sur une couche très fine de graphite. Les électrons diffusés sont collectés par des lentilles magnétiques et focalisés sur un écran électrosensible⁴, le grossissement obtenu peut aller jusqu'à 100 000 fois. Il est alors possible de faire une image avec une caméra haute sensibilité classique. La résolution peut atteindre la fraction de nanomètre avec ce type de

ions entre l'intérieur de la cellule et l'extérieur.

4. Ces écrans permettent la conversion du signal électronique en signal lumineux.

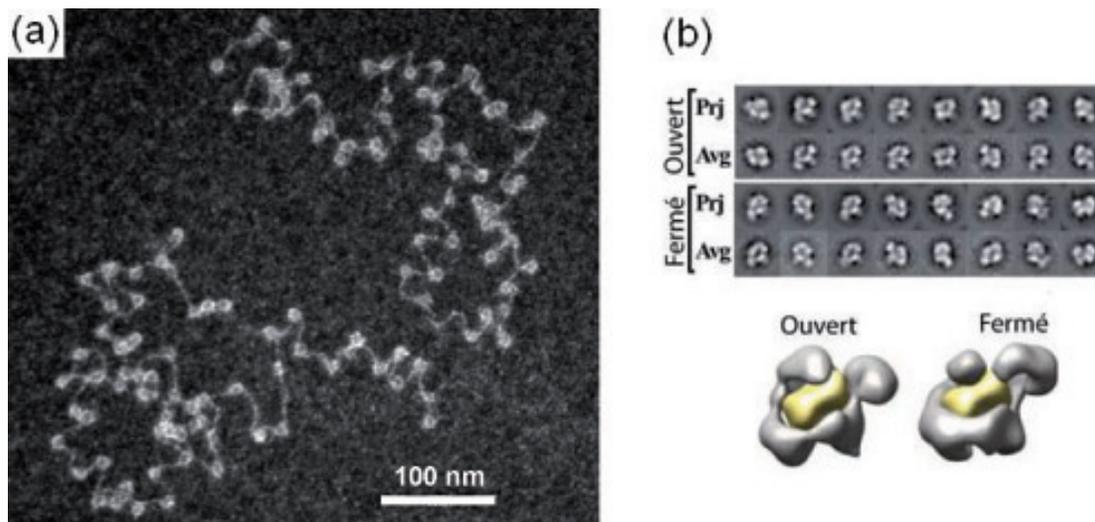


FIGURE 2.3 – Exemples d’images obtenues en microscopie électronique. (a) Fibres natives de nucléosomes vues en microscopie électronique en transmission. *C. Lavelle, IGR*. (b) Clichés de cryomicroscopie électronique du facteur de remodelage RSC (en haut), et structures du complexe obtenues à partir des clichés (en bas). *Adapté de [Dechassa et al., 2008]*.

microscope (Figure 2.3).

A nouveau cette technique nécessite une fixation du substrat sur une surface, et de plus dans ce cas il faut également que l’objet soit marqué par des métaux lourds afin de rendre son interaction avec les électrons suffisante. Il est fréquent de marquer les substrats nucléiques avec de l’acétate d’uranyle. Par ailleurs, pour réaliser l’image, il faut placer l’échantillon sous vide. On s’éloigne donc très fortement des conditions physiologiques. De plus, même si la résolution est très bonne, elle ne concerne que la projection de l’objet sur la surface, il manque donc de l’information quant à la hauteur de l’échantillon.

Il convient de préciser qu’une autre technique, la *cryomicroscopie électronique*, est aussi utilisée pour visualiser les objets biologiques. Dans ce cas, les complexes protéiques sont figés dans la glace par un refroidissement très rapide qui permet de produire la glace sous forme vitreuse⁵ et donc de préserver les échantillons. Enfin, il n’est pas nécessaire de fixer l’objet sur une surface : il est donc possible de visualiser plusieurs orientations ce qui permet de reconstruire la structure d’un complexe avec une résolution qui peut approcher 5 nm (Figure 2.3b).

Nous avons utilisé la technique de microscopie électronique en transmission pour visualiser les fibres de chromatine que nous avons étudiées avec un contraste important.

5. Dans ces conditions les molécules d’eau n’ont pas le temps de s’organiser selon un réseau cristallin, qui détruirait les échantillons. La glace vitreuse est l’état solide de l’eau qui se rapproche le plus de la phase liquide.

c. Visualisation dynamique indirecte : *FRET*

Nous venons de décrire deux méthodes de visualisation directe d'objets biologiques de tailles nanométriques. Ces deux techniques donnent de très importantes informations sur la structure et les dimensions des objets étudiés mais présentent un gros désavantage : elles ne donnent que des informations statiques. S'il est impossible à l'aide d'un microscope optique de visualiser directement des protéines, il est désormais tout à fait réalisable de déterminer la position d'une de leurs sous-parties à l'aide d'un marqueur fluorescent unique⁶.

La technique de FRET, pour *Fluorescence (or Förster) Resonance Energy Transfer* met à profit cette possibilité pour visualiser des mouvements nanométriques, par exemple les mouvements relatifs de deux sous-domaines d'un complexe lors d'une activité catalytique. Ces deux sous-domaines sont chacun marqués par un fluorophore différent. L'un d'eux, le donneur, est excité par une source externe et transfère son énergie de façon non-radiative⁷ à l'autre fluorophore, l'accepteur, qui lui, va alors émettre des photons. Pour que cela soit possible il faut réunir deux conditions :

- le spectre d'émission du donneur doit chevaucher le spectre d'absorption de l'accepteur,
- la distance entre les deux fluorophores doit être de l'ordre du nanomètre.

Plus précisément l'efficacité E de ce transfert peut être exprimée en fonction de la distance R entre l'accepteur et le donneur :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

où R_0 est le rayon de Förster pour lequel 50% de transfert d'énergie a lieu. Ce rayon vaut typiquement 5 nm pour le couple de donneur/accepteur Cy3/Cy5, paire de fluorophores communément utilisée en FRET. Cette technique permet de suivre des déplacements relatifs des deux fluorophores de 1 à 10 nm environ. Cette technique a été notamment mise à profit pour l'étude de la dynamique de la structure d'un mononucléosome [Koopmans *et al.*, 2007].

Pour étudier cette dynamique, Koopmans et coll. ont marqué l'ADN avec un fluorophore (Cy5) au niveau de l'axe dyadique sur le tour central. Le second fluorophore (ATTO647N) est placé en sortie du nucléosome (Figure 2.4). Dans ces conditions, si l'ADN nucléosomal est complètement enroulé autour de l'octamère d'histones, les deux fluorophores sont suffisamment proches pour que l'efficacité de FRET soit non nulle. Dans ce cas le signal de l'accepteur peut être détecté.

Les mononucléosomes ainsi modifiés sont attachés par une extrémité d'ADN à la surface, et l'imagerie se fait par une technique classique de TIRF⁸. L'équipe de J. Van Noort a ainsi pu mettre en évidence que le transfert d'énergie entre les deux fluorophores était

6. Ce marqueur peut être un Quantum Dot ou bien un autre fluorophore de type Cy5, Cy3 ...

7. C'est à dire qu'il n'émet pas de photons.

8. *Total Internal Reflection Microscopy*, cette technique permet de n'exciter qu'un très petit volume au dessus de la surface, cela rend possible une augmentation du rapport signal/bruit de fluorescence.

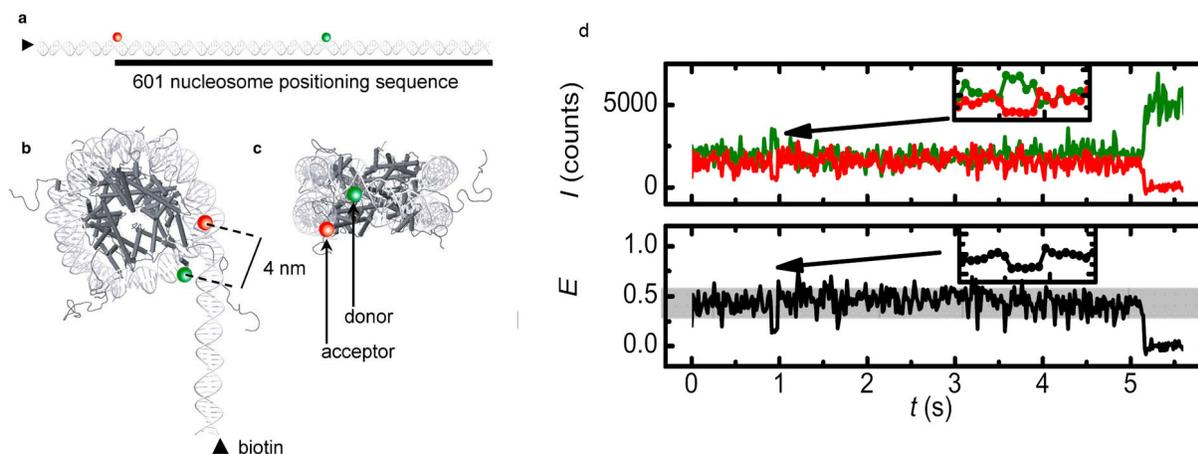


FIGURE 2.4 – Expériences de FRET sur un mononucléosome reconstitué sur une séquence positionnante 601. (a) Position des marqueurs fluorescents le long de l’ADN positionnant, en rouge ATTO647N, en vert Cy5. (b) et (c) Position des deux marqueurs à l’intérieur du nucléosome, lorsque l’ADN nucléosomal est complètement enroulé autour de l’octamère d’histones les deux fluorophores ne sont séparés que de 4 nm. (d) Trace de l’intensité de fluorescence des deux marqueurs (en haut) et de l’efficacité de transfert (en bas). On observe sur des périodes très courtes la diminution de l’efficacité de transfert, synonymes d’augmentation de la distance entre les deux fluorophores. *D’après [Koopmans et al., 2007].*

réduit de manière transitoire (Figure 2.4d). La constante de temps de ce phénomène est d’environ 120 ms. Cette diminution de E traduit directement l’augmentation de la distance entre les deux marqueurs, donc la modification de l’enroulement de l’ADN nucléosomal. Ils ont attribué cet effet à la respiration de l’ADN, en conséquence de la rupture de quelques SHL. Ce résultat aboutit à des conclusions similaires de celles obtenues par J. Widom dont nous avons déjà parlé [Li et Widom, 2004] (page 29).

La technique de FRET permet donc l’accès à des informations dynamiques au niveau de la molécule avec une résolution de l’ordre de quelques nanomètres. Toutefois, s’agissant d’une visualisation indirecte, l’information que l’on obtient ne concerne que deux points (les marqueurs fluorescents), on ne peut donc obtenir que des indications sur la position relative de deux sous-domaines. Ce genre d’expériences constitue un complément aux données structurales obtenues par d’autres techniques.

2 - Manipulations de molécules uniques

Nous venons de détailler les techniques modernes de visualisation de molécules uniques que sont l’AFM, la microscopie électronique ou bien le FRET, ces méthodes ont des résolutions qui sont compatibles avec les dimensions des molécules uniques (le nanomètre). Nous avons évoqué page 61 le fait que l’ordre de grandeur de la force à laquelle sont soumises les molécules était le piconewton. Des outils ont été développés depuis les années 1980 pour exercer des contraintes dans cette gamme de force.

a. Les pinces optiques

Les pinces optiques [Ashkin, 1997] constituent la principale technique d'étude de molécules uniques. Le principe est le suivant : il est possible de piéger un objet d'indice de réfraction plus grand que celui de l'eau à l'aide d'un faisceau laser fortement focalisé. La zone de piégeage étant le volume de l'espace où est focalisé le laser.

En général, une bille de polystyrène est piégée par un laser fortement focalisé à travers un objectif de très grande ouverture numérique. La longueur d'onde du laser est très souvent de 1064 nm (laser de type Nd :YAG) afin d'éviter d'échauffer localement le milieu, car les puissances du faisceau peuvent aller jusqu'au W. Le fort gradient de champ électromagnétique exerce une force sur l'objet (polarisé par le champ) qui tend à le ramener vers le point de plus forte intensité (Figure 2.5a). Le point de focalisation constitue donc le centre du piège, le faisceau exerce alors une force de rappel élastique qui peut être ajustée par l'intensité du laser.

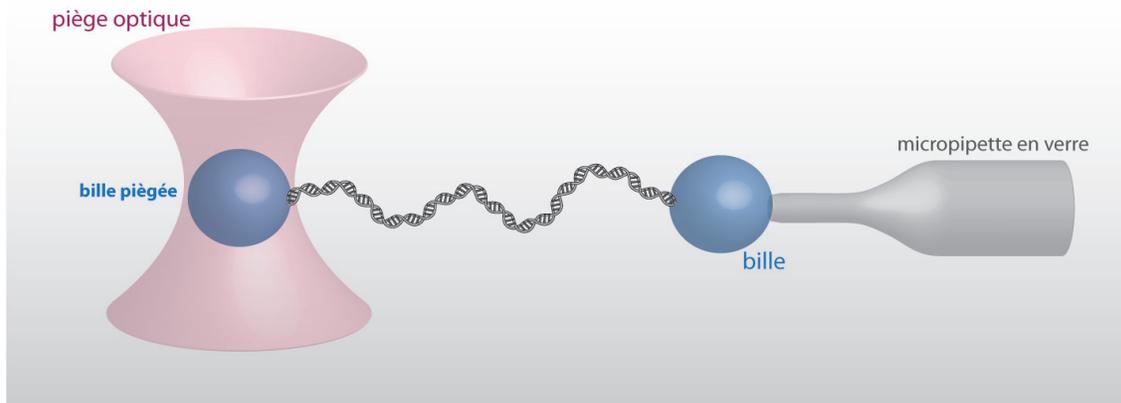


FIGURE 2.5 – Schéma d'un dispositif expérimental de pinces optiques. Un ADN est accroché par une de ses extrémités à une bille micrométrique de polystyrène piégée par un faisceau laser fortement condensé, le piège optique. L'autre extrémité de la molécule est accrochée à une autre bille micrométrique maintenue par aspiration avec une micropipette. Le déplacement de la micropipette permet d'exercer une force sur la molécule par l'intermédiaire du piège optique.

Cette technique permet de manipuler une bille. Si l'on utilise cette bille comme *poignée* pour saisir une protéine ou une molécule d'ADN, on peut alors exercer sur cet objet une force. Cela est réalisé en modifiant la surface de la bille pour permettre un accrochage spécifique de la molécule d'intérêt. Classiquement, on modifie la molécule d'intérêt avec la biotine, pour qu'elle s'accroche avec la streptavidine qui recouvre la bille. Le couple digoxigénine/antidigoxigénine peut aussi être utilisé pour, par exemple, fixer l'autre extrémité de la molécule à une bille ou une surface, afin d'appliquer une tension.

Les objets piégés étant de taille micrométrique, il est possible de mesurer leur position avec une précision de l'ordre de la dizaine de nanomètre. Cette mesure est importante puisque c'est la position de la bille à l'intérieur du piège qui impose la force exercée sur

cette bille. La raideur d'un tel piège optique est en général comprise dans la gamme allant de 10^{-5} à 10^{-3} N/m. Le système peut être relié à un dispositif de rétroaction qui contrôle la position de la bille dans le piège afin d'appliquer une force constante.

Cette méthode a permis l'étude de nombreux objets biologiques comme par exemple les moteurs moléculaires. Ces protéines sont en effet capables de se déplacer le long des filaments d'actines ou de microtubules qui constituent le cytosquelette des cellules. Elles peuvent même être à l'origine du déplacement de grosses vésicules [Howard, 1997]. Les manipulations en pinces optiques ont donné accès à de nombreuses informations concernant la force que pouvait développer ces moteurs et les pas élémentaires qu'ils étaient capables de générer [Mallik *et al.*, 2004, Block *et al.*, 1990, Molloy *et al.*, 1995].

Les pinces optiques ont aussi été utilisées pour caractériser les propriétés physiques des acides nucléiques et des complexes qui agissent sur eux. Ainsi il est possible de mesurer les caractéristiques force-extension de la molécule d'ADN : il suffit pour cela d'accrocher une extrémité de la molécule à un point fixe et l'autre extrémité à une bille piégée par les pinces optiques [Fuller *et al.*, 2006]. L'équipe de S. Block a également pu mettre en évidence grâce à cette technique la cinétique d'élongation de l'ARNm par l'ARN polymérase d'*E. Coli*. Ils ont pu constater d'une part que le pas élémentaire de la polymérase le long de l'ADN est bien de 1 pb, et d'autre part que l'enzyme était soumise à de fréquentes pauses durant l'élongation [Abbondanzieri *et al.*, 2005] (Figure 2.6b). En 2009 l'équipe C. Bustamante a étudié avec la même méthode la transcription d'un ADN sur lequel est positionné un nucléosome. Ils ont ainsi montré que la présence de cette particule induisait un arrêt provisoire de la polymérase au niveau du nucléosome [Hodges *et al.*, 2009].

b. Les pinces magnétiques

Le dispositif de pinces magnétiques consiste en la manipulation d'un ADN par l'intermédiaire d'une bille magnétique [Strick *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 1992]. La molécule est accrochée par une de ses extrémités à la surface d'une lamelle de verre positionnée sur un microscope inversé, et par son autre extrémité à une bille super-paramagnétique. Au dessus de l'échantillon est placée une paire d'aimants qui génère un champ magnétique orienté horizontalement. La bille est alors soumise à une force verticale due au gradient de champ magnétique. De plus, le moment magnétique de la bille s'oriente selon les lignes de champ horizontales (Figure 2.7).

A l'échelle des déplacements de la bille (inférieurs au micromètre), le champ est essentiellement homogène, donc la force ne varie pas avec la position de la bille. C'est bien la position verticale des aimants qui fixe la force. La bille magnétique n'est pas piégée comme peut l'être la bille dans un piège optique, c'est bien parce qu'elle est accrochée par l'intermédiaire d'une molécule que la bille est contrainte spatialement. Et c'est la molécule elle-même qui fixe la raideur du piège, les aimants eux fixent la force par leur position. Ainsi pour une molécule d'ADN double brins de longueur $1 \mu\text{m}$ sur laquelle on exerce une

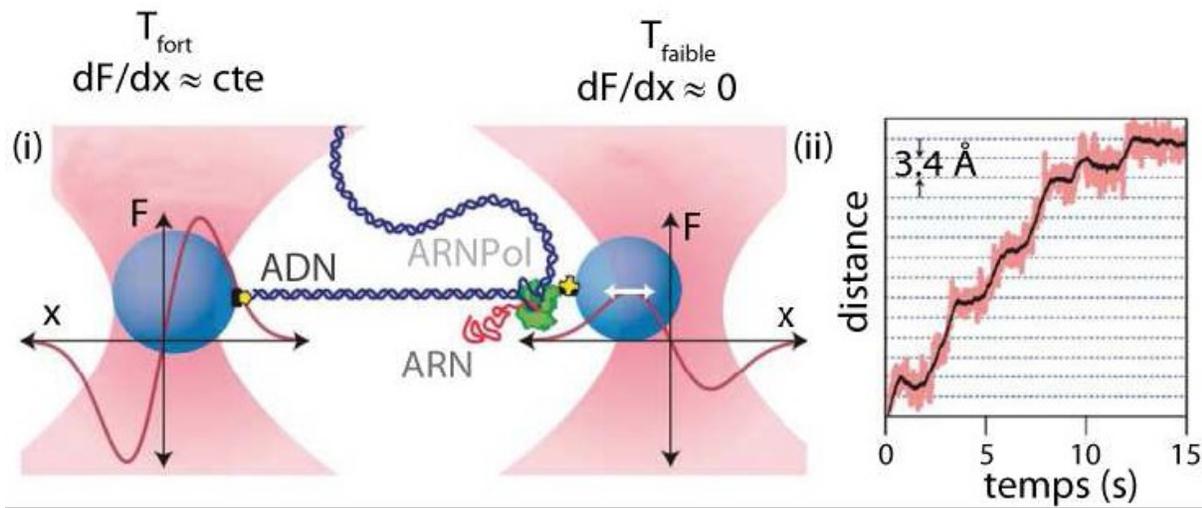


FIGURE 2.6 – Etude de la transcription d’une molécule unique d’ADN par une ARN polymérase d’*E. Coli*. (i) Schéma du dispositif expérimental. Un ADN est accroché à une bille de polystyrène piégée dans un piège optique. Cet ADN est transcrit par une ARN polymérase accroché à la surface d’une deuxième bille elle-même capturée par le second piège optique. La longueur d’ADN transcrit est mesurée par la position relative entre les deux billes. (ii) Représentation de la distance parcourue par l’enzyme le long de l’ADN en fonction du temps. On peut observer un profil avec des paliers séparés d’une distance de $3,4 \text{ \AA}$, la distance entre deux paires de bases. Adapté de [Abbondanzieri *et al.*, 2005].

force de 0.5 pN , la raideur vaut quelques 10^{-6} N.m^{-1} . Lorsque la force est augmentée à 10 pN la raideur augmente de manière importante et vaut environ $2.10^{-4} \text{ N.m}^{-1}$. La gamme de force accessible est typiquement de $0,01$ à 40 pN .

La position de la bille peut être mesurée en temps réel (acquisition à une fréquence de 60 Hz typiquement) avec une résolution de l’ordre de la dizaine de nanomètres. La force quant à elle est mesurée pour chaque position des aimants à partir des fluctuations browniennes de la bille. Nous aborderons les détails de ces mesures et du dispositif de pinces magnétiques à la page 91.

Avec ce dispositif, il est aisé d’exercer une force constante sur une molécule d’ADN, on peut en outre appliquer une contrainte de torsion par simple rotation des aimants autour de l’axe vertical. C’est cette caractéristique qui nous a conduit à faire de ce système notre outil d’étude.

Le dispositif de pinces magnétiques a lui aussi permis de mesurer les caractéristiques force-extension d’une molécule d’ADN [Allemand, 1997]. De plus, il s’agit d’un outil particulièrement puissant pour analyser l’interaction entre l’ADN et des enzymes ou protéines qui interagissent avec l’ADN. Par exemple l’activité d’une hélicase⁹ [Dessinges *et al.*, 2004] ou bien d’un facteur de remodelage [Lia *et al.*, 2006] peuvent être étudiées à l’aide de ce dispositif.

9. Enzyme qui sépare les deux brins de la double hélice d’ADN en rompant les interactions entre les bases complémentaires.

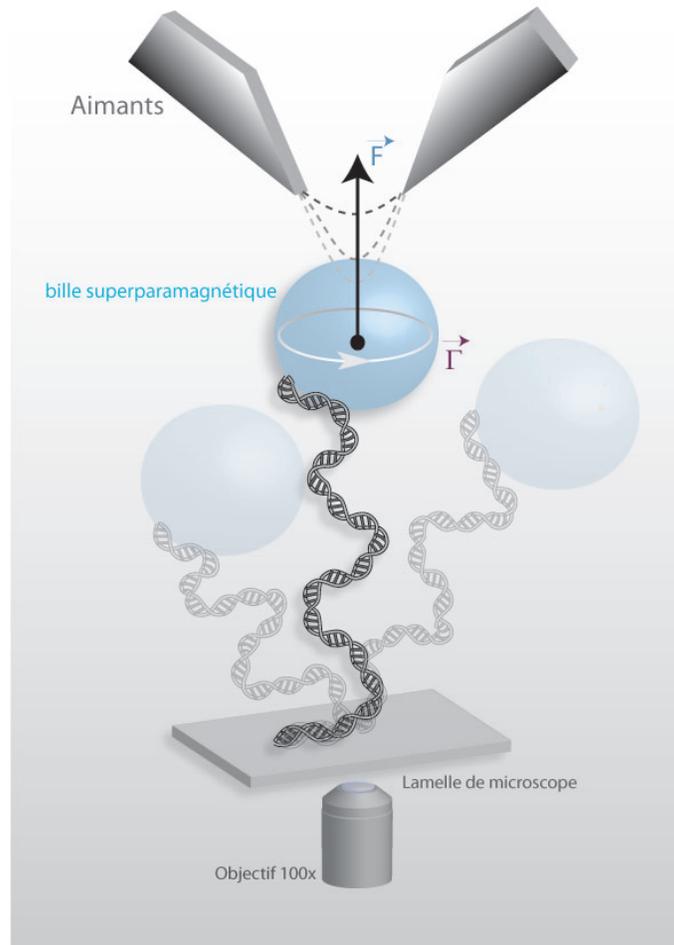


FIGURE 2.7 – Schéma de principe du dispositif de pinces magnétiques. Une molécule d'ADN est accrochée par l'une de ses extrémités à la surface de verre d'une lamelle de microscope, et par l'autre extrémité à la surface d'une bille superparamagnétique. Une paire d'aimants permanents est positionnée au dessus de l'échantillon afin d'exercer une force sur la bille magnétique. La rotation des aimants autour de l'axe vertical cause la rotation de la bille qui s'aligne sur les lignes champs. On peut donc exercer traction et torsion sur une molécule d'ADN. La longueur de la bille en fonction de ces contraintes est déterminée par la mesure de la position verticale de la bille à l'aide d'un objectif de microscope.

Résumé des propriétés des dispositifs d'étude de molécules uniques

Nous venons de voir différents dispositifs permettant l'étude de molécules uniques. Nous avons vu qu'il est possible de visualiser des complexes protéiques avec une résolution de 1 nm grâce aux microscopes à force atomique et aux microscopes électroniques. Il est également possible de visualiser en temps réel des changements conformationnels de l'ordre de 1 à 10 nm en utilisant la technique de FRET.

A ces techniques de visualisation s'ajoute d'autres techniques de manipulation de molécules isolées, comme les pinces magnétiques et pinces optiques qui permettent d'appliquer à un objet des contraintes et de mesurer avec précision leur longueur. La mesure de force

Dispositif	Gamme de force (pN)	Résolution en force (pN)	Résolution spatiale (nm)
FRET			1
Microscopie électronique			10^{-1}
AFM	10 à 10^4	10	1
Pinces optiques	1 à 10^2	10^{-1}	10
Pinces magnétiques	10^{-2} à 10^2	10^{-2}	10

TABLE 2.1 – Caractéristiques de dispositifs d’étude à l’échelle de la molécule unique.

s’étend autour de la gamme du piconewton. Nous n’avons pas précisé qu’il est également possible d’exercer et de mesurer une force sur une molécule unique à l’aide d’un AFM. Pour cela il suffit d’attacher la molécule d’intérêt entre la pointe de l’AFM et la surface. La déflexion du micro-levier donne alors accès à la force.

Les propriétés des différentes techniques évoquées sont résumées dans la table 2.1.

Il existe d’autres techniques pour étudier les molécules uniques qui ne sont pas décrites ci-dessus. On peut par exemple citer le peignage moléculaire pour la visualisation de molécules uniques d’ADN [Bensimon *et al.*, 1994], ou bien la technique de micropipette.

Nous allons nous intéresser ci-dessous aux informations qu’ont pu apporter ces techniques sur la dynamique du mononucléosome.

1.3 Expériences de molécules uniques sur la chromatine

Les expériences de molécules uniques que nous venons de décrire ont été appliquées à l’étude de la chromatine et en particulier à celles des mononucléosomes. Nous avons déjà eu l’occasion de présenter les résultats obtenus par AFM (Figure 1.26 page 50) qui concernent l’étude des facteurs de remodelage de la chromatine [Montel, 2008], ou bien les visualisations de chromatosomes par microscopie électronique (Figure 1.8 page 26), mettant en évidence le motif en forme de tige créé par l’interaction des ADN entrant et sortant avec l’histone de liaison [Hamiche *et al.*, 1996b].

D’un point de vue dynamique, nous avons déjà évoqué les résultats d’expériences de FRET sur un mononucléosome qui ont mis en évidence que l’ADN nucléosomal était accessible par un déroulement transitoire [Li *et al.*, 2005, Koopmans *et al.*, 2007]. L’utilisation de pinces optiques a permis de caractériser les forces mises en jeu dans ce déroulement.

1 - Dynamique d’un mononucléosome

L’équipe de C. Bustamante a étudié le comportement d’un nucléosome soumis à une force à l’aide d’un piège optique [Mihardja *et al.*, 2006]. Ils ont utilisé un mononucléosome reconstitué sur une séquence positionnante 601 et un système de pinces optiques leur a permis d’appliquer des forces entre 0.1 et 10 pN (Figure 2.8a). Ils ont mis en évidence des événements successifs d’allongements réversibles de la molécule : le premier aux alentours de 3 pN et le second vers 8 pN (Figure 2.8b).

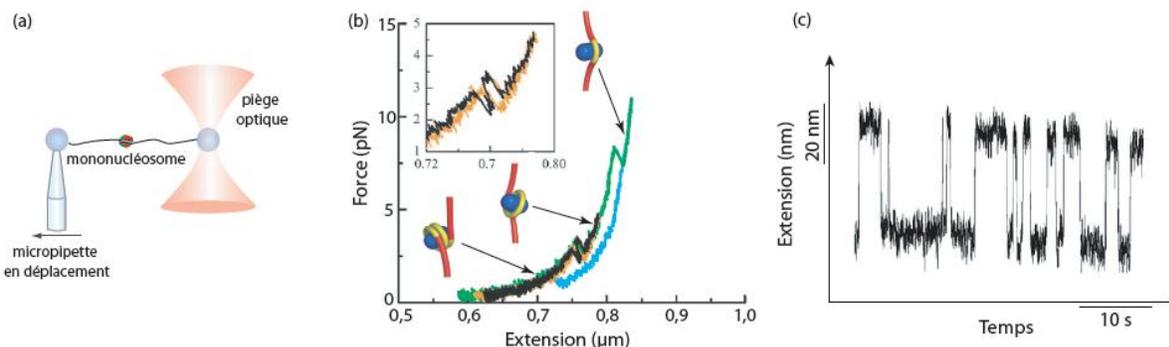


FIGURE 2.8 – Comportement d'un mononucléosome soumis à une force dans un piège optique. (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Courbes force-extension d'un mononucléosome, étirements en noir et vert, relaxations en orange et bleu. Les états d'enroulement du nucléosome sont indiqués pour les différentes parties de la courbe. (c) Extension de la molécule en fonction du temps pour une force de 2-3 pN, on constate le caractère dynamique entre enroulement/déroulement de l'ADN nucléosomal externe.

Ils ont attribué le premier allongement au déroulement de l'ADN premièrement engagé sur l'octamère, aussi bien du côté entrant que du côté sortant, nous nommerons cette partie de l'enroulement le *tour externe*. Lorsque la force est maintenue constante et proche de la force de cette transition on peut observer un signal caractéristique de l'équilibre entre deux états dans ces conditions : l'état enroulé et l'état partiellement déroulé (Figure 2.8c). Le second événement d'allongement se produit à 8-9 pN et est attribué au détachement du tour central d'ADN. Il ne présente quant à lui pas la même dynamique que le premier saut.

Ces transitions sont sensibles aux conditions ioniques : si on augmente la force ionique du tampon, la transition à basse force est toujours réversible mais les signaux ne présentent plus deux niveaux clairs comme précédemment : l'augmentation de la force ionique a diminué la coopérativité du processus de détachement et d'attachement du tour externe d'ADN. La seconde transition est moins perturbée, elle apparaît simplement à des forces plus faibles.

L'équipe de J. Langowski a publié un travail théorique sur la dynamique de l'ADN nucléosomal [Wocjan *et al.*, 2008]. Leur travail s'appuie sur un modèle coarse-grained de la dynamique brownienne. Cela leur permet d'obtenir des simulations de courbes force-extension et conduit à l'estimation des états du nucléosome et des constantes cinétiques mises en jeu (Figure 2.9c). Ils ont constaté que l'application d'une rampe de force à un nucléosome conduisait à un largage de l'ADN nucléosomal externe sur une durée de 50 μ s environ, alors que le tour central était éjecté en moins d'une μ s (Figure 2.9b).

Ces travaux théoriques et expérimentaux confirment le caractère réversible et séquentiel du détachement de l'ADN nucléosomal autour de la surface de l'octamère d'histones. Ce résultat que nous avons déjà évoqué a une importance capitale en ce qui concerne l'accessibilité de l'ADN nucléosomal aux enzymes du métabolisme des acides nucléiques.

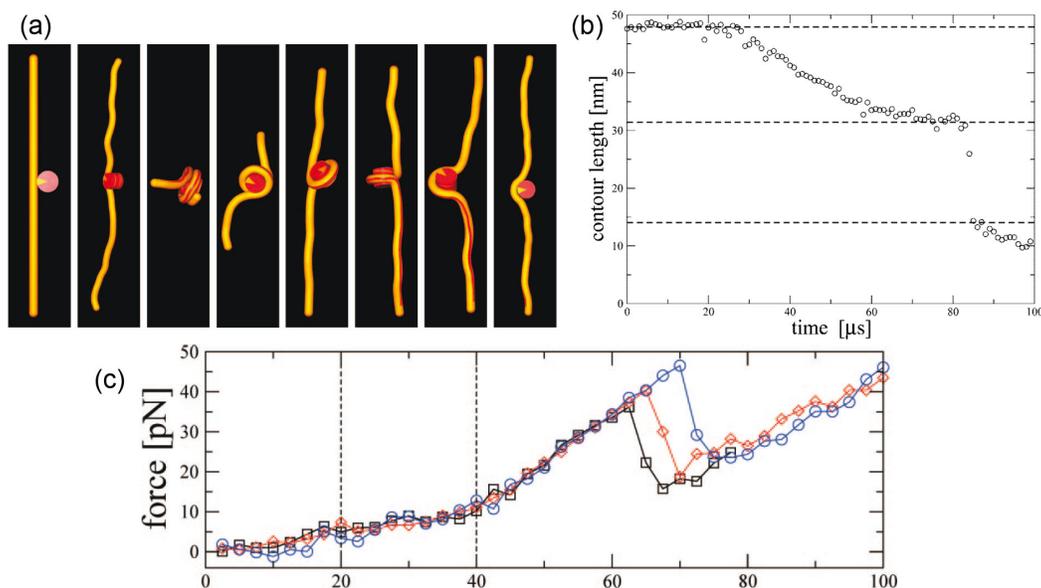


FIGURE 2.9 – Modélisation du comportement des mononucléosomes soumis à une rampe de force. (a) États du nucléosome partiellement déroulé. (b) Suivi en fonction du temps de la longueur d’ADN complexée autour de l’octamère d’histones. (c) Courbes force-extension théoriques d’un mononucléosome.

2 - Réponse mécanique d’une fibre de nucléosomes

Les résultats obtenus au niveau du mononucléosome avaient déjà été observés pour une fibre de chromatine reconstituée sur une séquence répétée d’ADN positionnant 5S [Brower-Toland *et al.*, 2002]. L’équipe de M.D. Wang avait également utilisé un piège optique (Figure 2.10a) pour sonder la réponse force-extension de cette fibre. Ils ont obtenu le même type de réponse que précédemment mais pour chacun des nucléosomes présents sur la fibre, ce qui donne aux courbes enregistrées un profil en dents de scie (Figure 2.10b). Plus précisément, ils observent deux régimes : à basse force (≤ 15 pN), la longueur de la fibre croît de manière continue. Ce régime est attribué au détachement simultané des fragments d’ADN nucléosomal situés entre ± 46 et ± 73 pb par rapport à l’axe dyadique (Figure 2.10c), soit un détachement total de 76 pb par nucléosome. Ces détachements sont réversibles : si on diminue la force, la fibre retrouve son extension initiale. A plus haute force (≥ 15 pN), on observe le profil périodique en dents de scie : ce régime correspond à la rupture soudaine des contacts ADN-histones plus robustes situés à ± 40 pb de l’axe dyadique. Ces détachements se font de manière discrète et correspondent au détachement de 82 pb de la surface de l’octamère. L’octamère ne tient alors plus à l’ADN que par les bases comprises entre ± 5 pb par rapport au dyad. Ce contact peut se rompre, l’octamère quitte alors l’ADN, empêchant définitivement le repliement de l’ADN autour de l’octamère lors d’une diminution ultérieure de la force (le modèle en trois étapes est schématisé sur la figure 2.10c).

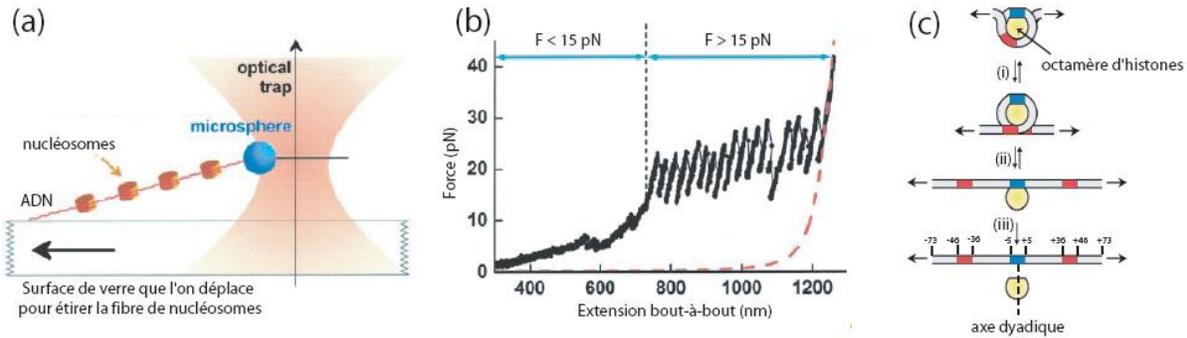


FIGURE 2.10 – Expérience de traction sur une fibre de nucléosome. (a) Schéma du dispositif expérimental. Une fibre de nucléosomes est attachée par une de ses extrémités à une lamelle de microscope, et par une autre extrémité à une bille de latex piégée dans un piège optique. La lamelle de verre est déplacée pour appliquer une tension à la molécule. (b) Extension de la molécule en fonction de la force appliquée. Le profil en dents de scie correspond à des événements de dissociation de l'ADN nucléosomal. (c) Modèle en trois étapes de dissociation de l'ADN nucléosomal. D'après [Brower-Toland *et al.*, 2002].

3 - Dynamique à basse force d'une fibre de 30 nm

L'équipe de John Van Noort a, quant à elle, étudié la réponse d'une fibre de chromatine à basse force, de 0.1 à 5 pN. Deux types de fibres ont été étudiés. Toutes deux ont été reconstituées sur une répétition de l'ADN positionnant 601 mais avec deux longueurs de répétitions différentes, 167 pb et 197 pb [Kruithof *et al.*, 2009]. La réponse force-extension des ces fibres a été mesurée grâce à un système de pinces magnétiques [Kruithof *et al.*, 2008]. Les résultats obtenus pour ces deux fibres compactes en présence de l'histone de liaison H5 sont présentés sur la figure 2.11 (b) et (c).

Les données obtenues ont permis de mettre en évidence un comportement similaire entre les fibres de longueurs de répétition nucléosomale différentes. Dans la gamme de force utilisée, ils n'ont observé aucun événement de déroulement de l'ADN nucléosomal. Les molécules s'allongent lorsque la force est augmentée, comme le ferait un ressort. Ils ont toutefois relevé une différence dans la rigidité des deux fibres ce qui soulève la question de la structure de cette fibre compacte. Les auteurs attribuent cette différence à deux types de conformation que nous avons déjà évoqué, à savoir le modèle de fibre en zig-zag et le modèle du solénoïde (voir page 38). Des données de cryomicroscopie ont déjà prouvé que ces deux types de fibres présentaient des structures complètement différentes (Figure 1.19). La molécule avec un NRL de 167 pb semble s'enrouler en deux colonnes de nucléosomes, alors que celle avec un NRL de 197 pb paraît adopter une configuration solénoïdale.

Les techniques de manipulation de molécules uniques fournissent de nombreuses et précieuses informations concernant les propriétés physiques des molécules d'intérêt biologique comme la chromatine ou l'ADN nu. Ces données permettent de confronter les modèles proposés aux réalités expérimentales. Nous allons détailler dans ce qui suit les modèles classiques de l'ADN et également les possibilités d'adaptation de ces modèles à la chromatine afin d'éclairer les expériences présentées précédemment.

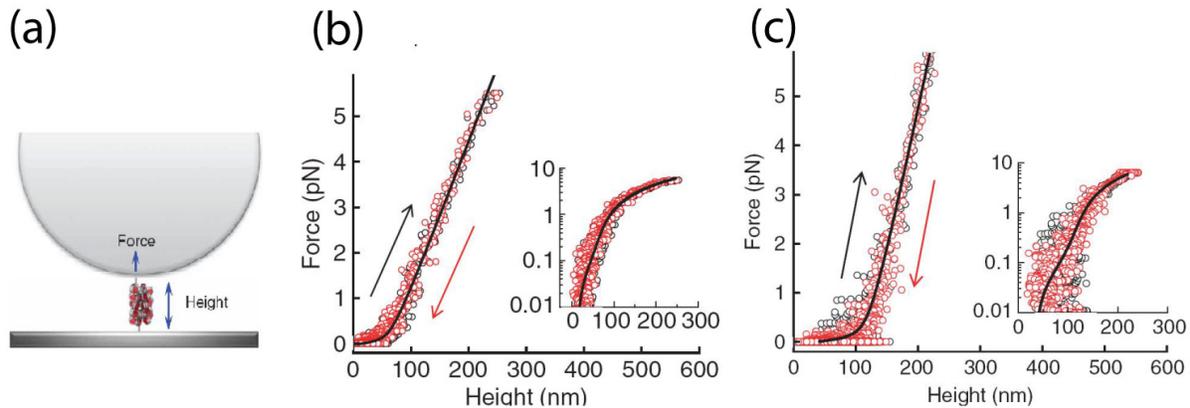


FIGURE 2.11 – (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) et (c) Réponses force-extension d'une fibre de chromatosomes avec une longueur de répétition de (b) 197 pb et (c) 167 pb. A basse force la fibre se comporte comme un ressort de raideur de l'ordre de $10^{-2} pN/nm$. D'après [Kruithof et al., 2009].

1.4 Les modèles de fibres

L'ADN peut être décrit comme un polymère¹⁰ en solution. Lorsqu'un tel polymère n'est soumis à aucune force, il adopte une configuration en pelote statistique sous l'effet de l'agitation thermique. Dans cette pelote, l'orientation de la molécule est aléatoire, c'est cette configuration qui maximise son entropie, c'est à dire le nombre de micro-états accessibles. Lorsque l'on tente d'étirer un polymère, on diminue le nombre de micro-états accessibles en alignant la molécule le long de l'axe de la contrainte appliquée. Ceci est donc défavorisé entropiquement et donne naissance à une force qui s'oppose à l'étirement, c'est la force *entropique*.

Lorsque l'on a réussi à étirer complètement la molécule, c'est-à-dire que son extension est égale à sa longueur de contour, on va alors sonder la réponse élastique des liaisons chimiques constituant la molécule. C'est le régime *enthalpique*.

Nous allons présenter ci-dessous les modèles qui permettent de décrire le comportement mécanique de l'ADN, puis nous développerons les modèles d'élasticité de la chromatine.

1 - Modèles d'élasticité de la molécule d'ADN nu

a. Le modèle de la chaîne librement jointe

Nous allons introduire ici un modèle très simple d'élasticité d'un polymère, appelé *modèle de la chaîne librement jointe*. Nous verrons que le paramètre déterminant le comportement de la molécule est sa longueur de persistance en courbure.

Réponse mécanique à une force appliquée

Dans cette approche, l'ADN est

10. Au sens strict du terme l'ADN est un hétéropolymère des 4 nucléotides.

modélisé comme une succession de N segments (monomères) indépendants, de longueur b , et dont les orientations sont complètement décorrélées [Flory, 1989] (Figure 2.12a).

Si l'on exerce une force \vec{F} à l'extrémité de la molécule, l'énergie du segment i s'écrit : $E_i = Fb \cos(\theta_i)$ où θ_i est l'angle que fait le segment i avec la direction de la force. L'énergie totale de la chaîne est donc :

$$E = Fb \sum_{i=1}^N \cos(\theta_i) \quad (2.1)$$

En exprimant la fonction de partition, puis l'énergie libre \mathcal{F} , on peut déduire :

$$\frac{\ell}{\ell_0} = -\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial F} = \coth\left(\frac{Fb}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{Fb} \quad (2.2)$$

où ℓ_0 représente la longueur de contour de la molécule, soit ici Nb .

On voit donc que cette situation est analogue à l'alignement de dipôles dans un champ : l'énergie d'agitation thermique (entropie) est en compétition avec le travail de la force. Les comportements asymptotiques peuvent être déterminés :

$$\begin{aligned} \text{A faible force } (Fb \ll k_B T) : \quad \frac{\ell}{\ell_0} &\sim \frac{Fb}{3k_B T} \\ \text{A haute force } (Fb \gg k_B T) : \quad \frac{\ell}{\ell_0} &\sim 1 - \frac{k_B T}{Fb} \end{aligned}$$

Intéressons-nous au cas particulier de l'ADN. La distance entre deux paires de bases est de 0,34 nm. Les orientations respectives de deux segments "paires de bases" successifs ne sont pas indépendantes, la molécule d'ADN double-brin est relativement rigide.

Nous avons introduit dans le chapitre 1 (page 17) un paramètre, appelé longueur de persistance, qui mesure la distance sur laquelle les orientations des différents segments restent corrélées. Pour l'ADN, celle-ci vaut environ 50 nm et est donc très différente de la distance entre deux paires de bases.

Les monomères à envisager dans le modèle de la chaîne librement jointe ne sont alors pas les monomères élémentaires "paires de base", mais des segments ayant une longueur de l'ordre de la longueur de persistance. Nous allons donc définir plus rigoureusement ce paramètre mécanique.

Longueur de persistance en courbure La *longueur de persistance en courbure* est la distance à partir de laquelle les corrélations d'orientation de l'axe de la molécule sont perdues. Nous la notons ξ_c . On peut également la définir plus rigoureusement par :

$$\langle \cos[\theta(0)] \cos[\theta(n)] \rangle = e^{-\frac{n \cdot b}{\xi_c}} \quad (2.3)$$

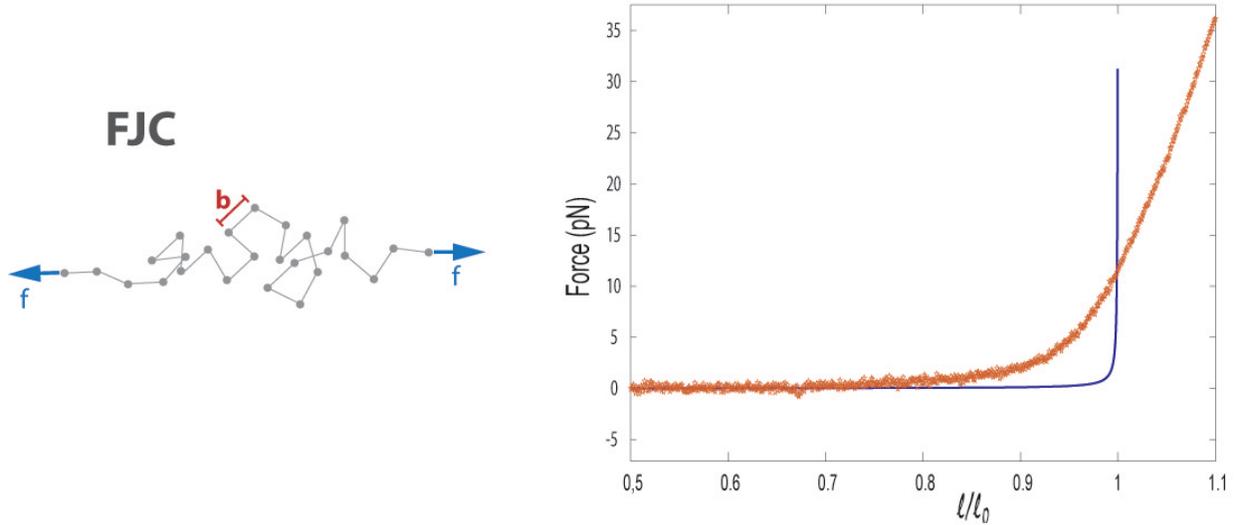


FIGURE 2.12 – Description du modèle de la chaîne librement jointe. (a) Représentation de la molécule d’ADN dans ce cadre. (b) Comportement force-extension d’une molécule d’ADN obtenu par pinces optiques (rouge) et ajustement par le modèle de la chaîne librement jointe (bleu).

où $\theta(n)$ est l’angle que fait le segment n par rapport à un axe de référence. La longueur de persistance est donc la distance au bout de laquelle la fonction de corrélation est divisée par e .

Modèle de la chaîne librement jointe adapté à l’ADN Avec cette définition de la longueur de persistance, on peut adapter le modèle à la molécule d’ADN. Il suffit de choisir comme longueur élémentaire $b = 2\xi_c$, appelée *longueur de Kuhn*.

La figure 2.12b représente le comportement élastique expérimental d’une molécule d’ADN double-brin. L’élasticité de l’ADN est mesurée par sa *réponse force-extension*, c’est-à-dire sa longueur normalisée ℓ/ℓ_0 en fonction de la force F appliquée. On voit que l’ajustement des données par le modèle de la chaîne librement jointe n’est valable que pour des forces très faibles, inférieures à 0,1 pN (courbe bleue).

Le modèle doit donc être amélioré afin de mieux décrire le comportement réel de l’ADN. Il faut prendre en compte la courbure à petite échelle (les segments ne sont plus rigides), et passer à la limite continue (la taille des segments tend vers zéro).

b. Le modèle du ver

Dans ce modèle (appelé *Worm-Like Chain* - *WLC* - en anglais), l’ADN est décrit comme un fil de longueur de contour ℓ_0 ayant une longueur de persistance en courbure ξ_c [Bustamante *et al.*, 1994, Doi et Edwards, 1992, Marko et Siggia, 1995]. On définit à

chaque abscisse curviligne s un vecteur tangent local : $\vec{t}(s)$ (Figure 2.13a).

Longueur de persistance de courbure Dans ce modèle continu, la longueur de persistance peut être redéfinie par :

$$\langle \cos [\theta(0)] \cos [\theta(s)] \rangle = e^{-\frac{s}{\xi_c}} \quad (2.4)$$

où $\theta(s)$ est l'angle que fait la tangente à la molécule en s par rapport à un axe de référence.

On peut aussi définir la longueur de persistance d'un point de vue énergétique. Exprimons l'énergie de courbure d'une molécule. Celle-ci est d'autant plus grande que la courbure C (inverse du rayon de courbure) est importante et que la molécule est difficile à courber (c'est-à-dire qu'elle a une grande longueur de persistance). En supposant que la réponse élastique de la molécule est linéaire, on a alors :

$$E_c \propto \xi_c \int_{s=0}^{s=\ell_0} (C(s))^2 ds \propto \xi_c \int_{s=0}^{s=\ell_0} \left(\frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right)^2 ds \quad (2.5)$$

Afin d'obtenir une expression homogène, il faut introduire une grandeur ayant la dimension d'une énergie. Ici, l'énergie qui engendre les fluctuations d'orientation est l'énergie thermique $k_B T$. D'où :

$$E_c = \frac{1}{2} k_B T \xi_c \int_{s=0}^{s=\ell_0} \left(\frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right)^2 ds \quad (2.6)$$

On appelle *module de courbure* la quantité $A_c = \xi_c k_B T$.

Réponse mécanique Lorsque la molécule est soumise à une force \vec{F} , son énergie s'écrit :

$$E = k_B T \int_0^{\ell_0} \left[\frac{\xi_c}{2} \left(\frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right)^2 - \frac{\vec{F} \cdot \vec{t}(s)}{k_B T} \right] ds \quad (2.7)$$

Dans l'équation (2.7), le premier terme est une énergie de pénalité de courbure liée à la rigidité de l'ADN aux petites échelles et le deuxième est le travail mécanique de la force extérieure.

Le modèle du ver n'est pas soluble analytiquement et on utilise l'expression approchée suivante pour ajuster les courbes force-extension :

$$\frac{F\xi_c}{k_B T} \simeq \frac{\ell}{\ell_0} + \frac{1}{4(1 - \frac{\ell}{\ell_0})^2} - \frac{1}{4} \quad (2.8)$$

Les comportements asymptotiques sont les suivants :

$$\text{A faible force } (F\xi_c \ll k_B T) : \frac{\ell}{\ell_0} \sim \frac{2F\xi_c}{3k_B T}$$

$$\text{A haute force } (F\xi_c \gg k_B T) : \frac{\ell}{\ell_0} \sim 1 - \sqrt{\frac{k_B T}{4F\xi_c}}$$

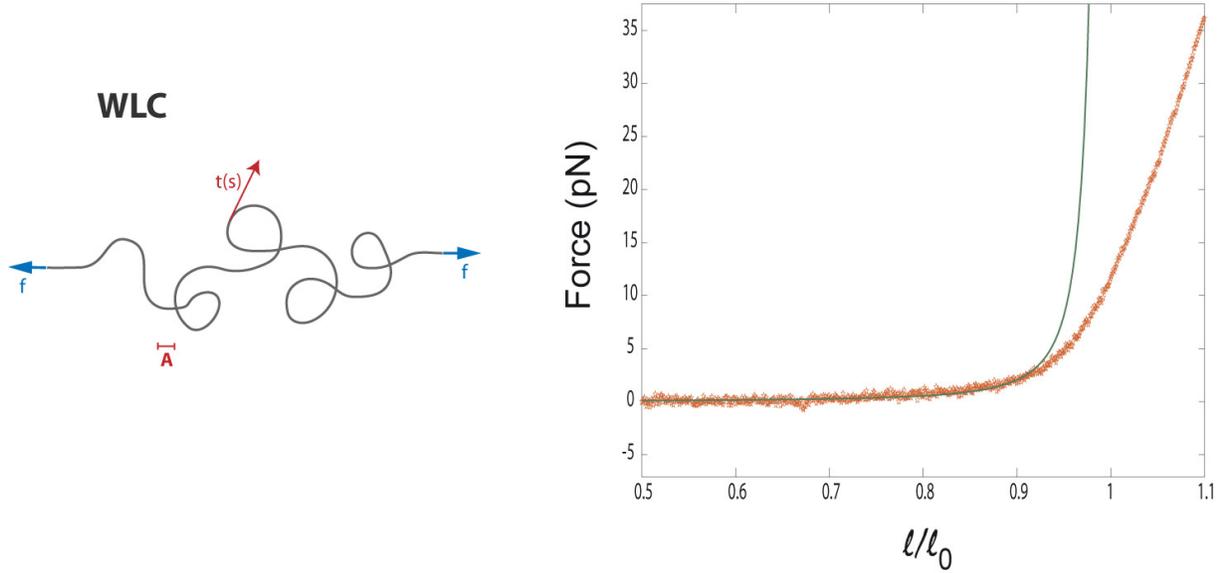


FIGURE 2.13 – Description du modèle du ver (WLC). (a) Représentation de la molécule d'ADN dans ce cadre. (b) Comportement force-extension d'une molécule d'ADN obtenu par pinces optiques (rouge) et ajustement par le modèle du ver inextensible (vert).

Cette solution approchée donne des erreurs d'environ 10% pour des forces de l'ordre de 0,1 pN.

Une correction polynomiale d'ordre 7 qui permet de rendre compte plus fidèlement des courbes expérimentales a été proposée [Bouchiat *et al.*, 1999] :

$$\frac{F\xi_c}{k_B T} \simeq \frac{\ell}{\ell_0} + \frac{1}{4(1 - \frac{\ell}{\ell_0})^2} - \frac{1}{4} + \sum_{2 \leq i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{\ell}{\ell_0}\right)^i \quad (2.9)$$

où les coefficients polynomiaux valent respectivement $\alpha_2 = -0,5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$ et $\alpha_7 = -14.17718$. Cette approche analytique permet d'approcher les résultats du modèle avec une précision de 0.1%.

Le modèle du ver ne décrit correctement le comportement de l'ADN que pour des forces inférieures à ~ 10 pN (Figure 2.13). Au-delà de ces valeurs, la molécule est presque complètement étirée et c'est l'élasticité de ses liaisons chimiques qui entre en jeu, comme on peut le voir sur la figure 2.13, qui montre que l'extension de la molécule dépasse sa longueur de contour.

c. Modèle d'élasticité enthalpique

Dans ce régime, l'ADN peut être modélisé comme une tige de rigidité donnée par son module d'Young ou son module d'étirement.

Module d'Young, module d'étirement Le *module d'Young* E_Y d'un matériau caractérise sa réponse à une force d'élongation. La force nécessaire pour étirer de $\Delta\ell$ une molécule de longueur ℓ_0 et de section S s'écrit :

$$F = S E_Y \frac{\Delta\ell}{\ell_0} \quad (2.10)$$

Plus E_Y est petit, plus l'allongement est grand à une force donnée. Par ailleurs, le module d'Young est homogène à une pression et s'exprime en Pascal.

On définit alors le *module d'étirement* γ par : $\gamma = E_Y S$. Cette grandeur est homogène à une force et s'exprime en Newton.

Pour un tube cylindrique élastique, le module d'Young et la longueur de persistance en courbure vérifient la relation [Cocco *et al.*, 2002] :

$$\xi_c = \frac{\pi R^4}{4 k_B T} E_Y \quad (2.11)$$

Réponse mécanique Dans le régime enthalpique, la force s'exprime alors par :

$$F = \gamma \frac{\ell - \ell_0}{\ell_0}, \quad \ell \sim \ell_0 \quad (2.12)$$

Pour l'ADN γ est mesuré à 400 pN en conditions physiologiques.

Cette contribution enthalpique peut être incluse dans le modèle du ver pour le rendre *extensible* [Odijk, 1995] et ainsi permettre son utilisation de 5 à 50 pN environ. Toutefois il est un phénomène que ce modèle ne pourra prendre en compte, c'est la transition de phase de l'ADN-B vers l'ADN-S à 65 pN, cette transition se traduit par une forte augmentation de longueur à force constante [Cluzel *et al.*, 1996, Bustamante *et al.*, 2000].

d. Prise en compte de la torsion - Modèle Worm Like Rope

L'ADN est une molécule flexible en courbure mais aussi en torsion. Le modèle du ver

peut alors être étendu et prendre en compte les paramètres de torsion. On parle du modèle *Worm-Like Rope* [Moroz et Nelson, 1997, Bouchiat et Mezard, 1998].

Longueur de persistance en torsion De la même manière que pour la courbure, on peut définir une *longueur de persistance en torsion* ξ_t telle que l'énergie de torsion s'écrive :

$$E_t = \frac{1}{2} k_B T \xi_t \int_{s=0}^{s=\ell_0} (\Omega(s) - \Omega_0)^2 ds \quad (2.13)$$

où $\Omega(s)$ est l'angle (en radian) que fait la normale au fil modélisant la molécule dans un plan perpendiculaire à l'axe de la force par rapport à un axe de référence (par unité de longueur, à l'abscisse curviligne s) et Ω_0 cet angle pour la molécule relâchée (la torsion intrinsèque).

On appelle *module de torsion* la quantité $A_t = \xi_t k_B T$.

Réponse mécanique En ajoutant ce terme d'énergie de torsion, le modèle permet d'ajuster les courbes expérimentales de longueur en fonction de la contrainte torsionnelle imposée. On trouve alors une longueur de persistance en torsion d'environ 80 nm en conditions physiologiques [Strick et al., 1999].

Nous venons de présenter différents modèles du comportement élastique d'une molécule d'ADN nu. La réponse est correctement prédite par le modèle du ver entre 0,01 et 10 pN, puis par un modèle d'élasticité enthalpique aux forces plus élevées.

Nous allons maintenant nous intéresser aux modèles développés pour décrire le comportement d'une fibre de chromatine régulière.

2 - Les modèles de fibres de chromatine

La présence de nucléosomes sur l'ADN modifie profondément ses propriétés mécaniques. Par exemple, l'interaction avec le coeur protéique est susceptible de modifier la longueur de persistance de la molécule, en modifiant sa rigidité locale. Nous avons également vu (Figure 2.11) que l'architecture de la fibre modifie ses propriétés physiques. Les modèles de la fibre régulière de chromatine doivent prendre en compte cet aspect géométrique.

Pour parvenir à une description de la chromatine il faut considérer que les nucléosomes sont rigides et que l'ADN nucléosomal ne peut pas se dérouler. Les ADN de liaisons ont eux le comportement élastique que nous venons de présenter. Les forces appliquées en général sont de l'ordre de quelques piconewtons au maximum pour ne pas déstabiliser la particule de coeur du nucléosome (Figure 2.8). Les ADN de liaisons peuvent donc être décrits par le modèle du ver.

La réponse de la chromatine résulte donc de l'élasticité des ADN de liaisons et de l'organisation tridimensionnelle des nucléosomes le long de la fibre. C'est le cadre classique du *modèle à deux angles* développé par Woodcock et coll. [Woodcock et al., 1993].

a. Paramètres géométriques de la fibre de chromatine

Si l'on étudie une fibre de chromatine régulière, son architecture peut être entièrement déterminée par les paramètres géométriques suivants (Figure 2.14) :

- l'angle α d'entrée/sortie
- la distance L entre deux nucléosomes (longueur de l'ADN de liaison)
- l'angle β mesurant la différence d'orientation entre deux nucléosomes successifs

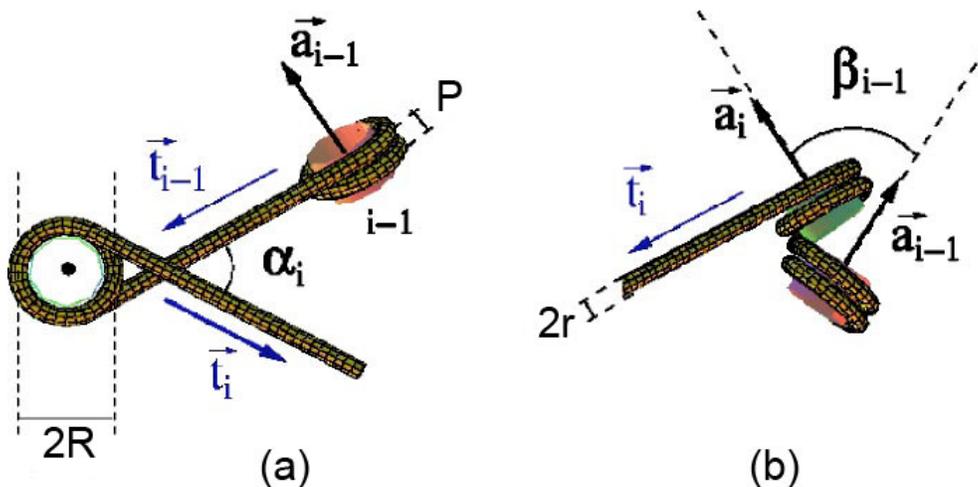


FIGURE 2.14 – Deux angles sont nécessaires pour décrire l'organisation d'une fibre régulière de nucléosomes. L'angle α est l'angle entre les brins d'ADN entrant et sortant du nucléosome. L'angle β est l'angle entre deux vecteurs normaux aux faces de deux nucléosomes successifs. D'après [Barbi *et al.*, 2005].

Or, l'orientation des nucléosomes les uns par rapport aux autres ne dépend que de la distance L et du pas hélical de l'ADN de liaison par : $\beta = 2\pi \frac{L}{h}$. Les paramètres L et β étant reliés, seuls deux paramètres sont nécessaires pour décrire la fibre.

b. Architecture des fibres

Des simulations numériques ont permis à Woodcock et coll. de montrer que lorsque α et β sont fixés, l'architecture de la fibre est régulière, tandis que si β est autorisé à varier le long de la molécule, il en résulte une organisation irrégulière (Figure 2.15) [Woodcock *et al.*, 1993]. Cela traduit donc l'importance du positionnement des nucléosomes sur la fibre dans l'organisation que celle-ci atteint. L'introduction de l'histone de liaison a donc pour conséquence de régulariser l'architecture de la chromatine en réduisant les fluctuations de l'angle α . En effet, nous avons vu que l'interaction avec cette histone contraint l'orientation des ADN entrant/sortant. Cependant il faut considérer le fait qu'à

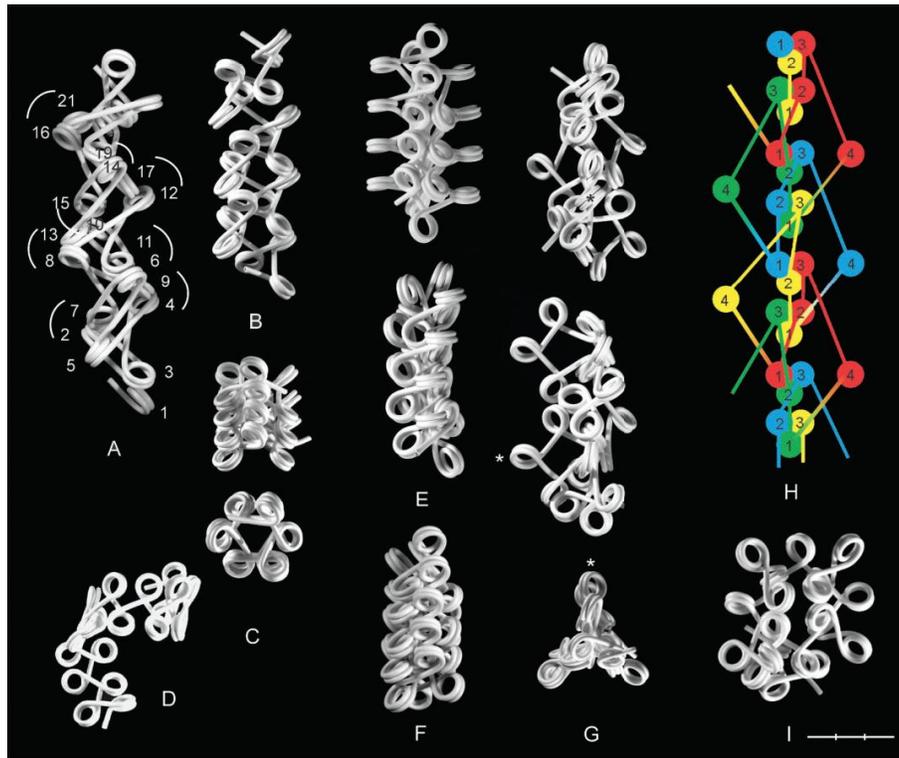


FIGURE 2.15 – Simulations numériques de fibres de chromatine. D’après [Engelhardt, 2007]

l’intérieur d’une fibre peuvent coexister des nucléosomes et des chromatosomes, donc il est probable qu’une telle fibre ait une trajectoire irrégulière.

Cette description géométrique ne tient en aucun cas compte des interactions possibles entre les nucléosomes ou bien de la répulsion entre les ADN de liaison. C’est pourquoi Wiedeman et Langowski ont ajouté à cette approche des répulsions électrostatiques entre ADN et un potentiel d’interaction entre nucléosomes de type Lennard-Jones [Wedemann et Langowski, 2002]. Ils ont ainsi déterminé que l’énergie d’interaction entre nucléosomes, d’environ $1.25 k_B T$, joue un rôle moins important dans l’architecture de la fibre que l’angle β .

Ces simulations ont conduit à des fibres de chromatine en accord avec les données expérimentales, leur densité est de l’ordre de 5 nucléosomes par 11 nm de fibre, et leur diamètre d’environ 30 nm.

Un modèle tout-atome d’une fibre de chromatosomes a été proposé par l’équipe de Jean-Marc Victor. Wong et coll. ont étudié en détails l’effet de la longueur de répétitions sur les organisations de la fibre en prenant en compte la courbure des ADN de liaison (Figure 1.21 page 38) [Wong *et al.*, 2007]. Cette étude permet de rendre compte de la grande variabilité des architectures accessibles, en accord avec des expériences de microscopie électronique [Routh *et al.*, 2008]. Il a même été montré dans le courant de l’année 2009 que plusieurs

organisations pouvaient exister au sein d'une même fibre [Grigoryev *et al.*, 2009].

c. Comportement mécanique

L'équipe de Jean-Marc Victor a également résolu analytiquement le comportement d'une fibre de nucléosomes en adaptant le modèle *Worm-Like Rope* [Ben-Haim *et al.*, 2001]. Ben-Haïm et coll. ont ainsi pu déterminer la structure des fibres et leurs paramètres mécaniques macroscopiques en fonction des paramètres microscopiques α et L . Cette longueur (donc l'angle β) apparaît comme un paramètre fondamental contrôlant l'architecture de la fibre et sa réponse mécanique.

Pour un angle α de 90° et une longueur de liaison de 43 pb, la fibre a une longueur de persistance en courbure de 29 nm, en torsion de 34 nm et un module d'étirement de 7 pN.

Les expériences de traction sur une fibre compacte de chromatine réalisées par l'équipe de John Van Noort (voir page 76) ont été ajustées par un modèle qui considère que la fibre est un ressort de rigidité k . Pour ajuster précisément les données expérimentales ils ont tenu compte de la réponse de l'ADN libre¹¹, suivant le modèle du ver. L'expression de l'extension ℓ_{chrom} de la molécule en fonction de la force F est alors du type :

$$\ell_{chrom}(F) = \ell_0 + L_{WLC}(F, L_{ADN}) + \frac{F}{k}$$

avec ℓ_0 l'extension sans contrainte, L_{WLC} l'extension de l'ADN libre. Cette expression permet de déterminer la constante de rigidité de la fibre de 30 nm, on trouve alors $k = 0.03$ pN/nm.

Pourquoi la torsion ?

Nous venons de décrire des expériences qui permettent de sonder la réponse mécanique de fibres de chromatine à des contraintes de tension, nous avons également vu les modèles qui permettent d'interpréter ces résultats. L'intérêt de ces descriptions vient du fait qu'à l'intérieur du noyau les processus du métabolisme des acides nucléiques (transcription, réparation, réplication,...) sont capables d'exercer des forces, non négligeables sur leur substrat : la chromatine. Certaines enzymes peuvent générer des forces allant jusqu'à 40 pN. Les expériences de molécules uniques en traction permettent donc de rendre compte du comportement du substrat chromatinien soumis à ces contraintes. Si les enzymes des processus métaboliques de l'ADN exercent une tension sur la molécule pendant leur activité, elles peuvent également appliquer une contrainte de torsion qui s'expliquent par le déroulement de la double hélice au coeur du complexe, ceci afin d'accéder à la séquence nucléique portée par un simple brin. Cette déstabilisation a pour conséquence la création d'une contrainte de surenroulement en amont et en aval de la protéine.

11. Ce sont les fragments d'ADN de chaque côté de la fibre de chromatine qui servent à attacher la molécule par ses deux extrémités dans le dispositif expérimental.

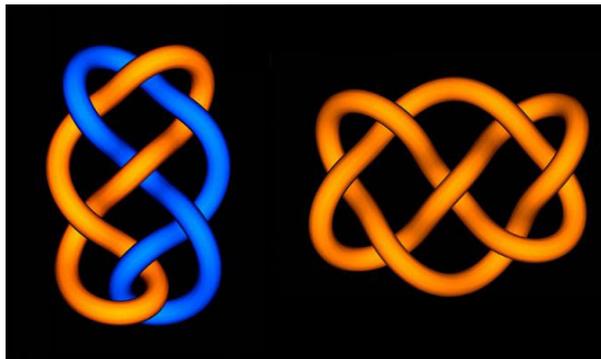


FIGURE 2.16 – Nœuds entre deux courbes (à gauche), et nœuds dans la même courbe (à droite)

C'est le comportement mécanique de la chromatine soumis à cette contrainte torsionnelle que nous avons voulu élucider. Les travaux réalisés dans le laboratoire par Aurélien Bancaud et Gaudeline Wagner ont porté sur l'étude de fibres individuelles de chromatine. Ils se sont intéressés d'une part à leur reconstitution en flux à partir d'extraits d'oeufs de Xénope, et d'autre part au comportement en torsion de fibres de nucléosomes reconstitués sur la séquence positionnante 5S. Afin de compléter ce travail, je vais présenter les résultats que j'ai obtenus pour le comportement de fibres de nucléosomes et de fibres de chromatosomes reconstituées sur la séquence positionnante 601. J'ai également mené cette étude avec un dispositif de pinces magnétiques. Mais avant d'évoquer ces résultats nous allons présenter les notions qui permettent de décrire l'état topologique de la molécule d'ADN et de la fibre de chromatine.

2 La topologie de l'ADN

2.1 Notions de topologie

Une branche de la topologie concerne l'étude des propriétés de croisements d'une courbe avec elle-même ou bien avec une autre courbe (Figure 2.16). On peut, par exemple, décrire mathématiquement l'enchevêtrement des fils des écouteurs, pour lesquels nous avons déjà tous observé la formation de noeuds difficilement déroulable¹².

Le nucléosome, sous-unités de base de la chromatine, consiste en 1,65 tour d'ADN enroulé autour d'un octamère protéique. Cet enroulement induit un changement topologique de la molécule d'ADN. Nous allons décrire dans ce qui suit les paramètres importants à prendre en compte pour la description de l'état topologique de l'ADN dans cette particule.

12. L'équipe de D.E Smith a caractérisé la formation spontanée de nœud dans une corde soumise à une agitation [Raymer et Smith, 2007].

1 - Définitions mathématiques

Pour caractériser l'état topologique d'un fil par exemple il est nécessaire de connaître deux paramètres, la *torsion* et le *vrillage*.

La torsion compte le nombre de tours que ce fil effectue autour de son axe, alors que le vrillage compte le nombre de croisements que fait l'axe du fil avec lui-même. Le signe de chacun de ces deux paramètres donne accès à la direction de la déformation. Une torsion dans le sens trigonométrique correspond à une torsion positive, et un enroulement dans le sens trigonométrique à un vrillage positif. La torsion, *twist* en anglais, se note Tw , et le vrillage, *writhe*, Wr .

On peut voir sur la figure 2.17 deux exemples de torsion ($Tw = -2$) et de vrillage ($Wr = -2$). Il est aisé de s'apercevoir que l'on peut obtenir à partir d'une des deux conformations l'autre. En effet si l'on enlève le cylindre supportant les deux tours d'enroulement et que l'on étire le ruban, on obtient la conformation torsadée. Et inversement. Si bien que torsion et vrillage sont équivalents d'un point de vue topologique. Cela a pour conséquence que l'état topologique doit être décrit par la somme de ces deux paramètres. Cette grandeur est alors appelée *nombre d'enlacement* et est notée Lk pour *Linking number* :

$$Lk = Tw + Wr$$

Le théorème de *White* énonce que pour une courbe dont les extrémités sont fixées le nombre d'enlacement est un *invariant topologique* [White, 1969]. Cela signifie que Lk ne peut être varié qu'en modifiant l'orientation d'une extrémité par rapport à l'autre.

Il est très important de remarquer que ce théorème implique que pour une courbe fermée sur elle-même, il n'est possible de modifier le nombre d'enlacement qu'en l'ouvrant.

2 - Topologie de l'ADN

Nous avons vu page 15 que la molécule d'ADN est une double hélice droite. Cela signifie donc que le nombre de torsion qui lui est associé est égale au nombre de tour que fait l'hélice. Cette valeur est directement dépendante de la longueur de la molécule considérée, puisqu'il faut en moyenne 10,5 pb pour faire un tour d'hélice, c'est le pas de l'hélice noté h_0 . On en déduit donc que pour un ADN de longueur N (en paires de bases) :

$$Tw_0 = \frac{N}{h_0}$$

C'est le *nombre de torsion intrinsèque* de la molécule qui correspond à son état relâché¹³. Le nombre d'enlacements d'une molécule d'ADN sans contrainte n'est donc pas nul, mais égal à son nombre de torsion intrinsèque :

$$Lk_0 = Tw_0$$

13. Remarquons que cette valeur n'est valable qu'à une seule température, puisque la température est un paramètre qui influe sur la valeur du pas hélical de l'ADN.

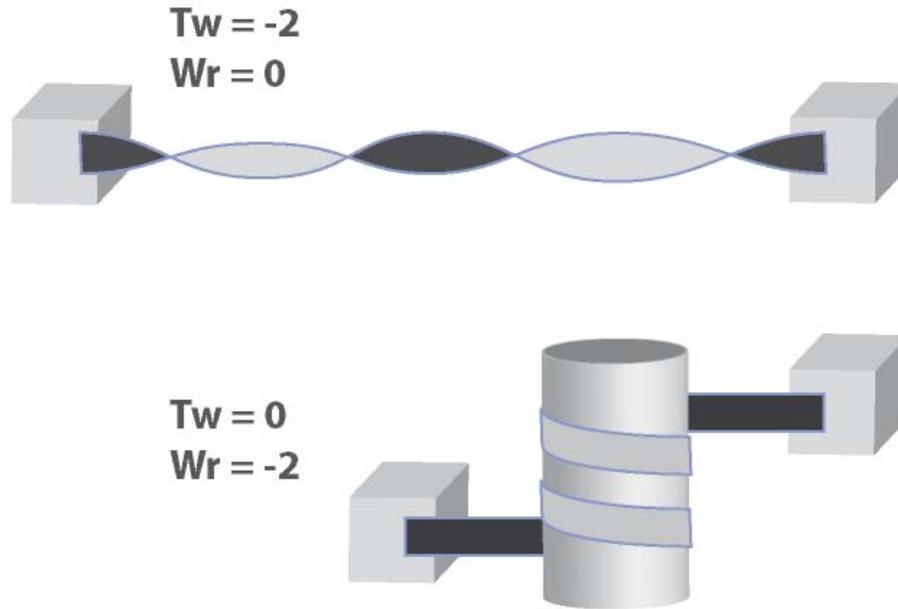


FIGURE 2.17 – Répartition de la contrainte de topologie entre torsion et vrillage pour une déformation topologique $\Delta Lk = -2$. Par convention les contraintes sont négatives si l'on tourne dans le sens indirect.

Par exemple, pour une molécule d'ADN de phage Lambda ($N = 48500$ pb) le nombre de torsion est de $Tw_0 = 4619,04$ ¹⁴.

Lorsque l'on applique une contrainte topologique à une molécule d'ADN, on mesure la variation du nombre d'enlacement de la molécule par rapport à son état relâché :

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = (Tw + Wr) - Tw_0 = \Delta Tw + Wr$$

ΔTw représente la *surtorsion* accumulée par la molécule (apparition de tours hélicaux supplémentaires par rapport à son nombre de torsion intrinsèque) et Wr le vrillage qui apparait du fait de la contrainte topologique.

Nous appellerons ce type de déformation topologique *contrainte de surenroulement* et nous parlerons de *surenroulement positif* lorsque que l'ADN sera contraint dans le sens de son hélicité, et de *surenroulement négatif* dans le cas contraire.

Remarquons que l'on utilise souvent la *densité de surenroulement* pour décrire la déformation topologique. Cette grandeur normalisée est indépendante de la taille de la molécule, elle est définie par :

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$$

Intéressons-nous à une molécule d'ADN circulaire. Toute déformation topologique qui lui est appliquée se répartira sous la forme de torsion et/ou de vrillage comme on peut le voir sur la figure 2.18, pour laquelle $\Delta Lk = -2$, les deux cas extrêmes sont présentés.

14. Le nombre de torsion n'est pas nécessairement entier.

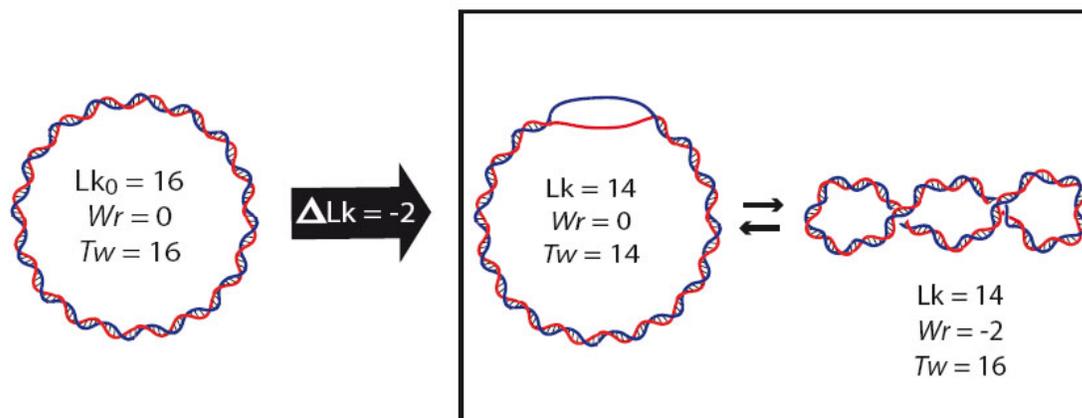


FIGURE 2.18 – Répartition de la contrainte entre torsion et vrillage dans un cercle d'ADN. Un cercle d'ADN de nombre de torsion intrinsèque égal à 14 est soumis à une contrainte de surenroulement de -2. Cette contrainte peut se répartir sous la forme d'un vrillage de -2 tours ou bien sous la forme de dénaturation de 2 tours de double hélice.

L'un (a) où la contrainte est totalement sous la forme de vrillage, et l'autre (b) où cette contrainte est sous la forme d'une diminution de 2 tours de la torsion, qui correspond à une dénaturation de l'ADN.

Il existe deux techniques différentes pour étudier la déformation topologique de l'ADN, l'une biochimique, la *technique des minicercles*, l'autre physique *les pinces magnétiques*. Ce sont ces deux techniques qui ont permis d'étudier avec précision la déformation topologique de l'ADN induite par son interaction avec l'octamère d'histones.

2.2 Techniques d'analyse de la topologie

1 - La technique des minicercles

La technique des minicercles consiste en la résolution des états topologiques de petits fragments d'ADN circulaire de longueur fixée, en général de l'ordre de 350 pb. Un minicercle peut exister sous différentes conformations topologiques qui varient entre elles d'une unité de ΔLk ¹⁵ (Figure 2.19a). Ces différents états d'un même minicercle sont appelés topoisomères.

Il est possible de différencier ces topoisomères par une migration sur gel d'acrylamide. Plus les topoisomères sont contraints (plus $|\Delta Lk|$ est grand), plus ils migrent à l'intérieur du gel (Figure 2.19b), car la topologie de l'ADN va déterminer sa conformation tridimensionnelle. Chaque bande sur le gel correspond alors à un topoisomère. Il faut noter que cette méthode ne permet pas de distinguer entre les surenroulements négatifs et positifs, qui ont

¹⁵. Pour fermer le minicercle il faut que les brins 5' (resp 3') se retrouvent l'un en face de l'autre, c'est pourquoi il faut tourner la double hélice d'au moins un tour.

le même effet sur la structure tridimensionnelle de l'ADN. Pour lever cette ambiguïté il faut faire migrer les minicercles en présence de chloroquine par exemple, qui a tendance à sous-enrouler la double hélice d'ADN, ce qui a pour effet de rendre plus contraints les topoisomères négatifs, et moins contraints les topoisomères positifs, qui migreront donc plus lentement en présence d'une telle molécule.

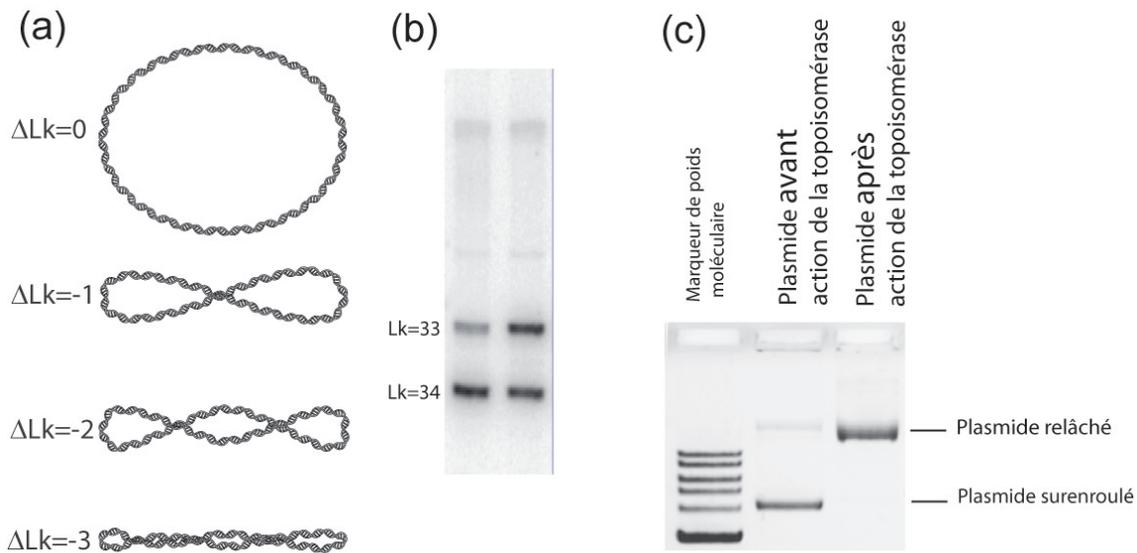


FIGURE 2.19 – La technique des minicercles. (a) Différents topoisomères d'un même minicercle, de haut en bas $\Delta Lk = 0, 1, 2, 3$. (b) Les topoisomères peuvent être séparés par migration sur un gel d'acrylamide, ici deux topoisomères de déformation topologique 33 et 34 sont séparés. (c) Relaxation d'un plasmide pUC19 par une topoisomérase. Les topoisomérases sont capables de relaxer la contrainte topologique d'un ADN, le substrat final correspond à l'état sans contrainte.

Si la topologie d'un minicercle donné est modifiée, par une protéine par exemple, alors il est possible de quantifier sur gel cette déformation topologique. Par exemple les enzymes nommées topoisomérases sont capables de relaxer la contrainte d'une molécule d'ADN surenroulée positivement ou négativement. Leur action peut donc être mise en évidence par une électrophorèse sur gel d'acrylamide, puisqu'un cercle d'ADN initialement contraint verra sa mobilité électrophorétique réduite après action de la topoisomérase (Figure 2.19c).

La déformation topologique induite par le nucléosome peut être mesurée par cette technique. Pour réaliser cela il faut reconstituer un mononucléosome sur un minicercle de séquence et de longueur données. L'enroulement autour de l'octamère d'histone induit un changement du nombre de vrillage. Nous verrons plus en détail les résultats obtenus sur la topologie du nucléosome (voir page 101)

2 - Les pinces magnétiques

Les pinces magnétiques sont un autre système d'étude de la topologie de l'ADN, c'est l'outil que nous avons utilisé durant ce travail de thèse pour étudier le comportement mécanique de fibres de chromatine soumises à des déformations topologiques. Le principe général de cet instrument a déjà été présenté à la page 69. Nous allons décrire plus en détail dans cette partie le dispositif expérimental et les informations auxquelles il permet d'accéder.

Le dispositif de pinces magnétiques a été mis au point dans l'équipe de V. Croquette et D. Bensimon au milieu des années 1990 [Strick *et al.*, 1996]. Cet instrument permet d'exercer une force et une contrainte de rotation à une molécule par l'intermédiaire d'une bille superparamagnétique de taille micrométrique (Figure 2.20a). Le dispositif donne accès à la longueur de la molécule en mesurant la position verticale de la bille, et à la force appliquée.

Durant cette thèse, j'ai utilisé deux dispositifs de pinces magnétiques différents, le premier est celui développé par A. Bancaud pendant sa thèse [Bancaud, 2004]. J'ai installé le second au cours de ma thèse, il s'agit du système Picotwist développé par V. Croquette (Figure 2.20.) Ce dispositif est doté d'un contrôle de la température du porte-échantillon et de son système de visualisation.

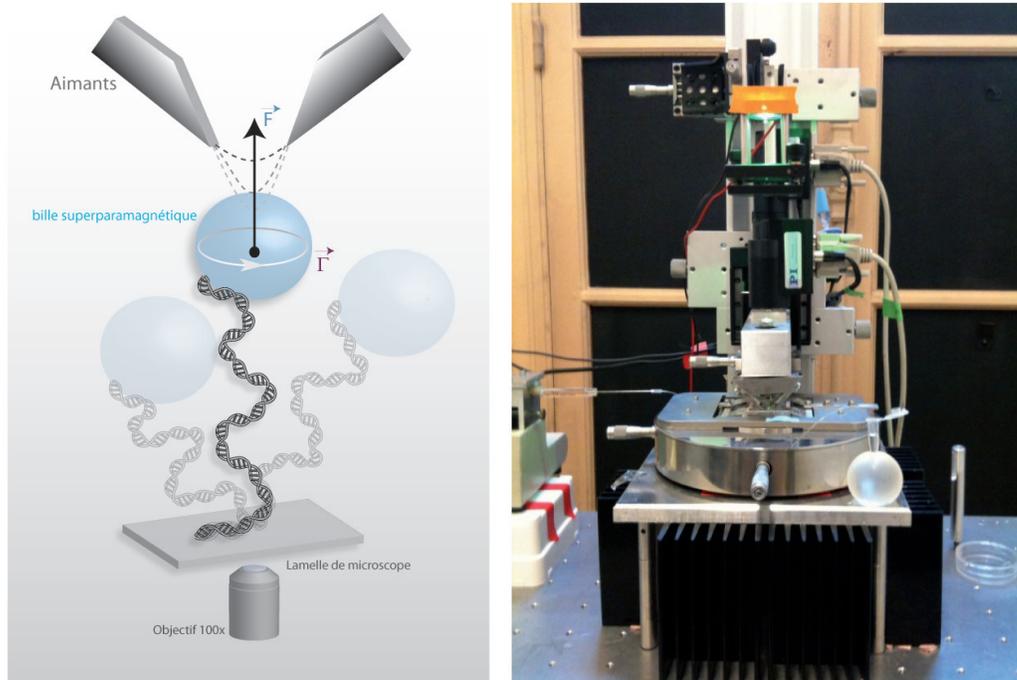


FIGURE 2.20 – Dispositif de pinces magnétiques. (a) Schéma de principe de l'expérience. (b) Photographie du dispositif expérimental.

a. Préparation de l'expérience

Les pinces magnétiques utilisent une paire d'aimants permanents afin d'exercer une force sur une bille superparamagnétique placée dans leur entrefer. Ce type de billes a pour caractéristiques une forte susceptibilité magnétique et une aimantation rémanente nulle. Elles sont constituées d'un ensemble de nanocristaux ferromagnétiques fixes (avec $T_c > T_{amb}$ ¹⁶), orientés dans une matrice non magnétique [Pankhurst *et al.*, 2003]. Ces nanodomains sont suffisamment petits pour perdre leur aimantation rémanente sous l'effet des fluctuations thermiques. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué à la bille un moment magnétique est créé, du fait d'une anisotropie de la répartition et de l'orientation du matériau magnétique, ce moment magnétique a une orientation privilégiée au sein de la bille. Ce moment subit un couple (de l'ordre de 10^4 pN.nm) qui tend à l'aligner le long des lignes de champ. Ce couple dépasse de quelques ordres de grandeurs tous les couples en jeu dans nos expériences (de l'ordre du pN.nm). On pourra donc considérer que l'application d'un champ magnétique suffit à déplacer la bille en bloc pour aligner sa direction d'aimantation avec le champ.

En ce qui concerne la force exercée sur la bille, elle est proportionnelle au gradient de champ magnétique (elle est attirée vers les zones de champ élevé). Cette force s'écrit de la façon suivante :

$$\vec{F} = (\vec{M} \cdot \vec{grad}) \vec{B}$$

La force exercée dépend donc du gradient de champ ressenti par la bille, il est donc possible de modifier cette contrainte en changeant les aimants ou bien en modifiant leur position par rapport à la bille. On peut également utiliser des billes avec des propriétés magnétiques différentes. Nous avons utilisé durant cette thèse des billes de $2,8 \mu m$ ¹⁷.

Les forces que nous pouvons atteindre avec la paire d'aimants que nous avons utilisée (qui est commune aux deux dispositifs) se trouvent dans la gamme 0,01 pN à 15 pN. Les aimants utilisés sont composés d'un alliage NdFeB d'aimantation rémanente d'environ 1,3 T. Afin de focaliser les lignes de champ, des pièces polaires¹⁸ forment l'entrefer, leur perméabilité magnétique μ_r est de l'ordre de 10000. La largeur L de l'entrefer peut être modifiée, nous avons déterminé expérimentalement la largeur qui donne accès aux forces les plus grandes, la géométrie optimale est $L \sim 0,8 mm$ (Figure 2.21a).

Nous avons déjà évoqué le fait que pour exercer une force sur la molécule d'intérêt, il faut que celle-ci soit attachée par une de ses extrémités à la surface d'une lamelle de microscope et par l'autre extrémité à une bille magnétique. Pour cela nous réalisons une ligation de fragments d'ADN modifié de chaque côté de la molécule (Figure 2.21b). Ces fragments d'environ 600 pb sont préparés par PCR¹⁹, des nucléotides modifiés sont insérés

16. La température de Curie, T_m , correspond à la température au dessus de laquelle un matériau perd ses propriétés magnétiques.

17. Dynabeads, Invitrogen

18. Elles sont composées d'un alliage à base de fer et de cobalt nommé AFK1 (Imply).

19. *Polymerase Chain Reaction* : cette technique permet la préparation de fragments d'ADN de longueur et séquences définies.

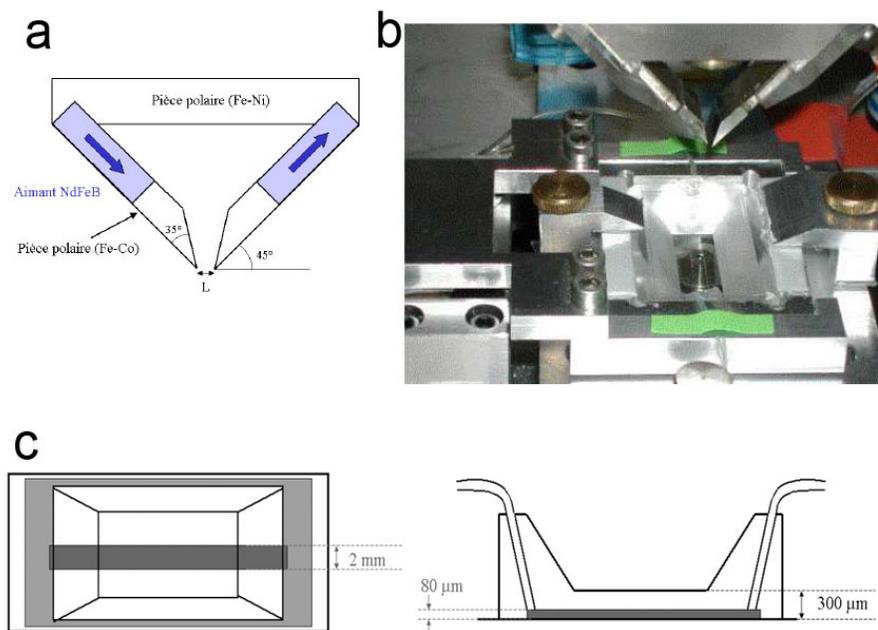


FIGURE 2.21 – (a) Géométrie de la paire d'aimants utilisée. (b) Photographie des aimants positionnés à la verticale de la cellule d'analyse. Cette dernière est placée au-dessus d'un objectif à immersion à huile 100x. (c) Cotes de la cellule microfluidique en PDMS dans laquelle sont réalisées les expériences.

dans la molécule au cours de la synthèse. L'un des deux ADN contient des biotines, qui vont permettre l'accrochage de cette partie à la bille magnétique fonctionnalisée en surface avec de la streptavidine. L'autre molécule d'ADN de 600 pb de longueur est modifiée avec de la digoxigénine, et permettra quant à elle l'accrochage de la molécule à la surface de verre. En effet, cette dernière est traitée afin de présenter à sa surface l'anticorps antidigoxigénine.

La molécule d'intérêt est donc reliée par une extrémité à la bille superparamagnétique *via* une interaction biotine-streptavidine. L'autre extrémité de cette construction est fixée à la surface d'une lamelle de microscope par une liaison digoxigénine-antidigoxigénine. Remarquons que cet accrochage se fait par l'intermédiaire de plusieurs points de fixation de part et d'autre de la molécule afin de rendre topologiquement clos l'assemblage bille-molécule. En effet, si on utilise un seul point de fixation, la contrainte de rotation pourrait être relâchée par rotation autour d'une liaison chimique simple.

Pour manipuler une molécule avec les pinces magnétiques, nous procédons tout d'abord à l'attachement de l'ADN à la bille magnétique. Pour s'assurer qu'une seule molécule s'accroche, nous mélangeons l'ADN dans un très large excès de billes. Ce mélange est ensuite injecté dans un canal micrométrique dans lequel se déroule l'expérience (Figure 2.21b). Ce système microfluidique est constitué d'un canal creusé dans une cellule réalisée en PDMS (PolyDiMéthySiloxane), un polymère beaucoup utilisé dans le laboratoire. Le canal est ensuite fermé à l'aide d'une lamelle de microscope (voir annexe page 153). La cellule microfluidique a une géométrie qui permet l'approche au plus près des aimants, afin

d'accéder aux forces les plus grandes. La distance minimale atteignable avec ce dispositif est d'environ 0,4 mm (Figure 2.21c).

C'est sur la lamelle de verre qui scelle le canal microfluidique que la molécule d'ADN est accrochée. Afin d'éviter au maximum les interactions non spécifiques entre la surface et la construction bille-molécule, la lamelle de verre est préalablement traitée avec un silane²⁰ pour la rendre hydrophobe. La cellule de PDMS est alors collée sur cette lamelle. Nous injectons ensuite dans le microcanal une solution contenant l'antidigoxigénine (environ 30 $ng/\mu L$) qui va se fixer non spécifiquement à la surface. Enfin la surface est bloquée avec une solution de BSA à 10 mg/mL afin de recouvrir les zones qui ne l'auraient pas été par l'antidigoxigénine.

Cette stratégie permet donc de manipuler une molécule attachée d'un côté à une surface de verre et par l'autre côté à une bille magnétique à l'intérieur d'un microcanal au dessus duquel est placée la paire d'aimants.

b. Acquisition de données

L'étude du comportement d'une molécule soumise à une force et à une déformation topologique nécessite la connaissance de trois paramètres : la force, la rotation et la longueur. S'il est facile de connaître la contrainte torsionnelle appliquée, en connaissant le nombre de tours effectués par les aimants autour de l'axe vertical, il faut développer des stratégies sophistiquées pour avoir accès à la force et à la longueur de la molécule.

Ces deux stratégies sont basées sur la microscopie en temps réel de la position de la bille. Pour cela nous utilisons un microscope inversé. Un objectif 100x²¹ est positionné sous la cellule d'analyse, une LED placée au dessus des aimants assure l'éclairage de l'échantillon. La position de l'objectif est ajustée par un piézo-électrique avec une course de 250 μm afin de faire varier le plan focal. De cette façon, on recueille sur une caméra CCD reliée à l'ordinateur l'image de l'échantillon. La configuration particulière du système d'imagerie fait que l'on peut obtenir la figure de diffraction des objets visualisés. Ainsi la figure de diffraction des billes correspond à des anneaux concentriques centrés sur le centre de la bille (Figure 2.22a). Le logiciel PicoJai, développé par V. Croquette, nous permet de déterminer à partir de ces anneaux les positions horizontales et verticales de la bille.

Principe de la mesure de position C'est en effectuant un calcul d'auto-convolution sur les anneaux qu'il est possible de déterminer la position de leur centroïde, donc la position du centre de la bille dans le plan (x,y) (Figure 2.22a). La position horizontale de la bille peut donc être enregistrée en temps réel grâce au suivi vidéo à une cadence de 60 Hz²².

Le système de visualisation donne seulement accès à l'image deux dimensions de la

20. Sigmacote (Sigma).

21. Objectif à immersion à huile Olympus, d'ouverture numérique 1,2.

22. Nous utilisons une caméra JAI A10 GigE (Elvitec).

figure de diffraction, dans le plan (x,y) . Toutefois c'est bien grâce à cette information 2D que l'on peut obtenir la position de la bille dans la troisième dimension, celle qui nous intéresse le plus puisqu'une variation de la position verticale de la bille donne directement accès à un allongement ou un raccourcissement de la molécule étudiée.

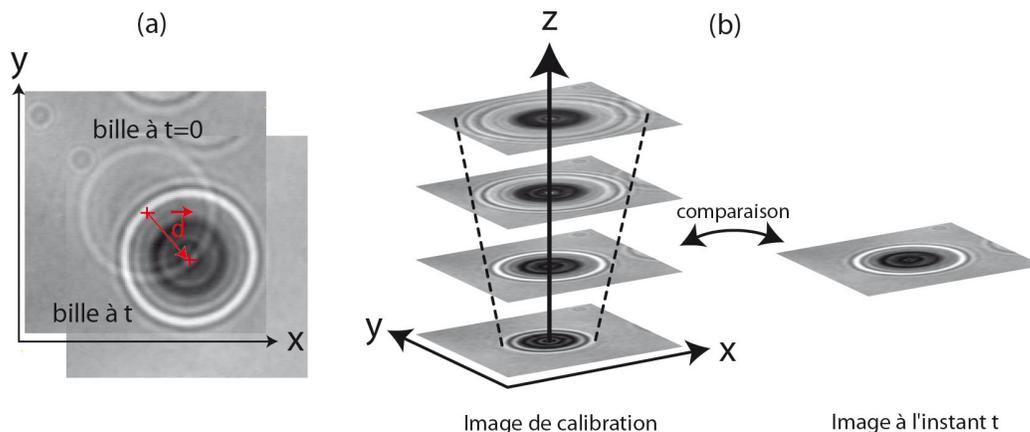


FIGURE 2.22 – Principe du suivi de la position 3D de la bille. La position dans le plan horizontal de la bille est suivie en temps réel. Pour déterminer sa position verticale, et donc l'extension de la molécule, la figure de diffraction est préalablement enregistrée pour différentes distances entre la bille et l'objectif. En comparant la figure de diffraction à un instant donné avec la collection d'images générée on peut connaître la position verticale de la bille.

Nous procédons à chaque début d'expérience au calibrage suivant : la figure de diffraction de la bille est collectée pour différentes positions du plan focal (tous les 300 nm). Nous disposons alors d'un ensemble d'images reliant l'allure de la figure de diffraction à la position du plan focal (Figure 2.22b).

Pour obtenir la position verticale de la bille nous fixons la position du plan focal et comparons ensuite l'image de diffraction avec le stock de figures collectées. Grâce à un moyennage temporel et une interpolation linéaire entre les images de calibration on obtient une précision de l'ordre de 10 nm. Notons toutefois que cette précision ne concerne pas la mesure de longueur absolue, puisqu'elle est obtenue par comparaison, ce sont les mesures de longueur relatives (allongement ou raccourcissement) qui sont précises à 10 nm près.

Principe de la mesure de force La mesure de force exploite la dynamique des fluctuations browniennes de la bille magnétique. Cette bille est soumise à la force exercée par les aimants, à la force de rappel exercée par la molécule qui la relie à la surface, aux fluctuations browniennes et à une force de frottements visqueux dues à l'interaction avec les molécules d'eau qui l'entourent.

Lorsque, sous l'action d'une fluctuation, la bille s'éloigne de δx de l'axe de la force, la résultante δF de la force exercée par les aimants et par l'ADN est transversale et vaut $\delta F \sim \frac{F\delta x}{\langle z \rangle}$. La bille est donc maintenue autour de l'axe de la force magnétique par un ressort effectif de raideur $k_x = F / \langle z \rangle$ (Figure 2.23a).

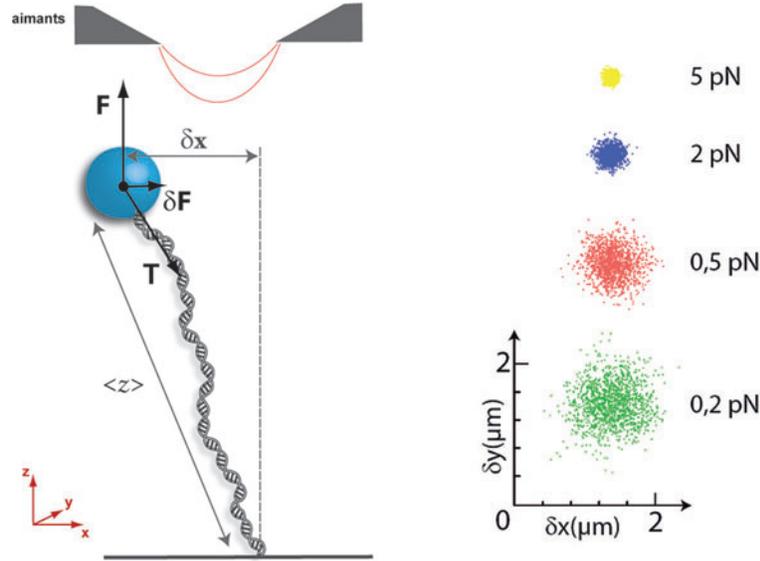


FIGURE 2.23 – Principe de la mesure de la force. (a) La résultante des forces exercées sur la bille par l'ADN et les aimants constitue une force de rappel δF équivalente à un ressort de raideur $k_x = F / \langle z \rangle$. (b) Enregistrement des fluctuations de la bille dans le plan horizontal (x,y) pour différentes forces appliquées, d'après [Praly, 2009].

Le théorème d'équipartition de l'énergie établit que la valeur moyenne de l'énergie mise en jeu dans chaque degré de liberté quadratique indépendant d'un système à la température T vaut $k_B T / 2$. Appliqué aux fluctuations transverses (selon x) de la bille, on obtient :

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} k_x \langle \delta x^2 \rangle$$

Or on a vu que k_x s'exprime simplement en fonction de la force et de la longueur de la molécule, d'où :

$$F \sim k_B T \frac{\langle z \rangle}{\langle \delta x^2 \rangle}$$

On a donc accès à la force appliquée par la mesure conjointe des fluctuations transverses de la bille et de l'extension de la molécule. On constate bien sur la figure 2.23b que l'amplitude des fluctuations dépend de la force appliquée par les aimants.

Cette approche très simple a toutefois un inconvénient : la fréquence d'acquisition nécessairement finie de la mesure des fluctuations ne permet pas d'avoir accès à leurs composantes hautes fréquences, elles sont donc sous-échantillonnées, ce qui conduit à une surestimation de la force.

Toutefois, le spectre de puissance des fluctuations de la bille a une fréquence de coupure, au delà de laquelle les fluctuations sont amorties par le frottement visqueux. Si la fréquence d'échantillonnage est grande devant cette fréquence de coupure la mesure de la force sera correcte. Avec la caméra que nous utilisons, qui permet une acquisition à 60 Hz, nous pouvons mesurer avec précision sur une bille de $2,8 \mu\text{m}$ de diamètre des forces allant

jusqu'à 15 pN.

Un autre problème d'ordre pratique concerne la mesure des faibles forces, pour lesquelles les durées d'acquisition nécessaires deviennent très longues, typiquement pour une mesure d'une force de 0,01 pN à une précision de 10% il faut plusieurs dizaines de minutes.

Pour plus de précisions sur la technique de mesure de force dans le dispositif de pinces magnétiques on peut se reporter aux thèses J.-F. Allemand et E. Praly [Allemand, 1997, Praly, 2009].

Pratiquement, sachant que les billes magnétiques Dynal de $2,8\mu\text{m}$ ont toutes les mêmes propriétés magnétiques, la force appliquée ne dépend que de la position verticale des aimants, il n'est donc pas nécessaire de faire la calibration en force pour chacune des billes analysées. Nous nous contentons donc de faire une seule calibration en force valable pour plusieurs expériences indépendantes²³.

c. Déroulement de l'expérience

Préalablement aux expériences nous préparons une cellule microfluidique (annexe page 153), le canal est relié à un pousse-seringue par des capillaires. Cela permet l'injection dans la cellule d'un mélange de billes magnétiques et de constructions d'ADN. Une fois dans le microcanal les billes vont sédimenter, de telle sorte que celles qui portent un ADN vont s'accrocher à la surface par l'intermédiaire de l'autre extrémité de la molécule. Les billes qui ne seront pas piégées de cette façon sont ensuite éliminées du canal par un rinçage avec le tampon d'étude. Ne restent alors dans le canal que des billes accrochées à la surface, soit par l'intermédiaire d'un ADN, soit par des interactions non spécifiques. Ces billes fixées servent de référence pour la position de la surface. Les dérives mécaniques du système pouvant conduire à des variations de la position de la surface de plusieurs dizaines de nanomètres, les positions de ces billes fixes sont retranchées aux mesures effectuées sur la molécule d'intérêt, conduisant à une précision plus grande.

Une fois une molécule unique d'ADN identifiée, nous procédons aux calibrations de longueurs et à la mesure de force (si nécessaire). L'acquisition de données se déroule alors dans le tampon choisi pour l'étude et qui peut être modifié en cours d'expérience.

d. Comportement de l'ADN sous pinces magnétiques

Le dispositif de pinces magnétiques permet de sonder la réponse mécanique de molécules d'ADN à des contraintes de tension et de rotation.

En mesurant la longueur de la molécule en fonction de la position des aimants au dessus de la cellule d'analyse, on peut accéder à la réponse force-extension de la molécule d'ADN.

²³. Concrètement une expérience se déroule sur une journée entière, cette durée prend en compte la recherche d'une molécule et l'enregistrement des données.

Pour chaque position des aimants, qui correspond à une force différente, la longueur de la molécule est mesurée.

Ce qui nous intéresse est de déterminer le comportement de l'ADN lorsque cette molécule est soumise à une déformation topologique. Nous enregistrons alors la réponse *extension-versus-rotation* d'une molécule unique d'ADN en mesurant la longueur ℓ de la fibre en fonction du nombre de tours N appliqués à la paire d'aimants à une force donnée (position verticale des aimants constante).

Une proportion non négligeable des molécules semble insensible à la contrainte de rotation, leur longueur ne change pas lorsque les aimants sont mis en rotation. Les molécules insensibles à la contrainte torsionnelle sont celles qui présentent en leur sein au moins une cassure simple brin, cela signifie que sur un des deux brins une liaison phosphodiester est manquante. Dans ces conditions, la contrainte imposée est relâchée par rotation autour de la liaison chimique simple de l'autre brin. On parlera dans ces circonstances de molécules *nickées*²⁴.

Les molécules sensibles à la contrainte de rotation seront appelées ADN *surenroulables*. Elles représentent entre 10 et 20% des molécules que nous avons étudiées. Nous obtenons pour leur réponse extension-rotation des *courbes en chapeau* (Figure 2.24) [Strick *et al.*, 1996]. La réponse varie en fonction de la force appliquée, nous allons décrire brièvement ces résultats pour différentes gammes de forces.

Force faible Pour des forces de l'ordre de 0.1 pN, la courbe extension-rotation de l'ADN est symétrique, c'est-à-dire que la réponse est la même si la molécule est surenroulée positivement ou négativement. La longueur maximale est obtenue lorsque la molécule n'est pas contrainte, on parle alors pour cette position particulière des aimants de *centre de rotation*.

Quelque soit le signe de la contrainte de torsion appliquée autour du centre de rotation, l'extension de la molécule varie peu. Dans ce régime la contrainte fait changer le nombre de torsion de l'ADN donc son hélicité.

A partir d'un certain nombre de tours appliqués, il devient préférable d'accumuler la contrainte sous forme de vrillage W_r , ce qui conduit à une forte diminution de longueur par la formation de plectonèmes, ce sont des structures de l'ADN dans lesquelles l'axe de la double hélice se croise un certain nombre de fois, conduisant à un ADN entortillé (Figure 2.24). On peut voir sur la figure 2.24(b) la représentation schématique des plectonèmes²⁵.

Ce comportement est exactement le même que celui d'un polymère semi-flexible tel que l'on peut le décrire dans le modèle *Worm-like Rope* (voir page 81).

A plus haute forces Lorsque la force est augmentée on commence à voir apparaître une dissymétrie dans la réponse extension-rotation de la molécule. Si le comportement de la molécule est inchangé par rapport au cas précédent lorsqu'elle est soumise à un

24. *Nick* est le terme anglais pour désigner une cassure simple brin.

25. Les plectonèmes sont des structures que l'on observe souvent dans les câbles de téléphones.

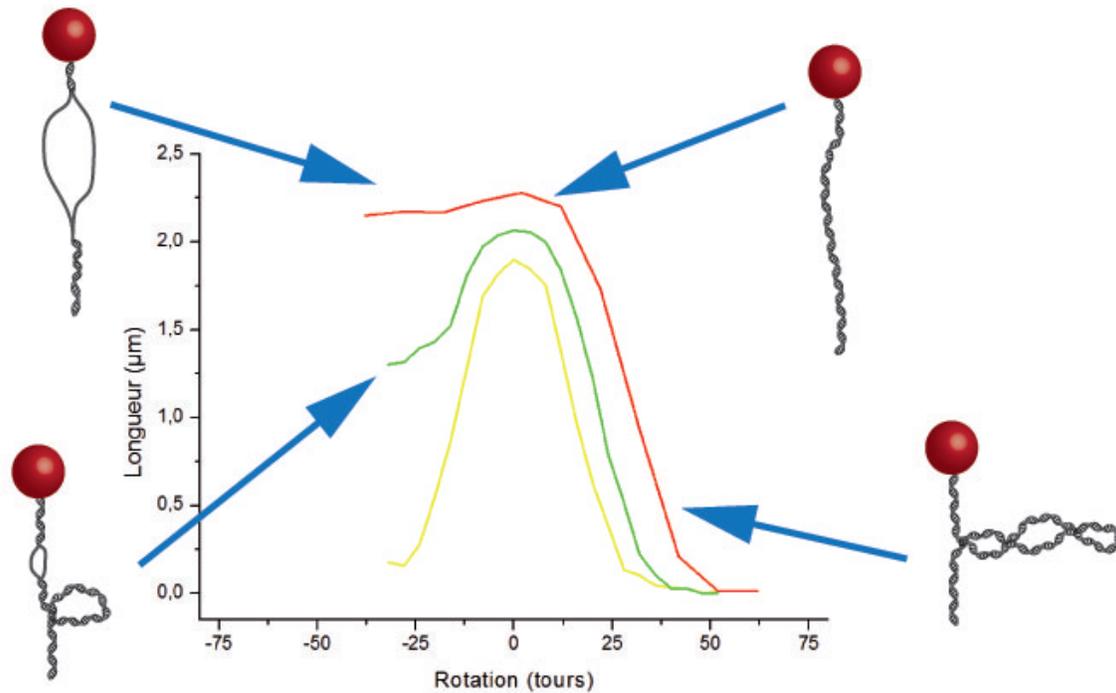


FIGURE 2.24 – Réponse mécanique d'une molécule unique d'ADN soumise à une déformation topologique à force constante. Courbe jaune : $F=0.05$ pN. Courbe verte : $F=0.1$ pN. Courbe rouge : $F=0.3$ pN. Courbe bleue : $F=0.4$ pN. Suivant la force et le signe de la contrainte la déformation topologique de l'ADN se répartit entre vrillage et dénaturation.

surenroulement positif, ce n'est pas le cas lorsque les aimants sont tournés dans le sens négatif. Quand la molécule est sous-enroulée on remarque que la formation de plectonèmes est moins extensive, il sera énergétiquement plus favorable de dénaturer la double hélice, c'est-à-dire de rompre les liaisons H reliant les paires de bases des brins complémentaires. Ainsi, plutôt que de former une boucle plectonémique, la molécule restera étendue avec les deux brins se faisant face sans s'enrouler, ce qui se traduit par une augmentation de longueur (Figure 2.24) dans le régime plectonémique.

Plus la force appliquée est grande plus la dénaturation sera importante, jusqu'à être totale pour des forces de l'ordre de 5 pN, c'est dire que quelque soit la contrainte de sur-enroulement négatif, la longueur de la molécule reste égale à son extension maximale.

Couples mis en jeu L'apparition des plectonèmes est contrôlée par un couple critique Γ_c , qui caractérise l'instabilité de flambage. Dès que le couple Γ exercé sur la molécule atteint cette valeur, la formation de plectonèmes débute et alors $\Gamma = \Gamma_c$. Une analyse énergétique simple permet d'obtenir une estimation de ce couple critique. Il est possible de déterminer le cout énergétique associé à la formation d'une boucle de plectonème. Si l'on modélise une telle boucle par un cercle de rayon R son énergie correspond à deux contributions : (i) une pénalité de courbure et (ii) le travail contre la force lors du raccourcissement

de la molécule. On obtient donc :

$$E_{plec} = 2\pi R \frac{\xi k_B T}{2R^2} + 2\pi R F$$

avec ξ la longueur de persistance de l'ADN.

Le rayon qui minimise l'énergie de courbure (terme de droite) est donné par : $R = \sqrt{\xi k_B T / (2F)}$. Ainsi plus la force augmente et plus la taille des boucles des plectonèmes diminue. On montre ainsi que la pente des régimes plectonémiques des courbes en chapeau $d\ell/dN = 2\pi R$ diminue quand F augmente.

On peut déduire de l'énergie des plectonèmes le seuil de l'instabilité de vrillage. Le début du vrillage correspond à l'instant où l'énergie de formation d'une boucle de plectonème est égale à l'énergie nécessaire pour ajouter un tour à l'hélice. Cela donne $2\pi\Gamma_c = 2\pi\sqrt{2F\xi k_B T}$, d'où on tire :

$$\Gamma_c = \sqrt{2F\xi k_B T}$$

On en déduit que plus la force est grande plus le couple critique d'apparition des plectonèmes est grand. A 0,1 pN ce couple est de l'ordre de 6 pN.nm.

On peut également définir un couple critique Γ_{dnat} concernant l'apparition de la bulle de dénaturation sous contrainte de surenroulement négatif. On observe alors la dénaturation de la double hélice lorsque $\Gamma_{dnat} < \Gamma_c$. Ce couple de critique pour la dénaturation est de l'ordre de 8 pN.nm.

Enfin, remarquons que la réponse extension-rotation d'une fibre peut être normalisée. En effet le rapport hauteur/largeur de la réponse en rotation d'un ADN nu est invariant à une force donnée, quelle que soit la longueur de la molécule. En d'autre terme, plus la fibre est longue, plus la largeur du chapeau sera grande. Pour comparer la capacité d'une molécule à supporter une déformation topologique il faut donc qu'elles aient la même longueur.

e. Les pinces magnétiques : un outil de choix pour l'étude de la topologie de l'ADN

La manipulation d'ADN en pinces magnétiques permet de mettre en évidence les déformations topologiques que peut subir la double hélice lors de l'interaction avec des protéines ou d'autres molécules. Par exemple il est possible de mettre en évidence le déroulement de la double hélice lors de la fixation de bromure d'éthidium (BET). Cette molécule est un intercalant de l'ADN qui se fixe dans le petit sillon de la fibre. Si l'on injecte dans le microcanal une solution contenant une faible concentration de BET on observe alors la translation de la courbe en chapeau vers les topologies négatives (Figure 2.25). En effet, considérons que le BET est injecté lorsque l'ADN est à son centre de rotation, c'est-à-dire son extension maximale, comme le nombre d'enlacement total ne peut pas changer, le surenroulement négatif induit par la fixation de l'intercalant est compensé par un surenroulement positif dans le reste de la fibre, donc la molécule n'est plus dans un état relâché.

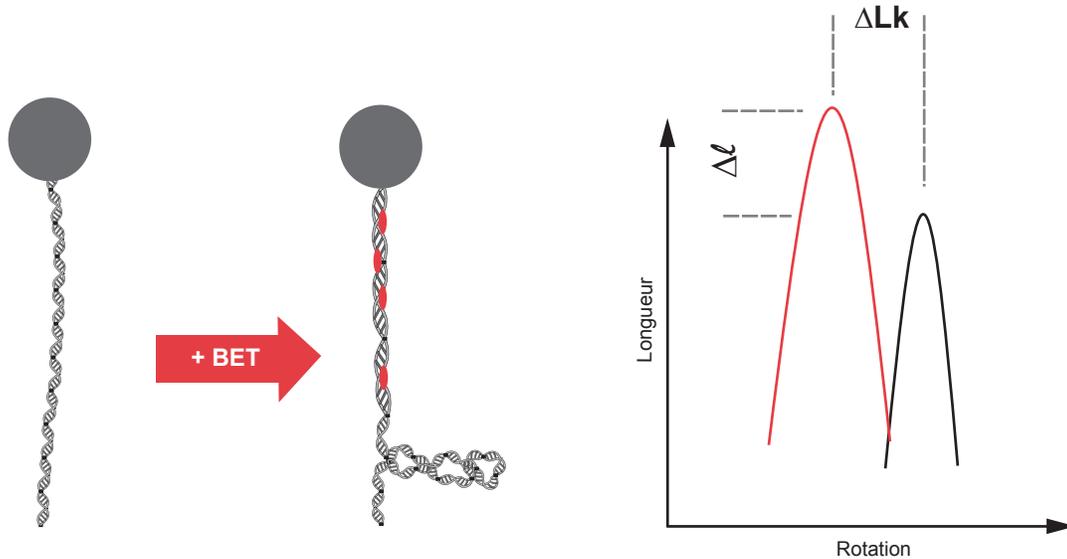


FIGURE 2.25 – Effet d’une déformation topologique de l’ADN sur les courbes en chapeau. Les molécules de BET s’intercalent dans la double hélice d’ADN, ce qui conduit à une augmentation du pas hélical. Cela se traduit par (i) une augmentation de longueur et (ii) une diminution de la torsion de l’ADN, compensée par une augmentation de son vrillage. Pour retrouver une molécule non contrainte en torsion il faut diminuer le vrillage en tournant les aimants dans le sens négatif. C’est pourquoi on peut mesurer un décalage topologique ΔLk .

Pour relaxer la molécule d’ADN il faut alors tourner les aimants dans le sens négatif afin que la fibre ADN+BET soit à son centre de rotation. C’est ce qui explique le décalage vers les tours négatifs de la courbe en chapeau en présence de BET.

De cette façon on a accès à la déformation topologique induite par l’interactant. Il se passe la même chose si la protéine qui interagit avec la double hélice induit non pas une torsion mais un vrillage, c’est pourquoi l’étude en pinces magnétiques de fibres de chromatine peut donner accès aux déformations topologiques de l’ADN induites par la formation de nucléosomes ou de chromatosomes (voir chapitre 3).

2.3 La topologie du nucléosome

Par *topologie du nucléosome* nous désignons la déformation topologique de l’ADN lorsque la double hélice est enroulée autour du cœur protéique d’histones. Nous noterons ΔLk_{nuc} cette déformation pour un nucléosome.

Les premières expériences biochimiques donnant accès à cette donnée topologique ont été menées par Shure et Vinograd [Shure et Vinograd, 1976]. Ils ont mesuré la différence de nombre d'enlacement d'un minichromosome circulaire du virus SV40²⁶, ils ont trouvé $\Delta Lk = -26$. Ce minichromosome comporte plusieurs nucléosomes, il a alors fallu attendre des expériences de microscopie électronique pour estimer ce nombre. [Saragosti *et al.*, 1980] ont montré qu'il y avait entre 24 et 27 nucléosomes sur ce fragment d'ADN. Il en résulte donc une contrainte topologique par nucléosome de $\Delta Lk_{nuc} \sim -1$. Le signe négatif de cette déformation reflète l'enroulement en une superhélice gauche de l'ADN autour de l'axe de superhélicité.

Ce résultat appelle à réflexion. En effet si l'on considère la géométrie du nucléosome telle que nous l'avons présentée à la page 22, il s'agit de l'enroulement de 1,65 tours d'ADN en une hélice gauche. De plus les ADN entrant et sortant se croisent si on les prolonge suffisamment. Ceci devrait donc conduire à un vrillage $Wr_{nuc} = -2$. Toutefois, ceci n'est vrai que si on considère que l'ADN est d'épaisseur nulle et que la pas de la superhélice est lui aussi nul. Une fois prise en compte cette correction on obtient tout de même une vrillage $Wr_{nuc} = -1,7$. Ce résultat semble en désaccord avec les données expérimentales obtenues aussi *in vivo* que *in vitro*. Cette contradiction a été appelée *paradoxe du nombre d'enlacements*.

La première hypothèse soulevée a été de dire que seul le vrillage a été pris en compte, le

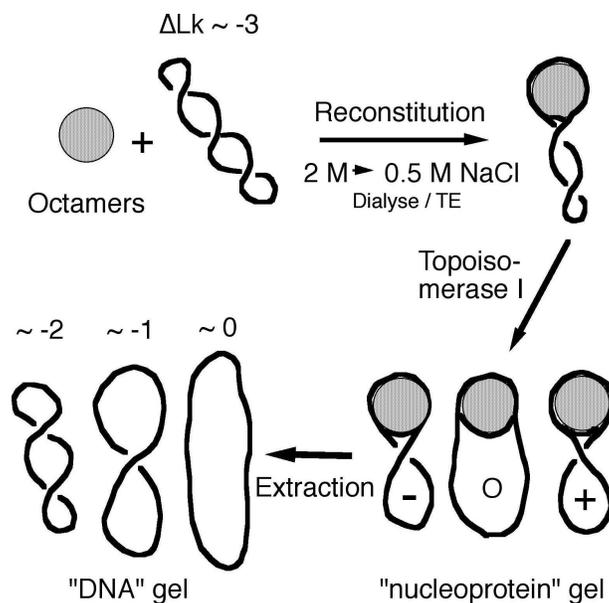


FIGURE 2.26 – Technique du minicercle appliquée à l'étude de la topologie du nucléosome. Un nucléosome est reconstitué sur un minicercle de déformation topologique donnée. Après relaxation de la contrainte emprisonnée dans la boucle d'ADN extra-nucléosomal par une topoisomérase, les ADN sont déprotéinisés. L'analyse sur gel des topoisomères produits donne accès à la déformation topologique de l'ADN nucléosomal.

26. SV40 pour Simian Virus 40, est un virus à ADN découvert chez les singes Rhésus.

théorème de Withe implique alors qu'une surtorsion de l'ADN nucléosomal $\Delta Tw_{nuc} = +0,7$ pourrait conduire à la valeur expérimentale de -1.

Pour estimer cette surtorsion il faut mesurer le pas hélical de l'ADN nucléosomal. Des expériences de digestion à la DNase ont donné des résultats allant de 9,9 à 10,5 pb/tour [Prunell, 1998]. La moyenne de cette périodicité locale apparente, h_{loc} , est d'environ 10,24 pb/tour. Il ne s'agit pas de l'hélicité intrinsèque h_{int} de la double hélice le long de l'octamère d'histones. En effet une hélice courbée autour d'une surface cylindrique subit une modification de son pas hélical. h_{int} peut être déduite à l'aide d'une correction géométrique estimée par Le Bret [Le Bret, 1988], on obtient alors $h_{int} = 10,4$ pb/tour en moyenne pour différentes séquences. Remarquons que le cristal du nucléosome résolu à 1,9 Å [Richmond et Davey, 2003] donne accès à une périodicité locale de 10,3 pb/tour, ce qui donne comme valeur corrigée $h_{int} = 10,4$ pb/tour pour cette séquence.

La connaissance de l'hélicité donne accès à la surtorsion de l'ADN autour de l'octamère. Avec N le nombre de paires de bases de l'ADN nucléosomal ($N = 146$ pb) et h_0 le pas hélical de la double hélice d'ADN libre ($h_0 = 10,5$ pb/tour), on trouve :

$$\Delta Tw_{nuc} = \frac{N}{h_{int}} - \frac{N}{h_0} \sim 0,08$$

Ce résultat est donc très inférieur à la valeur requise pour lever le paradoxe du nombre d'enlacements. Un autre paramètre que la surtorsion doit donc intervenir pour expliquer cette divergence apparente. Nous allons voir ci-dessous que la valeur $\Delta Lk_{nuc} \sim -1$ ne représente pas l'état topologique réel d'un nucléosome, mais est le reflet de l'existence de plusieurs conformations topologiques, mises en évidence par la méthode des minicercles.

La méthode des minicercles appliquée à l'étude de la topologie du nucléosome

Cette technique, développée dans le laboratoire d'Ariel Prunell (Biochimie de la chromatine, Institut Jacques Monod), se déroule de la façon suivante (Figure 2.26) :

1. des mononucléosomes sont reconstitués sur des minicercles de séquence donnée (Il peut s'agir d'une séquence positionnante, type 5S, ou non, par exemple issue d'un plasmide bactérien tel que pBR) et préalablement contraints topologiquement.
2. les particules formées sont alors incubées avec de la Topoisomérase I qui relaxe la contrainte de surenroulement présente dans la boucle d'ADN nu.
3. Les minicercles sont déprotéinisés puis mis à migrer sur gel pour l'analyse de leur topologie.

Afin de disposer d'un spectre continu de topologie de minicercle, les fragments circulaires d'ADN auront des tailles allant de 354 à 356 pb, en effet si l'on ne considère qu'une seule taille de cercle, deux topoisomères différents ne pourront varier que par un nombre entier de tours.

En faisant varier le degré de surenroulement des minicercles, on peut accéder à toutes les conformations topologiques du nucléosome. L'étude des minicercles montre que le nucléosome peut adopter trois états distincts (Figure 2.27a) [De Lucia *et al.*, 1999]. Ceux-ci

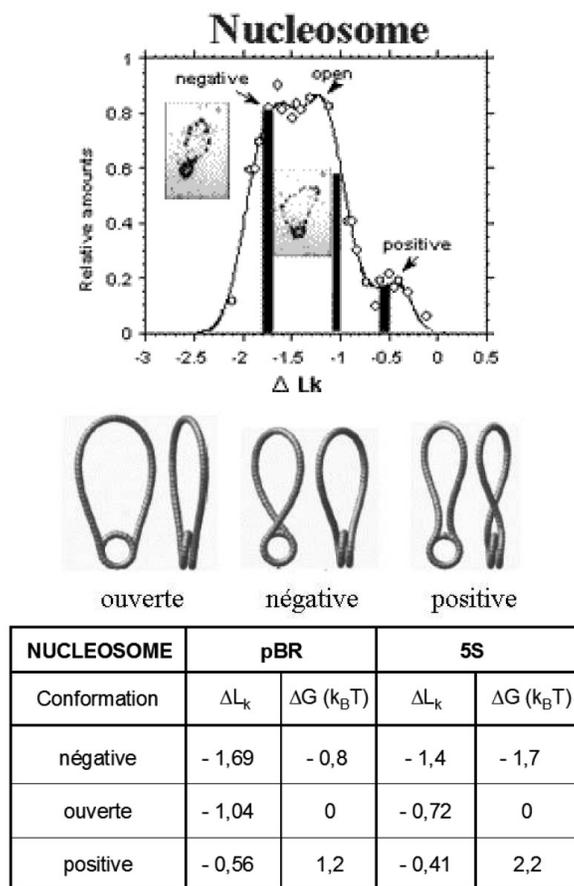


FIGURE 2.27 – Le nucléosome peut adopter trois états de topologies distinctes. (En haut) Distribution des états topologiques accessibles aux nucléosomes reconstitués sur la séquence pBR. Trois états sont accessibles : l'état croisé négatif, l'état ouvert et l'état croisé positif. (Au milieu) Représentation des trois états par simulation numérique. (En bas) Table résumant les valeurs des déformations topologiques associées à ces trois états sur les séries pBR et 5S.

ont pour topologies respectives $\Delta Lk_{nuc} = -1,69, -1,04, -0,56$ pour les minicercles pBR. Ces trois états varient entre eux par le statut du croisement de leur ADN entrant et sortant.

Une topologie de $\Delta Lk_{nuc} = -1,69$ correspond à l'état appelé *croisé négatif*, où les ADN entrant et sortant se croisent dans la continuité du chemin de l'ADN nucléosomal.

Une topologie de $\Delta Lk_{nuc} = -1,04$ correspond à l'état *ouvert*, dans lequel les deux brins entrant et sortant se repoussent sans se croiser.

Une topologie de $\Delta Lk_{nuc} = -0,56$ correspond à l'état *croisé positif*, dans lequel les ADN entrant et sortant effectuent un croisement positif.

Les représentations de ces trois conformations sont présentées sur la figure 2.27(b). On peut également voir sur cette figure des images de microscopie électronique des minicercles observables. On voit bien que le nucléosome peut se trouver dans une conformation ouverte ou croisée. On ne peut pas sur ces clichés distinguer entre les croisements négatifs et positifs.

Par ailleurs, la différence d'énergie entre deux conformations peut être déterminée en analysant les populations respectives de chaque état. On voit dans le tableau de la figure 2.27 les niveaux d'énergie des nucléosomes reconstitués sur les séquences pBR et 5S. On voit que dans chacun des cas l'état le plus favorisé, dans ces conditions, est l'état croisé négatif, et que l'état le plus défavorisé est l'état croisé positif. Il est important de relever que ces niveaux d'énergie ne sont valables que dans les conditions salines particulières utilisées pour cette expérience.

On remarque que la conformation croisée positive est encore plus défavorisée sur la séquence positionnante 5S.

Il est intéressant de noter que si les queues des histones H3 sont retirées ou bien hyper-acétylées, c'est l'état ouvert qui devient le plus stable énergétiquement [De Lucia *et al.*, 1999], cela s'explique par le fait que la répulsion entre les ADN entrant et sortant n'est plus écrantée par les résidus non structurés de H3. On aboutit à un résultat similaires lorsque l'on utilise un tampon sans sel du type TE²⁷, dans lequel les interactions électrostatiques sont très fortes, et donc aussi la répulsion entre les brins d'ADN.

Enfin, il a été montré que le passage des conformations croisées à la conformation ouverte s'accompagne de la rupture de deux sites d'interaction histones/ADN aux points SHL = ± 6.5 .

Topologie du chromosome : influence de l'histone de liaison

Il est possible d'effectuer le même type d'analyse avec des chromosomes, la reconstitution faisant alors intervenir H5 ou H1. Dans ces conditions la distribution entre les différents états est complètement modifiée. En effet, dans le chromosome les ADN entrant et sortant sont liés l'un à l'autre par l'intermédiaire de l'histone de liaison, ce qui empêche la particule d'adopter l'état ouvert. Le chromosome se répartit donc entre les états croisés négatif et positif (Figure 2.28a) [Sivolob *et Prunell*, 2003].

On a de la même façon que précédemment accès à la topologie et à l'énergie de ces deux états. On remarque que pour les deux types de séquences étudiées l'état négatif a une topologie plus *négative* que celle du nucléosome croisé négatif, et l'état positif a une topologie plus *positive* que celle du nucléosome croisé positif.

En outre on s'aperçoit que l'état croisé positif du chromosome est moins défavorisé que l'état croisé positif du nucléosome, surtout en ce qui concerne la séquence 5S.

Equilibre entre les différentes conformations topologiques.

La différence entre les conformations topologiques du nucléosome ou du chromosome réside dans le statut du croisement des ADN entrant et sortant. Il est important de remarquer que le passage d'un état de croisement à un autre est possible par simple rotation autour de l'axe dyadique de la particule (Figure 2.29).

Qu'en est-il du paradoxe du nombre d'enlacements ?

Nous venons de voir que le nucléosome et le chromosome existent sous différentes

27. Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM

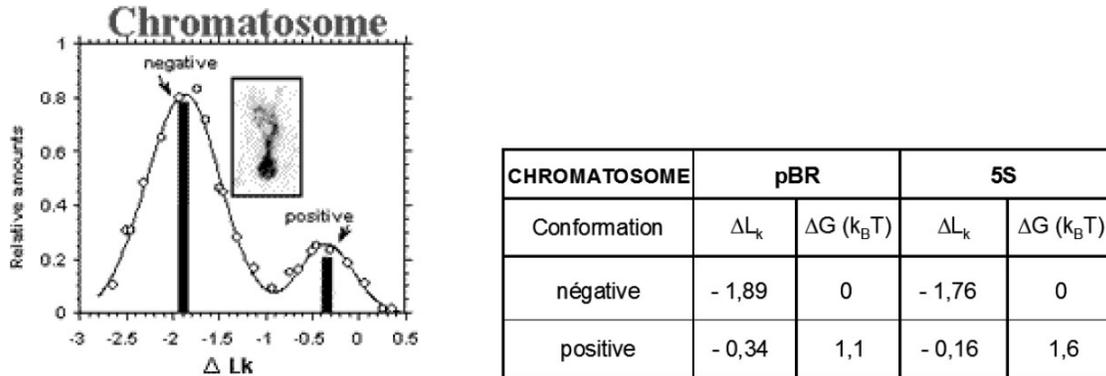


FIGURE 2.28 – Le chromatosome peut adopter deux états topologiques distincts. Distribution des états topologiques accessibles aux chromatosomes reconstitués sur la séquence pBR. Deux états sont accessibles : les états croisés négatifs et positifs. L’interaction avec l’histone de liaison supprime l’état ouvert. On peut voir en insert des images en microscopie électronique des états, il est impossible de distinguer les nucléosomes croisés négatifs et positifs. (A droite) Table résumant les valeurs des déformations topologiques associées à ces deux états sur les séries pBR et 5S.

conformations topologiques. C’est l’équilibre au sein de la fibre de chromatine entre ces différentes conformations qui explique que l’on mesure $\Delta Lk_{nuc} \sim -1$ par nucléosome. C’est de cette façon que le paradoxe du nombre d’enlacements a pu être levé.

2.4 La topologie du tétrasome

La technique des minicercles a permis de caractériser les états topologiques du nucléosome et du chromatosome. L’équipe d’Ariel Prunell l’a également appliquée à l’étude d’une particule nommée *tétrasome*, qui consiste en l’enroulement de la double hélice d’ADN autour du tétramère (H3,H4)₂. Nous avons déjà évoqué le fait (voir page 24) que ce tétramère définit le chemin suivi par l’ADN nucléosomal au cœur même du nucléosome, donc est responsable de l’enroulement en une super hélice gauche.

Les études de la topologie du tétrasome ont mis en évidence une déformation topologique négative, consistante avec la topologie globale du nucléosome, d’environ $-0,75$. De façon surprenante, il a été prouvé que le tétrasome pouvait exister dans une autre conformation topologique, cette fois-ci positive, de l’ordre de $+0,5$ (Figure 2.30) [Hamiche *et al.*, 1996a].

Ces deux états correspondent à deux sens d’enroulement de l’ADN autour du tétramère :

- un enroulement gauche pour $\Delta Lk_{tetra} \sim -0,6$, qui correspond à l’état au sein du nucléosome canonique. C’est la conformation *gauche*.
- un enroulement droit pour $\Delta Lk_{tetra} \sim 0,5$. C’est la conformation *droite*.

La *transition chirale* entre ces deux conformations est déclenchée par une contrainte topologique qui impose un réarrangement du tétramère (H3,H4)₂ qui peut pivoter autour de l’interface H3-H3.

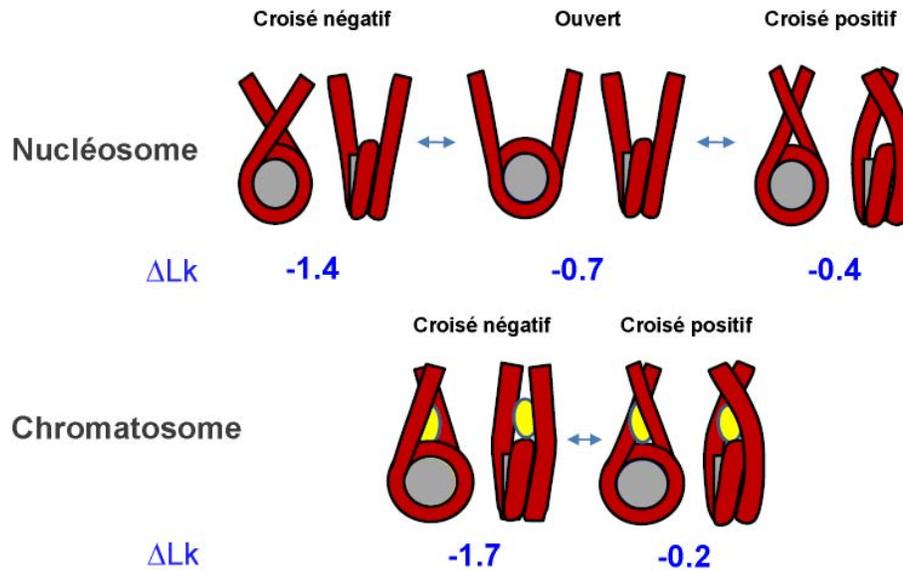


FIGURE 2.29 – (En haut) Les trois états topologiques du nucléosome et les ΔLk correspondants. (En bas) Les deux états topologiques du chromosome et les ΔLk correspondants. Le passage d’une conformation topologique à une autre peut se faire par rotation de la particule autour de son axe dyadique.

L’énergie de chacun des deux états ainsi que leur nombre d’enlacements sont donnés à nouveau pour les deux séquences pBR et 5S (voir table dans la figure 2.30).

Résumé

Nous venons de voir dans cette partie les outils qui sont à notre disposition pour étudier le comportement mécanique de fibres de chromatine. Le dispositif que nous avons choisi d’utiliser est les pinces magnétiques. Ce système va nous permettre d’étudier la réponse d’une fibre individuelle de nucléosomes ou de chromosomes lorsqu’elle est soumise une déformation topologique à force constante.

Pour interpréter les résultats que nous avons obtenus nous avons besoin de la connaissance des propriétés topologiques des objets étudiés. Dans le cas qui nous intéresse les données issues de la technique des minicercles sont très importantes. En particulier, il faut retenir que le nucléosome peut exister sous trois états topologiques distincts : l’état croisé négatif, l’état ouvert et l’état croisé positif. Ces états diffèrent entre eux par le statut de croisement des ADN entrants et sortants.

La présence de l’histone de liaison se traduit par la disparition de l’état ouvert. Le chromosome n’existe donc que sous deux états topologiques différents, l’état croisé négatif et l’état croisé positif.

Une dernière propriété importante est la possibilité pour le tétramère d’accéder à une structure de chiralité droite autour de laquelle l’ADN peut s’enrouler en une superhélice

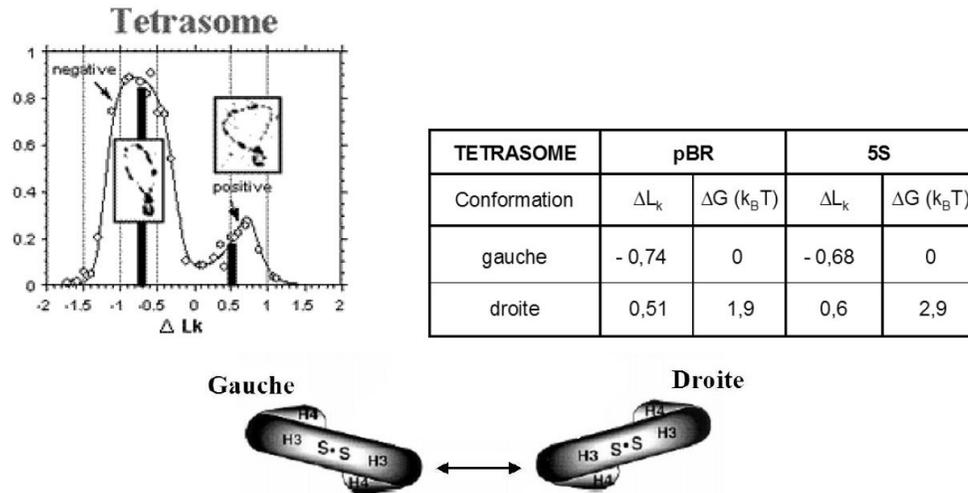


FIGURE 2.30 – Le tétrasome peut exister sous deux états topologiques distincts, dans lesquels l’enroulement de l’ADN a une chiralité différente. (A gauche) Distribution des états topologiques accessibles au tétrasome et image de microscopie électronique de chacun de ces deux états. (A droite) Table des déformations topologiques et des énergies des deux états sur les séquences pBR et 5S. (En bas)

droite, alors que dans la particule canonique cet enroulement est gauche.

Nous allons voir dans la partie suivante le comportement mécanique de fibres et interpréter les résultats en considérant les propriétés topologiques des nucléosomes et chromatosomes individuels.

CHAPITRE 3

Manipulation de fibres individuelles de nucléosomes et de chromatosomes

Sommaire

1	Les fibres de chromatine étudiées	110
1.1	La séquence positionnante 601	110
1.2	Reconstitution d'une fibre de nucléosomes	111
1.3	Reconstitution d'une fibre de chromatosomes	114
1.4	Déstabilisation chimique des histones de liaison	117
1.5	Déroulement des expériences de pinces magnétiques	117
2	Elasticité rotationnelle des fibres	119
2.1	Réponse extension-rotation de la fibre de nucléosomes	119
2.2	Réponse extension-rotation de la fibre de chromatosomes	126
3	Transition structurale des nucléosomes et chromatosomes . .	130
3.1	Comportement hystérétique de la fibre de nucléosomes	131
3.2	Comportement hystérétique de la fibre de chromatosomes	135
3.3	Modèle de ce comportement hystérétique	136
4	Pertinence biologique	138
5	Comportement en traction des fibres de chromatine	142
5.1	Réponses force extension de la chromatine	142
5.2	Extension en fonction du temps de la fibre de chromatine	144

Nous avons vu au cours des chapitres précédents que la chromatine est une fibre pouvant accéder à une grande variété de niveaux de compaction. Cette adaptabilité de la fibre est en rapport avec le rôle que possède la chromatine. Elle doit tout d'abord permettre la compaction de la très longue molécule d'ADN au sein du noyau des cellules eucaryotes. Cela conduit à une densité de matière très grande dans le noyau qui doit préserver ses propriétés dynamiques, indispensables à l'accessibilité du matériel génétique aux complexes enzymatiques ayant un rôle dans le métabolisme des acides nucléiques.

Lors des processus de réplication, de transcription ou de réparation la fibre subit des contraintes physiques qui peuvent altérer la structure des nucléosomes, en allant par exemple jusqu'à provoquer le relargage des dimères. Au cours de leurs thèses A. Bancaud et G. Wagner ont étudié la réponse d'une fibre de nucléosomes à une contrainte de rotation, à l'aide d'un dispositif de pinces magnétiques.

Pour ma part je me suis intéressé à la modification de ce comportement lorsque l'histone de liaison est présent au sein de la fibre, ceci dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques. Pour cela j'ai utilisé le même dispositif expérimental mais ai préparé de nouvelles constructions d'ADN à partir de la séquence positionnante 601. Dans le prochain chapitre nous allons voir les résultats pour ce type de fibres et les comparerons à ceux obtenus précédemment dans le groupe. Nous étudierons particulièrement l'influence de l'histone de liaison H5 sur le comportement mécanique de la fibre soumise à une déformation topologique.

1 Les fibres de chromatine étudiées

1.1 La séquence positionnante 601

Nous avons déjà évoqué dans le premier chapitre (voir page 25) qu'il existe des séquences d'ADN ayant une plus forte affinité pour le nucléosome. Celle qui possède la plus grande affinité est la séquence 601, synthétisée par Widom [[Lowary et Widom, 1998](#)]. En particulier, cette séquence a une affinité plus grande que la séquence 5S qui a été utilisée par A. Bancaud et G. Wagner.

Nous avons donc utilisé un multimère de la séquence 601. D. Rhodes nous a fourni un plasmide pUC19 contenant un fragment d'ADN constitué de 19 répétitions en tandem de la séquence 601 de 200 pb (la séquence de ce motif élémentaire est donnée en annexe)¹. Nous avons alors décidé de dimériser ce fragment afin d'avoir une molécule pouvant contenir jusqu'à 38 nucléosomes avec une longueur de répétition nucléosomale de 200 pb (voir annexe page 157).

1. La séquence positionnante 601 est constituée de 75 pb centrales, des séquences d'ADN sans propriétés particulières sont liguées à chaque extrémité pour lui donner la taille désirée.

Ce 38-*mere* de la séquence positionnante 601 correspond à une molécule d'ADN de 7600 pb, soit environ $2,3\mu\text{m}$. Afin de pouvoir manipuler une telle fibre, il faut liquer à chaque extrémité les séquences d'ADN modifiées permettant l'accrochage de la molécule d'une part à la bille magnétique et d'autre part à la surface de verre (ADN *poignées*). Nous avons donc utilisé des fragments de 600 pb chacun, l'un fonctionnalisé avec des biotines et l'autre avec des digoxigénines. Toutefois, entre ces ADN modifiés et le fragment positionnant nous avons décidé de placer un ADN *espaceur*, lui aussi de 600 pb afin d'éviter une trop grande proximité entre la fibre de nucléosomes/chromatosomes et les surfaces de la lamelle de microscope et de la bille, ceci afin de minimiser les interactions non-spécifiques potentielles.

La construction ainsi formée consiste en une molécule d'ADN de 10 kpb, ce qui représente une longueur totale d'environ $3,3\mu\text{m}$ (Figure 3.1).

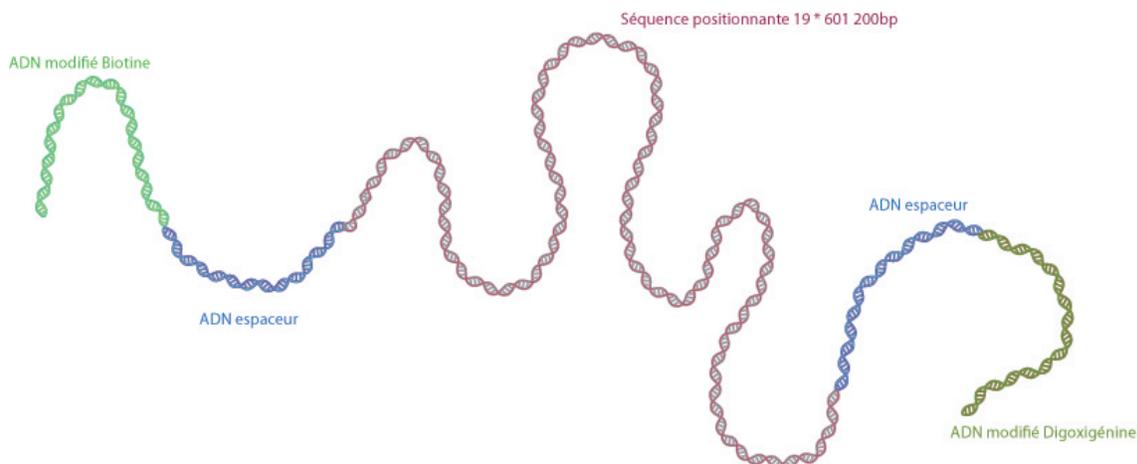


FIGURE 3.1 – Construction de la molécule d'ADN que nous avons utilisée dans l'expérience de pinces magnétiques pour étudier la réponse mécanique de la chromatine.

1.2 Reconstitution d'une fibre de nucléosomes

Les histones sont des protéines particulièrement chargées qui interagissent beaucoup avec les surfaces de charges opposées comme le verre. Pour minimiser ces interactions il est préférable de travailler à haute force ionique, le problème étant que dans ces conditions l'interaction entre les histones et l'ADN sont quasi nulles. De plus nous avons déjà évoqué le fait que pour reconstituer proprement des nucléosomes sur un ADN il faut effectuer une dialyse très lente ou des dilutions successives pour augmenter progressivement les interactions entre ADN et histones (voir page 28).

Il n'est donc pas réaliste de vouloir faire des reconstitutions de chromatine *in situ*, c'est à dire directement dans le microcanal où se déroulent les expériences de pinces magnétiques.

Nous avons donc choisi de pré-reconstituer les fibres de chromatine en volume. Cela permet en outre la caractérisation biochimique des fibres obtenues de cette façon. A. Ban-

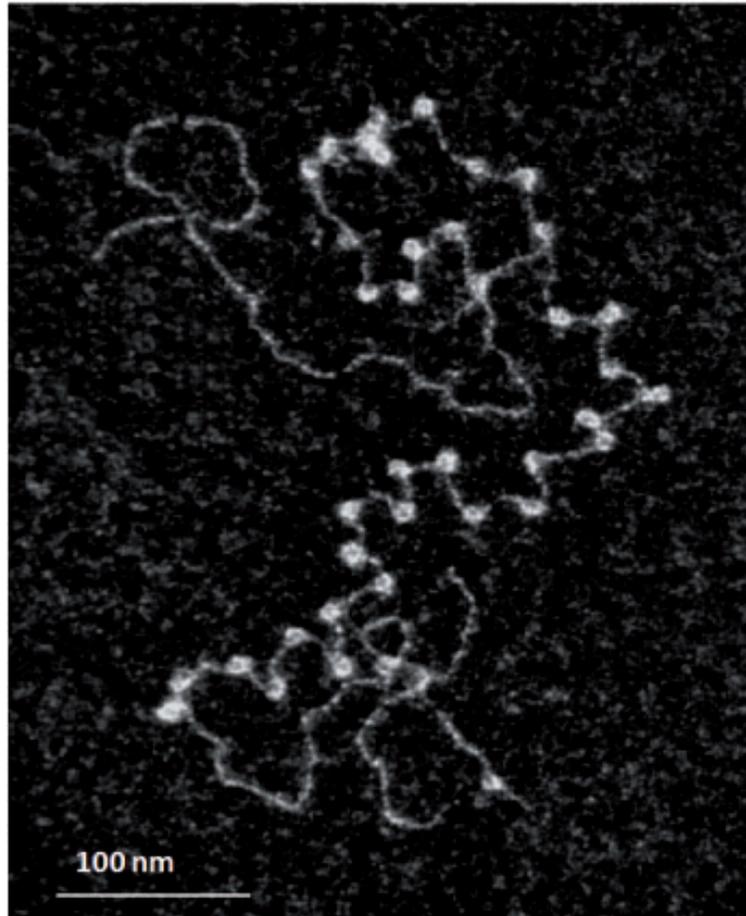


FIGURE 3.2 – Cliché de microscopie électronique d'une fibre de nucléosomes reconstituée sur la construction d'ADN utilisée dans le dispositif de pinces magnétiques. C. Lavelle (IGR)

caud et G. Wagner ont développé une stratégie qui consistait à reconstituer les nucléosomes sur la séquence positionnante. Les ADN espaceurs et "poignées" étaient ensuite ligués sur cette fibre [Wagner, 2006].

Nous avons tiré profit de la très forte affinité de l'ADN positionnant 601 pour effectuer les reconstitutions directement sur les constructions d'ADN totale : $38*601 + \text{espaceurs} + \text{poignées}$. Ainsi en ajustant le ratio entre le nombre d'octamères et le nombre de séquences positionnantes, on peut faire en sorte que seules ces dernières soient occupées par un nucléosome. Dans les bonnes conditions, les ADN qui flanquent la séquence positionnante sont totalement dépourvus de nucléosomes. La figure 3.2 présente un cliché de microscopie électronique d'une fibre obtenue.

Sur ce cliché, on peut remarquer que les nucléosomes se trouvent quasiment tous dans la conformation ouverte. Cela est en rapport avec les conditions ioniques à bas sel lors de l'étalement sur la surface : les répulsions électrostatiques entre ADN sont fortes, ce qui permet d'observer des fibres étendues et d'ainsi visualiser les nucléosomes individuels.

Le protocole de reconstitution est un protocole de dilution (voir page 28), le détail est

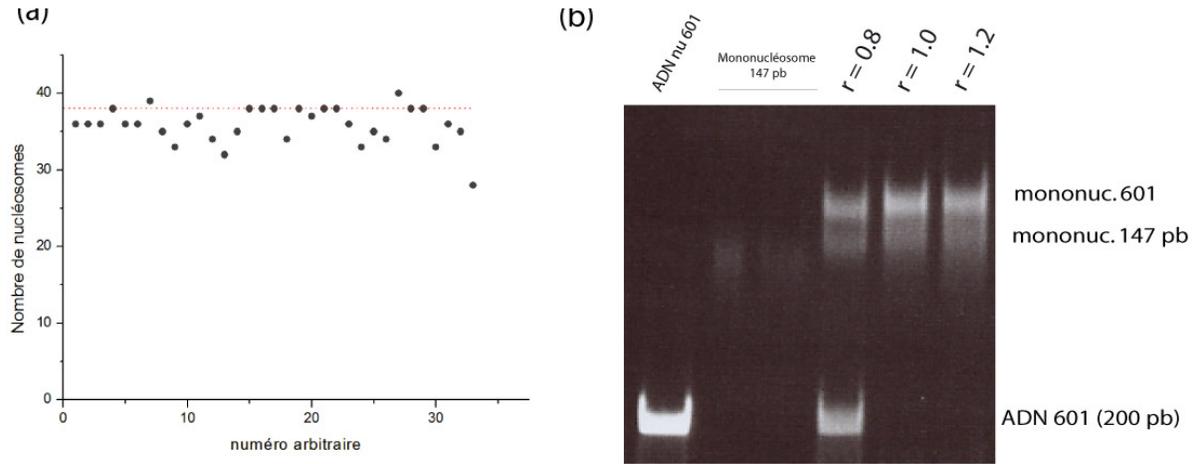


FIGURE 3.3 – Analyse de l’occupation par des nucléosomes des sites positionnants 601. (a) Nombre de nucléosomes identifiables sur les images de microscopie électronique de fibres de chromatine reconstituées sur la séquence 601. (b) Migration sur gel d’acrylamide des fragments d’ADN obtenus après digestion de la fibre par l’enzyme *Ava*I. Lorsque le fragment porte un nucléosome sa migration est retardée. On identifie ainsi les sites positionnant occupés par l’octamère d’histone. On remarque qu’à partir du ratio octamère/sites de 1.2, la bande d’ADN nu disparaît, ce qui traduit l’occupation complète de la fibre.

donné en annexe page 161. Les octamères d’histones que nous avons utilisés pour toutes les reconstitutions sont ceux qui nous ont été fournis par le laboratoire d’Ariel Prunell. Il s’agit d’histones purifiées à partir d’érythrocytes de canards. Ils comportent donc un éventail des modifications covalentes et des variants possibles dans des proportions physiologiques. Leur distribution le long de la fibre est quant à elle inconnue. Ceci pourrait être une cause d’hétérogénéité dans les réponses mécaniques des fibres.

Le rapport entre le nombre d’octamères et le nombre de séquences positionnantes a du être déterminé avec précision afin de saturer en nucléosome les sites positionnants. Si une trop grande quantité d’octamère est mélangée à l’ADN il peut se produire une oligomérisation de fibres et une précipitation subséquente. Si on n’utilise pas assez d’octamères, la fibre n’est pas complètement reconstituée. Pour déterminer le taux d’occupation des sites positionnants nous avons utilisé la méthode développée dans le laboratoire de D. Rhodes [Huynh *et al.*, 2005]. Après reconstitution la fibre est digérée par l’enzyme *Ava*I, son site de restriction est celui qui lie entre eux les répétitions de 601. La digestion par cette enzyme conduit donc à découper la séquence multimérique en monomères. On obtient donc des fragments d’ADN de longueur 200 pb. Une analyse sur gel d’acrylamide permet de déterminer si ces fragments portent ou non un nucléosome (Figure 3.3).

L’électrophorèse se déroule en conditions natives, cela signifie que les nucléosomes ne sont pas déstabilisés et migrent intacts dans le gel. Le tampon utilisé dans ces conditions est le TE, on utilise un gel acrylamide/bisacrylamide (29 :1) à 5%. La migration se déroule à 250 V pendant 2h (voir annexe page 162).

Les mononucléosomes migrent moins loin que les fragments d’ADN nus, cela permet

donc de vérifier la présence des octamères sur les séquences positionnantes. On peut se rendre compte de cette manière que si le ratio n'est pas assez grand, il reste des sites 601 inoccupés, qui migrent donc comme des ADN nus de 200 pb. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'un rapport de 1.2 octamère par site positionnant est suffisant pour reconstituer entièrement la fibre. Dans ces conditions on observe la disparition de la bande d'ADN nu à 200 pb. Les octamères supplémentaires sont "pris en charge" par des fragments d'ADN de 147 pb de séquence aléatoire, cela conduit à la formation de particules cœur de nucléosomes. Cette analyse nous indique également que les nucléosomes sont positionnés correctement, sans quoi certains sites de digestion seraient inaccessibles, conduisant à la formation de fragments de 400 pb au moins.

Pour vérifier également que la reconstitution s'est déroulée convenablement on peut procéder à une électrophorèse de la fibre entière sur gel d'agarose (Figure 3.5). Par rapport à l'ADN nu correspondant la fibre de nucléosomes migre moins à l'intérieur du gel. Le fait que la bande qui lui corresponde soit bien définie indique que les fibres ainsi reconstituées sont homogènes [Huynh *et al.*, 2005]. Dans le cas contraire on observerait sur le gel une trainée correspondant aux différents nombres de nucléosomes présents sur la fibre.

Par rapport à une fibre reconstituée sur la séquence positionnante 5S, les fibres avec 601 présente une régularité bien supérieure et un taux d'occupation proche de 100%, ce qui n'était pas le cas avec l'utilisation de la séquence 5S [Bancaud *et al.*, 2007]. Ceci constitue donc un avantage quant à la manipulation de ces fibres en pinces magnétiques, au regard de l'homogénéité des réponses obtenues.

1.3 Reconstitution d'une fibre de chromatosomes

A partir de la même construction d'ADN nous avons voulu obtenir des fibres de chromatosomes. Nous avons choisi comme histone de liaison le variant H5. Cette protéine nous a également été fournie par le laboratoire d'Ariel Prunell. Cette histone a été purifiée à partir d'érythrocytes de poulets [Sivolob et Prunell, 2003]. L'objectif est une nouvelle fois de construire des fibres qui contiennent un chromatosome par site positionnant. Nous avons choisi de garder le rapport octamère/site positionnant déterminé pour les fibres de nucléosomes et d'ajuster cette fois le rapport H5/sites positionnant.

La reconstitution de la fibre se déroule de la même façon que précédemment, excepté qu'à partir d'une concentration de 0,4M en NaCl on ajoute la quantité désirée de l'histone de liaison H5.

Pour cela, il faut comme précédemment vérifier l'incorporation de H5 au niveau de chaque nucléosome. Malheureusement il n'est pas possible de le faire par la méthode qui consiste à digérer la fibre pour produire des monochromatosomes. En effet le tampon dans lequel la digestion se déroule contient suffisamment de magnésium pour faire précipiter les fibres de chromatosomes [Huynh *et al.*, 2005] (voir page 34. Nous avons donc combiné imagerie par microscopie électronique et migration sur gel d'agarose des fibres entières pour

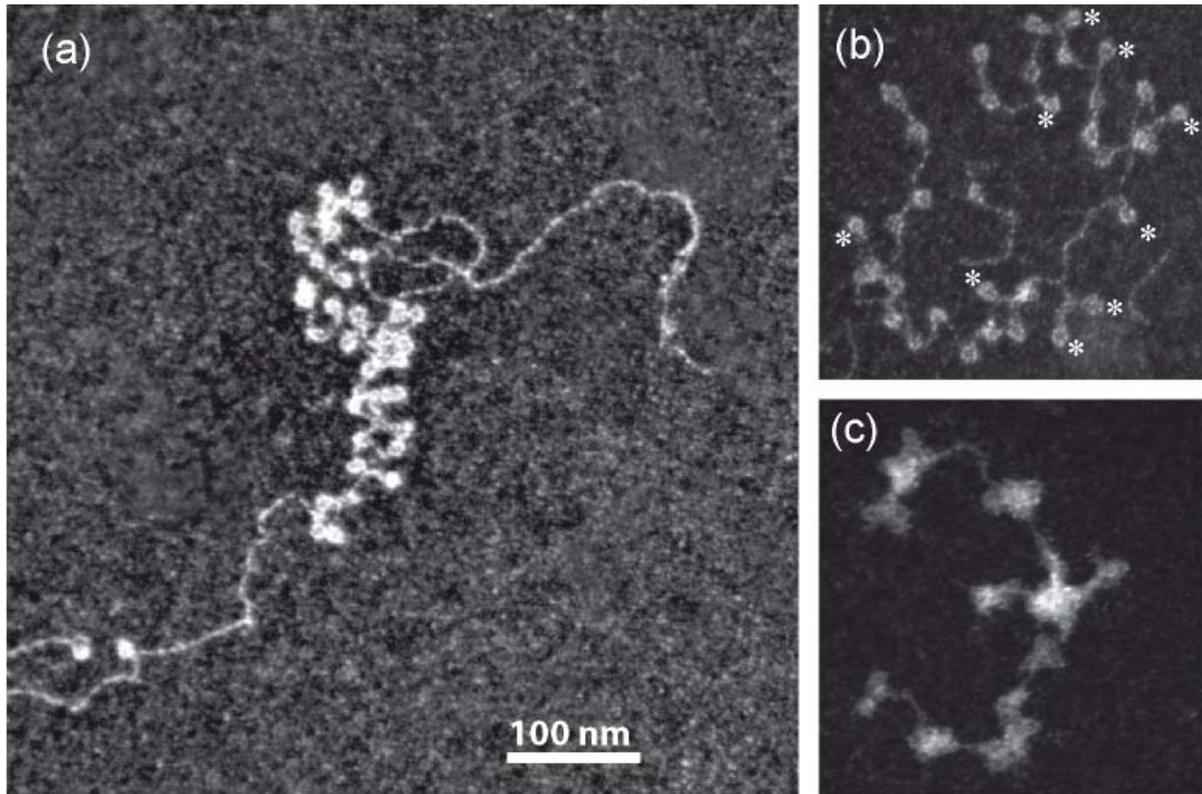


FIGURE 3.4 – Cliché de microscopie électronique de fibres de chromatosomes en fonction du ration H5/sites positionnants. (a) Ratio 1.5/1, c'est celui que nous avons choisi d'utiliser pour la reconstitution des fibres de chromatosomes étudiées sous pinces magnétiques. (b) ration 1/2, on observe la coexistence de nucléosomes et de chromatosomes (ces derniers sont repérés par *) . (c) ratio 2/1, l'histone de liaison recouvre en grande partie la fibre par une interaction non spécifique.

vérifier le produit des reconstitutions.

Les images de microscopie électronique (Figure 3.4a) mettent bien en évidence la présence de l'histone de liaison, à travers la formation du motif en tige (voir page 25). On constate ainsi une compaction apparente de la fibre. La figure 3.4b montre une fibre pour laquelle la quantité de H5 utilisée n'était pas suffisante. On observe la coexistence de nucléosomes et de chromatosomes (la présence de l'histone de liaison est repérée par *).

Du fait de leur forte charge électrostatique l'ajout d'une grande quantité d'histones de liaison conduit à une interaction non spécifique de la protéine avec l'ADN nu, ce qui se traduit par une couverture uniforme de la molécule par H5 (Figure 3.4c). On observe aussi la formation d'amas de nucléosomes.

Dans les mêmes conditions que pour la figure 3.4c, nous avons vérifié par migration sur gel d'agarose l'homogénéité des molécules. A nouveau le fait que l'on obtienne une bande fine et bien définie prouve l'homogénéité des fibres reconstituées. Par ailleurs l'incorporation de l'histone de liaison se traduit par une migration plus rapide, en accord avec une compaction supérieure de la fibre (Figure 3.5) [Huynh *et al.*, 2005].

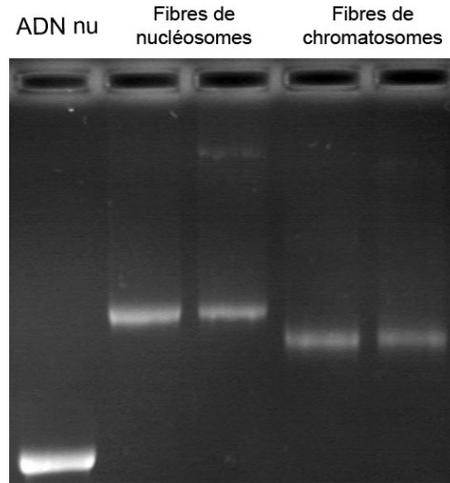


FIGURE 3.5 – Migration sur gel d’agarose en conditions natives de fibres avec et sans H5. La migration se déroule en conditions natives à 150V pendant 1h.

La combinaison de ces données nous a amené à choisir un rapport H5/site positionnant de 1.2. Ainsi nous obtenons des fibres de chromatosomes saturées et homogènes.

En utilisant ces protocoles de reconstitution de fibres de chromatine avec et sans l’histone de liaison H5, nous avons pu préparer des fibres nous permettant de sonder la réponse des fibres à une déformation topologique. La comparaison entre les deux types de réponses donne accès aux propriétés induites par la présence de l’histone de liaison. Toutefois il nous a semblé préférable de pouvoir comparer directement une fibre unique avec et sans H5. Il nous a fallu établir un protocole permettant de contrôler la présence de cette histone dans la fibre. Deux possibilités s’offraient à nous.

La première consiste à piéger une fibre de nucléosomes, puis d’injecter dans le microcanal une solution contenant H5, qui pourrait alors s’incorporer à la fibre. Or nous manipulons les fibres de chromatine dans un tampon sans sel, car dans le cas contraire les interactions électrostatiques sont fortes et le risque de collage sur la surface de la bille étudiée est très grand. L’injection de H5 directement dans un buffer sans ions conduirait à sa fixation non spécifique tout au long de la molécule. Il y a donc très peu de chances de pouvoir reconstituer des chromatosomes dans ces conditions.

La deuxième possibilité, que nous avons donc privilégiée, consiste à piéger des fibres de chromatosomes telles que nous pouvons les reconstituer (Figure 3.4), puis d’enlever spécifiquement H5 de ces fibres, afin d’obtenir la fibre de nucléosomes correspondante. Le détail de ce protocole est présenté ci-dessous.

1.4 Déstabilisation chimique des histones de liaison

Il a été montré que l'histone de liaison se dissocie du nucléosome pour des concentrations salines de l'ordre de 0,5 M. Encore une fois nous ne pouvons pas utiliser cette propriété dans notre dispositif car l'injection d'une solution à cette concentration en sodium conduirait inévitablement à l'accrochage non-spécifique mais irréversible de toutes les billes sur la surface, empêchant donc toute possibilité de manipulation de fibres. Nous avons donc dû établir un autre protocole pour déstabiliser l'histone de liaison.

A la fin d'une expérience, nous utilisons classiquement de l'héparine pour enlever tous les nucléosomes de la fibre, ceci dans le but de connaître la réponse de l'ADN nu correspondant à la fibre étudiée [Wagner, 2006]. Cette molécule est un polyanion connu pour interagir avec les histones [Brotherton *et al.*, 1989]. Pour déstabiliser complètement le nucléosome nous injectons l'héparine à une concentration de 100 $ng/\mu L$, durant sa thèse G. Wagner a déterminé que pour une concentration de 1 $ng/\mu L$ seuls les dimères (H2A,H2B) sont déstabilisés.

L'utilisation d'une concentration encore plus faible laisse intact le nucléosome mais affecte l'histone de liaison. Nous avons déterminé par des expériences de microscopie électronique et de migration sur gel qu'une concentration d'héparine de 0,02 $ng/\mu L$ déstabilise l'histone de liaison uniquement. Par contre on observe sur les clichés de microscopie électronique que les fibres de chromatosomes traitées par l'héparine perdent l'histone de liaison, le motif en tige des particules disparaît, comme on peut le voir sur la figure 3.6.

Nous disposons donc d'un protocole permettant de préparer des fibres régulières de nucléosomes et de chromatosomes manipulables en pinces magnétiques. Nous pouvons également sélectivement enlever l'histone de liaison H5 afin d'obtenir la fibre de nucléosomes correspondantes.

1.5 Déroulement des expériences de pinces magnétiques

Les expériences de manipulation de fibres individuelles de chromatine en pinces magnétiques se déroulent de la façon suivante. Nous injectons dans le microcanal le type de molécules que nous souhaitons étudier, après les avoir attachées aux billes magnétiques (Figure 3.7).

Nous enregistrons alors les données qui nous intéressent. Cela peut être les réponses *force-extension* ou bien *extension-rotation* de la fibre. S'il s'agit de fibres de chromatosomes, après les acquisitions nous injectons de l'héparine à très basse concentration (0,02 $ng/\mu L$) pour dissocier les histones de liaison et pouvoir enregistrer la réponse de la fibre de nucléosomes correspondantes.

Toutes les expériences se terminent par l'injection d'une solution concentrée d'héparine (100 $ng/\mu L$) afin d'enlever toutes les histones de la molécule et ainsi faire l'acquisition des données correspondant à l'ADN nu. Nous verrons que cela permet de remonter aux nombres de particules présentes sur la molécule initiale.

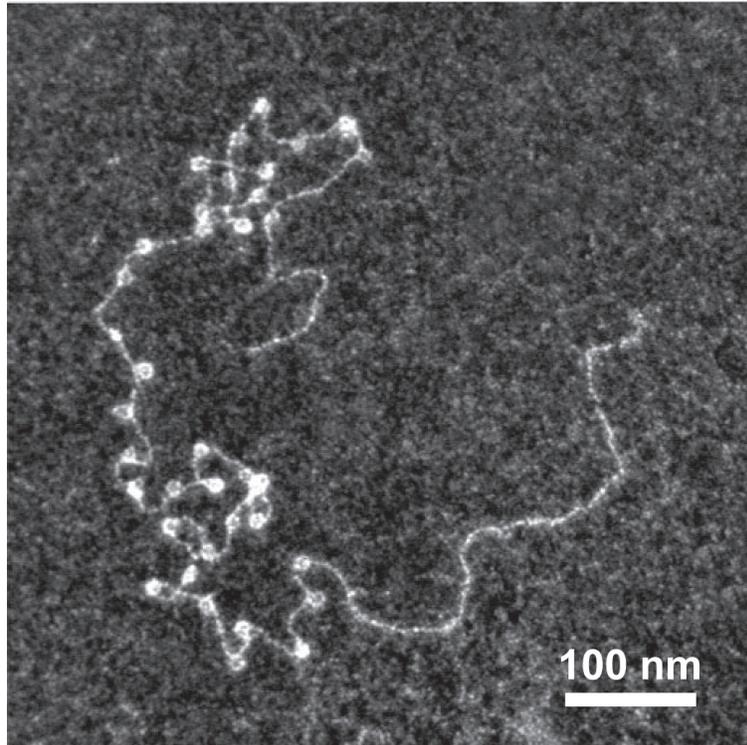


FIGURE 3.6 – Déstabilisation chimique de l’histone de liaison par incubation dans une solution à très faible concentration d’héparine. (a) Migration sur gel d’agarose de fibres traitées ou non par l’héparine. Les fibres de nucléosomes ne sont pas affectées par ce traitement, alors que les fibres de chromatosomes le sont. (b) Clichés de microscopie électronique de fibres de chromatosomes avant et après traitement par une solution de $0,02 \text{ ng}/\mu\text{L}$ d’héparine.

Le problème majeur durant les expériences est le risque de collage de la bille d’intérêt sur la surface, rendant alors impossible les mesures de longueur de la molécule. Afin de minimiser ce risque, nous utilisons dans tous les tampons une concentration en BSA de $10 \text{ mg}/\text{mL}$. Nous avons aussi parfois utilisé, en complément, un détergent non-ionique du style NP40. Dans ce cas nous avons choisi une concentration de 0.05% , malheureusement, l’ajout de ce détergent n’a pas réduit de façon significative les risques de collage de la bille sur la surface.

Une fois les billes accrochées à la surface et le microcanal rincé, nous recherchons une molécule qui présente la longueur attendue puis nous faisons des tests pour savoir s’il s’agit bien d’une molécule unique (voir annexe page 169). Ensuite nous commençons à faire les acquisitions. Il faut noter dès à présent que l’étape de recherche de la molécule est la plus délicate quand il s’agit de trouver des fibres uniques de chromatine. En effet, comme nous l’avons déjà dit le risque de collage de la bille est important à cause de la présence des histones très chargées, donc le nombre de fibres manipulables dans le microcanal est très inférieur à celui que l’on peut observer lorsqu’on manipule des molécules d’ADN. Le problème est encore plus grand lorsque l’on s’intéresse aux fibres de chromatosomes. Pour

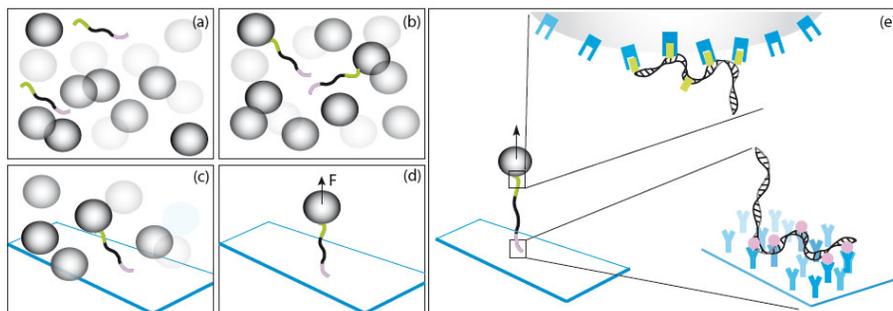


FIGURE 3.7 – Déroulement des expériences de pinces magnétiques.

cette raison le nombre de molécules analysées n'est pas aussi important que ce que l'on aurait souhaité pour pouvoir faire un traitement statistique avancé.

2 Elasticité rotationnelle des fibres

A. Bancaud et G. Wagner ont mis en évidence au cours de leur thèse que les fibres de nucléosomes reconstitués sur la séquence positionnante 5S possèdent une plasticité rotationnelle remarquable, beaucoup plus grande que celle de l'ADN. Nous allons détailler ci-dessous les résultats obtenus pour les fibres construites à partir de la séquence positionnante 601. Nous présenterons également l'effet de l'histone de liaison sur ce comportement. Puisque son incorporation s'accompagne d'une compaction de la fibre, les propriétés mécaniques de cette dernière pourraient en être modifiées.

2.1 Réponse extension-rotation de la fibre de nucléosomes

Grâce aux protocoles décrits précédemment, nous pouvons manipuler des fibres de nucléosomes et mesurer leurs longueurs en fonction de la rotation des aimants. Nous avons présenté à la page 97 le comportement de l'ADN nu soumis à une contrainte de rotation. Les fibres de nucléosomes présentent une réponse similaire, que nous pouvons comparer à celle de la molécule d'ADN nu correspondant en injectant de l'héparine à 0,1 mg/mL.

1 - Décalage topologique par rapport à l'ADN

Le figure 3.8 présente les réponses extension-rotation d'une fibre de nucléosomes et de l'ADN nu correspondant. On remarque que ces comportements sont différents en deux aspects : (i) une différence de longueur et (ii) une différence dans les centres de rotation².

La différence de longueur est le reflet de l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones et de la structure tridimensionnelle de la fibre. Le décalage des centres de rota-

2. On rappelle que le centre de rotation est la position en rotation des aimants pour laquelle la longueur de la molécule est maximale. Cette rotation correspond à une fibre non contrainte topologiquement.

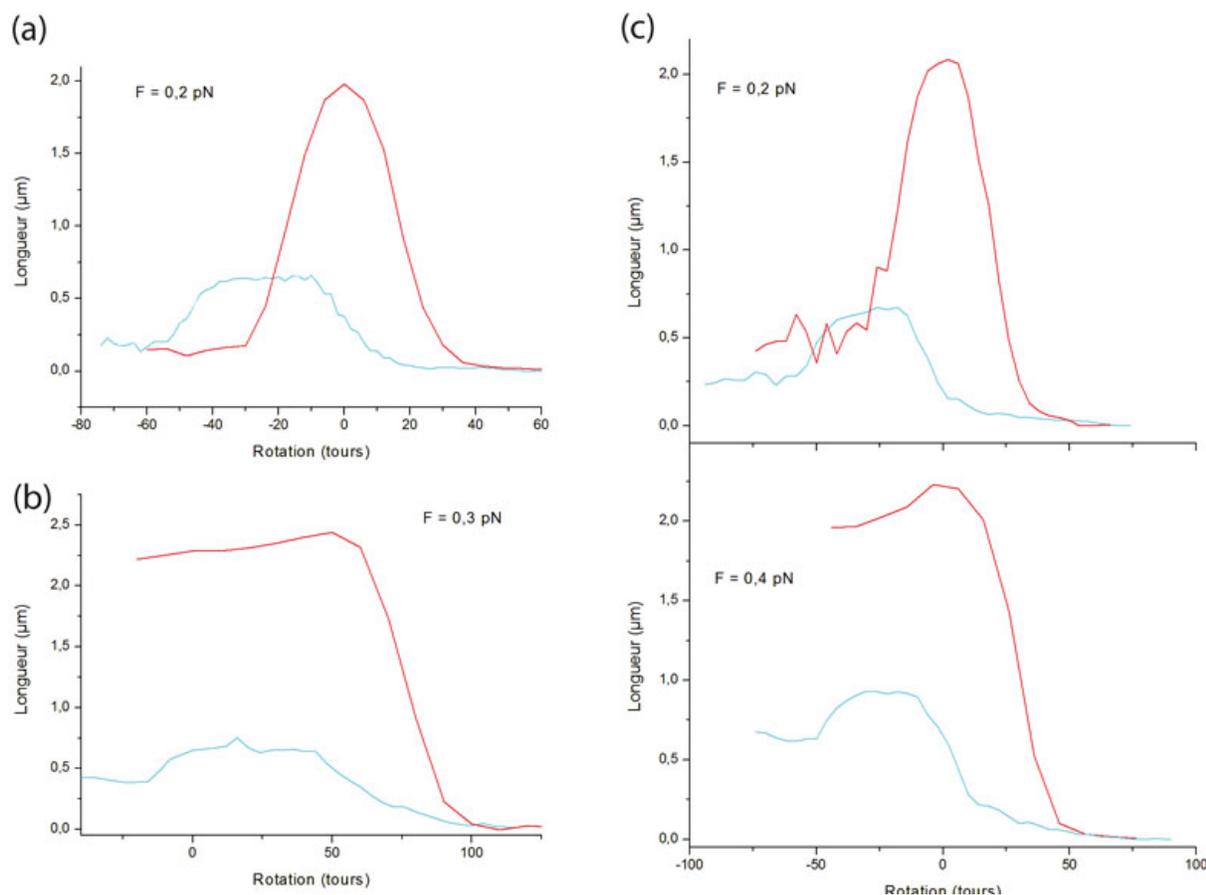


FIGURE 3.8 – Réponses *extension-versus-rotation* de plusieurs de nucléosomes et de leurs ADN nus correspondants. Les forces auxquelles ont été faits les enregistrements sont indiquées sur chaque figure, en (c) on peut voir la réponse d'une même fibre sous deux forces différentes. La mesure du décalage entre les centres de rotation des fibres et de leurs ADN nus correspondants donne approximativement accès au nombre de nucléosomes présents sur la fibre. Le nombre de nucléosomes sur chacune des fibres est de (a) 25, (b) 36 et (c) 30.

tion reflète la déformation topologique de l'ADN au sein de la fibre de nucléosomes. Plus il y a de nucléosomes, plus la compaction est importante et plus le décalage topologique est grand. Ces deux paramètres sont approximativement proportionnels au nombre de nucléosomes présents sur la molécule.

Revenons plus en détail sur le décalage des centres de rotation. Nous avons évoqué à la page 101 qu'une déformation topologique de l'ADN se traduisait par un tel décalage. Dans le cas de fibres de chromatine l'éjection des nucléosomes par l'héparine correspond uniquement à l'éjection des octamères d'histones, mais n'affecte en rien le nombre de vrillage Wr . L'ADN nu obtenu après rinçage est donc un ADN contraint topologiquement. Pour enlever cette contrainte il faut tourner les aimants de $-Wr$ tours, c'est-à-dire, dans le cas de nucléosomes, dans le sens positif. C'est pourquoi la courbe de la réponse extension-

rotation de l'ADN est décalée vers les tours positifs.

Si on considère que la valeur moyenne $\Delta Lk = -1$ est aussi valable pour les nucléosomes reconstitués sur la séquence positionnante 601 on peut connaître approximativement le nombre de nucléosomes présents sur la fibre par la mesure du décalage des centres de rotation.

On se trouve confronté tout de même à une difficulté lorsque l'on veut mesurer le décalage topologique. En effet on voit sur les courbes de la figure 3.8 que les sommets des courbes extension-rotation de la fibre de chromatine sont larges et plats, il est donc difficile de déterminer avec précision la position pour laquelle la fibre de chromatine n'est pas contrainte topologiquement. Cette difficulté est donc une source d'erreur dans l'estimation du nombre de nucléosomes présents sur la fibre.

2 - Equilibre conformationnel

a. Elasticité torsionnelle de la fibre

Il est intéressant de pouvoir comparer précisément le comportement de la chromatine avec celui de l'ADN nu. Les deux différences que nous venons d'évoquer ne donnent pas d'indications sur l'élasticité en rotation de la fibre de chromatine.

Nous avons évoqué à la page 100 que la réponse extension-rotation d'une molécule d'ADN peut être normalisée. Pour comparer l'élasticité des deux molécules, c'est-à-dire leur capacité à supporter les contraintes de rotation, il faut le faire pour une même longueur. Ainsi nous procédons à la renormalisation de la réponse de la molécule d'ADN pour voir son comportement si elle avait la même longueur que la fibre de chromatine. On peut voir sur la figure 3.9 la comparaison entre la fibre de nucléosomes et l'ADN nu correspondant renormalisé (le centre de rotation de l'ADN a été ramené à celui de la chromatine pour faciliter la comparaison).

On peut observer que la fibre de nucléosomes a toujours une longueur plus grande que l'ADN normalisé, quelle que soit la contrainte de rotation. Cela signifie qu'elle est moins sensible que l'ADN nu à la contrainte de rotation, on dit alors que la chromatine est plus *élastique en rotation*. En effet, la formation de plectonèmes nécessite l'application d'une déformation topologique plus importante, aussi bien du côté négatif que du côté positif.

b. Modélisation de la fibre

Depuis la thèse d'Aurélien Bancaud une collaboration a été initiée avec l'équipe de Jean-Marc Victor. Ce travail a permis le développement d'un modèle permettant d'expliquer le comportement en rotation des fibres de nucléosomes. Les détails de ce travail ont été publiés dans [Bancaud *et al.*, 2006] pour le cas des fibres reconstituées sur la séquence

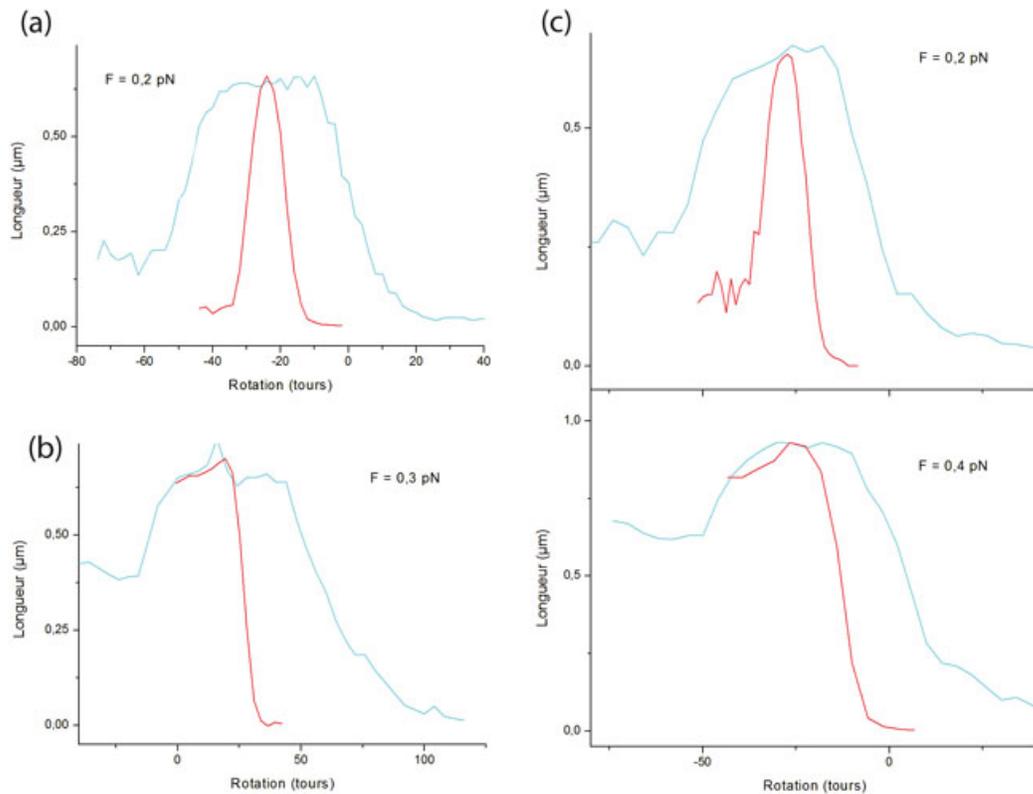


FIGURE 3.9 – Comparaison du comportement en rotation de fibres de nucléosomes et de leurs ADN correspondants normalisés. Fibres contenant (a) 26 nucléosomes, (b) 36 nucléosomes, (c) 30 nucléosomes (à deux forces différentes)

5S. Ce travail est tout à fait applicable à n'importe quelle séquence d'ADN et permet donc d'interpréter les résultats que nous venons d'évoquer et qui sont tout à fait similaires.

Le modèle Worm-Like Rope Le modèle Worm-Like Rope a été proposé pour décrire la réponse mécanique de l'ADN nu en rotation, mais nous avons vu que ce modèle a aussi été mis en application pour la description de la fibre de chromatine (voir page 85). Cette approche permet d'ajuster de manière phénoménologique le comportement rotationnel de la fibre de nucléosome et d'en déduire des paramètres macroscopiques. Toutefois cet ajustement ne permet pas de rendre compte des propriétés des nucléosomes présents sur la fibre et ne donne que des informations très générales sur les caractéristiques mécaniques de la molécule.

L'ajustement des données expérimentales obtenues avec la séquence 5S (Figure 3.10) donne accès à une longueur de persistance en courbure de ~ 28 nm et en rotation de ~ 5 nm [Bancaud *et al.*, 2006].

Ces valeurs sont à comparer avec celles de l'ADN qui sont de 50 nm pour la courbure et de 80 nm pour la rotation [Strick *et al.*, 1999]. Cela reflète à nouveau la plus grande

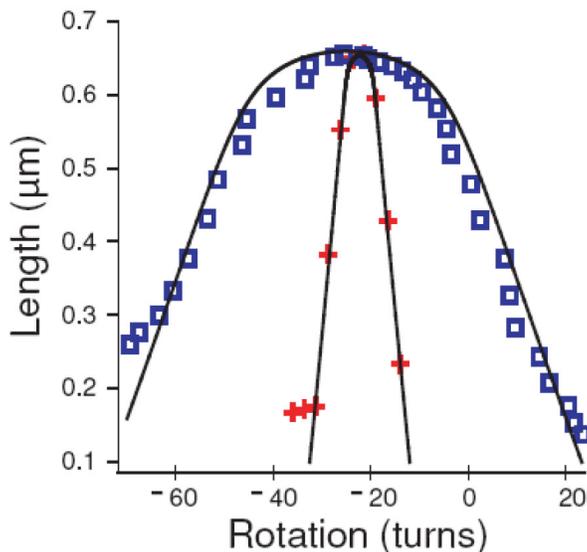


FIGURE 3.10 – Ajustement de la réponse mécanique en rotation de la fibre de nucléosomes (en bleu) et de son ADN nu correspondant (en rouge) par le modèle Worm-Like Rope. Cet ajustement donne accès aux longueurs de persistance en courbure et en rotation des molécules de séquence 5S. *D’après [Bancaud et al., 2006]*

élasticité de la fibre de chromatine par rapport à l’ADN et confirme donc l’interprétation des résultats expérimentaux.

Toutefois cet ajustement ne donne que des informations globales sur la fibre et ne décrit pas comment elle acquiert cette élasticité en rotation. Si l’on considère que l’ADN nucléosomal, qui est bloqué autour de l’octamère d’histones par les SHL, ne peut pas être déformé en torsion, seul les ADN de liaison et les ADN qui flanquent la séquence positionnante peuvent supporter la contrainte. Or ces parties de la molécule n’ont aucune raison d’avoir une longueur de persistance en rotation différente de celle de la molécule d’ADN nu. C’est pour expliquer cela qu’un modèle a été développé par J.M. Victor et Maria Barbi. Il prend en compte l’état topologique des nucléosomes individuels pour expliquer l’élasticité en rotation de la fibre.

Le modèle à trois états Nous avons vu à la page 101 que le nucléosome existe sous trois conformations topologiques différentes : l’état croisé négatif, l’état ouvert et l’état croisé positif. Il a été montré que la particule peut transiter entre ces états par rotation autour de son axe dyadique. Les différences d’énergie entre ces états ne sont que de quelques $k_B T$, on peut donc supposer que les nucléosomes de la fibre sont à l’équilibre thermodynamique entre ces trois états, à une force F , un couple Γ et une température T donnés.

Cela signifie que lorsque l’on tourne les aimants, le couple qui s’applique à la molécule induit la transition des nucléosomes vers la conformation qui minimise l’énergie totale de la fibre. Ainsi quand un surenroulement négatif est appliqué, l’état croisé négatif est favorisé.

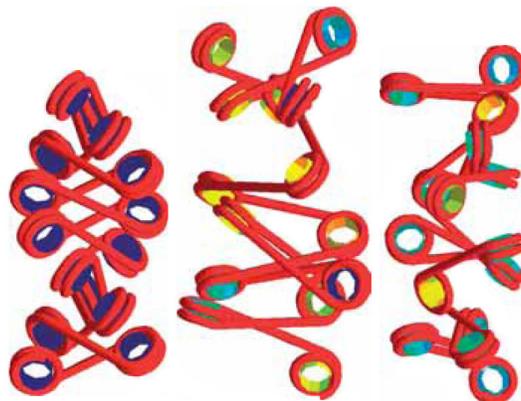


FIGURE 3.11 – Simulation par le modèle à deux angles de la fibre de nucléosomes. Les nucléosomes croisés négatifs sont en bleu, les nucléosomes ouverts en jaune et les nucléosomes croisés positifs en cyan. Les trois représentations de fibres correspondent à des déformations topologiques différentes.

Quand il s’agit d’un surenroulement positif les nucléosomes prennent préférentiellement la conformation positive. Les particules de la fibre transitent par l’état ouvert pour des déformations topologiques intermédiaires. Cela explique que pour un nombre de tours importants la fibre ne subit pas de changements de longueurs significatifs, puisque les contributions de chaque état à l’extension le long de l’axe de la force sont sensiblement les mêmes d’après le modèle à deux angles (Figure 3.11).

Une fois tous les nucléosomes dans l’état croisé négatif (resp. positif), la fibre subit la formation de plectonèmes qui sont à l’origine de la variation de longueur significative observée expérimentalement. Ces caractéristiques expliquent que l’on observe à nouveau des courbes en chapeau, mais plus large que celles obtenues pour l’ADN nu.

En déterminant le nombre de nucléosomes dans chaque état pour une contrainte de rotation R donnée, on peut ajuster la courbe extension-rotation. En effet en supposant que la longueur de la fibre correspond à la somme des contributions des fragments d’ADN nu et des nucléosomes dans les différents états, on peut déterminer la longueur totale de la molécule en fonction de la rotation imposée [Bancaud *et al.*, 2006]. La procédure consiste à déterminer le nombre de nucléosomes présents sur la fibre en utilisant la différence de longueur avec l’ADN correspondant aux centres de rotations. Cette estimation nécessite la prise en compte de la structure tridimensionnelle de la fibre. Cela est réalisé en utilisant le modèle à deux angles (page 83). On peut voir sur la figure 3.11 une simulation par ce modèle de la fibre pour plusieurs contraintes topologiques.

La minimisation de l’enthalpie libre de la fibre pour chaque rotation des aimants donne accès au nombre de nucléosomes dans chaque état. Ainsi une estimation de la longueur de la fibre pour les différentes rotations peut être estimée, ce qui donne accès à un ajustement des réponses extension-rotation.

Ce modèle a été validé dans les thèses d’Aurélien Bancaud et de Gaudeline Wagner. Il s’appliquait alors à la réponse d’une fibre de nucléosomes reconstituée sur la séquence

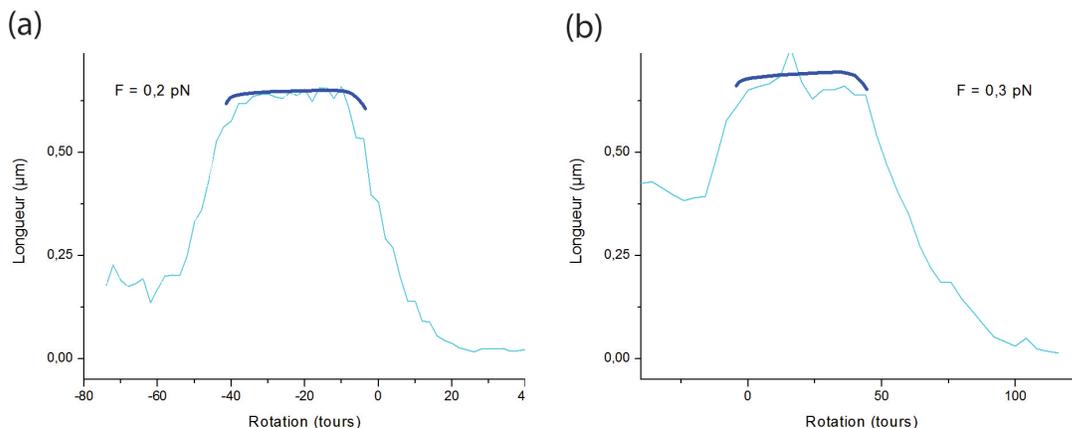


FIGURE 3.12 – Ajustements des sommets des réponses extension-rotation de deux fibres de nucléosomes. Cet ajustement donne accès au nombre de nucléosomes : (a) 25 nucléosomes, (b) 36 nucléosomes.

positionnante 5S, en tirant parti des données obtenues par la méthode des minicercles sur la topologie des états du nucléosome sur la cette séquence. Ces données topologiques précises nous font défaut en ce qui concerne la séquence 601. On a donc été contraint d'utiliser les ajustements des réponses extension-rotation de nos fibres de nucléosomes pour estimer ces paramètres. On peut voir sur la figure 3.12 un tel ajustement par ce modèle pour deux fibres différentes. L'application de ce modèle aux résultats expérimentaux donne :

- pour l'état croisé négatif $\Delta Lk_n = -1.4$
- pour l'état ouvert $\Delta Lk_o = -0.4$
- pour l'état croisé positif $\Delta Lk_p = -0.2$

Cette méthode donne aussi accès aux énergies des états. On détermine que dans ces conditions l'état le plus stable est l'état ouvert, à cause des répulsions électrostatiques entre les ADN à bas sel. L'état croisé négatif a une différence d'énergie de $0.7 k_B T$ avec l'état ouvert, et pour l'état croisé positif elle est de $2 k_B T$.

De plus, cette méthode permet de trouver la rotation pour laquelle la contrainte topologique de la fibre est nulle, c'est à dire le centre de rotation. Cette donnée, associée au nombre de nucléosomes, permet de déterminer plus précisément la déformation topologique moyenne par nucléosome. Dans le cas de la séquence 601 on trouve $\Delta Lk_{moy} = -0.7$. Pour la séquence 5S on trouvait une valeur de -0.8 . Cela peut être relié au fait que les nucléosomes reconstitués sur la séquence 601 se trouvent préférentiellement dans un état ouvert. Ce résultat n'est pas en contradiction avec les propriétés positionnantes de ces séquences car seules les 75 pb centrales ont été sélectionnées. L'état ouvert implique la rupture des $SHL = \pm 6.5$ qui sont en dehors de cette partie centrale.

Les expériences de pinces magnétiques constituent donc une alternative aux expériences de minicercles pour déterminer la topologie du nucléosome. Toutefois il convient d'être pru-

dent quant aux valeurs que l'on obtient car la variabilité des réponses entre les fibres est très grande, cela est inhérent au fait que la molécule unique sondée est soumise à des interactions non spécifiques non contrôlées. De plus la présence d'un grand nombre de nucléosomes sur une fibre implique également une plus grande instabilité du signal obtenu. En effet l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones est très dynamique, la respiration de l'ADN nucléosomal conduit à des variations de longueur de la fibre (voir page 144). Ces perturbations modifient l'allure du sommet du chapeau des courbes extension-rotation, et cela a donc une incidence sur la précision des paramètres obtenus par l'ajustement. Une autre source d'incertitudes réside dans le fait que le nombre de nucléosomes sur la fibre doit être déterminé pour chaque expérience, en outre ce nombre de particules et leur distribution le long de la molécule ont une influence sur l'organisation tridimensionnelle de la fibre.

Il est important de noter que ce modèle ne prend en compte que le sommet des courbes en chapeau et ne s'applique pas dès que la formation des plectonèmes débute. Nous verrons par la suite un modèle qui parvient à prendre en compte tous les régimes de la réponse extension-rotation de la fibre de chromatine (voir page 136). La pente de la courbe dans ce régime plectonémique est d'environ 25 nm/tour, alors que pour l'ADN nu elle est de l'ordre d'environ 90 nm. Cette différence reflète un changement de longueur de persistance³, et reflète aussi, très certainement, une organisation tridimensionnelle particulière des plectonèmes de nucléosomes. En effet, il est possible que la courbure de l'ADN autour des nucléosomes induise le flambage de la molécule. Les plectonèmes formés seraient alors différents de ceux établis au sein d'une molécule d'ADN nu.

2.2 Réponse extension-rotation de la fibre de chromatosomes

La préparation des fibres de chromatosomes nous permet de mettre en évidence l'influence de l'histone de liaison dans les propriétés mécaniques de la fibre. On a vu que l'interaction entre H5 et le nucléosome conduit à une compaction de la fibre (Figure 3.4). Cette compaction et le fait de verrouiller l'angle d'entrée/sortie se font-ils au détriment de l'élasticité en rotation de la fibre de chromatosomes ?

1 - Un autre équilibre conformationnel

Les comportements en rotation de plusieurs fibres de chromatosomes sont présentés sur la figure 3.13. On peut y voir la comparaison avec l'ADN nu correspondant (à gauche) et avec ce même ADN renormalisé (à droite). On peut remarquer que les réponses des fibres de chromatosomes sont elles aussi des courbes en chapeau. On observe à nouveau que la fibre de chromatosomes conserve la même longueur sur une grande gamme de rotation. Cela indique donc que ce type de fibre est aussi plus élastique en rotation que ne l'est l'ADN nu.

3. La taille des boucles formées à l'intérieur des plectonèmes dépend de la longueur de persistance.

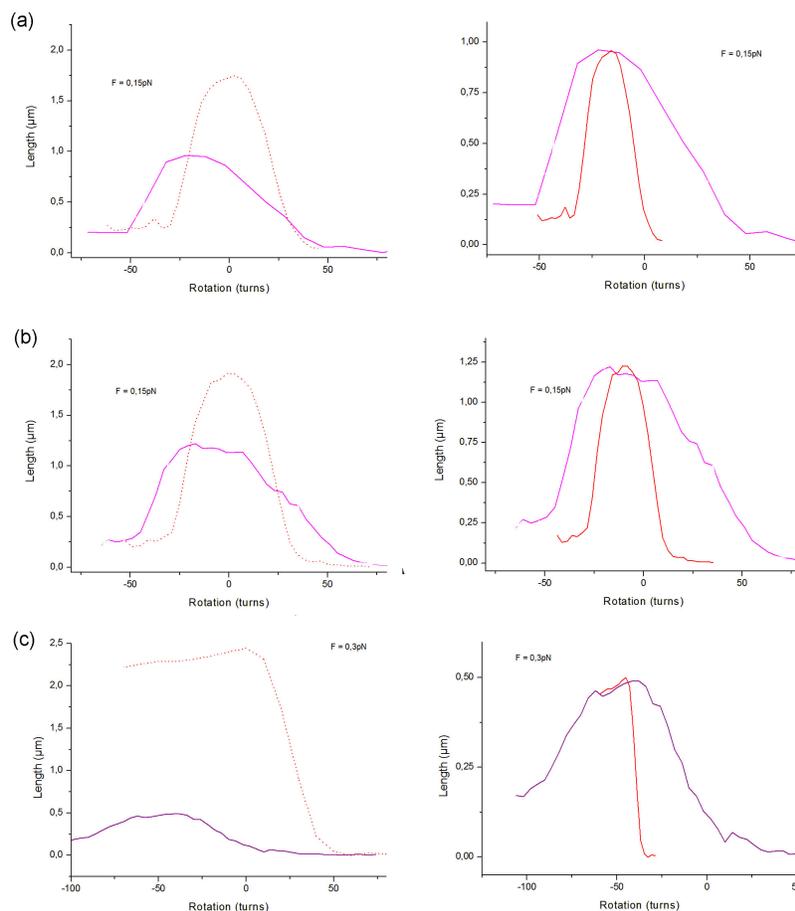


FIGURE 3.13 – Réponse de trois fibres de chromosomes à la contrainte de rotation. A gauche, comparaison avec l’ADN nu correspondant et à droite, comparaison avec cet ADN renormalisé (les centres de rotation ont été superposés pour faciliter la comparaison). Le nombre de chromosomes dans les fibres est de (a) 10, (b) 20, (c) 38.

Nous avons vu dans les pages précédentes que l’élasticité de la fibre de nucléosomes s’explique par un équilibre dynamique entre les états topologiques des nucléosomes. Le modèle à trois états permettait de modéliser ce comportement. Or nous avons vu que les chromosomes n’existent eux que sous deux états topologiques distincts, les états croisés négatifs et positifs. En imposant une pénalité énergétique très forte à la conformation ouverte le modèle à trois états peut être appliqué à la fibre de chromosomes. Un tel ajustement est présenté sur la figure 3.14. Il conduit aux états topologiques suivants :

- pour l’état croisé négatif $\Delta Lk_n = -1.4$
- pour l’état croisé positif $\Delta Lk_p = -0.2$

Même quand l’histone de liaison bloque les ADN entrant et sortant, la particule peut adapter sa topologie à la déformation topologique imposée, prévenant ainsi la formation de plectonèmes qui induiraient un raccourcissement extensif de la molécule. Les expériences de minicercles sur les chromosomes avaient elles aussi montré la possibilité du passage

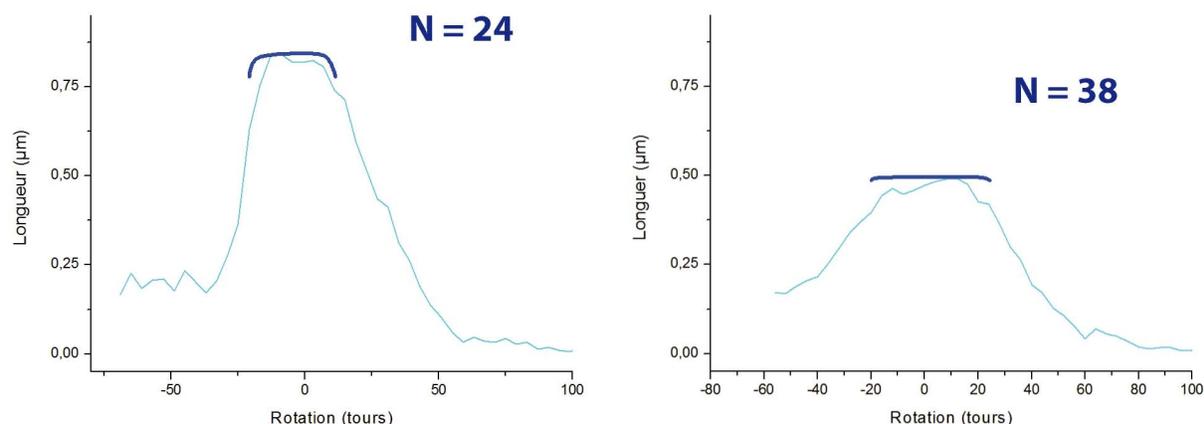


FIGURE 3.14 – Ajustements de la réponse extension-rotation de deux fibres de chromosomes.

entre les états croisés négatifs et croisés positifs par rotation autour de l'axe dyadique. Encore une fois, la différence d'énergie entre ces deux états a été estimée à quelques $k_B T$ (Figure 2.28).

Comme précédemment le régime plectonémique débute quand les chromosomes sont tous dans l'état positif (resp. négatif). Cette fois les pentes des régimes plectonémiques ne sont pas les mêmes lors de surenroulements négatifs et de surenroulements positifs. La pente côté négatif est d'environ 30 nm/tour, alors que la pente côté positif est moins forte, toujours inférieure à 20 nm/tour. Cette différence est difficile à interpréter car elle peut trouver son origine soit dans un changement des propriétés mécaniques de la fibre suivant l'état topologique des particules, soit dans un changement de la dynamique de passage entre les deux états. En effet, si le régime plectonémique débute avant que tous les chromosomes ne soient dans l'état positif, on peut imaginer que cette transition se fasse en même temps que la formation des plectonèmes, ce qui aurait pour conséquence de diminuer la pente. Il est pour l'heure impossible de distinguer ces deux cas.

2 - Comparaison entre la fibre avec et sans l'histone de liaison

Nous venons de voir que le régime plectonémique du côté positif de la courbe en chapeau est différent pour la fibre de chromosomes et pour la fibre de nucléosomes. Ce n'est pas la seule différence existante entre ces deux molécules. Pour obtenir une meilleure comparaison, avant l'éjection totale des chromosomes (pour obtenir la référence ADN), nous injectons une solution diluée d'héparine afin de n'enlever que les histones de liaison (Page 117). Ainsi il est possible de visualiser directement l'effet de l'histone de liaison. La figure 3.15 montre les comparaisons avec/sans H5 pour trois fibres différentes comportant, de gauche à droite, 10, 20 et 38 chromosomes.

On peut observer que la dissociation de l'histone de liaison s'accompagne d'un allongement qui est proportionnel au nombre de chromosomes présents sur la fibre. C'est le reflet

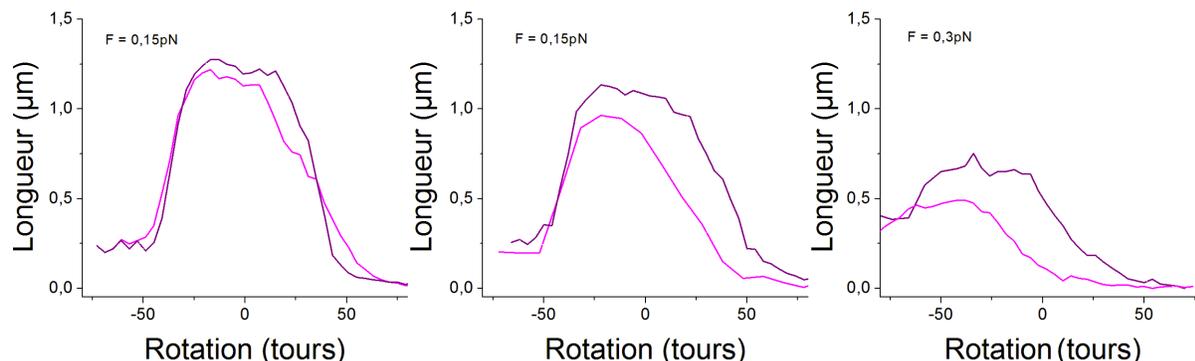


FIGURE 3.15 – Réponse d’une fibre de chromosomes avant (en rose) et après (en violet) éjection des histones de liaison par l’injection d’une solution diluée d’héparine. De gauche à droite les fibres contiennent 10, 20 et 38 particules. On peut observer l’allongement de longueur successif au départ de H5 et également un décalage topologique faible vers les tours positifs, qui peut être associé à un changement dans la distribution entre les différents états.

de la compaction déjà observée sur les images de microscopie électronique (Figure 3.4). La différence de longueur observée prend en compte l’ADN nucléosomal supplémentaire (environ 30 pb) engagé dans le chromosome et la différence d’organisation tridimensionnelle de la fibre, due aux changements des angles d’entrée/sortie (angle α dans le modèle à deux angles, page 83). On trouve une variation de longueur de 6 ± 2 nm par particule.

Notons que cette valeur peut être perturbée par la perte d’un nucléosome pendant l’injection puis le rinçage de la solution d’héparine. Lorsque le rinçage à l’héparine diluée est effectué sur une fibre de nucléosomes, on a parfois observé la perte d’un nucléosome, il est difficile de savoir si cela se produit à cause de l’héparine ou bien seulement à cause de la contrainte de cisaillement due au flux à l’intérieur du canal puisque l’injection du tampon d’étude a lui aussi parfois provoqué la perte d’un nucléosome.

De la même façon on peut quantifier un décalage topologique faible par nucléosome lors de la perte de l’histone de liaison, on trouve 0.4 ± 0.2 tour par nucléosome. Ce décalage s’explique par une répartition différente des états topologiques entre le nucléosome et le chromosome. Cela peut conduire à une déformation topologique moyenne par particule différente.

A nouveau cette valeur est sensible à la perte d’une particule entière, qui implique un décalage topologique de la réponse de la fibre vers les tours positifs.

L’ajustement des réponses par le modèle précédent permet de déterminer le nombre de particules présentes sur les fibres dans le cas où l’on fixe les valeurs des états topologiques. Il est donc possible de mettre en évidence la perte de nucléosome au cours du rinçage par l’héparine diluée. On peut voir sur le figure 3.16 les ajustements obtenus avant (en bleu) et après (en cyan) l’injection d’héparine diluée. Ce résultat met en évidence que la fibre de nucléosomes porte deux particules de moins que la fibre de chromosomes.

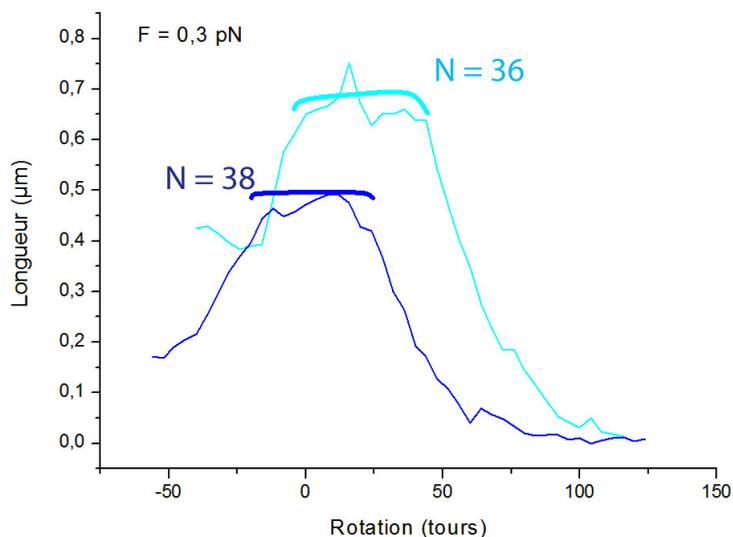


FIGURE 3.16 – Ajustements des chapeaux de la réponse extension-rotation d'une fibre avec l'histone de liaison (en bleu) et de la même fibre après éjection de l'histone de liaison (en cyan). Ces ajustements indiquent que lors du rinçage deux nucléosomes ont été perdus.

Conclusions

L'analyse des réponses extension-rotation des fibres de nucléosomes et de chromatosomes reconstitués sur la séquence positionnante 601 nous permet de conclure à nouveau à une élasticité plus grande de la chromatine par rapport à l'ADN nu. En adaptant leurs topologies à la contrainte de surenroulement les particules préviennent la formation de plectonèmes au sein de la fibre. En effet, le passage d'une conformation à une autre nécessite la rotation de la particule autour de son axe dyadique, c'est donc ce changement de conformation qui a lieu avant que ne se produise l'instabilité de flambage (Figure 3.17).

De cette façon, la fibre de chromatine soumise à une contrainte de surenroulement peut maintenir une conformation étendue, ce que ne pourrait pas faire une molécule d'ADN nu. **Même l'accès à une compaction plus forte, par l'interaction avec l'histone de liaison H5, ne prive pas la chromatine de son élasticité.**

3 Transition structurale des nucléosomes et chromatosomes

Nous nous sommes intéressés dans la partie précédente au comportement extension-rotation des fibres de chromatine avec et sans H5. Nous avons présenté leur comportement dans le cas de déformations topologiques de faibles amplitudes. L'application d'un fort surenroulement positif à une fibre de chromatine conduit à l'apparition d'un comportement

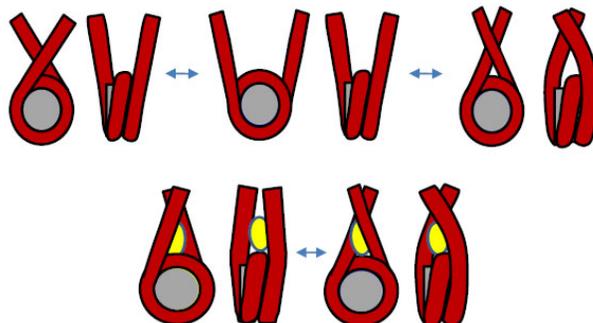


FIGURE 3.17 – Transition entre les états topologiques du nucléosome (a) et du chromatosome (b) qui explique la plus grande élasticité en rotation de la fibre de chromatine par rapport à l’ADN nu.

	5S		601	
	-H5	+H5	-H5	+H5
Croisé négatif	$\Delta Lk_n = -1.4$ $\Delta G_n = -1.7k_B T$	$\Delta Lk_n = -1.76$ $\Delta G_n = 0k_B T$	$\Delta Lk_n = -1.4$ $\Delta G_n = -1.7k_B T$	$\Delta Lk_n = -1.4$ $\Delta G_n = 0k_B T$
Ouvert	$\Delta Lk_o = -0.7$ $\Delta G = 0k_B T$		$\Delta Lk_o = -0.4$ $\Delta G = 0k_B T$	
Croisé positif	$\Delta Lk_p = -0.4$ $\Delta G = 2.2k_B T$	$\Delta Lk_p = -0.16$ $\Delta G = 1.6k_B T$	$\Delta Lk_p = -0.2$ $\Delta G = 2k_B T$	$\Delta Lk_p = -0.2$ $\Delta G = 1.3k_B T$

TABLE 3.1 – Tableau récapitulatif des déformations topologiques et des énergies des états des nucléosomes et chromatosomes reconstitués sur les séquences positionnantes 5S et 601. Les données sur les nucléosomes 5S ont été obtenues par la méthode des minicerclles [Sivolob et Prunell, 2004].

propre à la chromatine, caractérisé par l’apparition d’un cycle d’hystérésis.

3.1 Comportement hystérétique de la fibre de nucléosomes

La réponse extension-rotation de la fibre de nucléosomes est modifiée après application d’un fort surenroulement positif. La courbe obtenue lors de la diminution de la contrainte (des tours positifs vers les tours négatifs) ne se superpose pas à celle obtenue lors de l’augmentation de la contrainte (des tours négatifs vers les tours positifs). Dans ces conditions la réponse de la fibre décrit une hystérésis, comme on peut le voir sur la figure 3.18.

Ce cycle d’hystérésis est reproductible, cela signifie que la modification subie par la fibre sous forte contrainte positive est réversible.

Ce comportement a déjà été mis en évidence pour les fibres reconstituées sur la séquence positionnante 5S par A. Bancaud et G. Wagner [Bancaud *et al.*, 2007], et aussi sur de la chromatine reconstituée sur un fragment d’ADN non positionnant [Praly, 2009]. Cela prouve que ce comportement est accessible à tous les types de fibres et que ce n’est pas la séquence d’ADN ni l’organisation tridimensionnelle⁴ qui en sont responsables.

4. Qui n’est pas la même entre ces trois types de fibres.

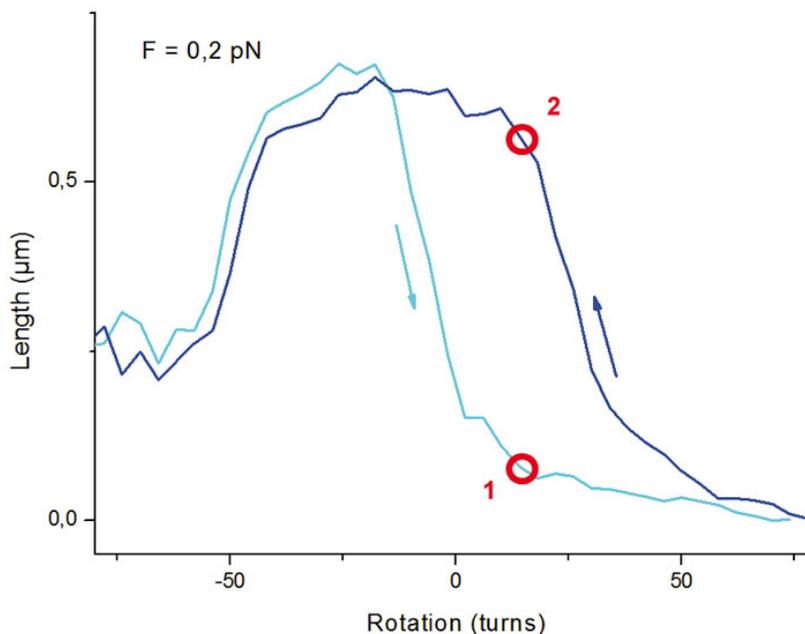


FIGURE 3.18 – Cycles d’hystérésis d’une fibre de nucléosomes soumise à un fort surenroulement positif. On voit que sur la courbe retour la fibre est plus longue que sur la courbe aller (des tours négatifs vers les tours positifs). La contrainte de surenroulement positive a été piégée par la fibre sous une autre forme que le vrillage ce qui lui permet de se trouver dans une configuration étendue.

Que signifie d’un point de vue mécanique ce cycle d’hystérésis ?

Nous nommerons *courbe aller* la réponse obtenue quand les aimants sont tournés des rotations négatives vers les rotations positives, et *courbe retour* le chemin inverse. Le sens de parcours est indiqué par des flèches sur les figures.

Pour une même rotation imposée, par exemple +20 sur la figure 3.18, la longueur au retour (point 2) de la fibre est plus grande qu’à l’aller (point 1), lors duquel elle était proche de zéro.

La fibre de la courbe retour a donc piégé du surenroulement positif sous une autre forme que des boucles de plectonèmes, ce qui lui confère une longueur plus grande.

La figure 3.19 présente les hystérésis décrites par plusieurs fibres comportant un nombre différent de nucléosomes. On peut voir que la largeur du cycle dépend du nombre de particules sur la fibre. La figure 3.20 présente la largeur de l’hystérésis en fonction du décalage topologique entre la fibre de nucléosomes et l’ADN nu correspondant. On trouve en moyenne une largeur de 1 tour par nucléosome (à comparer à 1.3 tour par nucléosome pour les fibres 5S [Bancaud *et al.*, 2007]). Cela traduit donc que c’est bien au niveau nucléosomal que se produit la capture des tours positifs. La particule se trouve alors dans un état

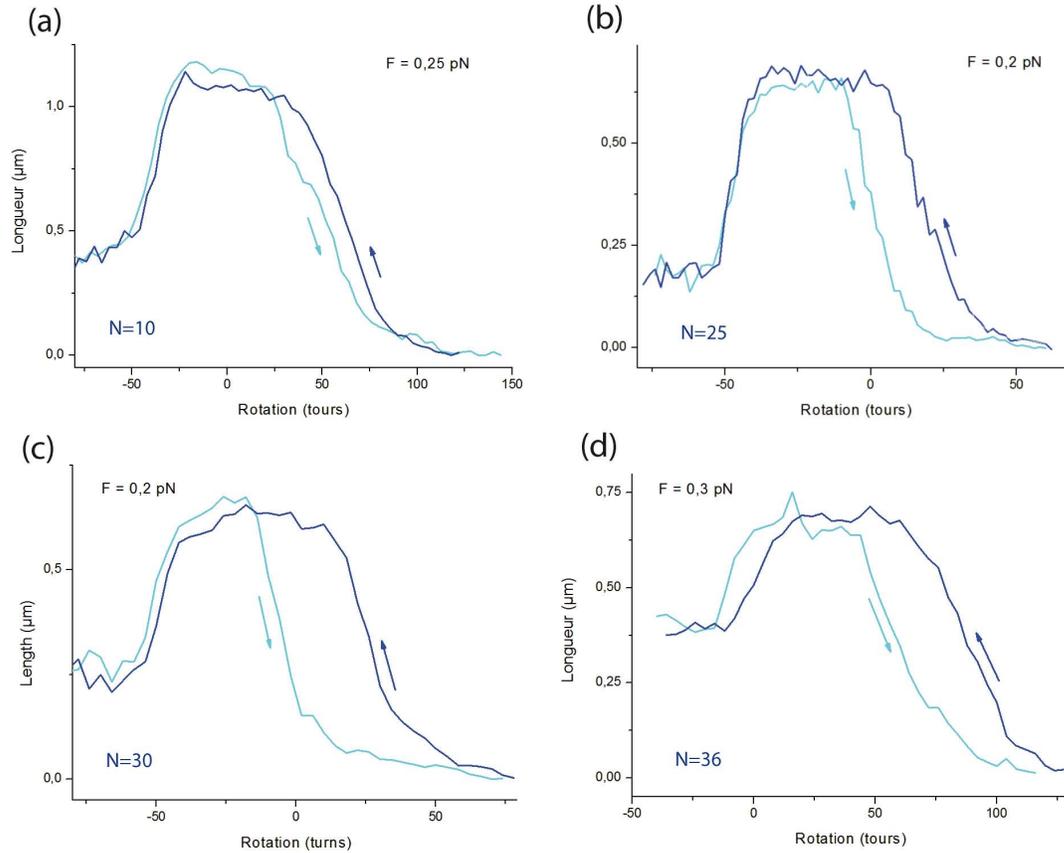


FIGURE 3.19 – Cycles d’hystérésis de plusieurs fibres de nucléosomes soumises à un fort surenroulement positif. on observe la dépendance de la largeur de l’hystérésis avec le nombre de nucléosomes présents sur la fibre. Le nombre de nucléosomes N et la force F sont indiqués sur les courbes.

altéré⁵ de topologie positive.

En effet, à l’aller, dans le régime plectonémique côté positif, les nucléosomes sont dans la conformation croisée positive, qui a pour déformation topologique $\Delta Lk_p = -0.2$, donc si le nucléosome altéré piège environ 1 tour positif dans sa structure, sa déformation topologique sera de l’ordre de $\Delta Lk_{altr} = +0.8$.

Nous avons vu (voir page 106) que le tétrasome pouvait exister sous la forme d’une particule à topologie positive [Hamiche *et al.*, 1996a]. Le passage de la conformation gauche à la conformation droite, appelé *transition chirale du tétrasome* implique une variation de la déformation topologique de l’ADN de $+1.28$ tour pour la séquence 5S.

Une telle transition chirale au niveau du nucléosome entier pourrait être à l’origine du comportement hystérétique observé. Gaudeline Wagner a montré que les dimères sont bien impliqués dans l’observation de l’hystérésis. L’état altéré est donc un nucléosome dans

5. Par comparaison à sa structure canonique.

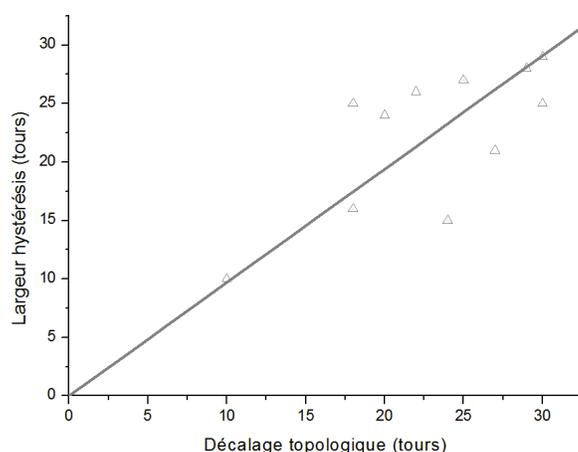


FIGURE 3.20 – Représentation de la largeur de l'hystérésis en fonction du décalage topologique entre la fibre de nucléosomes et l'ADN nu correspondant. La droite tracée passe par (0,0) et a une pente de +1. Malgré une variabilité importante on peut voir une relation de proportionnalité approximative entre ces deux paramètres.

lequel l'ADN est enroulé en une superhélice droite. Cette particule a été nommée *réversome*.

Le mécanisme proposé pour sa formation est le suivant : lorsque le couple exercé sur la fibre est suffisant, les dimères sont déstabilisés. Ceci permet aux tétrasomes d'effectuer leur transition chirale sous la contrainte. Ensuite les dimères interagissent au sein de la particule de façon à ce que le réversome soit stabilisé. C'est la raison de l'observation d'une hystérésis. On peut voir sur la figure 3.21 une structure possible de la particule ainsi qu'une proposition de mécanisme de la transition chirale du nucléosome.

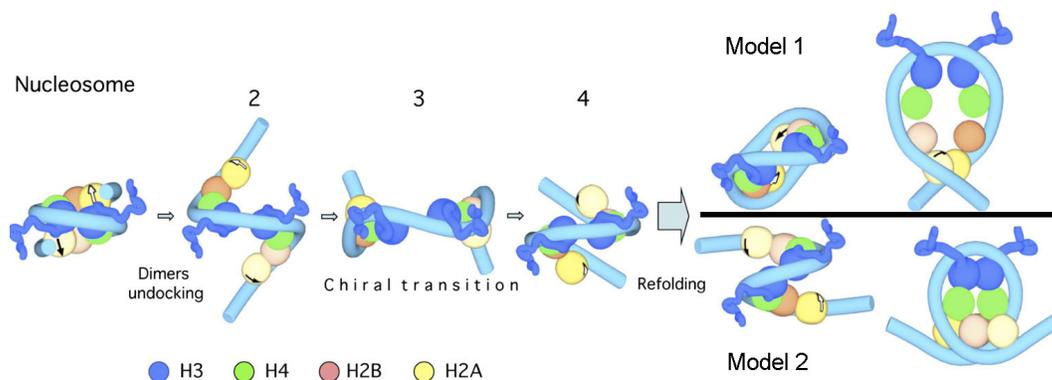


FIGURE 3.21 – Modèle de mécanisme de transition chirale du nucléosome. Les dimères sont d'abord déstabilisés avant que le tétrasome n'adopte sa conformation droite, ensuite le réversome est stabilisé par l'interaction des dimères avec le tétrasome droit. Toutefois aucun site de docking des dimères n'a pu être mis en évidence sur les nouvelles faces exposées par les histones H3 et H4.

Energie et couple La transition structurale que nous observons sur les fibres de nucléosomes intervient lorsque la contrainte de surenroulement positif est suffisamment grande. La barrière d'énergie qui a été estimée pour les nucléosomes reconstitués sur la séquence 5S est de l'ordre de $30 k_B T$ en TE et de l'ordre de $10 k_B T$ en présence de 50 mM NaCl. Or nous avons pu observer sur la séquence 601 que les réversomes se forment pour un degré de surenroulement similaire à celui nécessaire pour les réversomes sur la séquence 5S. Cela nous indique que les barrières d'énergie estimées dans [Bancaud *et al.*, 2007] sont encore valables dans nos conditions.

De la même manière l'énergie de l'état réversible ne doit pas être très différente de celle estimée pour la séquence 5S. On considère que cette particule a une énergie de l'ordre de $10 k_B T$ (en TE) par rapport à l'état ouvert qui est l'état de plus faible énergie dans ces conditions.

Ce comportement montre encore une fois la très grande adaptabilité de la chromatine face à une contrainte de torsion. L'application de surenroulement sur la fibre induit une série de changements de conformations qui peut aller jusqu'à une réorganisation complète de l'enroulement de l'ADN nucléosomal. Ces transitions impliquent des variations d'énergie qui ne sont de l'ordre que de quelques $k_B T$, donc dans une gamme qui n'exclut pas du tout la possibilité de cette plasticité dans le contexte physiologique.

3.2 Comportement hystérétique de la fibre de chromatosomes

Les fibres de chromatosomes ont elles aussi été soumises à un fort surenroulement positif, afin de voir si la présence de l'histone de liaison prévenait la formation du réversible. En effet H5 bloque ensemble les ADN entrant et sortant, ce qui peut avoir pour effet de prévenir la transition chirale du nucléosome. Or, comme on peut le voir sur la figure 3.22, le cycle d'hystérésis caractéristique de la formation du réversible est encore présent dans la réponse extension-rotation de la fibre de chromatosomes.

Cela signifie donc que les chromatosomes présents sur la fibre peuvent encore subir la transition chirale. Le modèle que nous avons présenté précédemment implique un large réarrangement de l'ADN nucléosomal qui nécessite également que les ADN entrant et sortant des chromatosomes soient libres l'un par rapport à l'autre. On peut donc imaginer que l'interaction entre les deux brins, médiée par H5, soit rompue, pour permettre la formation du réversible. Toutefois le cycle d'hystérésis est reproductible, cela signifie donc que les histones de liaison ne sont pas perdues après la première application d'un fort surenroulement positif.

Nous proposons que pour un couple appliqué suffisant, le lien entre l'histone de liaison et l'un des ADN soit rompu. Les conditions ioniques particulières permettent à la protéine de rester accrocher à l'autre brin. Ainsi, le verrou formé par H5 est levé et la transition chirale peut se produire. Après diminution de la contrainte et retour dans la conformation canonique, l'interaction conventionnelle entre la particule et l'histone de liaison est rétablie.

La largeur de l'hystérésis pour les fibres de chromatosomes est de l'ordre de +1 tour par

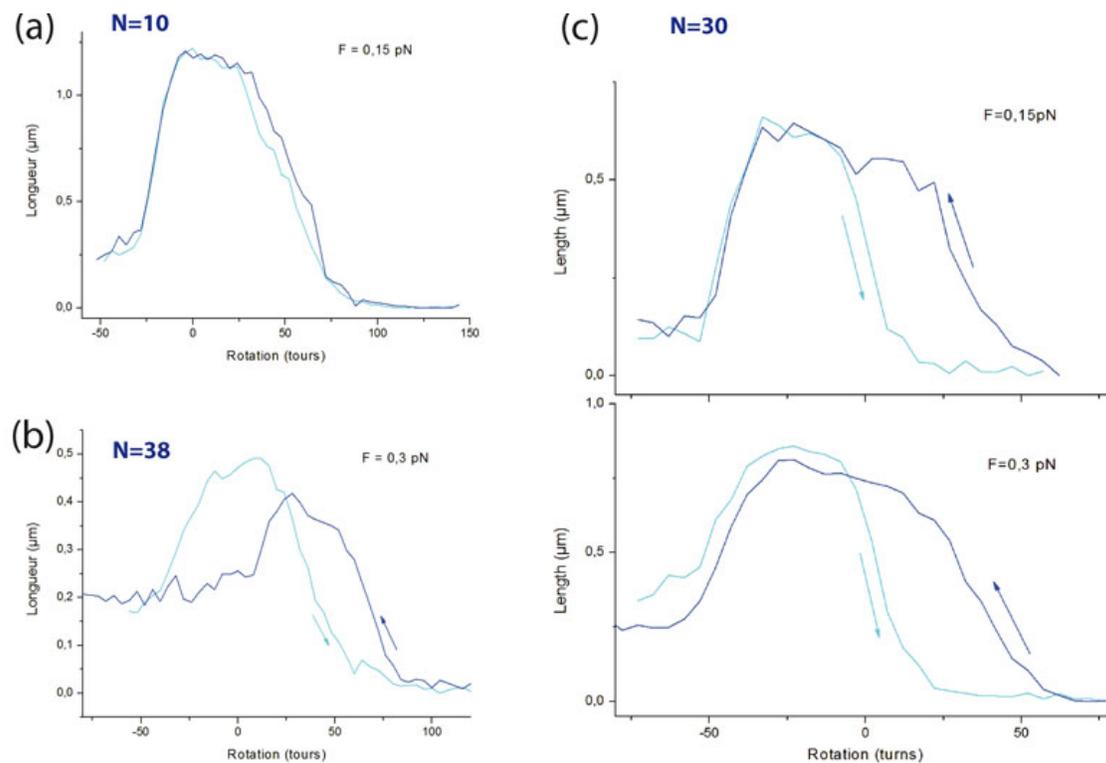


FIGURE 3.22 – Cycles d’hystérésis de plusieurs fibres de chromosomes. Le nombre de nucléosomes N et la force F sont indiqués sur les courbes.

chromosome. Cette valeur est semblable à celle obtenue pour les fibres de nucléosomes, cela suggère donc que l’histone de liaison n’a pas une influence majeure sur le réversible, dans ces conditions la particule obtenue pourrait être la même, ou très proche, qu’elle soit formée à partir d’un nucléosome ou à partir d’un chromosome.

A nouveau, même si l’histone de liaison permet à la chromatine d’accéder à une compaction supérieure, cela ne prive pas le substrat de son élasticité en rotation caractéristique, qui fait de la chromatine un substrat capable de supporter d’importantes déformations topologiques. Nous allons voir à la page 138 les conséquences que cette plasticité peut avoir pour la chromatine au sein des noyaux. Mais tout d’abord nous allons présenter une modélisation de ce comportement hystérétique réalisé par M. Barbi J.M. Victor.

3.3 Modèle de ce comportement hystérétique

Les expériences de pinces magnétiques que nous venons de décrire ont permis de mettre en évidence que les fibres de chromatine possèdent une élasticité torsionnelle beaucoup plus importante que celle de l’ADN. Cette propriété s’explique par la faculté que possèdent nucléosomes et chromosomes à s’adapter à la contrainte topologique. D’une part en adaptant l’état de croisement de leurs ADN entrants et sortants, et d’autre part en subissant

une transition chirale qui conduit à une particule dans laquelle l'ADN est enroulé en une superhélice droite.

Maria Barbi et Jean-Marc Victor ont développé un modèle qui permet l'ajustement des réponses complètes extension-rotation des fibres de chromatine. Nous avons déjà discuté de l'ajustement des sommets des courbes en chapeau, nous allons maintenant voir que même l'hystérésis peut être pris en compte par cette approche.

Ce modèle est basé sur les mêmes considérations que celui décrivant le sommet des courbes en chapeau des fibres de chromatine. Les nucléosomes ou chromatosomes des fibres sont en équilibre thermodynamique entre les états topologiques accessibles à la force F et au couple Γ appliqués. La force est connue (position verticale des aimants) mais le couple lui n'est pas accessible expérimentalement. De plus il varie en fonction de la contrainte topologique appliquée, il est donc nécessaire de l'estimer pour chaque rotation. Cela est possible par la minimisation de l'enthalpie libre de la fibre et l'expression de la déformation topologique de l'ADN au sein de la molécule. Le détail de ces équations est donné en annexe.

Le nombre de réversomes présents sur la fibre est estimé différemment. En effet, le passage de nucléosome à réversome est caractérisé par une barrière cinétique importante, cette transition est donc sous contrôle cinétique. Le nombre de réversomes est donc calculé par intégration de l'équation cinétique gouvernant leur formation à partir des états croisés positifs.

Pour de faibles déformations topologiques (avant la formation de plectonèmes) les particules transitent entre les états croisés négatifs, ouverts et croisés positifs lorsque la rotation est augmentée. Le nombre de nucléosome dans chaque état est estimé pour chaque rotation imposée. Dès lors que toutes les particules sont dans l'état croisé positif le couple augmente et atteint le couple critique de flambage (voir page 99) ce qui se traduit par l'apparition de plectonèmes. Le raccourcissement est alors supposé être linéaire avec la rotation et se dérouler à couple constant. Une fois la formation de plectonèmes complète, c'est à dire que la bille en contact avec la surface de la lamelle de verre, le couple augmente de façon importante.

L'augmentation du couple permet de dépasser la barrière d'énergie relative à la formation des réversomes. Le nombre de ces derniers est initialement fixé à zéro, l'intégration de l'équation cinétique donne donc accès au nombre de particules qui se forment une fois le couple suffisamment élevé. Cette intégration est effectuée sur une durée caractéristique de l'acquisition qui est de l'ordre de quelques secondes. Au retour, c'est le blocage cinétique qui est à l'origine de l'observation de l'hystérésis. Si l'on attend suffisamment longtemps les nucléosomes croisés positifs sont reformés à partir des réversomes.

La connaissance du nombre de particules dans chaque état donne accès à l'extension de la fibre à topologie imposée. C'est ce qui permet la modélisation des courbes en chapeau hystérétique comme on peut le voir sur la figure 3.23.

L'évolution du couple au cours du cycle est également présentée. Le fait qu'il ne soit pas constant au cours des régimes plectonémiques reflète le fait que lors du vrillage de l'ADN il

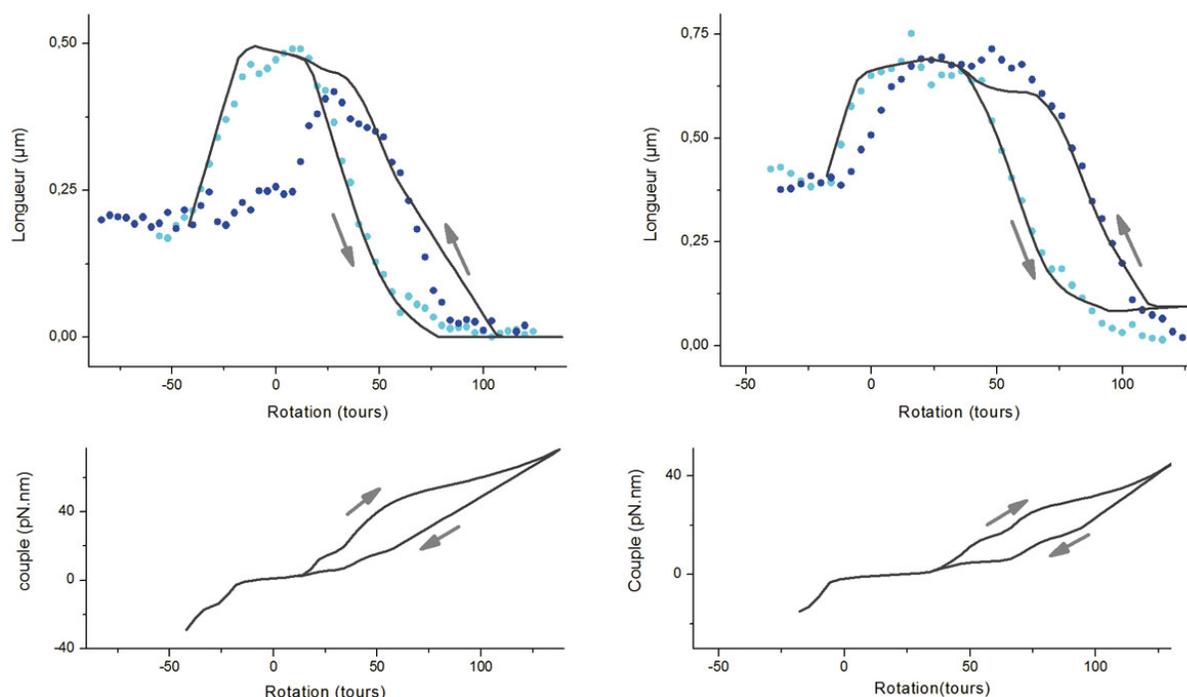


FIGURE 3.23 – Modèle des comportements hystériques des fibres de chromatine. L'estimation du nombre de particules dans chaque état (croisé positif, ouvert, croisé négatif et réversible) permet d'ajuster les réponses extension-rotation des fibres de chromatosomes (à gauche) et de nucléosomes (à droite). Les données expérimentales sont indiquées par les points cyans (courbe aller) et bleus (courbe retour). La réponse hystérique est reproduite par ces fits (tracé gris). En bas on peut voir l'évolution du couple au cours de l'expérience. Le couple présente lui aussi une hystérésis qui traduit le fait que le passage à l'état réversible relâche la contrainte appliquée sur la fibre.

se produit concomitamment des événements de transition entre les états du nucléosome.

En outre, on observe également que le couple décrit lui aussi une hystérésis entre les courbes aller et retour. Cela traduit le fait que le passage à l'état réversible diminue la contrainte appliquée sur la fibre. Au retour, pour une même déformation topologique, le couple exercé sur la fibre est plus faible qu'à l'aller.

Cette approche permet donc de modéliser les comportements en rotation des fibres de nucléosomes et de chromatosomes en prenant en compte l'existence du réversible, à l'origine de l'hystérésis observée au cours des expériences de pinces magnétiques.

4 Pertinence biologique

La chromatine est le substrat dans lequel l'ADN est compacté dans le noyau des cellules eucaryotes. L'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones est la première étape de cette condensation. Les résultats que nous venons de présenter mettent en évidence que la fibre de chromatine est plus élastique en torsion que l'ADN, même sous la forme

compacte contenant l'histone de liaison.

La chromatine est moins sensible aux contraintes de torsion que ne l'est l'ADN.

Ces propriétés prennent leur origine dans les propriétés dynamiques des nucléosomes individuels. Les énergies mises en jeu dans les transitions que nous avons évoquées sont de l'ordre de quelques $k_B T$. Le couple nécessaire à ces transitions est lui aussi de quelques pN.nm⁶. Or il a été montré que les polymérases sont capables de générer sur l'ADN des contraintes qui peuvent aller jusqu'à 40 pN et 5 pN.nm [Lavelle, 2009]. Il est donc très probable que les phénomènes décrits ici se produisent au sein des noyaux cellulaires.

La chromatine : un buffer topologique

Lorsqu'une polymérase, par exemple, se déplace le long de son substrat, elle génère une contrainte de surenroulement [Liu et Wang, 1987]. Or on peut supposer que dans le noyau la fibre est constituée d'un ensemble de domaines topologiquement clos [Jackson *et al.*, 1990a, Jackson *et al.*, 1990b]. En effet des protéines bloquent en de nombreux endroits la position de la chromatine, par exemple par une interaction avec la membrane nucléaire ou avec une autre partie de la fibre. La déformation topologique induite par une enzyme ne sera donc pas relâchée par libre rotation de la fibre.

La contrainte de torsion créée par les complexes protéiques se répartit en un surenroulement positif en aval et un surenroulement négatif en amont du complexe actif. Pour cela il faut supposer que l'enzyme ne peut pas tourner autour de l'axe de la fibre, ce qui a très peu de chance de se produire au regard de la taille du complexe (plusieurs dizaines de nanomètres) et de la viscosité du milieu intranucléaire, en partie à cause de la présence de l'ARN transcrit qui reste attaché à la polymérase. En outre, de nombreuses études ont montré que beaucoup d'évènements de transcription se déroulaient dans des loci, nommés *usines de transcription*, dans lesquels les ARN polymérases sont regroupées, accrochées à une sous-structure nucléaire [Sutherland et Bickmore, 2009]. C'est donc la fibre qui doit tourner autour de son axe pour présenter la séquence nucléotidique à la polymérase.

On peut voir sur la figure 3.24 une représentation de l'évolution de la contrainte générée par une polymérase. Le substrat initial est une fibre relâchée de 50 nucléosomes qui se répartissent dans les différents états topologiques [Bancaud *et al.*, 2006]. Les nucléosomes croisés négatifs sont en bleu, les nucléosomes ouverts en jaune, la fibre est en équilibre entre ces deux conformations lorsqu'elle n'est pas contrainte. Le couple appliqué par la polymérase induit la transition vers les états topologiques favorisés, ainsi, en amont, tous les nucléosomes passent dans la conformation croisée négative, alors qu'en aval, ils se retrouvent plutôt dans la conformation croisée positive (en cyan). Cette adaptation permet au complexe protéique de se déplacer sur une centaine de paires de bases avant d'atteindre

6. Rappelons que $4 \text{ pN.nm} = 1 \text{ k}_B T$.

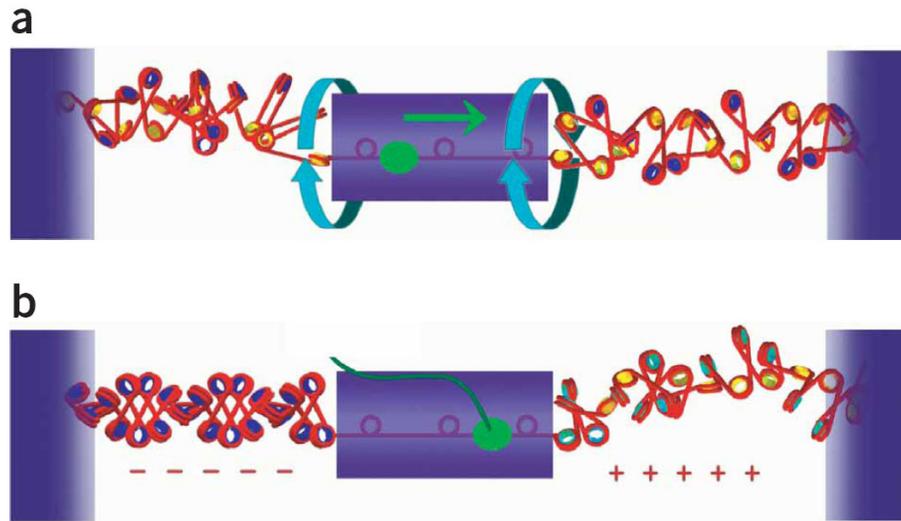


FIGURE 3.24 – Contrainte topologique lors du déplacement d’une polymérase. Lors de l’élongation de l’ARN la polymérase impose une contrainte torsionnelle sur la fibre de chromatine qui doit tourner autour de son axe pour présenter sa séquence nucléostidique. Il en résulte en aval de l’enzyme une déformation topologique positive qui induit la transition des nucléosomes vers la conformation positive, et en amont une déformation topologique négative qui induit la transition des particules vers l’état croisé négatif. *D’après [Bancaud et al., 2006].*

le couple maximal qu’il peut exercer. Donc même en l’absence de topoisomérases, la polymérisation peut se dérouler, puisque la contrainte est absorbée par la fibre. La chromatine agit donc comme un buffer topologique.

Cette description ne prend en compte que l’équilibre conformationnel des nucléosomes et chromatosomes. Or, le couple exercé par les complexes protéiques lors de tels processus métaboliques est suffisant pour déclencher la transition vers le réversome. Il a été montré [Bancaud et al., 2007] que la vitesse de polymérisation de l’ARNpolIII est suffisante pour déclencher la formation de réversomes en aval de la polymérase sur une distance de plusieurs centaines de bases. Cela signifie donc que sur une grande longueur en aval de la polymérase les nucléosomes peuvent transiter vers l’état réversome. Ainsi, la contrainte appliquée par l’enzyme est encore plus réduite, en accord avec le faible couple sur les courbes retour de la figure 3.23.

De plus, les réversomes sont des nucléosomes déstabilisés, donc il est très probable qu’ils constituent des barrières moins importantes à la polymérisation que ne le sont les nucléosomes et chromatosomes. La déstabilisation des dimères constitue la principale barrière à l’élongation à travers les nucléosomes, les réversomes eux n’ont pas de domaines spécifiques d’interaction avec les dimères [Bancaud et al., 2007]. Donc le passage de la polymérase pourrait être facilité à travers le substrat chromatinien.

Ces considérations prennent en compte le fait que la contrainte est accumulée durant l’élongation alors que l’on sait que des enzymes, les topoisomérases, ont pour rôle de relâ-

cher les contraintes de surenroulement. Cette accumulation de la contrainte au cours de la transcription a été confirmée en 2008 [Kouzine *et al.*, 2008], le groupe de D. Levens a montré qu'une contrainte résiduelle de surenroulement positif était observable même quand les topoisomérases sont actives. L'équilibre dynamique que nous avons présenté ci-dessus doit donc très certainement se produire au sein du noyau cellulaire, de façon à ce que la fibre reste étendue même sous contrainte topologique, et même avant que les topoisomérases ne joue leur rôle de supprimeur de la contrainte. Ce processus pourrait être un nouvel exemple de redondance des mécanismes de contrôle des activités métaboliques.

Le réversome : une particule de topologie positive

Le réversome est une particule de topologie positive. Cette propriété peut sembler surprenante au regard du fait que l'enroulement canonique de l'ADN autour des histones est un enroulement gauche. Cette topologie négative a été démontrée aussi bien *in vivo* que *in vitro*. La structure cristallographique du nucléosome a confirmé cette propriété très clairement.

Le réversome, quant à lui, n'a jamais été identifié *in vivo*, et seuls les expériences de pinces magnétiques ont pu mettre à jour son existence⁷. Pourtant, des études très récentes ont apporté une preuve de l'existence au sein du noyau eucaryote d'une interaction ADN/histones particulière. Au cours de l'année 2009, Furuyama et Hennikoff ont publié des résultats mettant en évidence que les nucléosomes centromériques pouvaient exister sous la forme d'une particule à topologie positive [Furuyama et Henikoff, 2009] (Figure 3.25).

Ce résultat démontre que l'assemblage entre l'ADN et les histones n'est pas forcément tel que celui que l'on imagine classiquement. Le nucléosome, à l'image de la fibre de chromatine, est une particule polymorphe, dont l'organisation dépend du contexte (transcription, localisation,...) dans lequel il se trouve.

Les résultats de Furuyama et coll. ne permettent pas de conclure quant à la composition exacte de ces assemblages d'histones. Des indications laissent à penser qu'il puisse s'agir d'hémisomes, c'est à dire de particules contenant une copie de chaque histone H2A, H2B, CENP-A et H4. Le variant CENP-A est localisé dans la chromatine centromérique par un ou plusieurs processus qui n'ont pas encore été complètement élucidés [e Silva *et al.*, 2007, Dunleavy *et al.*, 2009]. Il est probable que ces nouvelles particules soient impliquées dans la maintenance de la chromatine centromérique, même si pour l'instant aucun mécanisme n'a été proposé.

On peut imaginer que la présence de ces particules représente une barrière à la transcription des zones centromériques. Au regard de ce que l'on a développé plus haut, le fait que les particules soient de topologie positive implique que la fibre n'est pas à même de supporter la contrainte de surenroulement. Cela pourrait être un mécanisme qui maintiendrait la fibre dans un état réprimé transcriptionnellement.

7. En volume il est très difficile de former des fragments d'ADN de topologie positive. Au contraire, il est aisé de sousenrouler l'ADN par interaction avec un intercalant (comme le BET ou la chloroquine).

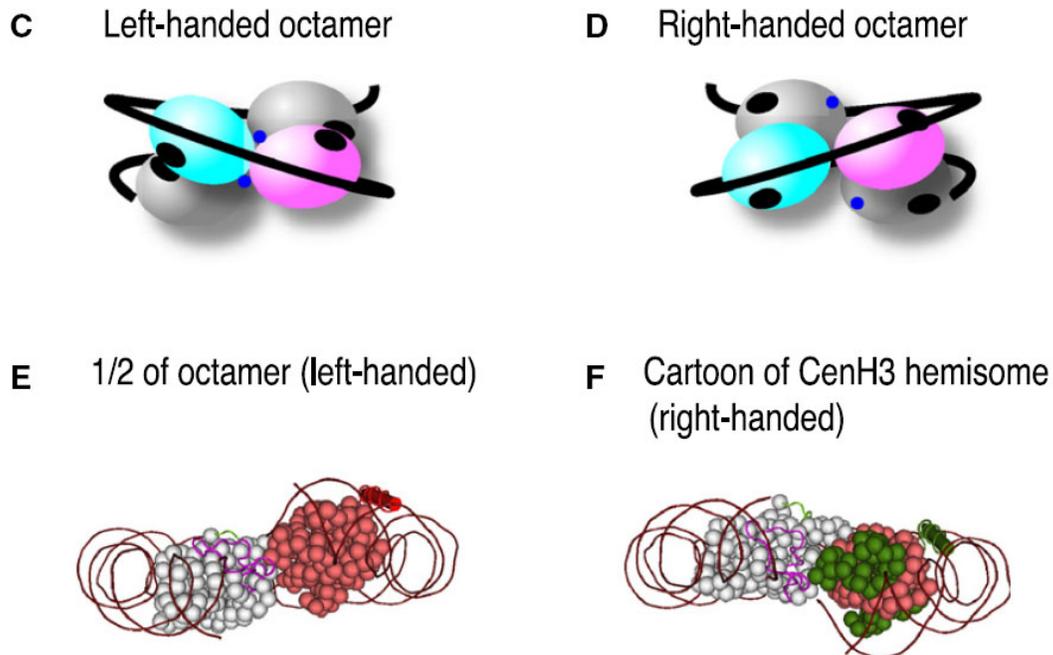


FIGURE 3.25 – Furuyama et coll. ont prouvé l’existence d’une particule de topologie positive au sein de la chromatine centromérique. Les auteurs proposent des structures pour cette particule. (C) Représentation d’un nucléosome dans sa structure conventionnelle, l’enroulement gauche de l’ADN (représenté en noir) se fait autour du tétramère (en cyan et rose) et des deux dimères (en gris). (D) Représentation symétrique d’un nucléosome à enroulement droit, les sites de docking (taches noires) ne sont plus orientés de la même façon dans cette particule. (E) Représentation de la structure d’un demi-nucléosome, composé d’un dimère (H3,H4), en rouge, et d’un dimère (H2A,H2B), en gris. Cette particule représente exactement une moitié du nucléosome présenté en (C). (D) Représentation schématique d’un hémisome composé d’un dimère (CENP-A,H4) et d’un dimère (H2A,H2B), autour desquels s’enroule l’ADN en une superhélice droite, à l’image de son enroulement autour de la conformation droite du tétramère (Figure 2.30). *Tiré de [Furuyama et Henikoff, 2009].*

On remarque donc que le nucléosome, et en particulier sa topologie, a un rôle tout à fait important dans le maintien de l’organisation de la chromatine. Les mécanismes impliquant des particules de topologie positive n’ont pas tous été mis en évidence et sont encore loin d’être expliqués. Les propriétés mécaniques et dynamiques de la fibre sont influencées par les propriétés topologiques des nucléosomes individuels, suggérant ainsi une nouvelle voie de régulation des processus biologiques.

5 Comportement en traction des fibres de chromatine

5.1 Réponses force extension de la chromatine

Nous avons vu à la page 78 que la molécule d’ADN ne se comporte pas comme un polymère semi-flexible. Sa réponse force-extension est très bien décrite par le modèle du ver. Le dis-

positif de pinces magnétiques et les constructions de chromatine que nous avons réalisées nous ont permis d'accéder à la réponse force-extension des fibres de nucléosomes et de chromatosomes. A nouveau l'injection dans le microcanal d'une solution diluée d'héparine nous a permis d'enlever spécifiquement les histones de liaison. Ensuite la réponse de l'ADN nu correspondant après éjection totale des nucléosomes peut être enregistrée.

La figure 3.26 présente les réponses force-extension d'une même molécule : en rose on peut voir le comportement de la fibre de chromatosomes, en violet celui de la fibre de nucléosomes et en gris la réponse de l'ADN nu correspondant. On peut observer les différents degrés de compaction de la fibre. L'état le plus compact est celui où la fibre contient l'histone de liaison.

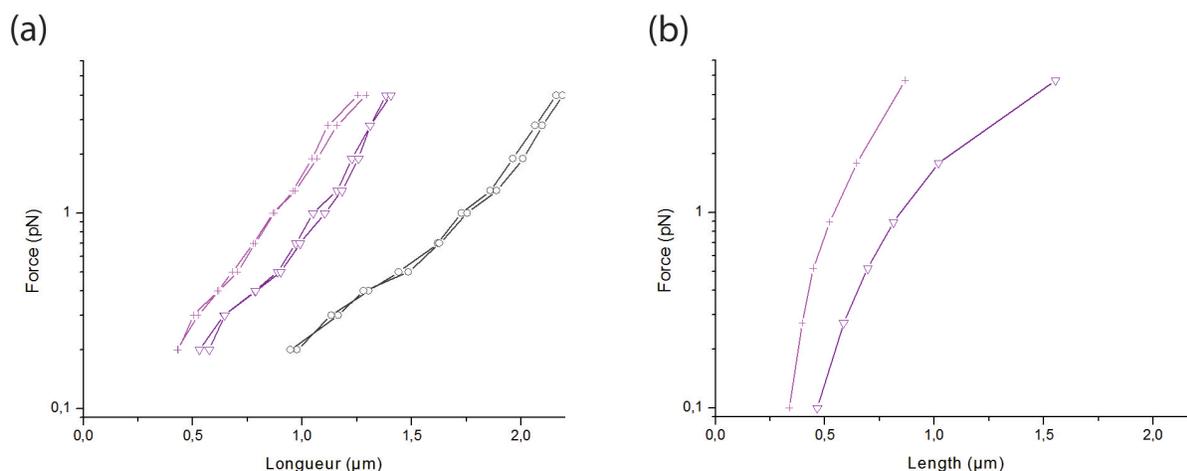


FIGURE 3.26 – Réponse force-extension de fibres de chromatine avant et après éjection des histones de liaison. (a) Fibre contenant 23 ± 3 particules. La réponse de la fibre contenant l'histone de liaison est en rose, celle après éjection de H5 est en violet, enfin la réponse de l'ADN nu correspondant est en gris. (b) Réponse d'une fibre contenant 37 ± 1 particules. En rose réponse force-extension avant éjection de l'histone de liaison, en violet réponse après éjection de l'histone de liaison, la molécule s'est détachée avant que l'on ait pu acquérir la réponse de l'ADN nu correspondant.

On constate que le comportement des fibres de chromatine est très différent de celui de la molécule d'ADN. A basse force les fibres de chromatine sont plus difficilement étirables. Ceci semble cohérent avec la présence des nucléosomes. A plus haute force, au contraire, la chromatine devient plus facilement étirable que la molécule d'ADN (Figure 3.26).

Les fibres avec et sans histones de liaison ont un comportement très proche. On a tout de même relevé plusieurs différences. Il semble que les fibres de chromatosomes soient moins élastiques en traction que les fibres de nucléosomes. Par exemple sur la figure 3.26b on peut voir que la présence de l'histone de liaison se traduit par une rigidité plus grande. La fibre s'allonge moins facilement. Cela pourrait être la traduction d'une structure tridimensionnelle différente entre les deux cas. En effet nous avons déjà évoqué le fait que la

structure tridimensionnelle de la chromatine semble guider la rigidité de la fibre (voir page 75). Toutefois, les résultats publiés dans [Kruithof *et al.*, 2009] n'ont montré de différences entre les fibres avec et sans histones de liaison qu'à partir d'une force de 5 pN. Au dessus de cette force les fibres de nucléosomes commencent à s'allonger par perte des interactions internucléosomales, il semble selon leurs résultats que les histones de liaison stabilisent ces interactions internucléosomales.

Les réponses force-extension que nous avons obtenues concernant la fibre de chromatine sont très hétérogènes, ce qui ne permet pas de décrire précisément leur comportement. On peut le voir en comparant les courbes obtenues pour deux fibres différentes sur la figure 3.26. On peut voir que la fibre en (b) s'allonge plus fortement pour des forces de quelques piconewtons que celle en (a).

L'organisation tridimensionnelle de la fibre dépend de la longueur de répétition nucléosomale, et surtout de l'occupation des sites par les nucléosomes. L'absence d'une particule au sein de la fibre doit conduire à une modification de son architecture. Or nous savons que le réseau de nucléosomes n'est pas complet, puisque très souvent les fibres que nous manipulons ne comportent pas 38 nucléosomes. Rien n'indique que l'enchaînement des nucléosomes le long de l'ADN lui permette d'accéder à une organisation régulière et compacte. Il est donc probable que des fibres individuelles aient des structures différentes et donc des propriétés mécaniques différentes lorsqu'on les étudie en détail.

Nous avons tout de même pu mettre en évidence le fait que l'histone de liaison H5 induit une compaction de la fibre, mais ne modifie pas profondément ses propriétés lorsqu'elle est soumise à une force de l'ordre du piconewton.

5.2 Extension en fonction du temps de la fibre de chromatine

Les courbes force-extension présentées ci-dessus sont obtenues en mesurant l'extension de la molécule sur une durée de quelques dizaines de secondes, pour chaque palier de force. Nous avons également la possibilité de suivre en temps réel l'extension de la molécule à une force donnée sur une durée beaucoup plus longue.

1 - Extension des fibres de nucléosomes

Les traces obtenues pour une fibre de nucléosomes sont présentées sur la figure 3.27. On peut y voir l'extension de la molécule en fonction du temps à des forces de 0.1, 0.2, 0.4, 0.9, 2 et 4.2 pN. Nous avons observé des événements d'allongement de la fibre lorsque la force atteint 2 pN. Les sauts observés sont de l'ordre de la dizaine de nanomètres mais sont très hétérogènes. On ne peut pas définir de taille caractéristique pour ces changements de longueurs. Ceci est peut-être dû au fait que la fibre contient un grand nombre de nucléosomes et donc que les fluctuations des nucléosomes individuels sont cachées dans ce signal. Il en résulte une trace très *bruitée*, difficile à interpréter.

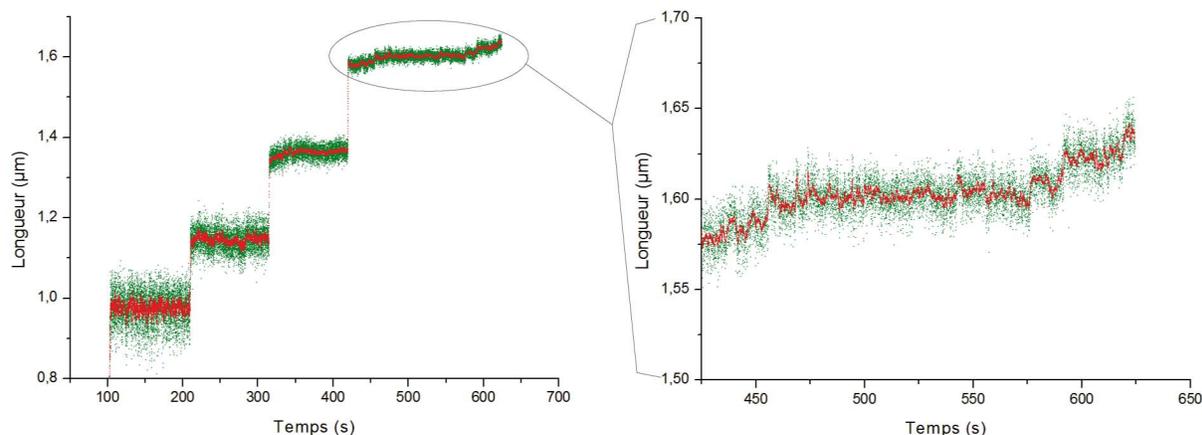


FIGURE 3.27 – Extensions d’une fibre de nucléosomes en fonction du temps. La force est modifiée au cours de l’expérience. Les points verts correspondent aux données brutes, un moyennage de ces données est réalisé sur une fenêtre glissante de 0.5 s (points rouges). Des paliers de force ont été appliqués (0.4 pN, 0.9 pN, 2pN, 4.2 pN). A droite, zoom sur la réponse de la fibre soumise à une force de 4.2 pN.

Les allongements que nous avons observés sont pour la plupart réversibles lorsque la fibre est soumise à une force faible ($\sim 0.1pN$) pour une durée longue. Il est très possible que les pas irréversibles que nous avons observés soient liés à une rupture des contacts entre la fibre et les surfaces.

Au cours de sa thèse Elise Praly s’est intéressée à la réponse en fonction du temps de molécules d’ADN contenant un seul nucléosome, à l’aide d’un dispositif de pinces magnétiques [Praly, 2009]. Les signaux qu’elle a obtenus présentaient eux aussi de nombreuses variations de longueur. Mais l’étude d’un seul nucléosome a permis de mettre en évidence l’existence de tailles caractéristiques de l’allongement. Les sauts observés ont pour tailles 11 nm, 27 nm et 58 nm. Ils correspondent au détachement plus ou moins important d’une partie de l’ADN nucléosomal de la surface de l’octamère. Ces résultats complètent ceux obtenus par l’équipe de C. Bustamante dont nous avons déjà parlé (voir page 72).

La dynamique de l’enroulement de l’ADN nucléosomal autour de l’octamère d’histone conduit à des variations de longueur de la fibre. Le fait que nous étudions des fibres comportant au moins 20 nucléosomes amplifie les fluctuations de longueurs que l’on peut observer. Même s’il devient alors difficile de discerner des événements individuels, nous avons tenté une un traitement statistique des données. La méthode "pairwise" permet d’avoir accès à la distribution des distances moyennes entre chaque paire de points. Si un saut en longueur est présent dans la courbe analysée, cela se traduira par un pic positionné sur la taille caractéristique de ce pas dans la distribution. On peut voir sur la figure 3.28 la distribution obtenue. Elle met en évidence la présence de sauts de longueurs de 21 ± 2 nm. Même si ce résultat semble être en accord avec celui obtenu par E. Praly, il est difficile d’attribuer ces sauts à un mécanisme précis.

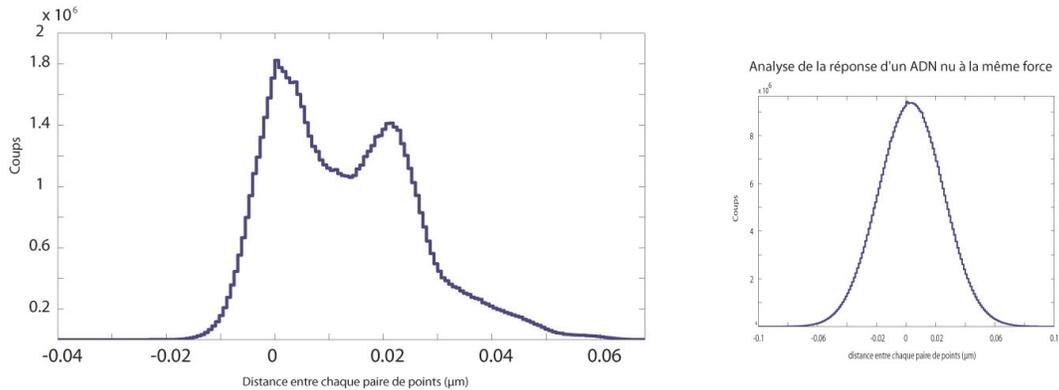


FIGURE 3.28 – Distribution des distances moyennes entre chaque paire de points. Un saut de longueur dans le signal temporel se traduit par une probabilité plus forte des distances égales à la hauteur du pas. On peut voir ici le résultat obtenu pour l’analyse de l’extension en fonction du temps d’une fibre de nucléosomes.

2 - Extension des fibres de chromosomes

De la même manière nous avons pu enregistrer l’extension d’une fibre de chromosomes en fonction du temps, pour différentes forces appliquées. L’allure des courbes obtenues est la même que précédemment, avec d’importantes fluctuations de longueurs.

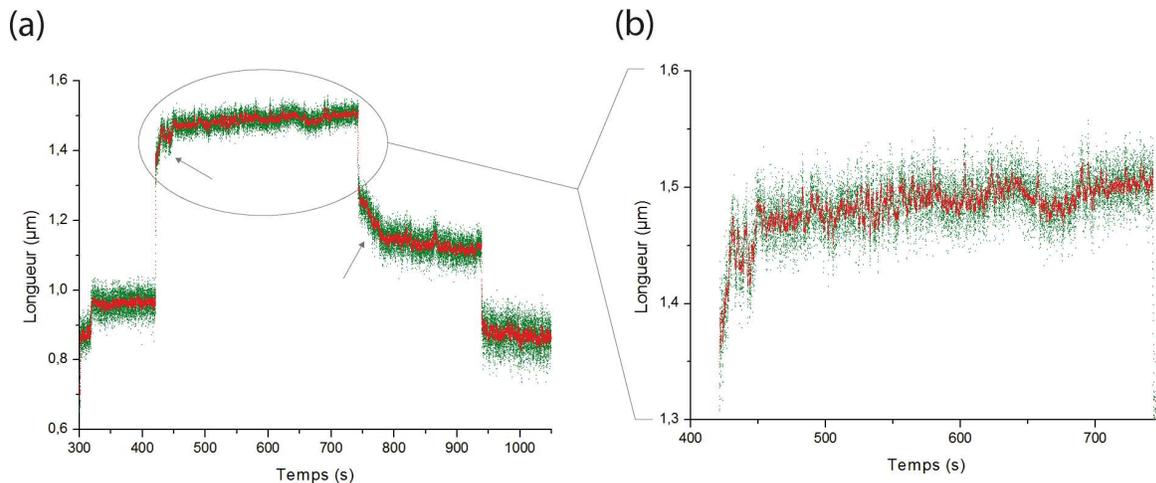


FIGURE 3.29 – Extension en fonction du temps d’une fibre de chromosomes. Les flèches indiquent les événements d’allongement de longueur *rapides* observés pour les fibres de chromosomes. Les données brutes sont en vert, un moyennage de ces données est réalisé sur une fenêtre glissante de 0.5 s (points rouges).

Toutefois quelques fibres ont montré un comportement particulier quand elles sont sou-

mises à des forces de l'ordre de 4 pN. On peut observer un allongement d'une centaine de nanomètres sur une durée de quelques dizaines de secondes (Figure 3.29 (repérés par des flèches)). Cet allongement a de plus la propriété d'être réversible sur une durée du même ordre de grandeur. Ce comportement qui n'est pas observé pour les fibres de nucléosomes pourrait être la signature de la rupture de l'interaction de l'histone de liaison avec les ADN entrant et sortant.

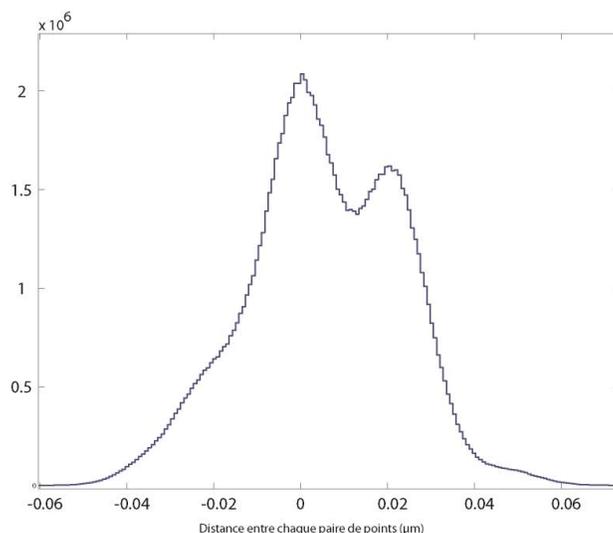


FIGURE 3.30 – Distribution des distances moyennes entre chaque paire de points du signal. On observe un pic large centré sur 0 nm, dont la largeur est associée au bruit de mesure. A nouveau un pic est observé pour une valeur de $21 \pm 2 \text{ nm}$.

L'analyse statistique de la longueur des fibres de chromatosomes en fonction du temps a indiqué une nouvelle fois l'existence de sauts de longueurs de $21 \pm 2 \text{ nm}$ (Figure 3.30), comme dans le cas des fibres de nucléosomes. Le fait que l'on retrouve la même longueur suggère que la dynamique de l'interaction de l'histone de liaison sous contraintes autorise encore les fluctuations d'enroulement de l'ADN nucléosomal.

Cela semble en accord avec le fait que les propriétés dynamiques des fibres de chromatosomes, aussi bien en rotation qu'en traction, sont peu différentes de celles des fibres de chromatosomes. La compaction associée à l'interaction avec l'histone de liaison ne prive pas la fibre de son élasticité.

Conclusion

Nous avons étudié les propriétés mécaniques des fibres de chromatine avec une technique de manipulation de molécules uniques : *les pinces magnétiques*. Nous avons réalisé la construction de fibres de chromatine sur une séquence ultrapositionnante, la séquence 601 synthétisée par J. Widom. L'utilisation de ce substrat a permis d'obtenir des fibres de nucléosomes reconstituées de façon régulière et complète, c'est à dire que tous les sites positionnants sont occupés. Nous avons vérifié cette localisation par des expériences de biochimie en volume (électrophorèses sur gels d'agarose et d'acrylamide) et par des expériences de microscopie électronique.

A l'aide de cette séquence positionnante nous avons également réussi à incorporer dans les fibres les histones de liaison H5, le variant présent dans les érythrocytes aviaires. La particule formée par l'interaction de cette histone avec le nucléosome, nommée chromatosome, est également distribuée de façon régulière le long de la fibre. Les analyses sur gels et par imagerie en microscopie électronique ont par ailleurs mis en évidence le fait que l'histone de liaison induit l'accès à un état de condensation supérieur de la fibre. Nous avons pu observer au sein des fibres la formation du motif en tige, caractéristique de l'interaction entre l'histone de liaison et la particule cœur de nucléosome.

Nous avons étudié les fibres de nucléosomes et de chromatosomes que nous avons préparées avec les pinces magnétiques. Ces expériences ont pu mettre en avant les propriétés mécaniques des fibres de chromatine soumises à une déformation topologique. Nous avons vérifié que les fibres de nucléosomes reconstituées sur la séquence 601 se comportent exactement comme celles reconstituées sur la séquence 5S [Bancaud, 2004, Wagner, 2006].

Ces fibres présentent une élasticité en rotation beaucoup plus importante que celle de l'ADN nu. Cette propriété est la traduction d'un équilibre dynamique eu niveau du nucléosome individuel. En effet, les nucléosomes peuvent adapter leurs topologies en fonction de la contrainte de rotation qui leur est imposé. Cela se traduit par un changement du statut de croisement des ADN entrant et sortant. Les trois états accessibles au nucléosome sont l'état croisé négatif, l'état ouvert et l'état croisé positif.

En ce qui concerne les fibres de chromatosomes, nous avons pu démontrer grâce à ces nouvelles expériences que leur élasticité en rotation est comparable à celle des fibres de nucléosomes. Les histones de liaison compactent la fibre, mais n'empêchent pas les particules de s'adapter à la contrainte topologique. Les données biochimiques montrent que les

chromatosomes peuvent exister sous deux états topologiques distincts : l'état croisé négatif et l'état croisé positif. C'est l'équilibre entre ces deux conformations qui confère à la fibre son élasticité.

Les outils de modélisation des réponses extension- rotation des fibres de chromatine nous ont par ailleurs donné accès à des informations dont nous ne disposions pas. En effet, les données sur les déformations topologiques des nucléosomes reconstitués sur la séquence 601 n'avaient pas été déterminées par la méthode des minicercles. Les ajustements des sommets des courbes en chapeau ont donné ces informations pour les nucléosomes et les chromatosomes. Cela justifie le fait que les pinces magnétiques peuvent être un outil précieux d'analyse de la topologie de l'ADN.

A. Bancaud et G. Wagner avaient mis en évidence un comportement hystérétique original des fibres de nucléosomes. Sous fortes contraintes de surenroulement positif, les nucléosomes subissent une transition structurale au cours de laquelle l'enroulement de l'ADN au sein de la particule change de chiralité. La particule formée, nommée *réversible*, présente une topologie positive.

Cette plasticité structurale a également pu être mise en évidence pour les chromatosomes. La présence de l'histone de liaison ne prévient pas la formation des réversomes.

Ces observations montrent que la chromatine, même sous une forme condensée par l'intermédiaire de l'histone de liaison, conserve des propriétés mécaniques remarquables lorsqu'elle est soumise à une contrainte de torsion. Ce substrat est capable de supporter les déformations topologiques de façon beaucoup plus importante que ne peut le faire la molécule d'ADN nu.

Au regard des processus biologiques, tels la réplication ou la transcription, qui peuvent induire des contraintes de torsion sur leur substrat, la plasticité de la fibre est une propriété importante dans le maintien d'une organisation compacte et accessible de l'ADN.

Par ailleurs, notre système d'étude a permis de mettre en évidence la dynamique des fibres de chromatine. Nous avons observé sur les enregistrements de l'extension en fonction du temps d'importantes fluctuations de longueurs. Ces fluctuations sont à relier à la dynamique de l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones. Nous avons pu vérifier, dans le limite de résolution de notre système, que cette dynamique n'est pas profondément modifiée par l'interaction avec l'histone de liaison. Après une étape de rupture réversible de cette interaction, l'ADN nucléosomal est soumis aux mêmes fluctuations. Toutefois la présence d'un grand nombre de particules sur les fibres que nous avons étudiées nous empêchent d'observer finement ces fluctuations. L'approche adaptée dans ce cas serait d'étudier en pinces magnétiques des molécules contenant un seul nucléosome ou chromatosome. Ce travail a été réalisé en partie dans la thèse d'Elise Praly. Le dispositif de pinces magnétiques permet d'avoir accès aux données concernant les fluctuations à basses forces, une gamme qui n'a pas encore été étudiée de façon extensive pour le moment.

Perspectives

Les études que nous avons menées nous ont permis d'accéder à une meilleure compréhension des propriétés mécaniques des fibres de chromatine. Nous avons vu que les contraintes que nous avons appliquées sont proches de celles que peuvent subir la fibre au sein du noyau. Le fait d'avoir pu nous intéresser à l'effet de l'histone de liaison nous a permis de nous approcher un peu plus de la réalité des conditions physiologiques de la fibre de chromatine.

Toutefois, un long chemin reste à parcourir qui ne semble pas moins semé d'embûches. Les expériences de pinces magnétiques que nous avons menées sur la fibre de chromatine ont été marquées par une difficulté importante : les problèmes d'interactions non-spécifiques entre la bille à laquelle est attachée la molécule étudiée et la surface de la lamelle de microscope. Cette difficulté réside dans le fait que nous nous intéressons à un substrat très chargé, d'une part par l'ADN lui-même, d'autre part par les histones qui sont des protéines particulièrement riches en résidus chargé. De plus ADN et histones portent des charges opposées, donc quelle que soit la charge de la surface, au moins un des deux constituants de la chromatine aura une interaction non négligeable.

Pour l'heure les traitements de surfaces dont nous disposons ne permettent pas de résoudre ce problème. C'est, il me semble, le point sur lequel des efforts devront être entrepris si l'on souhaite aller encore plus loin dans l'analyse des processus impliquant la fibre de chromatine. Car si ce problème est résolu il deviendra possible de travailler à des concentrations salines plus élevées, se rapprochant des conditions physiologiques.

Dans ces conditions, il sera possible d'étudier par des expériences de molécules uniques l'activité d'un facteur de remodelage ou d'une ARN polymérase sur une fibre de chromatine. Ce travail, déjà mené mais uniquement sur des molécules d'ADN nu, fournira des nombreuses et précieuses indications sur les mécanismes du métabolisme des acides nucléiques dans le contexte chromatinien.

ANNEXE A

Fabrication des cellules en PDMS et traitement de surface

1 Fabrication des cellules

Nous allons présenter les protocoles nous permettant de fabriquer les cellules de PDMS dans lesquelles nous faisons passer nos solutions, et de fonctionnaliser les lamelles sur lesquelles les cellules sont scellées.

1.1 Réalisation de la cellule

Lorsque nous fabriquons les cellules de PDMS, nous faisons réticuler le polymère dans un moule ayant la forme souhaitée et comportant une empreinte en résine qui permettra de creuser un canal dans l'épaisseur de la cellule (voir figure 2.21 page 93).

Nous devons donc d'abord réaliser l'empreinte du canal (le moule) par photolithographie.

1 - Préparation du moule

Plusieurs techniques sont disponibles au laboratoire pour préparer les moules. Toutes sont basés sur les principes de la photolithographie. Le principe est le suivant :

- Nous étalons une couche de résine d'épaisseur contrôlée sur une lame de verre préalablement nettoyée.
- Nous appliquons sur la lame un masque laissant apparaître uniquement la forme du canal souhaitée.

- Nous illuminons la lame avec des UV, ce qui permet la réticulation de la résine sur la zone non protégée par le masque.
- L’empreinte est ensuite révélée après incubation dans un solvant qui dissout la résine non réticulée.

Le masque opaque définit la longueur et la largeur du canal, l’épaisseur de résine sur la surface définit sa hauteur. L’opacité des masques est très importante c’est pourquoi nous les faisons imprimer à 3600 dpi par la société César Graphiques (Paris 15).

En ce qui concerne la résine nous avons choisi une résine en film SY300 (ElgaEurope), il s’agit d’une résine sèche sous forme de film utilisée pour la microélectronique. Elle est protégée entre deux films, l’un de polyéthylène (PE) l’autre de polyéthylène téréphtalate (PET) (Figure A.1). Son épaisseur est de $50\ \mu\text{m}$. Le substrat utilisé est une lame de verre de diamètre 40mm sur lequel est laminé la résine.

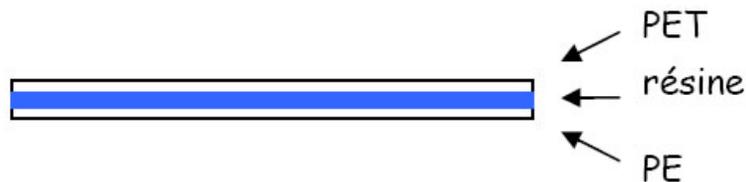


FIGURE A.1 – La résine en film SY300 est protégée par deux films plastiques. L’un est en PE et l’autre en PET. L’épaisseur de la résine (en bleue) définit la hauteur des objets que l’on peut créer sur la surface, et donc dans notre cas la hauteur du canal. Plusieurs couches peuvent être utilisées pour atteindre l’épaisseur souhaitée. Il existe des résines de 20, 30 et $50\ \mu\text{m}$ d’épaisseur.

PROTOCOLE

Nettoyage Les lames de verre sont lavées au savon puis rincées abondamment à l’eau mQ. Faire un bain d’isopropanol placé 10min aux ultrasons. Sécher à l’azote ou à l’air comprimé filtré. Placer les substrats sur plaque chauffante à 120°C pendant 15min environ afin de déshydrater la surface. Cette étape permet d’éliminer la fine couche d’eau qui pourrait éventuellement gêner l’adhérence de la résine au substrat.

Lamination Recouvrir le support métallique du laminoir de papier aluminium. Vérifier l’état de la résine, si celle-ci ne comporte pas d’imperfections, découper le format voulu et retirer la couche de polyéthylène. Laminer les supports avec cette résine à 90°C à la pression minimale et à une vitesse de $0,2\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure A.2). Pour atteindre l’épaisseur souhaitée il faut laminer une deuxième couche de résine. Il faut alors penser à enlever la couche protectrice supérieure (en PET) du premier film et la couche protectrice inférieure (en PE) du second film. La lamination se déroule de la même façon. Envelopper les lames dans du papier alu pour les protéger des UV.

ATTENTION : Lorsque l’on manipule la résine photosensible toujours travailler en lumière inactinique !

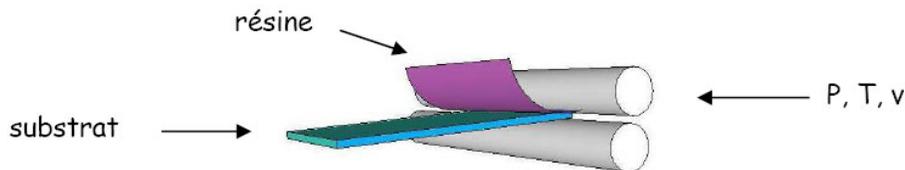


FIGURE A.2 – Principe de la lamination de la résine en film SY300 sur un substrat de verre.

Exposition En salle blanche, retirer la couche de polyéthylène (la 2^{ème} couche protectrice de la résine) puis exposer la résine sous la lampe UV à travers le masque de la géométrie souhaitée pendant 20s (pour une épaisseur de résine de $55 \mu m$). Poser sur une plaque chauffante pendant 10min à $120^\circ C$ (post exposure bake). Cette étape a pour but de finaliser la réticulation de la résine et d'augmenter l'adhérence de celle-ci sur le substrat.

Développement

Sous la hotte, mettre la lame de verre laminée de résine dans un récipient contenant du BMR developer C5 (ElgaEurope), attendre que la résine non illuminée se dissolve et que le relief du canal apparaisse nettement. Cette étape peut être réalisée dans un bain à ultrasons, cependant faire attention à ne pas surdévelopper. Mettre la lame dans un récipient contenant du BMR rincer (ElgaEurope) puis rincer abondamment à l'acétone et enfin à l'isopropanol. Sécher à l'air comprimé.

2 - Réticulation du PDMS

Afin de réaliser une cellule en PDMS, il faut :

- Mélanger le polymère et le réticulant dans des proportions 5 : 1 (on en prépare environ 10 g), puis dégazer ce mélange environ 15 min.
- Assembler le moule permettant de réaliser une forme de cellule particulière (en pyramide pour les pinces magnétiques) et y fixer la lame sur laquelle l'empreinte est réticulée.
- Couler le PDMS dans le moule et faire réticuler à $65^\circ C$ pendant 3 heures.
- Laisser refroidir la cellule à température ambiante pendant 30 minutes, puis démouler.

Dans les expériences de pinces magnétiques la cellule peut être utilisée un certain nombre de fois (environ 2 semaines avant que les surfaces ne soient rendues trop sales par la fixation de billes et de poussières).

En ce qui concerne la fermeture de la cellule par la lamelle de microscope nous suivons le protocole suivant :

- La cellule est appliquée sur une lame silanisée (voir ci-dessous) puis elle est mise à $65^\circ C$ pendant une nuit afin d'assurer l'adhésion cellule/lame.

- La cellule est ensuite mise en surpression : nous faisons passer une solution de TE dans la cellule par pression hydrostatique, puis nous bloquons la sortie du canal avec une pince.
- La pression est augmentée progressivement sur environ 4 heures afin de vérifier la solidité de l'adhésion.
- L'anti-digoxygénine est ensuite incubée pendant 1 heure, puis de la BSA (100x) est ajoutée. Cette dernière est incubée sur la nuit. La cellule est alors prête à être utilisée.

2 Traitement des surfaces

Le traitement de la surface de la lamelle de verre débute par une silanisation. Pour cela nous procédons à un nettoyage des lamelles, elles sont trempées dans de la soude à 5M pendant 1h. Nous les rinçons abondamment à l'eau mQ pour enlever les traces de bases. Pour éliminer l'eau de la surface les lamelles sont rincées à l'éthanol puis séchées à l'air comprimé filtré.

Les lamelles sont alors trempées dans du Sigmacote (Sigma) pendant 5min. Afin d'éliminer les traces dues au séchage du silane les lamelles sont immédiatement rincées dans de l'éthanol puis séchées à l'air comprimé (il est possible de faire un recuit des lames à 150°C pendant une heure, cette étape n'a jamais parue déterminante).

Les lamelles ainsi préparées peuvent être stockées à l'abri de l'air ambiant pour quelques semaines.

ANNEXE B

Préparation des fibres de chromatine

1 Préparation de l'ADN

L'utilisation de la séquence positionnante 601 nous a permis de préparer les constructions d'ADN finales avant la reconstitution de chromatine, c'est à dire que les nucléosomes et chromatosomes sont positionnés sur une molécule contenant la séquence positionnante et les ADN servant à manipuler cette molécule en pinces magnétiques (Figure B.1). Les différentes étapes de préparation de cette construction sont présentées ci-dessous.

1.1 Fragment central

Le fragment central contient les 38 répétitions de 200pb de la séquence positionnante 601. Pour préparer cet ADN nous utilisons un plasmide pUC19 contenant 19 répétitions de 601 qui nous a été fourni par D. Rhodes. Le multimère est inséré entre les sites EcoRI et XbaI.

Nous avons procédé à une mutation d'un plasmide pUC18 afin qu'il présente dans son site de clonage multiple un site de restriction pour DraIII¹. Pour cela nous avons procédé à une PCR mutagène avec le primer suivant : CAGTCACGACGCTGTAAAACGACACCCGGTGACAAGCTTGCATGCC. Ce site est positionné juste après le site de restriction XbaI de telle façon que le multimère puisse être coupé par une digestion entre EcoRI et DraIII.

Le multimère de 601 est inséré dans le plasmide muté entre les sites EcoRI et XbaI. Nous procédons ensuite à une purification MaxiPrep d'une culture bactérienne pour obte-

1. Afin d'avoir compatibilité avec les protocoles développés pour les séquences 5S [Wagner, 2006].

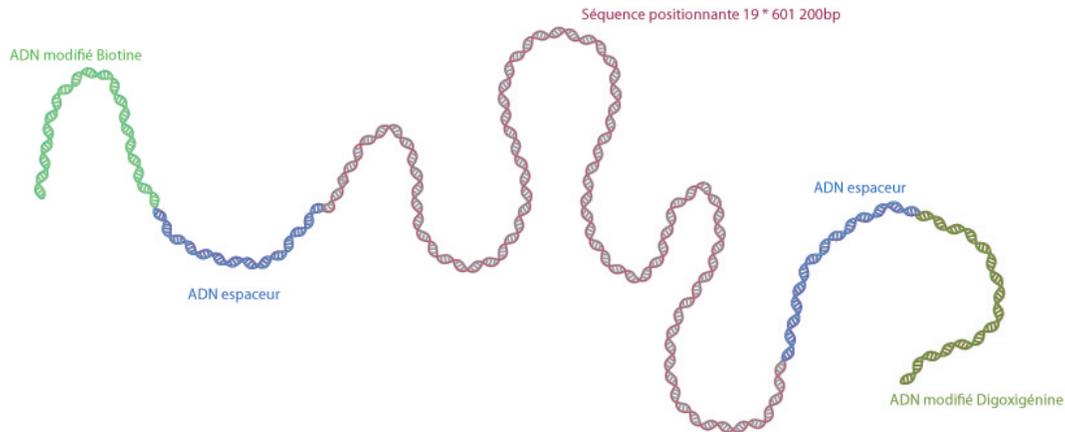


FIGURE B.1 – Représentation schématique de la construction d'ADN. Les sites de restriction et les longueurs des fragments sont indiqués.

```

ctcgggtta tgtgatggac cctatacgcg gccgcctgg agaatcccgg tgccgaggcc gctcaattgg
tcgtagcaag ctctagcacc gcttaaacgc acgtacgcgc tgccccccgc gttttaaccg
ccaaggggat tactcctag tetccaggca cgtgtcagat atatacatcc tgtgcatgta ttgaacagcg actcggg

```

TABLE B.1 – Séquence positionnante 601 de 200 pb. En bleu sont indiqués les sites de restriction d'AvaI par lesquels sont liés les répétitions.

nir quelques mg du plasmide.

Le 19-mère de 601 est ensuite extrait du plasmide par une digestion par les enzymes EcoRI et DraIII, on utilise également l'enzyme HgaI afin de couper plusieurs endroits le fragment d'ADN qui n'est pas d'intérêt. De cette manière les produits de digestion aient tous des tailles suffisamment différentes pour être séparés sur gel. Les multimères sont alors purifiés sur un gel d'acrylamide 19 :1 4%, de 10 cm de longueur on peut déposer 10 μ g dans des puits de 2 cm de largeur.

Pour obtenir les fragments de 38 répétitions nous procédons à une dimérisation des 19-mères sur le site de restriction palindromique de l'enzyme EcoRI. Pour augmenter le rendement de cette ligation nous avons choisi de faire la réaction dans un tampon contenant 10 % de PEG₄₀₀. Ainsi nous obtenons des rendements de dimérisation supérieurs à 50%. Le produit de ligation est ensuite purifié par la méthode Sevag et reprécipité à l'éthanol (voir page 165).

1.2 Fragment espaceur et extrémités collantes

1 - Fragments espaceurs

Ces 2 fragments sont identiques et un seul protocole suffit à les préparer.

a. PCR L'ADN est amplifié par PCR à partir du plasmide pFOS-1. Ce dernier est linéarisé par EcoRI. Les amorces de PCR sont situées aux positions 3803 et 4539 de pFOS-1 (voir figure B.2) et leurs séquences sont :

FOSup :

5'-GTCTACACGAAGGTTTTTGCG -3'

FOSdown :

5'-CAGACAGGACTGTCATTTGAGG -3'

```

3801 AAGTCTACAC GAAGGTTTT GCGCTGGATG TGGCTGCCCG GCACCGGGTG
3851 CAGTTTGCGA TGCCGGAGTC TGATGCGGTT GCGATGCTGA AACAAATTATC
3901 CTGAGAATAA ATGCCCTTGGC CTTTATATGG AAATGTGGAA CTGAGTGGAT
3951 ATGCTGTTTT TGTCTGTTAA ACAGAGAAGC TGGCTGTTAT CCACTGAGAA
4001 GCGAACGAAA CAGTCGGGAA AATCTCCCAT TATCGTAGAG ATCCGCATTA
4051 TTAATCTCAG GAGCCTGTGT AGCGTTTATA GGAAGTAGTG TTCTGTCATG
4101 ATGCCTGCAA GCGGTAACGA AAACGATTTG AATATGCCTT CAGGAACAAT
4151 AGAAATCTTC GTGCGGTGTT ACGTTGAAAGT GGAGCGGATT ATGTCAGCAA
4201 TGGACAGAAC AACCTAATGA ACACAGAACC ATGATGTGGT CTGTCCTTTT
4251 ACAGCCAGTA GGCTCGCCGC AGTCGAGCGA CGGCGAAGCC CTCGAGTGAG
4301 CGAGGAAGCA CCAGGGAACA GCACCTATAT ATTCTGCTTA CACACGATGC
4351 CTGAAAAAAC TTCCCTTGGG GTTATCCACT TATCCACGGG GATATTTTAA
4401 TAATTATTT TTTTATAGTT TTTAGATCTT CTTTTTAGA GCGCCTTGTA
4451 GGCCTTTATC CATGCTGGTT CTAGAGAAGG TGTTGTGACA AATTGCCCTT
4501 TCAGTGTGAC AAATCACCCCT CAAATGACAG TCCTGTCTGT GACAAATTGC

```

FIGURE B.2 – Séquence du plasmide pFOS coupée autour des sites où les amorces s'hybrident. En rouge : sites d'hybridation des amorces. En bleu : sites de reconnaissance de Dra III (3847) et Xba I (4470).

Le protocole de PCR est standard avec une température d'hybridation de 64°C. Les conditions sont rappelées dans l'annexe C page 165.

La PCR est purifiée sur colonne ChromaSpin TE-100 (coupure à 100 pb). Son rendement est contrôlé par DO (Nanodrop). On obtient de l'ordre de 5 µg dans 60 µL.

b. Digestion par Xba I et Dra III Pour obtenir des extrémités cohésives, ce fragment subit une double restriction :

- Xba I : Nous utilisons un excès 10X (37°C pendant 1h). Cette enzyme produit une extrémité palindromique CTAG qui est utilisée pour faire la ligation avec les extrémités biotine et digoxygénine (voir Table B.2). Ce site de restriction se situe à la position 4470, nous obtenons finalement deux fragments de 67 pb et 670 pb. Nous purifions ces produits de réaction sur colonne TE-100 et récupérons le fragment de 670 pb.

- Dra III : Nous utilisons un excès 3X (37°C pendant 1h). La restriction produit une extrémité 3' sortante CCG, qui est complémentaire du site créé sur le plasmide muté. Le site de restriction est situé à la position 3847 et deux fragments de 44 pb et 623 pb sont produits. Nous purifions sur colonnes TE-400 afin de nous assurer que les fragments courts

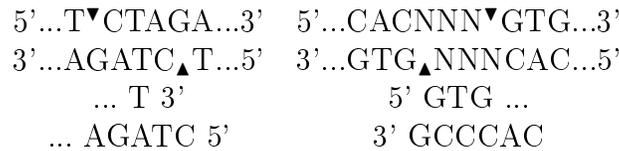


TABLE B.2 – Digestions du fragment pFOS par Xba I et Dra III. (En haut) (A gauche) Site de restriction de Xba I. (A droite) Site de restriction de Dra III. (En bas) (A gauche) Extrémité générée par la digestion de Xba I. (A droite) Extrémité générée par la digestion de Dra III.

sont bien filtrés. Nous procédons ensuite à une reprecipitation à l'éthanol (concentration finale autour de 100 ng/ μ L).

2 - Fragments digoxygénine et biotine dits "collants"

a. PCR Ces fragments sont préparés par PCR avec des oligonucléotides modifiés avec de la biotine ou de la digoxygénine. L'ADN est amplifié à partir du plasmide Litmus 28i (NEB) linéarisé par Pvu II. Les amorces de PCR sont situées aux positions 2008 et 2580 (voir figure B.3) et leurs séquences sont :

LitXba-up :



LitXba-down :



```

2001 ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC
2051 GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG
2101 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC
2151 AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT
2201 GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
2251 AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC
2301 TTTTGCTCAC ATGTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC ACCCCAGGCT
2351 TTACACTTTA TGCTCCGGC TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA
2401 ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA TGATTACGCC AAGCTACGTA
2451 ATACGACTCA CTATAGGGCA GATCTTCGAA TGCATCGCGC GCACCGTACG
2501 TCTCGAGGAA TTCCTGCAGG ATATCTGGAT CCACGAAGCT TCCCATGGTG
2551 ACGTCAACCGG TCTAGATAC CTAGGTGAGCTCTGGTACCC TCTAGTCAAG

```

FIGURE B.3 – Séquence du plasmide Litmus 28i coupée autour des sites où les amorces s'hybrident. En rouge : sites d'hybridation des amorces. En bleu : site de Xba I (2562).

Le produit de la réaction de PCR est purifié sur colonne ChromaSpin TE-100.

b. Digestion par Xba I Pour rendre les fragments digoxygénine et biotine fonctionnels, il faut les digérer avec l'enzyme Xba I. Il est important de noter que l'efficacité de l'enzyme est très faible dès lors que son site est recouvert de digoxygénine ou de biotine. Pour compenser cet effet, le site de restriction se trouve dans l'amorce LitXba-down (c'est d'ailleurs ce qui explique sa longueur). Dans notre cas, Xba I coupe à la position 2562.

Nous digérons les ADN avec un excès 15X de Xba I 1h à 37°C. Deux fragments sont produits : 18 pb et 554 pb. Ceux-ci sont purifiés sur ChromaSpin TE-100 puis précipités à l'éthanol (concentration finale autour de 100 ng/ μ L).

1.3 Construction totale

Les fragments centraux, les fragments espaceurs et les extrémités modifiées sont mélangés en présence de ligase afin de former la molécule d'ADN totale. Pour obtenir un maximum de constructions complètes les petits fragments sont introduits en large excès (au moins 10x).

Le produit de ligation est purifié (Sevag) puis précipité à l'éthanol. On peut alors purifier sur gel d'agarose 1% (Gel purification kit, Qiagen) la bande qui correspond à la construction totale.

2 Reconstitution des fibres de chromatine

2.1 Fibres de nucléosomes

Nous réalisons la reconstitution des fibres de nucléosomes sur 500 ng d'ADN positionnant. Cette quantité permet de générer suffisamment de fibres pour travailler plusieurs mois avec les pinces magnétiques.

Nous utilisons une méthode dans laquelle l'ADN et les histones sont initialement mélangés à haute force ionique (2 M NaCl), ce qui interdit toute interaction électrostatique. La concentration en ions est alors diminuée très progressivement afin d'assurer un dépôt correct des histones sur l'ADN. Toutes les étapes se déroulent à température ambiante.

Les étapes sont les suivantes :

1. Nous mélangeons 900 ng d'ADN (afin d'avoir 500 ng de séquence positionnante, nous ne considérons pas les séquences non positionnantes qui flanquent le fragment central), 1.7 μ g d'histones et 350 ng d'ADN de 147 pb (séquence aléatoire) dans 4 μ L final (tampon 10 mM Tris, 1mM EDTA), la concentration en NaCl est ajustée à 2M. Nous laissons incubé pendant 15 min.

2. Nous ajoutons 4 μL de tampon (TE + BSA 1X) afin d'atteindre une concentration de 1 M. Cette étape dure 30min.
3. Nous ajoutons 2 μL de tampon (TE + BSA 1X) afin d'atteindre une concentration de 0.8 M. Cette étape dure 1h.
4. Nous ajoutons 3.3 μL de tampon (TE + BSA 1X) afin d'atteindre une concentration de 0.6 M. Cette étape dure 2h30.
5. Nous ajoutons 6.7 μL de tampon (TE + BSA 1X) afin d'atteindre une concentration de 0.4 M. Cette étape dure 1h30.

Pour les dilutions, nous déposons le volume de TE-BSA au centre de la solution et nous le laissons diffuser sans mélanger.

La dernière dilution conduit à une concentration saline de 0,4 M et un volume de 20 μL . Finalement, pour diminuer la salinité à ~ 0 , une dialyse contre du TE de ce petit volume est réalisée pendant environ 1h30.

Les 20 μL de solution sont alors mélangés à 20 μL de glycérol afin de pouvoir conserver la chromatine à -20°C .

2.2 Fibres de chromatosomes

La procédure est la même que précédemment jusqu'à la fin de l'étape à 0.6 M. Les histones de liaison H5 sont introduit dans le mélange à 0.4 M, on introduit 0.15 μg de protéines. L'incubation dure 1h30. On termine également par une dialyse contre du TE.

Les fibres sont alors conservées à -20°C dans 50% de glycérol.

3 Analyse des fibres

Pour vérifier l'état de reconstitution nous avons procédé à plusieurs analyses sur gel en conditions natives aussi bien sur des fibres entières (agarose) que sur des mononucléosomes (acrylamide).

3.1 Migration sur gel d'agarose

Pour réaliser des migrations de fibres complètes de chromatine nous nous plaçons en conditions non-dénaturantes et à très bas sel pour déstabiliser au minimum les particules présentes sur la fibre. Nous préparons un gel d'agarose de 1% dans du tampon Tris 2 mM, acide borique 2 mM pH=7.5 (tampon TB 0.2X).

Nous déposons 200 ng de matériel (masse d'ADN) dans les puits. Le migration se déroule à 150V pendant 1h30. Dans ces conditions on voit l'effet sur la migration de la présence de l'histone de liaison H5.

3.2 Migration sur gel d'acrylamide

Nous pouvons faire migrer sur gel d'acrylamide des mononucléosomes. Dans ce cas nous préparons un gel à 4% d'acrylamide/bisacrylamide 29 :1 dans un tampon Tris 10 mM et EDTA 1 mM (TE). Avant de déposer la chromatine et tout autre matériel sur le gel nous réalisons une prémigration à 250 V pendant 1h afin d'éliminer du gel le persulfate d'ammonium qui pourrait déstabiliser la chromatine.

La migration pour séparer les nucléosomes de l'ADN se déroule à 250V sur 2h. La révélation se fait au BET.

ANNEXE C

Protocoles de PCR et de purification d'ADN

1 PCR

1.1 Produits utilisés

Nous mélangeons les différents produits selon les quantités mentionnées dans le tableau de la figure C.1. Nous préparons pour une reconstitution au moins 5 tubes de 50 μL de chaque type de fragment (biot, dig et espaceur).

La matrice est à une concentration d'environ 100 ng/ μL .

Les amorces sont reçues sous forme solide (Oligold) puis diluées dans du TE à une concentration finale de 100 μM .

Les nucléotides (Roche) sont à une concentration de 10 mM.

Les nucléotides modifiés (Roche) sont à une concentration de 1 mM.

Le tampon est le tampon 2 du kit "High-Expand Fidelity" de Roche. Il contient 1,5 mM de magnésium (une fois dilué 1X).

L'enzyme est la polymérase du kit "High-Expand Fidelity" de Roche.

	biotine	digoxygénine	espaceur
matrice	Litmus 28i 1 μL	Litmus 28i 1 μL	pFOS 1 μL
amorces	LitXba-up 0,5 μL down 0,5 μL	LitXba-up 0,5 μL down 0,5 μL	FOS-up 0,5 μL down 0,5 μL
A, G, C	1 μL de chaque	1 μL de chaque	1 μL de chaque
T	0,75 μL	0,85 μL	1 μL
U _{biot}	2,5 μL		
U _{dig}		1,5 μL	
H ₂ O	36,75 μL	37,65 μL	39μL
tampon 10X	5 μL	5 μL	5 μL
polymérase	1 μL	1 μL	1 μL

FIGURE C.1 – Protocole de PCR pour générer les fragments biotine et digoxygénine, et le fragment espaceur.

1.2 Programmation des cycles

Les cycles thermiques se déroulent de la façon suivante :

1. Dénaturation initiale, 1 minute à 94C.
2. 10 premiers cycles : dénaturation 94C pendant 1 min, hybridation x °C pendant 1 minute, élongation 72C pendant 45 secondes.
3. 20 cycles suivants : ajout de 10 secondes à chaque nouvelle étape d'élongation.
4. Élongation finale 5 minutes à 72C.

Pour les fragments dig et biot, la température d'hybridation est 58°C et pour le fragment espaceur (pFOS), elle est de 64°C.

Nous utilisons un appareil à PCR à couvercle chauffant (100°C), ce qui évite l'évaporation de la solution. Pour les autres appareils, il faut recouvrir la solution de PCR de 20 μ L d'huile.

2 Purification de l'ADN

Nous utilisons deux méthodes pour purifier l'ADN : (1) une filtration sur colonne, qui sépare les ADN en fonction de leur taille et permet de changer de tampon et/ou (2) une re-précipitation qui permet de retirer le sel (et les protéines pour le Sevag) mais qui ne filtre pas l'ADN en fonction de sa taille.

Pour la filtration sur colonnes, nous utilisons la protocole fourni avec les ChromaSpin (BD Biosciences).

Nous allons détailler le protocole des re-précipitations.

2.1 Re-précipitation à l'éthanol

Le but de cette purification est de précipiter l'ADN (sous forme solide), tout en laissant les ions en solution. Nous utilisons d'abord de l'éthanol à 95 % pour précipiter l'ADN, puis de l'éthanol à 80 % pour dissoudre les ions.

Ce protocole est réalisé dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.

1. Ajouter à la solution d'ADN 4 μL de glycogène pour 10 μg d'ADN (le glycogène va faciliter la précipitation de l'ADN).
2. Ajouter du NaCl 5 M pour avoir une concentration finale de 1 M NaCl. Mélanger au vortex.
3. Ajouter 2,5 volumes d'éthanol à 95 %. Mélanger au vortex. Mettre les tubes à -80°C pendant 10 min.
4. Centrifuger 10 min à 13500 tr/min, à 4°C .
5. Vider très rapidement les tubes en s'assurant que le précipité reste accroché au tube. Ajouter 1 mL d'éthanol à 80 %.
6. Vider rapidement les tubes. Cette étape est délicate car le précipité a tendance à se décoller.
7. Sécher sous vide (Speed-Vac) jusqu'à évaporation de l'éthanol.
8. Resuspendre dans le volume souhaité de TE.

2.2 Sevag

Cette purification permet à la fois de séparer l'ADN des ions, mais aussi de déprotéiner la solution. Nous travaillons en général avec un volume initial d'ADN de 300 μL dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.

1. Ajouter 0,1 volume de SDS 10 % à la solution d'ADN et 4 volumes de NaCl 5 M (la concentration finale est de 1 M). Mélanger au vortex. Chauffer 5 min à 37°C pour faire disparaître le précipité.

2. Ajouter un volume de mélange chloroforme/alcool isoamilique. Mélanger au vortex à vitesse maximale pendant 2 min.
3. Centrifuger à 13500 tr/min à 4°C pendant 4 min.
4. Prélever le surnageant. Ajouter 5 μL d'acrylamide puis 2,5 volumes d'éthanol à 95 %. Mélanger au vortex. Mettre à - 80°C pendant 10 min.
5. Centrifuger 10 min à 13500 tr/min à température ambiante. Vider rapidement les tubes.
6. Ajouter 1 mL d'éthanol à 80 %. Vider rapidement les tubes.
7. Sécher sous vide puis resuspendre dans le volume de TE souhaité.

ANNEXE D

Déroulement des expériences de pinces magnétiques

Nous allons détailler la mise en oeuvre d'une expérience de pinces magnétiques.

1 Fixation de la chromatine aux billes magnétiques

Avant chaque expérience, nous incubons les fibres de nucléosomes préalablement reconstituées avec des billes magnétiques recouvertes de streptavidine :

1. Les billes Dynal-M280-Streptavidine ($10 \mu\text{L}$) sont rincées deux fois avec $100 \mu\text{L}$ de tampon TE - BSA 1X - NaCl 50 mM. Les billes sont séparées du surnageant après chaque rinçage à l'aide d'un séparateur magnétique.
2. Les billes sont resuspendues dans $10 \mu\text{L}$ du même tampon et ajoutées délicatement sur environ $0,5 \mu\text{L}$ (6 ng) de chromatine. Ce volume est à adapter à chaque reconstitution afin d'avoir au maximum une molécule de chromatine par bille.
L'ensemble est mélangé au cône puis incubé 2 minutes.
3. Les {billes + chromatine} sont aspirées dans la cellule à un débit de $400 \mu\text{L}/\text{h}$. Dès qu'elles ont atteint une concentration importante dans le canal, le flux est arrêté. L'incubation dure environ 30 min.
4. Les billes non accrochées à la surface sont rincées avec un tampon TE - BSA 1X pendant environ 20 min à un flux de $250 \mu\text{L}/\text{h}$ (le flux est arrêté quand il reste peu de billes en suspension - non accrochées - dans la cellule).

2 Recherche des molécules

Nous souhaitons trouver des molécules de chromatine surenroulables (qui n'ont pas de cassure simple-brin, donc qui peuvent être soumises à une contrainte de rotation).

1. La force est mise à environ 0,3 pN (position des aimants entre $Z = 18$ et 19 mm). On applique alors - 30 tours à la molécule.

La longueur d'une molécule non surenroulable ne varie pas avec la rotation imposée, tandis qu'une molécule surenroulable étudiée en rotation négative forme des plectonèmes à faible force et est dénaturée à haute force. La longueur de la molécule surenroulable, pour une rotation négative donnée, est très différente entre basse et haute forces.

En revanche, une molécule surenroulable ne peut pas former de plectonèmes et sa différence de longueur entre basse et haute forces est faible.

2. Nous appliquons successivement une "grande" force (1-2 pN ; $Z \sim 20,5$ mm) puis une faible force (0,3 pN) et nous vérifions si la longueur diminue brutalement du fait de la formation de plectonèmes.
3. Nous confirmons que la molécule est surenroulable en faisant un aller-retour entre - 30 et + 30 tours et en observant "à l'oeil" si elle tombe à la surface lorsque les contraintes sont importantes.

Une fois la molécule trouvée, nous pouvons l'étudier et tracer des courbes longueur-rotation ou longueur-force.

ANNEXE E

Ajustement des réponses extension-rotation

1 Equations mises en jeu

L'ajustement des courbes extension-rotation est basé sur l'équilibre entre les différents états accessibles aux nucléosomes. Ces états sont au nombre de quatre pour le nucléosome : l'état croisé négatif, l'état ouvert, l'état croisé positif et le réversible. La suppression de l'état ouvert par l'interaction avec l'histone de liaison implique que le chromatosome peut exister sous trois formes différentes.

Les transitions entre les états se déroulent dans deux régimes distincts. Tout d'abord pour les faibles déformations topologiques, le couple appliqué est suffisant pour modifier l'état de croisement des ADN entrant et sortant. Ensuite, pour les fortes déformations topologiques le fort couple déclenche la transition chirale du nucléosome.

A faible déformation, donc bas couple, l'équilibre entre les états de croisements des ADN entrant et sortant est modifié par rapport à la configuration à couple nul. On suppose que pour chaque déformation à température et force constante, l'équilibre thermodynamique est atteint. On tire donc de la statistique de Boltzmann la probabilité de chaque état a (où $a=n, o, p$ pour négatif, ouvert et positif)¹ :

$$P_a(C) = \frac{e^{\frac{F_a - CLk_a}{k_B T}}}{Z} \quad (\text{E.1})$$

1. Pour le chromatosome l'état ouvert est rendu inaccessible.

Avec F_a l'énergie libre de l'état a , Lk_a sa déformation topologique à couple nul et Z la fonction de partition du système.

La connaissance du nombre total N de particules présentes sur la fibre donne accès au nombre n_a de particules dans chacun des états par $n_a = NP_a(C)$.

Malheureusement, le couple appliqué à la fibre ne peut pas être mesuré dans notre système. Le paramètre de contrôle est la déformation topologique Lk appliquée par la rotation des aimants. Elle peut s'exprimer de la manière suivante :

$$Lk = \sum_a n_a Lk_a + Tw_{DNA} + Wr_{DNA} = \sum_a n_a Lk_a + \frac{\ell C}{2\pi Lp_{twist} k_B T} + W(C) \quad (\text{E.2})$$

Avec ℓ la longueur d'ADN nu dans la fibre, Lp_{twist} sa longueur de persistance en courbure et $W(C)$ son vrillage.

Considérons le réversible. A bas couple cette particule est instable car son énergie est bien supérieure à celle des trois autres états. Sa stabilité augmente avec le couple, on peut écrire son enthalpie libre sous la forme suivante $F_r - CLk_r$. L'effet du couple sur la stabilité du réversible est même accentué par le fait que la déformation topologique de cette particule dépend du couple. On peut écrire $Lk_r = Lk_{r0} + bC$, le modèle à deux angles donne $b = 0.02/k_B T$. On peut donc réécrire l'enthalpie libre sous la forme $F_r - CLk_{r0} - bC^2$.

La stabilisation par le couple ne suffit pas à expliquer l'hystérésis, pour cela il faut prendre en compte le blocage cinétique dû à la grande barrière d'énergie. Cette barrière est en relation avec l'énergie requise pour briser les domaines d'accrochage des dimères. Cela implique donc que la transition est sous contrôle cinétique, la probabilité d'existence du réversible P_r augmente donc avec le temps. L'équation cinétique correspondante est donc de la forme :

$$\frac{dP_r}{dt} = k_1 P_r - k_{-1} P_p \quad (\text{E.3})$$

Avec k_1 (resp k_{-1}) la constante de vitesse de la réaction croisé positif vers réversible (resp. réversible vers croisé positif). Ces constantes sont définies par les relations suivantes :

$$k_1 = k_0 \exp\left[-\frac{F_{tr} - F_p - 2\pi C(Lk_{tr} - Lk_p)}{k_B T}\right]$$

$$k_{-1} = k_0 \exp\left[-\frac{F_{tr} - F_r - 2\pi C(Lk_{tr} - Lk_r)}{k_B T}\right]$$

Le facteur pré-exponentielle k_0 est évalué à $3.10^6 s^{-1}$ [Bancaud *et al.*, 2007]. F_{tr} et Lk_{tr} font référence à l'enthalpie libre et à la déformation topologique de l'état de transition (entre le nucléosome croisé positif et le réversible). La relaxation du réversible vers l'état croisé négatif peut être suivi expérimentalement et donne accès à F_{tr} et aux constantes cinétiques. Lk_{tr} reste le seul paramètre ajustable.

2 Ajustement des données expérimentales

En pratique l'ajustement des données expérimentales se déroule de la façon suivante. Le couple est initialement fixé à 0, la résolution de l'équation E.1 donne alors accès à la distribution entre les états de croisements des ADN entrant et sortant pour une fibre non contrainte. On peut alors tirer de l'équation E.2 la déformation topologique totale de la fibre avec $C = 0$. La probabilité d'existence du réversible est quant à elle fixée initialement à zéro.

Ensuite Lk est augmenté d'un nombre donné, correspondant au nombre de tours effectués par les aimants dans les expériences. L'équation E.3 est alors intégrée sur une durée égale à celle de la mesure expérimentale de position de la bille pour donner accès à P_r .

Ce cycle est répété pour suivre l'évolution de la rotation des aimants au cours de l'expérience. A chaque pas le couple C et les probabilités (P_n , P_o , P_p et P_r) des états sont recalculés en résolvant les équations E.1, E.2 et E.3.

Cette procédure permet en outre d'ajuster l'extension de la fibre z_{fibre} . Pour cela il faut prendre en compte la contribution de la partie de la fibre ne portant pas de nucléosomes z_{ADN} et la contribution de la partie chromatinienne z_a pour chaque état nucléosomal. Ces longueurs sont calculées à l'aide de la description de Moroz et Nelson [Moroz et Nelson, 1997], en prenant en compte les longueurs de persistance Lp_i^2 et les longueurs de contour ℓ_i dans chaque état :

$$z_i = \ell_i * (1 - 1/2K_i) * (1 + 1/(8K_i)^2)$$

avec $K_i = \sqrt{Lp_i * F/k_B T}$ où F est la force appliquée.

L'extension de la fibre est alors de la forme :

$$z_{fibre} = z_{ADN} + \sum_a z_a P_a \quad (\text{E.4})$$

Lorsque le couple atteint une valeur critique C_c , cela déclenche la formation de plectonèmes, lors desquels la diminution de longueur de la fibre est proportionnelle aux nombres de tours appliqués. La pente de ce régime est un paramètre ajustable estimé à partir des données expérimentales. Le couple critique est estimé à partir de celui de l'ADN et est de la forme $C_c = 2\sqrt{Lp_{ADN} F k_B T}$ [Moroz et Nelson, 1997].

Ces considérations permettent d'estimer l'extension totale des fibres en fonction de la déformation topologique, donc d'ajuster les réponses extension-rotation comme on a pu le voir à la page 138.

2. Ces grandeurs sont estimées à partir des modèles analytiques développés dans [Ben-Haim et al., 2001].

Bibliographie

- [Abbondanzieri *et al.*, 2005] ABBONDANZIERI, E. A., GREENLEAF, W. J., SHAEVITZ, J. W., LANDICK, R. et BLOCK, S. M. (2005). Direct observation of base-pair stepping by rna polymerase. *Nature*, 438(7067):460–465.
- [Akey et Luger, 2003] AKEY, C. W. et LUGER, K. (2003). Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 13(1):6–14.
- [Allan *et al.*, 1980] ALLAN, J., STAYNOV, D. Z. et GOULD, H. (1980). Reversible dissociation of linker histone from chromatin with preservation of internucleosomal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(2):885–889.
- [Allemand, 1997] ALLEMAND, J.-F. (1997). *Micro-manipulation de molécules d'ADN isolées*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.
- [Allis *et al.*, 1986] ALLIS, C. D., RICHMAN, R., GOROVSKY, M. A., ZIEGLER, Y. S., TOUCHSTONE, B., BRADLEY, W. A. et COOK, R. G. (1986). hv1 is an evolutionarily conserved h2a variant that is preferentially associated with active genes. *J Biol Chem*, 261(4):1941–1948.
- [Ando *et al.*, 2001] ANDO, T., KODERA, N., TAKAI, E., MARUYAMA, D., SAITO, K. et TODA, A. (2001). A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22):12468–12472.
- [Angelov *et al.*, 2003] ANGELOV, D., MOLLA, A., PERCHE, P.-Y., HANS, F., CÔTÉ, J., KHOCHBIN, S., BOUVET, P. et DIMITROV, S. (2003). The histone variant macroh2a interferes with transcription factor binding and swi/snf nucleosome remodeling. *Mol Cell*, 11(4):1033–1041.
- [Arents *et al.*, 1991] ARENTS, G., BURLINGAME, R. W., WANG, B. C., LOVE, W. E. et MOUDRIANAKIS, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 a resolution : a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(22):10148–10152.
- [Arents et Moudrianakis, 1995] ARENTS, G. et MOUDRIANAKIS, E. N. (1995). The histone fold : a ubiquitous architectural motif utilized in dna compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(24):11170–11174.
- [Ashkin, 1997] ASHKIN, A. (1997). Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10):4853–4860.

- [Asturias *et al.*, 2002] ASTURIAS, F. J., CHUNG, W.-H., KORNBERG, R. D. et LORCH, Y. (2002). Structural analysis of the rsc chromatin-remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21):13477–13480.
- [Avery *et al.*, 1944] AVERY, O., MACLEOD, C. et MCCARTY, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.*, 79:137–159.
- [Bancaud, 2004] BANCAUD, A. (2004). *Dynamique et structure de fibres de chromatine individuelles*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.
- [Bancaud *et al.*, 2006] BANCAUD, A., Conde e SILVA, N., BARBI, M., WAGNER, G., ALLEMAND, J. F., MOZZICONACCI, J., LAVELLE, C., CROQUETTE, V., VICTOR, J. M., PRUNELL, A. et VIOVY, J. L. (2006). Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation. *Nat Struct Mol Biol.*, 13(5):444–50. Epub 2006 Apr 16.
- [Bancaud *et al.*, 2007] BANCAUD, A., WAGNER, G., CONDE, E. S. N., LAVELLE, C., WONG, H., MOZZICONACCI, J., BARBI, M., SIVOLOB, A., LE CAM, E., MOUAWAD, L., VIOVY, J. L., VICTOR, J. M. et PRUNELL, A. (2007). Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Mol Cell.*, 27(1):135–47.
- [Barbi *et al.*, 2005] BARBI, M., MOZZICONACCI, J. et VICTOR, J. M. (2005). How the chromatin fiber deals with topological constraints. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, 71(3 Pt 1):031910. Epub 2005 Mar 23.
- [Becker et Hörz, 2002] BECKER, P. B. et HÖRZ, W. (2002). Atp-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, 71:247–273.
- [Ben-Haim *et al.*, 2001] BEN-HAIM, E., LESNE, A. et VICTOR, J. M. (2001). Chromatin : a tunable spring at work inside chromosomes. *Phys. Rev. E*, 64:051921 :1–19.
- [Bensimon *et al.*, 1994] BENSIMON, A., SIMON, A., CHIFFAUDEL, A., CROQUETTE, V., HESLOT, F. et BENSIMON, D. (1994). Alignment and sensitive detection of dna by a moving interface. *Science*, 265(5181):2096–2098.
- [Binnig *et al.*, 1986] BINNIG, QUATE et GERBER (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56(9):930–933.
- [Black et Bassett, 2008] BLACK, B. E. et BASSETT, E. A. (2008). The histone variant cenp-a and centromere specification. *Curr Opin Cell Biol*, 20(1):91–100.
- [Block *et al.*, 1990] BLOCK, S. M., GOLDSTEIN, L. S. et SCHNAPP, B. J. (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*, 348(6299):348–352.
- [Bonenfant *et al.*, 2006] BONENFANT, D., COULOT, M., TOWBIN, H., SCHINDLER, P. et van OOSTRUM, J. (2006). Characterization of histone h2a and h2b variants and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 5(3):541–552.
- [Bouchiat et Mezard, 1998] BOUCHIAT, C. et MEZARD, M. (1998). Elasticity model of a supercoiled DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 80:1556–59.

- [Bouchiat *et al.*, 1999] BOUCHIAT, C., WANG, M. D., ALLEMAND, J., STRICK, T., BLOCK, S. M. 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.
- [Brotherton *et al.*, 1989] BROTHERTON, T. W., JAGANNADHAM, M. V. et GINDER, G. D. (1989). Heparin binds to intact mononucleosomes and induces a novel unfolded structure. *Biochemistry*, 28:3518–25.
- [Brower-Toland *et al.*, 2002] BROWER-TOLAND, B. D., SMITH, C. L., YEH, R. C., LIS, J. T., PETERSON, C. L. et WANG, M. D. (2002). Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of dna. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(4):1960–5.
- [Bruce *et al.*, 2005] BRUCE, K., MYERS, F. A., MANTOUVALOU, E., LEFEVRE, P., GREAVES, I., BONIFER, C., TREMETHICK, D. J., THORNE, A. W. et CRANE-ROBINSON, C. (2005). The replacement histone h2a.z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic Acids Res*, 33(17):5633–5639.
- [Bustamante *et al.*, 1994] BUSTAMANTE, C., MARKO, J. F., SIGGIA, E. D. et SMITH, S. (1994). Entropic elasticity of lambda-phage dna. *Science*, 265(5178):1599–1600.
- [Bustamante *et al.*, 2000] BUSTAMANTE, C., SMITH, S. B., LIPHARDT, J. et SMITH, D. (2000). Single-molecule studies of dna mechanics. *Curr Opin Struct Biol*, 10(3):279–285.
- [Cairns, 2007] CAIRNS, B. R. (2007). Chromatin remodeling : insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol*, 14(11):989–996.
- [Cairns *et al.*, 1996] CAIRNS, B. R., LORCH, Y., LI, Y., ZHANG, M., LACOMIS, L., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., DU, J., LAURENT, B. et KORNBERG, R. D. (1996). Rsc, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87(7):1249–1260.
- [Carruthers *et al.*, 1998] CARRUTHERS, L. M., BEDNAR, J., WOODCOCK, C. L. et HANSEN, J. C. (1998). Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays : mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, 37(42):14776–14787.
- [Celeste *et al.*, 2003] CELESTE, A., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., KRHLAK, M. J., PILCH, D. R., STAUDT, D. W., LEE, A., BONNER, R. F., BONNER, W. M. et NUSSENZWEIG, A. (2003). Histone h2ax phosphorylation is dispensable for the initial recognition of dna breaks. *Nat Cell Biol*, 5(7):675–679.
- [Chadwick et Willard, 2001] CHADWICK, B. P. et WILLARD, H. F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone h2a, is largely excluded from the inactive x chromosome. *J Cell Biol*, 152(2):375–384.
- [Cluzel *et al.*, 1996] CLUZEL, P., LEBRUN, A., HELLER, C., LAVERY, R., VIOVY, J., CHATENAY, D. et CARON, F. (1996). DNA : an extensible molecule. *Science*, 271:792–94.
- [Cocco *et al.*, 2002] COCCO, S., MARKO, J. F. et MONASSON, R. (2002). Theoretical models for single-molecule DNA and RNA experiments : from elasticity to unzipping. *C. R. Physique*, 3:569–84.

- [Daban, 2000] DABAN, J. R. (2000). Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. local concentration of dna versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochemistry*, 39(14):3861–3866.
- [Dang *et al.*, 2007] DANG, W., KAGALWALA, M. N. et BARTHOLOMEW, B. (2007). The dpb4 subunit of isw2 is anchored to extranucleosomal dna. *J Biol Chem*, 282(27):19418–19425.
- [De Lucia *et al.*, 1999] DE LUCIA, F., ALILAT, M., SIVOLOB, A. et PRUNELL, A. (1999). Nucleosome dynamics. III. Histone tail-dependent fluctuation of nucleosomes between open and closed DNA conformations. Implications for chromatin dynamics and the linking number paradox. A relaxation study of mononucleosomes on DNA minicircles. *J. Mol. Biol.*, 285:1101–19.
- [Dechassa *et al.*, 2008] DECHASSA, M. L., ZHANG, B., HOROWITZ-SCHERER, R., PERSINGER, J., WOODCOCK, C. L., PETERSON, C. L. et BARTHOLOMEW, B. (2008). Architecture of the swi/snf-nucleosome complex. *Mol Cell Biol*, 28(19):6010–6021.
- [Degiorgio *et al.*, 1991] DEGIORGIO, V., MANTEGAZZA, F. et PIAZZA, R. (1991). Transient electric birefringence measurement of the persistence length of sodium polystyrene sulfonate. *Europhys. Lett.*, 15:75–80.
- [DeLange *et al.*, 1969] DELANGE, R. J., FAMBROUGH, D. M., SMITH, E. L. et BONNER, J. (1969). Calf and pea histone iv. 3. complete amino acid sequence of pea seedling histone iv; comparison with the homologous calf thymus histone. *J Biol Chem*, 244(20):5669–5679.
- [Dessinges *et al.*, 2004] DESSINGES, M.-N., LIONNET, T., XI, X. G., BENSIMON, D. et CROQUETTE, V. (2004). Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of uvrD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17):6439–6444.
- [Deuring *et al.*, 2000] DEURING, R., FANTI, L., ARMSTRONG, J. A., SARTE, M., PAPOULAS, O., PRESTEL, M., DAUBRESSE, G., VERARDO, M., MOSELEY, S. L., BERLOCO, M., TSUKIYAMA, T., WU, C., PIMPINELLI, S. et TAMKUN, J. W. (2000). The iswi chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell*, 5(2):355–365.
- [Dilworth *et al.*, 1987] DILWORTH, S. M., BLACK, S. J. et LASKEY, R. A. (1987). Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro : role of nucleoplasmin and n1 in xenopus egg extracts. *Cell*, 51(6):1009–1018.
- [Doi et Edwards, 1992] DOI, M. et EDWARDS, S. F. (1992). *The theory of polymer dynamics*. Oxford University Press, Oxford.
- [Doyen *et al.*, 2006] DOYEN, C.-M., AN, W., ANGELOV, D., BONDARENKO, V., MIETTON, F., STUDITSKY, V. M., HAMICHE, A., ROEDER, R. G., BOUVET, P. et DIMITROV, S. (2006). Mechanism of polymerase ii transcription repression by the histone variant macroh2a. *Mol Cell Biol*, 26(3):1156–1164.
- [Draves *et al.*, 1992] DRAVES, P. H., LOWARY, P. T. et WIDOM, J. (1992). Co-operative binding of the globular domain of histone h5 to dna. *J Mol Biol*, 225(4):1105–1121.

- [Dunleavy *et al.*, 2009] DUNLEAVY, E. M., ROCHE, D., TAGAMI, H., LACOSTE, N., RAY-GALLET, D., NAKAMURA, Y., DAIGO, Y., NAKATANI, Y. et ALMOUZNI-PETTINOTTI, G. (2009). Hjurp is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of cenp-a at centromeres. *Cell*, 137(3):485–497.
- [e Silva *et al.*, 2007] e SILVA, N. C., BLACK, B. E., SIVOLOB, A., FILIPSKI, J., CLEVELAND, D. W. et PRUNELL, A. (2007). Cenp-a-containing nucleosomes : easier disassembly versus exclusive centromeric localization. *J Mol Biol*, 370(3):555–573.
- [Engelhardt, 2007] ENGELHARDT, M. (2007). Choreography for nucleosomes : the conformational freedom of the nucleosomal filament and its limitations. *Nucleic Acids Res.*, 35(16):e106. Epub 2007 Aug 17.
- [Finch et Klug, 1976] FINCH, J. T. et KLUG, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(6):1897–1901.
- [Flanagan *et al.*, 2005] FLANAGAN, J. F., MI, L.-Z., CHRUSZCZ, M., CYMBOROWSKI, M., CLINES, K. L., KIM, Y., MINOR, W., RASTINEJAD, F. et KHORASANIZADEH, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone h3 tail. *Nature*, 438(7071):1181–1185.
- [Flanagan et Peterson, 1999] FLANAGAN, J. F. et PETERSON, C. L. (1999). A role for the yeast swi/snf complex in dna replication. *Nucleic Acids Res*, 27(9):2022–2028.
- [Florin *et al.*, 1994] FLORIN, E. L., MOY, V. T. et GAUB, H. E. (1994). Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157):415–417.
- [Flory, 1989] FLORY, P. J. (1989). *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. Hanser, Munich.
- [Foltz *et al.*, 2009] FOLTZ, D. R., JANSEN, L. E. T., BAILEY, A. O., YATES, J. R., BASSETT, E. A., WOOD, S., BLACK, B. E. et CLEVELAND, D. W. (2009). Centromere-specific assembly of cenp-a nucleosomes is mediated by hjurp. *Cell*, 137(3):472–484.
- [Fuller *et al.*, 2006] FULLER, D. N., GEMMEN, G. J., RICKGAUER, J. P., DUPONT, A., MILLIN, R., RECOUVREUX, P. et SMITH, D. E. (2006). A general method for manipulating dna sequences from any organism with optical tweezers. *Nucleic Acids Res*, 34(2):e15.
- [Furuyama et Henikoff, 2009] FURUYAMA, T. et HENIKOFF, S. (2009). Centromeric nucleosomes induce positive dna supercoils. *Cell*, 138(1):104–113.
- [Fyodorov *et al.*, 2004] FYODOROV, D. V., BLOWER, M. D., KARPEN, G. H. et KADONAGA, J. T. (2004). Acf1 confers unique activities to acf/chrac and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo. *Genes Dev*, 18(2):170–183.
- [Gangaraju et Bartholomew, 2007] GANGARAJU, V. K. et BARTHOLOMEW, B. (2007). Dependency of isw1a chromatin remodeling on extranucleosomal dna. *Mol Cell Biol*, 27(8):3217–3225.
- [Garcia-Ramirez *et al.*, 1995] GARCIA-RAMIREZ, M., ROCCHINI, C. et AUSIO, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem*, 270(30):17923–17928.

- [Gemmen *et al.*, 2005] GEMMEN, G. J., SIM, R., HAUSHALTER, K. A., KE, P. C., KADONAGA, J. T. et SMITH, D. E. (2005). Forced unraveling of nucleosomes assembled on heterogeneous dna using core histones, nap-1, and acf. *J Mol Biol*, 351(1):89–99.
- [Germond *et al.*, 1976] GERMOND, J. E., BELLARD, M., OUDET, P. et CHAMBON, P. (1976). Stability of nucleosomes in native and reconstituted chromatins. *Nucleic Acids Res*, 3(11):3173–3192.
- [Godde et Ura, 2008] GODDE, J. S. et URA, K. (2008). Cracking the enigmatic linker histone code. *J Biochem*, 143(3):287–293.
- [Gordon *et al.*, 2005] GORDON, F., LUGER, K. et HANSEN, J. C. (2005). The core histone n-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays. *J Biol Chem*, 280(40):33701–33706.
- [Gottesfeld et Luger, 2001] GOTTESFELD, J. M. et LUGER, K. (2001). Energetics and affinity of the histone octamer for defined dna sequences. *Biochemistry*, 40(37):10927–10933.
- [Goytisolo *et al.*, 1996] GOYTISOLO, F. A., GERCHMAN, S. E., YU, X., REES, C., GRAZIANO, V., RAMAKRISHNAN, V. et THOMAS, J. O. (1996). Identification of two dna-binding sites on the globular domain of histone h5. *EMBO J*, 15(13):3421–3429.
- [Grigoryev *et al.*, 2009] GRIGORYEV, S. A., ARYA, G., CORRELL, S., WOODCOCK, C. L. et SCHLICK, T. (2009). Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [Hake *et al.*, 2006] HAKE, S. B., GARCIA, B. A., DUNCAN, E. M., KAUER, M., DELLAIRE, G., SHABANOWITZ, J., BAZETT-JONES, D. P., ALLIS, C. D. et HUNT, D. F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone h3 variants. *J Biol Chem*, 281(1):559–568.
- [Hamiche *et al.*, 1996a] HAMICHE, A., CAROT, V., ALILAT, M., DE LUCIA, F., O'DONOHUE, M. F., REVET, B. et PRUNELL, A. (1996a). Interaction of the histone (h3-h4)₂ tetramer of the nucleosome with positively supercoiled dna minicircles : Potential flipping of the protein from a left- to a right-handed superhelical form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(15):7588–93.
- [Hamiche *et al.*, 1996b] HAMICHE, A., SCHULTZ, P., RAMAKRISHNAN, V., OUDET, P. et PRUNELL, A. (1996b). Linker histone-dependent dna structure in linear mononucleosomes. *J Mol Biol*, 257(1):30–42.
- [Harp *et al.*, 2000] HARP, J. M., HANSON, B. L., TIMM, D. E. et BUNICK, G. J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 a resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 12):1513–1534.
- [Havas *et al.*, 2000] HAVAS, K., FLAUS, A., PHELAN, M., KINGSTON, R., WADE, P. A., LILLEY, D. M. et OWEN-HUGHES, T. (2000). Generation of superhelical torsion by atp-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103(7):1133–1142.
- [Hayes *et al.*, 1990] HAYES, J. J., TULLIUS, T. D. et WOLFFE, A. P. (1990). The structure of dna in a nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(19):7405–7409.

- [Hewish et Burgoyne, 1973] HEWISH, D. R. et BURGOYNE, L. A. (1973). Chromatin substructure. the digestion of chromatin dna at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, 52(2):504–510.
- [Hodges *et al.*, 2009] HODGES, C., BINTU, L., LUBKOWSKA, L., KASHLEV, M. et BUSTAMANTE, C. (2009). Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of rna polymerase ii. *Science*, 325(5940):626–628.
- [Holstege *et al.*, 1998] HOLSTEGE, F. C., JENNINGS, E. G., WYRICK, J. J., LEE, T. I., HENGARTNER, C. J., GREEN, M. R., GOLUB, T. R., LANDER, E. S. et YOUNG, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95(5):717–728.
- [Howard, 1997] HOWARD, J. (1997). Molecular motors : structural adaptations to cellular functions. *Nature*, 389(6651):561–567.
- [Huynh *et al.*, 2005] HUYNH, V. A., ROBINSON, P. J. et RHODES, D. (2005). A method for the in vitro reconstitution of a defined "30 nm" chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. *J Mol Biol.*, 345(5):957–68. Epub 2004 Dec 7.
- [Jackson *et al.*, 1990a] JACKSON, D. A., DICKINSON, P. et COOK, P. R. (1990a). Attachment of dna to the nucleoskeleton of hela cells examined using physiological conditions. *Nucleic Acids Res*, 18(15):4385–4393.
- [Jackson *et al.*, 1990b] JACKSON, D. A., DICKINSON, P. et COOK, P. R. (1990b). The size of chromatin loops in hela cells. *EMBO J*, 9(2):567–571.
- [Jaskelioff *et al.*, 2003] JASKELIOFF, M., KOMEN, S. V., KREBS, J. E., SUNG, P. et PETERSON, C. L. (2003). Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex dna joint formation with chromatin. *J Biol Chem*, 278(11):9212–9218.
- [Jenuwein et Allis, 2001] JENUWEIN, T. et ALLIS, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532):1074–1080.
- [Khochbin et Wolffe, 1994] KHOCHBIN, S. et WOLFFE, A. P. (1994). Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. *Eur J Biochem*, 225(2):501–510.
- [Koopmans *et al.*, 2007] KOOPMANS, W. J., BREHM, A., LOGIE, C., SCHMIDT, T. et van NOORT, J. (2007). Single-pair fret microscopy reveals mononucleosome dynamics. *J Fluoresc.*, 17(6):785–95. Epub 2007 Jul 4.
- [Kornberg, 1974] KORNBERG, R. D. (1974). Chromatin structure : a repeating unit of histones and dna. *Science*, 184(139):868–871.
- [Kornberg et Klug, 1981] KORNBERG, R. D. et KLUG, A. (1981). The nucleosome. *Sci Am*, 244(2):52–64.
- [Kornberg et Thomas, 1974] KORNBERG, R. D. et THOMAS, J. O. (1974). Chromatin structure ; oligomers of the histones. *Science*, 184(139):865–868.
- [Kouzarides, 2007] KOUZARIDES, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4):693–705.

- [Kouzine *et al.*, 2008] KOUZINE, F., SANFORD, S., ELISHA-FEIL, Z. et LEVENS, D. (2008). The functional response of upstream dna to dynamic supercoiling in vivo. *Nat Struct Mol Biol.*, 15(2):146–54. Epub 2008 Jan 13.
- [Krogan *et al.*, 2004] KROGAN, N. J., BAETZ, K., KEOGH, M.-C., DATTA, N., SAWA, C., KWOK, T. C. Y., THOMPSON, N. J., DAVEY, M. G., POOTOOLAL, J., HUGHES, T. R., EMILI, A., BURATOWSKI, S., HIETER, P. et GREENBLATT, J. F. (2004). Regulation of chromosome stability by the histone h2a variant htz1, the swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase nua4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(37):13513–13518.
- [Kruithof *et al.*, 2008] KRUIHOF, M., CHIEN, F., de JAGER, M. et van NOORT, J. (2008). Subpiconewton dynamic force spectroscopy using magnetic tweezers. *Biophys J.*, 94(6):2343–8. Epub 2007 Dec 7.
- [Kruithof *et al.*, 2009] KRUIHOF, M., CHIEN, F. T., ROUTH, A., LOGIE, C., RHODES, D. et van NOORT, J. (2009). Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol*, 19:19.
- [Lavelle, 2002] LAVELLE, C. (2002). *POLYMORPHISME STRUCTURAL ET DYNAMIQUE DU NUCLEOSOME : influence de la séquence d'ADN*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie.
- [Lavelle, 2009] LAVELLE, C. (2009). Forces and torques in the nucleus : chromatin under mechanical constraints. *Biochem Cell Biol*, 87(1):307–322.
- [Le Bret, 1988] LE BRET, M. (1988). Computation of the helical twist of nucleosomal DNA. *J. Mol. Biol.*, 200:285–90.
- [Leschziner *et al.*, 2007] LESCHZINER, A. E., SAHA, A., WITTMAYER, J., ZHANG, Y., BUSTAMANTE, C., CAIRNS, B. R. et NOGALES, E. (2007). Conformational flexibility in the chromatin remodeler rsc observed by electron microscopy and the orthogonal tilt reconstruction method. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(12):4913–8. Epub 2007 Mar 13.
- [Levchenko et Jackson, 2004] LEVCHENKO, V. et JACKSON, V. (2004). Histone release during transcription : Nap1 forms a complex with h2a and h2b and facilitates a topologically dependent release of h3 and h4 from the nucleosome. *Biochemistry*, 43(9):2359–2372.
- [Li *et al.*, 2005] LI, G., LEVITUS, M., BUSTAMANTE, C. et WIDOM, J. (2005). Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal dna. *Nat Struct Mol Biol.*, 12(1):46–53. Epub 2004 Dec 5.
- [Li et Widom, 2004] LI, G. et WIDOM, J. (2004). Nucleosomes facilitate their own invasion. *Nat Struct Mol Biol*, 11(8):763–769.
- [Lia *et al.*, 2006] LIA, G., PRALY, E., FERREIRA, H., STOCKDALE, C., TSE-DINH, Y. C., DUNLAP, D., CROQUETTE, V., BENSIMON, D. et OWEN-HUGHES, T. (2006). Direct observation of dna distortion by the rsc complex. *Mol Cell*, 21(3):417–425.
- [Liu et Wang, 1987] LIU, L. F. et WANG, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7024–7.

- [Längst et Becker, 2001] LÄNGST, G. et BECKER, P. B. (2001). Nucleosome mobilization and positioning by iswi-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci*, 114(Pt 14):2561–2568.
- [Längst et al., 1999] LÄNGST, G., BONTE, E. J., CORONA, D. F. et BECKER, P. B. (1999). Nucleosome movement by chrac and iswi without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell*, 97(7):843–852.
- [Lowary et Widom, 1998] LOWARY, P. T. et WIDOM, J. (1998). New dna sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J Mol Biol.*, 276(1):19–42.
- [Luger et al., 1997] LUGER, K., MADER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. et RICHMOND, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 a resolution. *Nature.*, 389(6648):251–60.
- [Luger et Richmond, 1998] LUGER, K. et RICHMOND, T. J. (1998). Dna binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol*, 8(1):33–40.
- [Malik et Henikoff, 2003] MALIK, H. S. et HENIKOFF, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, 10(11):882–891.
- [Mallik et al., 2004] MALLIK, R., CARTER, B. C., LEX, S. A., KING, S. J. et GROSS, S. P. (2004). Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature*, 427(6975):649–652.
- [Marko et Siggia, 1995] MARKO, J. et SIGGIA, E. (1995). Streching DNA. *Macromolecules*, 28:8759–70.
- [McCauley et al., 2005] MCCAULEY, M., HARDWIDGE, P. R., MAHER, L. J., r. et WILLIAMS, M. C. (2005). Dual binding modes for an hmg domain from human hmg2 on dna. *Biophys J.*, 89(1):353–64. Epub 2005 Apr 15.
- [Meneghini et al., 2003] MENEGHINI, M. D., WU, M. et MADHANI, H. D. (2003). Conserved histone variant h2a.z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*, 112(5):725–736.
- [Mihardja et al., 2006] MIHARDJA, S., SPAKOWITZ, A. J., ZHANG, Y. et BUSTAMANTE, C. (2006). Effect of force on mononucleosomal dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43):15871–15876.
- [Mizuguchi et al., 2004] MIZUGUCHI, G., SHEN, X., LANDRY, J., WU, W.-H., SEN, S. et WU, C. (2004). Atp-driven exchange of histone h2az variant catalyzed by swr1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303(5656):343–348.
- [Müller et al., 1999] MÜLLER, D. J., FOTIADIS, D., SCHEURING, S., MÜLLER, S. A. et ENGEL, A. (1999). Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophys J*, 76(2):1101–1111.
- [Molloy et al., 1995] MOLLOY, J. E., BURNS, J. E., KENDRICK-JONES, J., TREGGAR, R. T. et WHITE, D. C. (1995). Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*, 378(6553):209–212.

- [Montel, 2008] MONTEL, F. (2008). *Dynamique à l'équilibre et hors-équilibre de la chromatine visualisée par Microscopie à Force Atomique : effet des variants d'histone et des facteurs de remodelage*. Thèse de doctorat, Université de Lyon 1 - Ecole Normale Supérieure de Lyon.
- [Montel *et al.*, 2007] MONTEL, F., FONTAINE, E., ST-JEAN, P., CASTELNOVO, M. et FAIVRE-MOSKALENKO, C. (2007). Atomic force microscopy imaging of swi/snf action : mapping the nucleosome remodeling and sliding. *Biophys J.*, 93(2):566–78. Epub 2007 Apr 27.
- [Moreira et Holmberg, 1998] MOREIRA, J. M. et HOLMBERG, S. (1998). Nucleosome structure of the yeast *cha1* promoter : analysis of activation-dependent chromatin remodeling of an rna-polymerase-ii-transcribed gene in *tbp* and *rna pol ii* mutants defective in vivo in response to acidic activators. *EMBO J*, 17(20):6028–6038.
- [Morillon *et al.*, 2003] MORILLON, A., KARABETSOU, N., O'SULLIVAN, J., KENT, N., PROUDFOOT, N. et MELLOR, J. (2003). Isw1 chromatin remodeling atpase coordinates transcription elongation and termination by rna polymerase ii. *Cell*, 115(4):425–435.
- [Moroz et Nelson, 1997] MOROZ, J. D. et NELSON, P. (1997). Torsional directed walks, entropic elasticity, and dna twist stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(26):14418–22.
- [Nakagawa *et al.*, 2001] NAKAGAWA, T., BULGER, M., MURAMATSU, M. et ITO, T. (2001). Multistep chromatin assembly on supercoiled plasmid dna by nucleosome assembly protein-1 and atp-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *J Biol Chem*, 276(29):27384–27391.
- [Odijk, 1995] ODIJK, T. (1995). Stiff chains and filaments under tension. *Macromolecules*, 28:7016–7018.
- [Okada et Hirose, 1998] OKADA, M. et HIROSE, S. (1998). Chromatin remodeling mediated by drosophila gaga factor and iswi activates fushi tarazu gene transcription in vitro. *Mol Cell Biol*, 18(5):2455–2461.
- [Oudet *et al.*, 1975] OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. et CHAMBON, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4(4):281–300.
- [Owen-Hughes *et al.*, 1996] OWEN-HUGHES, T., UTLEY, R. T., CÔTÉ, J., PETERSON, C. L. et WORKMAN, J. L. (1996). Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the swi/snf complex. *Science*, 273(5274):513–516.
- [Pankhurst *et al.*, 2003] PANKHURST, Q., CONNOLLY, J., JONES, S. et DOBSON, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 36:R167–R181.
- [Pehrson, 1989] PEHRSON, J. R. (1989). Thymine dimer formation as a probe of the path of dna in and between nucleosomes in intact chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23):9149–9153.
- [Pehrson et Fried, 1992] PEHRSON, J. R. et FRIED, V. A. (1992). MacroH2a, a core histone containing a large nonhistone region. *Science*, 257(5075):1398–1400.

- [Praly, 2009] PRALY, E. (2009). *Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine, à l'échelle de la molécule unique*. Thèse de doctorat, Université Paris Diderot, Paris 7.
- [Pray-Grant *et al.*, 2005] PRAY-GRANT, M. G., DANIEL, J. A., SCHIELTZ, D., YATES, J. R. et GRANT, P. A. (2005). Chd1 chromodomain links histone h3 methylation with saga- and slik-dependent acetylation. *Nature*, 433(7024):434–438.
- [Prunell, 1998] PRUNELL, A. (1998). A topological approach to nucleosome structure and dynamics : the linking number paradox and other issues. *Biophys J*, 74(5):2531–2544.
- [Pruss *et al.*, 1996] PRUSS, D., BARTHOLOMEW, B., PERSINGER, J., HAYES, J., ARENTS, G., MOUDRIANAKIS, E. N. et WOLFFE, A. P. (1996). An asymmetric model for the nucleosome : a binding site for linker histones inside the dna gyres. *Science*, 274(5287):614–617.
- [Puigdomènech *et al.*, 1983] PUIGDOMÈNECH, P., JOSÉ, M., RUIZ-CARRILLO, A. et CRANE-ROBINSON, C. (1983). Isolation of a 167 basepair chromatosome containing a partially digested histone h5. *FEBS Lett*, 154(1):151–155.
- [Raisner *et al.*, 2005] RAISNER, R. M., HARTLEY, P. D., MENEGHINI, M. D., BAO, M. Z., LIU, C. L., SCHREIBER, S. L., RANDO, O. J. et MADHANI, H. D. (2005). Histone variant h2a.z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, 123(2):233–248.
- [Raisner et Madhani, 2006] RAISNER, R. M. et MADHANI, H. D. (2006). Patterning chromatin : form and function for h2a.z variant nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 16(2):119–124.
- [Raymer et Smith, 2007] RAYMER, D. M. et SMITH, D. E. (2007). Spontaneous knotting of an agitated string. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(42):16432–16437.
- [Richmond et Davey, 2003] RICHMOND, T. J. et DAVEY, C. A. (2003). The structure of dna in the nucleosome core. *Nature.*, 423(6936):145–50.
- [Roberts et Orkin, 2004] ROBERTS, C. W. M. et ORKIN, S. H. (2004). The swi/snf complex–chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2):133–142.
- [Robinson et Rhodes, 2006] ROBINSON, P. J. et RHODES, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre : a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol.*, 16(3):336–43. Epub 2006 May 22.
- [Robinson *et al.*, 2006] ROBINSON, P. J. J., FAIRALL, L., HUYNH, V. A. T. et RHODES, D. (2006). Em measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber : evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17):6506–6511.
- [Routh *et al.*, 2008] ROUTH, A., SANDIN, S. et RHODES, D. (2008). Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 26:26. Using Smart Source Parsing Jun.
- [Rusche *et al.*, 2003] RUSCHE, L. N., KIRCHMAIER, A. L. et RINE, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem*, 72:481–516.

- [Ruthenburg *et al.*, 2007] RUTHENBURG, A. J., LI, H., PATEL, D. J. et ALLIS, C. D. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(12):983–994.
- [Saha *et al.*, 2002] SAHA, A., WITTMAYER, J. et CAIRNS, B. R. (2002). Chromatin remodeling by rsc involves atp-dependent dna translocation. *Genes Dev*, 16(16):2120–2134.
- [Saha *et al.*, 2005] SAHA, A., WITTMAYER, J. et CAIRNS, B. R. (2005). Chromatin remodeling through directional dna translocation from an internal nucleosomal site. *Nat Struct Mol Biol*, 12(9):747–755.
- [Saha *et al.*, 2006] SAHA, A., WITTMAYER, J. et CAIRNS, B. R. (2006). Chromatin remodelling : the industrial revolution of dna around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7(6):437–47.
- [Saragosti *et al.*, 1980] SARAGOSTI, S., MOYNE, G. et YANIV, M. (1980). Absence of nucleosomes in a fraction of SV40 chromatin between the origin of replication and the region coding for the late leader RNA. *Cell*, 20:65–73.
- [Sarma et Reinberg, 2005] SARMA, K. et REINBERG, D. (2005). Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2):139–149.
- [Schalch *et al.*, 2005] SCHALCH, T., DUDA, S., SARGENT, D. F. et RICHMOND, T. J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, 436(7047):138–141.
- [Schiessel, 2003] SCHIESEL, H. (2003). The physics of chromatin. *J Phys : Condens Matter*, 15:R699–R774.
- [Schlick *et al.*, 1994] SCHLICK, T., LI, B. et OLSON, W. K. (1994). The influence of salt on the structure and energetics of supercoiled dna. *Biophys J*, 67(6):2146–2166.
- [Schnitzler *et al.*, 2001] SCHNITZLER, G. R., CHEUNG, C. L., HAFNER, J. H., SAURIN, A. J., KINGSTON, R. E. et LIEBER, C. M. (2001). Direct imaging of human swi/snf-remodeled mono- and polynucleosomes by atomic force microscopy employing carbon nanotube tips. *Mol Cell Biol*, 21(24):8504–8511.
- [Schwarz *et al.*, 1996] SCHWARZ, P. M., FELTHAUSER, A., FLETCHER, T. M. et HANSEN, J. C. (1996). Reversible oligonucleosome self-association : dependence on divalent cations and core histone tail domains. *Biochemistry*, 35(13):4009–4015.
- [Segal *et al.*, 2006] SEGAL, E., FONDUFE-MITTENDORF, Y., CHEN, L., THASTROM, A., FIELD, Y., MOORE, I. K., WANG, J. P. et WIDOM, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature.*, 442(7104):772–8. Epub 2006 Jul 19.
- [Shao, 1999] SHAO, Z. (1999). Probing nanometer structures with atomic force microscopy. *News Physiol Sci*, 14:142–149.
- [Shen *et al.*, 2000] SHEN, X., MIZUGUCHI, G., HAMICHE, A. et WU, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and dna processing. *Nature*, 406(6795):541–544.

- [Shogren-Knaak *et al.*, 2006] SHOGREN-KNAAK, M., ISHII, H., SUN, J.-M., PAZIN, M. J., DAVIE, J. R. et PETERSON, C. L. (2006). Histone h4-k16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762):844–847.
- [Shure et Vinograd, 1976] SHURE, M. et VINOGRAD, J. (1976). The number of superhelical turns in native virion SV40 DNA and minicol DNA determined by the band counting method. *Cell*, 8:215–26.
- [Simpson, 1978] SIMPSON, R. T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of dna and all the histones. *Biochemistry*, 17(25):5524–5531.
- [Sivolob et Prunell, 2003] SIVOLOB, A. et PRUNELL, A. (2003). Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit dnas. *J Mol Biol.*, 331(5):1025–40.
- [Sivolob et Prunell, 2004] SIVOLOB, A. et PRUNELL, A. (2004). Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.*, 362(1820):1519–47.
- [Smith *et al.*, 2003] SMITH, C. L., HOROWITZ-SCHERER, R., FLANAGAN, J. F., WOODCOCK, C. L. et PETERSON, C. L. (2003). Structural analysis of the yeast swi/snf chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol*, 10(2):141–145.
- [Smith et Peterson, 2005] SMITH, C. L. et PETERSON, C. L. (2005). Atp-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol*, 65:115–148.
- [Smith *et al.*, 1996] SMITH, S. B., CUI, Y. et BUSTAMANTE, C. (1996). Overstretching b-dna : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded dna molecules. *Science.*, 271(5250):795–9.
- [Smith *et al.*, 1992] SMITH, S. B., FINZI, L. et BUSTAMANTE, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single dna molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085):1122–1126.
- [Srinivasan *et al.*, 2005] SRINIVASAN, S., ARMSTRONG, J. A., DEURING, R., DAHLSVEEN, I. K., MCNEILL, H. et TAMKUN, J. W. (2005). The drosophila trithorax group protein kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by rna polymerase ii. *Development*, 132(7):1623–1635.
- [Stokes *et al.*, 1996] STOKES, D. G., TARTOF, K. D. et PERRY, R. P. (1996). Chd1 is concentrated in interbands and puffed regions of drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14):7137–7142.
- [Strahl et Allis, 2000] STRAHL, B. D. et ALLIS, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765):41–45.
- [Strick *et al.*, 1996] STRICK, T. R., ALLEMAND, J. F., BENSIMON, D., BENSIMON, A. et CROQUETTE, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, 271:1835–7.
- [Strick *et al.*, 1999] STRICK, T. R., BENSIMON, D. et CROQUETTE, V. (1999). Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of DNA. *Genetica*, 106:57–62.

- [Stucki *et al.*, 2005] STUCKI, M., CLAPPERTON, J. A., MOHAMMAD, D., YAFFE, M. B., SMERDON, S. J. et JACKSON, S. P. (2005). Mdc1 directly binds phosphorylated histone h2ax to regulate cellular responses to dna double-strand breaks. *Cell*, 123(7):1213–1226.
- [Sudarsanam *et al.*, 2000] SUDARSANAM, P., IYER, V. R., BROWN, P. O. et WINSTON, F. (2000). Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7):3364–3369.
- [Sutherland et Bickmore, 2009] SUTHERLAND, H. et BICKMORE, W. A. (2009). Transcription factories : gene expression in unions ? *Nat Rev Genet*, 10(7):457–466.
- [Suto *et al.*, 2000] SUTO, R. K., CLARKSON, M. J., TREMETHICK, D. J. et LUGER, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone h2a.z. *Nat Struct Biol*, 7(12):1121–1124.
- [Thastrom *et al.*, 1999] THASTROM, A., LOWARY, P. T., WIDLUND, H. R., CAO, H., KUBISTA, M. et WIDOM, J. (1999). Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning dna sequences. *J Mol Biol.*, 288(2):213–29.
- [Thoma *et al.*, 1979] THOMA, F., KOLLER, T. et KLUG, A. (1979). Involvement of histone h1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, 83(2 Pt 1):403–427.
- [Thomas *et al.*, 1992] THOMAS, J. O., REES, C. et FINCH, J. T. (1992). Cooperative binding of the globular domains of histones h1 and h5 to dna. *Nucleic Acids Res*, 20(2):187–194.
- [Tsukiyama *et al.*, 1994] TSUKIYAMA, T., BECKER, P. B. et WU, C. (1994). Atp-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of gaga transcription factor. *Nature*, 367(6463):525–532.
- [Unhavaithaya *et al.*, 2002] UNHAVAITHAYA, Y., SHIN, T. H., MILIARAS, N., LEE, J., OYAMA, T. et MELLO, C. C. (2002). Mep-1 and a homolog of the nurd complex component mi-2 act together to maintain germline-soma distinctions in *c. elegans*. *Cell*, 111(7):991–1002.
- [van Attikum et Gasser, 2009] van ATTIKUM, H. et GASSER, S. M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the dna damage response. *Trends Cell Biol*, 19(5):207–217.
- [van Noort *et al.*, 2004] van NOORT, J., VERBRUGGE, S., GOOSEN, N., DEKKER, C. et DAME, R. T. (2004). Dual architectural roles of hu : formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(18):6969–6974.
- [Varga-Weisz *et al.*, 1997] VARGA-WEISZ, P. D., WILM, M., BONTE, E., DUMAS, K., MANN, M. et BECKER, P. B. (1997). Chromatin-remodelling factor chrc contains the atpases iswi and topoisomerase ii. *Nature*, 388(6642):598–602.
- [Wagner, 2006] WAGNER, G. (2006). *Etude de la dynamique de la chromatine par des techniques de molécules uniques*. Thèse de doctorat, Université Paris 7 - Denis Diderot.
- [Watson et Crick, 1953] WATSON, J. D. et CRICK, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids ; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738.

- [Wedemann et Langowski, 2002] WEDEMANN, G. et LANGOWSKI, J. (2002). Computer simulation of the 30-nanometer chromatin fiber. *Biophys. J.*, 82:2847–59.
- [Weintraub et Groudine, 1976] WEINTRAUB, H. et GROUDINE, M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*, 193(4256):848–856.
- [White, 1969] WHITE, J. (1969). Self-linking and the gauss integral in higher dimensions. *Am. J. Math.*, 91:693–728.
- [Wieland *et al.*, 2004] WIELAND, G., ORTHAUS, S., OHNDORF, S., DIEKMANN, S. et HEMMERICH, P. (2004). Functional complementation of human centromere protein a (cenp-a) by cse4p from *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 24(15):6620–6630.
- [Wocjan *et al.*, 2008] WOCJAN, T., KLENIN, K. et LANGOWSKI, J. (2008). Brownian dynamics simulation of dna unrolling from the nucleosome (dagger). *J Phys Chem B*, 5:5. Using Smart Source Parsing Dec.
- [Wong *et al.*, 2007] WONG, H., VICTOR, J. M. et MOZZICONACCI, J. (2007). An all-atom model of the chromatin fiber containing linker histones reveals a versatile structure tuned by the nucleosomal repeat length. *PLoS ONE.*, 2(9):e877.
- [Woodcock *et al.*, 1984] WOODCOCK, C. L., FRADO, L. L. et RATTNER, J. B. (1984). The higher-order structure of chromatin : evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 1):42–52.
- [Woodcock *et al.*, 1993] WOODCOCK, C. L., GRIGORYEV, S. A., HOROWITZ, R. A. et WHITAKER, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90(19):9021–5.
- [Woodland et Adamson, 1977] WOODLAND, H. R. et ADAMSON, E. D. (1977). The synthesis and storage of histones during the oogenesis of *xenopus laevis*. *Dev Biol*, 57(1):118–135.
- [Worcel *et al.*, 1978] WORCEL, A., HAN, S. et WONG, M. L. (1978). Assembly of newly replicated chromatin. *Cell*, 15(3):969–977.
- [Worcel *et al.*, 1981] WORCEL, A., STROGATZ, S. et RILEY, D. (1981). Structure of chromatin and the linking number of dna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(3):1461–1465.
- [Wu *et al.*, 2005] WU, W.-H., ALAMI, S., LUK, E., WU, C.-H., SEN, S., MIZUGUCHI, G., WEI, D. et WU, C. (2005). Swc2 is a widely conserved h2az-binding module essential for atp-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol*, 12(12):1064–1071.
- [Zhang *et al.*, 2004] ZHANG, H., RICHARDSON, D. O., ROBERTS, D. N., UTLEY, R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., CÔTÉ, J. et CAIRNS, B. R. (2004). The yaf9 component of the swr1 and nua4 complexes is required for proper gene expression, histone h4 acetylation, and htz1 replacement near telomeres. *Mol Cell Biol*, 24(21):9424–9436.
- [Zhou *et al.*, 1998] ZHOU, Y. B., GERCHMAN, S. E., RAMAKRISHNAN, V., TRAVERS, A. et MUYLDERMANS, S. (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone h5 on the nucleosome. *Nature*, 395(6700):402–405.

- [Zofall *et al.*, 2006] ZOFALL, M., PERSINGER, J., KASSABOV, S. R. et BARTHOLOMEW, B. (2006). Chromatin remodeling by isw2 and swi/snf requires dna translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol*, 13(4):339–346.