



HAL
open science

Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine par micromanipulation et visualisation de l'ADN

Giuseppe Lia

► **To cite this version:**

Giuseppe Lia. Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la chromatine par micromanipulation et visualisation de l'ADN. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005. Français. NNT : . tel-00608154

HAL Id: tel-00608154

<https://theses.hal.science/tel-00608154v1>

Submitted on 12 Jul 2011

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.

ECOLE NORMALE SUPERIEURE - DEPARTEMENT DE PHYSIQUE

Laboratoire de Physique Statistique



THÈSE

présentée devant

l'Université Paris 7

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS 7
Spécialité : GÉNÉTIQUE

par

Giuseppe LIA

**Etude du mécanisme d'action des facteurs de remodelage de la
chromatine par micromanipulation et visualisation de l'ADN**

À soutenir publiquement le 12 décembre 2005 devant la commission d'examen :

M.	David	BENSIMON	Directeur de thèse
Mme	Françoise	LIVOLANT	Rapporteur
M.	François	GALLET	
M.	Jean-Louis	VIOVY	Rapporteur
Mme	Genevieve	ALMOUZNI	
M.	Tom	OWEN-HUGHES	

Remerciements

Au cours de ce travail de thèse, j'ai rencontré des milliers de personnes qui m'ont soutenu psychologiquement et même physiquement dans les moments difficiles auxquels j'ai pu être confronté. Je leur dédie donc ces pages.

Je commence par remercier le big boss numéro 1, mieux connu comme le boss barbu, David Bensimon, mon directeur de thèse. Je le remercie tout d'abord de m'avoir accueilli dans son équipe. Sa rencontre a été un des événements qui changent la vie d'un homme. Son optimisme démesuré pour aborder un problème, que ce soit dans la vie de tous les jours ou bien en sciences, sa passion, son bonheur, sa curiosité et sa connaissance éclectique ont laissé des traces profondes dans ma formation professionnelle et humaine. J'espère réussir à suivre son exemple dans mon futur proche et sans certitude. Je n'ai malheureusement pas suffisamment de vocabulaire en français pour exprimer ma gratitude à son égard et je lui souhaite tout le bonheur du monde.

Après, je remercie le big boss numéro deux, mieux connu comme "SOS Croquette". Je le remercie de m'avoir supporté pendant les quatre années de ma thèse, pour toutes mes questions, mes plaintes, etc... du genre : "Vincent il y a un BUG! le programme ne marche pas!!!, Vincent j'ai un problème : comment je peux convertir un fichier eps en un fichier pdf?, Vincent qu'est-ce que c'est la bounding box!!!, Vincent ça me fait ch....(censure!), me....(censure!) j'ai perdu trois heures d'acquisition!!!!, comment c'est possible etc...". Je suis vraiment désolé de t'avoir embêté sans trêve. Je suis seulement un pauvre biologiste qui a essayé de jouer avec la physique. J'espère un jour réussir à avoir seulement une petite partie de tes connaissances scientifiques et informatiques. Je suis vraiment très admiratif à ton égard, et en plus je te suis vraiment reconnaissant de m'avoir prêté la perceuse, grâce à toi dans ma maison il y a de jolis rideaux montés qui me font rêver la nuit.

Ensuite je remercie Jean-François Allemand, le lien physique et mental entre le monde du bas et le monde du haut, entre le monde réel et le monde virtuel à la "MATRIX" dans notre laboratoire. On peut le définir comme l'intégriste alimentaire du lab. C'est grâce à lui que j'ai commencé à apprécier la bonne cuisine et les vins français. Du point de vue humain, je lui dois beaucoup, surtout pour le soutien qu'il m'a apporté au début de ma thèse, et en plus son origine corse fait de lui un italien manqué. On vas prendre une Foster pour fêter ça ? Techniquement et scientifiquement il m'a beaucoup aidé et peut être que l'alcool pourrait m'aider à libérer les freins inhibiteurs responsables de ce manque d'inspiration à exprimer clairement ma gratitude envers lui. Merci Jean !!

Je remercie Marie-Noelle Dessinges (connue parmi les thésards du LPS sous le nom de "Miss LPS") et Nynke Dekker, qui m'ont bien "dressé" quand je suis arrivé au laboratoire en donnant

un climat sérieux, une ambiance studieuse et rigoureuse et en créant un réel environnement de travail (mais avec certains jours de débordements épouvantables et de terreur : Giuseppe tais-toi, Giuseppe éteins la musique, Giuseppe fais-moins-de-bruit, Giuseppe j'en ai marre !!).

Je remercie les compagnons de la lutte prolétaire unie contre le système et la lutte contre la bille dévergoncée, Timothée Lionnet et Gilles Charvin, membres de l'association U.M.C.P.J. (une molécule coilable par jour !!), ou U.C.P.C.P.J. (un capillaire pas collant par jour !!), ou U.P.A.-M.A.S.H.C.J. (une protéine active malheureusement à sept heures (du soir) chaque jour !!). C'est grâce à eux que j'ai pu supporter le stress des manips.

En particulier, je tiens à remercier Gilles, qui a été mon "Cicerone", mon Mentor, Mon "Virgilio" dans l'utilisation des pinces magnétiques, et qui a donné une ambiance agréable sans égal dans le lab. Je lui dois de m'avoir appris pas mal de mots en français (typiquement des jurons). Merci Gilles !!

Salut Timothée, compagnon dans la lutte unie pour la "patate". Ton amitié est vraiment précieuse et j'espère continuer à la cultiver même dans mon futur proche. Rappelle-toi que "Mi casa es tu casa". Si tu viens à Boston avec Olivia, je serai honoré de vous introduire dans les bonnes fêtes à la "Nico" d'Harvard. J'ai une dette envers toi, tu es mon correcteur de français préféré.

Salut aux nouveaux esclaves du lab, Elise Praly, Francesco Mosconi, Adrien Meglio, et Thomas Julou. J'espère que vous réussirez à survivre dans le petit espace de la pièce D16 et continuerez à appliquer mes enseignements de comportement.

En particulier je tiens à remercier Elise, mon correcteur français préféré (oui je sais j'avais dit que c'était Timothée mon correcteur préféré, désolé Tim mais physiquement je préfère Elise à toi). Je tiens à la remercier parce qu'elle continuera le travail avec "My precious (citation du livre du seigneur des anneaux)" RSC et ISWI, et donc je lui souhaite une thèse riche en publications et surtout de continuer à casser la geul...!! à tous les chercheurs qui vont travailler sur les facteurs de remodelage de la chromatine. Bon courage et bonne chance.

Francesco, en tant qu'italien, je te remercie doublement. J'espère que tu continueras à raviver la flamme dans le lab avec le bonheur italien. Bonne chance et courage. Et j'espère que tu ne te sentiras pas trop seul en bas quand tu feras les manips !!, si tu veux tu peux toujours allumer la lumière de la chambre ou construire un bonhomme.

Je tiens à remercier les postdocs du lab, Omar Saleh, Keir Neuman et Hiroaki Yokota. Omar, ou devrais-je dire le professeur Saleh, qui maintenant est retourné aux Etats unis. Tu es vraiment sympa, et surtout tu as toute ma gratitude parce que tu m'as promis d'appeler ton premier fils Giuseppe (Je rigole mais quand même, ne l'appellez pas Abigail, ou Kevin, ou Genevèffa s'il vous plaît). Merci Omar et merci Indi, je vous suis reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour les conseils donnés pendant mon entraînement pour le marathon de Paris du 15 avril 2005. C'est grâce à vous si j'ai pu le courir en 3h et 53min.

Keir Neuman, compagnon des nombreuses Coffee Break du Lab, qui te soutiendra maintenant que je pars pour les Etas Unis ? Qui chantera sans musique toute la journée à côté de toi ?

Qui te poseras des questions en utilisant un anglais pourri ? Merci Keir pour tes conseils et ton soutien, ils m'ont été très précieux.

Je remercie Hiroaki, pour son bon saké, ses leçons de japonais et c'est grâce à lui que je connais le mot "KINTAMA". Merci Hiroaki et bonne chance au Japon.

Je remercie Jean-Pierre Dumas et Pierre Neveu pour leurs conseils en biologie et la bonne ambiance apportée dans le laboratoire de biologie, en particulier j'adore le regard psychédélique-post-69 de Jean-Pierre, ne le perds pas !!!

Je remercie tous les autres personnels du Laboratoire de Physique Statistique qui ont rendu possible ce travail : Jacques Meunier, en tant que directeur du laboratoire, Nora Sadaoui, Carole Philippe et Annie Ribaudeau pour l'administration et la gestion, et dont j'ai toujours apprécié la patience et la disponibilité .

Cette thèse s'est effectuée dans d'excellentes conditions au département de physique de l'Ecole Normale Supérieure. Je remercie tous les services pour leur compétence et leur disponibilité.

Merci à Monsieur et Madame Guérard pour la qualité de leur accueil et leur souplesse d'esprit et surtout pour les longs bavardages faits pendant ces quatre ans.

Je tiens naturellement à remercier les chercheurs qui ont accepté de participer à mon jury de thèse : Françoise Livolant, François Gallet, Jean-Louis Viovy, Geneviève Almouzni, et Tom Owen-Hughes.

Je pense avoir remercié toutes les personnes qui ont compté pendant cette thèse, mais je tiens à m'excuser par avance s'il m'est arrivé d'oublier quelqu'un.

Merci à tous et à bientôt.



Dédicace au lapin de Tim et Olivia

Et voilà une bonne recette qui fera le plaisir du lapin de Timothée et Olivia :

– **nom** : *"Coniglio alle olive" ou "Lapin aux olives"*

– **ingrédients** : 1 lapin, 1 oignon, 80 gr. d'olives vertes et noires, 1 céleri, 50 gr. de noix, thym, romarin, laurier, un verre de vin rouge, huile, poivre, sel.

préparation : nettoyez le lapin et coupez le en morceaux grands comme deux noix, faites le frire dans l'huile. Quand il aura pris un peu de couleur rajoutez l'oignon et le céleri coupés en morceaux, le thym, le romarin et une feuille de laurier. Rajoutez les noix et arrosez le tout avec du vin. Après avoir mis le sel et le poivre selon votre goût, réduisez la flamme. Après 25-30min (mi-cuisson), rajoutez les olives et continuez la cuisson en couvrant le lapin avec un couvercle, en rajoutant de temps en temps, si nécessaire, un peu d'eau. A dix minutes de la fin, rajoutez le foie de l'animal qui a été cuit avant dans l'eau 5min. Et bon appétit !!!



Ringraziamenti

Cari amici e amiche, anche questa volta un capitolo della mia vita, quello parigino, è giunto al termine. Come si addice in queste occasioni, facendo un resoconto, tra gli scaffali della memoria, ripenso alle cose belle vissute insieme a voi tutti. Vorrei ringraziarvi dal primo all'ultimo per avermi sostenuto, ispirato, rallegrato, fatto piangere e soprattutto reso partecipe delle vostre vite.

Vorrei cominciare a ringraziare tutto il mitico gruppo del Ghislieri di Pavia, che per primi mi hanno adottato nel loro gruppo, quando nel lontano 2001 sono approdato qui a Parigi. All'epoca era la prima volta che andavo a vivere da solo, ed è grazie a loro che mi sono sentito meno solo, cominciando ad assaporare il significato del termine "vera amicizia".

Quindi ringrazio Alberto, Roberto, Raoul e Silvana e Jacopo. In particolare vorrei ringraziare Jacopo con il quale ho condiviso le gioie della vita in comune (da conquinino, meglio specificare), e che guardo un po' con la stessa riverenza che si ha nei confronti di un padre. Ogni volta che penso a lui provo una sensazione di rispetto e ammirazione che non ha uguali in nessun'altra persona.

Ringrazio anche Paolo "Il Badulla", con il quale abbiamo passato delle lunghissime serate a giocare con Jac e Raoul a Risiko.

Ma veniamo al mio ultimo acquisto in fatto di "colocation", Carlo appunto. Lo considero un po' come il fratello che non ho mai avuto, con il quale ci si confida, si chiede consiglio in fatto di ragazze, si cresce insieme, si litiga, ci si stima, si scherza, si ride. Non trovo altre parole per descrivere la gioia e il buonumore che mi dà anche solo la sua presenza in casa. Non è una dichiarazione, perché non provo nessuna attrazione sessuale nei suoi confronti, ma mi piacerebbe trovare una donna con il suo senso dell'umorismo, il suo carisma e la sua allegria. Mi mancherà tantissimo il prossimo anno quando andrò a lavorare a Boston, e lì ricomincerò, per l'ennesima volta della mia vita, una nuova avventura. Spero solo di incontrare delle persone speciali come lui. Carlo come farò a vivere senza di te!!! sigh!!!! mi manchi di già!!.

Ringrazio Chiarina, l'orsacchiotta bauscia di casa PROIETTI-LIA, ospite gradita e amata, che ha rallegrato con la sua solarità, le fredde notti parigine. Come anche le coppie Paqui - Sevrine, e Gigi - Geraldine, compagni di piscina, di boccie, di cene pantagrueliche, di serate mondane e non. Sono fiero di essere loro amico e soprattutto di essere stato nominato da Gigi e Geraldina, come anche Carlo naturalmente, zio ufficiale del loro futuro pupo. Spero che lo chiamino Giuseppe, se sarà "masculo", o Giuseppina, se sarà "fimmina".

Passiamo ora a ringraziare gli amici di Milano, che in questi anni ho visto veramente poco, Andrea, Romina e Alberto, che come sempre occupano un posto importante nel mio cuore,

anche se sfortunatamente la vita e il lavoro ci tiene sempre di più lontani. Ringrazio Laura Finzi e David Dunlap e tutto il loro gruppo di Milano (Chiara, Elena, Alberto, Dorian, Priscilla, Fiorella, Laura) per avermi accolto nel loro laboratorio e con il quale ho passato dei momenti stupendi. Ringrazio anche il gruppo di Paolo Milani e in particolare Alessandro Podesta e Marco Indrieri per avermi sopportato durante le misure AFM.

E adesso veniamo al lungo reparto "Parenti". Grazie a zia Teresa e zio Renato per avermi accolto ancora una volta come il figliol prodigo quando sono ritornato a Milano. Se sono arrivato fin qui lo devo anche a voi.

Sarebbe scontato ringraziare i genitori e dire che sono i migliori di questo mondo, quindi non dico nulla a riguardo, sappiate però che lo penso sempre.

Grazie a Candida e Caterina, sorelle e perle della mia vita. Il vostro sorriso vale più di qualsiasi gratifica personale e lavorativa. Sappiate che il fratellone vi pensa sempre ogni giorno, anche se non l'ho da a vedere.

Ringrazio anche i nonni e gli altri zii sparsi in Italia e nel mondo, ma in particolare dedico un caloroso ringraziamento a zio Emilio e zia Serafina, venuti a mancare in questi anni, e che hanno lasciato uno spazio incolmabile nella mia vita. So che avrebbero voluto vedermi arrivare alla fine di questo traguardo, e che sarebbero stati molto fieri di me. Un bacione zia e zio non vi dimenticherò mai.

Ringrazio tutte le persone che ho incontrato questi anni : Maria del Mar Gonzales, Roberto, Mauro, Alessandro, Chiara, Monica, Teresa, Elena, Alessandra, Giulio, Morgan, Davide, Walter, Francesco, Daniella, Valerio, Rita, Giulia, Fabien, Marketa, Orazio, Luisa, Vero, il croato e sua moglie, etc "A gente un gna faa più".....

Questi ringraziamenti cominciano a essere veramente lunghi, quindi per farla breve grazie a tutti, e chi vivrà, vedrà !.

Table des matières

Introduction	13
1 Compaction de l'ADN dans le noyau cellulaire	17
1.1 Introduction	17
1.2 Architecture nucléaire	19
1.2.1 Structure de l'ADN	19
1.2.2 Structure des histones	21
1.2.3 Premier niveau de condensation de l'ADN : les nucléosomes	23
1.2.4 L'ADN de jonction et l'histone H1 de jonction	26
1.2.5 Deuxième niveau de compaction : la fibre de 30 nm	27
1.2.6 Niveaux supérieurs de compaction de la chromatine	28
1.2.7 Compartimentation structurale du noyau à grande échelle	29
2 Le remodelage de la chromatine	33
2.1 Introduction	33
2.2 Les modifications covalentes des histones	34
2.2.1 Acétylation des histones	35
2.2.2 Méthylation des histones	37
2.2.3 Phosphorylation des histones	37
2.2.4 ADP-ribosylation, Ubiquitination et Sumolation	38
2.2.5 Les variants des histones	38
2.2.6 La méthylation de l'ADN	39
2.3 Les facteurs de remodelage de la chromatine	40
2.4 La famille SWI/SNF	43
2.4.1 Le complexe γ RSC	45
2.4.2 Les sous-unités ATPase Brg1 et Brm	46
2.5 La famille ISWI	47
2.5.1 La protéine ISWI (<i>Drosophila</i>)	49
2.6 La famille CHD	49
2.7 Les enzymes avec le domaine Split ATPase	50
2.8 Comparaison biochimique de l'activité	51
2.9 Mécanismes d'action proposés pour le remodelage	54
3 Caractérisation et manipulation de molécules individuelles	63
3.1 Introduction	63
3.2 Force en Biologie	66
3.2.1 Force entropique	67

3.2.2	Force de rupture de liaison covalente F_{max}	68
3.2.3	Force de rupture de liaisons non-covalentes	68
3.3	Micromanipulation de l'ADN	68
3.3.1	Les pinces optiques	68
3.3.2	Les dispositifs à microfibres	69
3.3.3	Les pinces magnétiques	70
3.3.4	Différences entre les différentes techniques de micromanipulation de l'ADN	70
3.4	Montages expérimentaux utilisés	71
3.5	Pinces magnétiques	71
3.5.1	Microscope	71
3.5.2	Molécule d'ADN utilisée	72
3.5.3	Ancrage de la molécule sur les billes et sur la surface du capillaire	72
3.5.4	Mesure du déplacement de la bille et de l'extension de la molécule d'ADN	73
3.5.5	Mesure de la force	75
3.6	TPM	77
3.6.1	Montage expérimental	77
3.6.2	Préparation des chambres de mesure et de l'ADN	77
3.6.3	Analyse des images	80
3.6.4	Calibration et mesure de la distance bout-à-bout (E2E)	81
3.7	AFM	82
3.7.1	Montage expérimental	86
3.7.2	Dépôt d'ADN sur le mica	87
3.7.3	Analyse des images	87
4	Mécanismes d'action d'ISWI et RSC	91
4.1	Formalisme topologique	91
4.2	Comportement de l'ADN sous torsion	93
4.3	Micromanipulation d'une seule molécule d'ADN	96
4.4	Article RSC	98
4.4.1	"Direct observation of DNA distortion by the RSC chromatin remodeling complex"	99
4.5	Expériences avec la protéine ISWI	119
4.5.1	AFM	119
4.5.2	Étude de l'accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN linéaire nu	119
4.5.3	Translocation d'ISWI sur l'ADN linéaire en présence d'ATP	119
4.5.4	Pinces magnétiques	122
4.5.5	Accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN "nickée"	122
4.5.6	Accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN superenroulable	122
4.5.7	Translocation d'ISWI sur une molécule d'ADN "nickée"	126
4.5.8	Translocation d'ISWI sur une molécule d'ADN superenroulable	127
4.5.9	Translocation sur l'ADN simple brin	129
4.5.10	Effet de la force	130
4.5.11	Modèle de translocation proposé	130
4.6	Expériences faites avec la technique TPM	133
4.6.1	Contrôles effectués	133
4.6.2	Mesures effectuées en présence d'ATP	134

4.6.3	Mesures effectuées sans ATP et en présence d'ATP non hydrolysable (ATP- γ -S)	136
4.7	Pincés magnétiques vs. TPM	136
5	Conclusion et perspectives	141
A	Article GalR/HU	145
B	Protocoles expérimentaux	153
B.1	Constructions d'ADN	153
B.1.1	L'ADN pour les pincés magnétiques	153
B.1.2	Préparation de l'ADN pour les expériences TPM et AFM	153
B.2	Préparation des capillaires pour les pincés magnétiques	153
B.3	Préparation des microchambres pour les expériences TPM	154
B.4	Préparation des disques de Mica pour l'AFM	154
B.5	Tampon de la protéine	154
B.6	Analyse de données	154

Introduction

Les cellules de tous les organismes vivants contiennent des molécules d'ADN dont la longueur est plusieurs milliers de fois supérieure au diamètre de la cellule. Donc chaque organisme vivant doit faire face au problème de l'organisation et de la récupération de l'information génétique que constituent ces très longues molécules d'ADN. Le problème de l'organisation du matériel génétique chez les eucaryotes a été résolu en utilisant toute une série de protéines, les histones, qui réduisent le volume occupé par la molécule d'ADN en formant un complexe nucléoprotéique très compact appelé chromatine.

Cependant, le haut degré de compaction de l'ADN au sein de la structure chromatinienne pose des problèmes à la cellule pour la récupération de l'information génétique, en empêchant l'accrochage et l'activité de presque toutes les protéines qui doivent accéder l'ADN.

Plusieurs complexes sont impliqués dans le remodelage de cette structure en permettant un contrôle dynamique et de longue portée de l'expression génétique.

Parmi ces complexes, une famille de protéines, appelées facteurs de remodelage de la chromatine, utilise l'énergie d'hydrolyse de la molécule d'ATP pour remodeler la structure chromatinienne. Le mouvement des constituants de la chromatine (les nucléosomes) se fait en altérant le contact ADN histones. Plusieurs expériences suggèrent que ces familles de protéines ont une activité de translocase stimulée par l'ADN et qu'elles sont capables de changer la topologie de la molécule d'ADN.

Le mécanisme par lequel les facteurs de remodelage utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour remodeler la structure chromatinienne n'est pas encore clair, et les expériences en volume ne permettent pas d'accéder à ces informations avec facilité.

Récemment, les expériences de micromanipulation et de visualisation de molécules d'ADN (pinces magnétiques, TPM, AFM, etc..) se sont avérées être un outil d'investigation puissant pour étudier les enzymes qui travaillent sur la molécule d'ADN, comme les topoisomérases, les hélicases, les facteurs transcriptionnels qui forment une boucle dans l'ADN, les translocases, etc.. [1, 2, 3, 4].

Le travail présenté dans cette thèse a eu comme objectif d'essayer de comprendre le mécanisme d'action de deux facteurs de remodelage appartenant à deux familles différentes : la protéine ISWI (famille ISWI) de la drosophile et le complexe RSC (famille SWI/SNF) de la levure, en utilisant des techniques de manipulation et de visualisation de molécules individuelles d'ADN.

Le plan de ce manuscrit est donc le suivant : le premier chapitre est consacré à la description de la structure et de la compaction de l'ADN dans les noyaux cellulaires.

Ce chapitre permet d'introduire la structure de la chromatine, nécessaire afin de bien comprendre le fonctionnement et le rôle biologique des facteurs de remodelage de la chromatine.

Le deuxième chapitre est consacré à la description de toutes les formes de remodelage de

la structure chromatinienne, avec une partie plus consistante dédiée aux remodelages ATP-dépendants.

Dans le troisième chapitre, après une introduction générale sur les techniques de manipulation et de visualisation des molécules uniques utilisées pour étudier l'interaction ADN/protéines, on expose les montages expérimentaux utilisés, qui ont été les pinces magnétiques, la "TPM" (mouvement d'une particule accrochée), et l'AFM.

Dans la quatrième et dernière partie de la thèse, je présente les résultats expérimentaux obtenus avec les deux facteurs de remodelage, en proposant un mécanisme probable de translocation qui pourrait expliquer le fonctionnement de ces deux familles de remodelage.

Compaction de l'ADN et remodelage de la chromatine

Chapitre 1

Compaction de l'ADN dans le noyau cellulaire

1.1 Introduction

Toutes les cellules, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes, contiennent des molécules d'ADN chromosomique dont la longueur totale est plusieurs milliers de fois supérieure au diamètre de la cellule.

Par exemple, le génome humain est constitué de 3.3×10^9 bp (paires de bases), ce qui correspond à une longueur de 1.1 m. Cet ADN doit donc être replié et compacté pour qu'il puisse entrer dans l'espace très petit qui constitue le noyau cellulaire dont le diamètre vaut $10\mu\text{m}$.

Ce repliement résulte de l'association de l'ADN avec des protéines structurales, les histones, donnant ainsi naissance à une structure hiérarchique appelée chromatine.

Plusieurs niveaux de repliement aboutissent à une compaction efficace de l'ADN, celui-ci ayant alors une structure 100000 fois plus compacte que ne l'est sa forme native (fig. 1.1). C'est cette compaction que les facteurs de remodelage vont devoir réguler pour permettre l'accès de la machinerie de transcription.

Le premier niveau de repliement résulte de l'enroulement de l'ADN autour d'un coeur protéique pour former un nucléosome, qui est l'unité répétitive fondamentale de la chromatine. Cela raccourcit d'environ sept fois l'ADN nu.

Dans un second temps, le cordon de nucléosomes se replie en un filament plus court et plus épais appelé fibre de 30 nm, environ 40 fois plus court que l'ADN nu.

Cet élément est, à son tour, replié en une fibre de 100 à 300 nm de diamètre, qui forme vraisemblablement des domaines en boucles de 15000 à 100000 paires de bases, qui vont interagir avec les protéines qui constituent la matrice nucléaire.

Cette structure condensée de l'ADN, tout comme l'organisation de la chromatine en territoires et la répartition de ces derniers dans l'espace nucléaire, peut constituer un obstacle physique à des processus qui nécessitent d'avoir accès à l'ADN, tels que la transcription.

En réalité, la structure de la chromatine est très dynamique : celle-ci peut être décondensée localement puis recompactée par la suite, rendant momentanément l'ADN accessible à la machinerie de transcription, de réplication et de réparation.

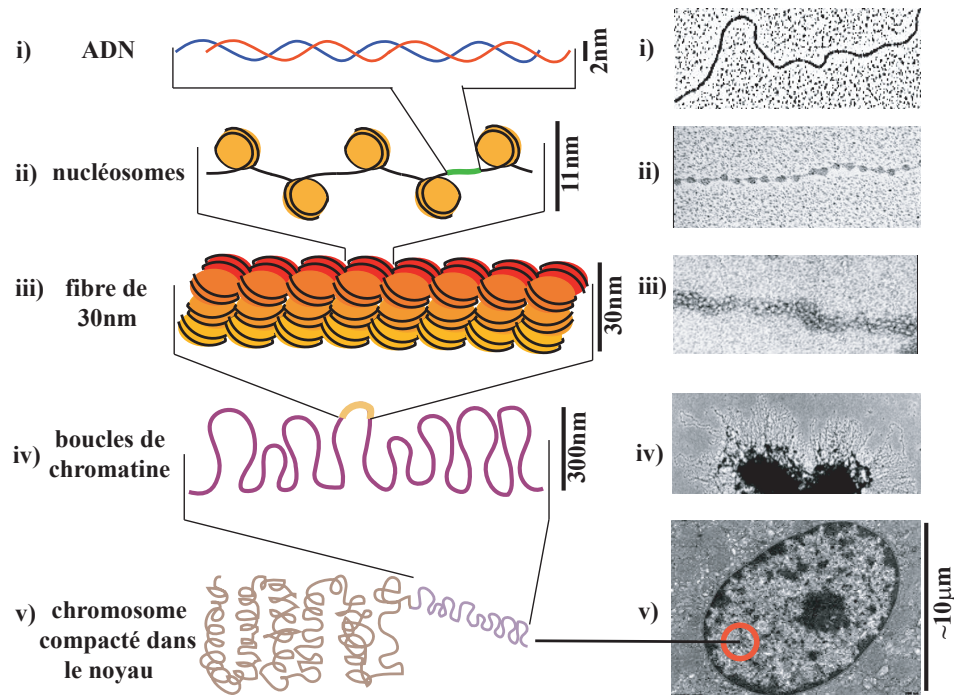


FIG. 1.1 – À gauche, représentation schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN à la base de la structure chromatinienne dans la cellule eucaryote. À droite, quelques clichés de microscopie électronique illustrant les différents niveaux de compaction.

Ces processus de décondensation et (re)compaction de la chromatine mettent en jeu des complexes spécialisés appelés facteurs de remodelage de la chromatine, qui altèrent la structure nucléosomale.

Nous allons à présent revenir plus en détail sur les différents niveaux de compaction de la chromatine après avoir procédé à quelques rappels concernant l'ADN.

1.2 Architecture nucléaire

1.2.1 Structure de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule constituée de deux brins arrangés de façon anti-parallèle qui s'enroulent l'un autour de l'autre pour former une hélice (fig. 1.2a). Chaque brin est un polymère organique linéaire (dont l'unité monomérique se décline sous 4 formes notées A, T, C et G). Chaque lettre (ou monomère) est constituée d'un sucre cyclique, le désoxyribose, d'une base azotée et d'un groupement phosphate (fig. 1.2b). La liaison entre monomères s'effectue par formation d'une liaison phosphodiester entre le phosphate lié au sucre sur le carbone en position 5' et le groupe hydroxyle lié au carbone en position 3' du sucre suivant.

Il existe quatre bases azotées dans l'ADN, deux purines (l'adénine et la guanine), et deux pyrimidines (la cytosine et la thymine), qui sont reliées au désoxyribose par le carbone 1'. On repère conventionnellement l'orientation d'un simple brin d'ADN à partir de son extrémité 5' (où est situé un groupement phosphate libre) jusqu'à son extrémité 3' (où est situé un groupe hydroxyle).

Les deux simples brins d'ADN sont orientés de façon anti-parallèle et s'enroulent l'un autour de l'autre grâce à la formation de liaisons hydrogène entre les bases azotées (fig. 1.2c). La présence d'amines primaires et secondaires dans les bases azotées permet aux bases azotées d'un brin d'interagir avec celles d'un autre brin en formant des paires de bases complémentaires. Les bases guanine (G) s'apparient en formant trois liaisons hydrogène avec les bases cytosine (C), tandis que les bases adénine (A) et thymine (T) s'apparient en formant deux liaisons hydrogène. La stabilité de l'hélice est due principalement à l'appariement des bases, mais il y a en plus une forte interaction hydrophobe, dite "d'empilement" (due à la nature hydrophobe des bases azotées), entre les paires de bases successives au sein de la double hélice. Les caractéristiques de l'hélice formée par l'enlacement des deux brins (le pas hélical, la direction de hélice, le diamètre effectif, etc.) dépendent d'un grand nombre de paramètres environnementaux tels que le solvant, la température, la force ionique [5]. L'ADN canonique en solution est nommé ADN-B, et a une structure en hélice droite. L'ADN-B a un diamètre d'environ 24Å, et un pas hélical de 3.6 nm (ou 10.5 paires de bases (pb)) par tour. L'espacement entre les bases est d'environ 3.4Å. L'ADN, stabilisé dans la forme B, a une forte rigidité locale : la longueur de persistance ξ de l'ADN-B est égale à $\xi = 50\text{nm}$, soit presque 150 pb. Elle correspond à la distance sur laquelle l'orientation de l'axe de la molécule est corrélée en dépit de l'agitation thermique et donne une mesure de la rigidité d'un polymère.

Si on change les conditions d'humidité ou de salinité, on peut obtenir des structures différentes de la forme B (fig. 1.3). Dans des conditions de faible humidité et à basse concentration en cations, on observe la forme A de l'ADN, qui est une structure plus compacte que la forme B (espacement entre les bases 2.6Å[5]), mais ayant la même hélicité. Par contre, avec des

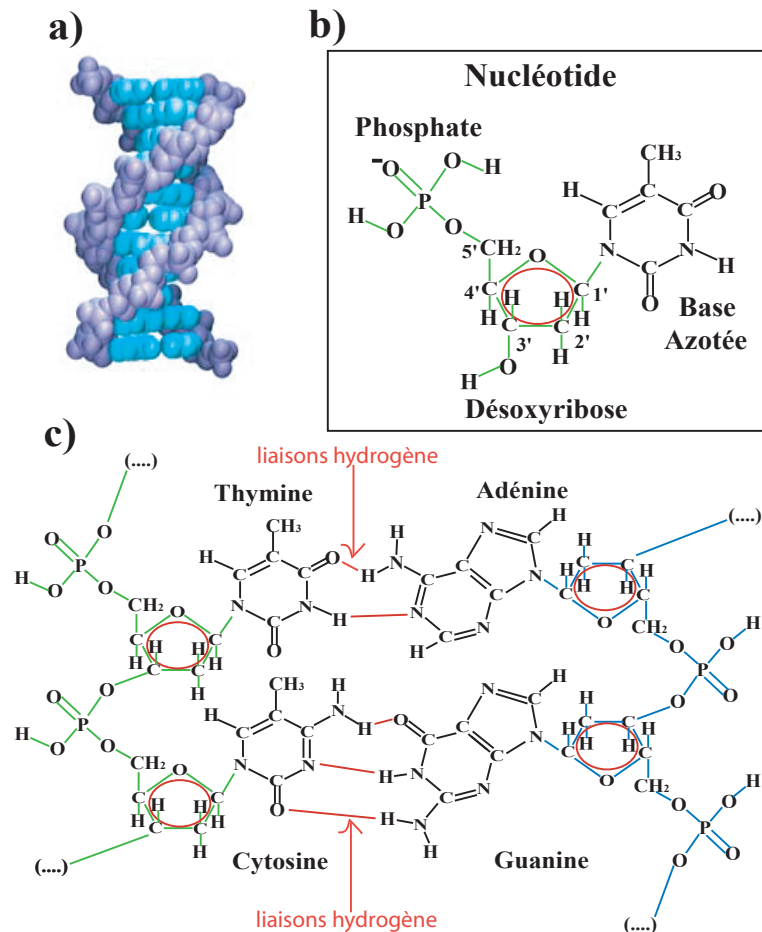


FIG. 1.2 – a) Structure atomique de la double hélice d'ADN. b) Représentation schématique d'un nucléotide. c) Enchaînement des nucléotides le long d'un fragment d'ADN simple brin et association des deux brins d'ADN de manière anti-parallèle qui, en établissant des liaisons hydrogène, adoptent une structure en double hélice.

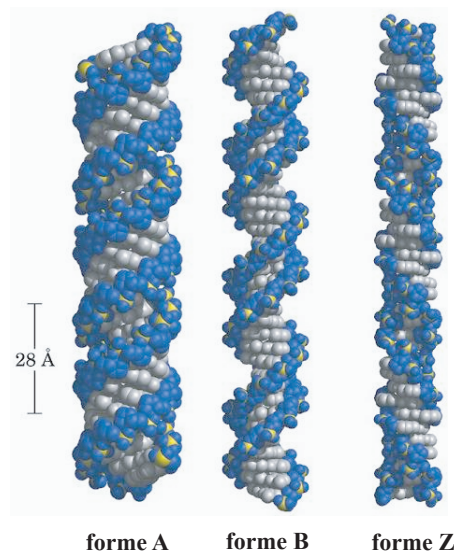


FIG. 1.3 – *Structure atomique de la double hélice d'ADN dans la forme A, B, ou Z, obtenues en changeant les conditions d'humidité et de salinité.*

concentrations salines très élevées et avec certaines séquences d'ADN, il est possible d'obtenir une structure dite ADN-Z qui a une hélicité gauche et un pas hélicale de 12pb.

1.2.2 Structure des histones

Il existe 5 principaux types d'histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Ces protéines sont parmi les plus conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Les histones dit de cœur correspondent aux histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont des protéines d'environ 14 kDa, organisées en deux domaines distincts : une queue N-terminale peu structurée et un domaine central et C-terminal qui adopte une structure particulière dite en "repliement histone" (ou "histone fold", fig. 1.4). La similitude entre les histones H2A, H2B, H3 et H4 en terme de séquence et de structure suggère qu'ils possèdent une origine commune. Leur extrémité N-terminale est fortement chargée positivement et, riches en certains acides aminés particuliers comme la lysine pour les histones H2A et H2B, et l'arginine pour les histones H3 et H4.

Une étude cristallographique a permis d'obtenir la structure du motif histone fold, commun aux histones de type H2A, H2B, H3, et H4 [6]. Ce dernier est constitué d'une longue hélice flanquée de deux hélices plus courtes reliées par des boucles. Ce repliement intervient dans les interactions entre histones au sein du nucléosome [6], mais il n'est pas spécifique des histones. Ce type de repliement a été observé dans de nombreuses protéines impliquées dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN [7, 8]. Chez les eucaryotes supérieurs, il existe de très nombreux variants d'histones dont certains sont spécifiques à certains types cellulaires et parfois présents seulement à certaines étapes du développement. Par exemple, chez les eucaryotes supérieurs, il existe plusieurs variants de l'histone H2A, comme l'H2AZ, qui sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle [9, 10].

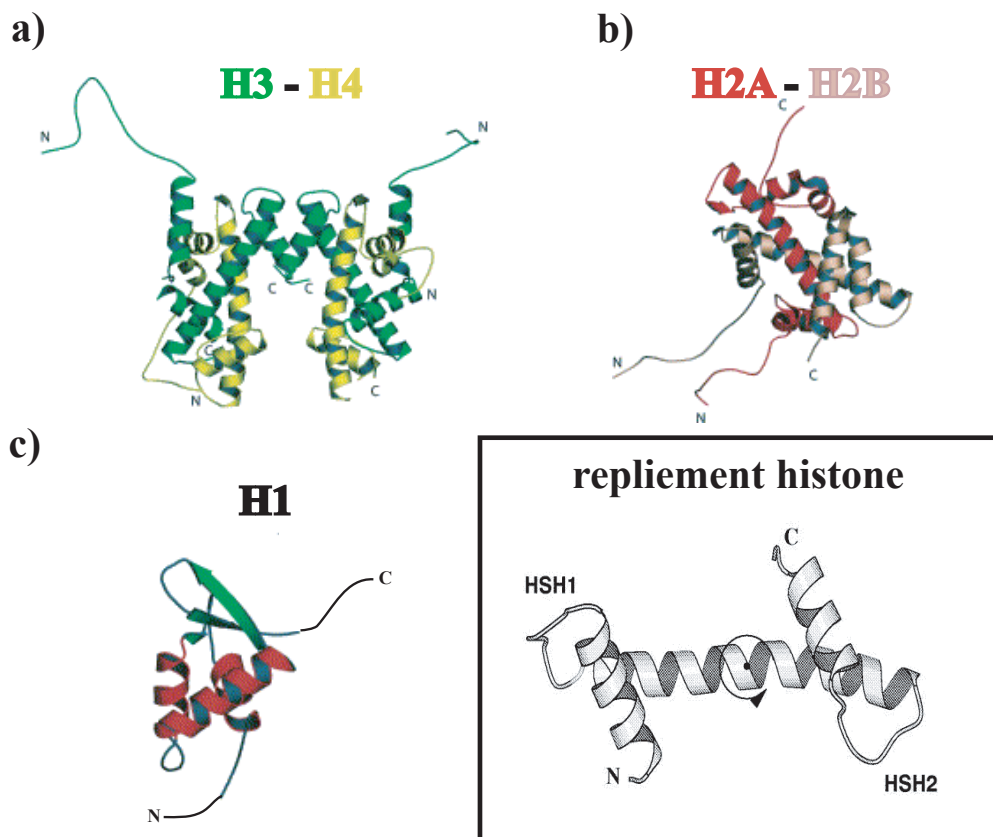


FIG. 1.4 – Structure atomique des histones du cœur (a et b), de l'histone H1 de jonction (c) et du "repliement histone" (en bas à gauche).

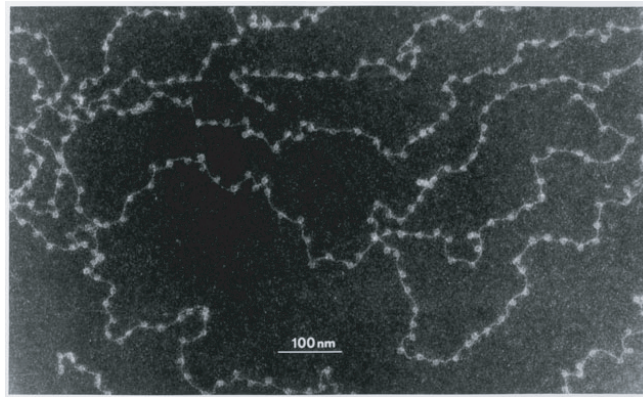


FIG. 1.5 – Cliché de microscopie électronique montrant l'ADN recouvert de nucléosomes.

1.2.3 Premier niveau de condensation de l'ADN : les nucléosomes

Il y a 30 ans, des images de microscopie électronique (Oudet et al 1975 [11]) ont montré, pour la première fois, que la fibre d'ADN de chaque chromosome relie en série des centaines de milliers de "particules" (les nucléosomes), qui sont uniformes en taille, et régulièrement distribués le long de la molécule d'ADN (fig. 1.5).

Des expériences de clivage de la chromatine par des nucléases ont permis d'isoler et de caractériser ces particules [12, 13, 14]. En particulier, la digestion aléatoire de la chromatine a permis initialement d'obtenir un mélange de particules nucléoprotéiques comportant un ou plusieurs nucléosomes qui contiennent des multiples de 200 paires de bases d'ADN (fig. 1.6a).

La poursuite de cette digestion par les nucléases permet d'isoler des particules plus petites en taille : une particule instable de 166 paires de bases (où la molécule d'ADN fait deux tours entiers autour du coeur protéique), et une particule très stable de 146 paires de bases (où l'ADN fait 1,75 tours autour du coeur protéique). La particule stable est appelée particule centrale du nucléosome (fig. 1.6b).

Des études cristallographiques avec une résolution en structure de 2.8Å et 1.9Å [15, 16, 17] ont permis de comprendre comment l'ADN interagit avec les histones pour former le nucléosome.

Dans cette structure, l'ADN est enroulé en superhélice gauche autour d'un octamère d'histones (fig. 1.7). Cet octamère est composé d'un tétramère central, constitué par deux hétérodimères H3 :H4, qui est flanqué de part et d'autre d'un hétérodimère H2A :H2B (fig. 1.4).

Les queues N-terminales des histones sont peu structurées et sortent du nucléosome. Celles des histones H3 et H2B s'intercalent entre les boucles d'ADN qui s'enroulent autour du nucléosome. Une partie de la queue amino-terminale de l'histone H2A interagit avec l'ADN à l'extérieur de l'hélice au niveau du petit sillon. Par ailleurs, plusieurs résidus basiques des queues d'histones H4 interagissent avec une région très acide de l'hétérodimère H2A/H2B.

L'orientation des sillons majeur et mineur par rapport à la surface des nucléosomes est un point critique en ce qui concerne l'accessibilité de l'ADN. En effet, le site de fixation d'une protéine peut être inaccessible s'il est tourné vers l'intérieur du nucléosome. Par exemple, la

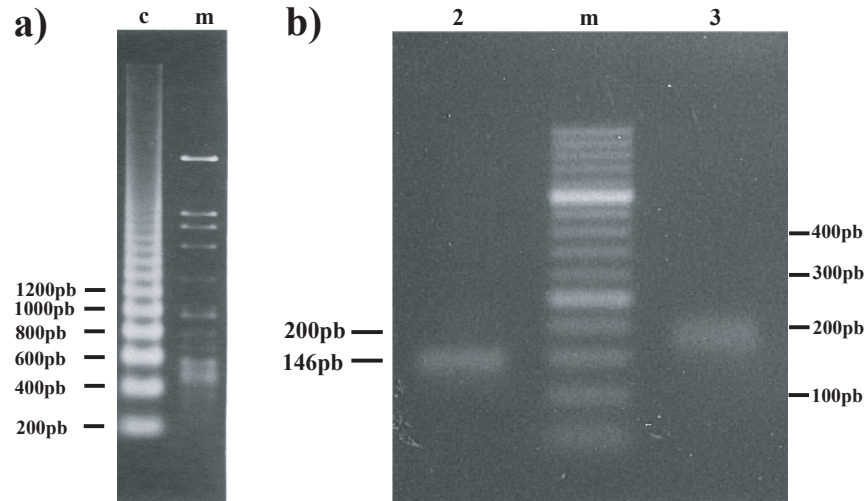


FIG. 1.6 – a) La digestion de la chromatine avec une nucléase révèle un mélange d'amorces d'ADN dont la taille est un multiple de 200pb (c chromatine digérée, m échelle moléculaire).
 b) La digestion de ces amorces d'ADN de 200pb donne un fragment d'ADN très stable de 146pb (2 fragment de 146 pb, 3 fragment de 200 pb, m échelle moléculaire).

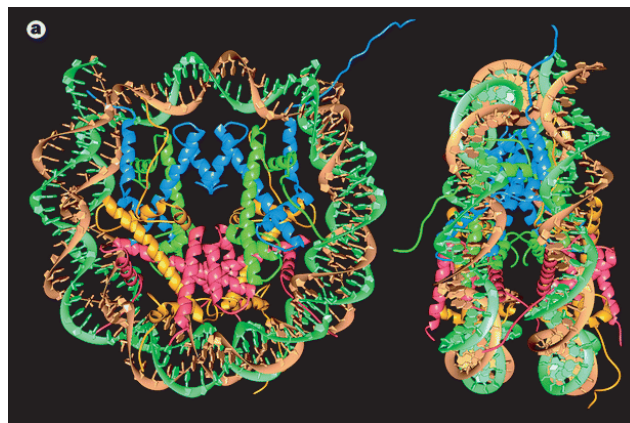


FIG. 1.7 – Images cristallographiques de face puis de profile, du nucléosome à 2.8Å [15].

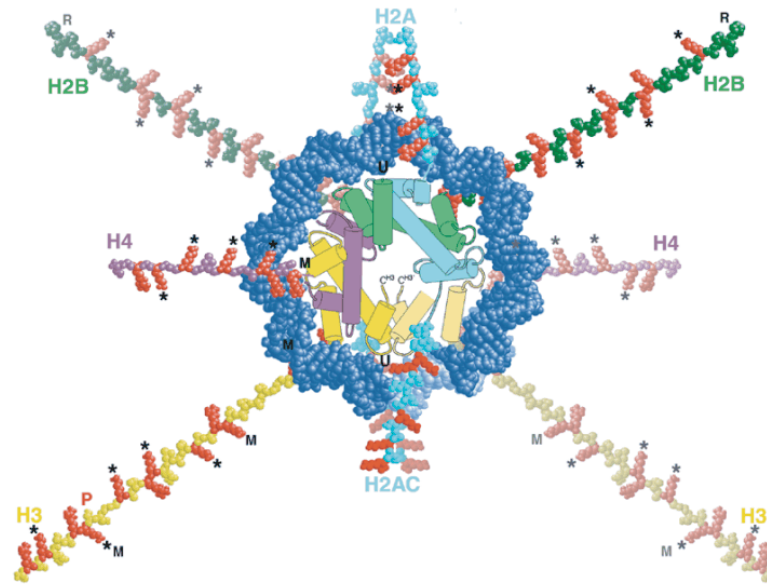


FIG. 1.8 – *Représentation schématique d'un nucléosome avec les queues des histones. Les astérisques indiquent les résidus où il est possible d'introduire des modifications post-traductionnelles.*

TATA Binding Protéine (TBP) se fixe sur la boîte TATA dans le sillon mineur de l'ADN. Si le sillon mineur de la boîte TATA est orienté vers la surface du nucléosome, la capacité de la TBP à se fixer à la boîte TATA est diminuée [18]. Les nucléosomes et leur positionnement sur la séquence régulent donc l'accessibilité de l'ADN aux protéines qui s'y fixent.

L'interactions entre l'ADN et les histones introduit des distorsions qui modifient la structure de l'ADN. Le rayon de courbure moyen de l'ADN le long de l'octamère est de $41,9\text{\AA}$, et le pas hélical est de $25,9\text{\AA}$ en lieu de 36\AA . L'enroulement correspond à $-1,65$ tour et est assuré par 14 points d'ancrage qui sont régulièrement répartis sur son pourtour. Ces interactions sont complexes dans la mesure où des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes, des pontages par des molécules d'eau et des interactions électrostatiques via des acides aminés (arginine) avec le petit sillon de l'ADN stabilisent la structure. La périodicité de l'hélice d'ADN dans la particule du cœur est directement mesurée par l'intervalle en paires de bases entre les points d'ancrage. Elle est en moyenne de 10,2 paires de bases.

La différence d'hélicité observée entre l'ADN libre en solution et l'ADN nucléosomal est, pour une grande part, due à l'apparition de torsion lors de l'enroulement de l'ADN sous forme de superhélice. Les régions N-terminales des histones (queues N-terminales) jouent un rôle important dans les interactions ADN-histones à l'intérieur et à l'extérieur du nucléosome (fig. 1.8). Ces queues se projettent en dehors de la surface cylindrique du cœur du nucléosome et également à travers des tunnels du sillon mineur au niveau desquels les deux tours de la superhélice d'ADN s'ajustent de telle sorte que les régions adjacentes du sillon mineur sont appariées.

Elles contiennent de nombreux résidus arginine et lysine et interagissent très fortement avec

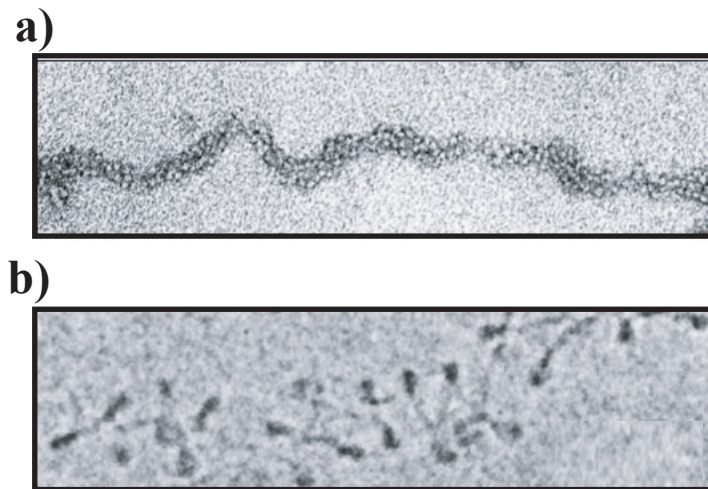


FIG. 1.9 – Deux clichés de microscopie électronique montrant la structure de la fibre de 30 nm à haute force ionique(a) et à faible salinité(b).

l'ADN environnant par des effets électrostatiques.

Bien que ces queues ne soient pas structurées, ni en solution ni en cristaux, elles sont parmi les régions les plus conservées car elles remplissent deux fonctions fondamentales.

Premièrement, en favorisant l'interaction entre les nucléosomes, elles permettent la condensation des nucléosomes en fibres compactes de 30 nm. Si on élimine, en utilisant des protéases, la queue des histones, on arrive à former des nucléosomes, mais on n'arrive pas à former la fibre de 30 nm.

Deuxièmement, *in vivo*, toute une série de modifications spécifiques dynamiques et finement contrôlées de ces queues participe à l'assemblage de la chromatine et, ultérieurement, à la régulation de l'accessibilité de l'ADN (incorporé dans la chromatine) aux facteurs de transcription, de réplication et de réparation.

Les queues des histones sont aussi impliquées dans le recrutement de protéines qui travaillent sur la chromatine. Par exemple, la queue N-terminale de H4 est impliquée dans le recrutement d'enzymes capables de déplacer le nucléosome comme ISWI [19].

1.2.4 L'ADN de jonction et l'histone H1 de jonction

En microscopie électronique, la chromatine nucléosomale se présente comme un collier de perles de 10 nm de diamètre (fig. 1.5 et 1.9), résultant de l'enchaînement successif des nucléosomes reliés entre eux par l'ADN de jonction. Chaque nucléosome est associé à environ 200 paires de bases d'ADN. Si on soustrait les 166 paires de bases des 1,75 tours d'hélice autour de l'octamère d'histones, l'ADN de jonction entre deux nucléosomes adjacents comporte 34 pb.

En réalité, la longueur et la structure de l'ADN de jonction sont extrêmement variables. Par exemple, chez les mammifères, les nucléosomes des neurones sont fortement compacts, de sorte qu'il n'existe pas d'ADN de jonction, tandis que dans les cellules gliales adjacentes, les

nucléosomes sont séparés par des séquences de jonction comportant 34 pb. Les raisons de cette variabilité ne sont pas connues. L'histone de jonction (H1) se lie à l'ADN de jonction entre les nucléosomes. Cette protéine est une protéine qui diffère des autres histones par la présence d'un domaine globulaire central flanqué de domaines basiques non structurés aux extrémités N- et C-terminales. D'une manière générale, on peut dire que deux molécules d'histone H1 encadrent chaque nucléosome en se plaçant au niveau des sites d'entrée et de sortie de l'ADN de jonction. Plusieurs variants de cet histone ont été isolés dont certains sont spécifiques de certains types cellulaires ou stades de développement. Chez *S. Cerevisiae*, le seul histone de liaison caractérisé à ce jour est codé par le gène non essentiel *hho1*. Ils stabilisent la structure nucléosomale et favorisent la formation de structures d'ordre supérieur [20, 21]. Chez les mammifères, on a au moins sept variants (ou sous-types) d'histone H1. Tous ces gènes codent des protéines dont le poids moléculaire est comparable, et dont la séquence d'acides aminés varie de 15 à 20%. Toutes ces isoformes d'H1 sont importantes pour la croissance et la prolifération cellulaire [22]. La présence d'H1 dans le nucléosome joue un rôle important dans l'organisation et la stabilisation de la fibre de 30 nm [23].

1.2.5 Deuxième niveau de compaction : la fibre de 30 nm

En étalant une chromatine native sur une grille de microscopie électronique, et en augmentant la force ionique, on observe une structure cylindrique ayant un diamètre de 30 nm et appelée fibre de 30 nm (fig. 1.9). Il est admis que les nucléosomes, en forme de disques, sont disposés de sorte que leur côté plat soit parallèle au grand axe du filament, mais il reste à déterminer comment les nucléosomes sont condensés dans ce filament. La valeur consensuelle pour la densité linéaire de nucléosomes est de 6-7 nucléosomes pour 11 nm. Si les nucléosomes sont espacés de 200 paires de bases, on déduit que 1300 paires de bases sont contenues dans 11 nm. En considérant qu'une molécule d'ADN nu de 32 paires de bases mesure environ 11 nm, on obtient donc un facteur de compaction de presque 40. La structure de la fibre de 30 nm et les conditions qui favorisent son apparition, ne sont pas des questions complètement résolues. Plusieurs modèles ont été proposés quant à la disposition des nucléosomes le long de la fibre. On peut citer comme modèles le solénoïde hélicoïdal relativement régulier, le ruban hélicoïdal spiral ou encore l'agrégation aléatoire en zigzag des nucléosomes (fig. 1.10). Ces divergences sont dues au fait que les fibres de chromatine sont très fragiles et facilement endommagées au cours des préparations nécessaires à leur étude structurale (en utilisant des techniques de microscopie électronique et de microscopie à force atomique). Deux modèles d'organisation de la fibre de 30 nm ont les faveurs de la littérature.

Le premier modèle est celui du solénoïde de 30 nm [24]. Dans ce modèle, l'histone H1 courberait l'ADN de liaison et permettrait un arrangement hélicoïdal du nucléofilament. Le pas de cette hélice serait de 7 nucléosomes. Le solénoïde ainsi créé expliquerait l'observation par microscopie électronique de la fibre de 30nm (fig. 1.9a).

Le second modèle se nomme "cross linked model" ou modèle en zigzag de la fibre de 30 nm [20]. Dans ce modèle, l'ADN de liaison est rigide et le nucléofilament suit une trajectoire zigzagante de façon irrégulière. Ce modèle permettrait d'expliquer les fibres de 30 nm observées à faible salinité et c'est actuellement le modèle le plus communément admis (fig. 1.9b).

Le rôle de H1 sur la formation de la fibre est à relativiser. Il a été montré que le blocage du gène codant H1 entraîne une baisse de 50% de la compaction de la chromatine du noyau [25], l'absence de H1 n'influe pas sur le positionnement des nucléosomes [26] et l'absence de H1 n'empêche pas la formation du chromosome [27, 28].

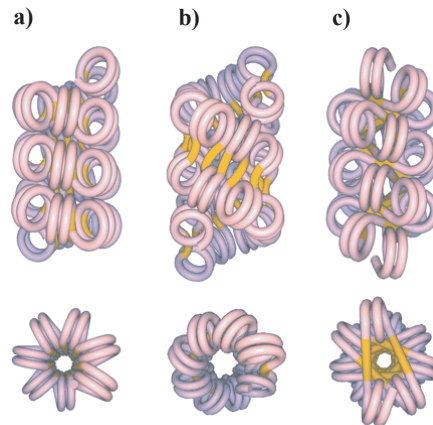


FIG. 1.10 – *Trois modèles possibles pour la disposition des nucléosomes dans la fibre de 30 nm. (a) Le solénoïde hélicoïdal régulier, (b) le ruban hélicoïdal en spirale, et (c) l'agrégation aléatoire en zigzag des nucléosomes.*

1.2.6 Niveaux supérieurs de compaction de la chromatine

Le degré de compaction de la chromatine dans le noyau cellulaire constitue un obstacle pour l'observation directe des niveaux supérieurs de sa compaction.

Le degré de compaction de la chromatine dans le noyau en interphase peut être estimé dans des expériences d'hybridation *in situ* avec des loci spécifiques dans des noyaux fixés. En connaissant la distance qui sépare deux séquences d'ADN, il est possible de calculer le degré de compaction entre ces deux éléments. Dans le cas de régions d'ADN séparées par 250000 paires de bases, on voit que la fibre de chromatine est raccourcie d'un facteur deux ou trois par rapport à la fibre de 30 nm. Pour des séquences séparées par des dizaines de millions de paires de bases, le facteur de raccourcissement augmente d'un facteur 20 à 30. Ces données suggèrent qu'il existe au moins deux niveaux de repliement supérieurs au delà de la fibre de 30 nm. À certains moments du cycle cellulaire, quand les bras des chromosomes sont moins condensés, on peut observer la présence d'une fibre de 100 à 300 nm de diamètre qui a été dénommée fibre chromonème et qui pourrait correspondre au niveau de compaction supérieur à la fibre de 30 nm. Des fibres similaires ont été observées sur des micrographies électroniques de cellules en interphase, mais il reste à déterminer si ces fibres ou d'autres structures correspondent à des niveaux plus élevés de condensation de la chromatine dans le noyau en interphase.

Il est possible d'observer les chromosomes par microscopie électronique (fig. 1.11a) [29, 30], mais les traitements infligés aux chromosomes pour obtenir un bon contraste sont très agressifs, et de petits changements de la force ionique peuvent entraîner la compaction ou la décompaction de la structure [31]. Il existe un grand nombre de modèles d'organisation des chromosomes en littérature : le modèle de "marche au hasard / boucles géantes", le modèle "chromomérique", et le modèle de "repliement hiérarchisé de l'ADN". Ces modèles d'organisation chromosomique ont certains points communs. Tout d'abord, ils supposent tous l'existence d'une fibre de 30nm. Ensuite, ces modèles proposent l'existence de boucles de chromatine formées par cette fibre, donc la taille très variable selon le modèle considéré (entre 30 et 140 kb). La présence de ces bulles a été mise en évidence par des expériences de décompaction réversibles

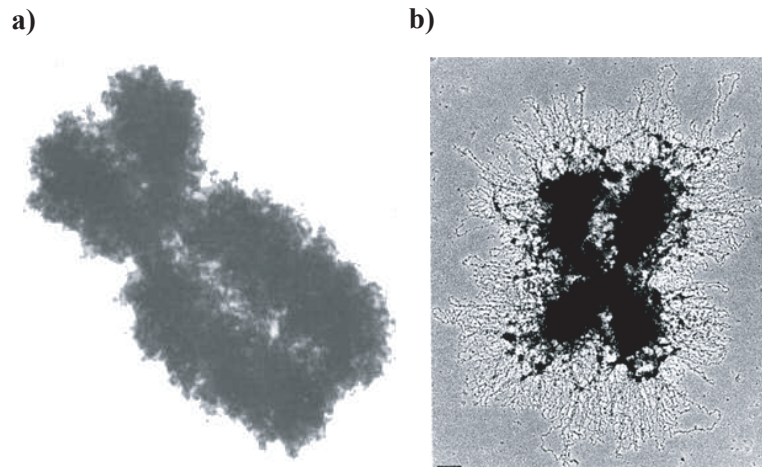


FIG. 1.11 – *Deux clichés de microscopie électronique montrant la structure du chromosome. (a) Un chromosome contrasté de façon peu agressive. (b) Image d'un chromosome obtenue avec un contraste peu agressif, après décompaction réversible induite par une diminution de concentration en Mg^{2+} . Dans ce dernier cas, il est possible de voir des bulles de chromatine.*

des chromosomes, décompaction entraînée par une diminution de la concentration en cations divalents comme le Mg^{2+} .

1.2.7 Compartimentation structurale du noyau à grande échelle

Des expériences de microscopie [32, 33] ont permis de mettre en évidence l'existence d'une structuration à grande échelle de la chromatine interphasique dans les noyaux. Outre les niveaux de structure d'ordre supérieur au sein de chaque chromosome, il apparaît que le noyau présente d'autres niveaux d'organisation.

Pendant le cycle cellulaire, la chromatine est plus ou moins condensée selon la région du noyau. Un noyau typique contient deux types de chromatine : l'euchromatine, qui contient presque tous les gènes quiescents ou transcrits de façon active, et l'hétérochromatine, qui n'est pas transcrite, et qui est plus condensée que l'euchromatine (fig. 1.12). L'hétérochromatine est environ 1000 fois plus compacte que l'ADN nu et sa structuration est impossible à observer en détail du fait de sa densité. L'euchromatine, présentant une activité transcriptionnelle relativement importante et étant moins compacte, apparaît comme un enchevêtrement de fibres inextricables qui empêchent l'observation fine de sa structure.

On distingue deux types d'hétérochromatine. L'hétérochromatine constitutive est constituée de séquences d'ADN qui ne sont jamais transcrites, quel que soit le type cellulaire, comme l'ADN satellite des centromères. L'hétérochromatine facultative est constituée de séquences d'ADN qui sont présentes dans l'hétérochromatine de certaines cellules et dans l'euchromatine d'autres cellules.

La chromatine interphasique de chaque chromosome se répartit majoritairement dans certaines zones précises du noyau. Ces zones sont appelées territoires chromosomiques (fig. 1.13b).

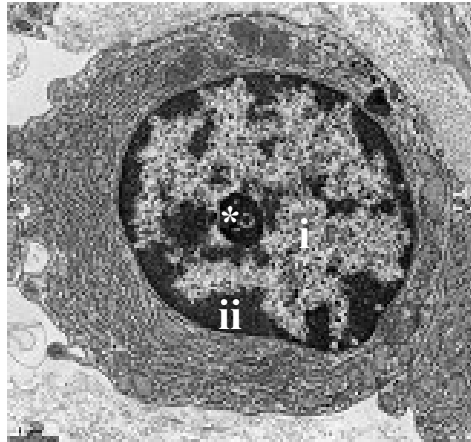


FIG. 1.12 – *Cliché de microscopie électronique montrant l'organisation d'un noyau eucaryote.*
* nucléole, *i* euchromatine, *ii* hétérochromatine.

Ces territoires correspondent à des chromosomes interphasiques. Bien que ces masses de chromatine soient distinctes, il semble qu'elles puissent s'interpénétrer [34, 35].

Il a été montré que l'arrangement radial des chromosomes interphasiques dans les territoires chromosomiques est corrélé à la séquence nucléotidique qu'ils contiennent [36, 37] et à leur densité de gènes [38]. Par exemple, dans les lymphocytes en prolifération, le chromosome 18 qui possède une chromatine pauvre en gènes, est localisé à la périphérie du noyau et interagit avec les lamines nucléaires (qui sont des protéines nucléaires qui forment des filaments (la lamina) entre la membrane nucléaire et la chromatine). En revanche, le chromosome 19, le plus riche en gènes, est situé près du centre du noyau et n'interagit pas avec les lamines nucléaires (fig.1.13a), en accord avec l'observation des positionnements de l'hétérochromatine et de l'euchromatine. Une explication récente de cette organisation des chromosomes propose que les lamines nucléaires jouent un rôle de structuration de l'hétérochromatine [39].

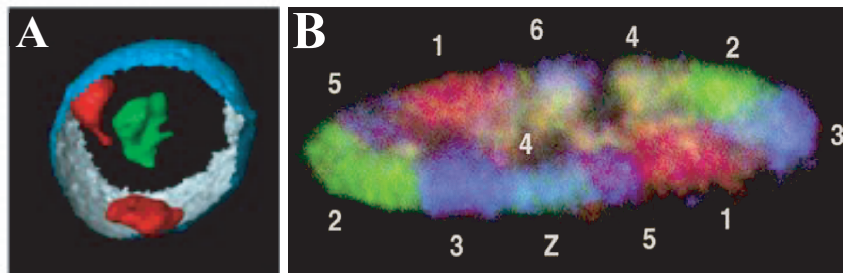


FIG. 1.13 – a) Arrangement radial des territoires chromosomiques dans le lymphocyte. Le chromosome 18, en rouge, est pauvre en gènes et il se dispose près de la périphérie du noyau (en bleu clair). A l'inverse, le chromosome 19, en vert, riche en gènes se dispose au centre du noyau.
 b) Photographie montrant les territoires chromosomiques dans une cellule de poulet.

Chapitre 2

Le remodelage de la chromatine

2.1 Introduction

Le positionnement des histones le long de l'ADN et l'accessibilité de l'ADN autour des histones sont les acteurs principaux de la régulation de l'expression génétique des eucaryotes. En effet, des expériences de déposition *in vitro* des histones sur de l'ADN nu ont montré que la déposition est suivie par une baisse de l'activité transcriptionnelle des gènes [40, 41]. Les nucléosomes, la plupart du temps, bloquent l'accrochage de plusieurs facteurs de transcription en masquant leur sites de reconnaissance sur l'ADN.

Généralement, les facteurs de transcription peuvent retrouver la capacité de s'accrocher sur l'ADN grâce au fait que les nucléosomes peuvent glisser le long de la molécule d'ADN de façon spontanée. Par un mécanisme inverse, la cellule peut réguler l'accès des protéines qui doivent interagir avec des sites spécifiques sur l'ADN, en bloquant les nucléosomes sur ces sites en utilisant l'histone de liaison (H1) [42].

La distribution des nucléosomes au sein de la chromatine n'est ni uniforme ni statique. La structure de la chromatine est très dynamique, d'une part parce que les nucléosomes sont mobiles du fait des fluctuations thermiques, d'autre part parce que les nucléosomes peuvent être modifiés par l'addition de groupements chimiques, qui modifient les propriétés structurales de la chromatine qui les contient.

Les enzymes qui remodelent la chromatine en altérant sa structure, sa fluidité et son assemblage, fournissent une solution aux problèmes d'accessibilité associés à la compaction de l'ADN par les histones.

Ces enzymes sont généralement regroupées en deux classes distinctes [43]. La première classe est constituée par les enzymes qui changent et modulent les propriétés de la chromatine par l'introduction de modifications covalentes des histones nucléosomales ou de l'ADN dans la chromatine (comme par exemple l'acétylation, la phosphorylation ou la méthylation) [44, 45, 46]. La deuxième classe (de ces enzymes) utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour altérer localement la structure chromatinienne de façon mécanique.

Au cours de ce chapitre, je parlerai de toutes les modifications que les nucléosomes peuvent subir. Ensuite, j'entrerai plus en détail dans la description des facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, qui ont constitué le sujet de cette thèse.

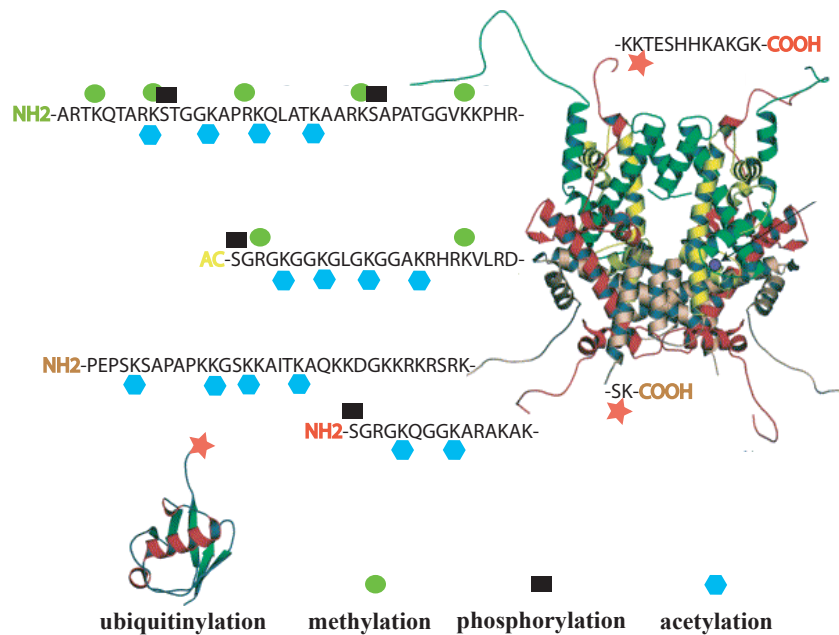


FIG. 2.1 – Représentation schématique des queues des histones et de certains types de modifications post-traductionnelles qu'elles peuvent subir. Les sites des modifications sont indiqués.

2.2 Les modifications covalentes des histones

Le terme "modifications covalentes des histones" recouvre en fait toute une série de modifications que peuvent subir les queues des histones (Fig. 2.1).

Chaque modification joue un rôle fondamental dans la dynamique de la chromatine et le niveau d'expression des gènes. Par exemple, l'acétylation est considérée comme un mécanisme d'activation transcriptionnelle. Cependant, si l'on regarde plus en détail la constitution de la chromatine, on voit qu'il existe déjà un niveau basal d'acétylation, et donc l'acétylation ciblée envers certains résidus se fait dans un contexte global d'acétylation et dé-acétylation déjà présentes [47]. En plus, l'acétylation n'est pas toujours synonyme d'activation de la transcription, vu que l'on trouve aussi des histones acétylés dans l'hétérochromatine [48]. Réciproquement, la dé-acétylation d'un résidu ne provoque pas toujours la répression des gènes concernés. Ceci suggère donc que l'effet sur la transcription dépend de la combinaison des différentes modifications effectuées au niveau de la chromatine.

Les modifications covalentes des histones et le profil de ces modifications entraînent, selon le contexte, des réponses différentes. L'association des différentes modifications formerait alors un code, déchiffré par d'autres protéines, qui déterminerait la voie dans laquelle s'engage la cellule. Cette hypothèse est contenue dans la théorie du code des histones proposée par D. Allis [49, 44]. Elle est soutenue par le fait qu'il existe des coopérations et/ou interférences entre les différentes modifications et le remodelage de la chromatine [50, 51, 52, 53, 54, 55].

Les différentes modifications des histones constituent un signal de ciblage et d'ancrage de l'activité de remodelage vers certaines régions chromatiniennes. La découverte de motifs tels

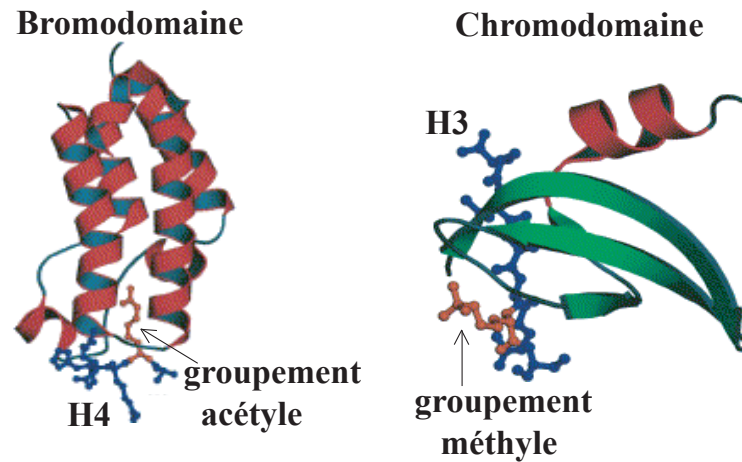


FIG. 2.2 – *Structure atomique du Bromodomaine et du Chromodomaine.* Ces domaines sont capables d'interagir avec les queues des histones H4 et H3 quand elles sont acétylées ou méthylées.

que les bromodomains et les chromodomains (Fig. 2.2), qui reconnaissent respectivement les histones acétylées et méthylées, conforte cette hypothèse. Le bromodomaine est un motif protéique d'environ 110 acides aminés, conservé chez les eucaryotes. On le retrouve fréquemment dans des protéines ayant un rapport avec la régulation de l'activité transcriptionnelle et notamment dans des protéines appartenant à des complexes histone acétyltransférases ou de remodelage de la chromatine comme Gcn5, Sth1 ou Rsc4.

Le bromodomaine est capable *in vitro* de se lier à la partie N-terminale de l'histone H4 [56, 57] et peut reconnaître spécifiquement des peptides acétylés.

Ceci a été montré par des études faites par résonance magnétique nucléaire sur le bromodomaine de la protéine humaine Pcaf [56, 58].

Le chromodomaine est un motif qui est constitué d'une cinquantaine de résidus. Il a été décrit pour la première fois chez la drosophile dans différentes protéines, comme des histones méthyltransférases, des histones acétyltransférases, des intégrases, ou des hélicases. Sa structure a été résolue [59] et son repliement est semblable à celui trouvé dans plusieurs protéines procaryotes et eucaryotes se fixant à l'ADN [60].

Certaines expériences ont montré que le chromodomaine est capable de se fixer aux histones méthylées [61, 62].

2.2.1 Acétylation des histones

L'acétylation est le transfert d'un groupement acétyle depuis l'acétyl coenzyme-A vers un résidu lysine de la protéine cible (Fig. 2.3). Dans les histones, elle est catalysée par des acétyltransférases. Cette réaction a lieu sur les queues amino-terminales des histones. L'acétylation des lysines est une modification qui diminue les charges positives de ces extrémités.

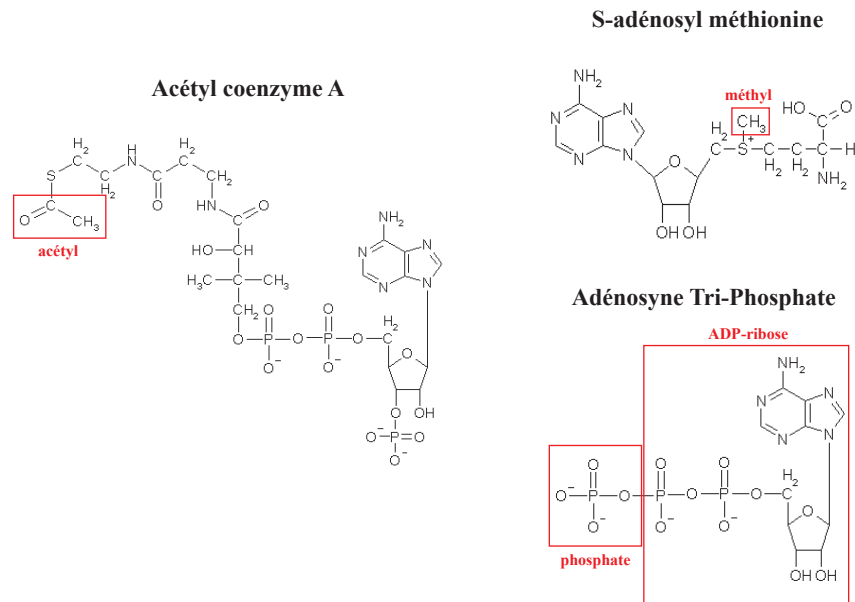


FIG. 2.3 – Structures chimiques des donneurs des groupements utilisés dans les réactions de modification covalente des histones. Les groupements chimiques transférés sont indiqués en rouge.

Cette modification provoque une sensibilité accrue des nucléosomes à la digestion par des nucléases, ce qui indique que l'ADN est plus accessible.

En fait, la présence d'acétyl-lysines dans la queue des histones rend plus faibles les interactions entre les queues et l'ADN ou entre les nucléosomes eux-mêmes, augmentant ainsi l'accessibilité de l'ADN et activant de cette façon la transcription [63, 64].

La corrélation entre la présence d'histones acétylés et la chromatine transcriptionnellement active a été établie dans les années 1960 [65, 66]. Des anticorps dirigés contre les histones hyperacétylés reconnaissent des fragments de chromatine contenant beaucoup de gènes transcriptionnellement actifs [67]. L'acétylation spécifique peut aussi réguler la réplication de l'ADN, la déposition des histones et la réparation de l'ADN par un mécanisme de recrutement de protéines qui contiennent le bromodomaine. Le lien entre l'acétylation des histones et ces autres processus a été renforcé par la découverte de complexes coactivateurs possédant une activité histone acétyltransférase (HAT)[68].

Ces enzymes ont généralement comme substrats privilégiés les histones H3 et H4. Deux catégories d'histone acétyltransférases ont été définies. Les HAT de type B, qui ont une localisation cytoplasmique et acétylent les histones H4 avant leur entrée dans le noyau et leur dépôt sur l'ADN néo-synthétisé. Les HAT de type A, qui sont nucléaires et acétylent les histones déjà incorporés au sein de nucléosomes. L'acétylation est un processus qui peut être inversé par l'action de protéines appelées histones dé-acétylases (HDACs) [69]. Un exemple est la protéine Sir2, qui est impliquée dans plusieurs aspects de la régulation des gènes et du métabolisme cellulaire [70].

2.2.2 Méthylation des histones

La méthylation est le transfert d'un groupement méthyle depuis la S-adénosyl méthionine vers la protéine cible (Fig. 2.3). Les histones peuvent être méthylés par des histones méthyltransferases (HMT) au niveau des résidus lysine ou arginine. Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne modifie pas la charge globale des histones.

La méthylation des histones a été corrélée à la régulation de la transcription, cependant, la méthylation, comme l'acétylation, n'a pas comme conséquence systématique une activation transcriptionnelle.

La méthylation des résidus lysine est directement impliquée dans l'héritage épi-génétique [71]. L'établissement et la maintenance d'un profil de transcription stable pendant la mitose et la méiose est fondamentale pour les fonctions et la détermination cellulaire. Deux mécanismes d'extinction épi-génétique pendant le développement sont liés à la méthylation des lysines 9 et 27 sur l'histone H3, et s'opèrent grâce à la protéine HP1 et la protéine Polycomb [72, 73].

Le résidu, son emplacement, le nombre de groupements méthylés ajoutés et la présence d'autres modifications, déterminent l'effet transcriptionnel. Par exemple, la méthylation du résidu lysine 9 de l'histone H3 a été associée à la formation d'hétérochromatine. Cette modification est par ailleurs reconnue par le répresseur transcriptionnel Hp1 chez la drosophile et les mammifères, et par son homologue Swi6 chez *S. pombe* [61, 62]. L'histone H3 peut également être méthylé sur la lysine 4. Contrairement à la méthylation de la lysine 9, la méthylation de la lysine 4 semble être associée à l'activation ou à la répression de la transcription, selon l'organisme considéré. Cette modification a été détectée par exemple dans l'euchromatine de *T. thermophila* [74] où elle est associée à l'activation transcriptionnelle. La méthylation de ce résidu est fréquente dans *S. cerevisiae* où elle peut soit activer, soit réprimer l'expression des gènes associés. Le nombre de méthylations de ce résidu peut même jouer un rôle capital. Par exemple ce résidu est diméthylé dans la région codante, et il participe à l'activation transcriptionnelle en bloquant l'acétylation des régions concernées [75, 76].

La méthylation des arginines dans les histones H3 et H4 a été corrélée avec un état actif de la transcription [77]. La méthylation de l'Arginine 3 de l'histone H4 facilite l'acétylation de H4, et elle augmente l'activation de la transcription par le récepteur d'hormones nucléaires [78].

2.2.3 Phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones (transfert d'un groupement phosphate sur une sérine à partir de la molécule d'ATP (Fig. 2.3)) modifie négativement la charge des nucléosomes. Les phosphorylations les mieux connues sont celles de l'histone H3 au niveau des sérines 10 et 28, qui sont corrélées à la mitose et la condensation du chromosome [79, 80, 81, 82, 83]. D'autres sérines phosphorylées ont été identifiées sur les histones H4, H2A et H2B [84]. La phosphorylation est impliquée aussi dans l'activation transcriptionnelle [85, 86]. En fait, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 module l'activité d'acétylation, et la mutation de ce résidu en alanine affaiblit la transcription de certains groupes de gènes [87]. Ces expériences sont une autre preuve de la coopération entre les différents mécanismes qui modifient les histones pour moduler leur activité. Aucun module reconnaissant les queues phosphorylées n'a encore été identifié.

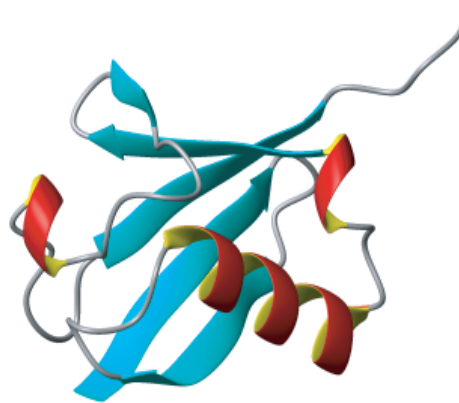


FIG. 2.4 – Structure atomique de l'Ubiquitine humaine avec une résolution de 1.8Å[95].

2.2.4 ADP-ribosilation, Ubiquitination et Sumolation

L'ADP-ribosilation du cœur histonique (transfert d'un groupement adénosine-diphosphate à partir de la molécule d'ATP Fig. 2.3) peut mener à un remodelage local de la fibre chromatine. La synthèse d'une longue chaîne chargée négativement d'ADP-ribose pourrait bien expliquer le déplacement partiel des nucléosomes, par un échange des histones avec un compétiteur polyanionique [88], en ouvrant localement la chromatine. L'attachement covalent d'Ubiquitine (Fig. 2.4) ou de Sumo (une petite protéine corrélée en séquence à l'Ubiquitine) sur une lysine spécifique dans les histones joue un rôle très important dans la régulation transcriptionnelle. La régulation peut intervenir soit par dégradation protéasome-dépendante des facteurs transcriptionnels (comme ceux impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation cellulaire, de la réponse au stress, etc. [89]), soit par d'autres mécanismes liés au recrutement des complexes de modification. Si l'ubiquitination a été associée à un contrôle positif de la transcription [90], des études récentes indiquent que la sumolation de l'histone H4 est importante pour la répression [91]. Les résidus ubiquitinylés ou sumolés des histones sont situés au début de la partie C-terminale et non dans la queue amino-terminale des histones H2A et H2B [92, 93, 94].

2.2.5 Les variants des histones

Il existe des variants des histone H3 et H2A qui confèrent des fonctions spécialisées à la chromatine qui les contient (Tab. 2.1) [96]. Ces variants sont synthétisés pendant tout le cycle cellulaire, et leur déposition est réplication-indépendante. L'accessibilité relative des histones H3 et H2A au sein du nucléosome rend la déposition possible. Un variant de l'histone H3 est la protéine centromérique A (CENP-A), qui participe à l'assemblage du nucléosome centromérique avec H4, H2A et H2B[97]. CENP-A est essentielle pour la structure et la fonction du centromère. Un autre variant de H3 est H3.3, qui partage une homologie en séquence avec H3, et qui est déposé dans des lieux particuliers sans nécessiter la réplication de l'ADN. On pense que le remplacement d'H3 par H3.3 est la cause d'une activation immédiate des gènes qui sont réprimés par la méthylation de la lysine 9 d'H3 [98].

variants des histones	Homme	Souris	Levure (S. pombe)	Levure (S. cerevisiae)	Drosophyla
H3.3	H3.3 H3F3	h3f3	hht	H3	His3.3
CenH3	CenP-A	Cenpa	cnp 1 sim 2	Cse4	Cid
H2A.Z	H2A.Z H2AF/Z	H2afz H2afv	pht 1	Htz 1	H2AvD
H2A.X	H2A.X H2AF/X	H2afx	H2A	H2A	H2AvD
H2A.Bbd	H2A.Bbd H2AF/B	H2a-bbd			
MacroH2A	MacroH2A H2AF/Y	H2afy			

TAB. 2.1 – *Les principaux variants des histones.*

Plusieurs variants de l'histone H2A existent chez les eucaryotes supérieurs. L'un d'entre eux, H2A.Z, conservé de la levure à l'homme, est impliqué dans la régulation transcriptionnelle. Sa répartition dans le génome n'est pas uniforme et il n'est pas uniquement localisé au niveau de la chromatine transcriptionnellement active [9].

Les nucléosomes incorporant des variants H2A.Z semblent moins stables, ce qui suggère que cet histone pourrait déstabiliser la chromatine en permettant une meilleure accessibilité de l'ADN [99]. Cependant, l'histone H2A.Z n'intervient pas uniquement dans l'activation transcriptionnelle. Il a été détecté au niveau des sites soumis à une extinction transcriptionnelle (silencing) et il est requis pour que cette extinction soit effectuée normalement [100].

Le cristal du nucléosome qui contient l'H2A.Z montre des changements subtils de l'accessibilité à la surface du nucléosome [101]. La surface d'interaction H2A.Z/H2B est modifiée par rapport à celle de H2A/H2B de telle sorte que l'intégration d'un deuxième histone H2A.Z est favorisée.

Le variant d'H2A H2A.X a une extension C-terminale qui est très importante pour la réparation de l'ADN par liaison d'extrémités non homologues. La fonction d'H2A.X dépend de la phosphorylation de l'extrémité C-terminale [102].

Le variant MacroH2A a un repliement non-histonique de 25 kDa à l'extrémité C-terminale. Il semble être impliqué dans l'inactivation d'un des deux chromosomes X des femelles mammifères [103].

2.2.6 La méthylation de l'ADN

L'ADN est sujet lui aussi à des modifications covalentes. La méthylation des cytosines est très importante pour la répression des gènes chez les mammifères et les plantes [104]. Dans les cellules adultes des vertébrés 60 à 90% des dinucléotides CpG sont méthylés au niveau de

la cytosine. Les différences de l'état de méthylation de l'ADN sont liées à l'extinction transcriptionnelle du génome, l'inactivation du chromosome X et le développement embryonnaire. La méthylation de l'ADN réprime les gènes par le recrutement de protéines qui contiennent un motif de liaison avec les CpG-méthylés (MBP). Un exemple typique de répression par recrutement d'une protéine qui contient le motif MBP implique la protéine MeCP2. Cette protéine interagit avec les régions méthylées, ainsi qu'avec une protéine appelée Sin3. Cette dernière recrute une dé-acétylase (HDAC1) au niveau du promoteur, et de cette façon ce système de recrutement va dé-acétyler les histones dans la région du promoteur, ce qui réduit l'accessibilité du promoteur aux facteurs transcriptionnels [105, 106].

Dans les organismes supérieurs, qui ont un grand nombre de gènes tissus-spécifiques, la méthylation offre un moyen de réprimer de manière permanente l'expression des gènes qui ne sont pas nécessaires à certains types de cellules différenciées. Cette répression est due au fait que la méthylation de l'ADN est une modification très stable, qui réside dans des sites spécifiques pendant le cycle cellulaire, et se transmet après la division cellulaire aux cellules filles. Les autres modifications, qui interviennent au niveau des nucléosomes, sont déplacés par la fourche de réplication, et ne sont donc pas efficaces pour garantir de manière permanente la répression d'un gène (ou d'une série de gènes) dans un tissu spécifique.

2.3 Les facteurs de remodelage de la chromatine

La deuxième catégorie de mécanismes de remodelage de la structure chromatinienne met en jeu des complexes de remodelage spécialisés, qui agissent dans la réorganisation de la chromatine associée à des gènes particuliers. La structure de la chromatine réduit l'interaction de l'ADN avec les facteurs nucléaires. Par exemple, la protéine TBP (TATA box Binding Protein) peut s'accrocher à la séquence TATA de l'ADN nu avec un K_d de $10^{-9} - 10^{-10}M$, mais est incapable de s'accrocher sur la chromatine, vu que son K_d est de l'ordre de $10^{-6}M$ [18]. La création d'un ADN accessible, dans le contexte chromatinien, est un événement clé dans plusieurs processus cellulaires (comme la régulation transcriptionnelle, la réplication, la réparation de l'ADN ou la recombinaison), et la dérégulation de ce remodelage a de sévères conséquences sur la croissance cellulaire, la division et la différenciation. Un grand nombre de ces complexes de remodelage ont été identifiés [107, 108, 109].

Ces complexes utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour induire des changements locaux dans l'arrangement des nucléosomes et dans l'enroulement de l'ADN au sein de la chromatine. Les mécanismes de modifications covalentes des histones et de remodelage des nucléosomes ne sont pas indépendants. Une des implications de la théorie du code des histones est que ces différentes machineries peuvent s'influencer mutuellement. L'action des complexes de modification des histones et de remodelage de la chromatine peut être ciblée au niveau de certains promoteurs. Certains régulateurs transcriptionnels peuvent interagir avec les deux types de machineries, ce qui suggère que les deux mécanismes peuvent coopérer [51, 110, 111, 112]. Les gènes de l'endonucléase HO et de l'interféron- β sont donnés à titre d'exemple pour montrer l'effet de la coopération entre les modifications covalentes des histones et les facteurs de remodelage (Fig. 2.5) [50, 52].

Les facteurs de remodelage de la chromatine ont été étudiés généralement comme facteurs d'activation génétique. En réalité, ils peuvent aussi faciliter la répression génétique. Des expériences mesurant la variation de l'expression génétique dans la levure, en présence d'une inactivation de SWI/SNF, ont montré une réduction des niveaux d'expression de 5-6% des

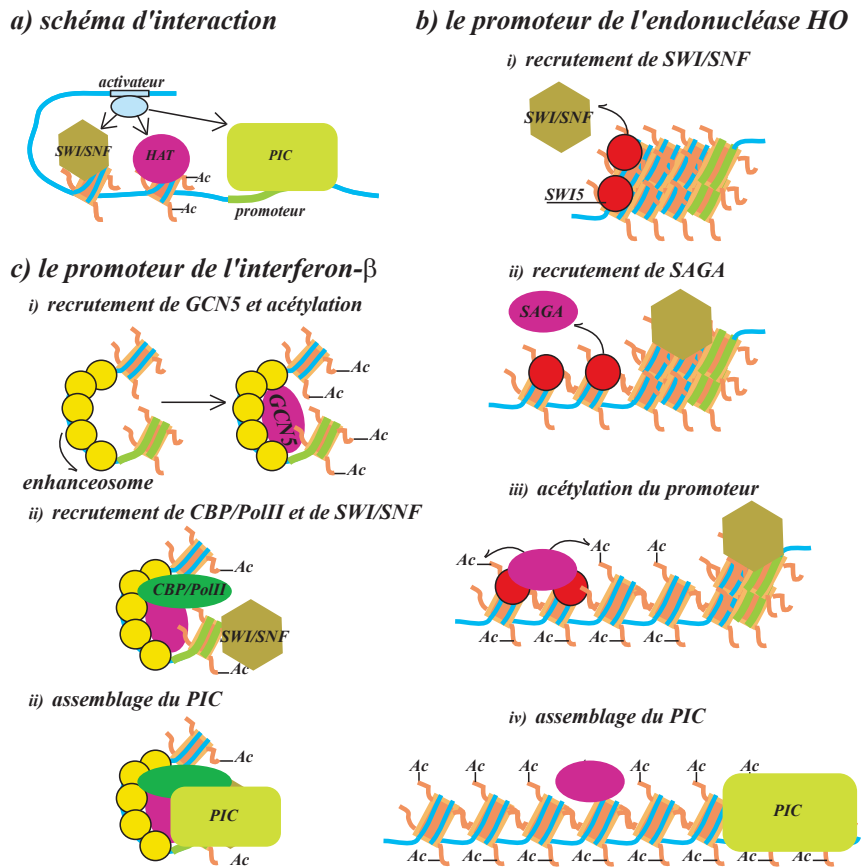


FIG. 2.5 – **a)** L'accrochage de certains activateurs transcriptionnels, peut recruter au niveau du promoteur des gènes les facteurs de remodelage ainsi que le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). **b)** et **c)** Schémas montrant le recrutement séquentiel des facteurs de remodelage au niveau des promoteurs de l'endonuclease HO et de l'interféron- β . **b)i)** L'activateur SWI5 recrute le complexe de remodelage SWI/SNF qui commence à remodeler en rendant plus accessible le promoteur. Ensuite, **ii)** SWI5 recrute le complexe SAGA, qui acétyle les queues des histones (**iii)**), en rendant le promoteur plus accessible et en favorisant ainsi l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC)(**iv)**). **c)i)** Dans le promoteur du gène de l'interféron- β , l'enhanceosome recrute le complexe GCN5 qui acétyle les queues des histones au niveau du promoteur. **ii)** Cette acétylation recrute soit le complexe CBP/PolII, soit le complexe SWI/SNF qui s'accroche grâce au bromodomaine directement sur les histones. **iii)** À la fin le remodelage facilite l'assemblage du PIC.

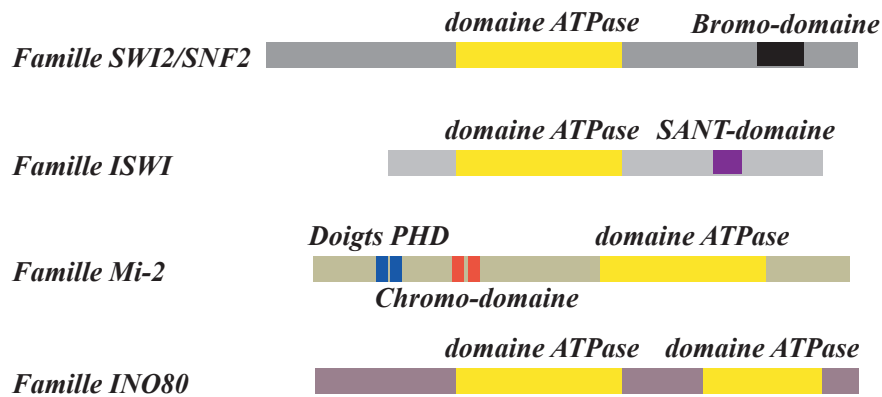


FIG. 2.6 – Tous les complexes de remodelage de la chromatine ont pour sous-unité catalytique une ATPase ADN-dépendante appartenant à la famille de protéines *Swi2/Snf2*. Le domaine ATPase de la protéine *Ino80* a la particularité d'être divisé en deux sous-domaines. Chaque classe est caractérisée par la présence d'un module supplémentaire. Leur domaine ATPase est conservé et ressemble à celui d'une ADN hélicase. Seul le complexe *INO80* a une activité hélicase démontrée. Ce dernier contient également les protéines *Rvb1* et *Rvb2*, homologues à une hélicase bactérienne.

gènes et la plupart semblent être régulés négativement [113]. D'autres expériences ont montré que les facteurs de remodelage régulent aussi négativement l'expression des gènes [114, 115, 116, 117, 118].

Les facteurs de remodelage de la chromatine peuvent être adressés vers des loci spécifiques par des interactions avec d'autres protéines qui régulent les gènes, ou par des épitopes situés sur des histones (Fig. 2.5). Le recrutement de SWI/SNF par certains gènes a été observé à travers l'interaction avec différents facteurs de transcription séquence-spécifiques [119].

Des contacts entre les domaines d'activation de différents facteurs de transcription et les sous-unités *Swi1p*, *Snf5p* et *Snf2p*, ont été identifiés et ils semblent être partiellement redondants *in vivo* [120]. D'autres facteurs de remodelage sont recrutés par des répresseurs, comme *ISW2p* qui est recruté par le répresseur transcriptionnel *Ume6* au niveau de gènes qui sont exprimés tôt dans la méiose, et *ISW1p* qui est recruté par le facteur séquence spécifique *Cbf1p* au niveau du promoteur *PHO8* [121, 122]. Il a été démontré que les interactions avec des coactivateurs ou des composants de la machinerie basale de la transcription peuvent influencer le recrutement de SWI/SNF [123, 52].

Le deuxième type d'adressage des facteurs de remodelage se fait par interaction directe avec les histones. L'exemple le mieux étudié est celui de l'interaction entre les bromodomaines des complexes et les histones acétylés. Des expériences ont montré que le bromodomaine est nécessaire pour la rétention du complexe SWI/SNF sur la chromatine acétylée *in vivo* et *in vitro* [124].

Tous les facteurs de remodelage de la chromatine sont caractérisés par la présence d'une sous-unité ATPase ADN-dépendante qui appartient à la super-famille SNF2 (Sucrose Non Fermenters) [125, 108]. Sur la base de cette sous-unité et la présence de domaines caractéristiques, ils ont été classés en sept sous-familles. Je parlerai seulement dans ce chapitre des quatre familles les plus importantes et les mieux connues en termes de fonction et de formation de

<i>levure</i> SWI/SNF	<i>levure</i> RSC	<i>Drosophila</i> Brahma	<i>Homme</i> SWI/SNF
Swi2/Snf2	Sth1/Nsp1	Brm	hBRG1 ou hBRM
Swi1			p270/BAF250
Snf5	Sfh1	Snr1	hSNF5/INI1/BAF47
Swi3	Rsc8/Swh3	Bap155/Moira	BAF170, BAF155
Swp82			
Swp73/Snf12	Rsc6	Bap60	BAF60
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7	Bap55	BAF53
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9	Bap55	BAF53
Snf6			
Swp29/TafII30			
Snf11	Rsc1* ou 2* Rsc3-5,-7,-9,-10 Rsc13-15		
		Bap111 β-Actin/Bap47 Bap74	BAF57 β-Actin

TAB. 2.2 – *Composition des complexes de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF. La sous-unité ATPase est indiquée en rouge. Les homologues dans les différents complexes sont placés sur la même ligne. Les sous-unités Rsc1 et Rsc2 (*) sont homologues et appartiennent à deux formes distinctes du complexe RSC.*

complexes : le groupe SWI2/SNF2, le groupe imitation SWI (ISWI), le groupe de la famille Ino80 et le groupe CHD (Fig.2.6). Le remodelage des nucléosomes a été décrit aussi pour les membres des sous-familles de la protéine B du syndrome de Cockayne (CSB), de la protéine Rad54 et la protéine DDM1 [126, 127, 128, 129, 130].

Leur domaine ATPase est conservé et ressemble à celui des hélicases (Fig. 2.13). Celui de la protéine Ino80 de *S. cerevisiae* a la particularité d'être divisé en deux sous-domaines. Aucune activité hélicase n'a été démontrée pour ces complexes de remodelage à l'exception du complexe de levure INO80 [131]. Les domaines ATPase sont associés au sein de chaque classe à un autre motif spécifique : les ATPases de type Snf2/swi2 possèdent un motif de type bromodomaine, le domaine ATPase des protéines homologues à Iswi est couplé par un module de liaison à l'ADN appelé domaine SANT. La famille Mi-2 est quant à elle caractérisée par la présence d'un chromodomaine. Le nombre de sous-unités de ces différents complexes varie énormément.

2.4 La famille SWI/SNF

La famille SWI/SNF contient notamment les complexes de levure SWI-SNF, RSC et les différentes isoformes humaines de facteurs SWI/SNF-A et SWI/SNF-B. Le complexe SWI/SNF a été le premier complexe de remodelage de la chromatine (contenant une ATPase de type Swi2/Snf2) à avoir été isolé chez la levure (Tab. 2.2). Plusieurs composants de ce complexe ont été originellement identifiés génétiquement comme régulateurs positifs de la transcription

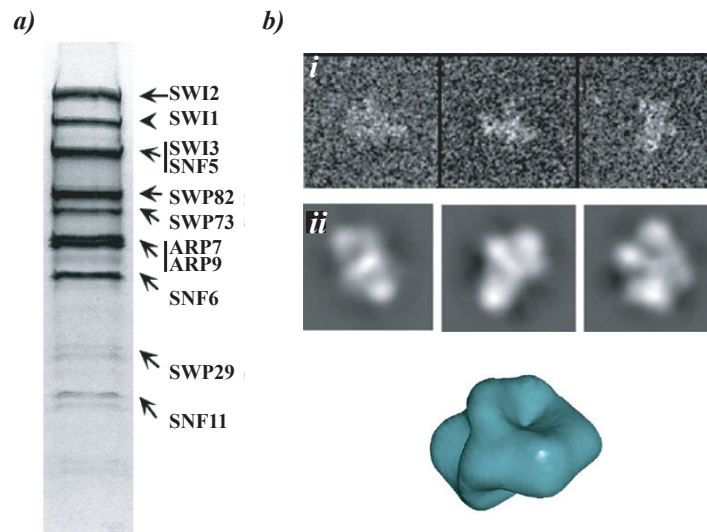


FIG. 2.7 – a) Gel SDS-PAGE montrant les différentes sous-unités qui constituent le complexe SWI/SNF chez la levure. b) i) Clichés en microscopie électronique montrant le complexe γ SWI/SNF. ii) Les images traitées en utilisant des méthodes d'analyse dans l'espace de Fourier permettent d'obtenir la reconstitution 3D de la structure du complexe avec une résolution estimée à 26-30 (en bas à droite).

de deux gènes : le gène de l'endonucléase HO et le gène SUC2, qui code pour une invertase. Le produit du gène HO est une endonucléase nécessaire au changement de type sexuel et les mutants pour ce gène ont des défauts dans le changement de type sexuel, d'où le nom SWI (SWItching mating type). Les mutants de l'invertase SUC2 sont classifiés comme Sugar Non Fermenters, d'où le nom SNF [132, 133]. Des études génétiques et biochimiques ont par la suite montré que ces différentes protéines forment un même complexe, composé d'au moins 11 sous-unités et d'une masse moléculaire d'environ 2 MDa [134]. Chez *S. cerevisiae*, SWI/SNF n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Des études génétiques ont permis d'établir un lien entre ce complexe et le remodelage de la chromatine. Ils ont été classés en fonction de mutations appelées SIN qui suppriment le phénotype swi/snf^- . Plusieurs mutations SIN correspondent à des mutations dans les gènes codant les histones H3 et H4 [135]. La déplétion partielle des histones H2A et H2B permet également de supprimer ce phénotype [136]. Ces données impliquent donc que la déstabilisation de la structure chromatiniennne et le fonctionnement de SWI/SNF sont liés. Des expériences de sensibilité de la chromatine à la digestion par des nucléases sur le gène SUC2 ont démontré la "fonction chromatiniennne" de SWI/SNF. L'activation de la transcription du gène s'accompagne d'un changement du profil de digestion. Des mutations dans les gènes codant les sous-unités Snf2 ou Snf5 abolissent à la fois l'induction transcriptionnelle et la modification de la structure chromatiniennne du gène SUC2. Celles-ci sont en partie rétablies lorsque la quantité d'histones H2A et H2B est artificiellement diminuée [136, 137]. Ces différentes observations suggèrent que les nucléosomes sont déplacés par SWI/SNF, permettant ainsi l'accès de la machinerie de transcription [138].

2.4.1 Le complexe γ RSC

RSC est un complexe de remodelage de la chromatine de la famille Swi/Snf, fortement exprimé chez *S. cerevisiae* [139]. RSC est un complexe d'environ 1 MDa isolé chez la levure sur la base de similitudes de sa sous-unité catalytique Sth1 avec la protéine Swi2/Snf2 du complexe SWI/SNF [139]. Des expériences de sensibilité à la digestion par la DNase I montrent que ce complexe est capable in vitro de remodeler de façon ATP-dépendante la structure de la chromatine. Le complexe RSC est composé d'au moins 15 sous-unités [139, 140]. Les gènes codant treize d'entre elles sont connus. En plus de Sth1, plusieurs autres sous-unités de RSC ressemblent à des sous-unités de SWI/SNF. Les sous-unités Sth1, Sfh1, Rsc8 et Rsc6 sont homologues respectivement à Swi2/Snf2, Snf5, Swi3, et Swp73 du complexe SWI/SNF. Les deux complexes partagent également deux protéines apparentées à l'actine, Arp7 et Arp9 (aussi nommées Rsc11/Swp61 et Rsc12/Swp59). Ces deux protéines, bien que capables d'hydrolyser l'ATP, semblent avoir un rôle plus structural que catalytique [141]. Par ailleurs, le complexe RSC compte au moins 6 sous-unités spécifiques : Rsc1, Rsc2, Rsc3, Rsc4, Rsc30 et Rsc58. Malgré leur ressemblance, les complexes SWI/SNF et RSC ne sont pas redondants. En effet, contrairement à SWI/SNF, le complexe RSC est essentiel pour la croissance mitotique. D'autre part, l'estimation basée sur les rendements de purification suggère que RSC est au moins dix fois plus abondant dans la cellule que SWI/SNF. Ceci permet de supposer que RSC pourrait agir soit au niveau d'un grand nombre de promoteurs, soit être impliqué dans plusieurs autres processus agissant au niveau de l'ADN, comme la réparation ou la réplication de l'ADN. Le complexe RSC existe sous plusieurs isoformes. La purification du complexe à partir d'anticorps dirigés contre la sous-unité Rsc6 fait apparaître deux formes distinctes de RSC. La forme RSCa est dépourvue des polypeptides Rsc3 et Rsc30 et représente 10 à 20 % de la quantité de complexe purifié [139, 142]. Les complexes RSC et RSCa ont des propriétés extrêmement proches [139]. Par ailleurs, il existe aussi deux autres isoformes de RSC qui contiennent soit la protéine Rsc1, soit la protéine Rsc2. L'isoforme contenant la protéine Rsc2 est la plus abondante. Les protéines Rsc1 et Rsc2 sont fortement similaires et ne sont pas essentielles à la cellule. Toutefois, la délétion des gènes RSC1 ou RSC2 confère des défauts de croissance spécifiques. La délétion simultanée des deux gènes est par contre létale [143]. Les protéines Rsc1 et Rsc2 partagent donc des fonctions communes mais ne sont pas totalement redondantes et interchangeables. Chacune contient deux bromodomains et un domaine de type BAH. Ce dernier est un motif protéique d'environ 130 résidus qui a été originellement identifié dans les protéines Polybromo humaine et Rsc2 de levure [144]. La présence dans ces deux protéines de bromodomains a conduit à nommer ce motif "Bromodomain Adjacent Homology" ou BAH. Le motif BAH, retrouvé chez tous les eucaryotes, est présent dans un grand nombre de protéines qui possèdent par ailleurs soit un domaine impliqué dans la régulation transcriptionnelle soit des motifs de liaison à l'ADN. Ceci suggère un rôle dans la régulation de la transcription [145]. Les protéines Rsc1, Rsc2 et Polybromo sont toutefois les seuls polypeptides connus possédant à la fois des bromodomains et des motifs BAH [146]. Il a été proposé que ce motif soit un module d'interaction protéine-protéine impliqué dans la régulation transcriptionnelle [145]. Notons également que les protéines Rsc1 et Rsc2 contiennent aussi un crochet AT (AT-hook). Il s'agit d'un motif de liaison à l'ADN qui reconnaît préférentiellement les sillons mineurs des régions riches en nucléotides A et T [147]. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées sur les deux isoformes du complexe. Elles ne font pas apparaître de différences flagrantes dans la localisation des complexes contenant les protéines Rsc1 ou Rsc2 [148]. La non redondance de Rsc1 et Rsc2 suggère alors que les deux complexes agissent différemment au niveau

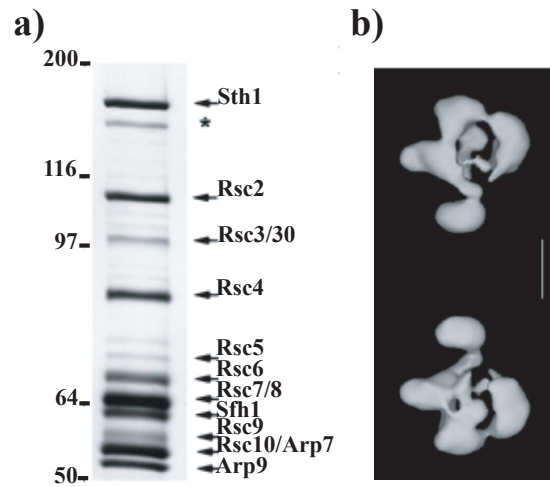


FIG. 2.8 – a) Gel SDS-PAGE montrant les différentes sous-unités qui constituent le complexe RSC dans la levure. b) Reconstitution 3D de la structure du complexe avec une résolution estimée à 26-30, obtenue en utilisant des images réalisées avec un microscope électronique.

de quelques loci et/ou qu'ils assurent des fonctions spécifiques autres que transcriptionnelles.

Le fait que RSC soit essentielle à la viabilité des cellules rend très difficile l'analyse génétique de ce complexe. En revanche, deux types d'analyses du génome suggèrent que RSC est un important régulateur transcriptionnel. La première, est une expérience de puce à ADN qui a analysé les mutants *rsc3* et *rsc30* en identifiant plusieurs classes de gènes RSC-dépendants, qui comprennent des gènes codant des protéines impliquées dans l'intégrité de la paroi cellulaire, la biogénèse des ribosomes et la voie d'utilisation de l'azote [142]. Les effets sur l'intégrité de la paroi cellulaire concordent avec d'autres expériences sur la liaison entre RSC et la voie de la protéine Kinase C [149, 150, 151]. Ces études suggèrent que comme Swi/Snf, RSC active et réprime la transcription. En plus, RSC a été localisé dans les promoteurs de l'ARN polymérase [148].

2.4.2 Les sous-unités ATPase Brg1 et Brm

Dans les cellules de mammifères, il y a au moins deux complexes SWI/SNF, de presque 2 MDa, qui partagent les mêmes composants, mais possèdent différentes sous-unités ATPases.

Ce sont d'une part le complexe BAF (hSwi/Snf-A ou BRG1 complex), et d'autre part le complexe PBAF (hSwi/Snf-B ou hBRM complex), avec leur sous-unité ATPase respective, BRG1 et BRM, homologues de la protéine Snf2 de la levure.

Les deux protéines ATPase (BRG1 et BRM) sont capables de catalyser la réaction de remodelage sans les autres sous-unités, mais l'efficacité de remodelage augmente d'un ordre de grandeur dans le complexe [152].

Bien que ces deux sous-unités ATPases possèdent une activité de remodelage et d'hydrolyse très similaire [153] et qu'elles soient identiques en séquence à 75%, les complexes qui les contiennent ont des rôles différents.

Des expériences sur des souris knockout ont montré que les mutations homozygotes qui inactivent BRG1 ou INI1/SNF5 (une sous-unité BAF) sont létales au niveau embryonnaire, alors que les souris avec BRM inactive sont viables [154, 155, 156, 157].

Les fonctions de BRG1 et BRM sont partiellement redondantes, mais les deux complexes ont des profils d'expression différents. BRG1, par exemple, est exprimé de façon constante dans toutes les cellules, alors que la concentration de la protéine BRM augmente pendant la différenciation cellulaire.

Les complexes humains SWI/SNF peuvent s'associer avec certaines protéines qui s'accrochent sur l'ADN, et ce mécanisme peut adresser les complexes vers des promoteurs spécifiques [158, 159]. En particulier, des expériences ont montré que les complexes contenant BRG1 et BRM interagissent avec différentes classes de protéines régulatrices, comme par exemple les protéines avec des domaines LEU zip, TRYP cluster ou ZF, qui interagissent préférentiellement avec BRG1, et les protéines contenant un domaine ANK repeats, qui interagissent avec BRM [160].

Ces deux protéines sont également impliquées dans la régulation de la croissance, de la prolifération cellulaire et du cycle cellulaire [161, 115]. Des études faites sur des souris mutantes BRM^{-/-} montrent une augmentation de la prolifération cellulaire [154]. De même, plusieurs expériences sur des lignées cellulaires humaines ont montré que BRG1 et BRM sont capables de réagir avec la protéine pRB (la protéine du rétinoblastome) et de bloquer la prolifération cellulaire [162, 163]. Brg1 influence directement le cycle cellulaire [164] par son interaction avec la protéine du rétinoblastome (pRB) et la répression des gènes de la cycline A et de cdc2 [165, 166]. L'ATPase BRG1 interagit aussi avec la cycline E et la protéine BRCA. Des mutations de cette dernière sont impliquées dans le développement du cancer du sein et de l'utérus.

2.5 La famille ISWI

La famille ISWI est caractérisée par la protéine de Iswi (Imitation SWI), isolée chez la mouche, *Drosophila Melanogaster* (Tab.2.3). Cette protéine présente de fortes similitudes avec Swi2/Snf2 mais contient un motif de type SANT à la place du bromodomaine présent dans la protéine Swi2. Le motif SANT est un motif de liaison à l'ADN fréquemment trouvé dans des protéines liées à la chromatine [167]. Le premier membre de cette famille est le complexe de *Drosophila* NURF (NUcléosome Remodeling Factor). En plus de NURF, la famille ISWI contient entre autres les complexes de drosophile CHRAC (CHromatin Remodeling and Assembly Complex) et ACF (ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor), de levure ISW1 et ISW2, humains RSF (Remodeling and Spacing Factor), WCRF (Williams syndrome transcription factor Chromatin Remodeling Factor) et NoRC (Nucleolar Remodeling Complex)[168]. Il est intéressant de noter la présence de la même sous-unité ATPase dans plusieurs complexes de composition différente. Les protéines de levure Isw1 et Isw2 sont homologues. Ce sont les sous-unités ATPase respectivement des complexes ISW1 et ISW2 dont les fonctions sont différentes. En effet, des études indiquent que les complexes CHRAC, ACF et ISW2 peuvent moduler l'espacement des nucléosomes *in vitro* (Fig. 2.9) [169, 170] alors que les facteurs NURF et ISW1 ne le peuvent pas. Par ailleurs, la protéine Iswi, produite de manière recombinante, possède une activité intrinsèque de remodelage. *In vitro*, la protéine Iswi peut assembler des nucléosomes et catalyser le transfert d'un nucléosome du centre de la molécule d'ADN vers son extrémité. Au sein de CHRAC, Iswi catalyse la réaction inverse en transférant les nucléosomes préférentiellement des extrémités vers le centre de la molécule d'ADN [171].

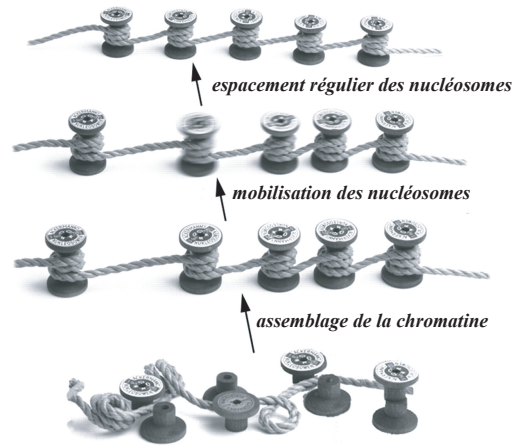


FIG. 2.9 – Schéma qui montre les principaux processus de remodelage que les complexes contenant ISWI sont capables d’induire.

<i>Drosophila</i> <i>NURF</i>	<i>Drosophila</i> <i>CHRAC</i>	<i>Drosophila</i> <i>ACF</i>	<i>Levure</i> <i>ISWI-1</i>	<i>Levure</i> <i>ISWI-2</i>	<i>Human</i> <i>NURF</i>
ISWI	ISWI	ISWI	ISW1	ISW2	hSNF2h
Nurf-55					
p215					
Nurf-38/iPPase					
	Topoll				
	p175				
	p20				
	p18				
		Acf1 (p185 ou p170)			
			p74		
			p105		
			p110		
				p140	
					p325

TAB. 2.3 – Composition des complexes de remodelage de la chromatine de la famille ISWI. La sous-unité ATPase est indiquée en rouge.

Il a été démontré que la protéine Acf1 fait partie des complexes ACF et CHRAC. L'association des protéines Iswi et Acf1 a pour conséquence non seulement d'augmenter très fortement l'activité d'Iswi mais également de modifier ses propriétés intrinsèques de remodelage [172, 173]. Ces données montrent donc que bien que tous ces complexes possèdent l'ATPase Iswi, leurs activités sont différentes et que l'activité d'Iswi est modulée par les autres protéines auxquelles elle s'associe. Une même ATPase peut donc catalyser des réactions différentes en fonction de la composition du complexe au sein duquel elle s'intègre. Le complexe de mammifères NoRC (Nucleolar Remodeling Complex) est apparemment un nouveau membre de la famille ISWI [174]. La protéine Tip5 interagit avec hSnf2h, l'homologue humain de Iswi. Des expériences d'immunofluorescence montrent que Tip5 est localisé dans le nucléole. Le complexe Tip5-Snf2h est capable *in vitro* de faire glisser des nucléosomes de manière ATP-dépendante. NoRC pourrait ainsi être un complexe de remodelage nucléolaire impliqué dans la régulation de la structure chromatinienne du locus de l'ADN ribosomique [153].

2.5.1 La protéine ISWI (*Drosophile*)

Les complexes qui contiennent ISWI possèdent entre deux et six sous-unités, et ont un poids moléculaire entre 200 et 700 kDa. Chaque complexe ISWI contient une ATPase de la famille du gène ISWI [125]. Les complexes les plus étudiés du groupe sont les complexes de *drosophila* ACF (ATP-utilising Chromatin assembly and remodeling Factors), NURF (NUcleosome Remodeling Factors), et CHRAC (CHromatin Accessibility Complex). Le domaine ATPase de la famille ISWI est très similaire au domaine ATPase de la famille de la protéine SWI2/SNF2, mais cette similarité est perdue en dehors de ce domaine. Le gène ISWI de la *drosophile* est essentiel pour le développement normal et pour la viabilité cellulaire [175]. Généralement les mutants Homozygotes ISWI- meurent à l'état larvaire tardif ou au début des états pupaux précoces. Ce phénotype est dû au fait qu'une très large quantité de protéines ISWI est déposée maternellement (environ 100000 molécules/noyau [176]). Le fait que la protéine ISWI soit nécessaire pour la viabilité cellulaire a été démontré par l'expression d'une forme dominante négative de la protéine ISWI, qui donne comme phénotype chez les mouches adultes un nombre d'yeux réduit, dû à une importante mortalité cellulaire. De plus, les mutants ISWI possèdent de structure altérées dans le chromosome X mâle, qui devient plus petit et plus large [175], ce qui suggère que la protéine ISWI a un rôle dans le maintien de l'architecture du chromosome. Le produit génétique du gène ISWI peut catalyser tout seul plusieurs activités du complexe entier *in vitro* [177], comme l'assemblage des nucléosomes [172], la modification de l'espace entre les nucléosomes [178], le glissement de l'octamère d'histones le long la molécule d'ADN [179, 171], et l'hydrolyse d'ATP stimulée par la présence des nucléosomes (mais pas par l'ADN nu) [180]. L'activité d'ISWI peut être fortement stimulée par la présence d'une autre sous-unité du complexe, la protéine de la *drosophile* ACF1 [172]. Ces autres sous-unités des complexes ont un rôle régulateur.

2.6 La famille CHD

La sous-unité ATPase fondatrice de cette famille est la protéine humaine Mi-2 (Tab.2.4) [181, 182]. Cette protéine possède un chromodomaine et appartient au complexe NuRD (NUcleosome Remodeling and Deacetylating)[183, 184]. Comme cela a été observé pour d'autres complexes de remodelage, l'activité de la sous-unité ATPase est modulée par les autres pro-

<i>homme</i> <i>NURD/NuRD/NRD</i>	<i>Xenopus</i> <i>Mi-2</i>
Mi-2b/CHD4, Mi2a/CHD3	Mi-2
HDAC1 (NURD63)	Rpd3
HDAC2 (NURD59)	Rpd3
RbAp48 (NURD56)	RbAp48/46
RbAp46 (NURD55)	RbAp48/46
MTA1/2 (NURD70)	MTA1-like
MBD3	MBD3 and MBD3 LFB
	p66
	Sin3

TAB. 2.4 – Composition des complexes de remodelage de la chromatine de la famille MI-2.

téines du complexe [185]. Notons que ce complexe a la particularité de posséder une activité de remodelage de la chromatine jumelée à une activité histone dé-acétylase. En effet, ce complexe contient les histones dé-acétylases Hdac1 et Hdac2. La fonction des complexes de cette famille est encore mal comprise. Les complexes isolés de cellules de mammifères et de Xénope contiennent aussi des ADN méthyltransférases putatives [186, 182]. La présence d'histone dé-acétylases et d'ADN méthyltransférases dans ces complexes suggère qu'ils sont impliqués dans la répression transcriptionnelle. Toutefois, la protéine Chd1, un homologue de Mi-2 chez la drosophile, est localisée au niveau de la chromatine transcriptionnellement active, ce qui évoque un rôle positif dans la transcription pour cette protéine [187]. Chez *S. cerevisiae*, seul le polypeptide Chd1 appartient à la famille de protéines Mi-2. Il a été montré par puces à ADN que Chd1 est requise pour la transcription d'un petit nombre de gènes [188]. Il est possible que l'activité de Chd1 soit partiellement redondante avec d'autres complexes de remodelage déjà identifiés ou non. Par ailleurs, alors que les protéines de type Mi-2 des eucaryotes supérieurs sont assemblées dans des complexes et associées à des histones déacétylases, la protéine Chd1 de levure forme apparemment un homodimère. Aucune interaction physique ou génétique de Chd1 avec des histones déacétylases n'a été décrite à ce jour.

2.7 Les enzymes avec le domaine Split ATPase

Les protéines Ino80 et Swr1p représentent des nouveaux types d'ATPase. En effet, leur domaine ATPase est éclaté en deux sous-domaines. Des complexes avec plusieurs sous-unités de cette classe d'ATPase ont été isolés à partir de la levure (Tab. 2.5) [131, 189, 190]. Ino80 et SWR ont en commun plusieurs sous-unités comme les protéines ARPs (les protéines homologues à l'actine). L'aptitude du complexe INO80 à remodeler la structure de la chromatine a été démontrée *in vitro* [131]. Du point de vue transcriptionnel, le gène INO80 a été isolé parce qu'il est nécessaire à la transcription du gène IN01 en l'absence d'inositol [191]. Le complexe INO80 pourrait également intervenir dans la réparation de l'ADN, en raison de son association aux enzymes Rvb1 et Rvb2 (la protéine Ino80 est copurifiée avec ces deux protéines), qui sont homologues à la protéine bactérienne RuvB, une hélicase impliquée dans la réparation de l'ADN. Cela pourrait expliquer l'activité ADN hélicase associée au complexe INO80 [131]. Une mutation dans le gène INO80 entraîne une sensibilité accrue de l'ADN aux lésions [131], ce qui suggère que le complexe INO80 pourrait participer aux mécanismes de réparation de l'ADN.

<i>levure</i> SWIr1	<i>levure</i> INO80
Swir1	Ino80
Rvb1	Rvb1
Rvb2	Rvb2
Arp4	Arp4
Act1	Act1
Swc4	
Yaf9	
Swc2	
Bdf1	
Swc3	
Swc5	
SWc6	
SWc7	
H2A.Z	

TAB. 2.5 – *Composition des complexes de remodelage de la chromatine de la famille INO80 chez la levure.*

Le complexe SWR [190, 189] représente un nouveau type de facteur de remodelage, qui peut échanger l'histone H2A avec des variants de cet histone.

2.8 Comparation biochimique de l'activité des facteurs de remodelage

Notre connaissance de la composition de ces complexes et de leur activité biochimique continue de croître, mais il reste encore des questions très importantes à résoudre, pour comprendre la fonction *in vivo* de ces complexes. Par exemple, on ne connaît ni le mécanisme utilisé par ces facteurs pour augmenter l'accessibilité de l'ADN nucléosomal, ni le rôle des différentes sous-unités dans ces complexes. La découverte que la sous-unité ATPase centrale peut altérer la structure de la chromatine en l'absence des autres sous-unités a donné de nouvelles directions de recherche concernant le remodelage de la chromatine [138, 192, 185]. La caractérisation biochimique de l'activité de la sous-unité centrale ainsi que des activités du complexe a commencé à fournir des données caractéristiques sur les différents mécanismes des trois classes principales de facteurs de remodelage, ainsi que sur le rôle des autres sous-unités. Les deux familles les plus étudiées sont la famille SWI/SNF et la famille ISWI. La faculté de ces complexes à altérer la structure de la chromatine a été étudiée en utilisant différentes méthodes (Fig. 2.10 et 2.11).

Ces études ont indiqué que les deux familles pourraient agir en utilisant des mécanismes différents, idée qui a été suggérée par le fait qu'ils ont besoin pour agir de différents substrats (Fig. 2.12). Par exemple, la perte de la queue N-terminale des histones dans le nucléosome a pour conséquence l'élimination du remodelage de la partie du complexe NURF (un des complexes ISWI de la Drosophile), mais ces substrats sont encore remodelés par les complexes SWI/SNF humain et de la levure [192]. L'activité ATPase est stimulée différemment entre NURF et SWI/SNF. Le complexe SWI/SNF peut être stimulé soit par le nucléosome soit par l'ADN nu. En revanche, l'activité de NURF est plus stimulée par la présence de nucléosomes que par l'ADN nu [180]. Des expériences ont montré que la queue N-terminale d'H4

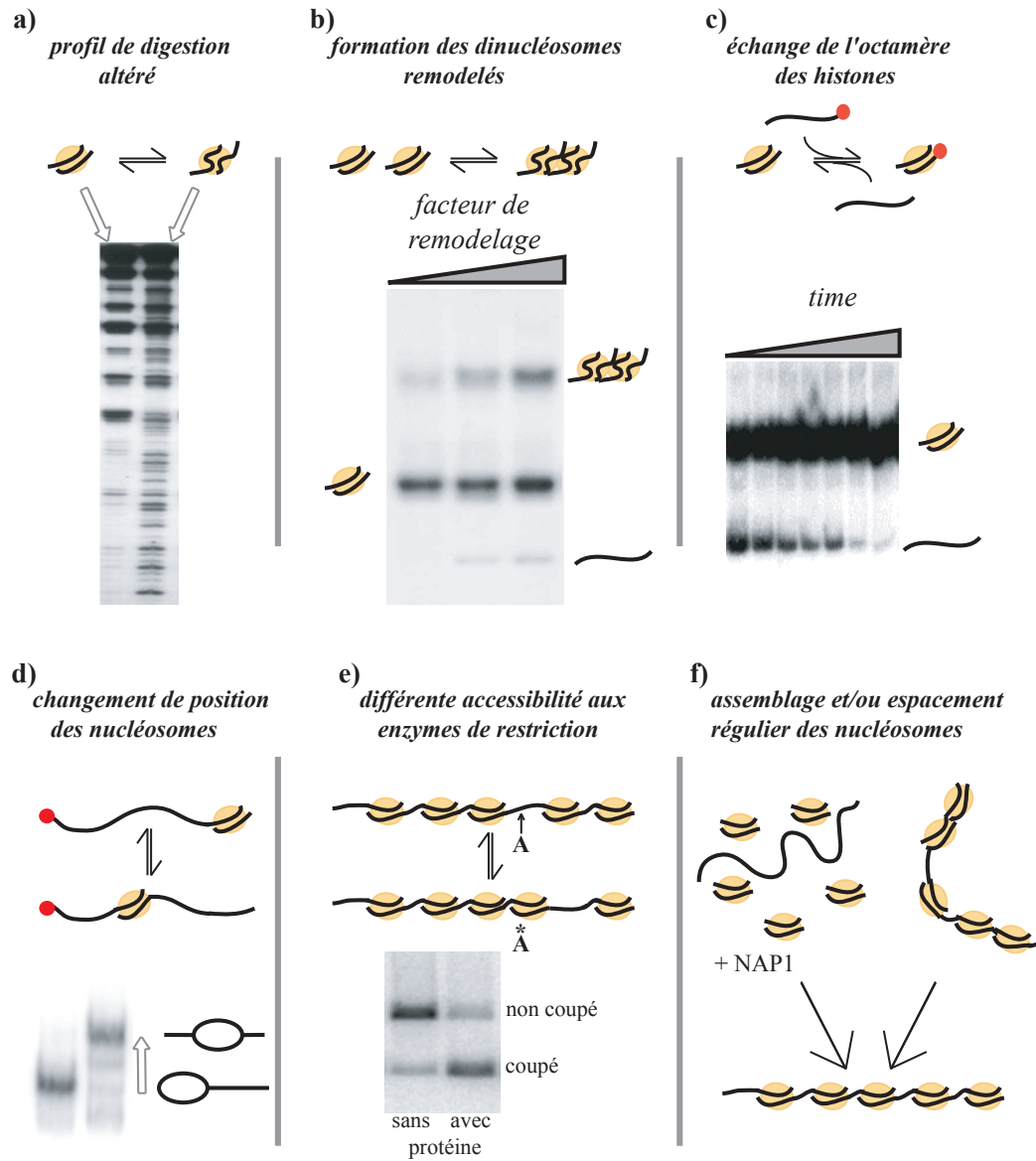
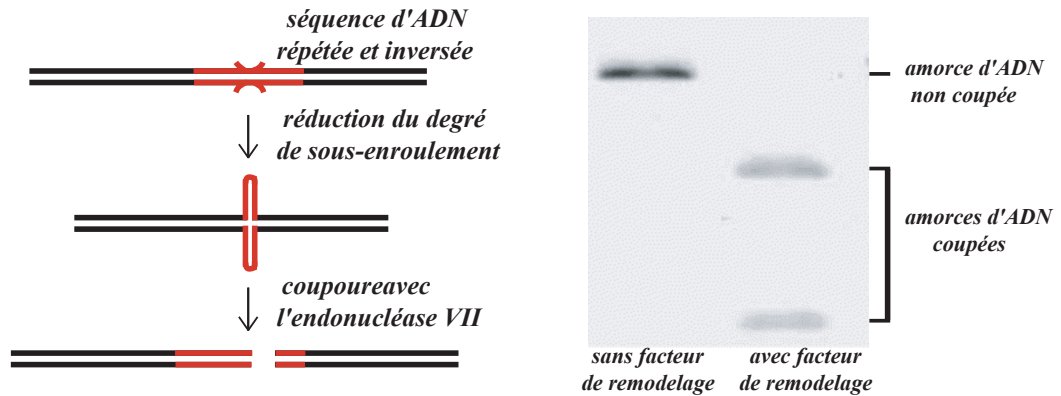


FIG. 2.10 – Tests biochimiques utilisés pour détecter différentes activités des facteurs de remodelage sur des nucléosomes. On peut détecter le remodelage des nucléosomes (et selon l'enzyme utilisée dans le test) a) soit par la formation d'un profil altéré de digestion avec une DNase, b) soit par la formation de di-nucléosomes remodelés stables, ou c) par l'échange de cis en trans de l'octamère des histones. Il est possible d'étudier aussi la capacité des facteurs de remodelage de changer la position des nucléosomes d), d'augmenter ou réduire l'accessibilité des autres protéines à la chromatine e), ou de faciliter l'assemblage et/ou l'espacement des nucléosomes le long de l'ADN f).

a) test d'extrusion d'ADN cruciforme



b) changements topologiques dans des plasmides

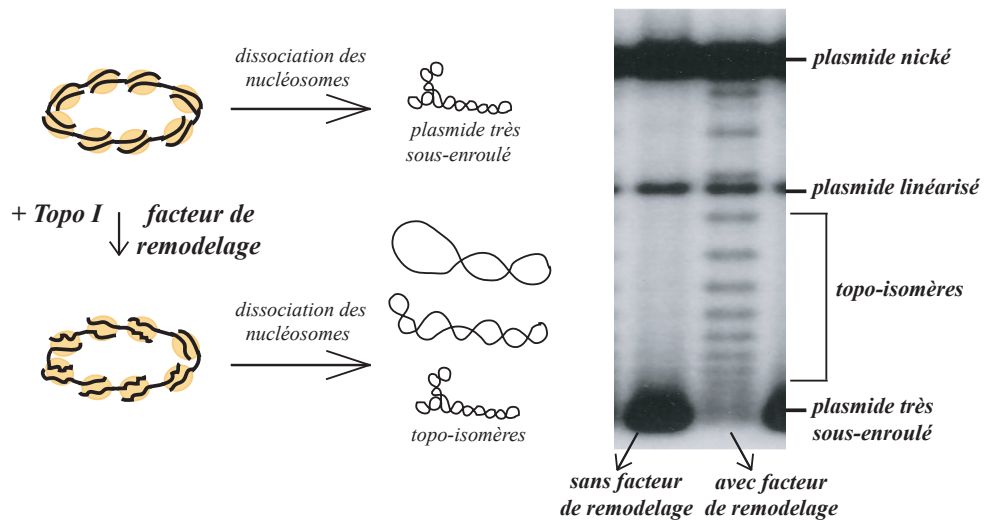


FIG. 2.11 – Tests biochimiques qui prouvent la génération de torsion pendant l'action de remodelage : a) l'extrusion d'ADN cruciforme, qui ne peut avoir lieu qu'en présence d'ADN sous-enroulé négativement, et b) changements topologiques transitoires détectés avec une topoisomérase qui génère, en présence de facteurs de remodelage, des topo-isomères dans des molécules d'ADN circulaires (plasmides).

était critique pour l'activité ATPase de ISWI [19]. L'ablation de cette queue réduit fortement l'accrochage d'ISWI, ce qui suggère que la queue pourrait jouer un rôle couplé à l'hydrolyse d'ATP dans le changement conformationnel du nucléosome. Par contre le taux de remodelage de SWI/SNF n'est pas affecté par l'enlèvement des queues des histones [193, 194]. La comparaison des activités de ySWI/SNF, hSWI/SNF, dNURF, du complexe xMi-2 et de dCHRAC, en utilisant des tests d'accessibilité d'enzymes de restriction sur un substrat nucléosomal, a montré que l'efficacité du remodelage est très similaire [195]. Des analyses successives des activités de BRG1, l'homologue humain de SWI2/SNF2 de la levure, et de SNFH, l'homologue humain de ISWI, en utilisant des tests multiples, ont suggéré des différences dans le mécanisme entre les deux familles [196]. Toutes deux peuvent remodeler une fibre de nucléosomes, mais seul BRG1 peut altérer le profil de restriction et l'accessibilité à la DNAase sur des mononucléosomes sans ADN de part et d'autre. De plus, BRG1, contrairement à SNF2H, peut introduire des changements topologiques dans un assemblage de nucléosomes sur un ADN circulaire.

Les protéines recombinantes ISWI et Mi-2 sont capables de changer la position du nucléosome [197] : alors que la protéine Mi-2 déplace l'octamère d'histones vers la position centrale d'un fragment d'ADN de 248 pb, ISWI le déplace vers ses extrémités. Contrairement à ISWI, Mi-2 peut remodeler les nucléosomes sans la queue N-terminale des histones H4, H3 et H2A. Des différences dans le mécanisme d'action entre les remodeleurs ont été suggérées en comparant les complexes ySWI/SNF, BRG1, ISWI et Mi-2 dans des tests d'extrusion d'ADN cruciforme [198]. Ce protocole détecte la faculté d'induire la formation d'ADN cruciforme à partir de séquences inversées répétées, une faculté commune aux remodeleurs et à certaines hélicases. Ces expériences ont montré que BRG1 et ySWI/SNF peuvent extruder un ADN cruciforme à partir soit d'ADN nu, soit de chromatine. Les facteurs ISWI et Mi-2 peuvent extruder le cruciforme seulement à partir de la chromatine. Ces données sont cohérentes avec le fait qu'un substrat nucléosomal stimule de préférence l'activité d'ISWI et Mi-2 [192].

2.9 Mécanismes d'action proposés pour un remodelage ATP-dépendant

Tous les facteurs de remodelage contiennent un domaine similaire à Snf2p, qui a en commun une homologie de séquence avec la très grande famille SF2 (Super Family 2) des hélicases (Fig. 2.13 a). Les membres de la famille SF2 ont un domaine qui hydrolyse l'ATP et guide la séparation des deux brins de l'ADN, ainsi qu'une activité de translocation sur l'ADN ATP-dépendante. Cela conduit à suggérer que le domaine Snf2 des complexes qui remodelent la chromatine pourrait être impliqué dans une translocation de l'ADN (Fig. 2.13b) [199]. Des données ont été obtenues comme support de cette hypothèse. Elles ont montré que cette translocation n'est pas très processive [200, 201, 202]. La protéine modèle utilisée pour étudier la translocation ATP-dépendante de la famille SF2 est la protéine bactérienne RecG. La structure de cette protéine a été résolue : elle suggère que la double hélice de l'ADN passe directement à travers le domaine qui contient sept motifs hélicases [203], en formant des contacts seulement avec les groupements phosphates [204]. Une région C-terminale qui arrive jusqu'aux motifs hélicases a été identifiée comme capable de contacter la molécule d'ADN, et il a été proposé qu'elle agisse comme un bras pendant la translocation [205]. Cette séquence est aussi conservée au sein des protéines reliées à Snf2. Récemment le domaine ATPase du complexe SWI/SNF de *Sulfolobus solfataricus* a été cristallisé [206]. Ces cristaux montrent une structure très similaire à celle de RecG et Rad54, et à partir de cette structure les auteurs proposent un possible mécanisme de translocation couplé à l'introduction de torsion (Fig. 2.14).

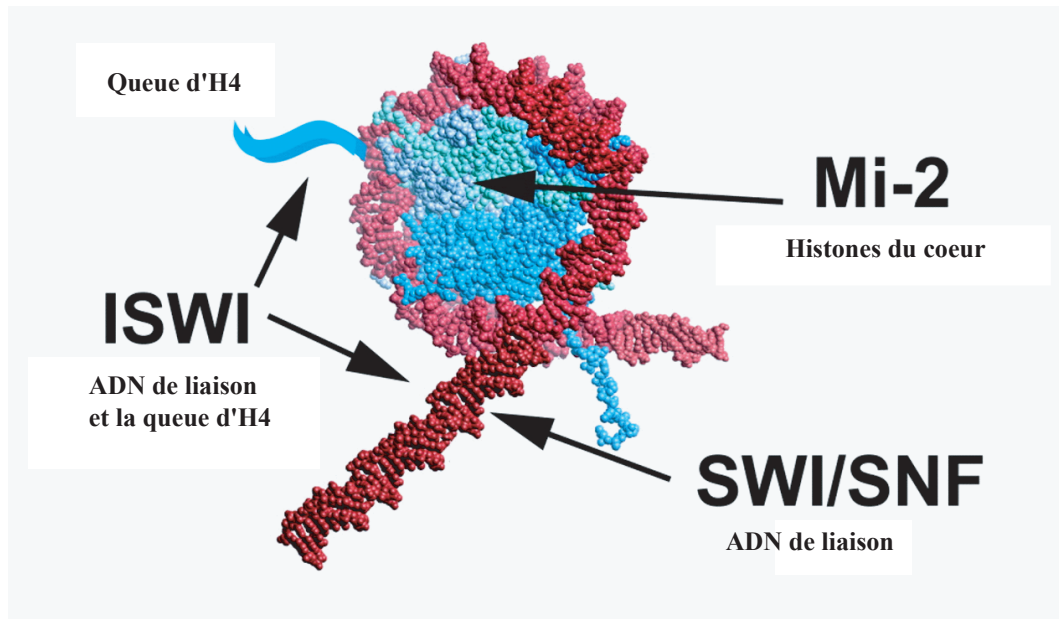


FIG. 2.12 – Schéma qui montre les substrats nécessaires pour stimuler l'activité ATPase dans les différentes familles de remodelage.

Les domaines accessoires des protéines liées à Snf2 influencent l'orientation avec laquelle le moteur qui remodèle agit sur le nucléosome. Les données existantes pour ISWI suggèrent une translocation de l'enzyme qui remodèle à partir du nucléosome vers l'extérieur [201, 168, 207]. Cette translocation pourrait pousser l'ADN vers le nucléosome et donc causer une déstabilisation de l'ADN sur la surface du nucléosome. Les sous-unités catalytiques corrélées à Snf2 font généralement partie des grands complexes et on a seulement un polypeptide Snf2 par complexe. Dans le cas de SWI/SNF, la stœchiométrie des 11 sous-unités a été déterminée précisément [208].

La reconstitution d'image faite au microscope électronique a donné une idée sur la structure de la surface des complexes RSC et SWI/SNF de la levure avec une résolution de 25-50 Å [208, 210] (Fig. 2.7 et 2.8). La surface suggère une organisation circulaire ou semi-circulaire, avec une cavité ou un "clamp" de dimension suffisante pour contenir un nucléosome. Les facteurs de remodelage ont été isolés au début comme des enzymes qui modifient les histones. En réalité, ils peuvent aussi modifier des protéines non-histones. Par exemple, le complexe hBRG1 peut générer des structures d'ADN Z qui sont importantes pour la régulation du promoteur CSF1 [211]. La protéine Rad26p peut fonctionner en aidant à libérer l'ARN polymérase bloquée [212], Rad16p peut agir en changeant la structure de l'ADN pendant la réparation de l'ADN endommagé [213], et Mot1 décroche TBP de l'ADN dans une réaction ATP-dépendante [214].

Plusieurs protéines homologues à Snf2p sont capables de modifier la position des nucléosomes [107]. Les nucléosomes sont aussi mobiles sous l'effet de fluctuations thermiques et leur repositionnement "naturel" intervient parallèlement aux activités ATP-dépendantes de remodelage [207]. Ceci suggère que les remodeleurs ATP-dépendants obéissent à la définition classique d'une enzyme : un catalyseur qui accélère une réaction pouvant se produire naturellement. Le mécanisme par lequel les nucléosomes sont distribués lors d'une réaction guidée par

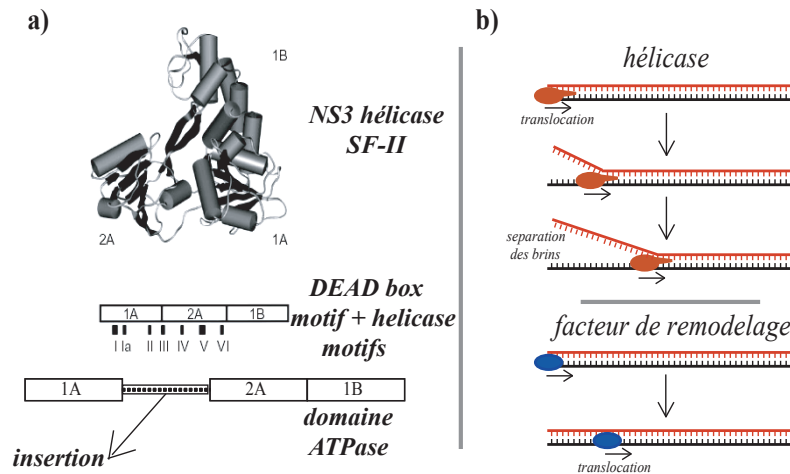


FIG. 2.13 – a) Structure atomique du domaine hélicase de la protéine NS3, qui est homologue au domaine hélicase Snf2 des facteurs de remodelage. On peut voir, par le schéma en bas, que la principale différence entre le DEAD box domain des hélicases [209] et le domaine hélicase de facteurs de remodelage est l'insertion d'une séquence protéique entre le sous-domaine 1A et 2A. b) Les hélicases SFII sont capable de transloquer le long de l'ADN et de séparer en même temps les deux brins de la molécule. Le fait que les facteurs de remodelage ne montrent pas d'activité hélicase, laisse supposer que l'insertion d'une séquence dans le motif DEAD box a fait perdre la faculté de séparer les deux brins, en maintenant l'habilité de translocation le long de la molécule d'ADN.

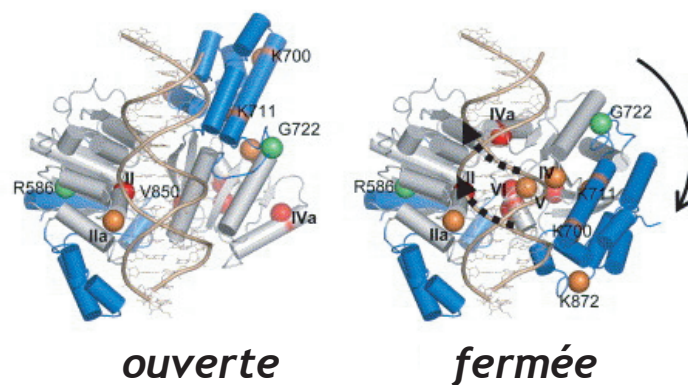


FIG. 2.14 – Structures cristallographiques du domaine ATPase de la protéine homologue à Rad54(SsoRad54cd). Le mouvement d'un des deux sous-domaines pendant le passage d'une conformation ouverte à une conformation fermée pourrait pousser l'ADN avec introduction de torsion [206].

l'ATP reste encore mystérieux. Plusieurs mécanismes ont été proposés [207, 108, 215].

Les premiers modèles du remodelage de la chromatine ATP-dépendant se sont focalisés sur les changements des composants des histones. Par exemple, on a proposé que les enzymes SWI/SNF utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour libérer un ou deux dimères H2A-H2B, avec à la fin une molécule d'ADN qui s'enroule seulement autour d'un tétramère de H3-H4 [216](Fig. 2.15d). Il a ensuite été proposé que les dimères pourraient ne pas être perdus, mais réarrangés en générant une nouvelle conformation nucléosomale [217].

Des données montrent aujourd'hui que le remodelage ATP-dépendant provoque des changements topologiques de l'ADN nucléosomal [198]. On ne sait pas comment les facteurs de remodelage pourraient introduire de la torsion dans l'ADN, mais plusieurs modèles proposent l'introduction de torsion par une activité de translocation qui va générer soit de la rotation dans l'ADN, soit la formation des petites boucles d'ADN [198, 218, 168]. Plusieurs expériences utilisant l'accessibilité aux enzymes de restriction afin de quantifier le remodelage sur un mono-nucléosome [219], suggèrent que l'action de remodelage ne génère pas seulement une seule structure remodelée, mais va créer une multitude de différents nucléosomes remodelés. Donc, des cycles multiples d'hydrolyse de l'ATP sont nécessaires pour rendre le nucléosome remodelé accessible, par exemple, aux enzymes de restriction utilisées comme rapporteurs du remodelage (Fig. 2.15c). Selon ce modèle, les états intermédiaires activés pourraient être une conséquence de la génération ATP-dépendante d'une contrainte torsionnelle. La contrainte torsionnelle pourrait se propager sur la surface du nucléosome par une dissociation spontanée d'un petit nombre de points de contact de l'ADN au nucléosome, ce qui pourrait rendre l'ADN sensible aux interactions avec les protéines qui doivent le contacter (Fig. 2.15a).

L'énergie d'hydrolyse de la molécule d'ATP est utilisée pour générer des intermédiaires hauts en énergie qui stochastiquement relaxent vers des états nucléosomaux finaux distincts, qui dans certains cas résultent en un changement de position, dans d'autres non. Tous ces résultats sont valables par exemple pour la famille SWI/SNF, mais pas pour la famille ISWI, pour laquelle toutes les données indiquent que le glissement le long de l'ADN est le principal mécanisme de remodelage [179, 196].

Différentes expériences utilisées pour étudier les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants montrent que ces complexes peuvent exposer l'ADN du nucléosome. Le mécanisme le plus simple que l'on puisse imaginer pour induire cette exposition de l'ADN, est un simple glissement de l'ADN par rapport à l'octamère des histones [220]. Le fait que tous les facteurs de remodelage changent la position des nucléosomes le long de la molécule d'ADN, a amené à penser que toutes ces protéines peuvent fonctionner en utilisant un mécanisme commun, comme le glissement de l'ADN. Mais d'autres mécanismes peuvent être pris en compte pour expliquer les changements de position des nucléosomes. Par exemple, un nucléosome qui se trouve être altéré par un facteur de remodelage peut soit spontanément retourner à une structure de nucléosome classique, en changeant sa position, soit relâcher partiellement l'octamère d'histones et se raccrocher ensuite dans une nouvelle position [221, 222]. Une des raisons qui invoque un mécanisme différent du glissement des histones le long de l'ADN est que ce mécanisme ne peut pas expliquer comment l'ADN devient accessible dans la fibre de chromatine avec des nucléosomes resserrés. Les modèles favorisés sont : le modèle de la diffusion de sous-enroulement négatif et le modèle de diffusion d'une boucle d'ADN le long du nucléosome (Fig. 2.15a et b).

Dans le premier modèle, des variations locales du degré de sous-enroulement se propagent autour du nucléosome. Le cristal du nucléosome donne des preuves directes de la présence d'états intermédiaires, dûs à une diffusion spontanée du sous-enroulement. Parce que les fac-

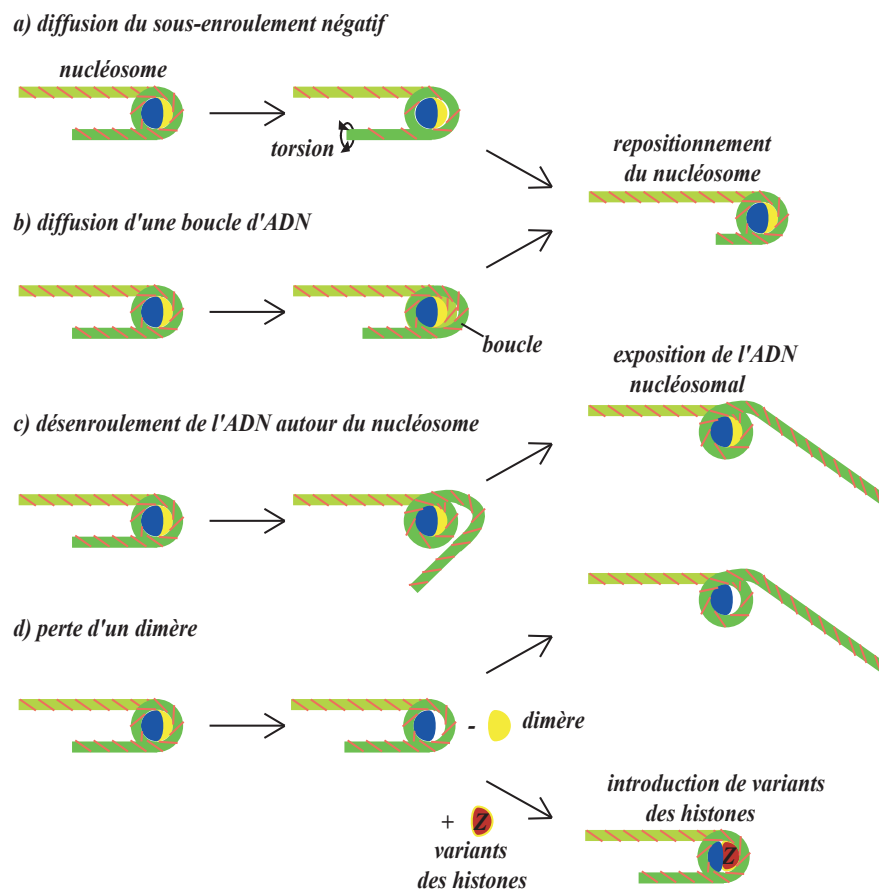


FIG. 2.15 – **Mécanismes possibles de remodelage.** La translocation des facteurs de remodelage pourrait générer de la torsion (a), ou une boucle d'ADN (b), (ou les deux), qui pourrait diffuser le long du nucléosome en favorisant le glissement et le repositionnement du nucléosome. Un autre mécanisme possible est le désenroulement de l'ADN autour du nucléosome (c), qui peut rendre l'ADN plus accessible. Même la perte d'un dimère (d) pourrait soit rendre l'ADN plus accessible en exposant l'ADN autour des nucléosomes, soit faciliter l'introduction de variants d'histones.

teurs de remodelage de la chromatine sont capables d'altérer le degré de torsion de l'ADN, il est possible qu'ils puissent accélérer le taux de diffusion.

Dans le deuxième modèle, une partie de l'ADN au niveau de l'entrée ou de la sortie du nucléosome, pourrait se décrocher. Ensuite, le nucléosome pourrait se raccrocher un peu plus loin, en créant une structure nucléosomale avec un surplus d'ADN sous forme de boucle. On pourrait donc imaginer une migration spontanée de cette boucle d'ADN autour du nucléosome, et par conséquent, après disparition de cette boucle, migration du nucléosome le long de l'ADN. Plusieurs expériences vont dans ce sens [207, 223].

Les deux modèles supposent que l'octamère d'histones ne change pas pendant le remodelage. Certaines expériences indiquent cependant, que des dimères d'histones peuvent être enlevés ou échangés entre nucléosomes pendant la réaction de remodelage [224, 225](Fig. 2.15d).

La libération de l'ADN de la surface des histones est importante pour l'échange des dimères, et des facteurs additionnels peuvent faciliter ce processus (Fig. 2.15 c et d). Pour le complexe SWI/SNF, la sous-unité Snf5 peut interagir avec H2B et un composant du complexe SWR1 est censé interagir directement avec H2A.Z[226]. La génération de sous-enroulement négatif pendant le remodelage peut aussi contribuer à ce processus [227].

**Technique de micromanipulation et
visualisation des molécules individuels
d'ADN et montages expérimentaux
utilisés**

Chapitre 3

Caractérisation et manipulation de molécules individuelles : présentation des différentes techniques utilisées

3.1 Introduction

Jusqu'à ces dernières années, les chimistes et biochimistes n'ont eu à leur disposition, pour étudier les propriétés des molécules, que des méthodes dites "en bulk", méthodes ne permettant que des études en volume, portant sur un grand nombre de molécules. Ce type d'approche ne permet d'accéder qu'à des propriétés globales telles que le temps caractéristique et la contribution moyenne de chaque molécule dans une population. Par conséquent, à partir de cette approche on ne peut avoir accès qu'à la moyenne des propriétés, mais pas à la distribution de ces propriétés ni aux fluctuations stochastiques qui accompagnent ces distributions.

Dans les études biochimiques conventionnelles, si on veut estimer l'activité d'une enzyme, on est obligé de diviser le résultat obtenu par le nombre total d'enzymes utilisées dans la cellule de mesure (Fig. 3.1). Cette procédure sous-estime l'activité réelle parce qu'on ne peut pas connaître le nombre exact d'enzymes inactives et/ou d'enzymes dans un état oligomérique.

La détection de molécules individuelles fournit d'énormes avantages par rapport aux techniques en volume. Etant capable d'étudier les molécules d'un échantillon une à une, il est possible non seulement de résoudre la gamme et la distribution des comportements exhibés dans le système, mais aussi d'étudier des propriétés comme la force, les interactions moléculaires, et les changements conformationnels, qui accompagnent le phénomène étudié. Une expérience de molécule unique est capable de détecter les intermédiaires qui sont produits pendant une réaction chimique. La détection des intermédiaires est très utile pour élucider les mécanismes de réaction, or cette détection est presque impossible à réaliser en mesurant les propriétés d'un ensemble de molécules.

Les informations dynamiques obtenues en observant les fluctuations autour de l'équilibre à partir d'une seule molécule, permettent de dériver les cinétiques sans avoir à synchroniser une population entière dans un état de non-équilibre, étape nécessaire pour avoir, à la fin, des concentrations détectables des intermédiaires de la réaction. La sensibilité de ces méthodes d'étude en fait l'approche idéale pour étudier les systèmes dans lesquels les événements ou les molécules d'intérêt sont rares.

Un exemple qui illustre bien la différence entre les mesures *en volume* et celles en molécule

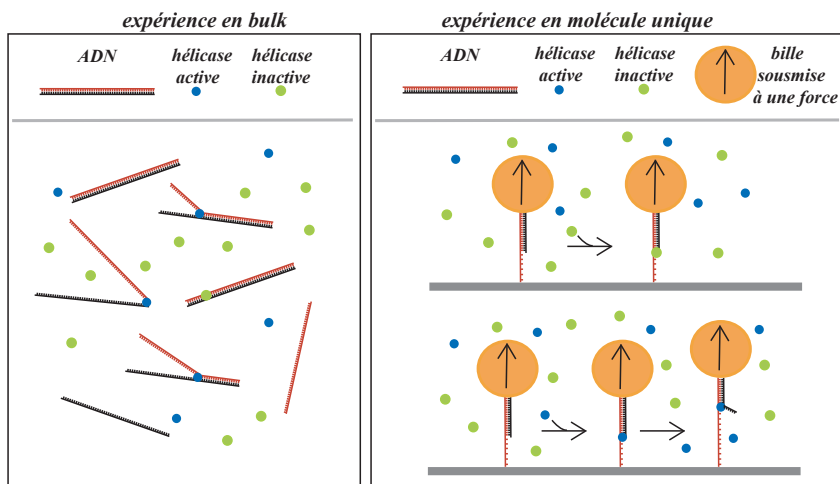


FIG. 3.1 – Schéma mettant en parallèle les expériences en bulk et en molécule unique (dans l'exemple, on veut mesurer l'activité d'une hélicase qui sépare les deux brins de la molécule d'ADN). Le fait que l'on ne connaisse pas, en bulk, la concentration des molécules inactives fait sous-estimer l'activité de la protéine parce que, pour obtenir cette valeur, on est obligé de diviser l'activité mesurée par la concentration totale en enzyme. En molécule unique, on contourne ce problème parce que l'on mesure seulement l'activité des enzymes actives.

unique est la mesure du courant électrique qui passe à travers des canaux ioniques cellulaires par les techniques de *Voltage-Clamp* (l'équivalent des mesures en bulk pour l'étude du courant ionique transmembranaire) et les techniques de *Patch-Clamp* (équivalent des mesures en molécule unique)[228].

Dans les techniques de *Voltage-Clamp*, deux électrodes sont insérées dans une cellule. La première maintient le potentiel membranaire à une valeur fixe choisie, pendant que la deuxième électrode de mesure insérée enregistre toute variation de courant. On peut alors modifier la concentration du milieu extérieur en tel ou tel ion et relier le signal obtenu à la migration de tel ou tel ion à travers la membrane.

Les techniques de patch-clamp (que l'on considère comme étant la première expérience en molécule unique) ne sont qu'une application de ces techniques de voltage imposé cette fois à de petits fragments membranaires isolés (patch) à l'extrémité d'une pipette. On arrive à isoler ainsi des fragments de membranes si petits (1 à 2 μm de diamètre) que l'on estime pouvoir observer le fonctionnement de quelques unités de canaux ioniques (dont l'existence est supposée).

Comme on peut voir dans la Fig. 3.2, le courant électrique qui passe à travers un seul canal ionique est un signal télégraphique très bruité. L'allure de ce signal est due au fait que le courant électrique passe seulement quand le canal est ouvert, et la probabilité d'ouverture du canal dépend du potentiel trans-membranaire appliqué. Cette information est perdue si on fait une analyse du courant global qui passe à travers l'ensemble des canaux de la cellule.

Les techniques de micromanipulation de biomolécules individuelles se développent depuis quelques années, et elles ont été appliquées pour étudier le comportement de biopolymères individuels comme l'ADN, l'ARN et les protéines.

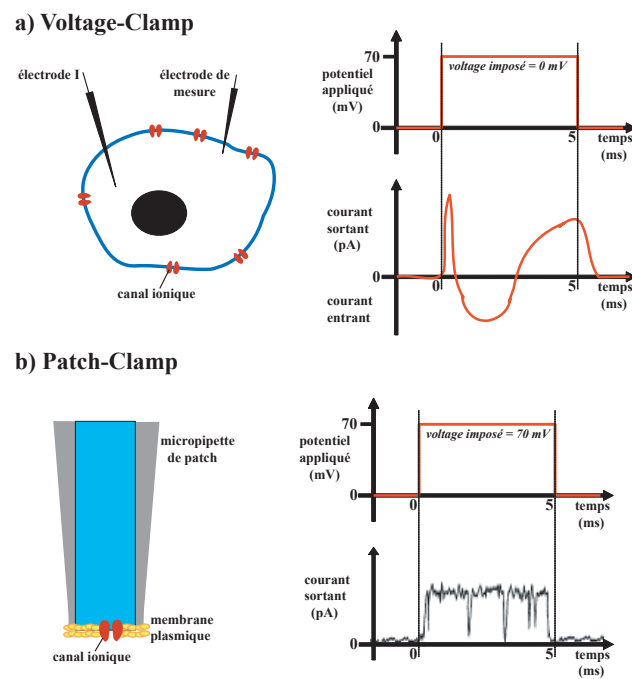


FIG. 3.2 – a) Schéma présentant la technique Voltage-Clamp. Cette technique permet la mesure du courant ionique global qui sort ou entre dans une cellule, la différence de potentiel transmembranaire étant fixée. À gauche, deux électrodes sont insérées dans une cellule, l'une pour imposer le voltage, et l'autre pour détecter le courant électrique. À droite, courbe typique de la variation de potentiel membranaire global d'une cellule. b) Schéma présentant la technique Patch-Clamp. Dans cette technique, avec une micropipette (à gauche), on prélève un petit fragment de membrane cellulaire. En imposant un voltage, et en détectant le potentiel transmembranaire, on observe un signal télégraphique (à droite) très bruité, signal typique du passage du courant électrique à travers un unique canal ionique.

Les techniques de mesures locales de force ont été utilisées pour étudier les propriétés élastiques et les transitions structurales induites mécaniquement dans les acides nucléiques au niveau d'une seule molécule. Ces techniques ont été utilisées par la suite pour étudier les processus enzymatiques ADN-dépendants. L'importance de ces études est due au fait que le comportement mécanique des acides nucléiques et des protéines est un aspect fondamental de leur fonctionnement.

Les expériences de micromanipulation introduisent la force comme nouveau paramètre thermodynamique. La force peut être utilisée pour altérer l'équilibre d'une réaction et/ou modifier la barrière d'activation. Elle s'ajoute donc à la température ou à la composition du tampon utilisé qui sont souvent les seuls paramètres de contrôle utilisés dans les tests traditionnels en volume.

Toutes les expériences en molécule unique qui permettent l'étude d'objets biologiques isolés ont besoin de deux éléments de base : un senseur, qui est généralement de dimension microscopique et qui est utilisé pour générer ou détecter des forces et des mouvements, et une façon de localiser spatialement la molécule d'intérêt.

Il existe actuellement plusieurs techniques disponibles pour manipuler et suivre le mouvement des molécules uniques : microscope à force atomique (AFM)[229], microfibres [230, 231], pinces optiques [232] et pinces magnétiques [233, 234, 235], flux hydrodynamique [236] et sondes de force de biomembrane (BFP) [237], Single Particle Tracking (SPT) et Tethered Particle Motion (TPM) [238, 239, 240].

D'un point de vue de pratique, un dispositif de micromanipulation peut utiliser différents types de senseurs :

- Le microscope à force atomique (AFM) utilise un petit bras flexible (cantilever) accroché à l'objet d'intérêt dont la mesure de la déflexion permet de déduire la force appliquée [229].
- Les dispositifs à microfibres utilisent une fibre optique micrométrique comme bras flexible, ce qui permet une mesure directe de la déflexion [231, 230].
- Les pinces optiques utilisent le piégeage d'une bille micrométrique à haut indice de réfraction (par exemple une bille en latex) au point focal d'un faisceau laser. La mesure de la déviation de la bille par rapport à sa position d'équilibre permet de remonter à la force exercée sur l'objet [241]).
- Les pinces magnétiques permettent d'exercer une force sur une bille super-paramagnétique à l'aide d'un aimant (piégeage simple) [236, 235] ou d'électroaimants (piégeage en trois dimensions) [233, 234].

Dans ce chapitre, je parlerai des principales techniques de manipulations de molécules uniques utilisées pour étudier l'ADN, en présentant plus en détail les techniques utilisées durant ma thèse, à savoir les pinces magnétiques, la TPM (Tethered Particle Motion - mouvement d'une particule accrochée) et le microscope à force atomique.

3.2 Force en Biologie

La force n'est pas une "entité" qui intéresse seulement les physiciens, elle joue un rôle fondamental dans presque tous les processus cellulaires et en particulier dans les processus ADN-dépendants. Par exemple, pendant la réplication et la ségrégation des chromosomes, chaque molécule d'ADN est soumise à une vaste gamme d'étirements, de vrillages et de courbures.

La plupart des moteurs moléculaires qui agissent sur l'ADN convertissent l'énergie issue

de l'hydrolyse des dNTP ou NTP (désoxy-Nucléotide Tri Phosphate ou le Nucléotide Tri Phosphate) en travail mécanique. L'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP, dans des conditions physiologique, libère une énergie d'environ $20k_B T$ (l'équivalent de $8 \times 10^{-20} J$). Cette énergie est utilisée par un grand nombre d'enzymes (moteurs moléculaires) pour effectuer un travail en se déplaçant typiquement de l'ordre d'un nanomètre lors d'un cycle enzymatique. L'ordre de grandeur des forces ainsi générées est de $20k_B T/nm$ ou 80pN. L'ARN-polymérase, importante pour la production d'ARN messenger, est capable de générer sur l'ADN des forces de l'ordre 15pN [242, 243]. Force et torsion peuvent entraîner l'ouverture de l'ADN, processus qui est fondamental que ce soit pour la réplication ou lors de l'expression génétique. Les cellules, en plus, contiennent plusieurs moteurs moléculaires qui génèrent forces et déplacements des organelles cellulaires.

Dans cette section, je vais introduire les différentes échelles de force auxquelles peuvent être soumises les molécules biologiques en solution.

3.2.1 Force entropique

Toutes les molécules sont sujettes à l'agitation thermique à chaque instant. Les fluctuations thermiques d'énergie sont de l'ordre de $k_B T = 4pN \times nm = 4 \times 10^{-21} J = 0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ à température ambiante. Ces fluctuations courbent transitoirement l'ADN et tous les biopolymères. Pour l'ADN, par exemple, ces fluctuations entraînent une perte de l'orientation de la molécule sur une distance appelée longueur de persistance ξ qui vaut environ $\xi = 50 \text{ nm}$. Si on étudie l'ADN sur des échelles de tailles supérieures à ξ , l'ADN se trouve sous une forme de pelote statistique. Ainsi, la force nécessaire pour étirer notablement une pelote d'ADN vaut : $F_e = k_B T / \xi \approx 0.1 \text{ pN}$.

Comme conséquence de cette agitation thermique, une molécule est soumise chaque instant à des chocs aléatoires avec les autres molécules du milieu où elle se trouve. Une molécule va ressentir donc chaque instant une force moyenne F_L (Force de Langevin) qui est la résultante des tous les chocs "ressentis". Cette force dirigée aléatoirement détermine le seuil inférieur des forces qui peuvent être appliquées de façon contrôlée sur une molécule en solution. Elle détermine donc la limite inférieure des mesures de force.

L'équation qui permet d'estimer cette force F_L est la suivante :

$$F_L = \sqrt{4\pi k_B T \gamma \Delta f} \quad (3.1)$$

où γ caractérise la dissipation (pour un objet sphérique, $\gamma = 3\pi\eta d$), et Δf la bande passante (inversement proportionnelle au temps d'intégration). Pour un objet de taille $d = 2\mu m$ (une bille, une cellule, etc..) dans l'eau (avec une viscosité $\eta = 10^{-3} P$), la force moyenne ressentie par l'objet sur 1 seconde vaut 10 fN.

Dans des conditions de micromanipulation optimales, cette force aléatoire est la source principale du bruit expérimental. Par la suite, nous verrons que la force typique à laquelle nous observons l'activité des facteurs de remodelage de la chromatine est de l'ordre du piconewton (pN) : c'est une force suffisamment élevée pour obtenir un étirement conséquent de l'ADN et des fluctuations limitées (un bruit faible), mais une tension suffisamment faible pour ne pas (trop) contrarier l'activité de ces protéines.

3.2.2 Force de rupture de liaison covalente F_{max}

Si on fait l'hypothèse qu'une liaison de taille d et d'énergie E peut être rompue en exerçant une force de l'ordre de $F \approx E/d$, on peut faire une estimation grossière de la force nécessaire pour casser les liaisons plus fortes dans le domaine biologique, qui sont les liaisons covalentes. Elles correspondent à des énergies de l'ordre de 1 eV ou $\approx 1.6 \times 10^{-19}$ J, équivalent à $40 k_B T$ à température ambiante ou 24 kCal/mol. La force nécessaire pour casser une liaison de longueur typique ≈ 0.1 nm et d'énergie ≈ 1 eV est donc $F_{max} \sim 1\text{eV}/0.1\text{nm} = 1.6 \times 10^{-9}$ N = 1.6 nN. Cette valeur des forces F_{max} donne la limite supérieure de force pour l'étirement de molécules uniques [244].

3.2.3 Force de rupture de liaisons non-covalentes

Les molécules biologiques possèdent énormément de liaisons faibles électrostatiques, hydrophobes ou des liaisons hydrogènes, qui ne sont pas covalentes et qui sont à la base de leur structure tridimensionnelle. Ces liaisons se font ressentir sur une échelle de distance de l'ordre du nanomètre. Les forces d'interaction caractéristiques des systèmes biologiques se situent entre les extrêmes des forces thermiques et des forces de liaisons covalentes. Elles sont générées par les liaisons hydrogènes ou ioniques ainsi que par des interactions de type van der Waals qui structurent les acides nucléiques et les protéines. L'énergie mise en jeu est de l'ordre de quelques fois l'énergie thermique $k_B T$. Ainsi, la force nécessaire pour rompre une liaison faible est typiquement ~ 4 pN. Cependant, la structure et la stabilité 3D des protéines et de toutes les macromolécules biologiques sont déterminées par de nombreuses liaisons faibles coopératives, qui augmentent la force nécessaire pour casser la structure. Des forces entre 10 pN et 100 pN sont généralement requises pour dénaturer les protéines et l'ADN, ou pour empêcher leur accrochage mutuel. Une des plus fortes interactions non-covalentes est celle qui existe entre la biotine (petite molécule organique) et la streptavidine (une protéine). La force nécessaire pour casser cette liaison est d'environ 160 pN. En réalité des expériences ont montré que grâce aux fluctuations thermiques, qui favorisent la rupture d'une liaison sous tension, la force nécessaire diminue quand on augmente le temps d'application de cette force [229, 245].

3.3 Techniques de micromanipulation de la molécule d'ADN

Pour détecter les forces générées par les protéines qui agissent sur la molécule d'ADN, différentes techniques ont été développées (Fig. 3.3 et 3.4). Selon la technique que l'on utilise, on peut explorer une gamme de forces qui est très étendue.

3.3.1 Les pinces optiques

L'utilisation des pinces optiques permet de manipuler des particules transparentes comme une cellule, des organelles à l'intérieur d'une cellule, ou plus communément des microsphères qui sont attachées à des protéines ou des molécules d'ADN, et qui ont un indice de réfraction élevé par rapport à celui de l'eau (dans laquelle se déroulent la plupart des expériences). Comme le suggère leur nom, les pinces optiques reposent sur l'interaction de particules avec la lumière (en pratique un faisceau laser très focalisé). Près du point focal du faisceau, une particule est soumise à une force de rappel tridimensionnelle résultant de la diffraction du faisceau laser. Pour de petits déplacements (150 nm) de la position d'équilibre du faisceau, la force de

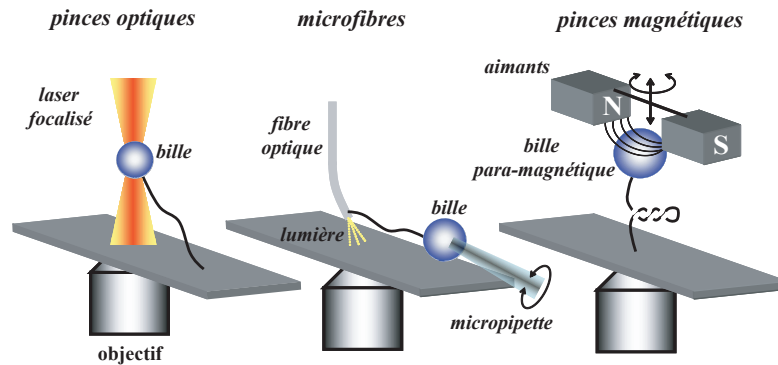


FIG. 3.3 – *Quelques exemples de méthodes de micromanipulation utilisées pour étudier l'interaction ADN-protéines.* Dans les pinces optiques, un faisceau laser piège et tire sur une bille qui a un indice de réfraction élevé par rapport à l'eau. Dans le système à microfibres, on tire avec une micropipette une molécule d'ADN et on mesure la force appliquée par la déflexion de la microfibre. Dans les pinces magnétiques, on tire et tourne des molécules d'ADN en utilisant un couple d'aimants.

rappel peut être traitée comme un simple ressort avec une constante de raideur k_{trap} qui dépend linéairement de l'intensité du laser. Les forces donc peuvent être mesurées (pour $F < 50$ pN) à partir du déplacement δx de la position d'équilibre : $F = k_{trap}\delta x$. La constante de raideur k_{trap} de la pince peut être déterminée avant la mesure, par exemple en utilisant un flux hydrodynamique (de vitesse v et de viscosité η) qui exerce une force F_s sur la particule piégée de rayon r : $F_s = 6\pi\eta r v$.

Une autre façon de déterminer k_{trap} est de mesurer l'intensité des fluctuations browniennes $\langle \delta x^2 \rangle$ de la bille piégée. En utilisant le théorème d'équipartition de l'énergie, on peut écrire :

$$\frac{k_{trap}\langle \delta x^2 \rangle}{2} = \frac{k_B T}{2} \quad (3.2)$$

Les pinces optiques peuvent exercer des forces allant de 0.5 à 100 pN. La limite inférieure des forces appliquées est déterminée à partir de la force à laquelle les fluctuations thermiques destabilisent le piège. La limite supérieure est déterminée par l'absorption du faisceau par la particule piégée, ce qui entraîne un échauffement local qui peut endommager les échantillons biologiques. Cette méthode ne permet pas de contrôler facilement la rotation d'un objet.

3.3.2 Les dispositifs à microfibres

Le dispositif à microfibres utilise la déflexion d'une microfibre optique pour mesurer la force appliquée sur une molécule d'ADN étirée à l'aide d'une micropipette. Cet appareil permet aussi la rotation de la micropipette et donc la torsion de la molécule d'ADN. La rigidité obtenue est de l'ordre de 10^{-5} N/m et sa résolution spatiale d'environ 10 nm. Cependant, à cause de la dimension importante de la fibre et la large force de Langevin associée limite la résolution en force, qui est de l'ordre de quelques pN.

3.3.3 Les pinces magnétiques

La technique des pinces magnétiques consiste à accrocher une molécule d'ADN par une extrémité à une bille magnétique et par l'autre à la surface d'un petit capillaire en verre. La force est exercée à l'aide d'un champ magnétique généré en approchant de forts aimants permanents. La position et la rotation des aimants peuvent être contrôlées et utilisées pour tirer et tordre la molécule. La force appliquée par ce système va de quelques femtoNewtons jusqu'à 100 pN avec une précision de $\sim 10\%$. La mesure de force est absolue et ne nécessite pas la calibration du senseur parce qu'elle est basée sur la mesure des fluctuations browniennes. Le système se comporte comme un pendule de longueur $l = \langle z \rangle$, étiré par une force F le long de l'axe z . Les fluctuations longitudinales ($\delta z^2 = \langle z^2 \rangle - \langle z \rangle^2$) et les fluctuations transverses (δx^2) sont caractérisées par les constantes de raideurs $k_{\parallel} = \partial_z F$ et $k_{\perp} = F/l$. Par le théorème d'équipartition elles doivent satisfaire

$$\delta z^2 = \frac{k_B T}{k_{\parallel}} = \frac{k_B T}{\partial_z F} \quad (3.3)$$

$$\delta x^2 = \frac{k_B T}{k_{\perp}} = \frac{k_B T l}{F}. \quad (3.4)$$

Ainsi en mesurant uniquement les fluctuations Browniennes de la bille (δx^2 , δy^2), il est possible d'obtenir la force exercée sur la molécule d'ADN (plus petites sont les fluctuations, plus grande est la force), et à partir de δz^2 , il est possible d'obtenir sa dérivée première, $\partial_z F$ (la rigidité effective de la molécule).

3.3.4 Différences entre les différentes techniques de micromanipulation de l'ADN

Les pinces optiques et les microfibres imposent l'extension du système étudié. La connaissance de la raideur du capteur permet de déduire la force exercée à partir de la mesure de son déplacement. La linéarité du senseur (domaine de validité de la loi de Hooke) limite en général le domaine accessible de forces à un ou deux ordres de grandeur. Les pinces magnétiques fixent la force appliquée au système. L'intensité du champ varie sur une échelle de l'ordre du mm, ce qui est bien plus grand que l'échelle des déplacements des moteurs moléculaires étudiés. Par conséquent, une position donnée des aimants impose une force constante, quel que soit le déplacement de la molécule étudiée. Les pinces magnétiques sont une technique non invasive qui n'a pas besoin de calibrations complexes et qui est limitée, à haute force, par la fréquence d'acquisition de la caméra vidéo et par la résolution spatiale pour suivre le mouvement Brownien et, à basse force par la force de Langevin agissant sur la bille. Le désavantage majeur de cette technique de mesure de force est le fait qu'il faut mesurer le mouvement Brownien pendant un temps suffisamment long pour avoir une mesure de force précise. En particulier, si on veut mesurer de faibles forces avec une précision de l'ordre de 10% , il est nécessaire d'acquérir pendant environ quarante minutes (pour une force voisine de 0.1 pN).

Pour des microfibres, avec une constante de raideur de l'ordre de 10^{-5} et une résolution de déplacement de l'ordre d'une dizaine de nm on pourrait en principe mesurer des forces de l'ordre d'une dizaine de femtoNewton. Cependant, comme déjà dit, les dimensions importantes de la fibre sont associées à une force de Langevin très grande qui limite la résolution en Force à quelques picoNewtons.

Dans le cas des pinces optiques, le piège a une constante de raideur de l'ordre de 10^{-5} et une dimension de l'ordre de $0.5 \mu\text{m}$. Ceci correspond à des forces de l'ordre du pN. Pour

Méthodes de molécule unique

Méthodes	$F_{\min - \max}$ (N)	δx_{\min} (m)	Stiffness (N m ⁻¹)
Cantilevers	10 ⁻¹¹ -10 ⁻⁷	10 ⁻¹⁰	0.001-100
Microfibres	10 ⁻¹² -10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶ -1
Pincés magnétiques	10 ⁻¹⁴ -10 ⁻¹¹	10 ⁻⁸	~10 ⁻⁹
Pincés optiques	10 ⁻¹³ -10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻³
Écoulement	10 ⁻¹³ -10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	n.a.

FIG. 3.4 – *Vue d'ensemble des principales techniques utilisées dans les études en molécule unique de l'ADN avec les caractéristiques principales pour chaque technique.*

tirer plus fort, il faut augmenter la puissance du laser, en augmentant le risque de photo-endommagement.

3.4 Montages expérimentaux utilisés

Au cours de ma thèse j'ai utilisé trois techniques différentes de manipulation et visualisation de molécules uniques d'ADN, celles-ci m'ont permis d'étudier les facteurs de remodelage de la chromatine. Ces techniques sont les pincés magnétiques, la technique TPM et l'AFM. Je vais maintenant décrire ces trois montages expérimentaux plus en détail.

3.5 Pincés magnétiques

3.5.1 Microscope

Dans l'image 3.5a et b on peut voir une photographie du montage utilisé. Il s'agit d'un microscope "artisanal" composé de :

- une simple source de lumière, dans notre cas une diode,
- un système de lentilles pour focaliser la lumière sur l'échantillon qui se trouve dans un capillaire en verre positionné sur une platine de translation horizontale,
- un objectif 100x qui collecte la lumière et un piezo pour régler la mise au point de l'objectif,
- une caméra vidéo CCD avec une fréquence d'acquisition de 25 Hz, qui permet l'acquisition d'images qui seront ensuite digitalisées par une carte d'acquisition vidéo pour être traitées en temps réel,
- *last but not least* ! un ordinateur pour l'analyse des données.

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

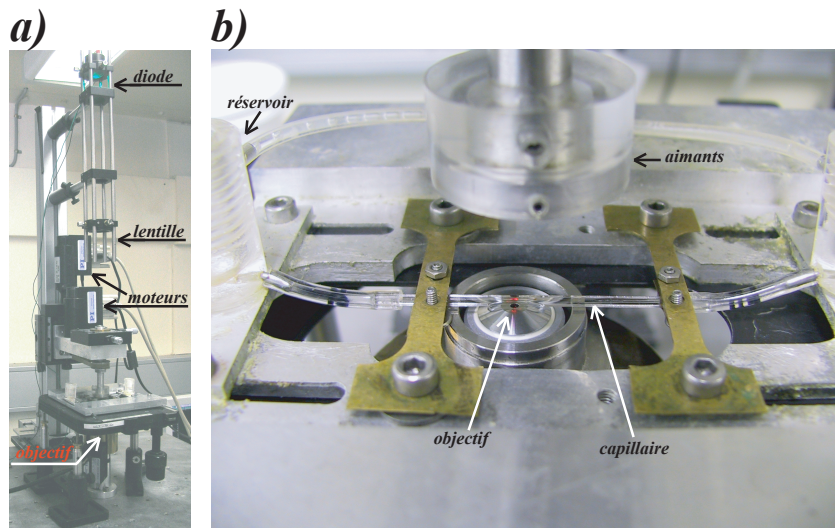


FIG. 3.5 – *Montage des pincettes magnétiques utilisées.* a) Image du microscope "artisanal" utilisé dans les mesures. b) Zoom sur la platine où se trouve le capillaire. On peut voir que le capillaire est connecté à deux réservoirs, utilisés pour introduire la solution ADN/billes, pour changer le tampon et pour introduire les protéines. Au dessus du capillaire on peut voir les aimants.

Le capillaire (Fig.3.5b) dans lequel se trouvent les molécules d'ADN, est connecté à des tubes qui permettent l'écoulement de tampons et l'injection du mélange bille-ADN ou des protéines.

3.5.2 Molécule d'ADN utilisée

La molécule d'ADN que j'ai utilisée est obtenue par des techniques classiques de biologie moléculaire. Il s'agit d'une molécule d'ADN linéaire obtenue par ligation de trois fragments différents.

Le fragment central est obtenu par digestion d'un ADN de plasmide. Cette molécule d'ADN provient de l'extraction de l'ADN d'une source d'*E. coli* transformée avec un plasmide dérivatif de pSA509, qui m'a été donné par le pr. S. Adhya, et qui a une taille voisine de 3,6 kbp.

Les deux fragments constituant les extrémités sont synthétisés par PCR (la réaction de polymérisation en chaîne) sur le même plasmide en présence d'oligonucléotides d'UTP marqués soit par la digoxigénine, soit par la biotine. De cette façon, on obtient des amorces d'ADN marquées avec plusieurs biotines ou digoxigénines.

Après digestion des amorces marquées et du plasmide (pour le protocole voir les annexes), les trois fragments linéaires obtenus sont ligués entre eux pour former une molécule d'ADN de près de 3.4 kpb.

3.5.3 Ancrage de la molécule sur les billes et sur la surface du capillaire

L'ancrage de l'ADN avec les billes se fait grâce à l'interaction biotine/streptavidine (Fig.3.6). D'abord, des billes recouvertes de streptavidine sont incubées avec l'ADN marqué avec la

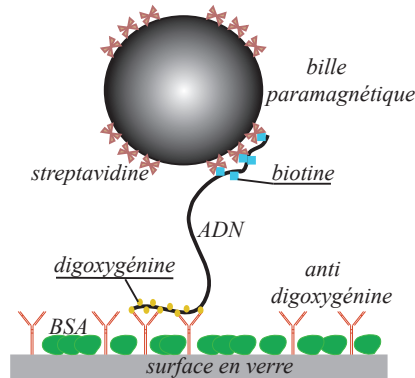


FIG. 3.6 – *Schéma de la stratégie d'ancrage de l'ADN.* Une extrémité de l'ADN est marquée avec la biotine, et l'autre avec la digoxigénine. L'interaction entre la biotine et la streptavidine fait que l'ADN s'ancree spécifiquement à la bille magnétique fonctionnalisée avec de la streptavidine. L'extrémité de l'ADN marquée avec la digoxigénine s'ancree de façon spécifique à la surface de verre d'un capillaire fonctionnalisé avec l'antidigoxigénine. La présence de points multiples d'ancrage entre bille et surface permet de contrôler la torsion de la double hélice de l'ADN.

biotine. L'extrémité marquée avec la biotine reconnaît spécifiquement la streptavidine qui recouvre la surface des billes superparamagnétiques utilisées. Dans mes expériences, j'ai utilisé des billes MyOne de $0.5 \mu\text{m}$ de rayon, commercialisées par Dynal.

Pour empêcher qu'il y ait plus d'une molécule d'ADN attachée à une même bille, lors de l'incubation on utilise beaucoup plus de billes que de molécules d'ADN.

L'ancrage de la molécule d'ADN sur la surface du capillaire se fait par l'interaction entre le couple digoxigénine/antidigoxigénine. En fait, les capillaires sont traités de façon à ce qu'ils soient recouverts d'un anticorps contre la digoxigénine. Cette antidigoxigénine reconnaît spécifiquement la digoxigénine qui marque l'autre extrémité de l'ADN.

On laisse donc incuber le mélange billes/ADN dans un capillaire et après rinçage de ce dernier, les billes accrochées par l'ADN à la surface restent dans les capillaires, de même que les billes qui interagissent avec la surface de manière aspécifique.

3.5.4 Mesure du déplacement de la bille et de l'extension de la molécule d'ADN

L'acquisition de l'image permet de suivre en temps réel le déplacement de la bille dans le plan xy. En fait l'image et le profil de la bille sont symétriques (Fig.3.7). Donc on peut utiliser cette symétrie pour localiser le centre de la bille, et par corrélation du profil de la bille à un certain temps t avec son symétrique par rapport à l'origine (défini par la position de la bille à l'instant précédent t_0) on peut suivre le déplacement \vec{d} en temps réel avec une précision de l'ordre de 10 nm. Pour suivre le mouvement dans la direction z (l'axe de la lumière), on utilise une astuce. Le faisceau lumineux utilisé est faiblement focalisé au niveau de l'échantillon, ce qui résulte en une éclairage quasi parallèle. En présence de cette lumière, on forme des anneaux de diffraction autour des billes. Le profil des anneaux de diffraction varie en fonction de la distance entre le point focal de l'objectif et la bille (Fig.3.8). On va donc construire un fichier

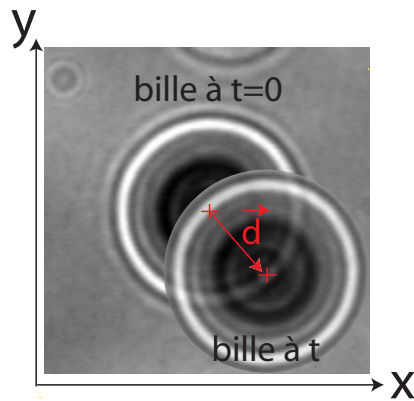


FIG. 3.7 – *Suivi de la bille en x et y.* La symétrie de la bille permet de trouver facilement le centre de la bille et la corrélation du profil de la bille permet de déduire le déplacement \vec{d} de la bille en temps réel.

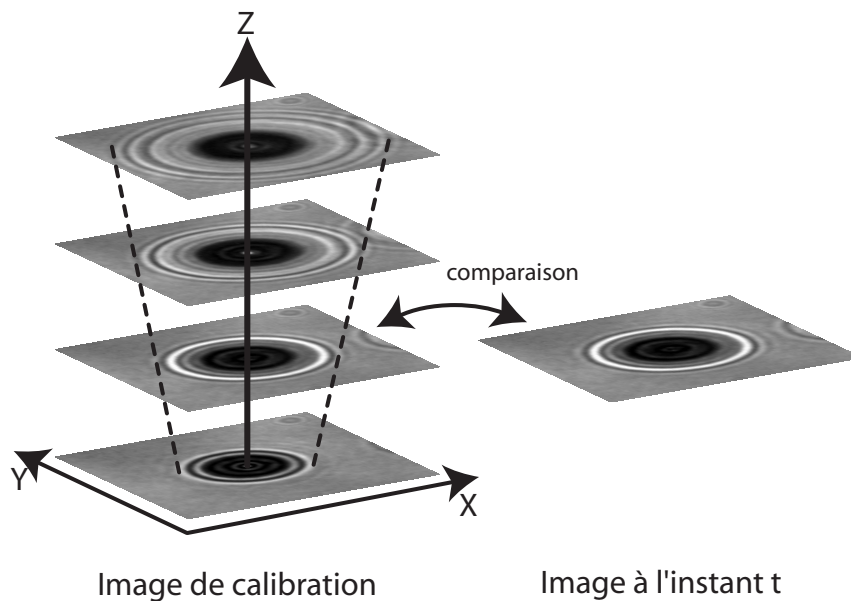


FIG. 3.8 – *Suivi du mouvement de la bille en z.* L'enregistrement du profil des anneaux de diffraction en fonction du point de focalisation permet de former une image de calibration, qui est ensuite utilisée pour déterminer la position de la bille à l'instant t , en comparant son profil par rapport au fichier de calibration.

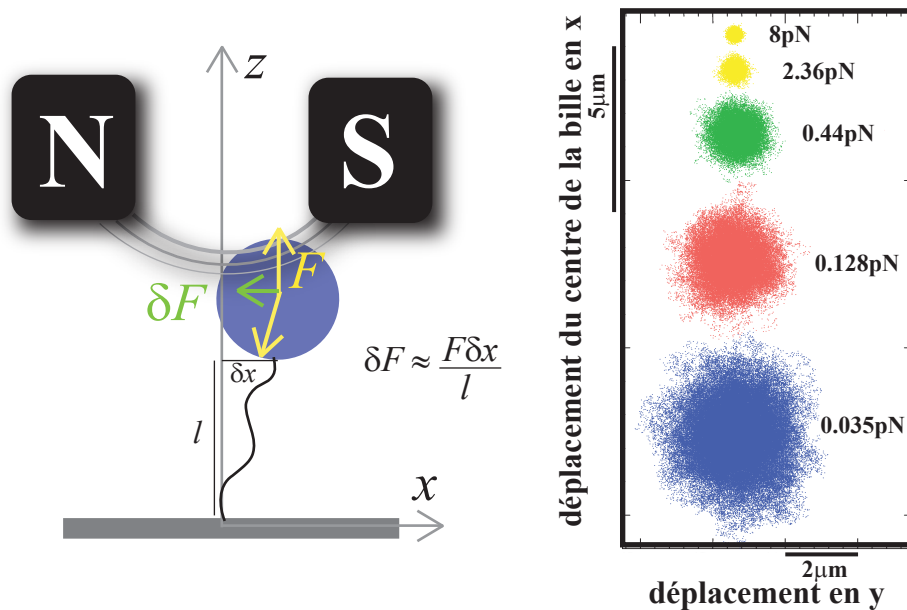


FIG. 3.9 – **Principe de la mesure de force.** À gauche) Les fluctuations thermiques déplacent la bille hors de sa position d'équilibre, de telle sorte qu'une force de rappel $\delta F \approx F \delta x / z$ due à la force magnétique tend à la replacer à sa position initiale. À droite) Position du centre de la bille dans la direction x et y soumise à différentes forces de traction. Comme on peut le voir, les déplacements diminuent au fur et à mesure que la force augmente, en accord avec l'eq. 3.5.

de calibration contenant les profils de diffraction pour différentes distances entre la bille et le point focal. La comparaison, en temps réel, entre l'image de la bille et de son profil et les profils des images de calibration permet de déduire la position en z de la bille avec une précision équivalente à celle du suivi en x et y . On a besoin d'une référence absolue de la position de la bille, qui est obtenue en laissant tomber la bille sur la surface en réduisant la force : $F \approx 0$ pN. On peut donc mesurer, de cette façon, l'extension de la molécule d'ADN en temps réel. Pour éliminer les dérives thermiques lentes de la platine du microscope, on va suivre aussi une bille accrochée à la surface de manière aspécifique. La différence entre la position des deux billes nous donne directement le mouvement de la bille mobile sans les dérives.

3.5.5 Mesure de la force

Comme je l'ai déjà dit précédemment, on n'a pas besoin de faire de calibration pour effectuer des mesures de force en utilisant les pincettes magnétiques, parce qu'on déduit la force en enregistrant les fluctuations browniennes de la bille. Le principe peut paraître compliqué, mais l'idée est simple : plus on tire sur la molécule, moins la bille à laquelle elle est attachée peut fluctuer librement, et inversement, si la force exercée sur la molécule est faible, la bille va beaucoup fluctuer (Fig.3.9b). En fait, le système bille-ADN se comporte comme un pendule amorti de longueur $\langle z \rangle$ pour lequel la gravité a été remplacée par un gradient de champ magnétique. Dans ce système, la force de Langevin (due aux chocs aléatoires des molécules d'eau sur la bille) déplace

la bille à chaque instant et fait donc fluctuer la bille par rapport à sa position d'équilibre d'une quantité δx . A chaque instant, la bille est soumise à une force de rappel $\delta F_x \approx F\delta/\langle z \rangle \equiv k_x \delta x$, ou $k_x = F/\langle z \rangle$ est la raideur dans la direction x (transverse) du système (Fig.3.9a). Grâce au théorème d'équipartition de l'énergie, on peut écrire : $k_x \langle \delta x^2 \rangle / 2 = k_B T / 2$. On peut déduire la force F appliquée et la constante de raideur k_x en utilisant les fluctuations transverses $\langle \delta x^2 \rangle$ de la bille et l'extension moyenne $\langle z \rangle$ de la molécule d'ADN :

$$F = \frac{k_B T \langle z \rangle}{\langle \delta x^2 \rangle}. \quad (3.5)$$

L'enregistrement des fluctuations dans la direction z (longitudinale) permet de connaître la raideur dans cette direction ($k_z \equiv \partial F / \partial z$) grâce à cette relation :

$$\frac{1}{2} k_z \langle \delta z^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T. \quad (3.6)$$

Le seul problème de cette mesure de force est qu'il faut faire des enregistrements très longs des fluctuations transverses pour avoir une mesure précise. Pour être sûr de ne pas sous-échantillonner la mesure des fluctuations, il est opportun d'analyser le signal de déplacement dans l'espace de Fourier (ou des fréquences de fluctuations de la bille) ce qui permet une étude plus complète et rigoureuse du mouvement de la bille et aussi d'accéder à des paramètres inobservables dans l'espace direct.

La description du spectre de puissance des fluctuations de la bille $|\delta x^2(f)|$, est identique à celui d'un oscillateur amorti. On peut décrire dans l'espace de Fourier le spectre de puissance des fluctuations par l'équation suivante :

$$|\delta x^2(f)| = \frac{12\pi k_B T \eta d}{k_x^2} \frac{1}{1 + (f/f_0)^2} \quad (3.7)$$

où $f_0 = k_x / (6\pi^2 \eta d)$ est la fréquence de coupure en Hertz, qui dépend de la taille de la bille d , de la viscosité du milieu η et elle est proportionnelle à la raideur du système et donc à la force appliquée. Mesurer f_0 est très important et permet de vérifier si l'acquisition n'est pas sous-échantillonnée (en vérifiant que la fréquence de coupure du système f_0 est bien petite par rapport à la moitié de la fréquence d'acquisition de la caméra vidéo ou fréquence de Nyquist $f_{Nyquist}$, $f_{Nyquist} = 25/2 Hz \gg f_0$). On vérifie aussi que la durée de l'acquisition T est suffisamment longue pour obtenir une estimation statistiquement robuste de $\langle z \rangle$ et surtout de $\langle \delta x^2 \rangle$, soit $f_0 T \gg 1$.

3.6 Tethered Particle Motion ou TPM

Dans la technique TPM, un petit fragment d'ADN est attaché par une extrémité à une petite bille en polystyrène, et par l'autre extrémité à la surface d'une lamelle de verre [246, 247]. Cette technique ne permet pas de micromanipuler la molécule d'ADN, mais se limite à enregistrer les fluctuations browniennes de la bille. Le principe de la mesure est le suivant : les changements de longueur de la molécule d'ADN sont accompagnés par des changements d'amplitude du mouvement de la bille qui peuvent être mesurés à partir de l'analyse des images digitales. La position du centre de la bille peut être déterminée avec une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre et une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde, et permet de suivre les trajectoires moléculaires [248]. La TPM a été effectuée aussi en utilisant des particules d'or et des particules fluorescentes [249]. Les changements d'amplitude des fluctuations browniennes servent comme senseur des changements conformationnels de la molécule d'ADN qui est attachée à la bille. En fait l'amplitude des fluctuations browniennes dépend de la "End-to-End distance" (distance bout-à-bout) moyenne, qui est proportionnelle à la "Contour Length" (la longueur réel de la molécule), la constante de proportionnalité pouvant être déterminée pour les conditions expérimentales utilisées [250].

Cette approche a été appliquée avec succès pour étudier l'élongation lors de la transcription par l'ARN-polymérase [251, 250, 252, 253], pour analyser la cinétique de formation de la boucle formée par le répresseur lac [240] et la translocation de l'ADN par l'enzyme RecBCD [239] (Fig.3.10). La technique a été utilisée aussi pour suivre le mouvement de moteurs moléculaires comme la kinésine [254] et aussi le mouvement des protéines membranaires [255, 256, 238].

3.6.1 Montage expérimental

Les échantillons bille-ADN ont été observés en utilisant un microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC). Dans notre cas, il s'agissait d'un microscope Leica DM LB, équipé d'un objectif à immersion dans l'huile 100 \times , avec une ouverture numérique de 1.4 (N-Plan). Les images ont été collectées avec une caméra vidéo CCD (CV-M10) qui avait une fréquence d'acquisition de 25Hz. Toutes les images ont été enregistrées sur des cassettes vidéo et digitalisées avec un ordinateur (Fig.3.11).

3.6.2 Préparation des chambres de mesure et de l'ADN

Les micro-chambres, dans lesquelles les mesures ont été faites, ont été obtenues en utilisant des lames en verre porte-objets et des lamelles en verre couvre-objets (Fig.3.11b). Les deux lames ont été assemblées en utilisant du ruban bi-adhésif et en délimitant un canal avec deux lignes de silicone. Dans ce canal ayant un volume variable compris entre 7-15 μ l, on va introduire des billes attachées aux molécules d'ADN, des tampons et des protéines. La surface du canal est recouverte d'antidigoxigénine et passivée avec de la BSA pour permettre l'ancrage de l'ADN en empêchant les interactions non-spécifiques entre la bille et la surface (Fig.3.12). Les molécules d'ADN utilisées (environ 800 bp) dans les expériences ont été produites par PCR, en utilisant des primers marqués aux extrémités avec une biotine et une digoxigénine, en amplifiant un morceau d'ADN du plasmide pUC19. Toutes les expériences et les contrôles ont été faites dans le tampon de la protéine ISWI (voir Annexes pour les protocoles).

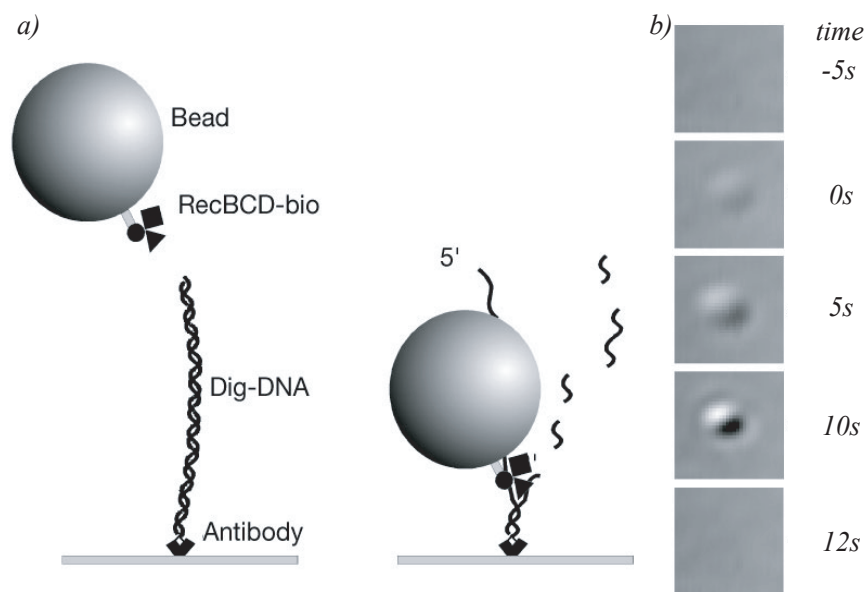


FIG. 3.10 – Schéma qui montre un exemple d'étude au niveau d'une seule molécule par la technique TPM de la translocation de RecBCD par le groupe de Gelles [239]. a) Une molécule d'ADN de 1.3 - 1.5 kpb, fonctionnalisée avec une digoxigénine à une extrémité, a été accrochée à la surface d'un capillaire recouvert d'antidigoxigénine. Une bille fonctionnalisée par la protéine RecBCD peut séparer les deux brins d'ADN à l'extrémité et commencer à dégrader un des deux brins. b) Suivi de la dégradation d'ADN opérée par ce complexe, réalisé en suivant l'amplitude des fluctuations browniennes ainsi que le profil de la bille.

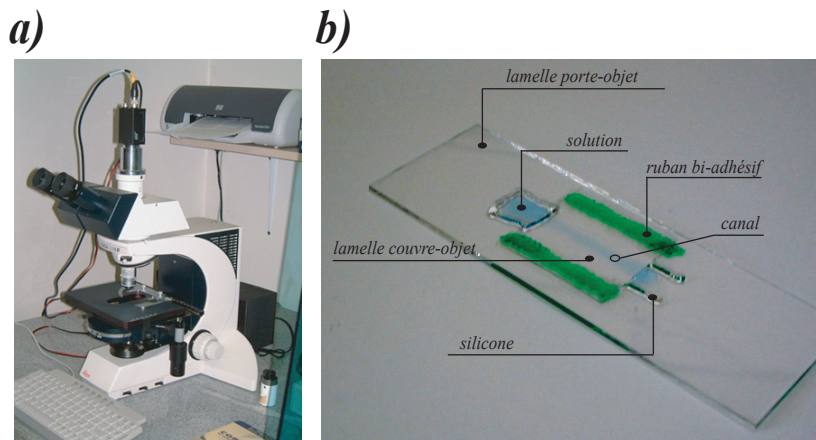


FIG. 3.11 – a) Le montage expérimental utilisé est un microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC) Leica DM LB, connecté à une caméra vidéo CCD. b) Photo de la microchambre utilisée dans les expériences.

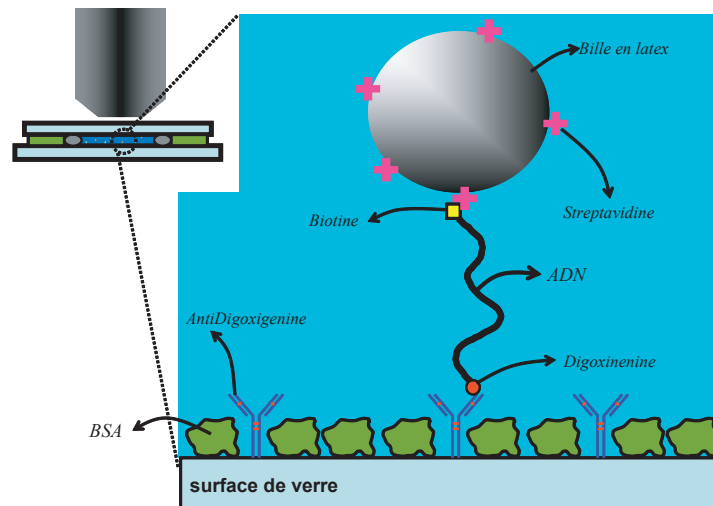


FIG. 3.12 – **Stratégie d'ancrage de l'ADN dans le canal de la microchambre.** Les extrémités d'une molécule d'ADN sont fonctionnalisées par PCR par une biotine d'une part et une digoxigénine d'autre part. Grâce aux liaisons spécifiques entre digoxigénine/antidigoxigénine et biotine/streptavidine, on attache spécifiquement l'ADN à la bille et à la surface de la microchambre. La surface de la microchambre est aussi fonctionnalisée avec de la BSA pour empêcher les interactions aspécifiques entre bille et surface.

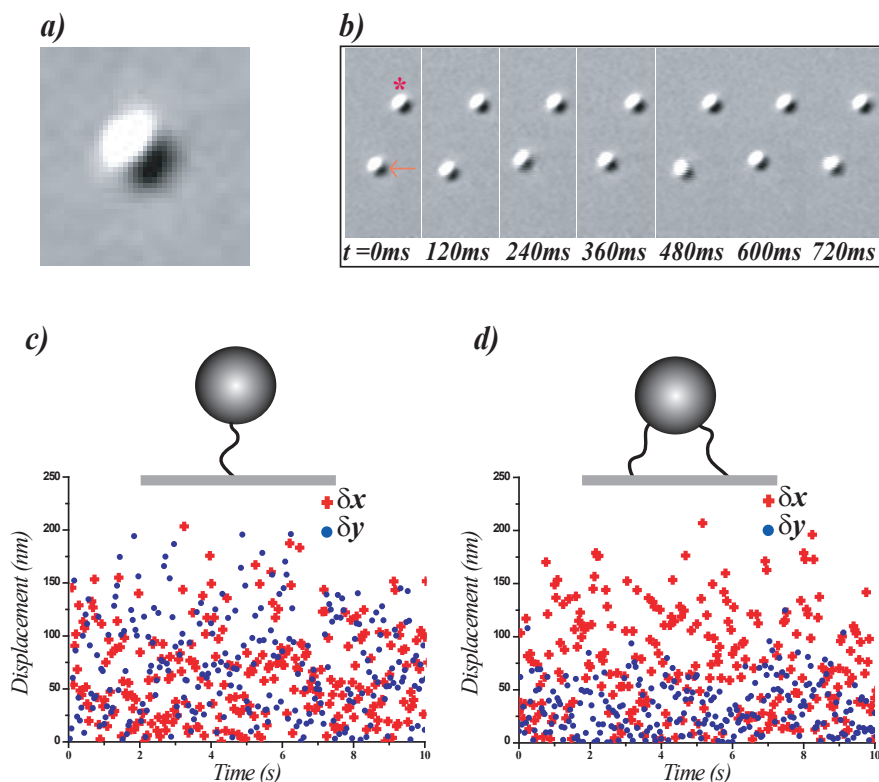


FIG. 3.13 – *a) Image typique d’une bille obtenue par microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC). b) Séquence d’images temporelles d’une bille fixe (*) et d’une bille mobile (←). c) L’analyse du déplacement et de l’amplitude du mouvement brownien le long de l’axe x et y permet de vérifier si la bille est accrochée à la surface par une seule ou plus d’une molécule d’ADN. À gauche, on voit que le déplacement est symétrique le long des deux axes (donc on a une seule molécule d’ADN qui ancre la bille). À droite, par contre on a un déplacement asymétrique le long des deux axes ce qui nous indique que l’on a probablement plus d’une molécule d’ADN attachée à la bille.*

3.6.3 Analyse des images

Les images des billes obtenues avec le microscope DIC, apparaissent comme une juxtaposition de deux moitiés d’un cercle blanc et noir (Fig.3.13a et b). Le programme qui traque la bille (écrit par le chercheur Dorian Brogioli), cherche dans la région sélectionnée où se trouve la bille d’intérêt, les points proches avec l’intensité lumineuse la plus élevée. Une fois cette opération faite, il trouve le centre de la région. Le programme, après avoir fait la même chose pour la région noire (région avec la plus faible intensité lumineuse), définit le centre de la bille comme la moyenne des deux centres. L’erreur de cette méthode de suivi de la bille correspond à moins d’un tiers de pixel, c’est-à-dire presque 20 nm. On utilise de faibles concentrations d’ADN pour garantir statistiquement que les billes soient accrochées par une seule molécule d’ADN. Il est cependant possible que certaines d’entre elles soient accrochées par plus d’une molécule. Pour éliminer ces billes, on a utilisé un programme qui examine la symétrie du mouvement de bille. La dimension de l’aire de la surface de mouvement de la bille est enregistrée chaque 4s. Cette

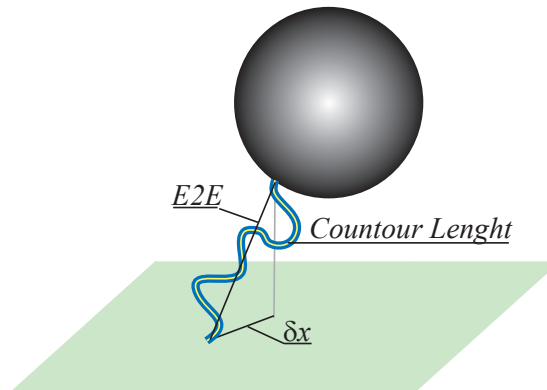


FIG. 3.14 – Schéma qui montre la relation entre la distance bout-à-bout (E2E) et le déplacement de la bille δx . On a que l'extension quadratique moyenne d'un polymère en solution est égale à la relation suivante $\langle \delta x^2 \rangle_{3D} = \frac{4}{3} \xi l (1 - (\xi/l)(1 - e^{-l/\xi}))$ [257].

aire est caractérisée par un axe majeur et un axe mineur. Si la bille est attachée par une seule molécule, les fluctuations browniennes le long des deux axes seront symétriques (Fig.3.13c et d).

3.6.4 Calibration et mesure de la distance bout-à-bout (E2E)

L'amplitude du mouvement brownien de la bille est limitée par la longueur de la molécule qui l'ancre à la surface et, vu que la molécule ne peut bouger qu'autour du point d'ancrage de la double hélice, elle échantillonnera l'espace intérieur d'une hémisphère dont le volume est déterminé par la longueur de l'ADN auquel on doit ajouter le rayon de la bille. La distance entre la position de la bille et les points d'ancrage de l'ADN à la surface représente l'amplitude du mouvement de l'ADN. À cause des fluctuations thermiques dues aux chocs aléatoires avec les molécules du milieu, la molécule d'ADN qui ancre la bille à la surface de la microchambre va adopter toutes les conformations possibles lui permettant de maximiser l'entropie. Si on regarde en détail la distance entre les deux extrémités de la molécule d'ADN (distance bout-à-bout ou l), on verra que cette distance changera dans le temps en oscillant autour d'une valeur moyenne caractéristique des conformations les plus probables que la molécule d'ADN peut adopter. Pour déterminer la variation de l'end-to-end distance $E2E$ de l'ADN qui lie la bille à la surface, on a utilisé l'équation donnée par Rivetti et Bustamante [257] qui met en relation la longueur l d'un polymère en solution avec le déplacement quadratique moyen de la bille en trois dimensions $\langle \delta x \rangle_{3D}$:

$$\langle \delta x^2 \rangle_{3D} = 2\xi l (1 - (\xi/l)(1 - e^{-l/\xi})). \quad (3.8)$$

Dans la limite $l \gg \xi$ on retrouve le résultat connu pour le rayon de gyration d'un polymère, $\langle r_g^2 \rangle = \langle \delta x^2 \rangle + \langle \delta y^2 \rangle + \langle \delta z^2 \rangle = 6\xi L$. Dans toutes les expériences de TPM, on regarde la projection du déplacement sur le plan focal du microscope donc, à l'équation 3.8, on va rajouter le facteur de correction :

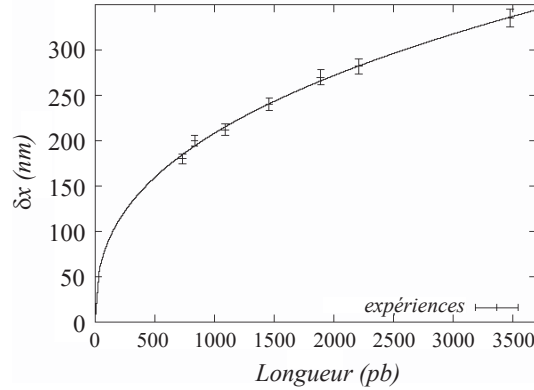


FIG. 3.15 – *Courbe de calibration obtenue en mesurant l'amplitude des fluctuations browniennes en fonction de la taille de la molécule d'ADN. Les points expérimentaux sont en accord avec le fit obtenu avec le modèle du ver (WLC).*

$$\langle \delta x^2 \rangle_{\text{projection}} = \frac{2}{3} \langle \delta x^2 \rangle_{3D}. \quad (3.9)$$

Il est possible de mettre en relation l'amplitude du mouvement δx de la bille avec la taille de l'ADN qui l'ancre à la surface en calibrant les fluctuations browniennes de plusieurs billes accrochées avec des molécules d'ADN de taille différente. Comme on peut le voir dans la Figure 3.15, l'amplitude des fluctuations browniennes observées est en accord avec la courbe théorique obtenue en modélisant l'ADN avec le modèle du ver, ou worm like chain model (WLC).

3.7 AFM

La microscopie électronique et la cryo-microscopie électronique permettent de visualiser des molécules d'ADN et d'étudier leur conformation en deux dimensions. Ces techniques, par leur excellente résolution, permettent d'obtenir des détails fins sur des caractéristiques topologiques de l'ADN ou sur l'interaction ADN/protéines. En contrepartie, elles peuvent entraîner des artefacts liés aux traitements successifs nécessaires à la préparation des échantillons. Elles permettent d'obtenir seulement des informations sur la composition et la structure microscopique de la surface de l'échantillon, mais pas une réelle reconstitution topographique tridimensionnelle de la surface. La tridimensionnalité de certaines images en littérature est due à un traitement des images obtenu avec l'ordinateur.

L'invention de l'AFM en 1986 [258], appelé aussi microscope à force atomique, a doté les biologistes d'une nouvelle méthode pour étudier et caractériser l'interaction ADN/Protéines. L'imagerie par microscopie à force atomique (AFM) permet également d'obtenir des images des molécules d'ADN isolées accrochées sur une surface. L'avantage, par rapport à la microscopie électronique, est que la technique est peu invasive, donc les sources d'artefacts sont plus limitées. En plus, l'analyse peut s'effectuer en milieu aqueux.

Le Microscope à Force Atomique fait partie de la famille des microscopes à champ proche (scanning probe microscope ou SPM) qui sont capables de reconstituer la surface d'un solide

avec une résolution atomique grâce à une pointe de dimension sub-micrométrique qui va balayer la surface en maintenant une distance de quelques Å avec celle-ci. Dans le microscope à Force atomique (AFM), on a pour élément de base une pointe au bout d'un microlevier dont la déplétion est proportionnelle à la force d'attraction (ou de répulsion) avec la surface. En gardant cette force constante (par un circuit de rétroaction approprié), on a accès à un relevé topographique de la surface avec une résolution de l'ordre du nm (Fig. 3.16).

La pointe de l'AFM est typiquement faite de Si ou de Si_2N_3 . Un faisceau laser est focalisé sur le microlevier, le rayon réfléchi est détecté par une photodiode. Les changements de réflexion du faisceau laser sont utilisés pour déduire la déflexion verticale du cantilever pendant le balayage de la surface, due à son interaction avec la surface. Des déflexions du levier de 0.01nm peuvent être détectées [259, 260].

Les cantilevers utilisés ont une constante de raideur k permettant de répondre à des forces de flexion entre $10^{-8} - 10^{-11} \text{ N}$. La constante de raideur dépend du matériel, de la forme et de la dimension du levier utilisé. Généralement, pour les cantilever commerciaux, k varie entre $10^{-3} - 10 \text{ N/m}$ et ils ont une fréquence de résonance comprise entre $1 - 100 \text{ kHz}$.

Le balayage de la surface peut se faire selon trois modes principaux. Dans le mode "contact", on impose une déflexion du cantilever constante ($F = \text{const}$). La pointe est toujours en contact avec la surface et on fait varier, par une boucle de rétroaction, la distance entre pointe et surface de façon à garder la déflexion du cantilever constante. Les forces générées dans ce mode peuvent varier entre 1 et 10 nN, ce qui correspond à des valeurs de force élevées. Les images obtenues sont très stables, mais les forces de compression et de cisaillement générées peuvent endommager l'échantillon. Ces forces empêchent aussi l'acquisition d'images d'échantillons qui sont liés faiblement à la surface comme l'ADN. En effet les forces générées dans ce mode peuvent déplacer l'échantillon (e.g. l'ADN) en donnant un signal erroné de la surface.

Dans le mode "non-contact", on garde constante l'amplitude des oscillations du cantilever ($\partial F/\partial z = \text{constant}$) pendant le balayage. Cette modalité donne des images moins stables que la modalité "contact" et elle n'a pas été utilisée (jusqu'à ce moment) pour étudier des échantillons biologiques.

Le troisième mode, dit "tapping mode", est un mélange entre les deux modes précédents. Le cantilever oscille à une fréquence d'une centaine de kiloHertz pendant qu'il balaie la surface avec de grandes amplitudes d'oscillation. La pointe touche, donc, périodiquement la surface. La durée très courte du contact avec la surface minimise le temps d'interaction et réduit les dégâts causés aux échantillons.

Plusieurs protocoles pour la préparation d'échantillons biologiques ont été développés ces dernières années. Généralement le substrat à utiliser pour faire le dépôt des échantillons et pour obtenir une bonne image doit être extrêmement plat, avec une rugosité moyenne inférieure à 0.5 nm. En particulier, le choix du substrat est fondamental pour la visualisation de biomolécules comme l'ADN qui a une hauteur de seulement 2 nm, mais avec un contraste typique de 0.5 - 1 nm. Les substrats les plus communs sont le mica, le graphite, le mica recouvert d'or, le verre et des wafers de silicium traités mécaniquement. Pour le dépôt des molécules d'intérêt, sur un substrat, deux groupes de techniques sont utilisés. Le premier utilise une immobilisation non-covalente, basée sur une adsorption physico-chimique des molécules sur la surface. Le substrat, pour ce type d'immobilisation et en particulier pour l'immobilisation de l'ADN, est généralement du mica qui peut être modifié facilement. Le second groupe implique une immobilisation covalente [261, 262].

Le mica est un substrat qui présente une surface plate à l'échelle atomique et qui peut être facilement et économiquement préparé. Il fait partie d'un groupe de minéraux qui contient du

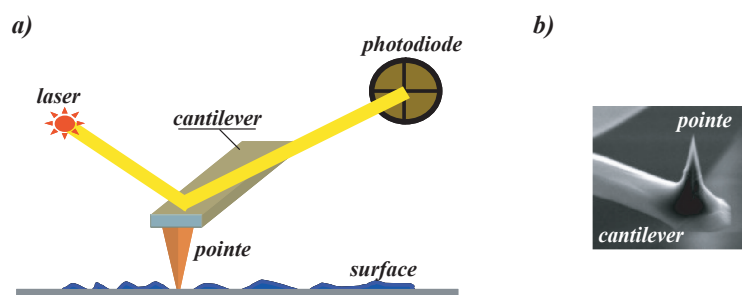


FIG. 3.16 – Schéma qui montre la technique AFM. a) Une pointe très fine balaie une surface (sur laquelle se trouve l'échantillon d'intérêt). La pointe est montée sur un cantilever. Les déflexions du cantilever, dues à l'interaction pointe-surface, sont suivies grâce à la réflexion d'un faisceau laser détectée par une photodiode. b) Photo d'une pointe utilisée pour l'AFM.

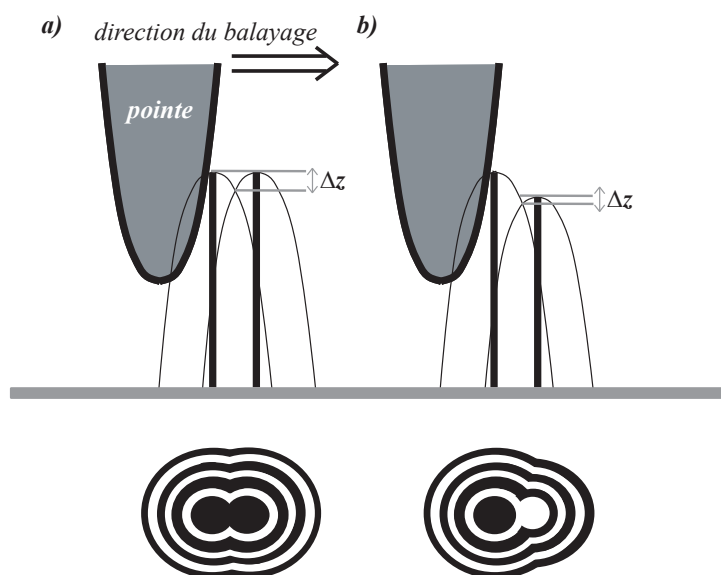


FIG. 3.17 – Schéma qui montre certains facteurs qui déterminent la résolution spatiale du microscope AFM. Si on a deux objets ponctuels à une certaine distance, l'image obtenue ne sera pas ponctuelle, mais aura un profil qui sera le profil inversé de la pointe (convolution). Donc la résolution du microscope ne dépend pas seulement de la distance entre les deux objets, mais aussi de la différence de hauteur entre ceux-ci. Ceci est présenté ci-dessus : dans les cas a) et b) deux objets sont placés à la même distance l'un de l'autre mais ces objets ne se trouvent bien résolus en AFM que dans le cas a) où ils se trouvent avoir la même hauteur. Dans le cas b), la différence de hauteurs entre les deux objets fait perdre en résolution.

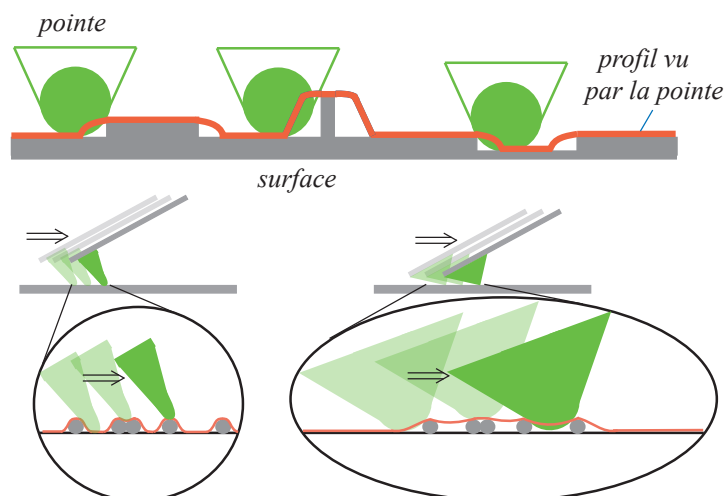


FIG. 3.18 – **Convolution et dimension de la pointe.** L'image de la surface obtenue n'est pas toujours une image totalement réelle de la topographie de la surface, ceci est dû à l'effet de convolution introduit par la pointe. On peut, par contre, essayer d'améliorer l'image en réduisant la dimension de la pointe comme on peut le voir dans les images en bas : une pointe petite arrive à "voir" plus de détails par rapport à une pointe plus épaisse.

SiO₄ sous forme lamellaire. Il est possible de cliver le mica en obtenant des surfaces atomiquement plates qui présentent des charges négatives [262].

Pour y absorber l'ADN (lui même négativement chargé) on doit donc traiter le mica pour le recouvrir de charges positives. Il est possible d'utiliser des détergents cationiques, de la spermine, de la spermidine, des ions Mg⁺⁺ ou de la poly-L-ornitine.

Différent des autres microscopes (optique, SEM, etc.), la résolution spatiale dépend des caractéristiques de l'échantillon [263], mais aussi de la forme de la pointe utilisée et en particulier sa largeur [264].

Si on regarde un objet ponctuel, la forme obtenue avec l'AFM ne sera pas ponctuelle mais aura plutôt un profil qui sera l'inverse du profil de la pointe utilisée, phénomène que l'on appelle convolution de l'objet. La résolution d'un AFM va dépendre également de la distance entre deux objets différents et surtout de la différence de hauteur entre deux objets proches (Fig.3.17).

À cause du phénomène de convolution, le profil topographique de la surface n'est pas une reproduction fidèle de celle-ci (Fig.3.18). On peut essayer de réduire ce problème en utilisant des pointes avec des rayons de courbure petits. Pour les mesures faites avec l'ADN, le rayon de courbure des pointes utilisées est généralement inférieur à 5 nm.

Un autre paramètre qui influence la formation des images est l'interaction entre la pointe et l'échantillon. Ainsi, quand on image dans l'air, les forces capillaires d'attraction (force de Laplace) dues au film d'eau entre la pointe et l'échantillon peuvent générer des forces d'attraction gigantesques à cette échelle qui peuvent atteindre jusqu'à une centaine de nN [264, 265, 259, 266]. On peut contrôler et réduire ces forces à 1-10nN en contrôlant l'humidité de l'air. Les forces attractives de type Van der Waals peuvent aussi être équilibrées par des forces répulsives

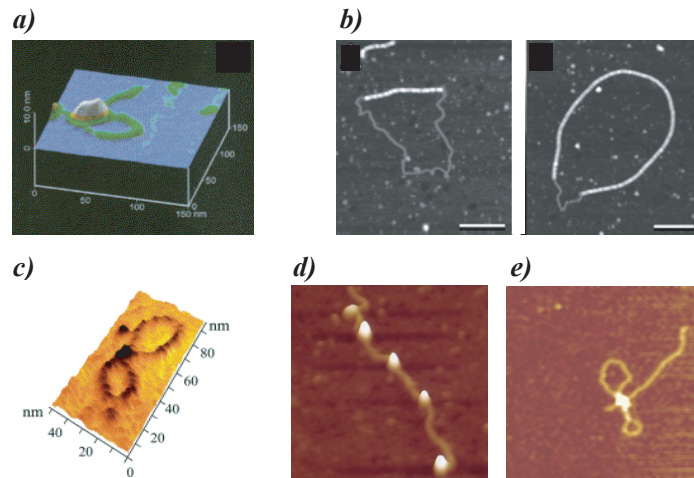


FIG. 3.19 – *Exemples de systèmes ADN/protéines étudiés avec l'AFM.* a) Interaction entre l'ARN-Polymérase, le facteur σ , la protéine Greek54 et le facteur NtrCD par formation d'une boucle d'ADN [268]. b) Deux images qui montrent des complexes RecA/ADN qui se forment et recouvrent lentement un plasmide. Ces deux images sont prises après 30 (à gauche) et 45 minutes (à droite) [269]. c) Boucle d'ADN formée par les protéines GalR et HU dans le promoteur du galactose [270]. d) ADN avec des nucléosomes qui montre la structure en collier de perles [271]. e) La translocation de l'ADN par l'enzyme de restriction EcoR124I [272].

électrostatiques entre les atomes de l'échantillon et ceux de la pointe [267].

Ces dernières années, les techniques basées sur l'AFM ont été utilisées pour imager les surfaces cellulaires. L'AFM est pour le moment la seule technique qui permette d'imager la surface d'une cellule vivante à haute résolution et en temps réel. L'AFM a aussi été utilisé pour étudier la croissance cellulaire, les événements de bourgeonnement et les changements de la morphologie de la surface après un traitement avec des agents externes (enzymes ou antibiotiques). L'AFM est aussi une bonne méthode pour explorer les membranes, et en particulier les membranes recouvertes de protéines. Des changements conformationnels de protéines sur ce substrat peuvent être facilement résolus [273]. L'AFM a été utilisé pour tirer sur la chromatine, et déterminer les forces nécessaires pour casser la liaison entre ADN et histones. Il a aussi été utilisé pour caractériser la géométrie et les relations spatiales de plusieurs complexes nucléo-protéiques aussi bien spécifiques que non-spécifiques [274, 275, 276, 277] et des protéines qui induisent une courbure dans l'ADN [278], ou un changement de son degré d'enroulement [279, 280].

3.7.1 Montage expérimental

Le microscope utilisé pour prendre les images est un microscope Multimode Nanoscope IV de Digital Instruments. Toutes les images sont prises dans l'air. Pour contrôler l'humidité de l'air, le microscope a été mis dans une chambre en plexiglas, dans laquelle règne une atmosphère saturée en azote permettant d'éliminer chaque trace d'eau de la surface de mica et de réduire ainsi la force de Laplace entre pointe et échantillon, ce qui améliore les images obtenues [281]. Les images ont été acquises en "tapping-mode", avec une fréquence d'oscillation



FIG. 3.20 – *Le microscope Multimode Nanoscope IV de la Digital Instruments utilisé pour obtenir les images.*

comprise entre 200 – 400 kHz et une amplitude d'oscillation de 5 – 10 nm. La vitesse de balayage était de 1.35 Hz à 1.48 Hz. La dimension des images prises était de 500×500 nm, $4 \times 1 \mu\text{m}$, $3 \times 1 \mu\text{m}$, $2 \times 1 \mu\text{m}$ et $1 \times 1 \mu\text{m}$, avec une résolution de l'ordre de 512×512 points, 4096×1024 points, 3072×1024 points, 2048×1024 points et 1024×1024 points.

3.7.2 Dépôt d'ADN sur le mica

Une goutte de solution contenant de l'ADN dilué, seul ou incubé avec la protéine, est déposée sur le mica fonctionnalisé. Le mica est fonctionnalisé avec de la poly-L-orнитine (Sigma St. Louis, MO) ayant un poids moléculaire de 35000 Da. La poly-L-Ornitine est un polypeptide chargé positivement avec une moyenne de 300 charges positives par molécule. La concentration de polyornitine utilisée est de 10 ng/ml. C'est un bon substrat pour le dépôt de l'ADN, parce qu'il permet une liaison stable avec un bon contraste et une rugosité moyenne égale à 0.15 nm. La molécule d'ADN utilisée est obtenue par PCR sur une molécule de 891pb. Le processus de transfert de l'ADN à la surface est gouverné par la diffusion. La fraction de molécules qui se lie à la surface $n_F(t)$ à un temps t croit comme \sqrt{t} . Il est donc possible de contrôler le nombre de molécules déposées sur la surface. Le mica est ensuite rincé avec de l'eau doublement distillée qualité HPLC. Pour le protocole détaillé de dépôt de l'ADN, voir les annexes.

3.7.3 Analyse des images

Pour éliminer la courbure de l'image (due aux non-linéarités du balayage) et pour améliorer le contraste et diminuer le bruit, les images AFM sont "aplaties" en soustrayant une courbe de

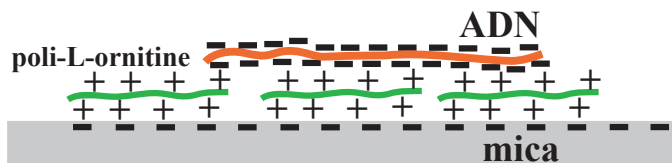


FIG. 3.21 – *Schéma qui montre la fonctionnalisation du mica utilisé pour déposer les molécules d'ADN. Le mica clivé (chargé négativement) est recouvert de poly-L-ornitine (qui présente en moyenne 300 charges positives par molécule). De cette façon, on forme une couche de charges positives sur laquelle les molécules d'ADN peuvent facilement venir se fixer.*

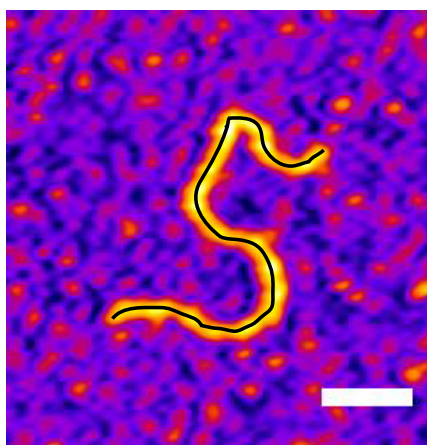


FIG. 3.22 – *Analyse de la longueur d'une molécule d'ADN. On suit le contour de la molécule (tracé avec le programme open source ImageJ). La longueur de contour des molécules d'ADN ainsi estimée est ensuite analysée de façon statistique.*

premier ou de deuxième degré de chaque ligne de l'image. Ces images corrigées sont ensuite analysées avec le programme open source ImageJ. Ce programme permet de déterminer le contour des molécules d'ADN et leur longueur. L'historgramme représentant la distribution des longueurs de contour des molécules d'ADN est à la base de l'analyse des données obtenues par AFM.

Résultats expérimentaux

Chapitre 4

Étude des mécanismes d'action des facteurs de remodelage RSC et ISWI

Les études biochimiques effectuées en volume ont montré que les facteurs de remodelage de la chromatine peuvent influencer la position des nucléosomes le long de la molécule d'ADN, transférer les octamères d'histones d'une molécule d'ADN à une autre, et générer tout une série d'intermédiaires de la chromatine remodelée. Si certaines conséquences de cette activité (comme la translocation et l'introduction de torsion dans l'ADN) commencent à être caractérisées, le vrai mécanisme d'action de cette famille de protéines reste largement inconnu. Les expériences en molécule unique, utilisant des techniques de micromanipulation telles que les pinces magnétiques, ou des techniques de visualisation comme l'AFM, offrent une nouvelle approche pour étudier le fonctionnement mécanique et cinétique de ces enzymes. Dans la première partie de ce chapitre nous revenons sur le formalisme topologique et le comportement de l'ADN sous torsion. Ceci facilitera l'analyse et la compréhension des données expérimentales présentées en deuxième partie de ce chapitre.

4.1 Formalisme topologique

On sait depuis 1953 que la molécule d'ADN en solution est composée de deux brins qui s'enroulent pour former une hélice droite caractérisée par un pas hélical de 10.5 paires de base correspondant à une distance de 3.6 nm. Le fait que les deux brins d'ADN sont enroulés l'un autour de l'autre implique qu'il est impossible de les séparer sans introduire de coupures dans leur squelette sucre-phosphate et forcer le passage d'un brin à travers l'autre. On peut définir l'indice d'enlacement de la molécule (ou linking number L_k comme le nombre de fois qu'il faut couper la molécule d'ADN et effectuer le passage des brins qui constituent la molécule d'ADN pour arriver à les séparer (voir Fig.4.1). On dit que la molécule d'ADN est dans un état relâché si son indice d'enlacement L_k est égal à l'indice d'enlacement naturel L_{k0} défini par la relation suivante :

$$L_{K0} \equiv \frac{N}{h} \quad (4.1)$$

où N est le nombre de paires de base de la molécule et h le pas hélical de la molécule.

Pour caractériser l'état d'enroulement d'une molécule d'ADN, deux grandeurs entrent en compte : la torsade ou Twist T_W et la vrille ou Writhe W_r . La torsade représente le nombre

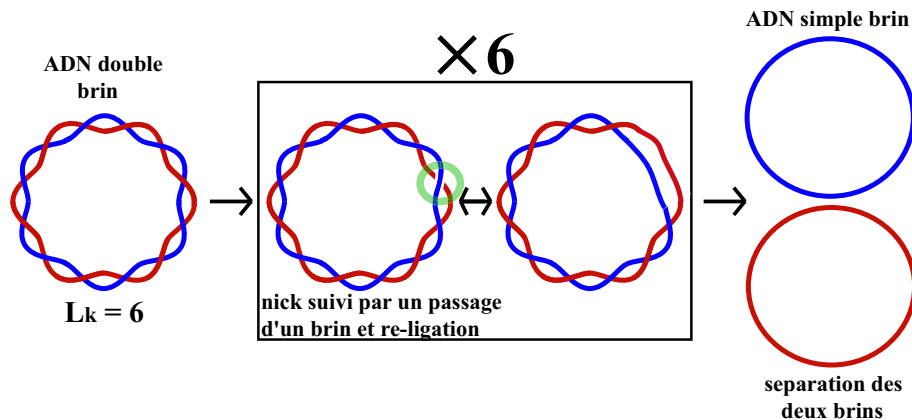


FIG. 4.1 – Schéma montrant une molécule d'ADN circulaire ayant un indice d'enlacement L_{k_0} égal à 6. Une valeur de $L_{k_0} = 6$ signifie que la molécule d'ADN a 6 tours hélice double brin ou 6 croisements hélice. Si on veut séparer les deux brins de cette molécule d'ADN, on doit effectuer 6 fois une cassure d'un des deux brins de la molécule, forcer ensuite le passage de l'autre brin d'ADN par la cassure et liguer enfin le brin cassé.

de tours qu'effectue un simple brin d'ADN autour de l'autre brin. Pour une molécule d'ADN relâché, le T_W est égal au nombre d'enlacement L_{k_0} :

$$T_W = T_{W0} = L_{k_0} = \frac{N}{h} \quad (4.2)$$

où T_{W0} s'appelle la torsade spontanée de la molécule d'ADN.

La vrille représente le nombre de croisements de l'axe de la molécule avec lui-même. Elle mesure les structures tertiaires de la molécule. Pour une molécule relâchée, $W_r = 0$.

En 1969, White a démontré (théorème de White) que le nombre d'enlacement L_k est un invariant topologique qui comptabilise le nombre total de croisements des deux brins de la molécule [282] :

$$L_k = T_W + W_r. \quad (4.3)$$

Un ADN est dit surenroulé lorsque $L_k \neq L_{k_0}$, c'est à dire lorsque la molécule présente un excès ou un déficit d'enlacements par rapport à sa forme torsionnellement relâchée. La variation du nombre d'enlacements de la molécule est donc donnée par la relation suivante :

$$\Delta L_k = L_k - L_{k_0} = \Delta T_W + W_r. \quad (4.4)$$

En normalisant par rapport au nombre d'enlacements naturels de l'ADN (L_{k_0}), on obtient la densité de surenroulement σ :

$$\sigma \equiv \Delta L_k / L_{k_0}. \quad (4.5)$$

Cette façon de normaliser le nombre d'enlacements d'un ADN permet de comparer des molécules de longueurs différentes. σ est positif lorsque l'ADN est surenroulé et négatif lorsqu'il est sousenroulé.

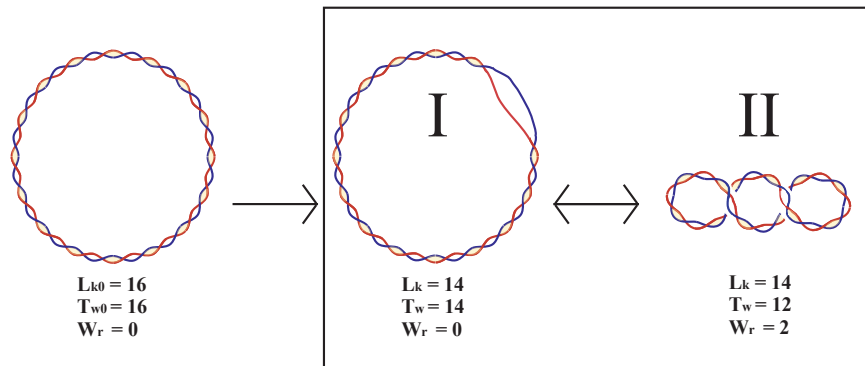


FIG. 4.2 – Schéma démontrant les effets induits par un changement de l'indice d'enlacements (L_k) dans la molécule d'ADN. Si on enlève 2 tours d'hélice à une molécule circulaire, on aura dans la molécule une variation de L_k égale à 2. D'après le théorème de White, on peut répartir cette variation entre la torsade et dans la vrille de l'ADN. On peut donc former une molécule d'ADN surenroulé avec un réduction de la torsade de deux unités (I) ou une augmentation de la vrille de l'ADN de la même quantité (II).

L'ADN est généralement superenroulé *in vivo*, ayant un σ compris entre -0.03 et -0.09 [283] (Fig.4.3).

Le nombre d'enlacements est un invariant du système. Si des tours sont introduits (ou enlevés) dans une molécule d'ADN, le changement topologique intervenant dans la molécule se répartit entre W_r et T_w (voir Fig.2). Un changement dans l'un implique un changement compensatoire dans l'autre comme expliqué dans la figure 4.2. En étudiant des molécules d'ADN sur des clichés de microscopie électronique, on a pu évaluer que le rapport $\Delta T_w/W_r$ vaut environ 1/3 [284].

4.2 Comportement de l'ADN sous torsion

Les formules présentées précédemment s'appliquent généralement aux molécules d'ADN circulaires. Mais elles peuvent être appliquées également au cas de molécules d'ADN linéaires, si leurs extrémités sont bloquées en rotation. C'est le cas des molécules d'ADN utilisées dans certaines expériences de micromanipulation par pinces magnétiques. Dans celles-ci les molécules d'ADN sont ancrées en de multiples points à une surface de verre d'une part et à une bille magnétique d'autre part. Elles sont donc bloquées en torsion. L'indice d'enlacements est contrôlé par le nombre de tours de rotation (n) de la microbille : $\Delta L_k = n$.

Le comportement de molécules d'ADN micro-manipulées en torsion a été décrit dans plu-

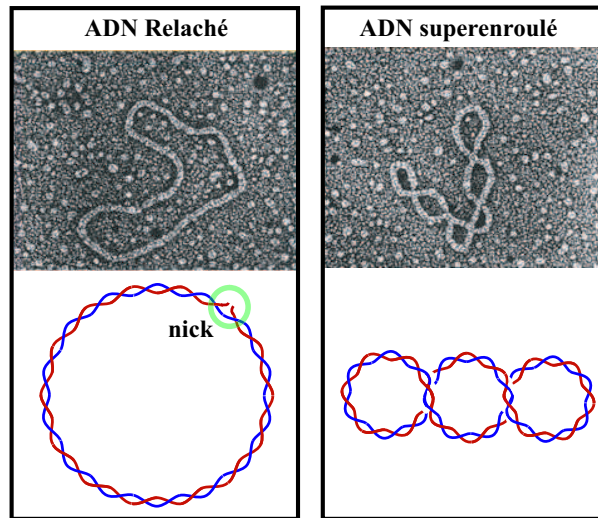


FIG. 4.3 – Clichés de microscopie électronique montrant deux molécules d'ADN circulaires extraites d'*E. coli*. Si on observe l'ADN après extraction, on remarque deux états topologiques différents : un ADN relâché suite à une cassure simple brin et un ADN sousenroulé caractérisé par la présence de plectonèmes.

sieurs travaux [235, 285]. Je rappellerai ici quelques idées essentielles pour comprendre les transitions structurelles induites par l'introduction de torsion dans les expériences de micro-manipulation.

Dans la figure 4 on peut voir des courbes typiques d'extension en fonction du nombre de tours n obtenus à différentes forces. On peut expliquer le comportement de chaque courbe en considérant le théorème de White (eq.4.4).

A basse force (< 0.5 pN), on observe des réductions rapides et régulières de la longueur de la molécule d'ADN qui s'expliquent par la formation de plectonèmes, structures observées par microscopie électronique sur des plasmides sousenroulés (Fig.3). Ces plectonèmes sont des structures qui permettent d'emmagasiner la contrainte de torsion sous forme de vrillage Wr . Ainsi, l'excès ($L_k > L_{k0}, n > 0$) ou le déficit ($L_k < L_{k0}, n < 0$) de supertours est emmagasiné dans ces plectonèmes où l'ADN est courbé plutôt que tordu.

Si on monte en force ($F > 1$ pN) ces courbes deviennent asymétriques : l'extension de l'ADN ne se réduit plus lorsque la molécule est sousenroulée ($\Delta L_k < 0$). Il n'y a donc pas formation de plectonèmes, et $Wr \approx 0$. Par conservation du nombre d'enlacement, on peut en conclure que $\Delta T_w < 0$. L'accumulation de tours négatifs dans la molécule favorise l'ouverture de la double hélice en formant des bulles de dénaturation localisées dans les régions riches en AT de l'ADN. Par contre en surenroulant la molécule d'ADN ($\Delta L_k > 0$), on observe toujours une réduction de extension de l'ADN passé un certain nombre de tours : n_C . Pour $n < n_C$ on a un régime où le système est soumis à une torsion pure $\Delta T_w > 0$. Dans ce régime chaque tour change le nombre d'enlacements en augmentant le nombre de torsade T_W et en accumulant de l'énergie de torsion. Au delà d'un certain seuil de tours introduits n_C (valeur qui dépend de la force appliquée sur la molécule d'ADN), la molécule flambe. Après le flambage l'extension décroît linéairement avec le nombre de tours introduits. Au delà du seuil de flambage, la molécule d'ADN forme à chaque tour un plectonème qui réduit l'extension de la molécule (en

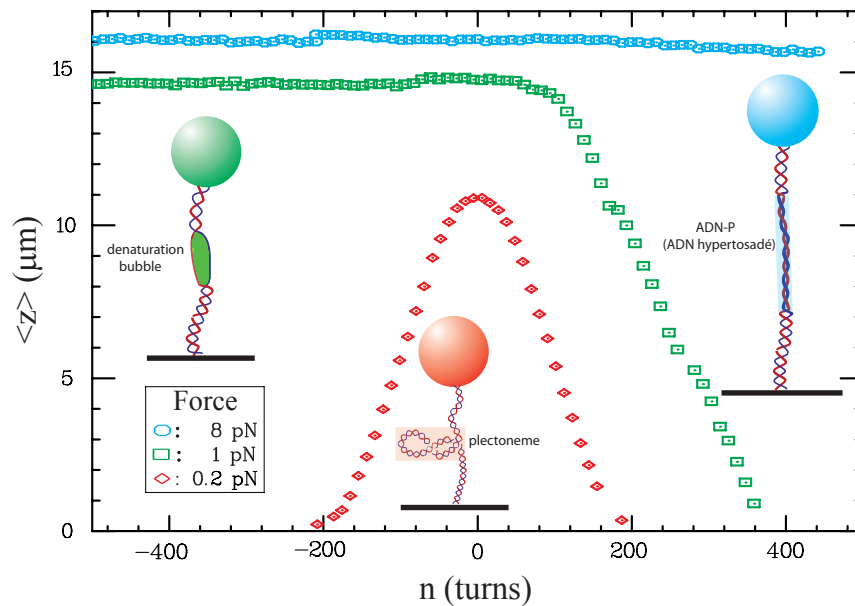


FIG. 4.4 – *Extension d'une molécule d'ADN en fonction du nombre de tours imposés à l'ADN par rotation de la bille à différentes forces (ADN- λ : 48 kb). Points rouges : $F = 0.2$ pN. L'extension décroît symétriquement pour $n > 0$ et $n < 0$. La molécule forme des plectonèmes. Points verts : $F = 1.2$ pN. L'extension diminue lorsque $n > 0$ mais reste constante pour $n < 0$. Dans ce dernier cas, l'ADN se dénature localement et forme des bulles d'ADN simple brin. Points bleus : $F = 8$ pN. L'extension de l'ADN ne varie pas beaucoup dans ce domaine. L'ADN surenroulé forme des structures localisées appelées ADN-P[286].*

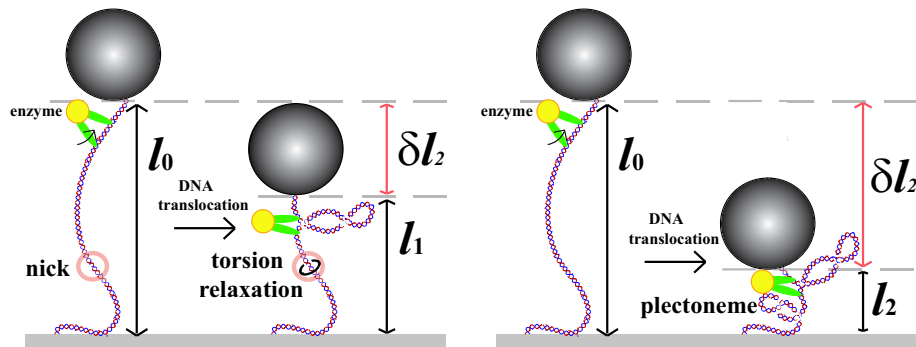


FIG. 4.5 – *Principe de la mesure avec les pinces magnétiques* Avec les pinces magnétiques, on mesure l'extension de la molécule d'ADN au cours du temps. Si l'enzyme transloque la molécule d'ADN, il formera au cours du temps des boucles d'ADN qui réduiront l'extension de l'ADN d'une quantité égale à la taille de la boucle. Si la translocation introduit aussi de la torsion, en utilisant des molécules d'ADN nickées, et donc insensibles à la torsion (schéma de gauche), il sera possible d'étudier seulement la translocation de l'enzyme. Si on utilise des molécules sensibles à la torsion (schéma de droite), une éventuelle introduction de torsion pendant la translocation d'ADN conduira à la formation de plectonèmes dans la molécule qui réduiront l'extension de l'ADN d'une valeur égale à la taille des plectonèmes formés.

variant ainsi le nombre d'enlacements par l'introduction de vrilles) et on a donc $Wr > 0$. La pente de la courbe, dans ce régime, donne la taille du plectonème.

A force élevée ($F > 5$ pN), le sous-enroulement provoque encore l'apparition de bulles de dénaturation. De plus, on remarque que l'ADN surenroulé à cette force ne se contracte pas et donc $Wr \approx 0$. L'existence d'une région hypertorsadée, baptisée ADN-P, a été confirmée par l'expérience de J-F Allemand [286].

Ces résultats montrent que la structure et la géométrie de l'ADN sont grandement affectées par la torsion qu'on lui applique. L'extension de la molécule d'ADN, à une force donnée, est directement reliée à n ($\equiv \Delta L_K$). Avec les pinces magnétiques nous pouvons imposer et mesurer en permanence l'état de super-enroulement d'une molécule d'ADN. Elles sont donc l'outil idéal pour étudier les enzymes qui modifient la topologie de l'ADN (même de façon transitoire). Comme nous le verrons par la suite ceci nous a permis d'étudier en détail l'introduction de torsion induite par la translocation de facteurs de remodelage de la chromatine.

4.3 Micromanipulation d'une seule molécule d'ADN

Dans notre montage expérimental, on mesure en temps réel l'extension d'une molécule d'ADN. L'expérience "typique" est celle de suivre la longueur d'une molécule d'ADN en imposant la force et le degré de super-enroulement (si la molécule choisie est sensible à la torsion). Si l'action de la protéine d'intérêt produit un changement de longueur de la molécule d'ADN, ce changement peut être observé en temps réel, enregistré et étudié de façon statistique. Les changements introduits par la protéine peuvent être mis en relation avec la force appliquée sur la molécule d'ADN, le degré de torsion, la présence (ou l'absence) d'un cofacteur, etc. L'action d'une protéine peut être étudiée soit en utilisant des molécules d'ADN nickées (avec une cassure simple brin, ce qui rend la molécule insensible à la torsion appliquée), ou bien en tra-

vaillant avec des molécules d'ADN enroulables (molécules d'ADN intègres). Ces dernières permettent d'étudier également l'action de protéines qui changent la topologie de l'ADN comme les topoisomérases, ou comme dans notre cas les facteurs de remodelage de la chromatine. Le principe de la mesure effectuée est illustré dans la figure 4.5.

4.4 Article : Direct observation of DNA distorsion by the RSC chromatin remodeling complex

L'article qui suit présente une étude détaillée du mécanisme d'action du complexe de la levure RSC effectué en utilisant de l'ADN nu (sans histones). Les mesures ont été effectuées pour la plupart à force suffisamment faible (typiquement $0.2 < F < 1.2pN$), pour ne pas contrecarrer l'action de la protéine, mais suffisamment forte pour limiter le bruit expérimental. Toutes les mesures ont été effectuées dans le même tampon et à la même concentration de protéines.

4.4.1 "Direct observation of DNA distortion by the RSC chromatin remodeling complex"

Direct observation of DNA distortions by the RSC chromatin remodelling complex

G.Lia⁽¹⁾, *E.Praly*⁽¹⁾, *H.Ferreira*⁽³⁾, *C.Stockdale*⁽³⁾, *Y.C.Tse-Dinh*⁽⁵⁾,
D.Dunlap⁽²⁾, *V.Croquette*⁽¹⁾, *D.Bensimon*⁽¹⁾ and *T.Owen-Hughes*⁽³⁾

(1) LPS, ENS, UMR 8550 CNRS, 24 rue Lhomond,
and Dept. of Biology ENS, 46 rue d'Ulm, 75 231 Paris Cedex 05

(2) San Raffaele Institut, 20132 Milan, Italy

(3) The Division of Gene Regulation, School of Life Sciences,
Univ. of Dundee, Dundee DD1 5EH, UK

(4) Department of Biochemistry and Molecular Biology,
New York Medical College, Valhalla, New York 10595

Abstract

The Snf2 family of proteins defines a broad class of enzyme involved in the manipulation of DNA. Here we use a magnetic trap to monitor in real time the action on a single DNA molecule of a member of this class: the RSC complex. RSC causes defined ATP-dependent transient shortenings in DNA length. Similar shortenings were also seen in AFM images of RSC-DNA complexes. These observations suggest the ATPase motor within the RSC complex translocates hundreds of base pairs of DNA in a couple of seconds resulting in the formation of a loop whose size is dependent on both the force applied to the DNA and the ATP concentration. The majority of loops, decrease in size at a rate similar to that at which they are formed suggesting that the motor has the ability to translocate in different directions. Loop formation was also associated with the generation of unconstrained negative DNA supercoiling. These observations support the idea that the ATPase motors of the Snf2 family of proteins act as DNA translocases that are specialised for the generation of transient distortions in DNA structure.

The Snf2 family of proteins contains distinctive helicase motifs that are shared by members of the Superfamily II (SFII) grouping of helicase related proteins. SFII includes bonafide double stranded DNA translocases such as the DNA translocating subunits of type I restriction enzymes [1], raising the possibility that the helicase motifs within the Snf2 protein family also function in this way. Consistent with this hypothesis, Snf2 family members have been found to alter DNA topology and displace triplex forming oligonucleotides from DNA [2–5]. In order to more directly monitor the action of a Snf2 family member, we have studied the action of the RSC chromatin remodelling complex [6] on single DNA molecules using an approach similar to one that has previously proven to be effective in the study of DNA helicases [7] and topoisomerases [8]. This involves the tethering of a 3.6 kbp DNA at one end to a glass slide and at the other to a magnetic bead. Magnets can then be used to set the force stretching the molecule and twist it. Video microscopy is used to monitor the position of the bead and provide a real time measurement of the distance of the bead from the glass surface (Schematically illustrated in Fig.1A).

In the absence of RSC, a single nicked DNA molecule undergoes restricted Brownian fluctuations (Fig.1B, Trace A). In the presence of RSC and ATP, transient reductions in the length l_n of the molecule were observed (Fig.1B, Trace B and Fig.1C, bursts 1 and 2). This change in extension δl_n was gaussian distributed (see Fig.1D) and occurred within a time τ_{on} that was exponentially distributed (see Fig.1E). At $100\mu\text{M}$ ATP and $F = 0.3$ pN, we observed an average decrease in extension of $106 \pm 7\text{nm}$ ($N = 250$ events) corresponding to approximately 440 base pairs. ATP was required for these shortenings to be detected and increasing the ATP concentration led to larger δl_n (see Fig.2A) .

Two major classes of shortening events were observed. In approximately 40% of events the reduction in the length of the DNA fragment was followed by a return to the original extension that occurred too quickly to be measured using this set-up (e.g. Fig.1C, burst 1). In the remaining 60% of events the molecule returned to its original length within a time τ_{off} similar to τ_{on} (e.g. Fig.1C, burst 2). This suggests that both τ_{on} and τ_{off} correlate with translocation by the ATPase motor. This could either occur as a result of a reversal in the orientation of translocation by a single motor (illustrated in Fig.7) or as a result of the concerted action of a complex comprising of two or more motors. Both the RSC and SWI/SNF complexes contain single copies of their catalytic Sth1 subunits [4, 9] meaning that if two motors were involved, two complexes would need to associate with the DNA molecule.

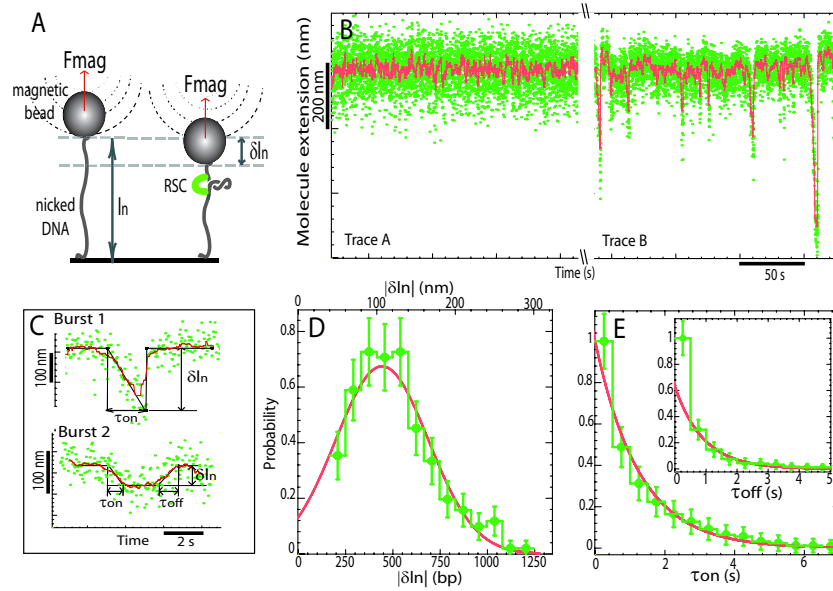


FIG. 1: Loop extrusion by RSC on a nicked DNA molecule. A) A single DNA is anchored at one end to a glass surface and at the other to a magnetic bead that is pulled by small magnets placed above the sample. We monitor the molecule's extension l_n at a fixed force ($F \approx 0.3pN$) and fixed $[ATP] = 100 \mu M$. Binding of RSC to DNA decreases its extension by δl_n . B) Time traces of the variation in DNA's extension without RSC (Trace A) and in the presence of RSC (Trace B) (non-averaged raw data (green) and averaged over 1 sec.(red)). C) Zoom on two different types of events observed with RSC (raw data (green), averaged over 1 sec.(red) and polygonal fit (black) from which we deduce δl_n , τ_{on} and τ_{off} ; see supplementary materials for data treatment). Burst 1, a slow decrease of the extension, followed after a short pause by a quick return to the original extension: $\delta l_n = 194.3 \text{ nm}$, $\tau_{on} = 2.34 \text{ s}$, $\tau_{off} = 0.04 \text{ s}$. Burst 2, a slow decrease of the extension, followed after a pause by a slow return to the original length: $\delta l_n = 46.4 \text{ nm}$, $\tau_{on} = 0.75 \text{ s}$, $\tau_{off} = 0.99 \text{ s}$. D) Histogram of the change in extension δl_n ($N = 250$ events). A gaussian fit yields: $\langle \delta l_n \rangle = -106 \pm 7 \text{ nm}$. E) Cumulative probability distributions of τ_{on} and τ_{off} for all bursts. The data for the on-times were fitted by: $P_{on}(t > \tau) = \exp(-\tau/\tau_{on})$ with $\tau_{on} = 1.26 \pm 0.11 \text{ s}$. The off-time data were fitted by: $P_{off}(t > \tau) = (1-p) \exp(-\tau/\tau_{off}) + p\delta(\tau=0)$ with $\tau_{off} = 0.91 \pm 0.15 \text{ s}$ and $p \approx 40\%$; p is the fraction of events with an off-time below the temporal resolution of our set-up ($\sim 0.5 \text{ sec}$).

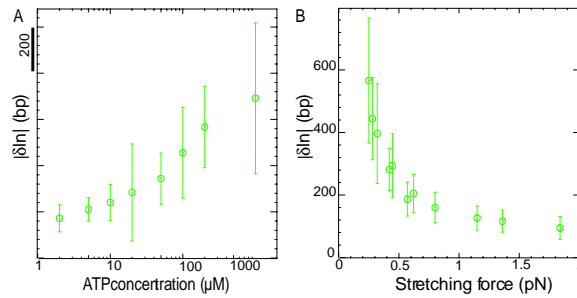


FIG. 2: Dependence of δl_n A) on ATP concentration at fixed force $F = 0.3$ pN and B) on stretching force F at fixed $[\text{ATP}] = 100 \mu\text{M}$. At large forces ($F > 1$ pN) the decrease in extension δl_n is overestimated, since we only record the few events with a size clearly larger than the noise level (with standard deviation $\sigma_n \sim 15$ nm). The error bars correspond to the standard deviation of the distribution of δl_n values.

To disfavour this, all measurements were made under conditions in which shortenings were infrequent. However, as it is not possible to directly measure the number of RSC complexes acting on a DNA molecule, we decided to investigate the effect of the RSC complex on linear DNA by Atomic Force Microscopy (AFM).

Fig.3 A, B and C show representative AFM images of respectively free RSC complex, free linear DNA and RSC complexes bound to DNA. The average diameter and maximal height of the RSC·DNA complexes were found to be identical to the values obtained for free RSC (Fig.3D) providing strong evidence for the association of a single RSC complex with DNA. When the average contour length of DNA was measured in the presence and absence of RSC and ATP, shortenings of $\delta l_n = 103$ nm ($N = 97$ events) and $\delta l_n = 132$ nm ($N = 116$

events) were observed at 2 μM and 4 μM ATP, respectively (Fig.3E). These shortenings were mostly due to the presence of ATP, as the DNA shortening observed in the absence of ATP was only 17 nm. The position of the RSC complex along DNA was also affected by the presence of ATP. Without ATP about 6% of RSC complexes (4 out of 65 events) were observed at the DNA's extremities, see Fig.3C(middle). This is slightly smaller than the $\sim 20\%$ expected for a random binding of RSC along DNA. However, in the presence of 2 μM ATP, this proportion reaches 64% of the observed complexes (62 out of 97 events). The fact that the position of RSC along DNA is significantly altered in presence of ATP suggests that a large proportion of the RSC complexes translocate along DNA. Moreover the finding that single RSC complexes are capable of generating ATP dependent shortenings similar to those observed with a magnetic trap set-up provides good evidence that in both cases single RSC complexes are responsible for the change in the DNA's extension. This supports the model illustrated in Fig.7 in which RSC translocates along the molecule while forming a loop of DNA. In that model a change in the orientation of translocation of a single motor is responsible for the ATP-dependent return to the original length. This ability to cause transient alterations in DNA topology rather than simply stall when encountering a barrier may represent an adaptation of Snf2 family proteins that assists in dynamic reconfiguration of DNA protein complexes.

Although the extent of DNA shortening observed in the AFM images and measured in the magnetic trap set-up were comparable, they were not identical. One difference between the two approaches is that in the AFM assay the RSC complex associates with an unstressed linear DNA, while in the magnetic trap experiment the DNA is maintained under a small tension (comparable to the tension existing in a naturally supercoiled DNA [10]).

To investigate how the force applied to DNA affected the action of RSC, the extent of DNA shortening was measured for different forces (at fixed $[\text{ATP}] = 100 \mu\text{M}$). The results show that the size of the average shortening event is reduced as the stretching force applied to the DNA is increased, see Fig.2B. Maximal changes in extensions $\delta l_n = 130 \pm 7 \text{ nm}$ ($N = 59$ events) were observed at the lowest force investigated ($F = 0.25 \text{ pN}$) and these decreased exponentially with the force (or the torque), with no DNA distortions being detected at forces larger than about 3 pN. The finding that force has such a strong effect on the average size of the DNA shortening events suggests that the tension (and/or torsion) the motor is working against may play a role in limiting the extent of translocation. Notice

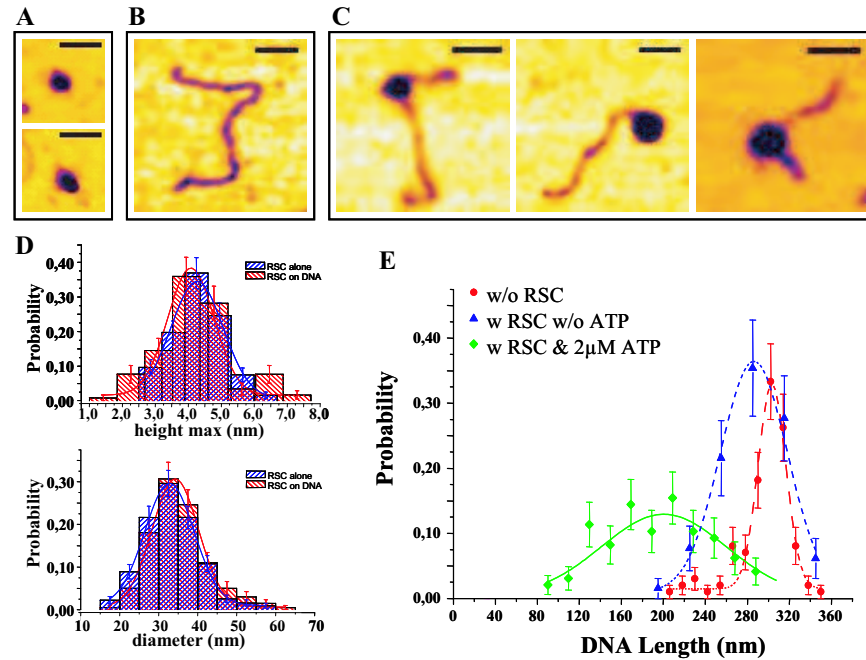


FIG. 3: AFM images of RSC complex on linear DNA molecules. A) Images of isolated RSC complexes on a mica surface. B) Image of a 891 bp linear DNA molecule. C) Three images of RSC-DNA complexes in presence of $2\mu\text{M}$ ATP - The bar is equal to 50nm. D) Histograms of the maximal height (h) and diameter (D) for isolated and DNA bound RSC complexes at $2\mu\text{M}$ ATP. The similarity of the histograms indicates that in the conditions of our experiments RSC binds to DNA as a single complex. E) Distribution of the DNA contour length l ; without RSC: $l = 303 \pm 2$ nm; with RSC but without ATP: $l = 286 \pm 5$ nm; with RSC and $2\mu\text{M}$ ATP: $l = 200 \pm 8$ nm.

also that while δl_n has a gaussian probability distribution (Fig.1D), τ_{on} is exponentially distributed (Fig.1E). The fact that δl_n and τ_{on} are described by different statistics contrasts with enzymes that have well defined translocation rates v (so that $\delta l_n = v\tau_{on}$, e.g. helicases [7], type1 restriction enzymes [11] or FtsK [12]). This different statistical behaviour can be explained if torsional load during translocation slows down the activity of the complex and determines the DNA change in extension. When the motor is working against relatively high opposing forces (or torques) there may be an increased likelihood that the translocase

disengages from DNA resulting in a rapid extension in DNA length, or engages with the opposite strand resulting in a gradual reduction in the molecule's extension.

An attractive feature of the magnetic trap is that by rotating the magnetic bead positive or negative turns can be introduced onto an unnicked DNA molecule. Such a supercoiled (sc)DNA may form plectonemes of either positive or negative chirality with a resulting significant reduction in the extension of the molecule. For example, at a force $F = 0.3$ pN the introduction of one superhelical turn results in a shortening of $l_p = 60$ nm [10]. The data presented in Figs.1 and 2 were obtained using nicked or relaxed molecules where DNA torsion does not contribute significantly to the observed shortening events. By comparing these observations to measurements made on scDNA templates it is possible to investigate whether the DNA shortening events are associated with alterations to DNA topology. Fig.4A shows that on (+)scDNA (at $[ATP]=100\mu\text{M}$) the action of the RSC complex results in a shortening of $\delta l^+ = -138 \pm 6$ nm ($N = 492$ events), while on (-)scDNA a lengthening of $\delta l^- = +259 \pm 4$ nm ($N = 221$ events) is observed. This increase in extension is most likely due to a reduction in the size of the negative plectonemes on (-)scDNA (schematically illustrated in Fig.4C).

If the action of the RSC complex results in the formation of a loop of size l_t^- that contains n^- negative supercoils, an identical number of compensatory positive supercoils must be formed outside this loop which would reduce the length of the plectonemes on (-)scDNA, causing an increase in the molecule's extension by n^-l_p . The overall change in the DNA's extension will then be $\delta l^- = l_t^- + n^-l_p = 259$ nm. Assuming that the average distance translocated by the RSC complex on (-)scDNA is the same as on a nicked molecule, $l_t^- = \delta l_n^- = -106$ nm, we deduce that $n^- = 6.1$ turns. This would indicate that (at $[ATP] = 100 \mu\text{M}$ and $F = 0.3$ pN) the RSC complex caused the generation of a loop containing approximately 400 bp of DNA with 6.1 negative superhelical turns (but as argued in the supplementary note, this should be viewed as an upper bound).

In a similar way, we can estimate the number of compensatory turns introduced on (+)scDNA considering that the overall change in the DNA's extension is: $\delta l^+ = l_t^+ - n^+l_p$. Making the same hypothesis as for (-)scDNA, i.e. $l_t^+ = \delta l_n^+ = -106$, we deduce that $n^+ = 0.6$ turns are introduced during translocation of RSC on (+)scDNA. These different results for (+) and (-) scDNA ($n^+ \neq n^-$) indicate that the (negative) torsion introduced in the DNA loop associated with RSC is affected by the overall torsion (positive or negative) in the

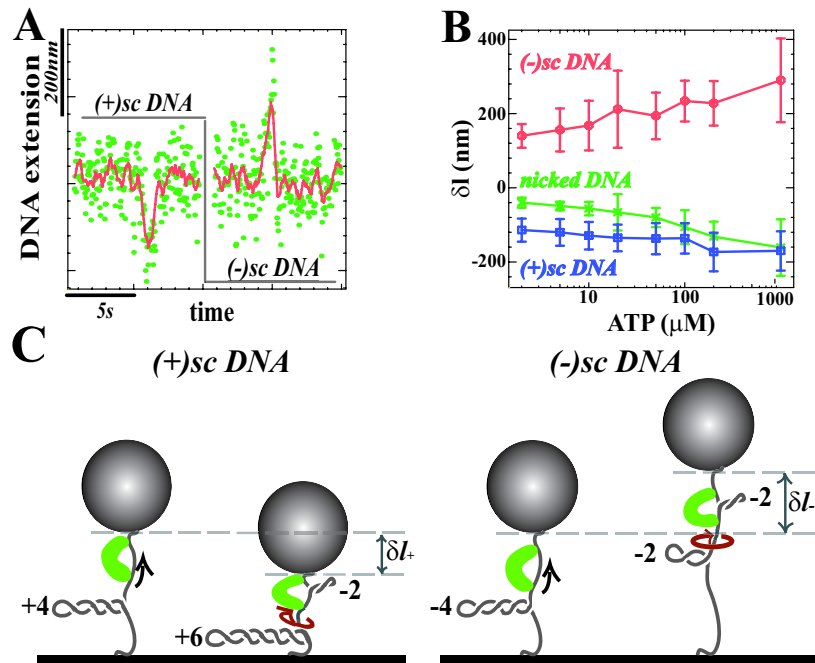


FIG. 4: Transient DNA topology changes associated with RSC translocation. A) Time traces on (+) and (-)scDNA, in presence of $100\mu\text{M}$ ATP at $F = 0.3\text{pN}$ (raw data: (green) and averaged over 1 sec.(red)). B) Dependence of δl on ATP concentration for nicked, (-)scDNA and (+)scDNA (the error bars correspond to the standard deviation of the δl distribution). C) Sketch showing the effect of twisting during RSC translocation on (+) and (-)scDNA.

remaining portion of the molecule.

RSC could generate loops of DNA containing negative supercoils either in the form of unconstrained supercoils, or in the form of constrained supercoils formed by wrapping the molecule around the RSC complex. The latter has to be given serious consideration given that DNA protruding from RSC complexes can only be seen in some of our AFM images and that another Snf2 family protein has been proposed to wrap DNA [13]. In order to distinguish between these possibilities we analysed the effect of RSC on DNA topology in bulk reactions. In the presence of E.coli Topoisomerase 1A (Topo1A), which preferentially

removes (-) supercoils, RSC caused an ATP-dependent increase in the linking number of plasmid DNA which could be detected as faster migrating bands following agarose gel electrophoresis (Fig.5A). The high mobility of these topoisomers in the presence of chloroquine indicates that (+)scDNA is generated in the presence of RSC, ATP and Topo1A (see Fig.5C lane 8). The level of positive supercoiling increases in the presence of increasing amounts of RSC complex and when RSC and Topo1A are incubated for longer times indicating that alterations to topology accumulate in the presence of RSC and ATP (Fig.5C and E). These changes to DNA topology are unlikely to require DNA molecules to be coated with many RSC complexes as they are detectable under conditions in which few RSC complexes interact with plasmid DNA, as shown by native gel shift assays (Fig.5F).

If RSC was wrapping DNA rather than forming the negatively supercoiled and freely accessible DNA loop suggested by the experiments with Topo1A, one would expect negatively supercoiled topoisomers to accumulate in the presence of vaccinia Topoisomerase 1B (which relaxes both (+) and (-)supercoils). Instead only a small proportion of both (+) and (-) supercoiled topoisomers are generated at high RSC concentrations (Fig.5B and D).

Combining these results with the single molecule measurements, we conclude that the RSC complex generates loops of negatively supercoiled DNA, accessible to topoisomerases and similar in size to the circumference of the RSC complex.

An attractive means by which RSC might generate negative superhelical loops would involve rotation associated with translocation along the helical DNA backbone. Similar effects have been observed with other DNA translocases [11, 12]. If translocation proceeded in this way by maintaining contact with each base along the DNA backbone, then it would be anticipated that one negative rotation would be generated for every 10.5 bp translocated [11]. Our observations are consistent with the introduction of negative rotation at a considerably lower rate than this, an observation that could be explained if the motion of RSC along DNA was broken down into steps of approximately 13 base pairs (or multiple thereof)[14]. Although we cannot accurately estimate the step size of the RSC complex for reasons explained in the supplementary text, our data are best explained by the progression of the RSC motor along DNA in movements slightly greater than the helical repeat. This could be an important adaptation for a translocase such as RSC that may be specialised to engage with DNA wrapped around histones. Although the magnitude of DNA distorting events may be altered during the action of RSC complexes in a nucleosomal context, the transloca-

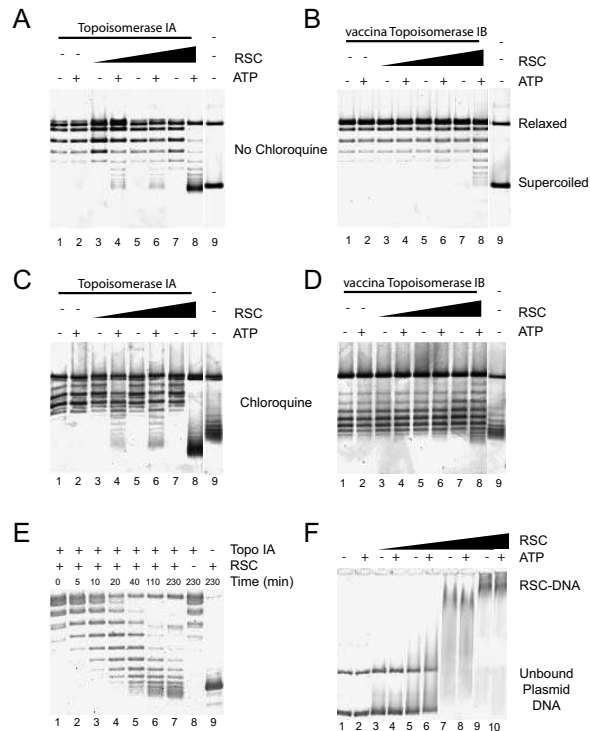


FIG. 5: Detection of unconstrained superhelical torsion in the presence of RSC. Relaxed pUC18 DNA (40ng) was incubated in the presence of recombinant E.coli Topoisomerase Ia (A, C, E) or recombinant vaccina Topoisomerase Ib (B, D), RSC and ATP as indicated for 1 hour at 30°C. RSC was present at 10nM (lanes 3 and 4), 33nM (lanes 5 and 6), 100nM (lanes 7 and 8), 300 nM (F lanes 9 and 10). Following incubation proteins were removed and topoisomers resolved by agarose gel electrophoresis. Electrophoresis was performed in the absence of chloroquine (A, B, E, F) or in the presence of 1µg/ml chloroquine (C, D). In the presence of RSC and ATP faster migrating supercoiled DNA was detected in the presence of Topoisomerase IA which selectively removes negative supercoils. The mobility of this DNA was increased rather than reduced in the presence of chloroquine indicating that this DNA is positively supercoiled (C). Little change in DNA topology was detected following incubation with RSC and vaccina Topoisomerase Ib indicating that RSC is not stably wrapped by the complex. In F, reactions were performed in the absence of topoisomerases and loaded directly onto 0.3× TBE agarose gel. This shows that the changes in topology detected in Figs. A and C were obtained under conditions in which DNA is partially bound by RSC.

tion and rotation of DNA provide two potent means of manipulating DNA structure on the surface of nucleosomes. This may be a general feature of the action of SWI/SNF related enzymes as we have observed qualitatively similar increase (decrease) of the DNA's extension on negative (positive) scDNA for the yeast SWI/SNF complex, and the catalytic subunits of the human SWI/SNF complexes: BRG1 and BRM (Fig.8 in supplementary data). The reversible force sensitive distortion of DNA illustrated schematically in Fig.7 may provide a means of manipulating DNA protein interactions that could be shared by other Snf2 family members including those functioning on non-nucleosomal substrates.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank A.Shankar for providing some of the plasmids used in these experiments, C.Bustamante for communicating to us results of a similar and complementary study on the action of RSC on stretched reconstituted chromatin and K.Neuman, O.A.Saleh, J.F. Allemand and L.Finzi for fruitful discussions. G.L. was funded by grants from the French Ministry of Foreign Affairs and the ARC. D.D. acknowledges support from the Italian Ministry of Instruction, Universities and Research. T.O-H. acknowledges support from the Wellcome Trust. Finally, D.B and V.C. acknowledge support by grants from the CNRS, the ARC and the CEE (MolSwitch).

MATERIAL AND METHODS

Sample preparation and Magnetic Tweezers experimental setup

A linear DNA fragment (≈ 3.6 kbp) was obtained with KpnI and SacI restrictions of plasmid pSA580 (gift of Sankar Adhya). Two "tails" were synthesized with biotin or digoxigenin-labeled nucleotides by a PCR of the multiple cloning site of a pBS plasmid comprising the restriction sites for KpnI and SacI. Following adequate restriction of these labelled "tails", they were ligated to the complementary ends on the linear fragment. These DNA molecules were then attached at one end to the glass surface of a microscope flow-chamber (previously coated with anti-digoxigenin) and at the other end to a $1\mu m$ paramagnetic bead (DYNAL MyOne beads coated with streptavidin). Magnetic traps [15] were used to twist and pull on single DNA molecules attached to the beads. The DNA's extension was monitored by

video microscopy of the bead[16]. By tracking the 3D position of a tethered bead [16, 17], the extension $l = \langle z \rangle$ of the molecule can be measured, with an error of $\approx 10nm$ with 1-s averaging. The horizontal motion of the bead $\langle \Delta x^2 \rangle$ allows for the determination of the stretching force via the equipartition theorem: $F = k_B T l / \langle \Delta x^2 \rangle$. F was measured with 10% accuracy. To eliminate microscope drift, differential tracking was performed via a second bead glued to the surface. All experiments were performed in the reaction buffer: 50mM *KCl*, 10mM *HEPES* (pH 7.8), 3mM *MgCl₂*, 0.1mM *DTT* and 60 μ M *BSA*.

Protein Purification

RSC, BRG1 and Brm were purified as previously described ([4, 18]).

Data Processing

The determination of the change in extension of a DNA molecule due to its interaction with RSC as well as the measurement of τ_{on} and τ_{off} requires the recording and processing of the elongation versus time signal $l(t)$. Each burst is fitted to a polygon defined by its 6 vertices: l_i, t_i ($i=1, \dots, 6$), see Fig.1C. Of the polygon's five segments, three are set to be horizontal ones (segments 1,3 and 5) and we further require: $l_1 = l_2 = l_5 = l_6$. Segments 1 and 3 are followed by a shortening (or lengthening) event (segments 2 and 4). The coordinates of the polygon vertices were adjusted to minimize the fitting error (χ^2 test) [19]. The decrease in extension is: $\delta l_n = l_3 - l_2 = l_4 - l_5$; the on-time: $\tau_{on} = t_3 - t_2$ and the off-time: $\tau_{off} = t_5 - t_4$. The change in extension δl_n can be given in base pairs using the formula: $\delta l_n(bp) = N_0 \delta l_n(nm) / l_n(F)$ where $l_n(F)$ is the extension at force F of a DNA molecule of N_0 bps (measured or computed from the Worm like Chain model [20]).

AFM

A 891 bp linear DNA was synthesized by PCR amplification of a segment of the plasmid pOid-O1 (gift of Sankar Adhya). It was purified with Qiagen PCR purification kit. $\approx 100ng$ of this DNA was incubated for 8 minutes with equimolar amount of RSC complex in the reaction buffer (without BSA and with or without ATP). Following incubation, 10–20 μ l were

deposited at room temperature on freshly cleaved mica (Ted Pella Inc., Redding, California) coated with poly-L-ornitine (MW 49,000 Sigma St. Louis, MO) for 2 – 3 minutes. The mica was then gently washed with 1ml of ddH₂O (Sigma) and subsequently dried with nitrogen. The sample was imaged in air with a NanoScope III (Digital Instruments) atomic force microscope operating in tapping mode. The AFM images were analysed with the Open source program ImageJ to determine the DNA countour length and RSC diameter and with the program WSxM (Nanotech, Inc.) to determine the complex heights.

Topoisomerase assays

Assays were performed in 40 μ l of 10mM HEPES (pH 7.8), 50mM KCl, and 3mM MgCl₂. Where indicated Mg:ATP was present at 1mM. Reactions contained 40ng relaxed pUC18 DNA, topoisomerase and RSC as indicated. One unit of recombinant vaccina topoisomerase Ib or E.coli topoisomerase Ia were included in reactions as indicated (1 unit defined as the ammount of enzyme required to relax 20ng supercoiled pUC18 DNA in 2 minutes under the reaction conditions described above). Reactions were terminated by addition of 10 μ l 50mM Tris (pH 7.5), 3% SDS, 100mM EDTA, 100 μ g/ml Proteinase K and incubated for 1 hour at room temperature. Products were resolved by electrophoresis in 1% Agaraose TBE gels with or without chloroquine (1 μ g/ml) as indicated. DNA was detected using a scanning fluorimeter following staining with Sybr gold (Molecular Probes). For gel shift analysis reactions performed in the absence of topoisomerase were loaded directly onto 0.3 \times TBE 1% agarose gels at 4°C.

SUPPLEMENTARY NOTE

The equation $\delta l^\pm = l_t^\pm \mp n^\pm l_p$ (with $l_t^\pm < 0$ and $n^\pm > 0$) applies to (\pm)scDNA templates. Since (at [ATP] =100 μ M and $F = 0.3$ pN) $\delta l^+ = -138 \pm 6$ nm and $\delta l^- = +259 \pm 4$ nm, l_t^\pm or n^\pm (or both) must be different on the different templates studied. There are a number of possible explanations for this. One possibility is that l_t^\pm changes on (\pm)scDNA templates. Supporting this, on (-)scDNA the total change in extension observed δl^- is in the same direction as the applied force whereas on (+)scDNA the contraction works against this force. The measurements on nicked DNA molecules at different forces indicate that $|l_n|$ decreases

with increasing work against the force(Fig.2). This would imply that $l_t^- \leq \delta l_n \leq l_t^+ < 0$. Another explanation is that n^\pm is altered, either as a result of changes to the step sizes on different templates or as a result of differences in the amount of slippage that occurs during translocation. Although we cannot calculate whether n^\pm , l_t^\pm or a combination of both are changed we can obtain useful bounds, see Fig.6. For example the degree of supercoiling in the loop formed by RSC on (-)scDNA (at $100\mu M ATP$) is bounded from above by:

$$|\sigma^-| \equiv \frac{n^-}{|l_t^-|} h = \frac{\delta l^- / |l_t^-| + 1}{l_p} h < \frac{\delta l^- / |\delta l_n| + 1}{l_p} h = 0.21$$

On the other hand, since $\delta l^- > 0$, $|\sigma^-|$ is also bounded from below: $|\sigma^-| > h/l_p = 0.060$, where $h = 3.6\text{nm}$ is the DNA pitch. These bounds imply that RSC generates much less than one turn per every 10.5 bps of (-)scDNA translocated, but enough torsion in the loop to induce its partial melting (which occurs when $\sigma^- < -0.06$). This remark is consistent with observations of cruciform extrusion by the action of some chromatin remodeling factors on DNA[2].

-
- [1] K. Firman and M.D. Szczelkun. Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement. *EMBO J.*, 19:2094–2102, 2000.
 - [2] M. Phelan R. Kingston P.A. Wade D.M. Lilley K. Havas, A. Flaus and T. Owen-Hughes. Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103:1133–1142, 2000.
 - [3] S. Van Komen, G. Petukhova, S. Sigurdsson, S. Stratton, and P. Sung. Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54. *Mol. Cell*, 6:563–572, 2000.
 - [4] A. Saha, J. Wittmeyer, and B.R. Cairns. Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev.*, 16:2120–2134, 2002.
 - [5] A. Flaus M.D. Szczelkun I. Whitehouse, C. Stockdale and T. Owen-Hughes. Evidence for DNA translocation by the ISWI chromatin-remodeling enzyme. *Mol Cell Biol.*, 23(6):1935–1945, 2003.
 - [6] Y. Li M. Zhang L. Lacomis H. Erdjument-Bromage P. Tempst J. Du B. Laurent B.R. Cairns, Y. Lorch and R.D. Kornberg. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87:1249–1260, 1996.

- [7] M.N. Dessinges, T. Lionnet X.G. Xi, D. Bensimon, and V. Croquette. Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:6439–6444, 2004.
- [8] T.R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404:901–904, 2000.
- [9] J.F. Flanagan C.L. Woodcock C.L. Smith, R. Horowitz-Scherer and C.L. Peterson. Structural analysis of yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat. Struct. Biol.*, 10:141–145, 2003.
- [10] G. Charvin, J.F. Allemand, T.R. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. Twisting DNA: single molecule studies. *Contemp. Phys.*, 45:383–403, 2004.
- [11] R. Seidel, J. van Noort, C. van der Scheer, J.G. Bloom, N.H. Dekker, C.F. Dutta, A. Blundell, T. Robinson, K. Firman, and C. Dekker. Real-time observation of DNA translocation by the type I restriction modification enzyme EcoR124I. *Nat. Struct. Biol.*, 11:838–843, 2004.
- [12] O.A. Saleh, C. Perals, F.X. Barre, and J.F. Allemand. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J.*, 23:2430–2439, 2004.
- [13] N. Beerens, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar W. Vermeulen, and C. Wyman. The CSB protein actively wraps DNA. *J. Biol. Chem.*, 280:4722–4729, 2005.
- [14] O.A. Saleh, S. Bigot, F.X. Barre, and J.F. Allemand. Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12:436–440, 2005.
- [15] T. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74:2016–2028, 1998.
- [16] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.*, 82:3314–3329, 2002.
- [17] D. Bensimon A. Bensimon T. Strick, J.F. Allemand and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271:1835–1837, 1996.
- [18] G.J. Narlikar M.L. Phelan, S. Sif and R.E. Kingston. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol. Cell*, 3:247–253, 1999.
- [19] D. Bensimon B. Maier and V. Croquette. Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(22):12002–12007, 2000.
- [20] T.R. Strick, M-N. Dessinges, G. Charvin, N. Dekker, J-F. Allemand, D. Bensimon, and

V. Croquette. Stretching of macromolecules and proteins. *Reports on Progress in Physics*, 66:1–45, 2003.

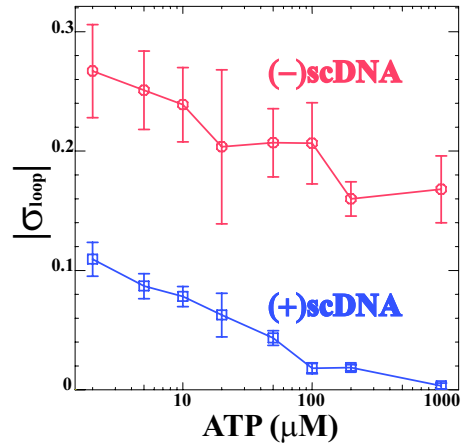


FIG. 6: Supercoiling degree inside the translocated DNA loop $|\sigma_{loop}|$ as a function of ATP, computed from the measurements of δl_n , δl^+ and δl^- , see Fig.4B, assuming $l_t^\pm = \delta l_n$, see supplementary note for details. For (-)scDNA the value displayed is an upper bound on the degree of supercoiling in the loop.

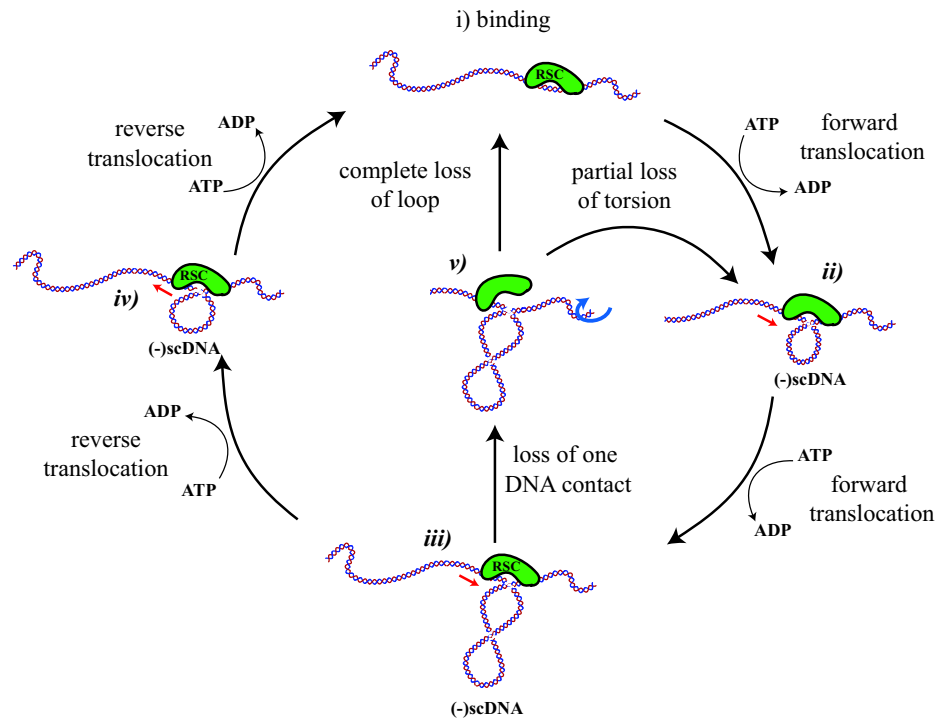


FIG. 7: Model for DNA distortion by RSC. In order to form loops on DNA, the RSC complex must make at least two contacts with DNA. If one of these contacts is capable of DNA translocation, DNA could be drawn into a loop in the presence of ATP as shown in i)-iii). Once formed we observe that the majority of loops are removed in an ATP-dependent reaction that could occur as a result of translocation in the reverse orientation iii), iv) and i). In some cases we observe loops collapsing rapidly. This could occur if either the translocase disengages or another contact constraining DNA is lost iii), v), i). In this latter case the translocase would be likely to restart the cycle at a different location on the DNA fragment. As we observe differences in the degree of supercoiling under different conditions, it is likely that in some cases torsion could be partially lost as a result of slippage, v)-ii), similar to what has been reported for other translocases[14].

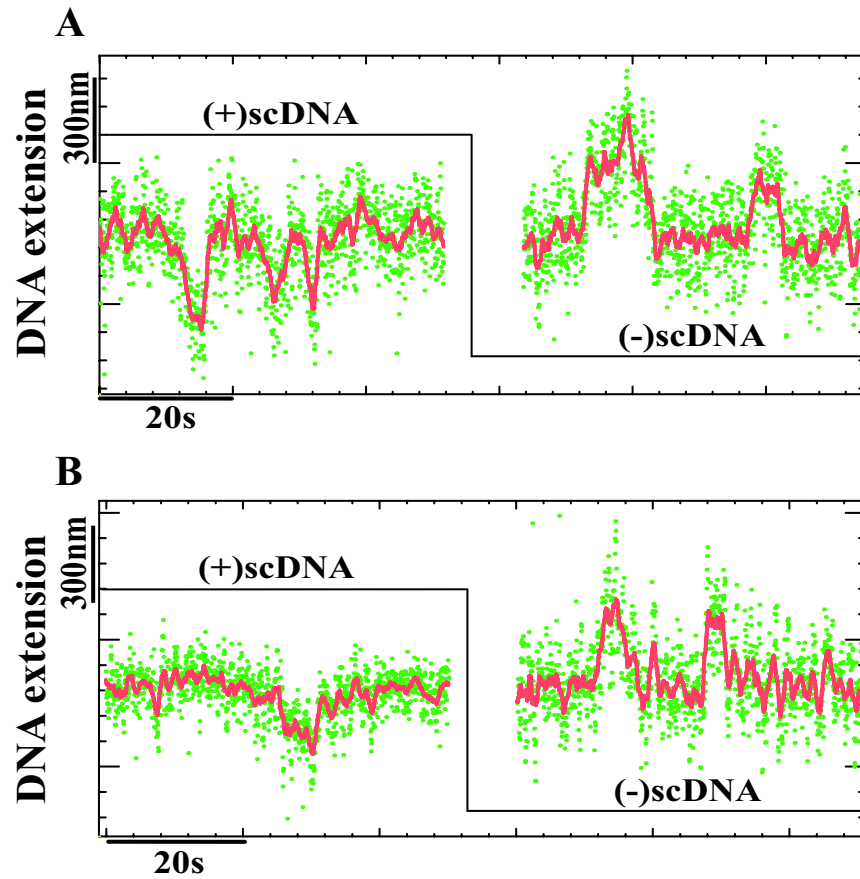


FIG. 8: Transient DNA topology changes associated with the human SWI/SNF ATPase: (A)BRG1 and (B) hBRM. Time traces on positive and negative supercoiled DNA, in presence of $250\mu\text{M}ATP$ for BRG1 and $1\text{m}ATP$ for hBRM at $F = 0.5\text{pN}$ (raw data (green), raw data averaged over 1sec. (red)).

Résumé des résultats obtenus avec RSC

RSC est un moteur moléculaire qui transloque une boucle d'ADN sousenroulé dont la formation est ATP-dépendante.

Cete translocation peut être réversible : le moteur peut changer direction de translocation et défaire activement la boucle.

La taille de la boucle formée dépend de la concentration d'ATP utilisée, et les distributions de taille sont distribuées de façon gaussienne.

La force affecte la formation de la boucle de façon exponentielle, et aucune boucle d'ADN n'a été observée au delà de $\sim 3pN$.

La translocation de l'ADN introduit transitoirement des changements du nombre d'enlacements de la molécule d'ADN.

Le nombre de tours introduits est différent dans le cas de l'ADN sousenroulé et surenroulé, ceci peut être dû à un phénomène de relaxation partiel (slippage) du degré de surenroulement de la boucle formée, phénomène dont l'amplitude pourrait dépendre de la topologie de l'ADN.

Les images AFM montrent que RSC transloque l'ADN surenroulé en présence d'ATP, et que la position relative du complexe change après la translocation.

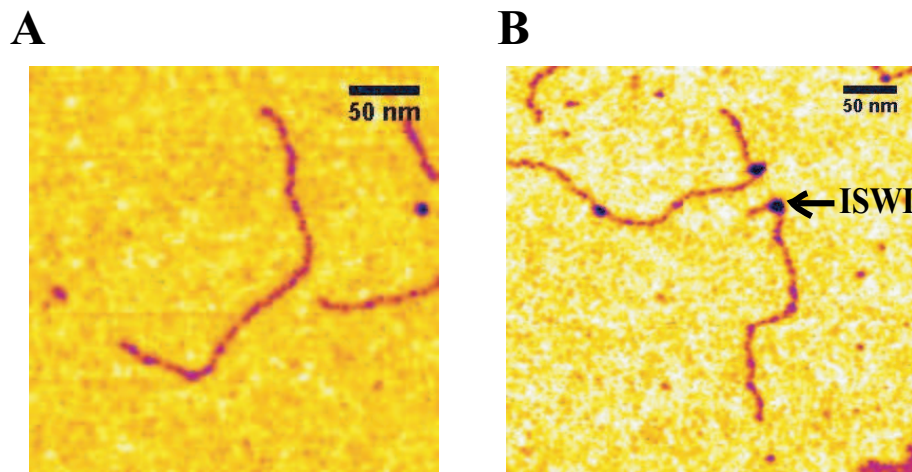


FIG. 4.6 – Deux images AFM obtenues en présence ou en absence d'ISWI, sans ATP. A) Image d'une molécule d'ADN. B) Image de deux molécules d'ADN en présence de la protéine ISWI.

4.5 Expériences avec la protéine ISWI

4.5.1 AFM

4.5.2 Étude de l'accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN linéaire nu

Comme pour le complexe RSC, on a étudié l'accrochage de la protéine ISWI sur des molécules linéaires d'ADN (891 bp) à l'aide d'un AFM, ce qui permet une visualisation directe du complexe nucléoprotéique. Dans la Fig.4.6 on peut voir des images correspondant à l'ADN nu et au complexe ISWI/ADN. On n'observe pas de changements structurels dans la molécule d'ADN. Par contre si on mesure la longueur des molécules d'ADN sans et avec ISWI, on trouve qu'en présence de la protéine, l'extension est réduite de presque 40 nm (Fig.4.7C). On peut voir aussi dans la figure 4.7A que l'ADN entre et sort du complexe nucléoprotéique avec un angle qui est égal à 121° (Fig.4.7B). En analysant la hauteur et le diamètre du complexe ISWI sur l'ADN (Fig.8), on observe des changements par rapport à la protéine isolée. On observe que la hauteur passe de 0.94 ± 0.03 nm à 1.18 ± 0.02 nm sur l'ADN, et le diamètre passe de 7.83 ± 0.13 nm à 11.15 ± 0.26 nm. Cette réduction en longueur de la molécule d'ADN, et surtout l'augmentation du diamètre de la protéine est compatible avec un enroulement de la molécule d'ADN autour de l'enzyme, en formant ainsi un complexe nucléoprotéique similaire aux histones.

4.5.3 Translocation d'ISWI sur l'ADN linéaire en présence d'ATP

On a ensuite pris des images du complexe ISWI/ADN en présence de $25 \mu\text{M}$ ATP. Comme on peut le voir sur les figures 4.9A et B, des boucles d'ADN émergent du complexe, comme on s'y attend pour une enzyme qui transloque l'ADN. On remarque que deux topologies de boucle ont été observées : des boucles relâchées et des boucles superenroulées. Généralement les boucles relâchées sont associées aux complexes localisés aux extrémités de la molécule d'ADN, et les superenroulés aux complexes localisés à l'intérieur de la molécule d'ADN. On a mesuré la taille de la boucle associée à ISWI, et on a trouvé qu'elle faisait $\cong 100$ nm (Fig.4.9C).

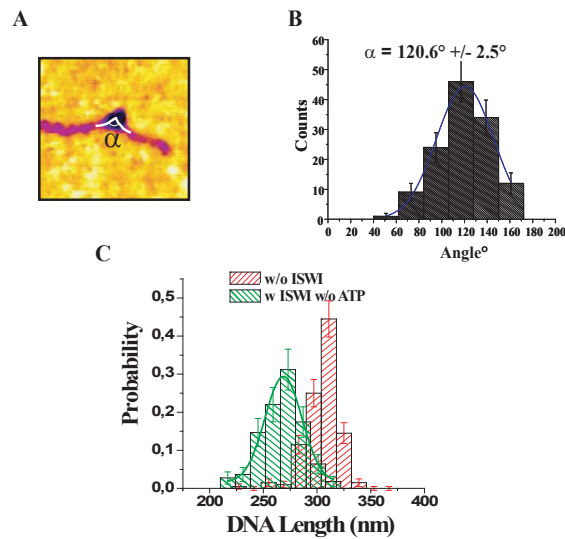


FIG. 4.7 – *Mesure des angles entre les segments d'ADN à l'entrée et à la sortie du complexe et mesure des longueurs des molécules d'ADN.* A) Image AFM du complexe ISWI/ADN sans ATP. L'ADN entre et sort du complexe avec un angle α . B) Histogramme de l'angle α . C) Longueurs observées de l'ADN en présence et en absence d'ISWI. Longueur sans ISWI $l_{DNA} = 306.7 \pm 1.0$ nm, et avec ISWI $l_{ISWI/ADN} = 268.7 \pm 2.1$ nm.

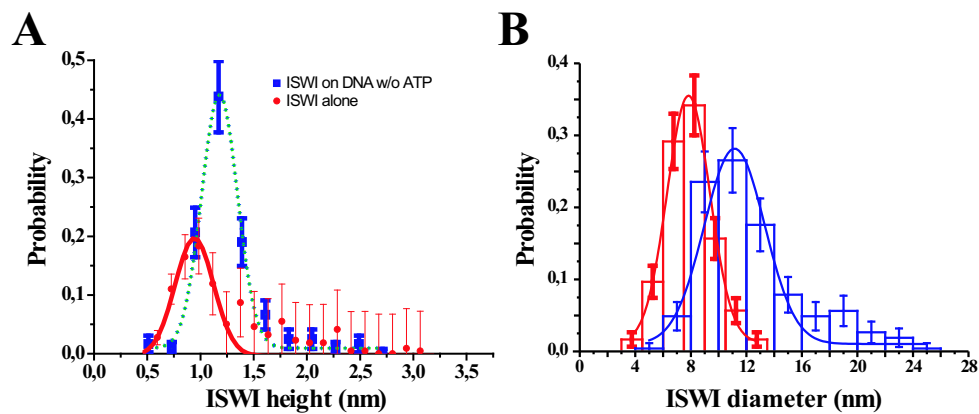


FIG. 4.8 – *Distribution des hauteurs et des diamètres d'ISWI.* A) Distribution des hauteurs max (h_{max}) d'ISWI. Sur la surface de mica $h_{max} = 0.94 \pm 0.03$ nm; sur l'ADN $h_{max} = 1.18 \pm 0.04$ nm. B) Distribution des diamètres (d) d'ISWI. Sur la surface de mica $d = 7.83 \pm 0.13$ nm; sur l'ADN $d = 11.15 \pm 0.26$ nm.

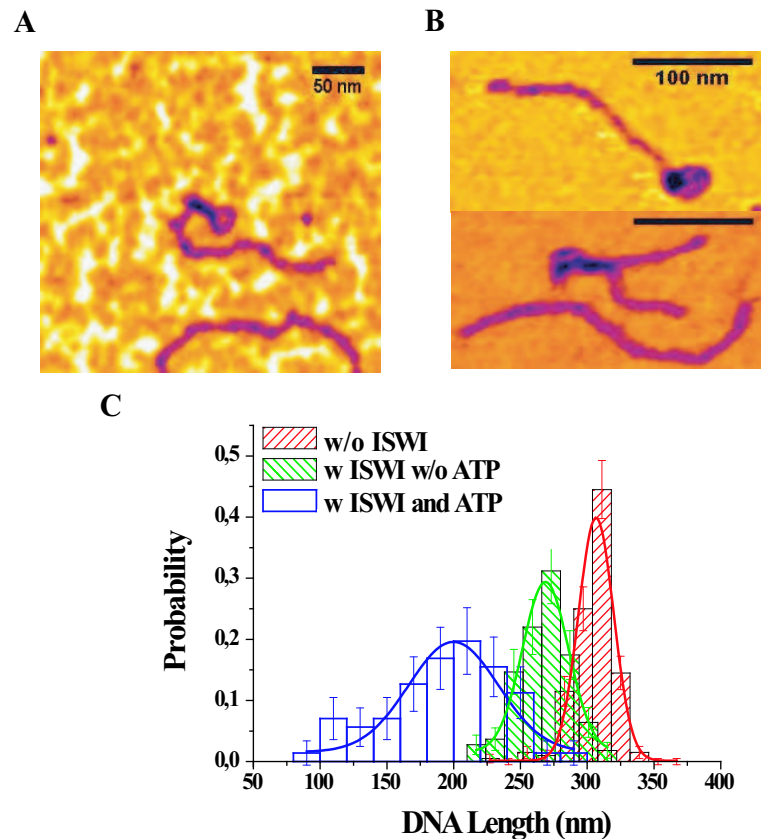


FIG. 4.9 – *Images AFM du complexe ISWI/ADN en présence d'ATP (25 μ M). A) Image d'un complexe presque à l'extrémité de la molécule d'ADN, avec une boucle superenroulée. B) Images de deux complexes, un complexe à une extrémité, avec un boucle relâchée, et l'autre à l'intérieur de la molécule d'ADN, avec un boucle superenroulée. C) Comparaison des distributions de longueurs de contour de l'ADN avec et sans ATP, et avec et sans ISWI. La longueur à cette concentration d'ATP est de $l_{DNA,ISWI,ATP} = 199.9 \pm 6.1$ nm ce qui suggère une réduction de longueur de la molécule induite par la formation d'une boucle de $\Delta l = 106$ nm.*

On a trouvé aussi que le complexe est souvent localisé aux extrémités de l'ADN (71 cas sur 91), alors qu'en absence d'ATP la position de l'enzyme sur la molécule est aléatoire (15 cas sur 109 aux extrémités). Le fait qu'en présence d'ATP l'enzyme soit plutôt localisée aux extrémités de la molécule suggère qu'elle pourrait transloquer l'ADN en se déplaçant le long de la molécule. Cette expérience montre que l'interaction entre ISWI et l'ADN est affectée par la présence d'ATP. Ces observations sont cohérentes avec des expériences faites en volume [287], où les auteurs mesurent la stabilité du complexe ADN/ISWI avec ou sans ATP, et en présence d'analogues non hydrolysables de l'ATP.

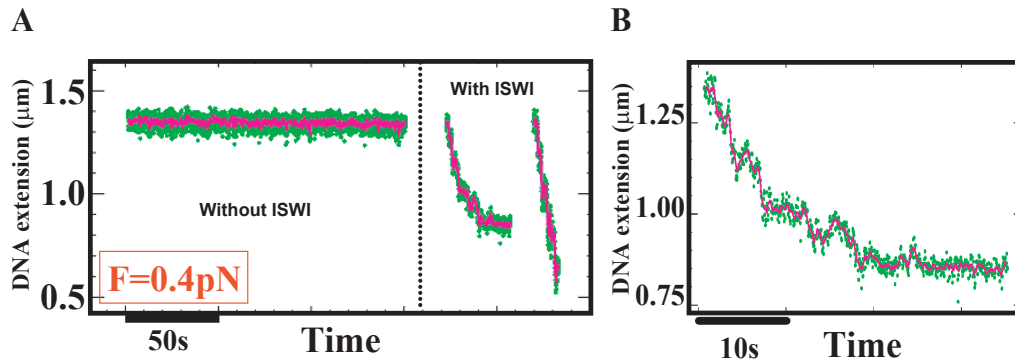


FIG. 4.10 – *Accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN nickée à haute concentration.* A) Une trace d'extension de l'ADN en temps réel sans ISWI, et deux traces en présence d'ISWI (25nM) à une force de 0.4pN. B) Un agrandissement d'une des deux traces en présence d'ISWI. En vert sont représentés les points expérimentaux (à 25Hz), en rouge les points moyennés sur 1s.

4.5.4 Pinces magnétiques

4.5.5 Accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN "nickée"

Comme pour le complexe RSC, nous avons étudié les propriétés d'accrochage d'ISWI sur un molécule d'ADN nickée. A très haute concentration d'ISWI (plus de 25 nM), on observe une compaction de la molécule d'ADN due à la formation, le long de la molécule, de nombreux complexes (Fig.4.10A). En fait, si on observe plus en détail la compaction, on peut voir (Fig.4.10B) que la compaction de l'ADN se fait par paliers discrets, chaque palier correspondant à l'accrochage d'une seule protéine. Si on augmente la force appliquée sur la molécule, on peut observer que l'extension de la molécule d'ADN fluctue entre deux niveaux d'extension correspondant à l'extension sans et avec ISWI (Fig.4.11A et B).

Si on réduit la concentration d'ISWI et si on réduit la force (Fig.4.11C) on peut arriver à isoler des événements isolés d'accrochage de la protéine. On peut ainsi mesurer la variation d'extension de la molécule d'ADN en présence d'ISWI mais sans ATP (Fig.4.11D), et on trouve qu'ISWI réduit celle-ci de $46,5 \pm 2,2$ nm. Cette réduction en longueur est très proche de celle observée avec l'AFM. On explique donc cette réduction par un enroulement de l'ADN autour de l'enzyme.

4.5.6 Accrochage d'ISWI sur une molécule d'ADN superenroulable

Si la molécule d'ADN s'enroule à la surface de l'enzyme, son interaction dans le complexe ISWI/ADN doit changer le nombre d'enlacement du reste de la molécule (de façon à garder fixe le nombre total d'enlacement). Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences avec de l'ADN sensible à la torsion. Avec ces molécules d'ADN on observe des résultats différents selon la topologie de la molécule. Comme on peut voir dans la figure 4.12A, (à $F = 0,4$ pN) l'accrochage d'une seule protéine d'ISWI sur un ADN sousenroulé est accompagné par une réduction de la longueur de la molécule d'ADN. Par contre, l'accrochage sur une molécule

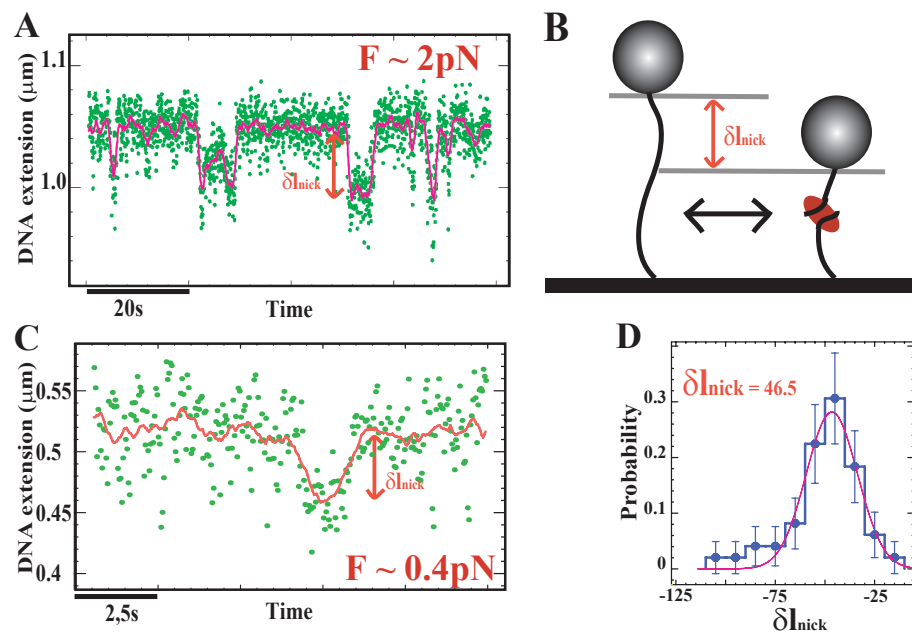


FIG. 4.11 – Accrochage d'ISWI à haute et à faible concentration (25 nM et 1 nM) à différentes forces (0.4 pN et ~ 2 pN). A) Trace d'extension de l'ADN en temps réel obtenue à ~ 25 nM ISWI et à ~ 2 pN, présentant un signal télégraphique (dû à des phénomènes d'accrochage/déaccrochage d'ISWI). En vert les points expérimentaux à 25 Hz, en rouge les points moyennés sur 1 s. B) Représentation schématique qui illustre pourquoi on observe un signal télégraphique si on regarde l'extension au cours du temps. C) Trace d'extension de l'ADN en temps réel obtenue à 1 nM ISWI et à 0.4 pN, présentant un événement d'accrochage/déaccrochage d'ISWI. D) Distribution des variations de longueur observées en présence d'ISWI.

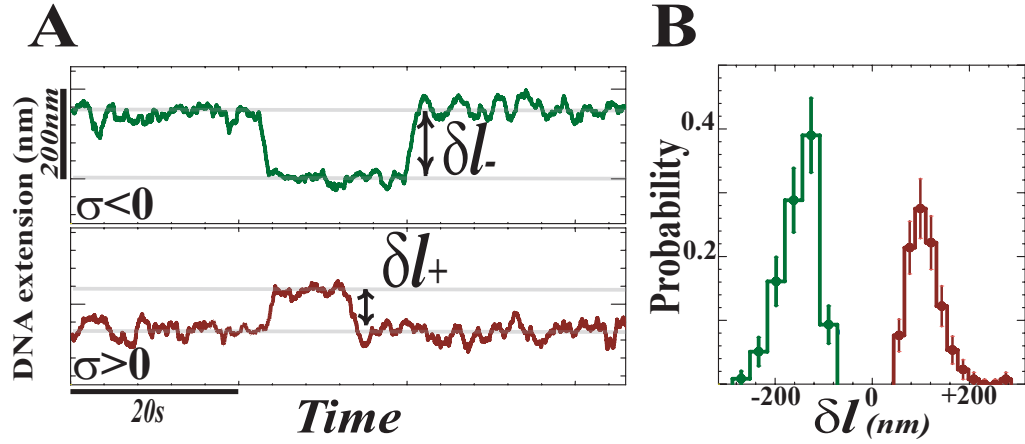


FIG. 4.12 – *Effet de la topologie dans l'accrochage d'ISWI.* A) Changements de l'extension de la molécule d'ADN induit par l'accrochage d'ISWI, dans l'ADN sousenroulé (en haut) et surenroulé (en bas) à $F = 0.4$ pN. le deux traces donnant l'extension de l'ADN en temps réel correspondent aux points expérimentaux moyennés sur 1s. B) Distribution des changements observés dans l'ADN surenroulé et sousenroulé. Pour $\sigma < 0$ (en vert) le $\delta l_- \cong -149$ nm et pour $\sigma > 0$ (en rouge) le $\delta l_+ \cong 104$ nm.

d'ADN surenroulée résulte en une augmentation de la longueur de la molécule.

Ces variations de longueur de l'ADN peuvent être expliquées par l'introduction d'une vrille positive (schéma figure.4.13A et B) lors de la formation du complexe. Cette vrille positive doit être compensée par des vrilles négatives dans le reste de la molécule.

Ces supertours négatifs compensatoires vont augmenter le nombre de plectonèmes négatifs (si on travaille en présence d'ADN sousenroulé), ou vont réduire le nombre de plectonèmes positifs (si on travaille avec une molécule surenroulée). Donc, selon le degré de superenroulement de la molécule, on va soit réduire soit augmenter l'extension de la molécule d'ADN, comme on l'observe dans la fig. 4.12A.

On a mesuré la variation de longueur de la molécule d'ADN et on a trouvé qu'elle est de $\delta l_- \cong -149$ nm pour l'ADN sousenroulé et $\delta l_+ \cong +104$ nm pour l'ADN surenroulé (Fig.4.12B). Cette variation observée dans l'extension de l'ADN (δ_{obs}) est attribuée à la formation d'une boucle d'ADN enroulée sur le complexe de taille δl_t et le changement de la taille des plectonèmes :

$$\delta_{obs} = -\delta l_t \pm n^{\pm} l_{plect} \quad (4.6)$$

où l_{plect} est la taille d'un plectonème (qui à $F=0,4$ pN est égale à 50 nm). En supposant que la taille de l'ADN enroulé sur le complexe ISWI est le même sur l'ADN enroulé ou nické ($\delta l_t = \delta l_{nick}$), on peut donc déduire le nombre de tours introduits par l'enzyme. En considérant que la contribution due à l'introduction de tours $n^{\pm} l_{plect}$ est positive dans l'ADN surenroulé et négative dans l'ADN sousenroulé, on trouve que l'enzyme ajoute $\cong 2$ tours, (si on fait hypothèse que le nombre de tours introduits est le même dans l'ADN surenroulé et sousenroulé).

Des contrôles positifs ont été faits en utilisant de l'ATP non hydrolysable (ATP- γ -S) et on a trouvé que les changements en longueur de la molécule d'ADN sont similaires à ceux observés

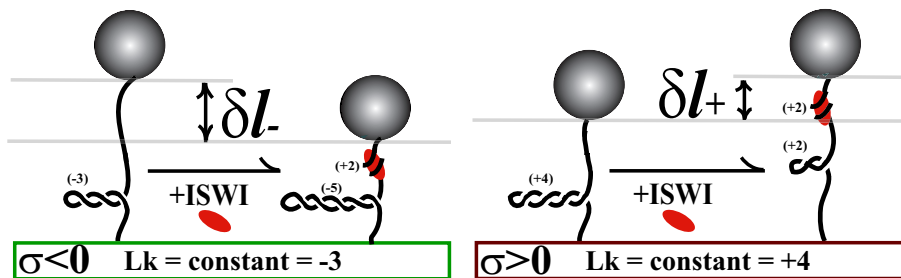


FIG. 4.13 – Représentation schématique du changement topologique induit par l'accrochage d'ISWI. Dans l'ADN sousenroulé ($\sigma < 0$), à la suite de l'accrochage d'ISWI, 2 supertours négatifs sont introduits dans la molécule (parce que l'ADN forme une vrille positive autour de l'enzyme). Ces supertours augmentent le nombre de plectonèmes négatifs présents dans la molécule d'ADN et réduisent donc l'extension de la molécule. Dans l'ADN surenroulé ($\sigma > 0$), le même nombre de tours négatifs est introduit ce qui va réduire le nombre de plectonèmes positifs présents dans la molécule augmentant ainsi l'extension de la molécule d'ADN.

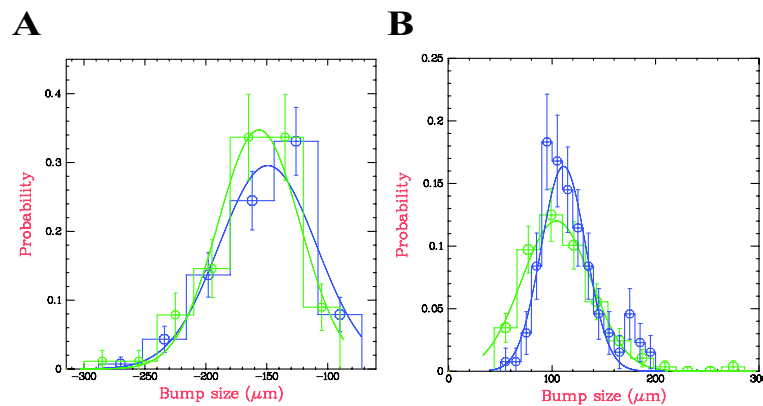


FIG. 4.14 – Distribution de la taille des changements de longueur induits par la formation du complexe ISWI/DNA, en présence d'ATP- γ -S. A) Distribution des changements de longueur avec ISWI sans et avec ATP- γ -S, sur de l'ADN sousenroulé ($\sigma \sim -0.03$). En bleu la distribution sans ATP ou $\delta l_{noATP}^- = 149.2 \pm 4.3$ nm, en vert avec ATP- γ -S ou $\delta l_{ATP-\gamma-S}^- = 156.4 \pm 4.1$ nm. B) Distribution des changements de longueur avec ISWI sans et avec ATP- γ -S sur de l'ADN surenroulé ($\sigma \sim +0.03$). En bleu distribution sans ATP ou $\delta l_{noATP}^+ = 104.1 \pm 3.5$ nm, en vert avec ATP- γ -S ou $\delta l_{ATP-\gamma-S}^+ = 111.1 \pm 2.3$ nm.

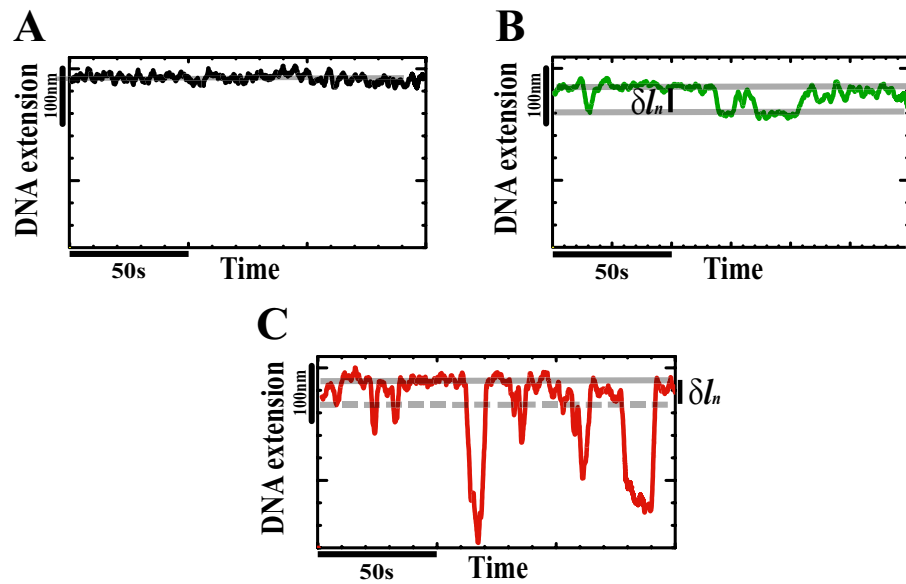


FIG. 4.15 – *Translocation de l'ADN par ISWI, en présence d'ATP à $F=0.4$ pN. Extension de la molécule d'ADN en temps réel sans protéine A), avec ISWI sans ATP B), et avec 200 μ M ATP C).*

sans ATP (Fig.4.14A et B).

4.5.7 Translocation d'ISWI sur une molécule d'ADN "nickée"

Nous avons ensuite étudié le comportement de l'enzyme en présence d'ATP. Comme on peut le voir dans la figure 4.15, en présence d'ATP, ISWI réduit la longueur de la molécule d'ADN, ce qui suggère qu'ISWI transloque de façon ATP dépendante la molécule d'ADN en formant des boucles.

De fait, si on mesure la taille de l'ADN transloqué en fonction de la concentration d'ATP, on observe dans la fig.4.16 que la taille de la boucle formée augmente selon une cinétique type Michaelis-Menten. En ajustant les données expérimentales avec cette loi on a pu mesurer la longueur maximale d'ADN transloqué $l_{max} \cong 66$ nm dans la boucle dans des conditions ATP saturant, avec une constante de Michaelis $k_M = 7,6$ μ M.

Dans la fig.4.17A on peut voir un événement isolé de translocation effectué par ISWI. Chaque événement de translocation a été ajusté par un polygone à 5 cotés (voir matériels et méthode). A partir du fit, on estime le temps requis pour transloquer la boucle d'ADN (τ_{on}), ainsi que le temps nécessaire pour défaire la boucle d'ADN (τ_{off}). Ces deux temps sont distribués exponentiellement. Si on étudie ces temps de vie moyens en fonction de la concentration d'ATP, on voit (Fig.4.17B) qu'aussi bien τ_{on} que τ_{off} croissent à faible concentration d'ATP. Cette tendance nous indique que l'enzyme ne transloque pas seulement de façon ATP dépendant la boucle, mais aussi qu'elle a également besoin d'ATP pour défaire la boucle ainsi formée. De fait, si on mesure la vitesse employée pour former et défaire la boucle à différentes concentrations d'ATP (Fig.4.17C), on trouve pour tous les deux une cinétique de type Michaelis-Menten, avec la même vitesse maximale ($\cong 430$ pb/s) et la même constante de Michaelis $k_M(16,5$ μ M). L'enzyme transloque donc l'ADN en formant un boucle et peut transloquer l'ADN dans la

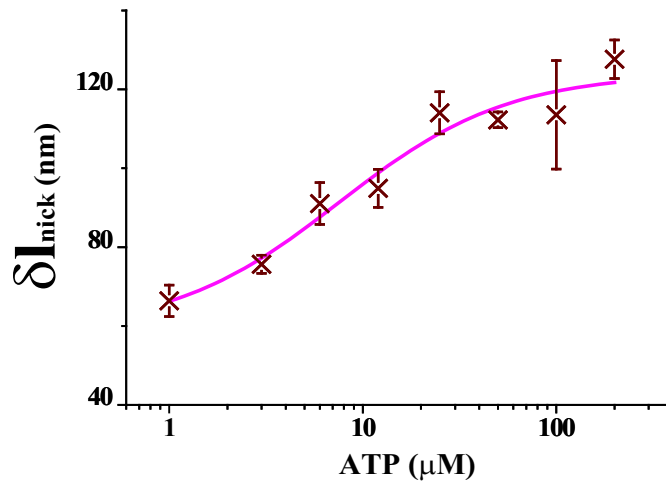


FIG. 4.16 – *Translocation de l'ADN en fonction de la concentration d'ATP.* Sur cette courbe sont représentées les valeurs moyennes de la taille de la boucle transportée par ISWI ($\langle \delta l_{nick} \rangle$) sur l'ADN nické. Les données ont été ajustées par une cinétique de type Michaelis-Menten ($\delta l_{nick} = l_{sansATP} + \frac{\delta l_{max}[ATP]}{K_M + [ATP]}$), avec un $\delta l_{max} \approx 65.5 \pm 7.1$ nm, un K_M de 7.6 ± 3.3 μ M, et $l_{sansATP}$ ajusté à 58.6 ± 7.6 nm.

direction inverse en défaisant la boucle formée.

4.5.8 Translocation d'ISWI sur une molécule d'ADN superenroulable

On a effectué une mesure de la translocation d'ISWI sur un ADN superenroulé. Si l'enzyme transloque la molécule d'ADN en suivant l'hélicité de la molécule, il est probable que la translocation soit couplée à l'introduction de tours dans la molécule d'ADN. Pour vérifier cette hypothèse nous avons comparé le transport observé dans un ADN superenroulé négativement et positivement, avec le transport observé sur un ADN nické. Comme on le voit dans la fig.4.18A la translocation de l'ADN sousenroulé réduit l'extension de la molécule d'ADN, et augmente l'extension de l'ADN surenroulé (compatible avec l'introduction de supertours négatifs dans la molécule).

La dépendance de la taille de la boucle d'ADN formée avec la concentration en ATP est similaire pour un ADN nické et un ADN sousenroulé mais diffère pour l'ADN surenroulé (Fig.4.18B). Cela suggère que le nombre de tours compensatoires introduits dans l'ADN sousenroulé est indépendant de la concentration d'ATP. En effet, si on estime ce nombre (Fig.4.18C), on trouve que le nombre de tours introduits par l'enzyme est constant ($\approx 1, 5$). Dans l'ADN superenroulé, par contre le nombre de tours introduits augmente avec l'ATP. Cependant le degré de surenroulement de la boucle formée (voir protocoles) est plus ou moins constant : $\sigma_+^{loop} \approx 0, 13$.

Ces résultats suggèrent que le nombre de tours compensatoires introduits dans l'ADN pendant la translocation est différent dans l'ADN surenroulé et sousenroulé.

Cet effet pourrait être expliqué par un phénomène de relaxation partielle de la torsion dans la boucle d'ADN transloquée (slippage). En effet les données AFM montrent qu'en présence d'ATP, l'ADN est ancré plus faiblement à l'enzyme, ce qui pourrait faciliter l'apparition d'évè-

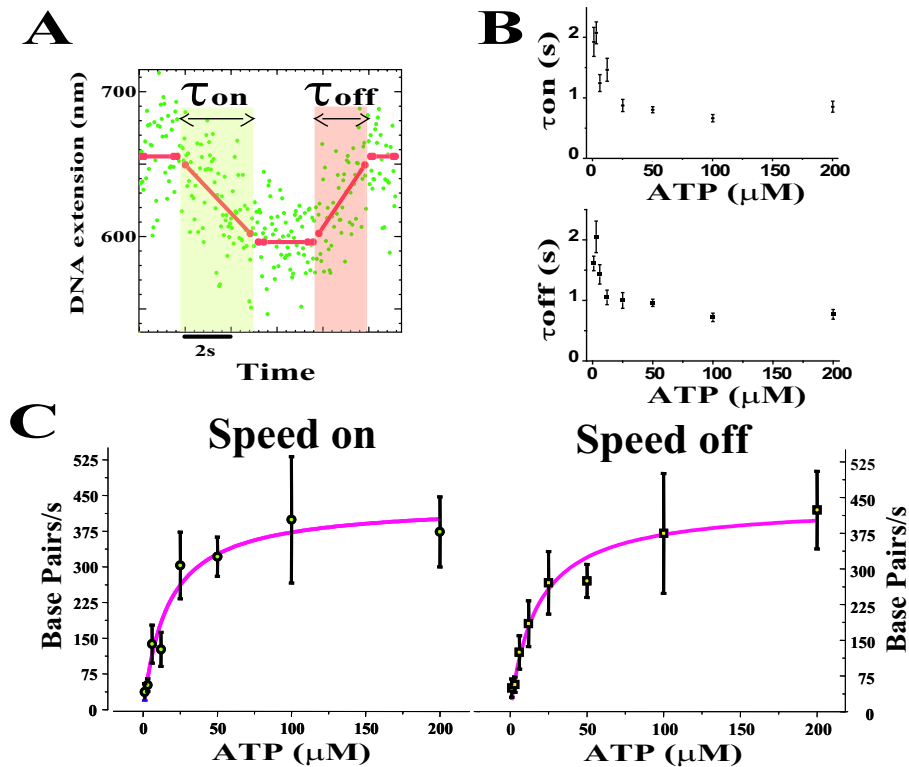


FIG. 4.17 – Analyse des temps et des vitesses de translocation de l'ADN. A) Une bouffée d'activité observée sur l'ADN nické, ajustée par un polygone (voir protocoles), et que l'on utilise pour estimer la taille et le temps nécessaire pour former la boucle d'ADN. B) Analyse de τ_{on} et τ_{off} en fonction de la concentration d'ATP. C) Vitesse de translocation pour former et défaire la boucle. Les données sont ajustées avec une cinétique de type Michaelis-Menten, avec une vitesse v_{max}^{on} de 436.6 ± 33.5 bp/s et une K_M^{on} de 16.1 ± 4.3 μM pour la formation de la boucle, et avec une vitesse v_{max}^{off} de 429.4 ± 25.3 bp/s et une K_M^{off} de 17.3 ± 3.5 μM pour défaire la boucle.

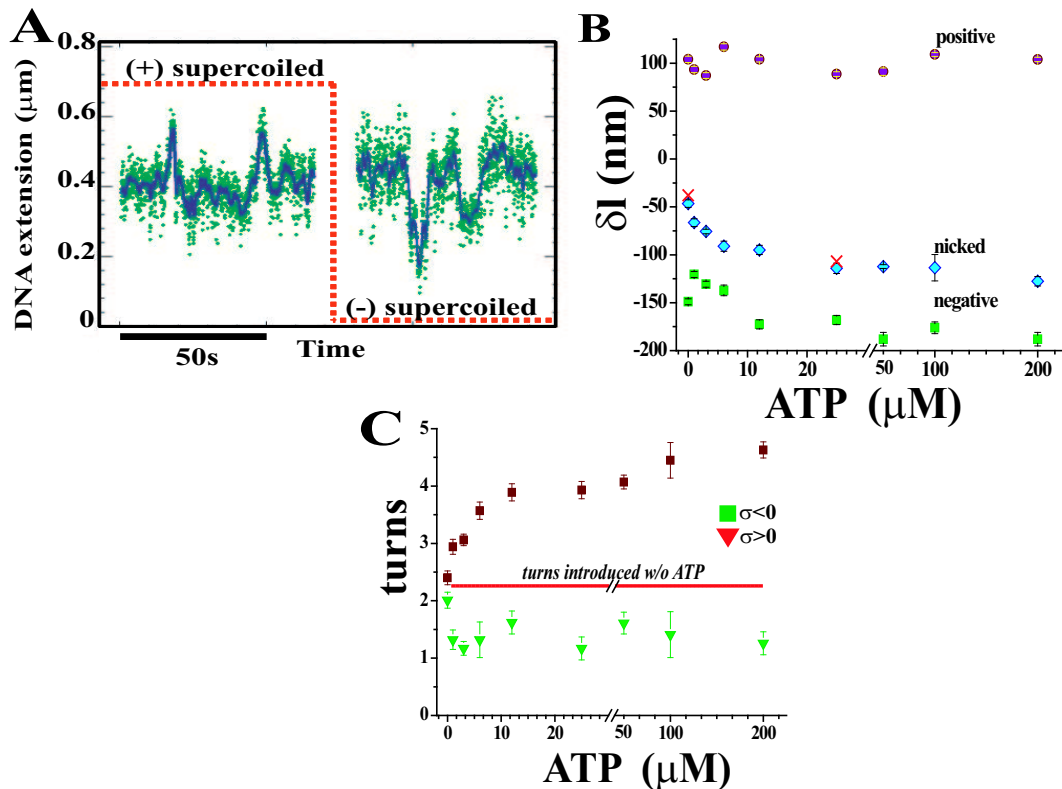


FIG. 4.18 – *Translocation dans l'ADN sensible à la torsion.* A) Deux traces donnant l'extension d'une molécule d'ADN en temps réel qui montrent des changements du nombre d'enlacement induits par la translocation d'ADN surenroulé et sousenroulé (en vert les données brutes et en rouge les données moyennées sur 1 s). B) Variation de l'extension de la molécule en fonction de la concentration d'ATP sur un ADN nické, sousenroulé et surenroulé C) Nombre de tours introduits pendant la translocation à différentes concentrations d'ATP, sur un ADN sousenroulé et surenroulé.

nements de slippage. Le fait que le nombre de tours introduits est différent selon la topologie de l'ADN pourrait donc être dû à un taux de slippage plus élevé dans l'ADN sousenroulé. Cet effet a été aussi observé pour d'autres enzymes qui transloquent la molécule d'ADN (la protéine FtsK [288]).

4.5.9 Translocation sur l'ADN simple brin

Les données obtenues sur l'ADN surenroulable et les images AFM ont montré que l'enzyme transloque une boucle d'ADN enroulée positivement. Pendant la translocation, le stress torsionnel ou/et tensionnel dans la boucle pourrait augmenter jusqu'à atteindre une valeur qui pourrait limiter la translocation même de l'enzyme. Pour tester cette hypothèse j'ai fait des expériences en présence d'ADN simple brin, où son éventuel transport se fait sans accumulation de torsion. Des expériences en volume avaient déjà montré que l'enzyme était capable de transloquer ce substrat. La fig.4.19A montre un signal avec deux événements de translocation sur l'ADN simple brin. En mesurant la processivité en paires de bases en fonction de la concen-

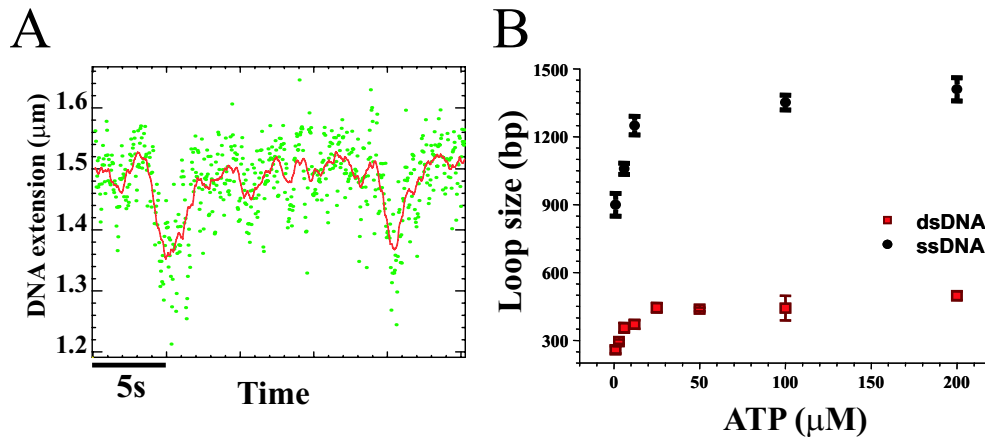


FIG. 4.19 – *Translocation de l'ADN simple brin par ISWI (ADN utilisé Charomid 11 kb). A) Deux évènements de translocation dans l'ADN simple brin à $F=0.4$ pN, en vert les points expérimentaux et en rouge les points moyennés sur 1s. B) Processivité en paires de bases de l'ADN simple brin et double brin à différentes concentrations d'ATP.*

tration d'ATP, on peut voir dans la fig.4.19B que le transport d'ADN simple brin est beaucoup plus processif que celui d'ADN double brin, et sature à ~ 1400 pb. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse que le stress torsionnel pourrait limiter le transport de l'ADN par l'enzyme.

4.5.10 Effet de la force

Pour essayer de cerner l'effet de la force sur la translocation, on a mesuré la taille de la boucle d'ADN transporté à différentes forces. Comme on peut le voir dans la Fig.20, la taille de la boucle d'ADN transloqué décroît exponentiellement avec la force appliquée sur la molécule d'ADN. Un fit exponentiel a été utilisé pour extrapoler la taille de la boucle à force nulle ($l_{F=0}^{transl} = 785 \pm 51$ bp), mais aussi la force maximale, F_{stall} . Si on considère que ISWI s'accroche à l'ADN en réduisant la longueur de la molécule de 46.5nm (ou ~ 154 bp), on trouve que $F_{stall} = 1.35 \pm 0.13$ pN. Entre cette force et ~ 2.3 pN on détecte seulement la formation de boucles dues à la formation du complexe. Au delà de ~ 2.3 pN aucune réduction de l'extension de la molécule d'ADN est détectable.

4.5.11 Modèle de translocation proposé

À partir des données obtenues on peut proposer un modèle de translocation (Fig.4.21). Sans ATP, l'ADN s'enroule autour de la protéine en formant un complexe très similaire aux nucléosomes (mais avec une topologie opposée parce que l'ADN s'enroule en suivant une hélice droite). En présence d'ATP, l'association ISWI/ADN est plus faible, comme cela a été confirmé par le temps de vie du complexe qui est plus court à concentration d'ATP plus élevée. L'enzyme semble se déplacer le long de la molécule d'ADN de façon ATP-dépendante, et en même temps il transloque une d'ADN surenroulée (on estime son degré de surenroulement à $\sigma \approx 0.13$). Nous avons suggéré un modèle de translocation très similaire à celui des hélicases (l'"inchworm" model ou modèle de la chenille). Selon ce modèle, l'enzyme se déplace comme une

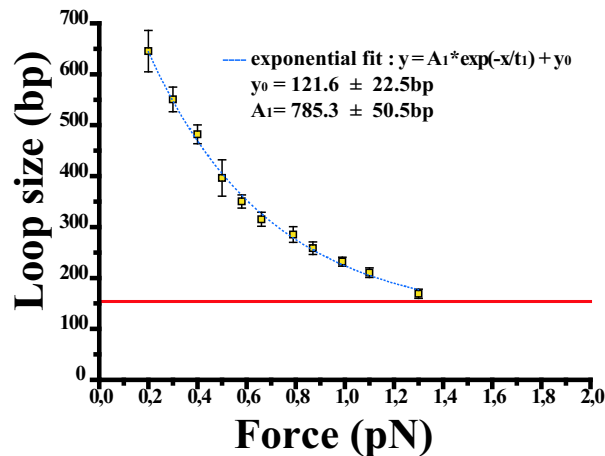


FIG. 4.20 – *Effet de la force sur la translocation d'ISWI. Les points expérimentaux ont été ajustés par une exponentielle. La ligne rouge représente la taille de la boucle formée par l'accrochage d'ISWI sans ATP. Tous les points ont été faits à une concentration d'ATP de 200 μ M, et pour chaque point la taille d'au moins 40 boucles ont été mesurées.*

"chenille", avec une partie antérieure et une partie postérieure. La partie antérieure transloque l'ADN après le relâchement d'une molécule d'ADP, pendant que la partie postérieure fluctue avec l'ancrage d'ATP entre un état fortement lié et un état faiblement lié à l'ADN. Ce dernier peut relaxer une partie du stress torsionnel, tensionnel et entropique dû à la taille de la boucle associée à l'enzyme. L'enzyme se déplace donc en extrudant une boucle avec une taille plus ou moins fixe qui interagit faiblement avec l'enzyme. Ce modèle (Fig.21) est cohérent avec un cycle d'utilisation de l'ATP proposé pour ISWI [287].

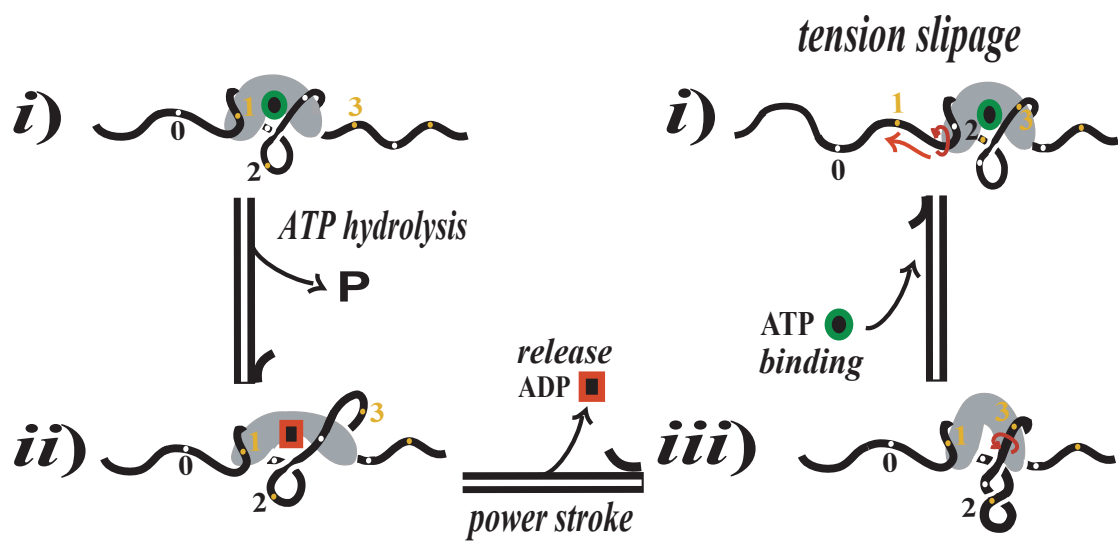


FIG. 4.21 – *Modèle possible de translocation d'ISWI couplé à l'hydrolyse d'ATP. Ce modèle a été inspiré par l'article [287].*

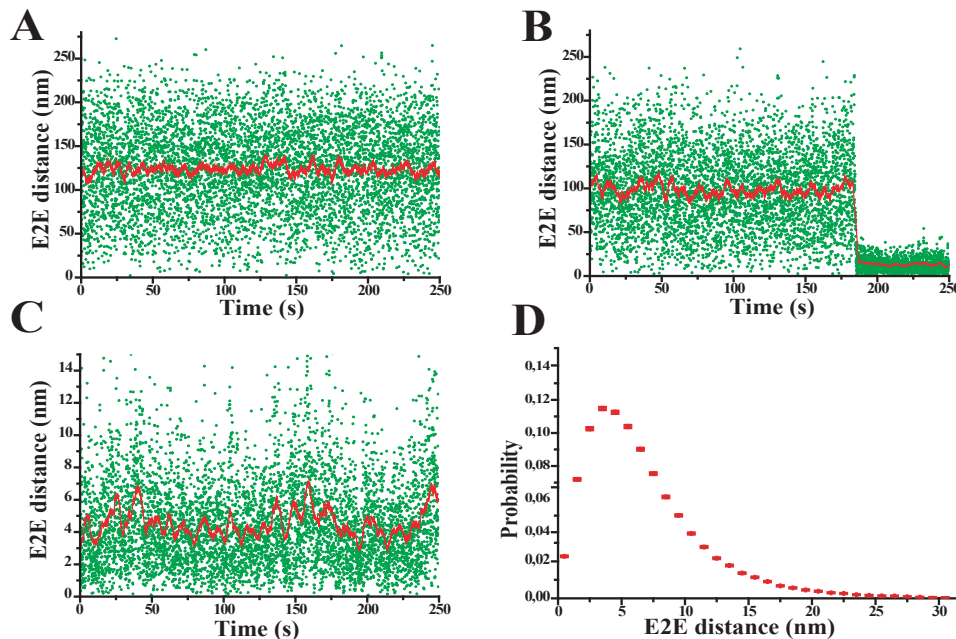


FIG. 4.22 – *Contrôles effectués sans protéine* A) et B) deux traces donnant la distance bout-à-bout de l'ADN. Dans la trace B), il est possible de voir l'adsorption de la bille sur la surface à la fin de l'acquisition. C) Trace qui montre le niveau du mouvement brownien d'une bille adsorbée sur la surface. En vert on a les points expérimentaux et en rouge les points moyennés sur 4 s. D) Distribution du bruit d'une bille collée à la surface.

4.6 Expériences faites avec la technique TPM

L'activité d'ISWI est profondément affectée par l'amplitude de la force appliquée sur la molécule d'ADN. A chaque instant, la molécule d'ADN utilisée dans les pinces magnétiques est soumise à une tension comparable à celle qui existe naturellement dans l'ADN superenroulé. Pour essayer de comprendre le comportement de l'enzyme sans tirer sur la molécule d'ADN, j'ai étudié ISWI par la technique TPM, dans le laboratoire du Pr. Laura Finzi à l'Université de Milan (technique décrite dans le chapitre 3). Toutes les mesures ont été faites en utilisant le "chromatin remodeling buffer" (voir annexe) avec une concentration en protéines de ≈ 20 nM.

4.6.1 Contrôles effectués

Dans la fig.4.22 on peut voir deux traces typiques de la distance bout-à-bout (End to End distance ou "E2E") de deux molécules d'ADN (de ~ 900 bp) sans protéines. Comme on peut le voir, tous les points sont distribués autour d'une valeur E2E caractéristique de la longueur d'ADN utilisée (voir calibration dans le chapitre 3). La fig.4.22B présente également la distance bout-à-bout d'une molécule d'ADN fixée à une bille qui finit par venir se coller sur la surface ce qui diminue son mouvement brownien. Pour déterminer quel niveau de mouvement brownien correspond au mouvement d'une bille adsorbée à la surface, j'ai étudié le bruit de huit billes

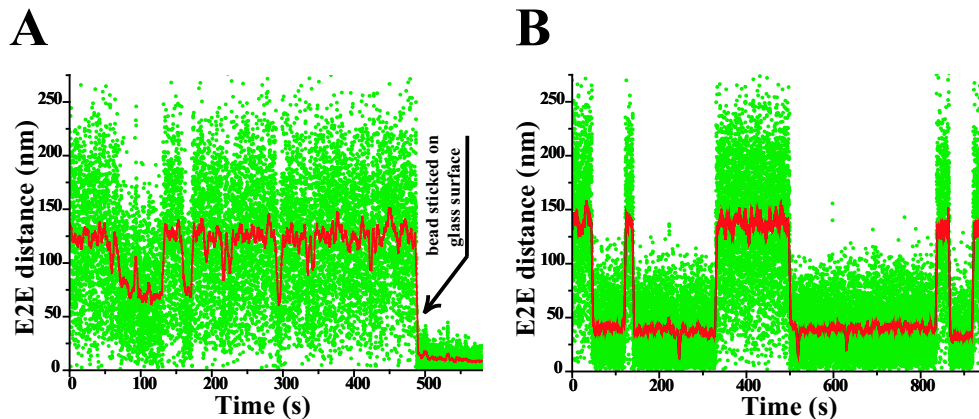


FIG. 4.23 – *Signal télégraphique en présence d'ISWI. A) Signal obtenu à $60 \mu\text{M}$ ATP et B) à $250 \mu\text{M}$ ATP. En vert on a les points expérimentaux et en rouge les points moyennés sur 4 s.*

ainsi collées (fig.4.22C). Convertissant le mouvement brownien de celles-ci en distance effective, j'ai pu déterminer un niveau de mouvement brownien seuil (15 nm) au dessous duquel le mouvement est caractéristique de celui d'une bille adsorbée sur la surface (fig.4.22D).

4.6.2 Mesures effectuées en présence d'ATP

Après avoir effectué ces contrôles sans protéines, j'ai observé le mouvement de billes ancrées à des molécules d'ADN en présence d'ISWI et d'ATP. Sur la fig. 4.23, on peut voir deux traces typiques obtenues en présence de deux concentrations d'ATP différentes. La figure 4.23A a été obtenue en présence de $60 \mu\text{M}$ ATP, la trace 4.23B, par contre, a été obtenue à une concentration plus élevée ($250 \mu\text{M}$ ATP). Dans les deux traces on peut voir la présence d'un signal télégraphique (absent du contrôle sans protéine). Ce signal résulte de l'introduction de boucles d'ADN qui réduisent la longueur de la molécule et par conséquent le mouvement brownien. Ainsi, l'extension de la molécule d'ADN au cours du temps fluctue entre deux niveaux de conformation correspondants à une conformation sans boucle et à une conformation avec boucle (Fig.4.24A).

Pour chaque trace, on a mesuré le temps passé dans chaque conformation (τ_{on} et τ_{off} dans la trace de la fig.4.24A), ainsi que la réduction de la distance bout-à-bout de la molécule induite par ISWI. On n'a pas observé de variations significatives de l'E2E distance en fonction de la concentration d'ATP utilisée ($\langle \Delta E2E \rangle \sim 58 \text{ nm}$ qui correspond à une boucle transloquée de $\sim 440 \text{ bp}$). La distribution des temps dans chaque conformation suit une distribution exponentielle (comme le montre dans la fig.4.24B)

Les temps de vie moyens de chaque conformation à différentes concentrations d'ATP ont été mesurés. Comme on peut le voir sur la fig.25A, les temps de vie de la conformation avec la boucle formée (τ_{on}) sont bien ajustés par une courbe de type Michaelis-Menten, ce qui a permis d'obtenir le temps de vie en conditions d'ATP saturant ($\tau_{on} \cong 88 \text{ s}$) et la constante de Michaelis ($K_M \cong 15 \mu\text{M}$). Pour le temps de vie moyen de la conformation sans boucle (τ_{off}), on observe que celui-ci devient plus petit lorsqu'on augmente la concentration d'ATP (fig.4.25B).

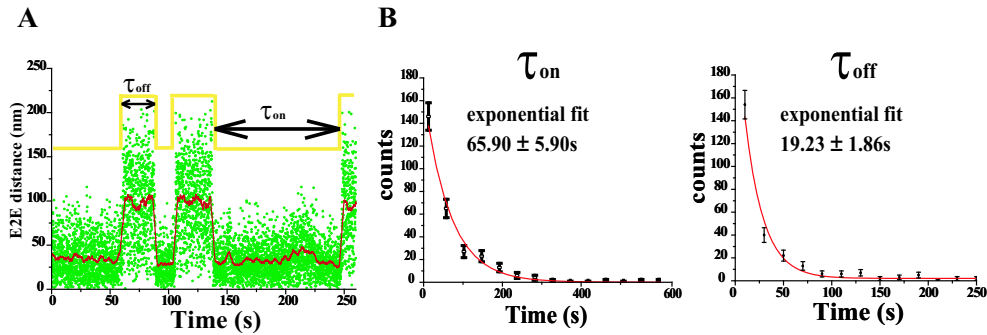


FIG. 4.24 – *Signal télégraphique et mesure du temps de vie moyen de la conformation avec boucle et sans boucle.* A) Signal obtenu à $125 \mu\text{M}$ ATP. Les temps pendant lesquels la bille se trouve dans la conformation avec boucle (τ_{on}) et dans la conformation sans boucle (τ_{off}) ont été mesurés. B) Distribution du temps de vie dans chaque conformation obtenue à $60 \mu\text{M}$ ATP. Les distributions suivent une loi exponentielle, et l'ajustement à une exponentielle a permis d'obtenir le temps de vie moyen à cette concentration d'ATP.

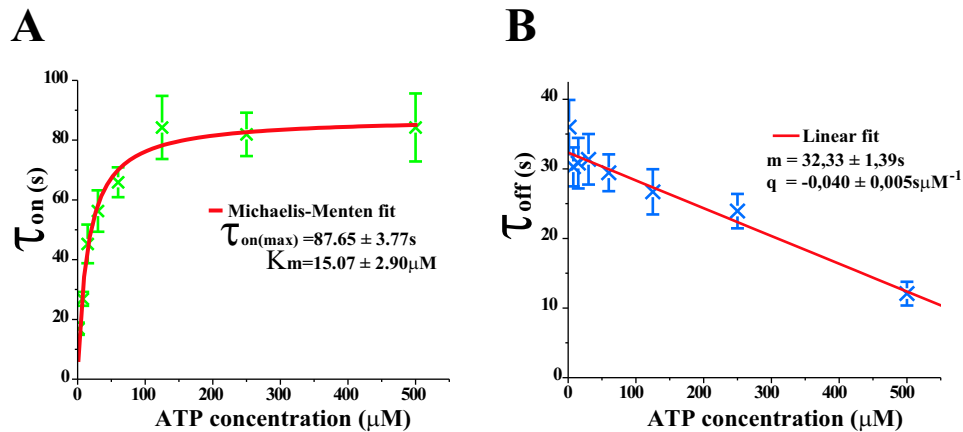


FIG. 4.25 – *Distribution des temps de vie en fonction de la concentration d'ATP.* A) Distribution des temps de vie pour la conformation avec boucle (τ_{on}), ajusté par une loi Michaelis-Menten. $T_{on(max)} = 87.65 \pm 3.77\text{s}$ et $K_M = 15.07 \pm 2.90 \mu\text{M}$. B) Distribution des temps de vie de la conformation sans boucle (τ_{off}), ajusté avec un droite. $T_{off}(ATP = 0) = 32.33 \pm 1.39\text{s}$.

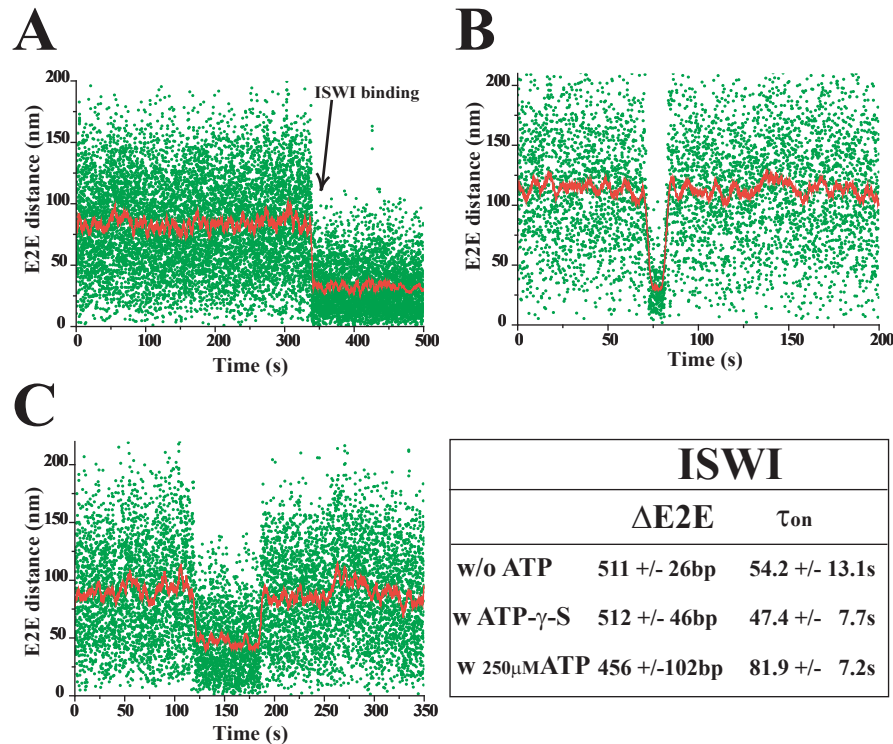


FIG. 4.26 – *Accrochage d'ISWI sans ATP ou en présence d'ATP- γ -S. A) et B) Signaux obtenus avec ISWI sans ATP. C) Signal obtenu avec ISWI et ATP- γ -S. Tableau qui résume les variations de la distance bout-a-bout observées et la durée d'accrochage de l'enzyme sur l'ADN dans 3 conditions différentes.*

4.6.3 Mesures effectuées sans ATP et en présence d'ATP non hydrolysable (ATP- γ -S)

Après les mesures effectuées avec ATP, j'ai étudié l'accrochage d'ISWI sur l'ADN en l'absence d'ATP. Dans la fig.4.26A et B on peut voir deux traces obtenues en présence d'ISWI sans ATP. Comme on peut le voir dans les deux traces, l'accrochage d'ISWI réduit la distance E2E en formant une boucle de $\cong 500$ bp. Le temps de vie moyen (τ_{on}) de ce complexe est $\cong 54$ s. Comme contrôle positif j'ai effectué des mesures avec de l'ATP non hydrolysable (ATP- γ -S). En présence de ce substrat, ISWI n'est pas sensé transloquer la molécule d'ADN. De fait, dans ces conditions (fig.4.26C) on observe la formation de complexes ADN/ISWI avec un temps de vie $\tau_{on} \cong 48$ s qui sont accompagnés d'une réduction de la distance bout-à-bout d'une valeur comparable à celle obtenue sans ATP (tab. fig.4.26).

4.7 Pinces magnétiques vs. TPM

Comme on a pu le remarquer, les données obtenues avec les pinces magnétiques présentent plusieurs points de désaccord avec celles obtenues par TPM. Les différences observées pourraient être expliquées par le fait qu'en TPM, on a étudié le comportement d'ISWI dans un ré-

gime de concentration beaucoup plus élevé (~ 20 nM) par rapport à celui utilisé avec les pinces magnétiques. On avait déjà pu noter, lors des expériences en utilisant les pinces magnétiques, que dans ce régime de concentration on observe un ancrage coopératif de plusieurs protéines ISWI sur une même molécule d'ADN, avec des changements de l'indice d'enlacements de la molécule qui ne sont ni très reproductibles, ni bien compris. Ceci rend très difficile la compréhension du comportement manifesté par l'enzyme à haute concentration, car le signal observé correspond à l'activité simultanée (et peut être coordonnée) de plusieurs moteurs. La formation de ces complexes multiprotéiques le long de l'ADN, pourrait donc être la raison principale des différences observées entre la technique TPM et les pinces magnétiques, dans la cinétique d'accrochage et dans la stabilité du complexe en fonction de la concentration d'ATP utilisée. Dans les mesures TPM nous n'avons pu descendre à de plus basses concentrations d'ISWI car aucun changement significatif de la distance bout-à-bout n'a pu être observé à de telles concentrations, car le temps de vie des complexes est sans doute trop court pour donner un signal visible en TPM.

Résumé des résultats obtenus avec ISWI

La protéine ISWI est capable de s'accrocher sur la molécule d'ADN en réduisant l'extension de la molécule d'ADN.

L'accrochage se fait en enroulant l'ADN sur la surface de l'enzyme comme cela a été montré par AFM.

Ce mode d'accrochage de l'enzyme introduit un changement du nombre d'enlacement de la molécule d'ADN, avec introduction de sousenroulements dans la molécule.

En présence d'ATP, ISWI forme des boucles d'ADN. Cette translocation de l'ADN a été observée que ce soit en AFM, en TPM ou en pinces magnétiques.

Comme pour RSC, la translocation peut être réversible et la taille de la boucle formée dépend de la concentration d'ATP utilisée; les distributions de taille ont, comme pour RSC, un profil gaussien.

Dans le cas d'ISWI, comme pour RSC, la force affecte fortement la formation de la boucle de façon exponentielle, et aucune boucle d'ADN n'a été observée au delà de $\sim 2.3pN$.

La translocation d'ADN introduit transitoirement des changements du nombre d'enlacement de la molécule d'ADN, comme pour le complexe RSC, mais avec une chiralité opposée (surenroulements emmagasinés dans la boucle; sousenroulements compensatoires dans le reste de la molécule).

Le nombre de tours introduits est différent dans le cas de l'ADN sousenroulé et surenroulé, ceci peut être, comme pour RSC, dû à un phénomène de relaxation partiel (slippage) du degré de surenroulement de la boucle formée.

Les images AFM montrent différentes topologies de boucles transloquées (selon que l'enzyme est localisée aux extrémités de l'ADN ou à l'intérieur de la molécule) ; ces images révèlent aussi que la position relative du complexe le long de la molécule change après la translocation.

En TPM, on a étudié le comportement d'ISWI dans des conditions de haute concentration, ce que nous a permis de mettre en évidence des cinétiques d'accrochage et de stabilité du complexe nucléoprotéique différentes par rapport aux données obtenues avec les pinces magnétiques. Ceci peut être dû à un phénomène d'accrochage coopératif de l'enzyme qui pourrait conduire à la formation de complexes multiprotéiques.

Chapitre 5

Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la micromanipulation et des techniques de visualisation des molécules individuelles d'ADN pour étudier les enzymes de la classe des facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Les expériences effectuées nous ont permis de bien caractériser la translocation de l'ADN par cette famille de protéines en contournant des problèmes typiques rencontrés lors des mesures effectuées en volume. Les expériences effectuées ont montré que les facteurs de remodelage ISWI et RSC transloquent la molécule d'ADN avec des mécanismes d'action très similaires. En effet, les deux familles transloquent la molécule d'ADN de façon ATP-dépendante, en formant des boucles d'ADN. La taille de la boucle d'ADN transloquée par les deux familles augmente avec la concentration d'ATP en suivant une cinétique de Michaelis-Menten. Cette translocation s'accompagne de plus par un changement transitoire du degré de surenroulement de la molécule d'ADN.

Les pinces magnétiques se sont révélées un outil idéal pour étudier la translocation de la molécule d'ADN, mais surtout pour détecter l'introduction de changements transitoires du degré de superenroulement couplés à la translocation.

Des différences par contre ont été observées dans le mode de translocation. Pour la famille ISWI, on a observé que même l'accrochage sans ATP est effectué en enroulant très fortement l'ADN. Avec l'ATP, par contre, l'ADN est toujours enroulé autour de l'enzyme mais la liaison avec l'enzyme est plus faible. La translocation de l'ADN par l'enzyme vient s'effectuer en introduisant des supertours négatifs en maintenant toujours une partie de l'ADN autour de l'enzyme. Pour le complexe RSC par contre, on n'a détecté de changement ni de longueur, ni du nombre d'enlacements sans ATP. La translocation de l'enzyme s'effectue en formant des boucles superenroulées négativement, ce qui introduit des supertours positifs dans le reste de la molécule. Comme on l'a montré dans les expériences effectuées avec les pinces magnétiques, cette translocation est fortement influencée par la force appliquée sur la molécule d'ADN dont dépend fortement soit la taille de la boucle d'ADN transloquée, soit le temps de résidence de l'enzyme.

Vu que la force influence fortement la translocation des deux familles, on a effectué des expériences en TPM avec l'enzyme ISWI. L'utilisation de cette technique nous a permis de déterminer la cinétique de résidence d'ISWI à haute concentration de protéines sans appliquer de tension sur la molécule d'ADN. La cinétique de résidence de la protéine sur la molécule d'ADN est vraiment différente de celle obtenue avec les expériences faites avec les pinces magnétiques. Si d'un côté on détecte la formation de boucle induite par la présence d'ISWI, apparemment la taille de ces boucles d'ADN ne change pas beaucoup en fonction de la concentration d'ATP en

TPM, de l'absence (présence) d'ATP. On peut remarquer par contre la présence d'une dépendance avec la concentration d'ATP pour le temps de résidence de la protéine sur l'ADN, qui suit une cinétique enzymatique de type Michaelis-Menten. Les différences observées entre TPM et AFM sont probablement dues à des effets coopératifs dans l'ancrage d'ISWI qui formeraient à haute concentration en protéines des multicomplexes le long l'ADN.

La technique de visualisation AFM nous a permis de voir directement le complexe et son interaction sur l'ADN et aussi de faire des hypothèses quant au mode de translocation du complexe le long de l'ADN. On a remarqué que si, en l'absence d'ATP, la position du complexe RSC et d'ISWI est aléatoire le long de la molécule, en présence d'ATP, par contre, on voit une augmentation du nombre de protéines localisées à la fin de la molécule d'ADN avec dans certains cas des boucles d'ADN superenroulées extrudées par les protéines.

Toutes ces données nous mènent à formuler des hypothèses quant au mécanisme de translocation de la molécule d'ADN par les deux familles de facteurs de remodelage qui prévoient aussi un mouvement le long de la molécule comme le montrent la fig. 7 de l'article sur RSC et la fig. 4.21.

Si d'un côté, on a bien caractérisé l'activité de ces deux familles sur l'ADN nu, beaucoup d'expériences doivent encore être faites, soit sur l'ADN nu, soit sur la chromatine, qui est le substrat naturel de l'action de remodelage, pour confirmer, et/ou approfondir les connaissances, le mécanisme d'action. Cela reste une piste d'étude à l'échelle de la molécule unique.

En fait, vu notre résolution temporelle et aussi la faible processivité de ISWI et RSC, on n'a pas réussi à déterminer le pas élémentaire des enzymes. La réduction de la longueur de la molécule d'ADN utilisée pendant les expériences de pinces magnétiques, et l'augmentation de la fréquence d'acquisition de la caméra vidéo pourraient améliorer la résolution spatiale, temporelle et le rapport signal sur bruit de l'expérience, et pourraient être utiles dans la détermination du pas élémentaire des protéines étudiées dans un futur proche.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude de la translocation par d'autres expériences de visualisation pour confirmer notre modèle de translocation. Celles-ci pourraient être faites par exemple en marquant les protéines avec un fluorophore et en suivant leur "mouvement" le long des molécules d'ADN déposées de façon linéaire sur une surface.

Comme on peut le voir, l'utilisation de techniques de manipulation et visualisation de molécules uniques permet d'obtenir des informations qui sont presque impossibles à obtenir avec des techniques en volume, en permettant de caractériser l'action dynamique d'une enzyme unique travaillant sur son substrat.

Annexes

Annexe A

Article GalR/HU

L'article qui suit présente une étude détaillée de la formation d'une boucle d'ADN dans la région du promoteur de l'operon *gal*. Dans cette étude on a déterminé le rôle des protéines impliquées dans la formation de la boucle, ainsi que le rôle du sousenroulement de l'ADN dans ce processus.

Supercoiling and denaturation in Gal repressor/heat unstable nucleoid protein (HU)-mediated DNA looping

Giuseppe Lia^{*†}, David Bensimon[‡], Vincent Croquette[‡], Jean-Francois Allemand^{§§}, David Dunlap[¶], Dale E. A. Lewis^{||}, Sankar Adhya^{||}, and Laura Finzi^{*,**}

^{*}Department of Biology, University of Milan, 20133 Milan, Italy; [‡]Laboratoire de Physique Statistique and Department de Biologie, and [§]Departement de Chimie, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France; [¶]San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy; and ^{||}Laboratory of Molecular Biology, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892

Contributed by Sankar Adhya, July 31, 2003

The overall topology of DNA profoundly influences the regulation of transcription and is determined by DNA flexibility as well as the binding of proteins that induce DNA torsion, distortion, and/or looping. Gal repressor (GalR) is thought to repress transcription from the two promoters of the *gal* operon of *Escherichia coli* by forming a DNA loop of ~40 nm of DNA that encompasses the promoters. Associated evidence of a topological regulatory mechanism of the transcription repression is the requirement for a supercoiled DNA template and the histone-like heat unstable nucleoid protein (HU). By using single-molecule manipulations to generate and finely tune tension in DNA molecules, we directly detected GalR/HU-mediated DNA looping and characterized its kinetics, thermodynamics, and supercoiling dependence. The factors required for *gal* DNA looping in single-molecule experiments (HU, GalR and DNA supercoiling) correspond exactly to those necessary for *gal* repression observed both *in vitro* and *in vivo*. Our single-molecule experiments revealed that negatively supercoiled DNA, under slight tension, denatured to facilitate GalR/HU-mediated DNA loop formation. Such topological intermediates may operate similarly in other multiprotein complexes of transcription, replication, and recombination.

The nucleoid structure in the bacterium *Escherichia coli* contains a circular DNA molecule of 4.7 million bp present in highly condensed form. The condensation is mediated by DNA supercoiling and the binding of several small nucleoid-associated proteins, e.g., heat unstable nucleoid protein (HU), integration host factor (IHF), factor for inversion stimulation (FIS), histone-like nucleoid structuring protein (HNS), suppressor of thymidylate synthase mutant phenotype A (StpA), and DNA binding protein from starved cells (Dps). These proteins are known to bend DNA or bind to altered structures of DNA. It is suggested that these proteins are mainly responsible for the compaction of DNA in a way that distinguishes the bacterial nucleoid from eukaryotic chromatin. These proteins are also associated with the machinery of macromolecular biosynthesis, including RNA polymerase and specific gene-regulatory, DNA-binding proteins such as repressors and activators. Indeed, DNA may serve as a scaffold for the organized recruitment and assembly of proteins at specific positions to create nucleoprotein complexes with specific activity and regulatory properties. Such positioning has long been postulated to be the mechanism of repression of the *gal* operon by the gal repressor dimer protein (GalR). GalR represses transcription initiation from the two promoters, *P*₁ and *P*₂, of the *gal* operon by binding to two spatially separated operators, *O*_E and *O*_I, which encompass the promoters (1). Repression also requires supercoiled DNA and the presence of the nucleoid-associated protein HU (2). It has been proposed that a DNA loop generated by the interaction of the two operator-bound gal repressors inactivates the promoter (3). Repression of the *gal* operon would, thus, occur when a nucleoprotein complex forms containing supercoiled DNA, two

GalR dimers, and HU. However, direct evidence of such looped complex has not been reported previously. Furthermore, an understanding of local conformational changes and their thermodynamic driving forces is required to relate structure to function.

Conventional techniques for studying DNA-protein interactions are restricted to observing the average properties of molecular ensembles. To breach this constraint, we have used magnetic tweezers (4) to unwind and stretch single DNA molecules, containing the regulatory segment of the *gal* operon, to study the molecular mechanism of transcriptional control by the Gal repressor protein. We reasoned that, if DNA looping was to cause transcriptional repression of the *gal* operon, it would be possible to detect transitions between short (looped) and long (unlooped) conformations of single, supercoiled *gal* DNA molecules under moderate tension only in the presence of the GalR and HU proteins (Fig. 1*a*).

Materials and Methods

Sample Preparation and Experimental Set Up. The linear DNA fragments used in the single-molecule experiments are prepared by linearization of plasmid pBR509. pBR509 contains 288 bp of the *gal* operon (from -197 to 91 bp from transcriptional initiation site) between *Eco*RI and *Bam*HI restriction sites of pBR322. pBR509 also contains a sequence of 6,497 bp from the digestion of λ phage with *Bam*HI and *Sph*I. Digestion of pBR509 with *Sal*I and *Eag*I allowed ligation of these two ends with two "tails" labeled with biotin and digoxigenin, respectively. The two different DNA "tails" are synthesized by PCR by using biotin-labeled nucleotides in one and digoxigenin-labeled nucleotides in the other. In so doing, the labels will be on both strands of the DNA tail. The biotinylated tail and the digoxigeninated one, ~1000 bp long, will contain an *Eag*I and a *Sal*I site, respectively. In this way, after digestion of the tails, they can be ligated to the opposite ends of the fragment from pBR509. Single molecules of DNA were attached at one end to the glass surface of a microscope flow-chamber and at the other end to a paramagnetic bead 2.8 μ m in diameter. Magnetic tweezers (4) were used to twist and pull single DNA molecules attached to the beads, and the length of the DNA was monitored by 3D, video-rate monitoring of the bead (5). By tracking the 3D position of the tethered bead (5, 6), the extension $l = \langle z \rangle$ of the molecule can be

Abbreviations: HU, heat unstable nucleoid protein; GalR, gal repressor dimer protein; SSB, single-stranded binding protein; ssDNA, single-stranded DNA.

[†]Present address: Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France.

^{**}To whom correspondence should be addressed at: Dipartimento di Biologia and Centro Interdipartimentale Materiali e Interfacce Nanostrutturate, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy. E-mail: laura.finzi@unimi.it.

© 2003 by The National Academy of Sciences of the USA

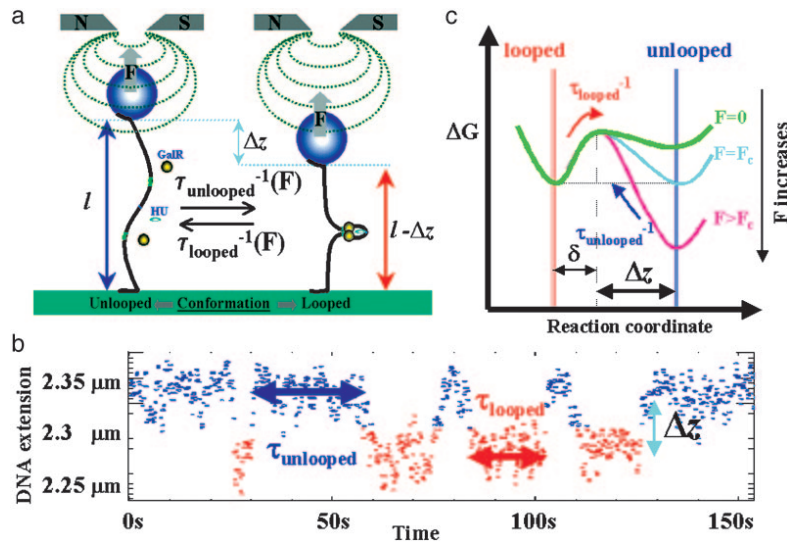


Fig. 1. Experimental set-up. (a) A single DNA molecule tethering a magnetic bead to a surface can be twisted and stretched by using small magnets placed above the sample. DNA loop formation by GalR and HU reduces the bead-to-surface distance by an amount Δz at the expense of the work, $F\Delta z$, performed against the stretching force F . The tension on the DNA may be used to tune the transition rates, $(\tau_{\text{unlooped}})^{-1}$ and $(\tau_{\text{looped}})^{-1}$, between the unlooped and looped state. (b) A typical telegraph-like signal. (c) A diagram illustrating the variation of ΔG for the reaction involving the DNA conformational change associated with loop opening. The activation energy for loop opening, $E_b - \delta F$, is slightly decreased on pulling, whereas the activation energy for loop formation, $E_f + F\Delta z$, is increased on pulling.

measured, with an error of ≈ 10 nm with 1-s averaging. The horizontal motion of the bead $\langle \Delta x^2 \rangle$ allows the determination of the stretching force via the equipartition theorem: $F = k_B T$

$1/\langle \Delta x^2 \rangle$. F was measured with 10% accuracy. To eliminate microscope drift, differential tracking was performed via a second bead glued to the surface.

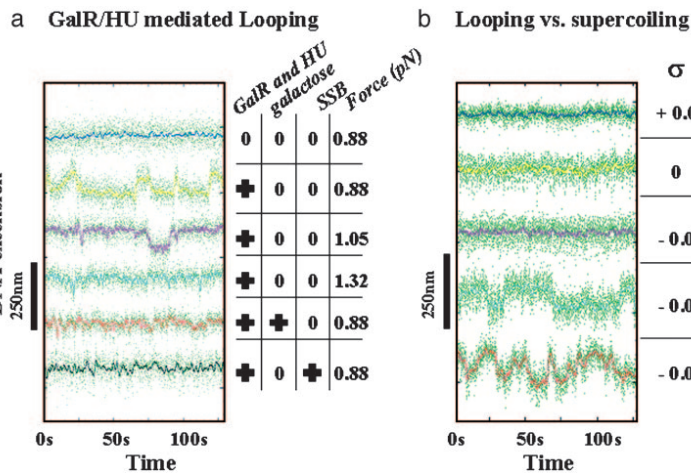


Fig. 2. Traces of DNA length vs. time. The green dots are raw data, whereas the continuous colored lines are the averaged signal. The pertinent conditions are indicated beside each trace. Measurements were conducted at room temperature by using a solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM DTT, 50 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂. The GalR and HU concentrations were 25 nM and 50 nM, respectively. BSA and SSB were used at concentrations of 40 nM. (a) Variations in DNA extension at constant supercoiling ($\sigma = -0.03$) and force at $F = 0.88$ pN, unless otherwise stated. DNA with: no proteins (turquoise), GalR and HU (yellow), GalR and HU with a tension of 1.05 pN (purple), GalR and HU with a tension of 1.32 pN (cyan), GalR and HU and galactose (red), GalR, HU, and SSB (dark green). (b) DNA extension at $F = 0.88$ pN, in the presence of GalR and HU as a function of supercoiling. $\sigma = +0.03$ (blue); $\sigma = 0$ (yellow); $\sigma = -0.015$ (purple); $\sigma = -0.03$ (cyan); and $\sigma = -0.06$ (red). σ is the superhelical density in the DNA defined as $(Lk - Lk_0)/Lk_0$, where Lk is the linking number of DNA and is given by the sum of its twist (Tw) and writhe (Wr). In relaxed DNA, $Lk = Lk_0 = Tw = (\text{number of bp})/10.4$ bp. Similarly, in our single-molecule experimental conditions in which DNA molecules are stretched, the distribution between Tw and Wr is about 3:1 whereas in plasmids (unnickd and under no tension) it is about 1:3. As a result, the torsion within each molecule in our measurements at $\sigma = -0.03$ (i.e., with $Tw \approx 0.022 Lk_0$) is slightly higher than the torsion present in a plasmid at $\sigma = -0.06$ (i.e., with $Tw \approx 0.015 Lk_0$).

Data Processing. Traces with transitions between longer (unlooped) to shorter (looped) lengths were best fitted to the raw data $l(t)$ (filtered at 2 Hz) by using a sliding Heaviside (step) function: $l_{\text{step}}(t) = s\theta(t - t_1) + l_1$ defined over a time window of size T_{av} . In other words, for every t_0 of the data set, the parameters of the step function (s, t_1, l_1) were fitted such as to minimize the error $(l(t) - l_{\text{step}}(t))^2$ in the time window $t_0 < t < t_0 + T_{\text{av}}$, where only one transition is expected. At the end, the parameters that consistently scored best (χ^2 test) were selected as steps. The time interval between successive looped and unlooped steps was binned to form histograms of τ_{unlooped} (τ_{looped}) corresponding to the time spent in the longer (shorter) state.

Free Energy Calculation: Loop Formation. For an activated process Arrhenius' law yields (7): $\tau_{\text{unlooped}}(F) = \tau_0 \exp((E_f + F\Delta z)/k_B T)$ and $\tau_{\text{looped}}(F) = \tau_0 \exp((E_b - F\delta)/k_B T)$. τ_{unlooped} and τ_{looped} are the average lifetimes of the unlooped and looped conformations, E_f and E_b are the energy barriers to formation and breakdown of the DNA loop at zero force, k_B is Boltzmann's constant, T is the temperature, Δz is the decrease in the DNA's extension due to the formation of a loop, and δ is the minimum separation between the two GalR dimers that leads to loop breakdown (6) [about 1 nm (8)]. Considering both looping and unlooping to be first order reactions, the free energy of looping is therefore: $\Delta G_1 = k_B T \ln(\tau_{\text{unlooped}}/\tau_{\text{looped}})$. Notice that at the critical force $F = F_c$ where $\tau_{\text{unlooped}} = \tau_{\text{looped}}$: $\Delta G_1 = 0$. The free energy of looping at zero force is thus: $\Delta G_{1,0} = E_f - E_b = -F_c(\Delta z + \delta)$ (see *Supporting Text*, which is published as supporting information on the PNAS web site, www.pnas.org).

Transcription Assays. Supercoiled DNA plasmids (2 nM) were preincubated at 37°C for 5 min in transcription buffer (20 mM Tris acetate/10 mM Mg acetate/50 mM NaCl) supplemented with 1 mM DTT, 1 mM ATP, and 0.8 units recombinant ribonuclease inhibitor (rRNasin) and 20 nM RNA polymerase in a total reaction volume of 50 μ l. When required, 80 nM GalR and/or 160 nM HU and/or single-stranded binding protein (SSB) were added before RNA polymerase. To start the transcription reactions, nucleotides were added to a final concentration of 0.1 mM GTP and CTP, 0.01 mM UTP, and 5 μ Ci [α - 32 P]UTP (1 Ci = 37 GBq). The reactions were incubated for an additional 10 min before they were terminated by the addition of an equal volume (50 μ l) of loading dye (90% formamide/10 mM EDTA/0.1% xylene cyanol/0.1% bromophenol blue). Samples were heated to 90°C for 2–3 min, chilled, then loaded on an 8% sequencing gel and electrophoresed at a constant power of 60 W in TBE (90 mM Tris/64.6 mM boric acid/2.5 mM EDTA, pH 8.3). The RNAI transcripts (108 nt) were used as an internal control to quantify the relative number of *gal* transcripts.

Results and Discussion

DNA molecules that were negatively supercoiled by at least 3% ($\sigma = -0.03$) and stretched with a force (F) of 0.88 pN intermittently switched between two conformations in the presence of both GalR and HU (Figs. 1b and 2a). We verified that no telegraphic signals were observed in the absence of GalR and/or HU (data not shown), or in the presence of 40 nM D(+)-galactose, an inducer of *gal* transcription (Fig. 2a). Similarly, GalR and HU did not generate looping in molecules containing only one operator, O_E or O_I (data not shown). Taken together, these measurements confirm the widely held hypothesis that GalR and HU induce DNA looping in the *gal* operon.

The higher force was expected to shift the thermodynamic equilibrium to favor the unlooped form (Fig. 1c). Indeed, the probability of looping decreased when the tension was raised to 1.32 pN (Fig. 2a). Interestingly, the length of DNA that separates the GalR binding sites O_E and O_I (113 bp or 38 nm for B-DNA)

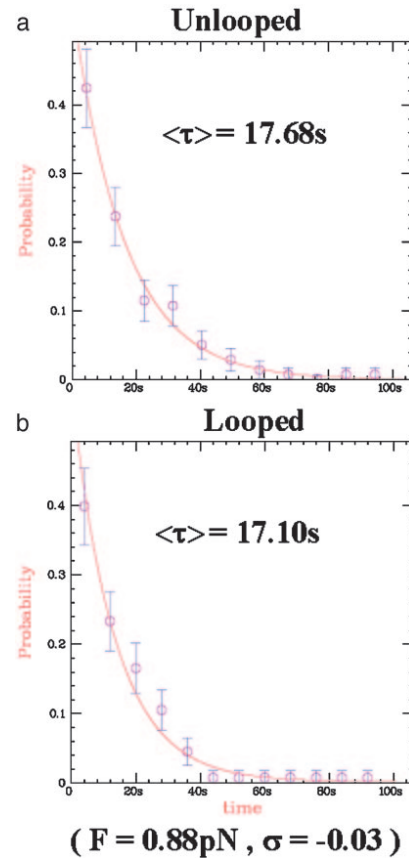


Fig. 3. Mean lifetimes of the looped and the unlooped DNA conformations were calculated from histograms of the lifetimes at $F = 0.88$ pN and 3% negative supercoiling.

is less than the 55 ± 5 nm transition (Δz) observed experimentally. This finding is consistent with a recently proposed antiparallel loop (9) in which the DNA exiting the loop complex gradually bends to align in the direction of stretching.

Kinetic and Thermodynamic Parameters. By analyzing the lifetimes of the looped and unlooped DNA conformations in traces like those in Fig. 2, we were able to determine the mean lifetimes as a function of force and calculate the free energy changes of the looping reactions. In all cases, the lifetime distributions were well fit by single exponentials (Fig. 3). Thus, in our experiment, loop formation and breakdown can be analyzed as a two-state system. At a force of 0.88 pN, the mean lifetimes for both the looped and unlooped conformations were 17 s. The lifetimes for zero tension were calculated applying the following relations: $\tau_{\text{unlooped}}(F) = \tau_{\text{unlooped}}(0) \exp(F\Delta z/k_B T)$, where $\Delta z \approx 55$ nm and $\tau_{\text{looped}}(F) = \tau_{\text{looped}}(0) \exp(-F\delta/k_B T)$, where $\delta \approx 1$ nm (8) yielding $\tau_{\text{unlooped}}(0) \approx 0.1$ ms and $\tau_{\text{looped}}(0) \approx 21$ s. Thus, the lifetime of the unlooped state dramatically increases with the DNA tension, whereas the life time of the GalR/HU-mediated loop remains

single-stranded DNA (ssDNA) in the unwound segment induced by negative supercoiling. Such a conformation would lower the energy required for looping, because ssDNA is more flexible than double-stranded DNA. The model just hypothesized is described in Fig. 4.

To test this hypothesis, we investigated whether or not SSB interfered with GalR/HU-mediated looping. SSB (23) and HU (24) proteins both have dissociation constants in the nanomolar range for binding to single-stranded DNA. Addition of SSB to our assay eliminated all transitions between looped and unlooped conformations (Fig. 2a), whereas BSA, used as a control, had no effect (data not shown). This result suggested that HU binding to ssDNA might be required for repression of the *gal* operon. SSB was also used in an *in vitro* transcription assay using supercoiled plasmids ≈ 3 kb long. In this case, SSB added before RNA polymerase did not alter simultaneous repression of *P1* and *P2* by HU and GalR (Fig. 5).

Energetic considerations nicely explain the difference between the *in vitro* transcription and the looping experiments. With 0.9 pN of tension in the DNA, the ΔG of loop formation is 0 and that of SSB binding to DNA is approximately $-9 k_B T$ (25). Thus, SSB is an effective competitor of GalR/HU-mediated looping. On the other hand, in the transcription assay in which the DNA is not stretched, the free energy change associated with loop formation becomes approximately $-12 k_B T$. At the same time, SSB binding becomes less favorable given the higher temperature of this assay (26) and cannot compete effectively with the looping reaction. Stretching the DNA deftly shifted the free energy landscape to favor competition by SSB, and it remains to be shown that *gal* DNA is under similar tension *in vivo*.

Conclusion

Our work shows that manipulation of single molecules permits the analysis of macromolecular machinery of increasing complexity. Kinetic control achieved through tensioning single DNA molecules permitted the characterization of a loop that is remarkably stabilized thermodynamically by the HU protein. Such a high negative free energy change ensures rapid repression when galactose is unavailable. SSB interfered with the formation of the loop in gently stretched molecules, which might be relevant to conditions *in vivo*, in which genomic DNA is supercoiled, topologically constrained by proteins, and locally tensioned by DNA processing enzymes (27). Transcriptional control via such a loop would be inherently sensitive to the local environmental and energetic context. The multifactorial and characteristic kinetic and thermodynamic properties of *gal* DNA looping distinguish a dynamic system for reducing the expression of the products of *gal* operon (28). Besides induction (loop breakdown) of the operon by D(+)-galactose, which acts by inactivating GalR, the loop must break down for expression in response to anabolic needs resulting from changes in DNA superhelicity or HU concentration (29–31).

This work was supported by grants from Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) and the Human Frontier Science Program (HFSP) (to L.F.); grants from MIUR (to D.D.); an Erasmus fellowship (to G.L.); grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (to V.C.); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ecole Normale Supérieure (ENS), Université Paris VI, and Université Paris VII and CEE MolSwitch (to D.B.); support from the French Ministère de la Recherche (to J.-F.A.); and grants from the National Institutes of Health Intramural Research Program (to S.A. and D.E.A.L.).

- Irani, M. H., Orosz, L. & Adhya, S. (1983) *Cell* **32**, 783–788.
- Aki, T., Choy, H. E. & Adhya, S. (1996) *Genes Cells* **1**, 179–188.
- Choy, H. E., Park, S. W., Parrack, P. & Adhya, S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7327–7331.
- Strick, T. R., Allemand, J. F., Bensimon, D. & Croquette, V. (1996) *Science* **271**, 1835–1837.
- Grosse, C. & Croquette, V. (2002) *Biophys. J.* **82**, 3314–3329.
- Strick, T. R., Allemand, J. F., Croquette V. & Bensimon, D. (1998) *J. Stat. Phys.* **93**, 647–672.
- Rief, M., Fernandez, J. & Gaub, H. (1998) *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4764–4767.
- Marko, J. F. & Siggia, E. D. (1997) *Biophys. J.* **73**, 2173–2178.
- Geanacopoulos, M., Vasmetzis, G., Zhurkin, V. B. & Adhya, S. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 432–436.
- Liphardt, J., Onoa, B., Smith, S. B., Tinoco, I., Jr., & Bustamante, C. (2001) *Science* **292**, 733–737.
- Whitson, P. A., Hsieh, W.-T., Wells, R. & Matthews, K. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4943–4946.
- Hsieh, W.-T., Whitson, P., Matthews, K. S. & Wells, R. D. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14583–14591.
- Finzi, L. & Gelles, J. (1995) *Science* **267**, 378–380.
- Strick, T. R., Croquette, V. & Bensimon, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10578–10583.
- Allemand, J.-F., Bensimon, D., Lavery, R. & Croquette, V. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14152–14157.
- Hwa, T., Marinari, E., Sneppen, K. & Tang, L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4411–4416.
- Aki, T. & Adhya, S. (1997) *EMBO J.* **16**, 3666–3674.
- Bonnefoy, E., Takahashi, M. & Rouvière-Yaniv, J. (1994) *J. Mol. Biol.* **242**, 116–129.
- Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J. & Boiteux, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10291–10296.
- Kobryn, K., Lavoie, D. & Chaconas, G. (1999) *J. Mol. Biol.* **289**, 777–784.
- Grove, A., Galeone, A., Mayol, L. & Geiduschek, E. P. (1996) *J. Mol. Biol.* **260**, 196–206.
- Grove, A. & Lim, L. (2001) *J. Mol. Biol.* **311**, 491–502.
- LeCaptain, D. J., Michel, M. A. & Van Orden, A. (2001) *Analyst* **126**, 1279–1284.
- Kamashev, D. & Rouvière-Yaniv, R. (2000) *EMBO J.* **19**, 6527–6535.
- Bujalowski, W. & Lohman T. M. (1987) *J. Mol. Biol.* **195**, 897–907.
- Overman, L. B., Bujalowski, W. & Lohman, T. (1988) *Biochemistry* **27**, 456–471.
- Forde, N. R., Izhaky, D., Woodcock, G. R., Wuite, G. J. & Bustamante, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11682–11687.
- Adhya, S. (1987) in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, ed. Neidhardt, F. (Am. Soc. Microbiol., Washington, DC) pp. 1503–1512.
- Claret, L. & Rouvière-Yaniv, J. (1997) *J. Mol. Biol.* **273**, 93–104.
- Wei, Y., Lee, J. M., Richmond, C., Blattner, F. R., Rafalski, J. A. & LaRossa, R. A. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 545–556.
- Azam, T. A. & Ishihama, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33105–33113.

Derivations for the web site

For an activated process, the larger the activation barrier the exponentially-longer the life-

time. The activation barrier from the unlooped to the looped state is increased when pulling on the molecule from E_f to $E_f + F\Delta z$, where E_f is the energy barrier for the formation of the loop at $F = 0$ and δz is the decrease in DNA extension due to the formation of the loop, see fig. 1c (paper) . Thus if we define :

- E_f the activation energy necessary for loop formation in the absence of external force applied to the DNA ($F = 0$)
- $E_f + F\delta z$ the activation energy for loop formation in the presence of external force applied to the DNA ($F \neq 0$)
- E_b the activation energy for loop breakdown in the absence of external force applied to the DNA ($F = 0$)
- $E_b - F\delta$ the activation energy for loop breakdown in the presence of external force applied to the DNA ($F \neq 0$).

The lifetime of the unlooped DNA conformation as a function of an externally applied force, according to Arrhenius law is :

$$\tau_{unlooped}(F) = \tau_0 \times e^{\frac{E_f + F\Delta z}{k_B T}} \quad (\text{A.1})$$

where τ_0 is the typical molecular relaxation time, k_B is the Boltzman constant and T is the temperature.

This can be re-written as :

$$\tau_{unlooped}(F) = \tau_0 \times e^{\frac{E_f}{k_B T}} \times e^{\frac{F\Delta z}{k_B T}} \quad (\text{A.2})$$

The first product on the right hand-side of the equation above is the unlooped lifetime in the absence of force thus, we can re-write it as follows :

$$\tau_{unlooped}(F) = \tau_{unlooped}(0) \times e^{\frac{F\Delta z}{k_B T}} \quad (\text{A.3})$$

Similarly, the lifetime of the looped DNA conformation as a function of an externally applied force is :

$$\tau_{looped}(F) = \tau_0 \times e^{\frac{E_b - F\delta}{k_B T}} \quad (\text{A.4})$$

which is equivalent to :

$$\tau_{looped}(F) = \tau_0 \times e^{\frac{E_b}{k_B T}} \times e^{\frac{-F\delta}{k_B T}} \quad (\text{A.5})$$

Again, the first product on the right hand-side of the equation above is the looped lifetime in the absence of force thus, we can re-write it as follows :

$$\tau_{looped}(F) = \tau_{looped}(0) \times e^{\frac{-F\delta}{k_B T}} \quad (\text{A.6})$$

The free energy variation of loop formation is :

$$\Delta G_l = k_B T \ln \frac{\tau_{unlooped}}{\tau_{looped}} \quad (\text{A.7})$$

Substituting in eqn. 7, eqns. 6 and 3 :

$$\Delta G_l = k_B T \ln \frac{\tau_{unlooped}(0) \times e^{F\Delta z/k_B T}}{\tau_{looped}(0) \times e^{-F\delta/k_B T}} \quad (\text{A.8})$$

$$\Delta G_l = k_B T \ln \frac{\tau_0 \times e^{E_f/k_B T} \times e^{F\Delta z/k_B T}}{\tau_0 \times e^{E_b/k_B T} \times e^{-F\delta/k_B T}} \quad (\text{A.9})$$

Simplifying out the τ_0 and grouping the exponents,

$$\Delta G_l = k_B T \ln$$

Simplifying and grouping :

$$\Delta G_l = (E_f - E_b) + F(\Delta z + \delta) \quad (\text{A.11})$$

$$\Delta G_l = \Delta G_{l,0} - F(\Delta z + \delta) \quad (\text{A.12})$$

Where $\Delta G_{l,0}$ is the free energy of loop formation in the absence of force ($F = 0$).

At $F = F_c$, $\Delta G_l = 0$ (see text), thus

$$\Delta G_{l,0} = F_c(\Delta z + \delta) \quad (\text{A.13})$$

At $F = F_c = 0.88 \text{ pN}$,

$$- \tau_{looped}(F_c) = \tau_{unlooped}(F_c) \cong 17 \text{ s}$$

at $F = 0$, using $\Delta z = 55 \text{ nm}$ and $\delta = 1 \text{ nm}$:

$$- \tau_{unlooped}(0) \cong 0.1 \text{ ms}$$

$$- \tau_{looped}(0) \cong 21 \text{ s},$$

thus :

$$- \Delta G_{l,0} = F_c(\Delta z + \delta) \sim -12 k_B T.$$

Annexe B

Protocoles expérimentaux

B.1 Constructions d'ADN

B.1.1 L'ADN pour les pinces magnétiques

La construction d'ADN est composée de trois parties distinctes : un fragment principal (environ 3.3kb) obtenu après digestion par NdeI et HindIII du plasmide pSA850 (qui provient du laboratoire de S. Adhya) extrait de bactéries *E. coli* en phase exponentielle en utilisant le kit Plasmid-extraction Qiagen.

Parallèlement, une molécule d'ADN de l'ordre de 800 paires de bases est synthétisée par PCR à partir du plasmide pSA850 autour du site MCS. Nous utilisons des nucléotides d'UTP marqués par la biotine ou la digoxigénine (Roche). Le fragment marqué par la biotine est digéré avec NdeI, alors que le fragment marqué par la digoxigénine est coupé avec HindIII.

Toutes les purifications des fragments d'ADN ont été faites en utilisant le PCR purification kit Qiagen, l'échantillon a ensuite été concentré avec le filtre Microcon100 (Millipore). Enfin, la ligation de ces trois fragments donne une molécule d'environ 3.6 kb *a priori* sensible à la torsion. Cependant une fraction variable des molécules possède généralement au moins une cassure simple brin.

B.1.2 Préparation de l'ADN pour les expériences TPM et AFM

L'ADN utilisé pour les expériences de TPM a été obtenu en amplifiant par PCR une amorce d'ADN d'environ 900 pb du plasmide pUC19 en utilisant des amorces marquées avec de la biotine et de la digoxigénine. Les amorces ont été purifiées après avec le PCR purification Kit de Qiagen. L'ADN utilisé pour les expériences AFM a été obtenu en amplifiant par PCR une amorce d'ADN de 900 pb du plasmide pOid-O1 (donné par le chercheur Sankar Adhya) et purifié avec le kit Quiagen, l'ADN étant finalement resuspendu dans le tampon TE (10mM Tris (pH 8.8), 1mM EDTA) préparé avec de l'eau stérile déionisée de qualité HPLC (Sigma-Aldrich).

B.2 Préparation des capillaires pour les pinces magnétiques

Le protocole utilisé pour préparer les chambres réactionnelles (petits capillaires en verre de 50 mm x 1 mm x 1 mm) est le suivant : la surface du capillaire est rincée avec une solution 5M NaOH pour activer les silicates de surface. Elle est ensuite rincée avec de l'eau déionisée

et séchée avec un jet d'argon. Ensuite, elle est placée sur une platine chauffante pour quelques minutes, puis incubée avec du Sigmacote (Sigma-Aldrich), qui forme une couche de polysilane sur la surface. Après 20 – 30 min. d'incubation sur la plaque chauffante, elle est incubée avec de l'Antidigoxigénine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans PBS). L'incubation dure environ trois heures. Enfin la surface est passivée et conservée à 4°C jusqu'à utilisation dans une solution contenant du PBS, 1% BSA, 1% Pluronic F_{127} (Sigma-Aldrich), et 0.01% NaN_3 .

B.3 Préparation des microchambres pour les expériences TPM

Après avoir préparé la microchambre comme cela est décrit dans le chapitre 2, on introduit de 7 à 15 μl d'antidigoxigénine(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans PBS) et on incube la chambre pendant 30 min. à température ambiante. On fait une vingtaine de rinçages avec du PBS contenant 0.1% de BSA. On ajoute ensuite une solution 8×10^{-13} M d'ADN conservé dans le tampon TE (10 mM Tris (pH 8.8), 1 mM EDTA) et on laisse incuber 1 h à température ambiante. On fait une vingtaine de rinçages avec du PBS en contenant 0.1% de BSA, on rajoute une dizaine de μl ($\approx 1 \times 10^{11}$ billes) des billes de 480 nm de diamètre recouvertes de streptavidine (Indicia Biotechnology). Après 20 min. on rince avec le tampon de la protéine.

B.4 Préparation des disques de Mica pour l'AFM

Des disques de mica (Ted Pella Inc., Redding, California) sont collés avec de la colle acrylique à un support en métal. On clive ensuite le mica en détachant une à une les couches superficielles avec du ruban adhésif. Sur le mica clivé, on dépose 7 à 10 μl de poly-L-ornitine (100 ng/ μl)(Sigma St.Louis, MO) et on laisse incuber pendant 5 min., ensuite, on rince avec 800 μl d'eau déionisée qualité HPLC (Sigma-Aldrich). On sèche avec de l'azote et on rajoute 10 à 20 μl d'une solution d'ADN diluée soit dans le tampon de la protéine (sans BSA et préparée avec de l'eau déionisée) de façon à atteindre la concentration souhaitée, soit dans un mélange ADN/protéine. On laisse incuber entre 2 et 5 min, puis on rince avec de l'eau déionisée HPLC et on sèche avec de l'azote.

B.5 Tampon de la protéine

Le tampon standard que j'ai utilisé pour toutes les expériences (Pincés Magnétiques, TPM et AFM) avec les facteurs de remodelage, était le suivant :

- 50mM *KCl*
- 10mM *Hepes* (pH 7.8)
- 3mM *MgCl₂*
- 0.1mM *DTT*

Dans les expériences TPM et avec les pincés magnétiques, j'ai rajouté au tampon de la BSA (0.1%).

B.6 Analyse de données

Tous les programmes d'analyse de traces enzymatiques obtenues avec les pincés magnétiques, ainsi que des programmes de traitements (histogrammes, ajustements, etc.) ont été

écrits en C et intégrés dans XV , le programme d'interface et d'acquisition écrit par Vincent Croquette. Pour la détermination des changements de longueur des molécules d'ADN due à l'interaction avec les protéines utilisées, on a ajusté chaque bouffée d'activité par un polygone à 5 segments. Les segments 1, 3 et 5 sont horizontaux et on impose aux segments 1 et 5 d'être au même niveau. Les coordonnées $l_i, t_i (i = 1, \dots, 6)$ des sommets des segments sont ajustés en minimisant l'erreur avec le χ^2 test. La variation de longueur est égale à $\delta l_n = l_3 - l_2 = l_4 - l_5$, et le τ_{on} et τ_{off} pour une bouffée activité particulière est égaux respectivement à $\tau_{on} = t_3 - t_2$ et $\tau_{off} = t_5 - t_4$.

Pour la détermination du degré de surenroulement dans la boucle transloquée par RSC et ISWI, on a appliqué la relation suivante :

$$|\sigma^\pm| \equiv \frac{n^\pm}{|l_t^\pm|} h \quad (\text{B.1})$$

où n^\pm est le nombre de tours introduits dans l'ADN surenroulé respectivement positivement et négativement, l_t^\pm est la longueur de la boucle transloquée dans l'ADN surenroulé (\pm) et h est le pas hélicale de l'hélice de l'ADN.

Le nombre de tours introduits par le complexe RSC est donné par la relation suivante :

$$\delta l^\pm = l_t^\pm \mp n^\pm l_p \quad (\text{B.2})$$

où δl^\pm est la variation de longueur observée dans l'ADN surenroulé respectivement positivement et négativement et l_p est la longueur du plectonème à la force à laquelle on a fait les expériences.

Le nombre de tours introduits par ISWI est donné par la relation suivante :

$$\delta l^\pm = l_t^\pm \pm n^\pm l_p. \quad (\text{B.3})$$

Pour les deux relations on a fait l'hypothèse que la boucle transloquée est la même dans l'ADN surenroulé (\pm) et que cette valeur correspond à la boucle transloquée dans l'ADN nické (δl_{nick}).

Le programme utilisé pour suivre le mouvement de la bille dans la technique TPM a été écrit par le chercheur D. Brogioli. Les traces ont été traitées et analysées par la suite avec le programme Origin 7. Les images AFM ont été analysées avec le programme OpenSource ImageJ pour mesurer la longueur des molécules et le programme WSxM (Nanotech, Inc.) pour la détermination de la hauteur.

Bibliographie

- [1] T.R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404 :901–904, 2000.
- [2] M.N. Dessinges, T. Lionnet X.G. Xi, D. Bensimon, and V. Croquette. Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 :6439–6444, 2004.
- [3] Lia G, Bensimon D, Croquette V, Allemand JF, Dunlap D, Lewis DE, Adhya S, and Finzi L. Supercoiling and denaturation in gal repressor/heat unstable nucleoid protein (hu)-mediated dna looping. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100 :11373–11377, 2003.
- [4] O.A. Saleh, C. Perals, F.X. Barre, and J.F. Allemand. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J.*, 23 :2430–2439, 2004.
- [5] W. Saenger. Principle of nucleic acid structure. *Springer-Verlag*, 1988.
- [6] G. Arents, R.W. Burlingame, B.C. Wang, W.E. Love, and E.N. Moudrianakis. The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å resolution : a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(22) :10148–10152, 1991.
- [7] A.D. Baxevanis and D. Landsman. Histone and histone fold sequences and structures : a database. *Nucleic Acids Res*, 25(1) :272–273, 1997.
- [8] A.D. Baxevanis, G. Arents, E.N. Moudrianakis, and D. Landsman. A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif. *Nucleic Acids Res*, 23(14) :2685–2691, 1995.
- [9] T.J. Leach, M. Mazzeo, H.L. Chotkowski, J.P. Madigan, M.G. Wotring, and R.L. Glaser. Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of drosophila melanogaster. *J Biol Chem*, 275(30) :23267–23272, 2000.
- [10] R. Faast, V. Thonglairoam, T.C. Schulz, J. Beall, J.R. Wells, H. Taylor, K. Matthaei, P.D. Rathjen, D.J. Tremethick, and I. Lyons. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*, 11(15) :1183–1187, 2001.
- [11] P. Oudet, M. Gross-Bellard, and P. Chambon. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4(4) :281–300, 1975.
- [12] R.D. Kornberg. Chromatin structure : a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184 :868–871, 1974.
- [13] R.D. Kornberg and J.O. Thomas. Chromatine structure : oligomers of histones. *Science*, 184 :865–868, 1974.
- [14] D.R. Hewish and L.A. Burgoyne. Chromatin substructure. the digestion of chromatin at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 52 :504–510, 1973.

- [15] K. Luger, A. Mader, R. Richmond, D. Sargent, and T. Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 resolution. *Nature*, 389(6648) :251–260, 1997.
- [16] T.J. Richmond and C.A. Davey. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936) :145–150, 2003.
- [17] C.A. Davey, D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, and T.J. Richmond. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9Å^o resolution. *J Mol Biol.*, 319(5) :1097–1113, 2002.
- [18] A.N. Imbalzano, H. Kwon, M.R. Green, and R.E. Kingston. Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature*, 370(6489) :481–485, 1994.
- [19] C.R. Clapier, G. Langst, D.F. Corona, P.B. Becker, and K.P. Nightingale. Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol Cell Biol.*, 21(3) :875–883, 2001.
- [20] J. Bednar, R.A. Horowitz, S.A. Grigoryev, L.M. Carruthers, J.C. Hansen, A.J. Koster, and C.L. Woodcock. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 :14173–14178, 1995.
- [21] L.M. Carruthers, J. Bednar, C.L. Woodcock, and J.C. Hansen. Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays : mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry*, 37 :14776–14787, 1998.
- [22] S. Khochbin, A. Verdel, C. Lemerrier, and D. Seigneurin-Berny. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*, 11 :162–166, 2001.
- [23] S. Khorasanizadeh. The nucleosome : from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116 :259–272, 2004.
- [24] J. Widom and A. Klug. Structure of the 300nm chromatin filament : X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, 43(1) :207–213, 1985.
- [25] X. Shen and M.A. Gorovsky. Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*. *Cell*, 86(3) :475–483, 1996.
- [26] K.M. Karrer and T.A. VanNuland. Nucleosome positioning is independent of histone H1 *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 274(46) :33020–33024, 1999.
- [27] K. Ohsumi, C. Katagiri, and T. Kishimoto. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science*, 262(5142) :2033–2035, 1993.
- [28] S. Dimitrov, M.C. Dasso, and A.P. Wolffe. Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extract : the role of core histone phosphorylation and linker histone H4 in chromatin assembling. *J. Cell. Biol.*, 126(3) :591–601, 1994.
- [29] J.R. Paulson and U.K. Laemmli. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3) :817–828, 1977.
- [30] J.R. Marsden and U.K. Laemmli. Metaphase chromosome structure : evidence for a radial loop model. *Cell*, 17(4) :849–858, 1979.
- [31] M.G. Poirer, A. Nemani, P. Gupta, S. Eroglu, and J.F. Marko. Probing chromosome structure with dynamic force relaxation. *Phys. Rev. Lett.*, 86(2) :360–363, 2001.
- [32] N. Sadoni, S. Langer, C. Fauth, G. Bernardi, T. Cremer, B.M. Turner, and D. Zink. Nuclear organization of mammalian genomes. polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell. Biol.*, 146(6) :1211–1226, 1999.

- [33] H. Tanabe, F.A. Habermann, I. Solovei, M. Cremer, and T. Cremer. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories : evolutionary considerations and functional implications. *Mutat. Res.*, 504(1-2) :37–45, 2002.
- [34] T. Cremer, G. Kreth, H. Koester, R.H. Fink, R. Heintzmann, M. Cremer, I. Solovei, D. Zink, and C. Cremer. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix : an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 10(2) :179–212, 2000.
- [35] T. Cremer and C. Cremer. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.*, 2(4) :292–301, 2001.
- [36] H.B. Sun, J. Shen, and H. Yokota. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J.*, 79(1) :184–190, 2000.
- [37] M. Cremer, J. von Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, J. Walter, C. Fischer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res.*, 9(7) :541–567, 2001.
- [38] J.A. Croft, J.M. Bridger, S. Boyle, P. Perry, P. Teague, and W.A. Bickmore. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell. Biol.*, 145(6) :1119–1131, 1999.
- [39] P.R. Cook. A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J. Cell. Sci.*, 108(9) :2927–2935, 1995.
- [40] J.J. Hayes and A.P. Wolffe. The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA. *Bioessay*, 14 :597–603, 1992.
- [41] M. Han and M. Grunstein. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell*, 55 :1137–1145, 1988.
- [42] P. Bouvet, S. Dimitrov, and A.P. Wolffe. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Genes Dev.*, 8 :1147–1159, 1994.
- [43] C.J. Fry and C.L. Peterson. Chromatin remodeling enzymes : who's first *Curr. Biol.*, 11 :R185–197, 2001.
- [44] T. Jenuwein and C.D. Allis. Translating the histone code. *Science*, 293(5532) :1074–1080, 2001.
- [45] C. Redon et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12 :162–169, 2002.
- [46] K. Ahmad and S. Henikoff. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 :16477–16484, 2002.
- [47] M. Vogelauer, J. Wu, N. Suka M., and Grunstein. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature*, 408 :495–498, 2000.
- [48] M. Braunstein, R.E. Sobel, C.D. Allis, B.M. Turner, and J.R. Broach. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.*, 16 :4349–4356, 1996.
- [49] B.D. Strahl and C.D. Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765) :41–45, 2000.
- [50] M.P. Cosma, T. Tanaka, and K. Nasmyth. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell*, 97 :299–311, 1999.

- [51] J.E. Krebs, M.H. Kuo, C.D. Allis, and C.L. Peterson. Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes. Dev.*, 13 :1412–1421, 1999.
- [52] T. Agalioti, S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, and D. Thanos. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, 103 :667–678, 2000.
- [53] S. Rea, F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, and T. Jenuwein. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406 :593–599, 2000.
- [54] Syntichaki, P., Topalidou, I., and G. Thireos. The Gcn5 bromodomain coordinates nucleosome remodelling. *Nature*, 404 :414–417, 2000.
- [55] J. Nakayama, J.C. Rice, B.D. Strahl, C.D. Allis, and S.I. Grewal. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*, 292 :110–113, 2001.
- [56] C. Dhalluin, J.E. Carlson, L. Zeng, C. He, A.K. Aggarwal, and M.M. Zhou. ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF. *J. Biomol. NMR*, 14 :291–292, 1999.
- [57] P. Ornaghi, P. Ballario, A.M. Lena, A. Gonzalez, and P. Filetici. The bromodomain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4. *J. Mol. Biol.*, 287 :1–7, 1999.
- [58] C. Dhalluin, J.E. Carlson, L. Zeng, C. He, A.K. Aggarwal, and M.M. Zhou. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399 :491–496, 1999.
- [59] L.J. Ball, N.V. Murzina, R.W. Broadhurst, A.R. Raine, S.J. Archer, F.J. Stott, A.G. Murzin, P.B. Singh, P.J. Dommelle, and E.D. Laue. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *Embo J*, 16 :2473–2481, 1997.
- [60] J.C. Eissenberg. Molecular biology of the chromo domain : an ancient chromatin module comes of age. *Gene*, 275 :19–29, 2001.
- [61] A.J. Bannister, P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire, and T. Kouzarides. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410 :120–124, 2001.
- [62] M. Lachner, D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410 :116–120, 2001.
- [63] K. Luger, A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389 :251–260, 2001.
- [64] S.K. Kurdistani and M. Grunstein. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4 :276–284, 1984.
- [65] B.G. Pogo, V.G. Allfrey, and A.E. Mirsky. The effect of phytohemagglutinin on ribonucleic acid synthesis and histone acetylation in equine leukocytes. *J. Cell. Biol.*, 35 :477–482, 1967.
- [66] V.G. Allfrey, B.G. Pogo, V.C. Littau, E.L. Gershey, and A.E. Mirsky. Histone acetylation in insect chromosomes. *Science*, 159 :314–316, 1968.
- [67] R. Reeves. Transcriptionally active chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, 782 :343–393, 1984.
- [68] S.Y. Roth, J.M. Denu, and C.D. Allis. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 70 :81–120, 2001.

- [69] R. Marmorstein. Structure of histone deacetylase : insights into substrate recognition and catalysis. *Structure(Camb)*, 9 :1127–1133, 2001.
- [70] L. Guarente. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.*, 14 :1021–1026, 2000.
- [71] M. Lachner, R.J. O’Sullivan, and T. Jenuwein. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.*, 116 :2117–2124, 2003.
- [72] W. Fischle, Y. Wang, S.A. Jacobs, Y. Kim, C.D. Allis, and S. Khorasanizadeh. Molecular basis for discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and Hp1 chromodomains. *Genes Dev.*, 17 :1870–1881, 2003.
- [73] J. Min, Y. Zhang, and R.M. Xu. Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev.*, 17 :1823–1828, 2003.
- [74] B.D. Strahl, R. Ohba, R.G. Cook, and C.D. Allis. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 96 :14967–14972, 1999.
- [75] B.E. Bernstein, E.L. Humphrey, R.L. Erlich, R. Schneider, P. Bouman, J.S. Liu, T. Kouzarides, and S.L. Schreiber. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 99 :8695–8700, 2002.
- [76] J. Dover, J. Schneider, M.A. Boateng, A. Wood, K. Dean, M. Johnston, and A. Shilatifard. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by RAD6. *J. Biol. Chem.*, 277(32) :28368–28371, 2002.
- [77] Y. Zhang and D. Reinberg. Transcription regulation by histone methylation : interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, 15 :2343–2360, 2001.
- [78] H. Wang, Z.Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, S.D. Briggs, C.D. Allis, J. Wong, P. Tempest, and Y. Zhang. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, 293 :853–857, 2001.
- [79] M.J. Hendzel, Y. Wei, M.A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B.R. Brinkley, D.P. Bazett-Jones, and C.D. Allis. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106 :348–360, 1997.
- [80] A. Van Hooser, D.W. Goodrich, C.D. Allis, B.R. Brinkley, and M.A. Mancini. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J. Cell. Sci.*, 111 :3497–3506, 1998.
- [81] Y. Wei, L. Yu, J. Bowen, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97 :99–109, 1999.
- [82] E. Kaszas and W.Z. Cande. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell. Sci.*, 113 :3217–3226, 2000.
- [83] J.Y. Hsu, Z.W. Sun, M. Reuben X. Li, K. Tatchel, D.K. Bishop, J.M. Grushcow, C.J. Brame, J.A. Caldwell, and D.F. Hunt. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 103 :279–291, 2000.

- [84] P. Cheung, C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103 :263–271, 2000.
- [85] V.A. Spencer and J.R. Davie. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240 :1–12, 1999.
- [86] S.L. Berger. An embarrassment of niches : the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. *Oncogene*, 20 :3007–3013, 2001.
- [87] W.S. Lo, R.C. Trievel, J.R. Rojas, L. Duggan, J.Y. Hsu, C.D. Allis, R. Marmorstein, and S.L. Berger. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell*, 5 :917–926, 2000.
- [88] G. Mathis and F.R. Althaus. Release of core DNA from nucleosomal core particles following (ADP-ribose)_n-modification in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143 :1049–1054, 1987.
- [89] M.H. Glickman and A. Ciechanover. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway : destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, 82 :373–428, 2002.
- [90] Y. Zhang. Transcription regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev.*, 17 :2733–2740, 2003.
- [91] Y. Shiio and R.N. Eisenman. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 :13225–13230, 2003.
- [92] N.R. Ballal, Y.J. Kang, M.O. Olson, and H. Busch. Changes in nucleolar proteins and their phosphorylation patterns during liver regeneration. *J. Biol. Chem.*, 250 :5921–5925, 1975.
- [93] P.S. Swerdlow, T. Schuster, and D. Finley. A conserved sequence in histone H2A which is a ubiquitination site in higher eucaryotes is not required for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 10 :4905–4911, 1990.
- [94] K. Robzyk, J. Recht, and M.A. Osley. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 287 :501–504, 2000.
- [95] S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, and W. J. Cook. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 194 :531–544, 1987.
- [96] R.T. Kamakaka and S Biggins. Histone variants : deviants ? *Genes Dev.*, 19 :295–316, 2005.
- [97] K. Ahmad and S. Henikoff. Centromeres are specialized replication domain in heterochromatin. *J. Cell. Biol.*, 153 :101–110, 2001.
- [98] K. Ahmad and S. Henikoff. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell*, 9 :1191–1200, 2002.
- [99] D.W. Abbott, V.S. Ivanova, X. Wang, W.M. Bonner, and J. Ausio. Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles : implications for transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, 276 :41945–41949, 2001.
- [100] N. Dhillon and R.T. Kamakaka. A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell*, 6 :769–780, 2000.
- [101] R.K. Suto, M.J. Clarkson, D.J. Tremethick, and K. Luger. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histon H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.*, 7 :1121–1124, 2000.
- [102] E.P. Rogaku, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, 273 :5858–5868, 1998.

- [103] C. Costanzi and J.R. Pehrson. Histone macroH2A1 is concentrated in inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393 :599–601, 1998.
- [104] A. Bird. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, 16 :6–21, 2002.
- [105] P.L. Jones and G.J.C. Wade et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet.*, 19 :187–191, 1998.
- [106] X. Nan et al. Transcription repression by methyl-CpGbinding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393 :386–389, 1998.
- [107] P.B. Becker and W. Horz. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.*, 71 :247–273, 2002.
- [108] A. Lusser and J.T. Kadonaga. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessay*, 25 :1192–1200, 2003.
- [109] G.J. Narlikar, H.Y. Fan, and R.E. Kingston. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108 :475–487, 2002.
- [110] T.G. Fazzio, C. Kooperberg, J.P. Goldmark, C. Neal, R. Basom, J. Delrow, and T. Tsukiyama. Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.*, 21 :6450–6460, 2001.
- [111] H. Reinke, P.D. Gregory, and W. Horz. A transient histone hyperacetylation signal marks nucleosomes for remodeling at the PHO8 promoter *in vivo*. *Mol. Cell*, 7 :529–538, 2001.
- [112] F.D. Urnov and A.P. Wolffe. Chromatin remodeling and transcriptional activation : the cast (in order of appearance). *Oncogene*, 20 :2991–3006, 2001.
- [113] F.C.P. Holstege, E.G. Jennings, J.J. Wyrick, T.I. Lee, C.J. Hengartner, M.R. Green, T.R. Golub, E.S. Lander, and R.A. Young. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95 :717–728, 1998.
- [114] J.M.A. Moreira and S. Holmberg. Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *EMBO J.*, 18 :2836–2844, 1999.
- [115] C. Muchardt and M. Yaniv. The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 10 :189–195, 1999.
- [116] D.J. Murphy, S. Hardy, and D.A. Engel. Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol. Cell. Biol.*, 19 :2724–2733, 1999.
- [117] J. Kehle, D. Beuchle, S. Treuheit, B. Christen, J.A. Kennison, M. Bienz, and J. Muller. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science*, 282 :1897–1900, 1998.
- [118] J. Kim, S. Sif, B. Jones, A. Jackson, J. Koipally, E. Heller, S. Winandy, A. Viel, A. Sawyer, T. Ikeda, R. Kingston, and K. Georgopoulos. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, 10 :345–355, 1999.
- [119] A.H. Hassan, K.E. Neely, M. Vignali, J.C. Rees, and J.L. Workman. Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Front. Biosci.*, 6 :D1054–D1064, 2001.
- [120] P. Prochasson, K.E. Neely, A.H. Hassan, B. Li, and J.L. Workman. Targeting activity is required for SWI/SNF function *in vivo* and is accomplished through two partially redundant activator-interaction domains. *Mol. Cell*, 12 :983–990, 2003.
- [121] J.P. Goldmark, T.G. Fazzio, P.W. Estep, G.M. Church, and T. Tsukiyama. The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell*, 103 :423–433, 2000.

- [122] J.L. Moreau, M. Lee, N. Mahachi, J. Vary, and J. Mellor. Regulated displacement of TBP from PHO8 promoter *in vivo* requires Cbf1 and the Isw1 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell*, 11 :1609–1620, 2003.
- [123] V.M. Sharma, B. Li, and J.C. Reese. SWI/SNF-dependent chromatin remodeling of RNR3 requires TAF(ii)s and general transcription machinery. *Genes Dev.*, 17 :502–515, 2003.
- [124] A.H. Hassan, P. Prochasson, K.E. Neely, S.C. Galasinski, M. Chandy, M.J. Carrozza, and J.L. Workman. Function and selectivity of bromodomain in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, 111 :369–379, 2002.
- [125] J.A. Eisen, K.S. Sweder, and P.C. Hanawalt. Evolution of the SNF2 family of proteins : subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.*, 23 :27152723, 1995.
- [126] A. Alexeev, A. Mazin, and S.C. Kowalczykowski. Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat. Struct. Biol.*, 10 :182–186, 2003.
- [127] V. Alexiadis and J.T. Kadonaga. Strand pairing by Rad54 and Rad51 is enhanced by chromatin. *Genes Dev.*, 16 :2767–2771, 2002.
- [128] J. Brzeski and A. Jerzmanowski. Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *Biol. Chem.*, 278 :823–828, 2003.
- [129] E. Citterio, V. van den Boom, G. Schitzler, R. Kanaar, E. Bonte, R.E. Kingston, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 20 :7643–7653, 2000.
- [130] M. Jaskelioff, S. van Komen, J.E. Krebs, P. Sung, and C.I. Peterson. Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *J. Biol. Chem.*, 278 :9212–9218, 2000.
- [131] X. Shen, G. Mizuguchi, A. Hamiche, and C. Wu. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, 406 :541–544, 2000.
- [132] A.N. Imbalzano. Energy-dependent chromatin remodelers : complex complexes and their components. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.*, 8 :225–255, 1998.
- [133] C.L. Peterson. Multiple SWItches to turn on chromatin? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6 :171–175, 1996.
- [134] J. Côté, J. Quinn J.L. Workman, and C.L. Peterson. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*, 265 :53–60, 1994.
- [135] F. Winston and M. Carlson. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.*, 8 :387–391, 1992.
- [136] J.N. Hirschhorn, S.A. Brown, C.D. Clark, and F. Winston. Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.*, 6 :2288–2298, 1992.
- [137] L. Wu and F. Winston. Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the SUC2 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 25 :4230–4234, 1997.
- [138] R.E. Kingstone and G.J. Narlikar. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.*, 13 :2339–2352, 1999.

- [139] B.R. Cairns, Y. Lorch, Y. Li, M. Zhang, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Du, B. Laurent, , and R.D. Kornberg. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87 :1249–1260, 1996.
- [140] S.L. Sanders, J. Jennings, A. Canutescu, A.J. Link, and P.A. Weil. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery : identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol. Cell. Biol.*, 22(13) :4723–4738, 2002.
- [141] C.L. Peterson, Y. Zhao, and B.T. Chait. Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family. *J. Biol. Chem.*, 273(37) :23641–23644, 1998.
- [142] M.L. Angus-Hill, A. Schlichter, D. Roberts, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and B.R. Cairns. A Rsc3Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol. Cell*, 7 :741–751, 2001.
- [143] B.R. Cairns, A. Schlichter, H Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.D. Kornberg, and F. Winston. Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol. Cell*, 4 :715–723, 1999.
- [144] R.H. Nicolas and G.H. Goodwin. Molecular cloning of polybromo, a nuclear protein containing multiple domains including five bromodomains, a truncated HMG-box, and two repeats of a novel domain. *Gene*, 175 :233–240, 1996.
- [145] I. Callebaut, J.C. Courvalin, and J.P. Mornon. The BAH (bromo-adjacent homology) domain : a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS lett.*, 446 :189–193, 1999.
- [146] G.H. Goodwin and R.H. Nicolas. The BAH domain, polybromo and the RSC chromatin remodelling complex. *Gene*, 268 :1–7, 2001.
- [147] R. Reeves and M.S. Nissen. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group i chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J. Biol.Chem.*, 265 :8573–8582, 1990.
- [148] H.H. Ng, F. Robert, R.A. Young, and K. Struhl. Genome-wide localisation and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.*, 16 :806–819, 2002.
- [149] B. Chai, J.M. Hsu, J. Du, and B.C. Laurent. Yeast rsc function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway. *Genetics*, 161 :575–584, 2002.
- [150] T. Hosostani, H. Koyama, M. Uchino, T. Miyakawa, and E. Tsuchiya. PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubules functions through the yeast EB1 homologues BIM1. *Genes Cells*, 6 :775–788, 2001.
- [151] M.J. Romeo, M.L. Angus-Hill, A.K. Sobering, Y. Kamada, B.R. Cairns, and D.E. Levin. HTL1 encodes a novel factor that interacts with the RSC chromatin remodeling complex in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.*, 22 :8165–8174, 2001.
- [152] M.L. Phelan, G.R. Schnitzler, and R.E. Kingston. Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI-SNF and its isolated ATPases. *Mol. Cell Biol.*, 20 :6380–6389, 2000.
- [153] M.L. Phelan, S. Sif, G.J. Narlikar, and R.E. Kingston. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol. Cell*, 3 :247–253, 1999.
- [154] J.C. Reyes, J. Barra, C. Muchardt, A. Camus, C. Babinet, and M. Yaniv. Altered control of cellular proliferation in absence of mammalian brahma (SNF2). *EMBO J.*, 17 :6979–6991, 1998.

- [155] S. Bultman, T. Gebuhr, D. Yee, C. La Mantia, J. Nicholson, A. Gilliam, F. Randazzo, D. Metzger, P. Chambon, G. Crabtree, and T. Magnuson. A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell*, 6(6) :1287–1295, 2000.
- [156] A. Klochendler-Yeivin, L. Fiette, J. Barra, C. Muchardt, C. Babinet., and M. Yaniv. The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep.*, 1 :500–506, 2000.
- [157] A. Klochendler-Yeivin, C. Muchardt, and M. Yaniv. SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12 :73–79, 2002.
- [158] J.A. Armstrong, J.J. Bieker, and B.M. Emerson. SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1 is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell*, 95 :93–104, 1998.
- [159] S. Kadam, G.S. McAlpine, M.L. Phelan, R.E. Kingston, K.A. Jones, and B.M. Emerson. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.*, 14 :2441–2451, 2000.
- [160] S. Kamakaka and B.E. Emerson. Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell*, 11 :377–389, 2003.
- [161] C. Muchardt and M. Yaniv. ATP-dependent chromatin remodelling : SWI/SNF and Co. are on the job. *J.Mol.Biol.*, 293 :187–198, 1999.
- [162] J.L. Dunaief, B.E. Strober, S. Guha, P.A. Khavari, K. Alin, J. Luban, M. Begemann, G.R. Crabtree, and S.P. Goff. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*, 79(1) :119–130, 1994.
- [163] B.E. Strober, J.L. Dunaief, S. Guha, and S.P. Goff. Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol.*, 16(4) :1576–1583, 1996.
- [164] P.A. Khavari, C.L. Peterson, J.W. Tamkun, D.B. Mendel, and G.R. Crabtree. BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, 366(6451) :170–174, 1993.
- [165] D.N. Reisman, M.W. Strobeck, B.L. Betz, J. Sciarriotta, W. Funkhouser, C. Murchardt, M. Yaniv, L.S. Sherman, E.S. Knudsen, and B.E. Weissman. Concomitant down-regulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines : differential effects on RB-mediated growth arrest vs CD44 expression. *Oncogene*, 21 :1196–1207, 2002.
- [166] K.B. Hendricks, F. Shanahan, and E. Lees. Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Mol. Cell Biol.*, 24 :362–376, 2004.
- [167] R. Aasland, A.F. Stewart, and T. Gibson. The SANT domain : a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional corepressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem. Sci.*, 21 :87–88, 1996.
- [168] G. Langst and P.B. Becker. ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol. Cell*, 8 :1085–1092, 2001.
- [169] T. Tsukiyama and C. Wu. Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7 :182–191, 1997.
- [170] P.D. Varga-Weisz, M. Wilm, E. Bonte, K. Dumas, M. Mann, and P.B. Becker. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, 388 :598–602, 1997.

- [171] G. Langst, E.J. Bonte, D.F. Corona, and P.B. Becker. Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell*, 97 :843852, 1999.
- [172] T. Ito, M. Levenstein, D. Fyodorov, A. Kutach, R. Kobayashi, and J. Kadonaga. ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Dev.*, 13 :15291539, 1999.
- [173] A. Eberharter, S. Ferrari, G. Langst, T. Straub, A. Imhof, P. Varga-Weisz, M. Wilm, and P.B. Becker. Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI induced nucleosome remodelling. *Embo J.*, 20 :3781–3788, 2001.
- [174] R. Strohner, A. Nemeth, P. Jansa, U. Hofmann-Rohrer, R. Santoro, G. Langst, and I. Grummt. NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *Embo J.*, 20 :4892–4900, 2001.
- [175] K. Ikeda, D.J. Steger, A. Eberharter, and J.L. Workman. Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol. Cell. Biol.*, 19 :855–863, 1999.
- [176] J. Kamine, B. Elangovan, T. Subramanian, D Coleman, and G. Chinnadurai. Identification of a cellular protein specifically interacts with essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*, 216 :356–366, 1996.
- [177] D.F. Corona, G. Langst, C.R. Clapier, E.F. Bonte, S. Ferrari, J.W. Tamkun, and P.B. Becker. ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol. Cell*, 3 :239245, 1999.
- [178] T. Ito, M. Bulger, M.J. Pazin, R. Kobayashi, and J. Kadonaga. ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, 90 :145155, 1997.
- [179] A. Hamiche, R. Sandaltzopoulos, D.A. Gdoula, and C. Wu. ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Mol. Cell. Biol.*, 19 :1132–1144, 1999.
- [180] T. Tsukiyama and C. Wu. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*, 83 :10111020, 1995.
- [181] P.A. Wade, P.L. Jones, D. Vermaak, and A.P. Wolffe. A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr. Biol.*, 8 :843–846, 1999.
- [182] Y. Zhang, H.H. Ng, H., Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.*, 13 :1924–1935, 1999.
- [183] J.K. Tong, C.A. Hassig, G.R. Schnitzler, R.E. Kingston, and S.L. Schreiber. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodeling complex. *Nature*, 395 :917–921, 1998.
- [184] Y. Xue, J. Wong, G.T. Moreno, M.K. Young, J. Cote, and W. Wang. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell*, 2 :851–861, 1998.
- [185] H.B. Wang and Y. Zhang. Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Nucleic Acids Res.*, 29 :2517–2521, 2001.
- [186] P.A. Wade, A. Geggion, P.L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry, and A.P. Wolffe. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nat. Genet.*, 23 :62–66, 1999.

- [187] D.G. Stokes, K.D. Tartof, and R.P. Perry. CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of drosophila polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 :7137–7142, 1996.
- [188] H.G. Tran, D.J. Steger, V.R. Iyer, and A.D. Johnson. The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *Embo J.*, 19 :2323–2331, 2000.
- [189] G. Mizuguchi, X. Shen, J. Landry, W.H. Wu, S. Sen, and C. Wu. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalysed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303 :343–348, 2003.
- [190] N.J. Krogan, M.C. Keogh, N. Datta, C. Sawa, O.W. Ryan, H. Ding, R.A. Haw, J. Pootoolal, A. Tong, and V. Canadien et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell*, 12 :1565–1576, 2003.
- [191] R. Ebbert, A. Birkmann, and H.J. Schuller. The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol. Microbiol.*, 32 :741–751, 1999.
- [192] G. Langst and P.B. Becker. Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodelling factors. *J. Cell. Sci.*, 114 :2561–2568, 2001.
- [193] J.R. Guyon, G.J. Narlikar, S. Sif, and R.E. Kingstone. Stable remodeling of tailness nucleosomes by human SWI-SNF complex. *Mol. Cell. Biol.*, 19 :2088–2097, 1999.
- [194] C. Logie, C. Tse, J.C. Hansen, and C.L. Peterson. The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry*, 38 :2514–2522, 1999.
- [195] L.A. Boyer, C. Logie, P.B. Becker, P.A. Wade, A.P. Wolffe, C. Wu, A.N. Imbalzano, and C.L. Peterson. Functional delineation of three group of ATP-dependent family of chromatin remodeling enzymes. *J. Biol. Chem.*, 275 :18864–18870, 2000.
- [196] J.D. Aalfs, G.J. Narlikar, and R.E. Kingstone. Functional differences between the human ATP-dependent nucleosome remodeling proteins BRG1 and SNF2H. *J. Biol. Chem.*, 276 :34270–34278, 2001.
- [197] A. Brehm, G. Langst, J. Kehle, C.R. Clapier, A. Imhof, A. Eberharther, J. Muller, and P.B. Becker. dMi-2 and ISWI chromatin remodeling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *EMBO J.*, 19 :4332–4341, 2000.
- [198] K. Havas, A. Flaus, M. Phelan, R. Kingston, P.A. Wade, D.M. Lilley, and T. Owen-Hughes. Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103 :1133–1142, 2000.
- [199] A. Flaus and T. Owen-Hughes. Mechanisme for ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11 :148–154, 2001.
- [200] A. Saha, J. Wittmeyer, and B.R. Cairns. Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev.*, 16 :2120–2134, 2002.
- [201] I. Whitehouse, C. Stockdale, A. Flaus, M.D. Szczelkun, and T. Owen-Hughes. Evidence for DNA translocation by the ISWI chromatin-remodeling enzyme. *Mol Cell Biol.*, 23(6) :1935–1945, 2003.

- [202] D.V. Fyodor and J.T. Kadonaga. Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature*, 418 :897–900, 2002.
- [203] M.R. Singleton, S. Scaife, and D.B. Wigley. Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. *Cell*, 107 :79–89, 2001.
- [204] M.R. Singleton and D.B. Wigley. Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *J. Bacteriol.*, 184 :1819–1826, 2002.
- [205] A.A. Mahdi, G.S. Briggs, G.J. Sharples, Q. Wen., and R.G. Lloyd. A model for dsDNA translocation revealed by structural motif common to RecG and Mfd proteins. *EMBO J.*, 22 :724–734, 2003.
- [206] H. Dürr, C. Körner, M. Müller, V. Hickmann, and K.P. Hopfner. X-Ray Structures of the *Sulfolobus solfataricus* SWI2/SNF2 ATPase Core and Its Complex with DNA. *Cell*, 121 :363373, 2005.
- [207] A. Flauss and T. Owen-Hughes. Dynamic properties of nucleosomes during thermal and ATP-driven mobilization. *Mol. Cell. Biol.*, 23 :7767–7779, 2003.
- [208] C.L. Smith, R. Horowitz-Scherer, J.F. Flanagan, C.L. Woodcock, and C.L. Peterson. Structural analysis of yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat. Struct. Biol.*, 10 :141–145, 2003.
- [209] J.M. Caruthers and D.B. McKay. Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12 :125–133, 2002.
- [210] F.J. Asturias, W.H. Chung, R.D. Komberg, and Y. Lorch. Structural analysis of the RSC chromatin-remodeling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 :13477–13480, 2002.
- [211] R. Liu, H. Liu, X. Chen, M. Kirby, P.O. Brown, and K. Zhao. Regulation of CSF1 promoter by SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*, 106 :309–318, 2001.
- [212] E.C. Woudstra, C. Gilbert, J. Fellows, L. Jansen, J. Brouwer, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and J.Q. Svejstrup. A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol ii proteolysis in response to DNA Damage. *Nature*, 415 :929–933, 2002.
- [213] D.Y. Yu, T. Owen-Hughes, E.C. Friedberg, R. Water, and S.H. Reed. The yeast Rad7/Rad16/Abf1 complex generates superhelical torsion in DNA that required for excision repair. *DNA repair*, 3 :277–287, 2004.
- [214] O.H. Gumbs, A.M. Campbell, and P.A. Weil. High-affinity DNA binding by a Mot1p-TBP complex : implications for TAF-independent transcription. *EMBO J.*, 22 :3131–3141, 2003.
- [215] K. van Holde and T. Yager. Models for chromatin remodeling : a critical comparison. *Biochem. Cell. Biol.*, 81 :169–172, 2003.
- [216] C.L. Peterson and J.W. Tamkun. The SWI/SNF complex : a chromatin remodeling machines *Trends Biochem.*, 20 :143–146, 1995.
- [217] K.M. Lee, S Sif, R.E. Kingstone, and J.J. Hayes. hSWI/SNF disrupt interactions between the H2A N-terminal tail and nucleosomal DNA. *Biochemistry*, 38 :8423–8429, 1999.
- [218] L.A. Boyer, X. Shao, R.H. Ebright, and C.L. Peterson. Roles of the histone H2A-H2B dimers and (H3/H4)₂ tetramer in nucleosome remodeling by the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.*, 275 :11545–11552, 2000.
- [219] G.J. Narlikar, M.L. Phelan, and R.E. Kingston. Generation and interconversion of multiple distinct nucleosomal states as a mechanism for catalysing chromatin fluidity. *Mol. Cell*, 8 :1219–1230, 2001.

- [220] G. Meersseman, S. Pennings, and E.M. Bradbury. Mobile nucleosome—a general behavior. *EMBO J.*, 11 :2951–2959, 1992.
- [221] Y. Lorch, M. Zhang, and R.D. Kornberg. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*, 96 :389–392, 1999.
- [222] V.M. Studitsky, D.J. Clark, and G. Felsenfeld. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell*, 76 :371–382, 1994.
- [223] T.G. Fazzio and T. Tsukiyama. Chromatin remodeling *in vivo* : evidence for a nucleosome sliding mechanism. *Mol. Cell*, 12 :1333–1340, 2003.
- [224] G. Mizuguchi, X. Shen, J. Landry, W.H. Wu, S. Sen, and C. Wu. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalysed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303 :343–348, 2004.
- [225] M. Bruno, A. Flaus, C. Stockdale, C. Rencurel, H. Ferreira, and T. Owen-Hughes. Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Mol. Cell*, 12(6) :1599–1606, 2003.
- [226] J. Recht and M.A. Osley. Mutation in both the structured domain and N-terminus of histone H2B bypass the requirement for Swi-Snf in yeast. *EMBO J.*, 18 :229–240, 1999.
- [227] W. Brooks and V. Jackson. The rapid transfer and selective association of histones H2A and H2B onto negative coiled DNA at physiological ionic strength. *J. Biol. Chem.*, 269 :18155–18166, 1994.
- [228] B. Sakmann and E. Neher. Single channel recording. *Plenum, second edition*, 1995.
- [229] E.L. Florin, V.T. Moy, and H.E. Gaub. Adhesion force between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264 :415–417, 1994.
- [230] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA : an extensible molecule. *Science*, 271 :792–794, 1996.
- [231] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada, and T. Yanagida. Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin *in vitro*. *Nature*, 352 :301–306, 1991.
- [232] R.M. Simmons, J.T. Finner, S. Chu, and J.A. Spudis. Quantitative measurements of force displacement using an optical trap. *Biophys. J.*, 70 :1813–1822, 1996.
- [233] F. Amblard, B. Yurke, A. Pargellis, and S. Leibler. A magnetic manipulator for studying local rheology and micromechanical properties of biological system. *Rev. Sci. Instrum.*, 67 :1–10, 1996.
- [234] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers : micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.*, 82 :3314–3329, 2002.
- [235] T. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271 :1835–1837, 1996.
- [236] S.B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of a single DNA molecule by using magnetic beads. *Science*, 258 :1122–1126, 1992.
- [237] E. Evans, K. Ritchie, and R. Merkel. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological surfaces. *Biophys. J.*, 68 :2580–2587, 1995.
- [238] A. Kusumi, Y. Sako, T. Fujiwara, and M. Tomishige. Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton that regulate the movements of plasma membrane proteins. *Methods Cell. Biol.*, 55 :173–194, 1998.

- [239] K.M. Dohoney and J. Gelles. Chi-sequence recognition and DNA translocation by single RecBCD helicase/nuclease molecules. *Nature*, 409 :370–374, 2001.
- [240] L. Finzi and J. Gelles. Measurement of lactose repressor-mediated loop formation and breakdown in single DNA molecules. *Science*, 267 :378–380, 1995.
- [241] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271 :795–799, 1996.
- [242] M.D. Wang, M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block. Force and Velocity Measured for Single Molecules of RNA Polymerase. *Science*, 282 :902–907, 1998.
- [243] R.J. Davenport, G.J.L. Wuite, R. Landick, and C. Bustamante. Single-Molecule Study of Transcriptional Pausing and Arrest by *E. coli* RNA Polymerase. *Science*, 287 :2497–2500, 2000.
- [244] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H.E. Gaub. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, 275 :1295–1297, 1997.
- [245] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397 :50–53, 1999.
- [246] H. Qian, M.P. Sheetz, and E.L. Elson. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.*, 60 :910–921, 1991.
- [247] A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.*, 65 :2021–2040, 1993.
- [248] J. Gelles, B.J. Schnapp, and M.P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331 :450–453, 1988.
- [249] M.J. Saxton. Single-particle tracking : the distribution of diffusion coefficients. *Biophys. J.*, 72 :1744–1753, 1997.
- [250] H. Yin, R. Landick, and J. Gelles. Tethered particle motion method for studying transcript elongation by a single RNA polymerase molecule. *Biophys. J.*, 67 :2468–2478, 1994.
- [251] D.A. Schafer, J. Gelles, M.P. Sheetz, and R. Landick. Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy. *Nature*, 352 :444–448, 1991.
- [252] H. Yin, I. Artsimovitch, R. Landick, and J. Gelles. Nonequilibrium mechanism of transcription termination from observations of single RNA polymerase molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 :13124–13129, 1999.
- [253] S.F. Tolic-Norrelykke, A.M. Engh, R. Landick, and J. Gelles. Diversity in the rates of transcript elongation by single RNA polymerase molecules. *J. Biol. Chem.*, 279 :3292–3299, 2004.
- [254] K. Svoboda, C.F. Schmidt, B.J. Schnapp, and S.M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365 :721–727, 1993.
- [255] L.S. Barak and W.W. Webb. Diffusion of low density lipoprotein-receptor complex on human fibroblasts. *J. Cell. Biol.*, 95 :846–852, 1982.
- [256] M. de Brabander, R. Nuydens, A. Ishihara, B. Holifield, K. Jacobson, and H. Geerts. Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with Nanovid microscopy. *J. Cell. Biol.*, 112 :111–124, 1991.

- [257] C. Rivetti, M. Guthold, and C. Bustamante. Abstract scanning force microscopy of DNA deposited onto mica : equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.*, 264 :919–932, 1996.
- [258] G. Binnig, C.F. Quate, and C.H. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56 :930–933, 1986.
- [259] D. Ruga and P.K. Hansma. Atomic force microscopy. *Phys. Today*, 43 :23–30, 1990.
- [260] D. Sarid. Scanning Force Microscopy with Applications to Electric, Magnetic, and Atomic Forces. *New York : Oxford Univ. Press.*, page 253, 1991.
- [261] J. Yang, K. Takeyasu, and Z. Shao. Atomic force microscopy of DNA molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 301 :173–176, 1996.
- [262] C. Bustamante and C. Rivetti. Visualizing protein-DNA interactions on a large scale with the scanning force microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25 :395–430, 1996.
- [263] C. Bustamante and D. Keller. Scanning force microscopy in biology. *Phys. Today*, 48 :32–38, 1995.
- [264] C. Bustamante, D. Keller, and G. Yang. Scanning force microscopy of nucleic acids and nucleoprotein assemblies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3 :363–372, 1993.
- [265] C. Bustamante, J. Vesenka, C.L. Tang, W. Rees, M. Guthold, and R. Keller. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 3 :22–26, 1992.
- [266] T. Thundat, D.P. Allison, R.J. Wannack, and T.L. Ferrel. Imaging isolated strands of DNA molecules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 42-44 :1101–1106, 1992.
- [267] J. Isrealachvili. Intermolecular and Surface Forces. *New York : Academic*, page 450, 1992.
- [268] K. Rippe, M. Guthold, P.H. von Hippel, and C. Bustamante. Transcriptional activation via DNA-looping : visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase σ^{54} holoenzyme by scanning force microscopy. *J. Mol. Biol.*, 270 :125–138, 1997.
- [269] B.D. Sattin and M.C. Goh. Direct observation of the assembly of RecA/DNA complexes by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 87 :3430–3436, 2004.
- [270] K. Virnik, Y.L. Lyubchenko, M.A. Karymov, P. Dahlgren, M.Y. Tolstorukov, S. Semsey, V.B. Zhurkin, and S. Adhya. "antiparallel" DNA loop in gal repressosome visualized by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.*, 334 :53–63, 2003.
- [271] M.H. Sato, K. Ura, K.I. Hohmura, F. Tokumasu, S.H. Yoshimura, F. Hanaoka, and K. Takeyasu. Atomic force microscopy sees nucleosome positioning and histone H1-induced compaction in reconstituted chromatin. *FEBS Lett.*, 452 :267–271, 1999.
- [272] J. van Noort, T. van der Heijden, C.F. Dutta, K. Firman, and C. Dekker. Initiation of translocation by Type I restriction-modification enzymes is associated with a short DNA extrusion. *Nucleic Acids Res.*, 32 :6540–6547, 2004.
- [273] D.J. Müller, C.A. Schoenenberger, G. Büldt, and A. Engel. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer imaged by atomic force microscopy. *J. Bacteriology*, 178 :3025–3030, 1996.
- [274] D.A. Erie, G. Yan, H.C. Schultz, and C. Bustamante. DNA bending by Cro protein in specific and nonspecific complexes : implications for protein site recognition and specificity. *Science*, 266 :1562–1566, 1994.

- [275] H.G. Hansma, M. Bezanilla, F. Zenhausem, M. Adrian, and R.L. Sinsheimer. DNA bending by Cro protein in specific and nonspecific complexes : implications for protein site recognition and specificity. *Nucleic Acids Res.*, 21 :505–512, 1993.
- [276] W.A. Rees, R.W. Keller, J.P. Vesenka, G. Yang, and C. Bustamante. Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy. *Science*, 260 :1646–49, 1993.
- [277] F. Zenhausem, M. Adrian, B. ten Heggeler-Bordier, L.M. Eng, and P. Descouts. DNA and RNA Polymerase/DNA complex imaged by scanning force microscopy : influence of molecular-scale friction. *Scanning*, 14 :212–217, 1992.
- [278] D.M. Crothers, M.R. Gartenberg, and T.E. Shrader. DNA bending in protein-DNA complexes. *Methods Enzymol.*, 208 :118–146, 1991.
- [279] R.G. Brennan, S.L. Roderick, Y. Takeda, and B.W. Matthews. Protein-DNA conformational changes in the crystal structure of a lambda Cro-operator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 :8165–8169, 1990.
- [280] D. Bramhill and A. Komberg. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell*, 52 :743–755, 1988.
- [281] S.J.T. Van Noort, K.O. Van der Werf, B.G. De Grooth, N.F. Van Hulst, and J. Greve. Height anomalies in tapping mode atomic force microscopy in air caused by adhesion. *Ultramicroscopy*, 69 :117–127, 1997.
- [282] J.H. White. Self linking and the gauss integral in higher dimensions. *Am. J. Math.*, 91 :693–728, 1969.
- [283] W.R. Bauer, F.H.C. Crick, and J.H. White. Supercoiled DNA. *Scient. Am.*, 243 :118–133, 1980.
- [284] T.C. Boles, J.H. White, and M.R. Cozzarelli. Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.*, 213 :931–951, 1990.
- [285] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74 :2016–2028, 1998.
- [286] J.-F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette. Stretched and overwound DNA form a Pauling-like structure with exposed bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 :14152–14157, 1998.
- [287] D.J. Fitzgerald, C. DeLuca, I. Berger, H. Gaillard, R. Sigrist, K. Schimmele, and T.J. Richmond. Reaction cycle of the yeast *isw2* chromatin remodeling complex. *EMBO J.*, 23(19), 2004.
- [288] O.A. Saleh, S. Bigot, F.X. Barre, and J.F. Allemand. Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12 :436–440, 2005.

Résumé

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le fonctionnement de différents facteurs de remodelage de la chromatine (RSC et ISWI), en utilisant les techniques de pinces magnétiques, TPM et AFM. Les facteurs de remodelage sont des enzymes qui sont responsables de la régulation de l'accessibilité de la chromatine (ADN compacté dans le noyau cellulaire). Dans une première partie, nous présentons la structure de l'ADN et sa compaction à l'intérieur de la cellule. Ensuite, nous abordons le remodelage de la chromatine en nous focalisant sur le remodelage ATP-dépendant. Après, nous présentons les techniques classiques employées en molécule unique pour étudier l'interaction ADN/protéines, ainsi que les montages expérimentaux utilisés. Tous ces montages expérimentaux nous ont permis de bien caractériser la translocation des facteurs de remodelage sur l'ADN nu, et de proposer un mécanisme d'action possible utilisé par la famille SWI/SNF et la famille ISWI.

Mots clés : ADN, nucléosome, facteurs de remodelage de la chromatine, molécule unique, pinces magnétiques, TPM, AFM, boucles d'ADN, translocation, introduction de surenroulement, mécanisme d'action.

Abstract

We have studied the behaviour of the chromatin remodeling factors RSC and ISWI using single DNA molecule micromanipulation setups (Magnetic Tweezers and TPM) and AFM imaging. Chromatin remodeling factors are enzymes responsible for regulating chromatin accessibility in the cell. In the first part of this thesis, we introduce DNA structure and the DNA compaction inside the cell. Next, we introduce chromatin remodeling, focusing in particular on ATP dependent remodeling. Next, we introduce standard single molecule techniques used to investigate protein/DNA interactions, describing the setups used to conduct experiments. These different approaches allow us to well characterize chromatin remodeling factors translocation, and they allow us to propose a possible mechanism of action to explain chromatin remodeling by the SWI/SNF and ISWI families.

Key words : DNA, chromatin, nucleosome, chromatin remodeling factors, single molecule, magnetic tweezers, tethered particle motion, AFM, looping, translocation, supercoiling introduction, mechanism of action.