HAL
open science

Complexation de l'ADN par des composés organoruthénés et étude de l'adhésion cellulaire sur des substrats mous

Stéphane Despax

To cite this version:

Stéphane Despax. Complexation de l'ADN par des composés organoruthénés et étude de l'adhésion cellulaire sur des substrats mous. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAE006 . tel-01124382

HAL Id: tel-01124382

https://theses.hal.science/tel-01124382v1

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

École Doctorale de Physique et Chimie-Physique

Université de Strasbourg - Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Chimie-Physique

par

Stéphane DESPAX

Complexation de l'ADN par des composés organoruthénés et étude de l'adhésion cellulaire sur des substrats mous.

Soutenance orale le vendredi 13 juin 2014

Membres du jury

Rapporteur externe : Mme. Alberta Bergamo, Professeur des Universités, Fondazione Callerio Onlus, Trieste

Rapporteur externe : M. Benjamin Elias, Professeur des Universités, Institute of Condensed Matter, Louvain-la-Neuve

Examinateur : M. Christian Gaiddon, Directeur de recherche au CNRS, INSERM, Strasbourg

Examinateur : M. Xavier Assfeld, Professeur des Universités, Institut Jean Barriol, Vandœuvre-lès-Nancy

Directeur de thèse : M. Pascal Hébraud, Chargé de recherche au CNRS, IPCMS, Strasbourg

Co-directeur de thèse : M. Michel Pfeffer, Directeur de recherche au CNRS, Institut de Chimie, Strasbourg

Invité : M. Antonio Monari, Maître de conférence, Institut Jean Barriol, Vandœuvre-lès-Nancy

REMERCIEMENTS

Je tenais en tout premier lieu à remercier l'Université de Strasbourg, l'École Doctorale de Physique et Chimie-Physique et l'IPCMS pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse. Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury de soutenance pour avoir pris le temps d'examiner mon travail.

J'adresse un grand merci à mon directeur de thèse Pascal Hébraud qui m'a accompagné et aidé tout au long de ce travail. Je le remercie tout particulièrement pour son encadrement plus que compétent qui m'a apporté une formation complète sur le travail de recherche scientifique, mais surtout pour son soutien dans mes choix pour mon avenir professionnel. J'avais beaucoup entendu parler des tensions entre un doctorant et son directeur de thèse qui pouvaient apparaître surtout pendant les derniers mois, mais je n'ai à aucun moment pu vérifier ces rumeurs par moi-même et ce grâce à son écoute et sa patience. De même je remercie chaleureusement Michel Pfeffer, qui a co-dirigé cette thèse, pour son aide et ses conseils sur mon travail.

Ensuite, je voulais remercier de façon générale l'ensemble des chercheurs, doctorants, post-doctorants, ingénieurs, stagiaires qui ont, à un moment ou un autre, participé à mon travail ou à ma vie dans le laboratoire : Bastien, Ali, Christophe, Jean-Thomas, Marcelina, Piotr, Fuchao, Stanislav, Damien, Omar, Soumia, Claude, Cynthia, Orphée, Marie-Élodie, Georg, Virginie, Sébastien, et beaucoup d'autres que j'oublie certainement... Un merci tout particulier à Elisabeth pour son aide sur les cultures cellulaires et à Christian pour ses conseils sur la partie biologique de mon travail.

J'en profite aussi pour adresser mes remerciements à l'équipe de direction de l'ECPM, Daniel Guillon et Sylvie Bégin, qui a accepté de m'engager en parallèle de mon travail de thèse. Merci aussi à l'ensemble de mes collègues enseignants de la filière Chimie Analytique, Laurence, Anne, Véronique H., Véronique D., Jérémy, Dominique, et l'équipe des PRAG du CPI Audrey, Priscilla, Vincent qui m'ont soutenu ces deux dernières années.

Puis, bien évidemment, je tiens à remercier de tout coeur mes amis Strasbourgeois les plus

proches sans qui je n'aurais certainement pas réussi à terminer ce travail. Merci à Euryale, Galette, Prisc, Jéjé, Juju, Karel, Seb et aussi aux expatriés Amandine, Caro, Benji, Loïc, René. Merci pour les Perriers du mercredi qui ont été décalés au mardi mais qu'on faisait aussi de temps en temps les mercredis, pour les restos du vendredi, pour les journées à Europapark, pour les séjours en Ardèche et en Corse et bien d'autres choses...
Une pensée aussi à mes amis du "sud", ceux avec qui j'ai partagé beaucoup de moment avant de m'installer sur Strasbourg, mes amis d'enfance Ardéchois et mes amis universitaires.
De même, je souhaite remercier les handballeurs de l'UVMH qui m'ont permis d'évacuer un peu le stress de l'écriture d'un manuscrit de thèse lors des entraînements et des matchs en leur compagnie.

Enfin, je termine en remerçiant l'ensemble de ma famille et plus particulièrement ma mère Joëlle, mes deux frères Cédric et Ghislain qui me supportent et qui ont toujours eu confiance en moi pour atteindre les objectifs professionnels que je m'étais fixés. Merci à eux pour leur soutien et leur présence quotidienne malgrè la distance qui nous sépare.

Table des matières

I Introduction générale : cadre de l'étude **11**

1 Généralités sur le cancer 14

1.1 Les chiffres 14

1.2 Origine et développement 15

1.3 Les thérapies 15

2 Composition et rôle(s) des systèmes biologiques étudiés 17

2.1 Les cellules 17

2.2 Les macromolécules biologiques 20

3 Systèmes étudiés 23

3.1 L'ADN et les agents anti-cancéreux 23

3.2 L'adhésion des cellules cancéreuses 24

4 Objectifs des travaux de thèse 26

II Interactions RDC-ADN **29**

1 Système macromolécule-molécules **31**

1 Étude générale des équilibres 32

1.1 Grandeurs caractéristiques 32

1.1.1 Constante d'affinité 32

1.1.2 Notion de site d'association 33

1.1.3 Taux d'occupation 35

1.2 Les différents modèles 36
1.3 Détermination expérimentale du taux d'occupation 40
1.3.1 Évolution d'une observable lors d'un dosage 40
1.3.2 Méthode d'analyse à deux dosages 42
2 Le système RDC-ADN 43
2.1 L'Acide Désoxyribo Nucléique 43
2.2 Les complexes organométalliques du ruthénium : RDC 45
2.3 Techniques expérimentales 47
2.4 Types d'association 50
2.4.1 Intercalation 50
2.4.2 Association de surface 54
2.4.3 Interaction électrostatique 55
2.5 Principaux résultats connus 58
2.5.1 Énantiosélectivité de l'association 58
2.5.2 Spécificité de l'association 60
2.5.3 Existence simultanée de plusieurs modes d'association . . . 60
3 Objectifs des travaux 61

2 Étude expérimentale des équilibres RDC-ADN 63

1 Spectrophotométrie d'absorption UV-visible 63
1.1 Spectres d'absorption 63
1.2 Dosage des RDC par l'ADN 64
1.3 Méthode de mesure à deux dosages 68
1.4 Présentation des résultats expérimentaux 69
1.5 Analyse et discussion des résultats 71
1.5.1 Modélisation des deux équilibres 71
1.5.2 Détermination de grandeurs caractéristiques 76
1.5.3 Obtention des constantes d'affinité 79

2 Identification des modes d'association 81
2.1 Étude du premier mode d'association 81
2.2 Étude du second mode d'association 87
3 Conclusion 92

3 Validation de l'analyse des équilibres RDC-ADN 93
1 Taux d'occupation des sites d'association 94
1.1 Méthode d'analyse de Bujalowski 94
1.2 Limites d'utilisation de la méthode 95
2 Variation de l'absorbance par site d'association 97
2.1 Modèle à deux sites d'association différents 97
2.2 Paramètres influençant le graphe $Q_{obs} = f(\nu^S)$ 98
2.2.1 Coefficients d'absorption molaire : ϵ_{b1} et ϵ_{b2} 98
2.2.2 Rapport des constantes d'affinité : $\left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}}\right)$ 100
2.2.3 Paramètre q 101
3 Détermination des constantes d'affinité 102
3.1 Modèle à un unique équilibre 103
3.2 Modèle à deux équilibres 104

III Adhésion cellulaire 109

1 Propriétés d'adhésion cellulaire 111
1 La cellule : un système dynamique 112
1.1 L'adhésion cellulaire 112
1.2 La motilité cellulaire 114
2 État de l'art 117
2.1 Techniques expérimentales 117
2.2 Principaux résultats connus 121

3 Objectif des travaux 124

2 Observations expérimentales de l'adhésion cellulaire 125

1 Résultats expérimentaux 126

1.1 Paramètres observés 126

1.2 Présentation des résultats 128

2 Analyse et discussion 130

2.1 Traitement statistique des résultats expérimentaux 130

2.2 Analyse des résultats 136

2.3 Discussion 138

IV Conclusions et perspectives 143

V Protocoles expérimentaux 147

1 Interactions moléculaires 149

1 Synthèse des RDC 149

2 Spectrophotomètrie d'absorption UV-visible 153

3 Dichroïsme circulaire 157

2 Adhésion cellulaire 161

1 Conditionnement des boîtes d'observations 161

2 Culture cellulaire 166

3 Enregistrement et analyse des images cellulaires 168

RÉSUMÉ

Le domaine général des travaux de recherche de cette thèse est l'étude des procédés physico-chimiques impliqués dans le développement du cancer et/ou leurs thérapies.

Des études réalisées au sein du laboratoire de Synthèse Métallo-Induites (LSMI) ont montré l'activité anti-cancéreuse d'un type particulier de complexe organométallique du ruthénium appelés RDC : Ruthenium Derived Compounds. Comme la plupart des molécules chimiques, ces complexes agissent à différentes échelles dans les milieux biologiques. Ces observations justifient le choix de la séparation du manuscrit en deux grandes parties disctinctes :

— Aspect moléculaire : interaction entre les complexes RDC et la macromolécule d'ADN.

— Aspect cellulaire : étude des propriétés d'adhésion et de la motilité des cellules cancéreuses dans le but de comprendre, à plus long terme que ces travaux, l'influence de certaines drogues sur ces propriétés.

La première partie de la thèse est consacrée à la caractérisation des interactions mises en jeu lors de l'association des molécules de RDC avec la macromolécule d'ADN. Ce type d'équilibre est étudié depuis longtemps et certains aspects sont assez spécifiques par rapport aux équilibres classiques des systèmes composés uniquement de petites molécules. La caractérisation expérimentale de l'équilibre RDC-ADN peut se faire par un certain nombre de technique mais nous avons choisis de nous focaliser sur les manipulations de spectrophotométrie d'absorption UV-visible et de dichroïsme circulaire. Les résultats obtenus montrent la présence de deux domaines disctincts selon le rapport entre les concentrations d'ADN et de complexe. Ces deux domaines correspondent à l'existence présumée de deux types d'associations entre ces composés. La méthode d'analyse utilisée pour arriver à cette conclusion nécessite deux dosages mais permet de n'émettre aucune hypothèse sur la linéarité de la réponse entre l'association d'un complexe avec l'ADN et la modification des propriétés optiques enregistrées au cours de la mesure. Les grandeurs quantitatives extraites des résultats expérimentaux et basées sur un modèle à deux équilibres entre les composés montrent une

grande différence d'affinité entre ces deux équilibres. Le premier mode d'association possède une affinité très élevée ($K_a \approx 1.10^5\ M^{-1}$) tandis que le second mode possède une affinité 15 à 20 fois plus faible. En utilisant les résultats complémentaires obtenus en dichroïsme circulaire et en comparant avec un complexe au comportement connu ainsi qu'à la littérature, nous pouvons supposer que le premier mode d'association correspond à une intercalation du complexe entre les paires de bases d'ADN et que le second mode d'association, dont l'affinité dépend fortement de la force ionique de la solution, est dû en grande partie à des interactions électrostatiques. En revanche le modèle proposé ne permet pas d'obtenir facilement la taille occupée par les complexes sur l'ADN ainsi que la répartition entre le nombre de molécules associées dans le premier ou dans le second mode.

Le deuxième partie de la thèse constitue un travail préliminaire à la mise en place d'une manipulation permettant l'observation et la caractérisation des forces cellulaires lors de leur mouvement à la surface ou dans un gel. L'objectif est de reproduire la rigidité des tissus présents dans le corps humain et de mesurer les forces mis en jeu lors de l'adhésion ou des déplacements cellulaires sur ces supports. Ces phénomènes sont importants notamment dans le mécanisme de formation de métastases au cours du développement d'un cancer. Dans ce manuscrit, nous nous limitons à l'étude de l'influence de la rigidité du substrat sur l'adhésion de cellules issues d'un cancer colo-rectal humain. Ce type de cancer étant connu pour former facilement des métastases, l'étude de l'adhésion de ces cellules est tout à fait justifiée dans le cadre de nos recherches. Les résultats expérimentaux montrent une adhésion plus grande des cellules lorsque les supports sont rigides. Pour nos mesures nous obtenons que l'aire de contact des cellules A a une relation, avec le module élastique du support E, de type : $A \propto E^{1/3}$. La grande majorité du travail réalisé dans cette thèse sur cette partie a été de mettre en place un protocole de dépôt de cellule sur les gels support et un appareillage optique permettant une viabilité des cellules pendant l'enregistrement de leur adhésion. A plus long terme, l'objectif du laboratoire est de mettre en place des manipulations utilisant des techniques optiques pour caractériser et quantifier les forces cellulaires mises en jeu dans ces systèmes.

Première partie

Introduction générale : cadre de l'étude

Les systèmes biologiques montrent une richesse et une complexité qui ne sont pas toujours évidentes à comprendre sans une analyse précise à différentes échelles de grandeur. L'exemple qui sera traité dans ce manuscrit est le cas du cancer : une maladie mortelle dont les origines et le développement sont maintenant mieux connus mais dont la guérison complète reste encore un des grand défi de la recherche actuelle. Les conséquences de cette maladie sur l'organisme apparaissent à différents niveaux :

— au niveau macroscopique : la plupart des cancer connus se traduisent à terme par la présence sur certains organes de tumeur maligne pouvant atteindre plusieurs centimètres.

— au niveau microscopique : la maladie étant due à une multiplication cellulaire incontrôlée, elle entraîne la formation d'amas cellulaire à l'origine des tumeurs. De plus, une modification des propriétés d'adhésion des cellules cancéreuses entraîne une possibilité d'invasion et de contaminations des tissus voisins appelés métastases.

— au niveau nanoscopique : l'altération des processus de contrôle de la multiplication cellulaire est identifiée comme une altération de l'ADN.

Dans ce manuscrit nous nous limitons à l'étude de phénomènes au niveau cellulaire (microscopique) et moléculaire (nanoscopique).

Ce chapitre introductif a pour objectif de justifier au mieux le choix des sytèmes étudiés dans ces travaux de thèse. Nous nous proposons dans un premier temps de donner les informations principales concernant cette maladie. Puis, nous décrivons brièvement la composition et le rôle des systèmes biologiques auxquels nous nous intéressons avant de préciser les objectifs principaux de nos recherches.

1 Généralités sur le cancer

1.1 Les chiffres

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) proposent une base de données (GLOBOCAN) qui donne des chiffres récents sur le cancer. En 2012, les nouveaux cas de cancer s'élèvent à 14,1 millions et les décès liés au cancer à 8,2 millions. Les cancers les plus fréquent sont le cancer du poumon avec 13 % des cas, suivi par celui du sein avec $11,9$ % des cas et le cancer colorectal qui réunit $9,7$ % des cas. Les estimations montrent une augmentation de 19,3 millions de nouveaux cancer par an d'ici à 2025 en raison notamment de la croissance démographique et du vieillissement de la population mondiale.

Selon la population étudiée, les types de cancer les plus fréquents ne sont pas les mêmes. D'après l'étude réalisée en 2013 en France par un ensemble d'organisation se basant sur les registres du réseau Francim entre 1980 et 2012, le cancer le plus observé chez les hommes est celui de la prostate et le plus mortel est celui du poumon. Chez les femmes, le plus observé et aussi le plus mortel est le cancer du sein. Pour les deux sexes, le cancer colo-rectal est un des plus fréquents et aussi des plus mortels. Cette observation justifie l'importance de la recherche sur ce type de cancer, c'est une des raisons pour laquelle nos travaux sur les cellules cancéreuses sont focalisés sur des cellules issues d'un cancer colo-rectal humain (lignée SW-480).

L'ensemble de ces chiffres montre l'importance et la gravité de cette maladie et justifie l'existence de plan visant à organiser l'accompagnement des malades, le développement de méthode de détection de la maladie, la recherche pour la mise en place de thérapies, ... Mais, si les origines et le développement de la maladie sont de mieux en mieux connus, il n'existe pas encore à ce jour de rémède permettant la guérison complète. Cependant, plusieurs types de thérapies développées montrent des résultats très prometteurs.

1.2 Origine et développement

Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de la modification cellulaire entrainant un cancer : l'alimentation, l'environnement (usines chimiques/radioactivité), les facteurs géniques (prédisposition génétique au dérèglement des cellules), les hormones...

Le développement de la maladie peut être schématisé en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression (voir figure 1).

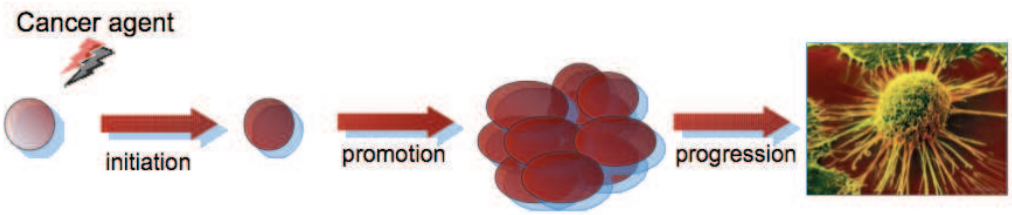


FIGURE 1 – Mécanisme des étapes de l'apparition et du développement d'un cancer

L'initiation fait intervenir un phénomène extérieur qui va entraîner une mutation de l'ADN dans le noyau d'une cellule ce qui peut modifier certaines de ses propriétés et notamment le contrôle de sa multiplication. La conséquence directe de cette modification est la promotion, c'est à dire la multiplication non-contrôlée de la cellule ayant subi une initiation, ainsi que celle de toutes les cellules filles issues de cette cellule initiée. Ceci explique le développement exponentiel de la maladie une fois qu'une cellule a été modifiée. Enfin l'étape de propagation correspond à l'extension de la maladie vers les organes voisins pouvant aller jusqu'à la généralisation du cancer à tout le corps.

1.3 Les thérapies

Il existe différents types de thérapies qui ont été mises au point pour lutter contre cette maladie : chirurgie, radiothérapie, immunothérapie, hormonothérapie, chimiothérapie. Ces procédés sont classés selon leur mode d'action sur les cellules cancéreuses.

— La chirurgie consiste à retirer la tumeur constituée des cellules cancéreuses pour arrêter leur propagation. La principale difficulté est d'enlever l'ensemble des cellules malades

car s'il reste des cellules encore atteintes, leur multiplication risque fortement de former une nouvelle tumeur plus tard.

— La radiothérapie utilise des rayonnements afin de détruire les cellules malades en causant des cassures des macromolécules d'ADN contenues dans le noyau. L'objectif est de cibler le faisceau sur la tumeur afin de neutraliser le maximum de cellules cancéreuses sans détruire les cellules saines voisines.

— L'hormonothérapie est une thérapie ciblant principalement les cancer hormono-dépendant comme certains cancer du sein par exemple.

— L'immunothérapie consiste à stimuler les défenses immunitaires naturelles pour lutter contre la maladie.

— La chimiothérapie est le procédé faisant intervenir des drogues et médicaments gênant les processus biochimiques impliqués dans la multiplication cellulaire. De façon générale les drogues interagissent avec la macromolécule d'ADN et empêchent sa réplication donc la division cellulaire. Un des problèmes majeurs est le ciblage spécifique des cellules cancéreuses. En effet, la plupart des drogues utilisées agissent aussi sur les cellules saines ce qui cause des effets secondaires indésirables.

La conclusion de cette section est que l'origine et le développement de cette maladie ainsi que les thérapies utilisées montrent une activité à plusieurs échelles de grandeur. Au niveau moléculaire, l'origine de la maladie est en effet due à une altération de la macromolécule d'ADN et la chimiothérapie a pour but d'agir sur cette molécule par l'intermédiaire d'agents anti-cancéreux. Au niveau cellulaire, la faculté des cellules malades à créer des métastases, c'est à dire à modifier leurs propriétés d'adhésion pour pouvoir se déplacer d'un organe à un autre, est un phénomène primordial à comprendre afin de pouvoir le limiter voire l'empêcher. A ce stade, il est nécessaire de donner certaines informations sur la composition et le rôle des différents composés biologiques cités précédemment avant de définir plus clairement les objectifs de nos études.

2 Composition et rôle(s) des systèmes biologiques étudiés

2.1 Les cellules

2.1.1 Structure

Il existe deux grandes familles de cellules :

— les cellules procaryotes, généralement des bactéries, constituées d'une paroi cellulaire protégeant un compartiment cytosplamisque contenant l'ensemble de l'information génétique et les protéines nécessaires à leur développement.

— les cellules eucaryotes, présentes chez les animaux et les plantes supérieures, qui sont beaucoup plus complexes que les précédentes au niveau de leur constitution.

Nous nous intéressons uniquement aux cellules eucaryotes humaines. Ces cellules sont constituées d'une paroi cellulaire protégeant l'intérieur de la cellule contenant un grand nombre d'organites différents, de protéines et surtout d'un noyau où l'ensemble de l'information génétique se situe. Les organites principaux des cellules animales sont[1] (voir figure 2) :

— les mitochondries : organite d'une taille proche de celle des bactéries c'est à dire environ 10 μm de longueur et 1 μm de diamètre. Ce sont les sources d'énergie des cellules transformant l'énergie provenant de l'environnement comme l'oxygène et les molécules alimentaires en énergie utile à la cellule sous forme d'ATP (Adénosine Tri Phosphate).

— le reticulum endoplasmique : réseau occupant l'ensemble du cytoplasme et responsable du transport de lipides et de protéines membranaires.

— l'appareil de Golgi : joue un rôle d'organisation et de tri des macromolécules qui doivent être sécrétées et transportées vers d'autres organes.

— Les ribosomes sont les usines à protéines des cellules, ils les synthétisent à partir de la description de l'ARN messager provenant du noyau et formé à partir de l'ADN.

— Les vacuoles ou vésicules sont des poches remplies d'eau et de molécules inorganiques et organiques comme des enzymes par exemple.

L'ensemble de ces organites sont contenus dans le cytoplasme : milieu liquide désignant le contenu d'une cellule. La forme des cellules ainsi que leur mouvement sont dus à la présence,

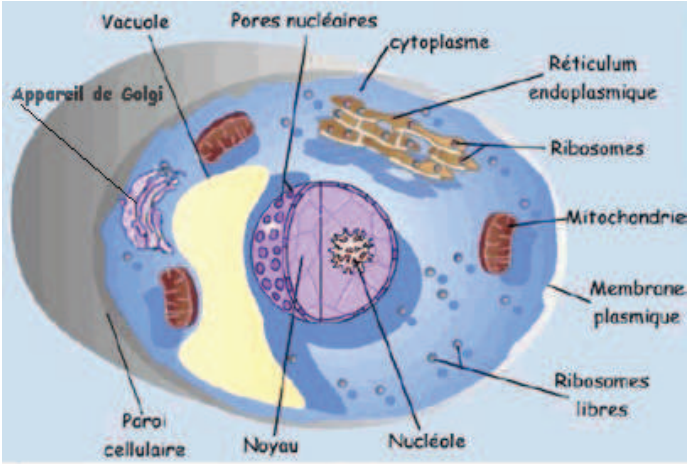


FIGURE 2 – Structure d'une cellule eucaryote présentant les principaux organites. Image issue d'un site internet[2]

dans ce cytoplasme, d'un cytosquelette constitués principalement de trois types de filaments :

— les filaments intermédiaires sont constitués de protéines fibrillaires comme la kératine par exemple et ont un diamètre d'environ 10 nm.

— les microtubules sont constitués de l'enchaînement de protéines globulaires, principalement la tubuline, et ont un diamètre d'environ 25 nm.

— les filaments d'actine sont constitués aussi de l'enchaînement de protéines globulaires, l'actine, et ont un diamètre d'environ 7 nm.

L'ensemble de ces filaments protéiques forment un réseau tridimensionnelle définissant la forme de la cellule et lui conférant ses propriétés dynamiques (voir figure 3). Les filaments d'actine sont sans doute les plus actifs lors des mouvements cellulaires.

Le noyau, organite uniquement présent dans les cellules eucaryotes, contient l'ensemble de l'information génétique sous forme de chromosomes. Ces entités sont composées de macromolécules et de protéines organisées et leur fonctionnement dépend fortement de leurs processus dynamiques. La description plus précise de la macromolécule responsable de l'information génétique (l'ADN) est proposée dans un paragraphe ultérieur.

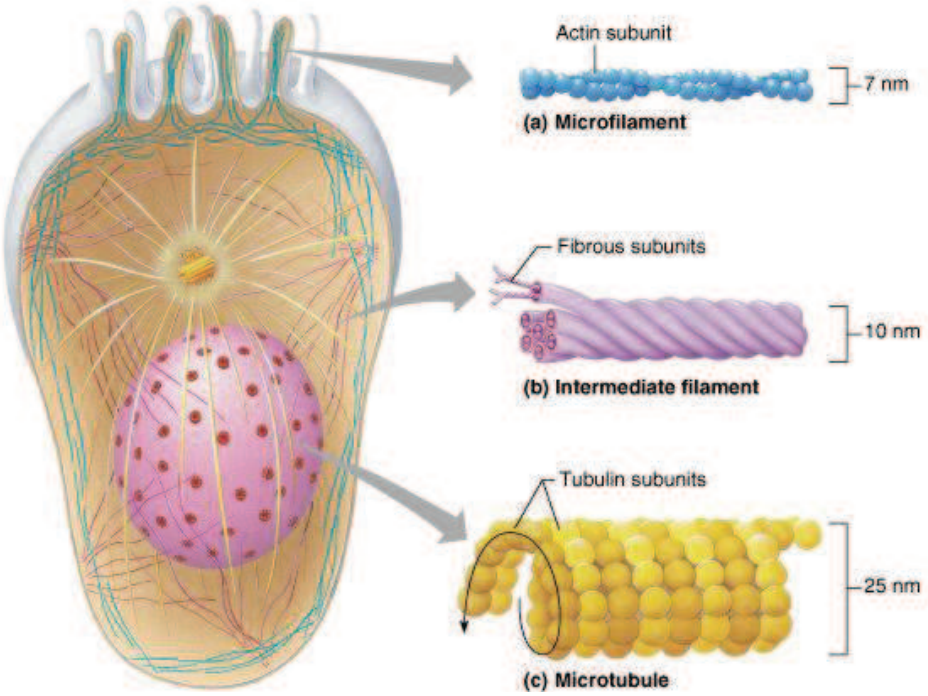


FIGURE 3 – Structure et composition du cytosquelette d'une cellule. Image issue d'un site internet[3]

Même si les cellules animales font partie de la famille générale des cellules eucaryotes, il en existe différents types ne remplissant pas les mêmes fonctions dans les organismes vivants.

2.1.2 Les différents types de cellule

Lors du développement d'un organisme les premières cellules sont appelées cellules souches et ont la capacité, en plus de celle de se reproduire, de pouvoir se différencier en différents types de cellules. Chaque type cellulaire possède des propriétés spécifiques lui permettant de remplir son rôle dans l'organisme.

— Les cellules épithéliales sont les cellules frontière entre l'environnement extérieur et l'intérieur d'un organisme ou d'un organe. Pour une bonne protection, les cellules sont jointives et forment un "mur".

— Les cellules nerveuses sont principalement impliquées dans la transmission des messages biochimiques envoyés par le cerveau aux autres organes du corps par exemple.

— Les cellules musculaires possèdent des caractéristiques mécaniques spécifiques leur permettant de créer des mouvements mécaniques responsables de la contraction des tissus musculaires.

— Les cellules du tissu conjonctif constitue la majorité des cellules du corps humain (environ 70 %), elles jouent un rôle de soutien, de protection, de nutrition et influencent beaucoup d'autres phénomènes observés dans un organisme vivant.

Un des thèmes de recherche de ce travail est l'étude de l'adhésion cellulaire qui joue un rôle crucial dans des processus cellulaires tel que la différenciation ou la formation de métastase par exemple. Pour se déplacer, les cellules doivent adhérer à des supports présents dans les organismes vivants. Pour le corps humain, il en existe différents types selon la nature des cellules étudiées : le tissu musculaire, les os, le cerveau, ... Mais le support le plus fréquent est une matrice appelée "matrice extracellulaire" qui est principalement constituée de glycoprotéines, de protéines et de glycosaminoglycanes comme par exemple : le collagène, la fibronectine, la laminine et l'élastine. La structure de cette matrice est basée sur un maillage à trois dimensions de collagène relié par des macromolécules d'élastine. Il en existe des spécifiques pour des tissus particuliers : la matrice cartilagineuse, la matrice osseuse, la lame basale... Chacune possède des caractéristiques spécifiques comme un type de collagène particulier et/ou une concentration en glycoprotéines remarquable. La structure complète de cette matrice est assez complexe et a peu d'intérêt pour nos études. Pour nous, il est important de noter que l'élasticité de cette matrice joue un rôle très important dans les processus d'adhésion cellulaire ainsi que dans la spécification des cellules.

2.2 Les macromolécules biologiques

2.2.1 Les acides aminés et les protéines

Les acides aminés sont des molécules chimiques essentielles pour le monde vivant, elles présentent deux groupements fonctionnels : un acide carboxylique et une amine. Il en existe vingt et certains sont directement produits par le corps humain tandis que d'autres doivent

être apportés par l'environnement extérieur. L'enchaînement de plusieurs acides aminés, reliés par des liaisons peptidiques (voir figure 4), permet la formation de protéines : macromolécules de plusieurs milliers de grammes par mole. Les protéines jouent des rôles essentiels dans la

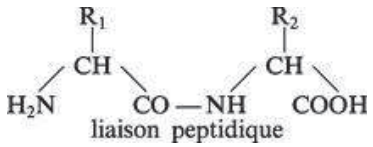


FIGURE 4 – Liaison peptidique entre deux acides aminés.

vie cellulaire :

— rôle structurel : comme les filaments d'actine, qui compose le cytosquelette des cellules
— rôle dans la mobilité : comme la myosine active dans les systèmes acto-myosine qui seront développées dans la partie de ce manuscrit consacrée aux études cellulaires
— rôle catalytique : comme les enzymes
— rôle de régulation et d'expression des gènes...

La synthèse de ces protéines est réalisée par une transcription de la macromolécule contenant l'ensemble de l'information génétique d'une cellule eucaryote : l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN). Cette macromolécule fait partie de la famille des acides nucléiques comme l'ARN (Acide Ribo Nucléique), et est décrite dans le prochain paragraphe.

2.2.2 Les nucléotides et l'ADN

Comme les protéines et les acides aminés, l'ADN est une macromolécule constituée d'éléments de base appelés nucléotides (voir figure 5). Ces "briques" sont formées par un sucre, une nucléobase et un groupement phosphate reliant ces deux éléments. Selon la nature du sucre, les deux acides nucléiques cités précédemment sont distingués : ribose pour l'ARN et le désoxyribose pour l'ADN (voir figure 6). Quatre nucléobases existent pour l'ADN (voir figure 7) : la cytosine, la thymine (bases pyrimidiques), l'adénine et la guanine (bases purines). Pour l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile. L'enchaînement des plusieurs nucléotides forme un brin : longue chaîne moléculaire (voir figure 5). L'assemblage de deux "brins" forme

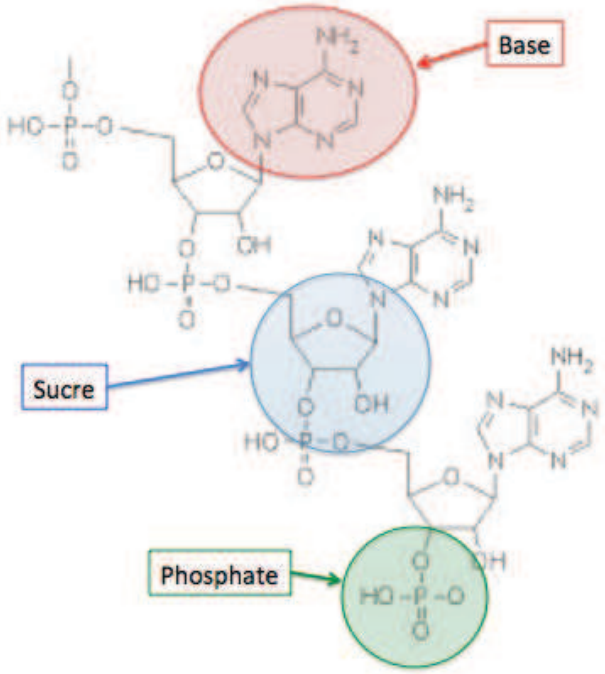


FIGURE 5 – Structure des nucléotides composant l'ADN. Image issue d'un site internet[4]

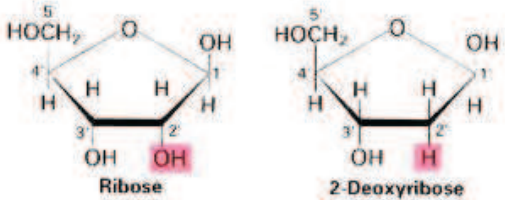


FIGURE 6 – Structure des sucres ribose et déoxyribose. Image issue d'un site internet[5]

une structure de double hélice. Les caractéristiques géométriques de cette macromolécule seront données de façon plus précise dans la partie de ce manuscrit traitant des interactions moléculaires. Dans le noyau cellulaire, l'ADN se trouve sous forme de chromosome ou de chromatine selon la phase dans laquelle se trouve le processus de division cellulaire. La régulation de ces deux structures est réalisée par les protéines appelées histones.

Cette macromolécule est sans doute la plus importante étant donné les différents rôles importants qu'elle remplie dans les systèmes vivants : stockage de l'information génétique, synthèse des protéines, contrôle de la multiplication cellulaire, ... C'est pourquoi l'étude des interactions entre des drogues et l'ADN est cruciale pour mettre en place des thérapies.

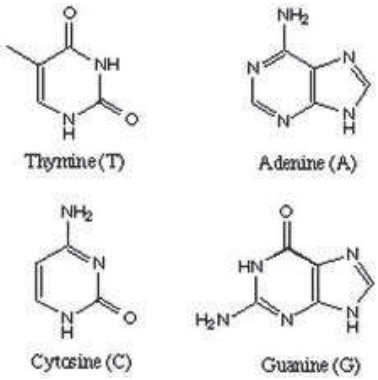


FIGURE 7 – Structure des nucléobases de l'ADN. Image issue d'un site internet[6]

3 Systèmes étudiés

3.1 L'ADN et les agents anti-cancéreux

La chimiothérapie repose sur le fait d'empêcher les cellules de se reproduire. Pour cela, des agents chimiques sont nécessaires pour bloquer la réplication de l'ADN dans le noyau cellulaire. Ainsi, l'étude de l'association de molécules chimiques avec la double-hélice permet de mieux comprendre le mode d'action des drogues afin d'en améliorer leur efficacité.

L'un des composés les plus efficaces connus de nos jours, pour le traitement de certains types de cancer, est le cisplatine.[7] Il est utilisé dans le traitement thérapeutique de près de 70 % des cas. Cette molécule est cependant assez toxique et entraîne de nombreux effets secondaires. De plus, il s'avère qu'il n'agit que sur une gamme assez restreinte de cancer (sarcomes, carcinomes et lymphomes). Son mode d'action est assez bien connu[8–10] : il y a formation de liaisons covalentes entre le platine et les bases azotées constituant l'ADN. Ces liaisons empêchent la réplication de la macromolécule et entraînent la mort cellulaire. Pour limiter les effets indésirables du cisplatine, d'autres composés organométalliques ont été étudiés et le ruthénium s'est imposé comme un excellent candidat pour la formation de molécules anti-cancéreuses. En effet, les ions du ruthénium sont semblables au niveau électronique aux ions du fer, métal présent à des fortes concentrations dans le corps humain, ce qui leur confère une plus grande biocompatibilité que ceux du platine. De plus, il a été

montré que les cellules cancéreuses se développent plus rapidement que les cellules saines ce qui demandent un apport en fer plus important. Ce phénomène entraîne une surexpression des récepteurs de la transferrine qui peut être exploitées pour cibler les cellules malades par rapport aux cellules saines. Pour que cette spécificité puisse avoir lieu il faut que le médicament utilisé soit sensible aux récepteurs à transferrine, d'où l'utilisation des complexes du ruthénium.

Plusieurs de ces complexes ont déjà montré une activité anticancéreuse (voir figure 8) :

— Les complexes du ruthénium (III) comme le NAMI-A ou le KP-1019[11,12] qui sont des composés ayant atteints le stade des essais cliniques.

— Les complexes du ruthénium (II) comme les complexes RAPTA et dérivés[13,14] contenant un ligand arène montrant une certaine spécificité de leur efficacité sur des cellules malades par rapport à des cellules saines.

— Les complexes organométalliques du ruthénium présentant une liaison ruthénium carbone qui semble augmenter significativement l'activité anticancéreuse de ces composés par rapport à leur équivalent sans liaison covalente entre le métal et ses ligands.[15]

Pour nos travaux, ce sont ces derniers composés qui sont étudiés plus en détail et notamment leur association avec la macromolécule d'ADN.

3.2 L'adhésion des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses développent des propriétés d'adhésion différentes des cellules saines ce qui leur permet, entre autre, de pouvoir se déplacer d'un organe à un autre et former des métastases. Prenons l'exemple des cancers colo-rectaux qui sont très fréquents dans la population que ce soit chez les femmes ou chez les hommes. Ce type de cancer montre une grande facilité à former des métastases. Il est dû au départ à une modification du fonctionnement des cellules épithéliales recouvrant l'intérieur de l'intestin (voir figure 9). Ces dernières vont former un amas cellulaire appelé aussi une hyperplasie qui se crée à la surface interne de l'intestin. Les cellules modifiées dans cet amas subissent des modifications

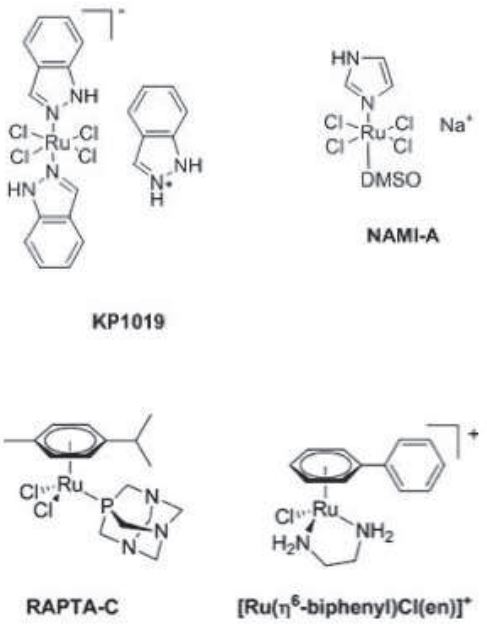


FIGURE 8 – Structure des complexes du ruthénium à activité anticancéreuse connus. Images issues de sites internet[16,17]

profondes, deviennent différentes des cellules saines d'origine et se transforment alors en une dysplasie. L'évolution des mutations cellulaires conduit alors à la formation d'un cancer in situ qui, après rupture de la paroi séparant l'intérieur de l'intestin avec l'environnement extérieur (paroi basale), forme un adénocarcinome : cancer invasif pouvant alors affecter les vaisseaux sanguins. La migration des cellules cancéreuses par le réseau sanguin ou lymphatique peut entraîner la formation de métastases dans le reste de l'organisme (organes voisins). Pour cela, les cellules malades doivent circuler dans les organismes et pour empêcher cette circulation il est nécessaire de comprendre en quoi les propriétés d'adhésion des cellules cancéreuses est différent de celui des cellules saines. Ainsi, l'étude de l'adhésion cellulaire sur des substrats mous mimant les tissus biologiques constitue un axe de recherche intéressant dans le cadre général de la compréhension du mécanisme de formation des métastases. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les propriétés d'adhésion cellulaire d'une lignée issue d'un adénocarcinome humain (SW480).

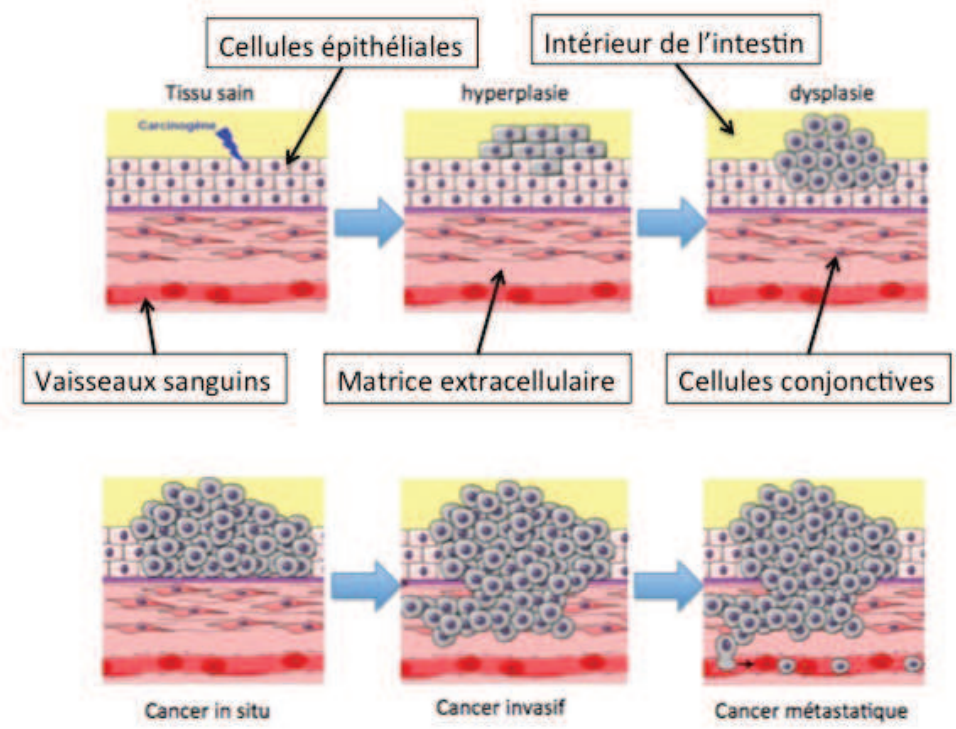


FIGURE 9 – Mécanisme de formation de métastases lors du développement d'un cancer colorectal. Image issue d'un site internet[18]

4 Objectifs des travaux de thèse

L'objectif principal de ces travaux de recherche et l'utilisation de la physico-chimie expérimentale et théorique pour l'explication des phénomènes biologiques suivants :

— L'étude des interactions entre des complexes du ruthénium (nommés RDC) et l'ADN.

— L'étude de l'adhésion de cellules cancéreuses issues d'un adénocarcinome (lignée SW480) sur des substrats mous.

En effet, il a été montré dans ce chapitre que ce sont deux processus importants dans le développement du cancer. La suite du manuscrit est donc organisée en deux parties associées à ces deux sujets.

L'étude des interactions entre les complexes organoruthénés et l'ADN est dans un premier chapitre, considérée d'un point de vue générale avec la description des équilibres entre une macromolécule et des petites molécules. De plus, ce chapitre contient une étude bibliogra-

phique plus précise des systèmes {ADN-Molécules} permettant d'exposer quelques résultats connus de la littérature et d'en dégager les objectifs principaux de notre travail.
Le deuxième chapitre présente les résultats des manipulations expérimentales réalisées, notamment les dosages des complexes RDC par de l'ADN suivis par spectrophotométrie UV-visible. La méthode d'analyse utilisée permet de conclure sur la présence des deux modes d'association entre les RDC et l'ADN et de caractériser quantitativement l'affinité de ces deux modes. Des manipulations complémentaires de spectrophotométrie UV-visible et de dichroïsme circulaire, ainsi que la comparaison des résultats du dosage d'un complexe du ruthénium modèle par de l'ADN, permettent d'identifier ces deux modes d'associations.
Le dernier chapitre de cette partie a pour objectif principal de valider la fiabilité de la méthode d'analyse utilisée dans le chapitre expérimental et constitue une étude théorique du modèle proposé pour décrire les équilibres mis en jeu lors de l'association des complexes RDC avec l'ADN.

L'étude de l'adhésion de cellules cancéreuses sur des substrats mous constitue un travail préliminaire à la mise en place d'une nouvelle thématique de recherche dans l'équipe. Le premier chapitre introduit brièvement les propriétés d'adhésion cellulaires et l'importance de leur compréhension. Il permet aussi de dresser un état de l'art, notamment au niveau des techniques expérimentales utilisées pour détecter et mesurer cette adhésion, et de justifier le choix d'étudier l'influence de l'élasticité du substrat sur la morphologie des cellules adhérées.
Ensuite, un chapitre expérimental présente les résultats obtenus sur l'évolution de la surface d'adhésion des cellules SW480 en fonction de l'élasticité de leur substrat. Les résultats obtenus sont encourageants mais pas aboutis au point de pouvoir donner un modèle traduisant le comportement cellulaire observé. Il apparaît cependant que ces résultats sont en accord avec la littérature.

Deuxième partie

Interactions RDC-ADN

Chapitre 1

Système macromolécule-molécules

Les équilibres entre des espèces chimiques sont généralement de la forme {molécule + α molécule}, où α est la stoechiométrie, et sont caractérisés par une constante d'affinité au travers de la loi d'action de masse. Dans ce travail nous nous intéressons au cas des systèmes {macromolécule + α molécules}, où une macromolécule est définie comme une molécule de grande taille et de masse molaire élevée. Les interactions entre ces composés sont les mêmes que pour les systèmes dits "simples" : interactions de Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes, π-stacking, ... En revanche, la présence de molécule de grande taille nécessite de traiter différemment ce type d'équilibres[19,20] comme nous le verrons par la suite. Les paramètres importants à prendre en compte pour la caractérisation d'un équilibre sont :

— Le nombre de molécules pouvant s'associer n'est pas forcément connu comme la stoechiométrie d'une réaction chimique d'un système "simple" {molécule + α molécules}.

— La présence simultanée de plusieurs types d'associations issues d'interactions de natures différentes.

— La sélectivité et la spécificité de l'association des molécules avec les macromolécules. Par exemple, les énantiomères Δ et Λ des complexes métalliques octahédriques peuvent s'associer de manière différente à une macromolécule chirale tel que l'ADN. De même, une molécule peut s'associer préférentiellement à une partie de la macromolécule

comme par exemple à une séquence particulière de paires de bases sur la double hélice d'ADN ou encore à un site particulier d'une protéine.

— Le phénomène de coopérativité (positive ou négative).[21] L'association d'une molécule sur une macromolécule favorise/défavorise l'association d'autres molécules sur cette même macromolécule.

A partir de ces observations, des modèles pour décrire ces équilibres ont été mis en place et nous nous proposons de présenter les différents travaux réalisés jusqu'à présent dans la section suivante de ce chapitre.

1 Étude générale des équilibres

1.1 Grandeurs caractéristiques

Afin de décrire précisément ces équilibres il est nécessaire de définir les grandeurs caractéristiques des systèmes : {macromolécule + molécules}.

1.1.1 Constante d'affinité

L'équilibre entre une macromolécule et n petites molécules est caractérisé par une constante d'affinité $K_a^{(M)}$ et peut s'écrire :

$$\mathrm{M} + \mathrm{nL} \underset{K_a^{(M)}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{M{-}L_n})$$

avec M : macromolécule, L : ligand (molécule chimique de petite taille), n : nombre de molécules pouvant s'associer sur la macromolécule.

En utilisant la loi d'action de masse, la constante d'affinité s'écrit :

$$K_a^{(M)} = \frac{[M - L_n]_{eq}}{[M]_{eq}[L]_{eq}^n}$$

avec $[M - L_n]_{eq}$: la concentration à l'équilibre du composé constitué d'une macromolécule M et n ligands L, $[M]_{eq}$: la concentration à l'équilibre de macromolécule non-associée à des

ligands et $[L]_{eq}$: la concentration à l'équilibre des ligands non associés à une macromolécule. Pour simplifier les écritures dans la suite nous notons que les concentrations à l'équilibre des composés liés s'écrivent avec un indice b (b = bound) et que les concentrations à l'équilibre des composés libres en solution s'écrivent avec un indice f (f = free). On a alors :

$$K_a^{(M)} = \frac{[M]_b}{[M]_f[L]_f^n} = \frac{n \times [L]_b}{[M]_f[L]_f^n}$$

Les lois de conservation de la matière imposent :

$$\begin{aligned} [M]_T &= [M]_b + [M]_f \\ [L]_T &= [L]_b + [L]_f \end{aligned}$$

avec l'indice T utilisé pour décrire les concentrations totales (libres et liées) des composés, on peut alors écrire :

$$K_a^{(M)} = \frac{n \times [L]_b}{([M]_T - n \times [L]_b)([L]_T - [L]_b)^n} \tag{1.1}$$

Ainsi pour déterminer la valeur de la constante d'affinité il est nécessaire de connaître la concentration de ligand liés ($[L]_b$) ainsi que le nombre de ligand associés à chacune des macromolécules (n). Cependant, ces valeurs ne sont pas facilement accessibles expérimentalement et il faut considérer une autre façon d'écrire l'équilibre.

1.1.2 Notion de site d'association

Dans certains cas, les solutions de macromolécules ne sont pas monodisperses et ces composés n'ont pas tous la même taille comme le montre la figure 1.1. La conséquence directe est que le nombre de ligand pouvant s'associer à chaque macromolécule n'est pas le même (2, 4 ou 6 selon la taille de la macromolécule sur la figure 1.1) et la constante d'affinité est différente pour chaque macromolécule. La valeur de $K_a^{(M)}$ alors déterminée n'est qu'une valeur moyenne de l'ensemble des constantes d'affinité de chacune des macromolécules en

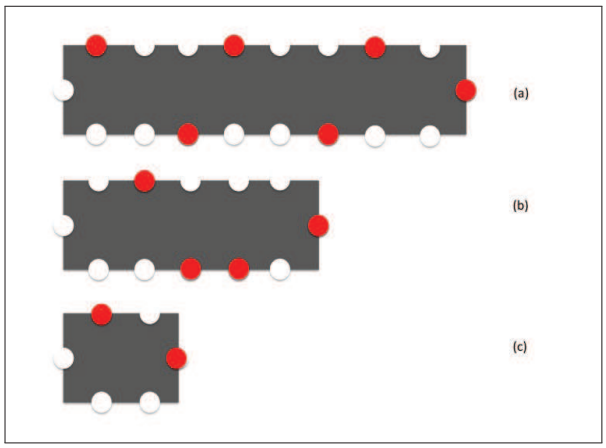


FIGURE 1.1 – Schématisation de trois macromolécules de taille différentes ayant le même rapport entre le nombre des sites d'association occupés par une molécule (ronds rouges) et le nombre de sites d'association total (ronds rouges et blancs).

solution. Cette grandeur n'est pas réellement représentative de la force mise en jeu lors de l'association entre ces deux composés. Pour caractériser correctement cette interaction il est pertinent de considérer l'équilibre qui existe entre une seule petite molécule et une partie de la macromolécule. Cette partie est appelée site d'association et est noté S dans les équilibres :

$$\mathrm{S} + \mathrm{L} \underset{K_a^{(S)}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S}{-}\mathrm{L})$$

La constante d'affinité associée à l'équilibre entre un site d'association et un ligand est notée $K_a^{(S)}$:

$$K_a^{(S)} = \frac{[L]_b}{[L]_f \times [S]_f} \tag{1.2}$$

avec $[L]_b$ et $[L]_f$ respectivement les concentrations en ligands liés et libres ; $[S]_f$ la concentration en sites d'association libres. La nature de l'interaction du site d'association avec les molécules considérées n'est, a priori, pas connue et il est possible de définir autant de types de sites d'association que de types d'interactions. De même, la taille des sites varie selon leur nature et les macromolécules étudiées. Un cas courant est l'exemple des macromolécules linéaires composées de monomères comme l'ADN qui est constitué d'une succession de paires de bases. Un site d'association est alors défini comme un groupe de p monomères.

La constante $K_a^{(S)}$ (équation 1.2) s'exprime comme une fonction de la concentration en ligand lié $[L]_b$ et de la concentration en site d'association libre $[S]_f$. On introduit une quantité qui permettra d'écrire $K_a^{(S)}$ en fonction d'une inconnue unique et des grandeurs totales connues a priori. Cette quantité est le taux d'occupation des sites d'association.

1.1.3 Taux d'occupation

Le taux d'occupation des sites d'association d'une macromolécule est défini comme le rapport entre la concentration de molécule liée à la macromolécule ($[L]_b$) et la concentration des sites d'association disponibles pour une interaction avec les petites molécules ($[S]_T$) :

$$\nu^S = \frac{[L]_b}{[S]_T} \tag{1.3}$$

De même que précédemment, les lois de conservation de la matière imposent :

$$[S]_T = [S]_f + [S]_b \tag{1.4a}$$

$$[L]_T = [L]_f + [L]_b \tag{1.4b}$$

L'expression de la constante d'affinité définie précédemment (équation 1.2) pour un équilibre simple entre un ligand et un site d'association devient alors :

$$K_a^{(S)} = \frac{\nu^S}{([L]_T - \nu^S[S]_T) \times (1 - \nu^S)} \tag{1.5}$$

D'après cette équation il apparaît clairement que la seule connaissance du taux d'occupation des sites d'association permet de déterminer la constante d'affinité $K_a^{(S)}$. En effet, sur la figure 1.1, le taux d'occupation est le même pour chacune des macromolécules malgré leurs tailles différentes. Cette grandeur est une caractéristique qui décrit correctement l'ensemble du système.

La détermination d'une constante d'affinité pour ce type d'équilibre est donc liée à la

connaissance du taux d'occupation des sites d'association de la macromolécule. Selon les modèles utilisés pour décrire les équilibres mis en jeu, la relation entre la constante d'affinité et le taux d'occupation est plus ou moins compliquée. La paragraphe suivant est consacré à présenter les différents modèles connus pour décrire ces systèmes et à mettre en place, pour chaque modèle, la relation existante entre la constante d'affinité et le taux d'occupation.

1.2 Les différents modèles

1.2.1 Sites d'association identiques et indépendants

1.2.1.a Modèle de Scatchard

A la fin des années 40, Scatchard[20] propose un modèle qui se base sur un certain nombre d'hypothèses : la macromolécule est constituée de sites indépendants et équivalents entre eux. Chaque site d'association est donc caractérisé par la même constante d'affinité et s'associe de la même façon aux petites molécules. Ce modèle correspond au cas le plus simple déjà proposé auparavant entre un site d'association et un ligand. D'après la loi d'action de masse écrite précédemment 1.5, on obtient la relation :

$$\frac{\nu^S}{[L]_f} = K_a^{(S)} \times (1 - \nu^S) \tag{1.6}$$

Une évolution de ce modèle a été proposée dans le cas des macromolécules linéaires constituées d'une succession de monomères. Pour le cas le plus simple, les sites d'association sont contigus sur la macromolécule (cas (a) de la figure 1.2), la relation existant entre la concentration totale de monomère ($[m]_T$) et la concentration totale des sites d'association ($[S]_T$) est alors triviale :

$$[m]_T = p \times [S]_T \tag{1.7}$$

L'équilibre s'écrit sous la forme :

$$\mathrm{p} \times m + \mathrm{L} \underset{K_a^{(S)}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{pm{-}L})$$

et l'expression 1.6 devient :

$$\frac{p \times \nu^m}{[L]_f} = K_a^{(S)} \times (1 - p \times \nu^m) \tag{1.8}$$

avec ν^m le taux d'occupation des monomères de la macromolécule défini comme : $\nu^m = \frac{[L]_b}{[m]_T}$.

Cependant, ce modèle n'est pas représentatif car il est peu probable que la répartition des sites d'association le long de la macromolécule linéaire soit tel que tous les monomères participent à la formation des sites d'association.

1.2.1.b Modèle de MacGhee et Von Hippel

En 1974, Mac Ghee[19] propose un modèle prenant en compte le fait que sur une même macromolécule linéaire il peut y avoir différentes possibilités de répartition des sites d'association. En effet, d'après le schéma de la figure 1.2, la répartition (b) donne 2 sites d'association et la répartition (c) en donne 3 bien que la taille des sites et le nombre de monomères sur la macromolécule soient les mêmes. Deux sites d'association ne sont donc pas forcément contigus et il peut y avoir des monomères "non utilisés" dans le décompte des sites d'association. En appliquant ce modèle il apparait que la relation entre la concentration totale de sites d'as-

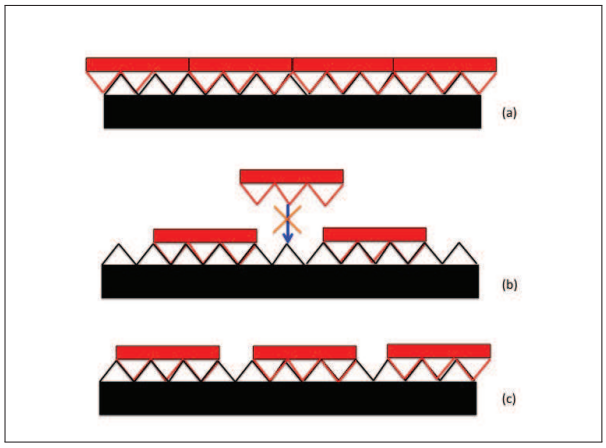


FIGURE 1.2 – (a) Répartition des sites d'association identiques et équivalents pour le modèle de Scatchard. (b) et (c) Deux répartitions possibles de l'association de molécules sur les monomères de la macromolécule : le nombre de molécules liées n'est pas le même (2 pour (a) et 3 pour (b)) s'il y a des monomères non utilisés entre les sites d'association.

sociation et la concentration totale en monomère n'est pas simple. Les équations précédentes sont alors modifiées en écrivant les poids statistiques de chacune des configurations globales, conduisant à un nombre maximal de sites associés, et Mac Ghee et Von Hippel obtiennent, dans l'hypothèse des sites d'association équivalents :

$$\frac{\nu^m}{L_f} = K_a^{(S)}(1 - p\nu^m)\left(\frac{1 - p\nu^m}{1 - (p-1)\nu^m}\right)^{(p-1)} \tag{1.9}$$

Dans le cas de certains équilibres, l'association d'une molécule à un site dépend du taux d'occupation de la macromolécule. Les molécules déjà associées peuvent favoriser ou défavoriser l'association d'une nouvelle molécule. Ce phénomène est appelé coopérativité.

1.2.2 Sites d'associations non-indépendants. Phénomène de coopérativité

On considère alors un équilibre pour des sites n'ayant aucun site voisin déjà associé

$$\text{(S−S−S)} + \text{L} \underset{K_{a1}}{\rightleftharpoons} \text{(S−SL−S)}$$

$$K_{a1} = \frac{[L]_{b1}}{[L]_f[S]_f} \tag{1.10}$$

Puis un équilibre pour des sites ayant un site voisin déjà associé

$$\text{(S−SL−S)} + \text{L} \underset{K_{a2}}{\rightleftharpoons} \text{(S−SL−SL)}$$

$$K_{a2} = \frac{[L]_{b2}}{[L]_f[S]_f} \tag{1.11}$$

Et enfin un équilibre pour des sites ayant les deux sites voisins déjà associés

$$\text{(SL−S−SL)} + \text{L} \underset{K_{a3}}{\rightleftharpoons} \text{(SL−SL−SL)}$$

$$K_{a3} = \frac{[L]_{b3}}{[L]_f[S]_f} \tag{1.12}$$

Avec la concentration des ligands liés pouvant s'exprimer comme la somme des concentrations des ligands liés dans les trois équilibres décrits ci-dessus :

$$[L]_b = [L]_{b1} + [L]_{b2} + [L]_{b3} \tag{1.13}$$

$$K_{a1} + K_{a2} + K_{a3} = \frac{[L]_b}{[L]_f[S]_f} \tag{1.14}$$

Les constantes d'affinité des équilibres 2 et 3 peuvent s'exprimer à l'aide de celle de l'équilibre 1 corrigées par un facteur ($\omega(\nu^S)$) dépendant du taux d'occupation des sites d'association de la macromolécule.

$$K_{a2} = \omega(\nu^S) \times K_{a1} \tag{1.15a}$$

$$K_{a3} = \omega^2(\nu^S) \times K_{a1} \tag{1.15b}$$

Et donc l'expression précédente s'écrit :

$$\frac{\nu^S}{[L]_f} = K_{a1}(\omega(\nu^S)^2 + \omega(\nu^S) + 1) \times (1 - \nu^S) \tag{1.16}$$

Ainsi, il existe une relation entre les constantes d'affinité et le taux d'occupation des sites d'association.

De plus, ce modèle de coopérativité permet aussi décrire les équilibres entre un ligand et un nombre p de monomères constituant un site d'association. La relation recherchée devient alors assez compliquée :

$$\frac{\nu^m}{L_f} = K_a^{(S)}(1 - p\nu^m)\left(\frac{(2\omega + 1)(1 - p\nu^m) + \nu^m - R}{2(\omega - 1)(1 - p\nu^m)}\right)^{(p-1)}\left(\frac{1 - (p + 1)\nu^m + R}{2(1 - p\nu^m)}\right)^2 \tag{1.17}$$

avec $R = \sqrt{(1 - (p + 1)\nu^m)^2 + 4\omega\nu^m(1 - p\nu^m)}$ et ω une fonction dépendante de ν^m et traduisant la nature et la force de la coopérativité dans l'équilibre. En prenant $\omega = 1$, le modèle décrit le cas des sites d'association équivalents et indépendants (équation 1.9). Pour des va-

leurs de $\omega > 1$, la coopérativité est dite positive et l'association d'une molécule à un site favorise l'association d'une autre molécule sur un site voisin. Réciproquement, les valeurs de $\omega < 1$ correspondent à de la coopérativité négative et une molécule liée défavorise l'association d'une autre molécule sur un site voisin.

D'après ces différents modèles, la relation entre le taux d'occupation et la constante d'affinité peut être déterminée plus ou moins facilement. Toutefois, pour déterminer expérimentalement la constante d'affinité de l'équilibre il est nécessaire de relier le taux d'occupation à une observable mesurable.

1.3 Détermination expérimentale du taux d'occupation

1.3.1 Évolution d'une observable lors d'un dosage

Les observables utilisées pour caractériser ces équilibres sont des propriétés du ligand et/ou de la macromolécule. Habituellement, celles utilisées sont : les propriétés optiques (absorption et émission), les propriétés mécaniques, l'énergie d'association (variation d'enthalpie et d'entropie)... Une description plus précise de ces différents exemples est proposée dans le paragraphe concernant les techniques expérimentales.

En considérant qu'effectivement la variation d'une observable du système permet de suivre l'évolution du taux d'occupation de la macromolécule au cours d'un dosage, il est alors nécessaire de connaître la relation existant entre ces deux grandeurs afin de quantifier la valeur de la constante d'affinité de l'équilibre. Supposons que l'association d'une molécule à un site d'association de la macromolécule modifie la grandeur mesurée Obs d'une petite variation δObs, il faut alors déterminer quelle sera la conséquence de l'association d'une deuxième molécule sur un autre site d'association (voisin ou non du site déjà occupé). Plusieurs possibilités se présentent :

— La modification de l'observable reste toujours la même (δObs) et alors le taux d'occupation est proportionnel à la variation totale de l'observable : $\nu^S \propto Obs_t - Obs_0$

avec Obs_t la valeur de l'observable à un instant t du dosage, Obs_0 la valeur initiale de l'observable lorsqu'aucune molécule n'est liée à la macromolécule. L'évolution de Obs_t au cours du dosage est une fonction linéaire de la concentration en ligand lié $[L]_b$:

$$Obs_t = Obs_0 + a \times [L]_b \tag{1.18}$$

En divisant les membres de cette équation par la concentration totale des sites d'association et en utilisant la définition du taux d'occupation ν^S (équation 1.3) on obtient :

$$\nu^S = \frac{Obs_t - Obs_0}{Obs_\infty - Obs_0} \tag{1.19}$$

avec Obs_∞ la valeur de l'observable pour un taux d'occupation final maximal $\nu^S_\infty = 1$. Le taux d'occupation initial ν^S_0 est nul car aucun ligand n'est associé à un site d'association. Le taux d'occupation des sites d'association est une valeur connue à condition de pouvoir mesurer les valeurs de l'observable initiale ($\nu^S = 0$) et finale (à saturation : $\nu^S = 1$) respectivement Obs_0 et Obs_∞.

— La modification de l'observable varie en fonction du nombre de molécules déjà associées sur la macromolécule : c'est le phénomène de coopérativité. La relation entre la variation totale de l'observable et le taux d'occupation est dans ce cas plus compliquée qu'une simple relation de proportionnalité.

La détermination expérimentale du taux d'occupation dépend fortement de la manière dont les molécules s'associent à la macromolécule. Selon le modèle utilisé, l'obtention du taux d'occupation à partir de la mesure expérimentale sera plus ou moins difficile. D'après la littérature, les systèmes qui nous intéressent dans ce travail, molécules de RDC en équilibre avec des macromolécules d'ADN, ne sont que très rarement analysés par un modèle avec coopérativité. En première approche, la détermination du taux d'occupation à partir de l'évolution d'une observable ne dépend donc que de la mesure des valeurs initiale et à saturation de cette observable. Comme nous le verrons dans le chapitre expérimental, la mesure

de la valeur d'une observable à saturation n'est pas toujours possible pour des raisons de solubilité des ligands ou autre limite expérimentale. Il est donc nécessaire d'utiliser une autre méthode d'analyse des résultats de dosage pour obtenir les valeurs de taux d'occupation. Bujalowski[22] et plus tard Nishida[23] ont alors proposé d'obtenir ces valeurs à partir de deux dosages complémentaires à des concentrations en ligand ou en sites d'association différents.

1.3.2 Méthode d'analyse à deux dosages

Cette méthode a été proposée en tout premier par Nishida[23] puis reprise ensuite par Bujalowski.[22] Une première approche de cette méthode est proposée dans ce paragraphe et est reprise plus précisément dans la suite du manuscrit.

Prenons l'exemple de deux dosages réalisés avec des concentrations de macromolécules différentes : un premier où la concentration totale de sites d'association est de $[S]_T$ et un deuxième dosage où la concentration est doublée : $[S]'_T = 2 \times [S]_T$. Au cours de ces dosages, en notant $[L]_f$ (respectivement $[L]'_f$) la concentration de ligands libres et ν^S (respectivement ν'^S) le taux d'occupation des sites lors du dosage à une concentration $[S]_T$ (respectivement $[S]'_T$), les lois d'action de masse s'écrivent :

$$K_a^{(S)} = \frac{\nu^S}{[L]_f(1-\nu^S)} \tag{1.20a}$$

$$K_a^{(S)} = \frac{\nu'^S}{[L]'_f(1-\nu'^S)} \tag{1.20b}$$

La variation d'une observable du système au cours des dosages est due à l'association des ligands libres aux sites d'association de la macromolécule. Sur le schéma ci-contre, les ligands associés à la macromolécule sont représentés en rouge et les ligands libres en bleu. Chaque ligand associé entraîne la modification de l'observable mesurée d'une amplitude identique (hypothèse de non-coopérativité). En se plaçant dans la situation où la variation de l'observable ramenée à un site d'association est identique, comme dans les deux situations étudiées sur le schéma de la figure 1.3, alors il apparaît que le taux d'occupation des sites

d'association est le même : $\nu^S = \frac{[L]_b}{[S]_T} = \frac{4}{12}$ pour le cas (a), $\nu^S = \frac{2}{6}$ pour le cas (b), soit $\nu^S = \frac{1}{3}$ pour les deux exemples. D'après les lois d'action de masse précédentes, si le taux

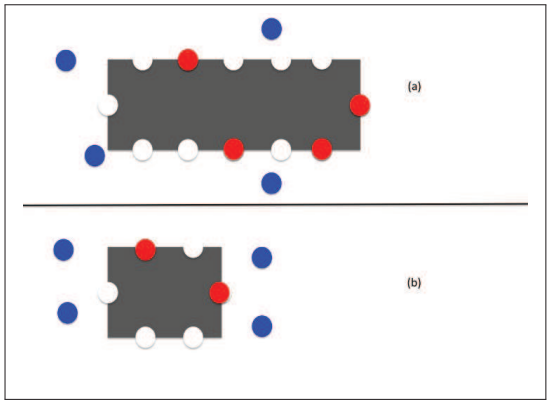


FIGURE 1.3 – (a) $[S]_T$ et (b) $[S]'_T = 2\times[S]_T$. Les ligands libres (bleu) et liés (rouge) permettent de déterminer que le taux d'occupation et la concentration de ligand libre sont les mêmes dans le cas où la variation de l'observable par site d'association est la même : $\frac{4}{12}$ pour (a) et $\frac{2}{6}$ pour (b).

d'occupation est le même alors la concentration des ligands libres en solution ($[L]_f$) est aussi la même. C'est à partir de ces observations qu'une méthode d'analyse permettant de déterminer expérimentalement le taux d'occupation des sites d'association de la macromolécule a été développée. Pour cela, deux dosages à des concentrations initiales différentes du composé dosé sont nécessaires. L'explication de cette méthode sera plus développée dans le chapitre traitant des études expérimentales des systèmes RDC-ADN.

2 Le système RDC-ADN

2.1 L'Acide Désoxyribo Nucléique

Comme il a été décrit précédemment, l'ADN est une macromolécule d'intérêt biologique formée par l'association de deux brins. Ces chaînes sont constituées d'une succession de brique élémentaire comprenant une nucléobase azotée et un sucre ribose. Ces éléments sont reliés entre eux par des phosphates. Dans ce paragraphe nous nous intéressons plus précisément à la structure en double-hélice[24] formée par l'association de ces deux brins.

L'association des deux brins est due à des interactions de type liaisons hydrogènes entre deux nucléobases. D'après la géométrie de ces bases, leur association est spécifique, l'adénosine ne s'associe qu'à la thymine et la guanine ne s'associe qu'à la cytosine. Ces paires de bases forment soit deux, soit trois liaisons hydrogènes (voir figure 1.4) d'où leur spécificité dans la formation de la paire de bases. La géométrie asymétrique de ces molécules entraîne une rotation au fur et à mesure que les bases s'associent le long des deux brins ce qui confère la structure de double hélice à cette macromolécule (voir figure 1.5).

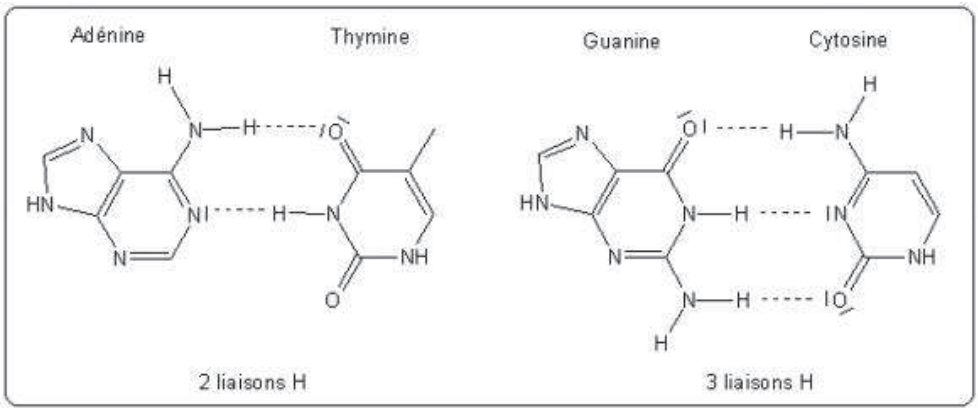


FIGURE 1.4 – Liaisons hydrogènes entre les nucléobases d'ADN. Image issue d'un site internet[25]

Il existe différents types d'ADN qui diffèrent principalement par le sens de rotation de la double-hélice, la distance séparant deux paires de bases et l'angle de ces paires de bases par rapport à l'axe de la macromolécule. Pour nos expériences, nous utilisons un ADN de type B qui est un ADN droit en ce qui concerne la rotation de la double-hélice, où la distance entre les paires de bases est de $3,4$ Å et l'angle d'inclinaison des bases est très faible ($\approx 2,4^{\circ}$). Pour faire une rotation complète autour de cette double-hélice il faut 10 paires de bases, soit un angle de rotation entre deux paires de bases successives de 36°. De plus, cette association particulière fait apparaître une asymétrie dans la structure de la double-hélice, où un petit sillon d'une profondeur de $7,5$ Å et d'une largeur de $5,7$ Å est située en face d'un grand sillon d'une profondeur de $8,5$ Å et d'une largeur de $11,7$ Å (voir figure 1.5). Cette structure à trois dimensions confère des propriétés caractéristiques différentes entre l'intérieur et la

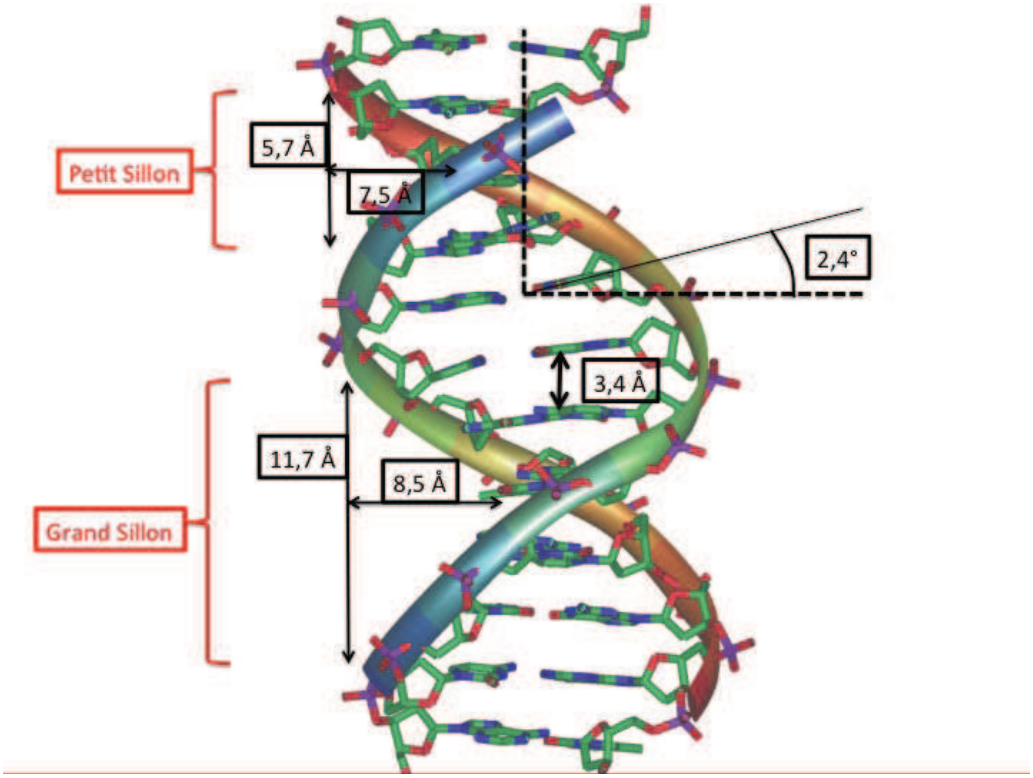


FIGURE 1.5 – Structure de la double-hélice d'ADN avec les valeurs numériques des distances et des angles caractéristiques du type B.

surface de la double-hélice. En effet, les paires de bases situées à l'intérieur donnent un caractère hydrofuge à cette zone à cause de la présence des cycles aromatiques. De même, les phosphates à la surface étant chargés donnent au contraire un caractère plutôt hydrophile à cette zone (voir figure 1.6).

Dans les noyaux des cellules, ces macromolécules s'organisent autour de protéines, les histones, qui contrôlent leur enroulement et leur réplication. Pour nos manipulations, nous nous limitons à l'étude de l'ADN sous sa forme de double-hélice et ne prenons pas en compte son organisation plus complexe dans les noyaux cellulaires.

2.2 Les complexes organométalliques du ruthénium : RDC

Il existe un grand nombre de complexes du ruthénium à activité anticancéreuse[26] souvent classés selon le nombre d'oxydation du ruthénium et du mode d'action du complexe (voir la

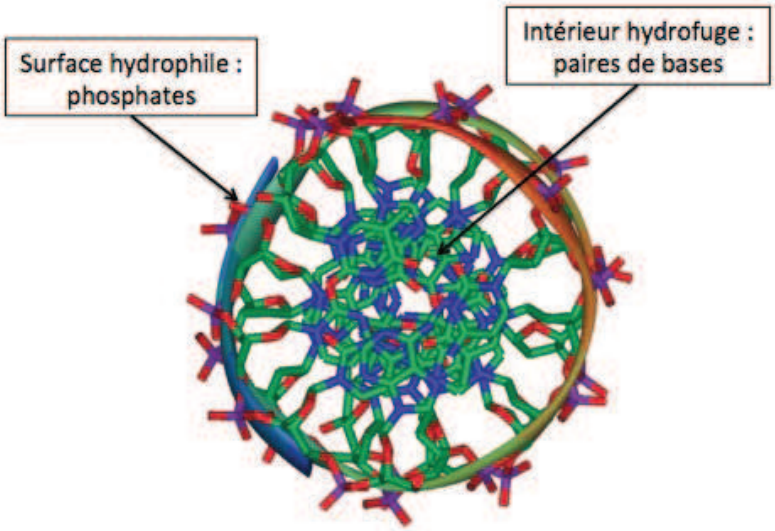


FIGURE 1.6 – Structure de l'ADN en vue de dessus montrant la distinction entre la zone centrale hydrofuge et la zone de la surface plutôt hydrophile. Le diamètre est de l'ordre de 20 Å pour ce type d'ADN.

partie d'introduction générale de ce manuscrit). Dans le laboratoire de Synthèses Métallo-Induites (LSMI) à Strasbourg, l'observation de la diminution de la toxicité des complexes lors de la présence d'une liaison covalente ruthénium carbone ainsi que l'augmentation de l'activité anticancéresue de ces composés ont justifié l'étude plus approfondie et la synthèse de nouveaux complexes organométaliques du ruthénium.[15] Ces composés, nommés RDC pour "Ruthenium Derived Compounds", constituent la base des études réalisés dans ces travaux de thèse.

Une chimiothèque[27] assez variée des ces composés est disponible mais seulement deux composés vont être étudiés dans ce manuscrit : le RDC37 et le RDC40. A cause de la faible solubilité des ces complexes dans l'eau, ce sont les composés chlorés équivalents qui vont en réalité être étudiés : RDC37Cl et RDC40Cl (voir la partie expérimentale de ce manuscrit).

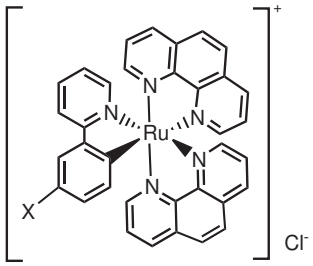


FIGURE 1.7 – Structure des complexes RDC37Cl (X = H) et RDC40Cl (X = NO_2).

Ces complexes sont formés par un atome de ruthénium au nombre d'oxydation (+II) coordiné à un ligand phénylpyridine (liaison covalente Ru-C) et deux ligands phénanthroline. La différence entre ces deux composés est la présence sur le ligand phénylpyridine du RDC40Cl d'un groupement attracteur électronique : NO_2 (voir figure 1.7).

2.3 Techniques expérimentales

Pour caractériser les équilibres entre les complexes métalliques (RDC) et l'ADN, les dosages peuvent être suivis de différentes manières : soit en suivant l'évolution des propriétés du complexe, soit en suivant l'évolution des propriétés de la macromolécule (ADN) ou encore en suivant directement l'association entre les deux composés. Cette section est consacrée à énoncer les techniques expérimentales les plus utilisées pour caractériser ces systèmes.

2.3.1 Spectroscopie d'absorption et d'émission

La spectroscopie d'absorption UV-visible constitue la majeure partie des analyses expérimentales de ce travail et sera donc développée plus en détail dans la partie consacrée à la présentation des résultats. La spectroscopie d'émission a apporté des résultats importants notamment au niveau de l'existence simultanée de plusieurs équilibres.[28,29] La mesure de deux temps de vie de relaxation de la luminescence du complexe associé avec l'ADN traduit la présence de deux types d'association.

2.3.2 Dichroïsme circulaire et linéaire

Les mesures de dichroïsme circulaire sont très utilisées pour mettre en évidence un changement de structure de l'ADN lors de l'association avec des complexes métalliques. De plus, l'analyse plus fine des résultats a permis de caractériser une certaine énantiosélectivité de l'association : les énantiomères Δ et Λ ne s'associent pas de la même manière et avec la même force à l'ADN. Le dichroïsme linéaire[30–33] est une méthode qui apporte des renseignements supplémentaires sur la conformation spatiale de l'association entre les complexes et la

double-hélice.

2.3.3 Viscosimétrie

De façon similaire, cette technique permet principalement de décrire qualitativement l'association sans apporter une quantification de la constante d'affinité. Lors de l'association, le rayon hydrodynamique du complexe ADN/RDC formé augmente, et donc la viscosité de la solution augmente aussi. Cependant, plusieurs causes peuvent être responsables de l'augmentation du rayon hydrodynamique : l'augmentation de la longueur de contour de l'ADN, un changement de sa flexibilité, ou encore des interactions électroniques modifiées. Pour cette raison, la mesure de la viscosité est très indirecte et ne peut pas être quantitative sans d'autres hypothèses. La plupart de ces mesures[34–37] sont réalisées en complément d'autres mesures par des techniques optiques citées précédemment.

2.3.4 FRET

La méthode de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) renseigne sur la longueur du double brin d'ADN. Si la longueur varie lors de l'association, alors la structure de la double hélice a été modifiée.[38] Pour cela, deux chromophores : un accepteur d'énergie et un donneur d'énergie sont liés aux deux extrémités d'un même double-brin d'ADN. Les chromophores sont choisis de façon à pouvoir exciter sélectivement le donneur d'énergie et détecter sélectivement l'accepteur d'énergie par fluorescence. Le transfert d'énergie non-radiatif entre les deux chromophores est fortement dépendant de la distance les séparant c'est à dire de la taille du brin d'ADN. Ainsi, la moindre variation de structure de la double-hélice entraîne une forte modification de l'efficacité de transfert d'énergie entre les deux chromophores. Cette méthode est donc très sensible aux équilibres faisant intervenir une modification de la structure de l'ADN.

2.3.5 Pinces optiques

C'est une méthode de mesure sur molécule unique. La réponse en force d'un double brin d'ADN soumis à une élongation est caractéristique de la macromolécule et l'association de complexes entraîne des modifications de cette réponse mécanique.[39–41] Selon la nature de l'association, la réponse mécanique est différente : ainsi ces mesures ont permis de mesurer les changements des propriétés mécaniques associés à chaque type d'interaction. En revanche, la concentration exacte de paire de bases d'ADN mises en jeu dans l'équilibre est difficile à connaître dans cette expérience et donc la détermination de la constante d'affinité est moins fiable pour cette technique.

2.3.6 ITC : Isothermal Titration Calorimetry

Lors de l'association des molécules de RDC avec l'ADN, les échanges de chaleur qui se produisent son enregistrés et permettent de déterminer les grandeurs thermodynamiques caractéristiques des équilibres mis en jeu. L'utilisation de cette méthode pour caractériser ces systèmes a permis de montrer que la plupart de ces équilibres sont dirigés par un phénomène entropique et non enthalpique.[42–44] La quantification de ces deux grandeurs dans le cas d'un équilibre est très important et permet d'émettre des hypothèses sur la nature des interactions mises en jeu lors de l'association.

2.3.7 RMN/RAMAN

La caractérisation des équilibres par ces types de spectroscopies donnent des informayions précieuses notamment sur la structure des systèmes formés par l'association des complexes avec l'ADN.[45–47]

2.3.8 Electrogenerated Chemiluminescence (ECL)

Cette technique est une méthode électrochimique mettant en évidence l'association des complexes du ruthénium avec l'ADN dans un montage électrochimique où la luminescence

du complexe lors de l'oxydation du Ru(II) à l'électrode est fortement diminuée lors de son interaction avec l'ADN.[48,49]

2.4 Types d'association

Au travers de différentes études expérimentales, les auteurs ont mis en évidence la possibilité de plusieurs modes d'association entre les complexes métalliques et l'ADN[50] (voir figure 1.8). Il apparaît même que l'activité biologique peut dépendre du mode d'association des complexes avec la double-hélice.[51]

Pour cette macromolécule, un site d'association est défini comme un ensemble de paires de bases (monomères) et la taille de chaque site est alors caractérisée par un nombre p de paires de bases. Les différents types d'association sont en général classés en utilisant la nature de l'interaction mise en jeu :

— association par formation de liaisons covalentes (cas du cis-platine avec l'ADN)[10]

— intercalation, qui fait intervenir des interactions de type $\pi - \pi^*$[28,52,53]

— association de surface, qui est due à des interactions de Van der Waals[50,54]

— interaction électrostatique qui a pour origine la présence de groupements chargés sur la macromolécule d'ADN[42,50,54]

Dans la suite, ces différents types d'association seront exposés plus précisément, excepté le cas des interactions covalentes qui n'intervient pas pour les complexes du ruthénium.

2.4.1 Intercalation

L'intercalation est certainement le type d'association qui a été le plus étudié et le plus discuté. Ce mode est caractérisé par une grande force d'association, la constante d'affinité entre un complexe métallique et l'ADN est toujours très élevée[39,40,49,55] : $K_a \approx 10^6\ M^{-1}$.

Un des ligands présent sur le complexe métallique a une géométrie lui permettant de s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN. L'interaction alors mise en jeu est de l'empilement π (π-stacking) dû à des recouvrement positifs entre les orbitales moléculaires frontières de

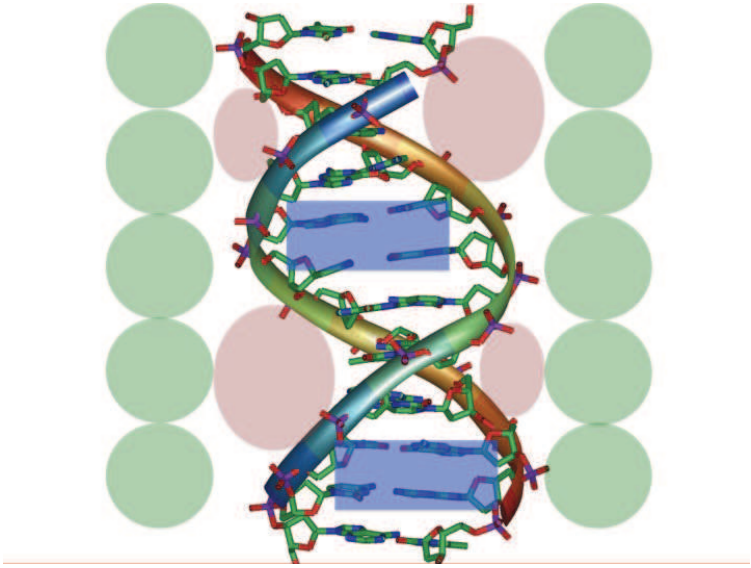


FIGURE 1.8 – Les différents sites d'associations possibles sur la macromolécule d'ADN : intercalation (rectangle bleu), association de surface (ovale rouge) et interaction électrostatique (rond vert).

type π des paires de bases et du ligand intercalant.[56] De plus, les cycles aromatiques des ligands intercalant est compatible avec le caractère hydrophobe du centre de la structure de la double-hélice. La conséquence directe de ce phénomène d'intercalation est la modification locale de la structure de l'ADN : la distance entre les paires de bases où s'intercale un ligand aromatique est doublée (6.8Å) par rapport à leur distance sans intercalant[57] (3.4Å). Pour que cette intercalation ait lieu il faut que le ligand soit un ligand aromatique plan, similaire aux bases aromatiques (purines ou pyrimidiques) formant les paires de bases de l'ADN. Les ligands aromatiques les plus couramment utilisés pour les complexes du ruthénium à activité anti cancéreuse sont les dérivés de la bipyridine (bpy), les dérivés de la phénanthroline (phen) et les dérivés de la dipyridophénazine (dppz). La structure de ces ligands est donnée dans la figure 1.9.

2.4.1.a Le ligand dppz

Le ligand dipyridophénazine (dppz) est un très bon intercalant car sa géométrie plane et sa surface assez développée lui permettent de s'intercaler assez facilement et profondément

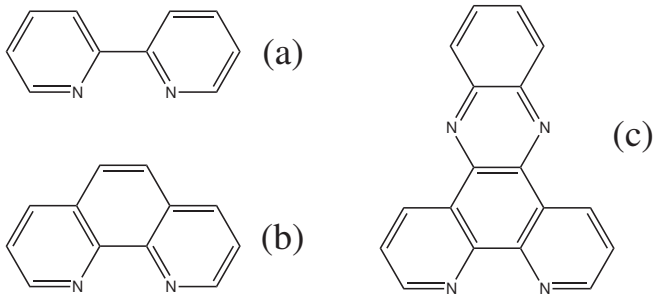


FIGURE 1.9 – Structure des ligands (a) bipyridine, (b) phénanthroline et (c) dipyridophénazine.

dans la double hélice d'ADN. Les complexes du ruthénium les plus étudiés possédant ce ligand sont : $Ru(bpy)_2(dppz)^{2+}$ et $Ru(phen)_2(dppz)^{2+}$. Des études de spectroscopie RAMAN ont montré que seule la partie phénazine du ligand dppz s'intercale entre les paires de bases de l'ADN,[47] ce qui permet d'estimer la profondeur de l'intercalation. De plus, la spectrosocpie d'émission enregistre deux temps de vie de relaxation pour le complexe $Ru(phen)_2(dppz)^{2+}$ associé avec l'ADN.[29] Une interprétation possible de ce résultat est que le ligand dppz peut s'intercaler sous différents angles par rapport à l'axe de la double-hélice d'ADN. Les manipulations de dichroïsme linéaire apportent une grande aide pour la quantification de ces angles d'intercalation[28,29] et les structures par rayons X[58] permettent d'avoir accès à la géométrie précise de l'association par intercalation.

Une autre discussion sur la structure de cette intercalation concerne l'approche du complexe venant s'intercaler entre les paires de bases. Elle peut se faire du côté du petit ou du grand sillon de l'ADN. Ce phénomène est très discuté car la plupart des auteurs ont supposé une approche par le grand sillon[59] pour des raisons d'encombrement stériques moindre que dans le petit sillon. Cependant, des études par RMN[60] et photophysique[61] montrent plutôt une approche par le petit sillon.

Ainsi, les complexes formés avec le ligand dppz sont communément considérés comme des intercalants tandis que les complexes formés par le ligand bipyridine ($Ru(bpy)_3^{2+}$) ne le sont pas car la taille de ce ligand ne lui permet pas d'interagir avec les bases de l'ADN se trouvant à l'intérieur de la structure de la double-hélice. D'autres molécules sont connues pour être de

bons intercalants, citons comme exemple : l'ethidium bromide, la proflavine, la daunomycine, la doxorubicine et la thalidomide.

2.4.1.b Le ligand phénanthroline

Pour le ligand phénanthroline, son caractère intercalant est soumis à discussion étant donné que sa taille intermédiaire est entre la dppz et la bipyridine. Le complexe référence qui a été fortement étudié est le $Ru(phen)_3^{2+}$. Les discussions sur sa possible intercalation sont encore très contreversées et si certains résultats de pinces optiques[40] tendent à montrer que ce mode existe bien pour ce complexe, d'autres résultats de viscosimétrie sont contradictoires avec l'existence d'une intercalation.[54] Certains auteurs proposent un mode intermédiaire d'intercalation partielle[32,36] (voir figure 1.10) où l'interaction mise en jeu reste l'empilement π mais la modification de la structure de l'ADN est beaucoup moins importante que dans le cas d'une intercalation classique. En effet, la faible profondeur d'une intercalation partielle

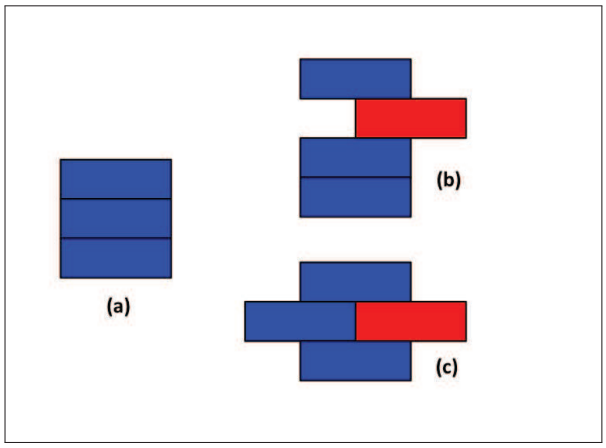


FIGURE 1.10 – Un ligand (en rouge) peut s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN libres en bleues (a) par une intercalation classique (b) ou partielle[32] (c). La modification de la longueur de l'ADN n'est pas modifiée dans le cas d'une intercalation partielle tandis que la distance entre les paires de bases est doublée pour une intercalation classique.

n'entraîne pas de fortes variations de la distance entre les paires de bases. Les modifications des propriétés de l'ADN sont alors limitées par rapport à une intercalation "classique" et plus difficilement détectables par les mesures habituelles (pinces optiques).

Comme le ligand dppz, la phénanthroline peut aussi s'intercaler avec des conformations spatiales différentes. Grâce à sa taille, il est supposé que ce ligand peut s'intercaler soit parallèlement aux paires de bases (intercalation classique) soit perpendiculairement.[36]

Lors d'une intercalation d'un complexe métallique avec la double hélice d'ADN plusieurs paires de bases sont occupées et ne pourront pas participer à l'association d'un autre complexe (du moins par l'intermédiaire d'une intercalation). Le site d'association de type intercalation a donc une taille définie par un nombre de paires de bases : p. Ce nombre p peut varier en fonction de l'importance des répulsions stériques causées par les ligands présents sur le métal mais non-intercalés. Des ligands volumineux occupent une grande place et bloquent l'accès à un plus grand nombre de paire de bases voisines à celle où le complexe est intercalé.

Pour terminer, citons la revue écrite par l'équipe de J. K. Barton[62] qui distingue le cas de l'intercalation et de l'insertion. Cet autre mode diffère de l'intercalation classique en remplaçant réellement une paire de bases d'ADN (expulsée hors de la struture de la double-hélice) par un ligand du complexe lors de l'association.

2.4.2 Association de surface

L'association de surface comme son nom l'indique est une association entre les complexes métalliques et la surface de la double-hélice d'ADN. Elle a pour origine des interactions de type Van der Waals. Ce mode correspond au deuxième type principal d'association des complexes du ruthénium avec l'ADN après l'intercalation. L'affinité mise en jeu par ce mode d'association est environ deux fois plus faible que pour l'intercalation.[50]

Comme pour l'intercalation, le site d'association alors formé est constitué par un certain nombre de paires de bases qui ne pourront plus être utilisées pour une autre association de surface. Par contre, si le complexe est associé dans le grand sillon, les paires de bases occupées peuvent encore l'être du côté du petit sillon. De même, on peut supposer que les paires de bases occupées par un complexe intercalé sont encore disponibles pour faire parties d'un site

d'association de surface. Alors, une paire de bases peut sans doute participer à la formation de plusieurs types de site d'association.

Les molécules Hoechst et YOYO sont des composés connus pour s'associer avec l'ADN par une association de surface.

Pour conclure, il est important de noter que ces deux modes d'association (surface et intercalation) sont peu ou pas influencés par la force ionique de la solution. En effet, ils ne mettent pas ou peu en jeu des interactions de type électrostatiques décrites dans le paragraphe suivant.

2.4.3 Interaction électrostatique

L'ADN est formé d'un squelette phosphatique chargé négativement qui crée un champ électrostatique où des cations présents en solution (Na^+, K^+, Ca^{2+},...) sont attirés. Des théories développées notamment par M. T. Record[63] et G. S. Manning[64] permettent d'expliquer la création d'un cylindre de cations formant une double couche électrostatique autour de la chaîne principale chargée négativement (ADN). Lors de l'association des complexes du ruthénium, eux mêmes chargés, avec l'ADN ces cations sont "expulsés" de la double couche électrostatique mais pas forcément dans des proportions stoechiométriques par rapport à la quantité de complexe entrant dans cette zone. Pour comprendre comment sont dirigées les interactions électrostatiques mises en jeu dans ces systèmes il faut connaître :

— le nombre de cations présents dans la double couche électrostatique

— l'influence de la concentration en sel sur l'épaisseur de cette zone

— l'influence de l'épaisseur de cette zone sur la force d'association électrostatique entre l'ADN et les complexes

D'après la théorie de Manning-Oosawa[65] sur la condensation des ions en solution, on considère l'ADN comme une chaîne linéaire chargée de rayon a (voir figure 1.11). Les groupements phosphates le long de cette chaîne sont espacés d'une longueur $l = 1.7$ Å(deux groupements phosphates par paire de bases distantes de 3.4 Å). Cette distance est à compa-

rer à la longueur de Bjerrum (l_b) qui est définie comme étant la distance entre deux charges pour laquelle l'énergie d'interaction électrostatique correspond à l'énergie d'agitation thermique (kT). A température ambiante ($25^{\circ}C$) cette longueur est de : $l_b = 7.2$Å dans l'eau. Les auteurs ont alors introduit un facteur défini comme le rapport entre la longueur de Bjerrum et la distance entre deux groupements chargés : $q_0 = \frac{l_b}{l}$. La théorie montre que si cette grandeur est supérieure à 1 ($q_0 > 1$) alors des cations vont se condenser, s'associer aux groupements phosphates de l'ADN pour diminuer l'énergie électrostatique d'interaction entre deux charges distantes de moins de l_b. L'équilibre étant atteint pour $q_0 = 1$. En pratique, pour un ADN double brin $q_0 = 4.2$. Ainsi une quantité de cations présents en solution vont former un cylindre autour de l'ADN. Quelle est l'épaisseur de ce cylindre ? Il dépend du rayon de la chaîne chargée a et de la concentration d'ions en solution. Dans le cas de l'ADN, la valeur de a est une constante et on ne s'attardera pas sur son influence, en revanche il faut déterminer dans quelle proportion la concentration en sel influence la taille de ce cylindre électrostatique. Manning propose d'étudier l'évolution de la grandeur q_0 en fonction de la distance à la chaîne linéaire r. Il apparaît une grandeur caractéristique correspondant à la distance pour laquelle

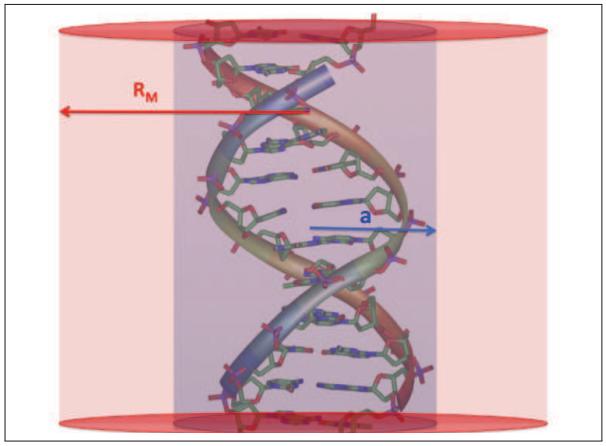


FIGURE 1.11 – Le rayon du cylindre de l'ADN (en bleu) est noté a et le cylindre de rayon R_M (en rouge) défini la zone dans laquelle les cations sont considérés comme associés à la macromolécule. Cette distance dépend de la concentration en sel de la solution.

la valeur de q_0 est égale à l'unité (équilibre). Au delà de cette distance les ions peuvent être considérés comme libres en solution. Cette distance est appelée rayon de Manning (R_M) et

peut être considérée comme l'épaisseur du cylindre électrostatique à l'intérieur duquel toutes les espèces chargées positivement sont en interaction avec l'ADN. L'expression mathématique du rayon de Manning est assez compliquée :

$$R_M = \sqrt{a\lambda_D} \times \exp - \left(\frac{C_0 + \frac{1}{q_0 - 1}}{2} \right) \tag{1.21}$$

on retiendra simplement qu'il est proportionnel à $\sqrt{\lambda_D}$ avec λ_D la longueur de Debye correspondant à la distance au delà de laquelle une séparation significative des charges peut avoir lieu. Une bonne approximation de la longueur de Debye est donnée par la relation : $\lambda_D = \frac{3}{\sqrt{C_S}}$ avec C_S la concentration des ions en solution en $mol.L^{-1}$. La valeur de C_0 correspond à une constante de valeur $C_0 \approx -1.5$. De plus pour la macromolécule d'ADN double brin, la facteur $q_0 = 4.2$ et le rayon $a = 10$ Å. Des valeurs numériques de ces grandeurs à différentes concentrations de sel en solution sont données dans le tableau suivant :

C_S	1 mM	10 mM	40 mM	100 mM
λ_D	94.5Å	30Å	15Å	9.4Å
R_M	17 Å	9.6 Å	6.8 Å	5.4 Å

On remarque donc que plus la concentration en sel est élevée, plus la longueur de Debye et donc le rayon de Manning est faible. Ainsi les charges positives sont très dense autour de l'ADN lorsque la concentration en sel est grande. L'écrantage est donc plus fort et il est raisonnable de penser que l'interaction de type électrostatique avec d'autres ions chargés ajoutés par la suite (comme les complexes RDC par exemple) est plus faible lorsque la concentration en sel augmente dans la solution. Une étude plus approfondie de l'interaction entre un ligand chargé et l'ADN condensé par des cations en solution a été réalisée par Record.[63] Pour comprendre et quantifier ce phénomène il faut écrire la réaction réelle (K_{reel}) qui se déroule lors de l'association entre un ligand et un site de l'ADN et la comparer à la réaction simplifiée écrite jusqu'à présent dans ce manuscrit (K_{app}).

$$\mathrm{pDNA_{bp}} + \mathrm{L} \underset{K_{app}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{pDNA_{bp}}\text{–}\mathrm{L})$$

$$\mathrm{pDNA_{bp}} + \mathrm{L} \underset{K_{reel}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{pDNA_{bp}}{-}\mathrm{L}) + \Psi Na^+$$

La relation entre les deux constantes d'affinité est donc :

$$\begin{aligned} K_{app} &= \frac{K_{reel}}{[Na^+]^{\Psi}} \\ \ln K_{app} &= \ln K_{reel} - \Psi \ln [Na^+] \\ \frac{d \ln K_{app}}{d \ln [Na^+]} &= -\Psi \end{aligned} \tag{1.22}$$

Avec Ψ une grandeur stoechiométrique caractérisant le nombre d'ions sodium expulsés par la complexation avec un ligand. Ainsi pour une molécule de RDC entrant dans le cylindre de rayon R_M, seulement une fraction de cations en sort. Pour l'ADN et un RDC monovalent, cette grandeur est estimée à $\Psi = 0.88$ pour une valeur de $q_0 = 4.2$. Certains résultats expérimentaux sur l'influence de la force ionique sur les équilibres entre l'ADN et les complexes du ruthénium ont déjà été réalisés[42,54] et la théorie développée ci-dessus a permis d'expliquer convenablement les phénomènes observés.

L'interaction électrostatique entre l'ADN et les complexes n'est donc pas spécifique ou sélective. Le nombre de sites d'association associés à ce type d'interaction est dépendant indirectement du nombre de paires de bases d'ADN (lui-même relié au nombre de groupements phosphates) mais surtout de la concentration en ions de la solution. Contrairement aux cas précédents, ce type d'association dépend donc de la force ionique de la solution et d'une portée plus grande. Il n'y a pas de changement structural de la double hélice lors de l'association par interaction électrostatique et la force d'interaction mise en jeu est beaucoup plus faible que celle de l'intercalation.

2.5 Principaux résultats connus

2.5.1 Énantiosélectivité de l'association

Le phénomène d'énantiosélectivité a été observé en tout premier lieu sur le complexe $\mathrm{Ru(phen)}_3^{2+}$ [52] et a aussi été mis en évidence sur les complexes contenant le ligand dppz

comme Ru(phen)$_2$(dppz)$^{2+}$ [31] ou Ru(bpy)$_2$(dppz)$^{2+}$. Si on considère un mode d'association

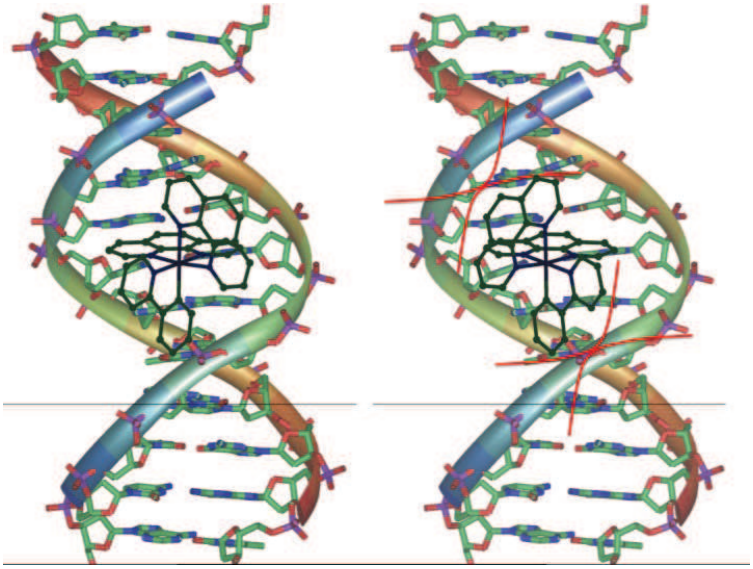


FIGURE 1.12 – A gauche, l'énantiomère Δ du $Ru(phen)_2(dppz)^{2+}$ intercalé entre les paires de bases d'ADN au travers du ligand dppz et à droite l'énantiomère Λ. Des interactions stériques (en rouge) entre le squelette phosphate de l'ADN et les ligands phénanthroline du complexe apparaissent dans le cas de l'énantiomère Λ.

par intercalation (ou intercalation partielle), un des ligand du complexe (dppz ou phenanthroline) est intercalé entre les paires de bases d'ADN et selon la nature de l'énantiomère Δ ou Λ, les autres ligands présents sur le centre métallique peuvent développer des interactions stériques plus ou moins déstabilisantes avec le squelette phosphaté de l'ADN (voir figure 1.12). Des mesures de spectroscopie d'absorption et de dichroïsme circulaire[31] ont permis de mettre en évidence une différence de constante d'affinité (approximativement d'un facteur 5) entre les deux énantiomères intercalés de $Ru(phen)_2(dppz)^{2+}$.

Si les complexes sont associés à l'ADN par l'intermédiaire d'une association de surface, cette énantiosélectivité est beaucoup moins importante car la différence d'interactions destabilisantes entre les énantiomères Δ et Λ dans ce mode est très faible. Des expériences de spectroscopie d'émission et de polarisation ont cependant permis de mettre en évidence une faible énantiosélectivité de l'énantiomère Λ du complexe Ru(phen)$_3^{2+}$ lorsqu'il est supposé une association de surface.[50]

Enfin, pour le mode d'association électrostatique, aucune mesure n'a permis de montrer une quelconque sélectivité de l'ADN pour un énantiomère étant donné qu'ils portent exactement la même charge et que la distance séparant l'ADN et les complexes dans ce mode est beaucoup trop grande pour voir apparaître des interactions stériques.

2.5.2 Spécificité de l'association

Des études sur la spécificité de l'association entre les complexes contenant un ligand dppz et les paires de bases AT ou GC ont été réalisées et montrent une préférence d'association pour les bases AT par rapport aux GC.[66–69] L'obtention d'une grande spécificité de certains complexes pour des paires de bases particulières a des grandes applications en ciblage et en diagnostic des maladies. On peut aussi signaler la spécificité d'association de certains complexes à des structures d'ADN particulières : Z-ADN, B-ADN, A-ADN, quadruplex.[43]

Les complexes ne contenant pas le ligand dppz ne montrent pas une grande spécificité pour un certain type de paires de bases. Il semble assez clair que ce phénomène est uniquement dirigé par l'intercalation d'un ligand (dppz) ayant une affinité plus grande pour les paires de bases AT.

2.5.3 Existence simultanée de plusieurs modes d'association

Des situations où un unique mode d'association développe plusieurs types de réponses expérimentales ont déjà été vues précédemment : différents angles d'intercalation, sélectivité des énantiomères Δ et Λ des complexes octahédriques. Mais il se peut aussi que plusieurs modes d'associations décrits dans la section précédente coexistent lors de l'équilibre entre un complexe du ruthénium et l'ADN. Pour expliquer ces phénomènes, deux cas principaux peuvent être envisagés :

— Chacun des énantiomères Δ et Λ du complexe s'associe par un mode d'association unique. Par exemple, l'énantiomère Δ s'intercale tandis que le Λ se complexe par association de surface. En effet, les interactions stériques déstabilisantes développées

dans le cas de l'énantiomère Λ sont parfois suffisantes pour que le complexe s'associe préférentiellement par association de surface.[30,50]

— Cependant, certains résultats[33] montrent que les deux énantiomères sont capables de s'associer à l'ADN par une intercalation partielle. L'apparition d'un deuxième mode d'association autre que l'intercalation ne pas alors être dû qu'à la variation du rapport entre la concentration en complexe et la concentration en paires de bases d'ADN $\left(\frac{[D]_T}{[L]_T}\right)$. Pour un rapport élevé (> 10) alors l'intercalation partielle est la seule existante, mais pour un rapport plus faible (< 1) alors un deuxième mode d'association est observé : l'association de surface ou l'interaction de type électrostatique. Ce phénomène constitue la base des études expérimentales de ce travail et sera largement développé dans le chapitre de présentation des résultats du manuscrit.

Pour ces deux cas de figure, il existe une différence d'affinité entre les deux modes d'associations observés et un des objectifs des mesures réalisées pendant ces travaux de thèse est de caractériser ces équilibres en les modélisant.

3 Objectifs des travaux

Les travaux sur les interactions entre des complexes du ruthénium et une macromolécule d'ADN ont pour but d'analyser les types d'associations mises en jeu dans ces équilibres en fonction du rapport de concentration de ces composés. Les techniques expérimentales utilisées sont connues mais l'analyse qui en est faite est approfondie afin d'éviter toute hypothèse réductrice dans l'interprétation des résultats. De plus, d'après les résultats expérimentaux obtenus, un modèle permettant de décrire ces équilibres est proposé.

Chapitre 2

Étude expérimentale des équilibres RDC-ADN

1 Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

1.1 Spectres d'absorption

Les spectres d'absorption expérimentaux de l'ADN utilisé au cours des dosages, et des complexes du ruthénium étudiés sont présentés sur la figure 2.1. Ces composés possèdent des bandes d'absorption caractéristiques.

Pour l'ADN, il existe des bandes d'absorption dans le domaine de l'ultra-violet et la plus caractéristique est celle se trouvant à 260 nm. Cette bande correspond à des transitions de type $\pi - \pi*$ des électrons des cycles aromatiques des paires de bases organisées en structure de double hélice (macromolécule d'ADN).

Pour les RDC, il existe deux bandes caractéristiques, une dans le domaine de l'ultra-violet (à environ 275 nm) et une dans le visible (entre 400 et 550 nm). La bande dans l'ultra-violet correspond à des transitions électroniques dites centrées sur le ligand (LC). Les molécules aromatiques telles que les bipyridine, phénanthroline, phenyl-pyridine et autres dérivées présentent des transitions électroniques de type $\pi - \pi^*$ dont l'énergie correspond à

celle des rayonnements UV. La bande dans le visible correspond à des transitions de charge se réalisant entre le métal central (ruthénium) et les ligands associés : transition MLCT (Metal to Ligand Charge Transfer). C'est ce type de transition qui est à l'origine de la couleur des complexes étudiés.

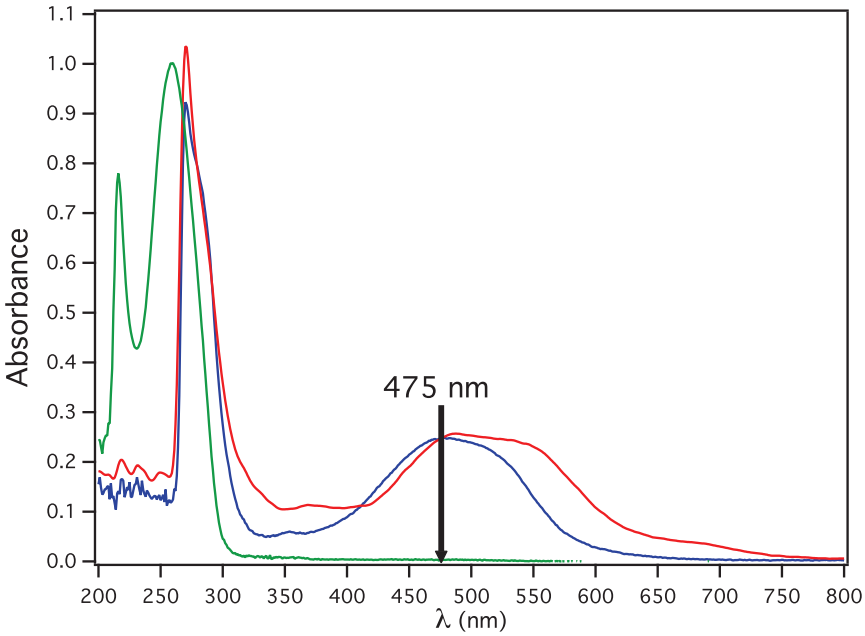


FIGURE 2.1 – Spectres d'absorption UV-visible de l'ADN (vert) à 1.5 10^{-4} $mol.L^{-1}$ en paire de bases, du RDC37Cl (rouge) à 2 10^{-5} $mol.L^{-1}$ et du RDC40Cl (bleu) à 2 10^{-5} $mol.L^{-1}$ dans l'eau. La bande située dans les longueurs d'ondes de l'UV correspond à une transition de type $\pi - \pi^*$ des cycles aromatiques des bases (purines et pyrymidiques) pour l'ADN et des ligands (bipyridine, phenylpyridine, phénanthroline, ...) pour les RDC. Pour les complexes, la bande située dans les longueurs d'ondes du visible ($400-600$ nm) correspond à une transition de type MLCT (Metal to Ligand Charge Transfer).

1.2 Dosage des RDC par l'ADN

Afin de suivre le dosage d'une solution de RDC par de l'ADN il faut déterminer une longueur d'onde de travail permettant de caractériser l'équilibre entre ces composés. Pour éviter de confondre la proportion de l'absorbance due à l'un ou l'autre des composés il est nécessaire de se placer dans un domaine où un seul des composés est actif. Comme le montrent les spectres d'absorption (fig.2.1), l'ADN n'absorbe pas dans le visible contrairement au

complexe RDC. De plus, on choisit la longueur d'onde d'absorbance maximale de la bande MLCT des RDC ($\lambda_{max} = 475\ nm$) pour minimiser le rapport signal sur bruit lors de la mesure et ainsi optimiser la détection des variations d'absorbance au cours du dosage.

L'ajout de petites quantités de paires de bases d'ADN dans une solution de RDC entraîne une diminution de l'intensité d'absorbance à la longueur d'onde de travail (notée Abs). La figure 2.2 propose le tracé de l'évolution de cette absorbance lors du dosage du complexe RDC37Cl par de l'ADN. Pour s'affranchir des effets de dilution lors du dosage, on trace la grandeur $\left(\frac{Abs}{[RDC]}\right)$ en fonction de la concentration en paire de bases d'ADN.

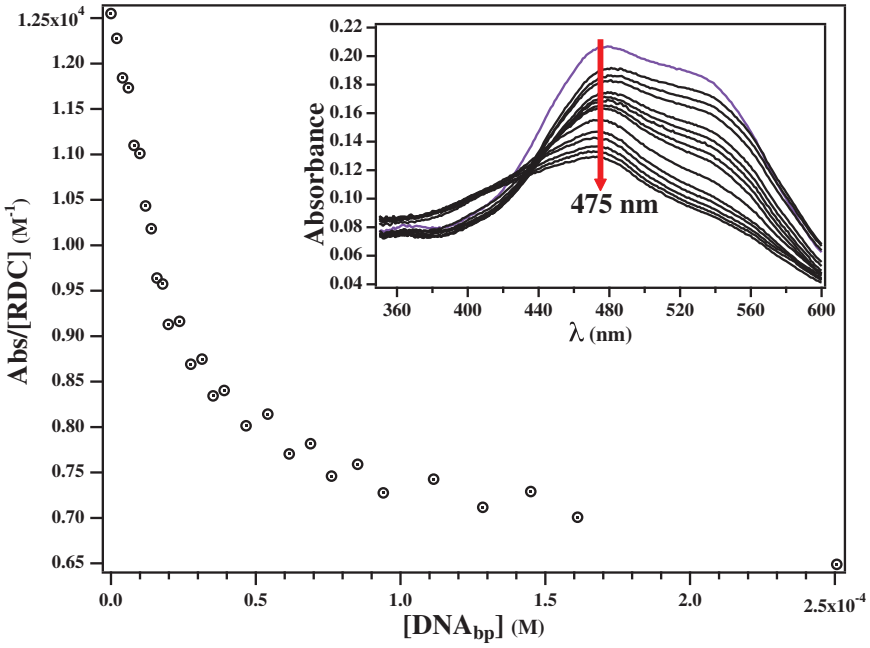


FIGURE 2.2 – Diminution de l'absorbance par mole de RDC37Cl à $\lambda = 475\ nm$ (transition MLCT) lors du dosage de RDC37Cl à $2.10^{-5}\ M$ par de l'ADN. Insert : spectres d'aborbance de la bande MLCT pour différentes concentrations de paires de bases d'ADN ajoutées. La flèche rouge montre l'évolution des spectres au cours du dosage.

La loi de Beer Lambert donne la relation existante entre l'absorbance (A) d'une solution et sa concentration :

$$A = \epsilon \times l \times C$$

avec ϵ le coefficient d'absorption molaire ($M^{-1}cm^{-1}$), l la longueur de solution traversée par

le faisceau lumineux (cm) et C la concentration de la solution étudiée (M). D'après cette relation, la diminution de l'absorbance alors observée peut provenir soit d'une diminution de la concentration du RDC en solution, soit d'une diminution de son coefficient d'absorption molaire. Étant donné qu'il n'y a pas de transformation chimique des composés mis en solution (RDC et ADN) et que la variation d'absorbance est indépendante de la concentration en RDC lors du dosage, il apparaît alors que l'association des RDC avec la macromolécule d'ADN modifie le coefficient d'absorption molaire du complexe à la longueur d'onde de travail ($\lambda = 475\ nm$). Ce phénomène est dû à une modification des propriétés électroniques du complexe lors de son association avec l'ADN qui entraîne un changement de la probabilité de transition électronique (ϵ) à l'origine du phénomène d'absorption.

Ces observations conduisent à exprimer l'absorbance totale du système au cours du dosage en fonction de deux termes distincts : un premier correspondant à l'absorbance des complexes libres en solution et un autre à l'absorbance des complexes liés à la double-hélice d'ADN. De façon générale, on notera dans la suite respectivement la concentration en RDC et en paires de bases d'ADN : $[L]$ et $[D]$. De même, les indices : f, b et T associés aux grandeurs représentent respectivement les cas libres (free) ou non-associés, liés (bound) et totaux c'est à dire libres et liés. Ainsi, à $\lambda = 475\ nm$:

$$\begin{aligned} A_{obs} &= A_f + A_b \\ A_{obs} &= \epsilon_f [L]_f + \epsilon_b [L]_b \end{aligned}$$

il est à noter ici que le coefficient d'absorption molaire (ϵ) est donné dans une unité particulière : M^{-1}, plutôt que dans l'unité habituelle : $M^{-1}cm^{-1}$, uniquement par souci de simplification des notations. Pour cela, il suffit de sous-entendre le terme de longueur dans l'équation de Beer Lambert : cette opération est possible étant donné que la longueur de la cuve traversée par le faisceau lumineux lors de la mesure est de 1 cm et reste constante pour tous les dosages. De même, la longueur d'onde pour laquelle sont définies ces grandeurs ne

sera pas toujours précisées dans la suite, il sera alors supposée qu'il s'agit de la longueur d'onde d'absorbance maximale du complexe pour la bande d'absorption du visible (MLCT). En utilisant les lois de conservation de la matière on obtient l'expression de l'absorbance suivante :

$$A_{obs} = \epsilon_f[L]_T + (\epsilon_b - \epsilon_f)[L]_b$$

et en définissant le taux d'occupation des paires de bases de l'ADN comme le rapport des concentrations de ligand lié et de paires de bases totale : $\nu^D = \frac{[L]_b}{[D]_T}$, il apparaît alors une grandeur notée Q^D_{obs} et représentant la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN (unité : M^{-1}).

$$Q^D_{obs} = \frac{\epsilon_f[L]_T - A_{obs}}{[D]_T} = \frac{\epsilon_f[L]_b + \epsilon_f[L]_f - \epsilon_f[L]_f - \epsilon_b[L]_b}{[D]_T} = (\epsilon_f - \epsilon_b) \times \nu^D \tag{2.1}$$

avec $\epsilon_f[L]_T$: l'absorbance initiale sans association des complexes avec l'ADN.

D'après l'équation 2.1, la grandeur Q^D_{obs} est proportionnelle au taux d'occupation de l'ADN : grandeur recherchée pour caractériser l'équilibre. Étant donné que Q^D_{obs} est une grandeur expérimentale il suffit de déterminer la constante de proportionnalité, c'est à dire la valeur de ϵ_b pour avoir accès au taux d'occupation des paires de bases : ν^D. Pour obtenir cette valeur à saturation (l'ADN entièrement saturé par des molécules de RDC) il faut être certain que la concentration en RDC soit suffisante pour que l'ensemble des molécules soit associé à l'ADN. Cependant, la solubilité des RDC dans l'eau ne permet pas d'arriver à de telles concentrations et donc d'obtenir une valeur à saturation exploitable. Une méthode d'analyse développée par Bujalowski et plus tard par Nishida (déjà brièvement présentée au Chapitre 1) permet de s'abstenir de la détermination de cette constante et de déterminer la valeur de ν^D par l'intermédiaire de deux dosages à des concentrations en RDC différentes.

1.3 Méthode de mesure à deux dosages

Reprenons ce qui a été introduit précédemment en se basant sur les analyses de Nishida et Bujalowski. Le dosage de RDC par l'ADN est réalisé à deux concentrations initiales en complexe différentes. Comme il a été montré précédemment, cette méthode permet de s'affranchir des hypothèses de linéarité lors de l'association des complexes avec la macromolécule d'ADN. L'équilibre le plus simple pouvant être écrit pour décrire le dosage réalisé est le suivant :

$$\mathrm{pDNA_{bp}} + \mathrm{RDC} \underset{K_a}{\rightleftharpoons} (\mathrm{pDNA_{bp}}{-}\mathrm{RDC})$$

avec p : le nombre de paires de bases occupées par une molécule de RDC ou encore la taille d'un site d'association. La constante d'affinité de cet équilibre peut s'écrire dans le cas des deux dosages à des concentrations en RDC, $[L]_T$ et $[L]'_T$:

$$\begin{aligned} K_a &= \frac{[L]_b}{[L]_f[D]_f} = \frac{\nu^D}{[L]_f(1-p\nu^D)^{(p-1)}} \\ K_a &= \frac{[L]'_b}{[L]'_f[D]'_f} = \frac{\nu'^D}{[L]'_f(1-p\nu'^D)^{(p-1)}} \end{aligned}$$

Pour la même valeur de taux d'occupation de l'ADN ($\nu^D = \nu'^D$), les expressions précédentes montrent que la concentration en ligand libre est aussi la même ($[L]_f = [L]'_f$). En utilisant les lois de conservation de la matière pour les deux dosages on obtient, pour le même taux d'occupation de l'ADN aux deux concentrations $[L]_T$ et $[L]'_T$:

$$\begin{aligned} [L]_T &= [L]_f + \nu^D[D]_T \\ [L]'_T &= [L]_f + \nu^D[D]'_T \end{aligned}$$

Et donc l'expression du taux d'occupation devient :

$$\nu^D = \frac{[L]'_T - [L]_T}{[D]'_T - [D]_T} \tag{2.2}$$

De plus, d'après l'expression de la variation d'absorbance par paire de bases (eq. 2.1), se placer à un taux d'occupation identique pour les deux dosages signifie avoir la même valeur de Q^D_{obs}. Pour expliquer la méthode, prenons un exemple de dosage réalisé sur le complexe RDC37Cl (fig. 2.3). Pour cette manipulation, deux dosages à des concentrations de 2.10^{-5} M et 4.10^{-5} M sont réalisés et dans les deux cas la variation de l'absorbance du complexe par paires de bases d'ADN (Q^D_{obs}) est représentée en fonction de la concentration totale en paires de bases d'ADN ($[D]_T$). Les deux courbes obtenues sont représentées sur la même figure et graphiquement, une droite horizontale représente une valeur unique de taux d'occupation quelque soit la concentration de complexe utilisée pour le dosage. Ainsi, pour une valeur de Q^D_{obs}, il est associé deux couples de points ($[L]_T$,$[D]_T$) et ($[L]'_T$,$[D]'_T$) correspondant à l'intersection de la droite horizontale et des courbes expérimentales. On détermine alors la valeur numérique du taux d'occupation associée à cette variation d'absorbance du ligand par paires de bases d'ADN grâce à l'équation 2.2. Cette opération est répétée pour différentes valeurs de Q^D_{obs} grâce à une procédure informatique. Ainsi l'évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D peut être construite afin de déterminer le coefficient de proportionnalité reliant ces deux grandeurs : $(\epsilon_f - \epsilon_b)$ dans le modèle simple proposé (eq. 2.1).

1.4 Présentation des résultats expérimentaux

En utilisant la méthode décrite précédemment sur les manipulations expérimentales de spectrophotométrie d'absorption des complexes RDC on obtient l'évolution de la variation d'absorbance par paire de bases en fonction du taux d'occupation de l'ADN au cours du dosage. Selon l'équation 2.1, la variation d'absorbance par paire de bases est proportionnelle au taux d'occupation de l'ADN par les RDC. La représentation graphique de Q^D_{obs} en fonction de ν^D serait alors une droite passant par l'origine : le taux d'occupation étant nul quand l'absorbance n'a pas varié par rapport à une solution de RDC seuls en solution. Les résultats expérimentaux obtenus pour les RDC ne présentent cependant pas ce type de comportement

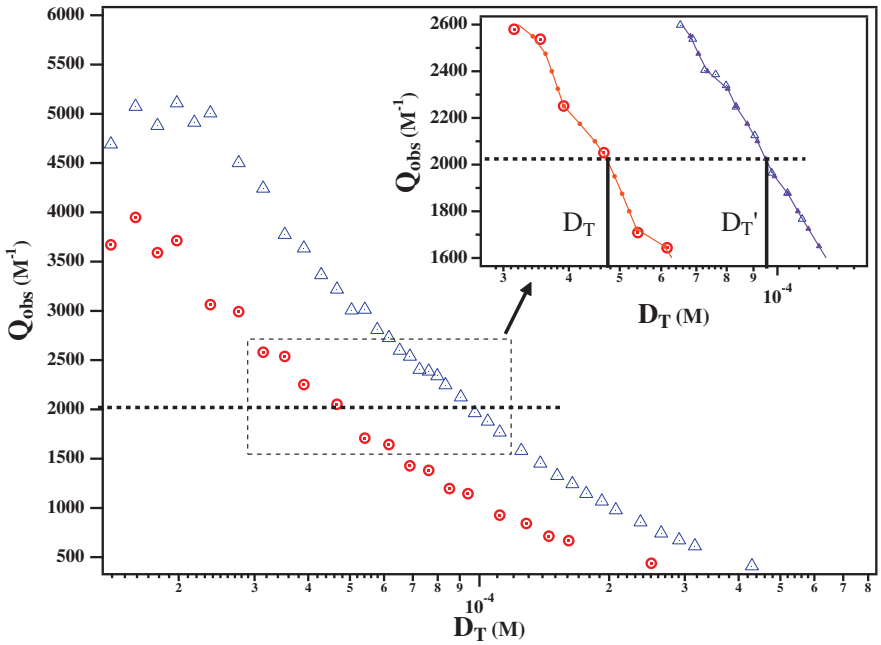


FIGURE 2.3 – Évolution de la variation d'absorbance par paires de bases d'ADN : Q^D_{obs} en fonction de la concentration en paires de bases d'ADN : $[D]_T$ pour deux concentrations de RDC37Cl différentes : $[L]_T = 2.10^{-5}$ M (rond rouge) et $[L]'_T = 4.10^{-5}$ M (triangle bleu). *Insert* : agrandissement de la zone de la courbe dans le carré en pointillé. Á une valeur de Q^D_{obs} donnée (ligne en pointillé) correspond deux valeur de concentrations en paires de bases d'ADN ($[D]_T$; $[D]'_T$) respectivement associées aux concentrations en RDC37Cl ($[L]_T$; $[L]'_T$). Une extrapolation linéaire de valeur a été faite entre deux points expérimentaux (petits points reliés par une ligne) afin d' avoir des Q^D_{obs} communs aux deux courbes expérimentales. Pour obtenir des valeurs du taux d'occupation ν^D l'équation 2.2 a été utilisée pour l'ensemble de ces Q^D_{obs}.

(fig. 2.4 et 2.5). En effet, dans le cas du RDC37Cl, la réponse de la variation d'absorbance du système n'est pas directement proportionnelle au taux d'occupation de l'ADN ; mais il apparaît deux domaines linéaires séparés par une valeur caractéristique notée : ν^D_{cross} sur le graphe. Cette valeur caractéristique se trouve aux alentours de $\nu^D = 0.4$, par contre pour le RDC40Cl on remarque un comportement plutôt linéaire comme le laissait prévoir les analyses précédentes. Nous verrons plus tard que la réponse observée pour le RDC40Cl ne lui confère pas un comportement complètement différent de celui du composé RDC37Cl mais seulement que son association correspond à un cas particulier de l'analyse générale. De plus, on peut aussi noter que le taux d'occupation de l'ADN donné dans les résultats

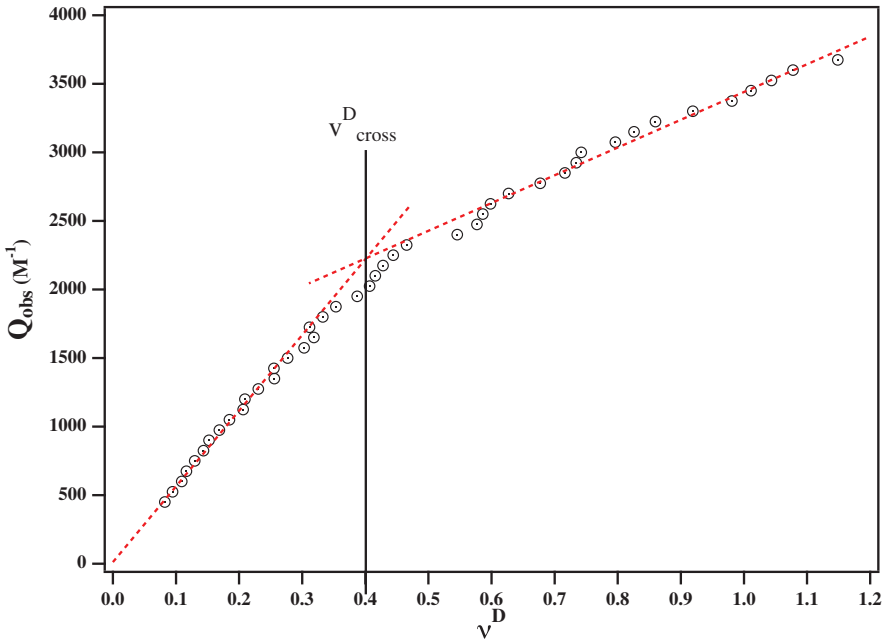


FIGURE 2.4 – Évolution de la variation d'absorbance par paire de base en fonction du taux d'occupation de l'ADN pour le complexe RDC37Cl. Les deux domaines linéaires sont représentés par des droites pointillées rouge.

expérimentaux dépassent la valeur de 1. Ce phénomène se traduit par le fait qu'il y a plus d'une molécule de RDC qui est capable de s'associer à une paire de bases d'ADN. Ces résultats ne sont donc pas compatibles avec l'existence d'un seul équilibre comme supposé jusqu'à présent. Pour expliquer ces résultats il faut émettre l'hypothèse, comme il a été fait auparavant par certains auteurs, que les RDC interagissent avec la double hélice par l'intermédiaire de plusieurs modes d'association, et qu'une paire de bases peut être utilisée par les deux équilibres simultanément.

1.5 Analyse et discussion des résultats

1.5.1 Modélisation des deux équilibres

D'après la littérature et ces résultats expérimentaux il est raisonnable de penser qu'il existe différents équilibres possibles entre la macromolécule d'ADN et les molécules de RDC. Par exemple, une molécule de RDC n'est pas en équilibre de la même façon avec un site

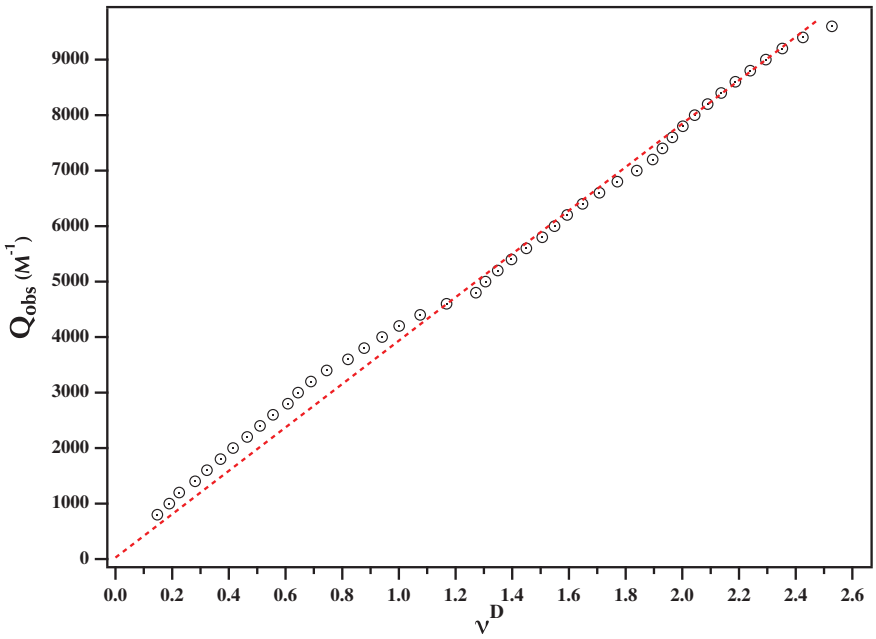


FIGURE 2.5 – Évolution de la variation d'absorbance par paire de base en fonction du taux d'occupation de l'ADN pour le complexe RDC40Cl. Le domaine linéaire est représenté par une droite pointillée rouge.

d'association correspondant à de l'intercalation entre les paires de bases d'ADN qu'avec un site correspondant à de l'association de surface. De même, les deux énantiomères Δ et Λ des complexes octahédriques du ruthénium n'ont pas la même force d'association avec l'ADN. Mais aussi, on pourrait imaginer que chaque site d'association S ait une constante d'affinité différente, dépendant ou non de l'occupation des sites voisins (phénomène de coopérativité). C'est pourquoi, il est raisonnable de postuler l'existence de plusieurs équilibres, au moins deux, pour expliquer le comportement expérimental observé.

1.5.1.a Deux molécules en compétition avec un même site d'association

Dans un premier temps, étudions le modèle de deux équilibres en compétition sur un même type de site avec des valeurs de constante d'affinité différentes comme par exemple deux énantiomères (Δ et Λ) s'associant de la même façon à l'ADN mais pas avec la même force.

$$\mathrm{S} + \mathrm{RDC}_{\Delta} \underset{K_{a_{\Delta}}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}RDC})_{\Delta}$$
$$\mathrm{S} + \mathrm{RDC}_{\Lambda} \underset{K_{a_{\Lambda}}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}RDC})_{\Lambda}$$

avec les constantes d'affinité s'exprimant de la façon suivante :

$$\begin{aligned} K_{a_{\Delta}} &= \frac{[L]_{b_{\Delta}}}{[L]_f[S]_f} \\ K_{a_{\Lambda}} &= \frac{[L]_{b_{\Lambda}}}{[L]_f[S]_f} \end{aligned}$$

L'expression de l'absorbance devient alors :

$$A_{obs} = \epsilon_f[L]_f + \epsilon_{b_{\Delta}}[L]_{b_{\Delta}} + \epsilon_{b_{\Lambda}}[L]_{b_{\Lambda}} \tag{2.3}$$

avec $\epsilon_{b_{\Delta}}$ et $\epsilon_{b_{\Lambda}}$ respectivement les coefficients d'absorption molaires des complexes *Delta* et Λ lorsqu'ils sont liés à l'ADN. De même, les concentrations de complexes *Delta* et Λ sont respectivement notés $[L]_{b_{\Delta}}$ et $[L]_{b_{\Lambda}}$. Les équations de conservation de la matière s'expriment de la façon suivante :

$$\begin{aligned} [L]_T &= [L]_f + [L]_b \\ [L]_b &= [L]_{b_{\Delta}} + [L]_{b_{\Lambda}} \end{aligned}$$

et la variation d'absorbance par site d'association de l'ADN :

$$Q^S_{obs} = \frac{A_{obs} - \epsilon_f L_T}{S_T} = \nu^S \times \left(\frac{\epsilon_{b_{\Delta}} + \alpha\epsilon_{b_{\Lambda}}}{\alpha + 1} - \epsilon_f \right) \tag{2.4}$$

avec $\alpha = \frac{K_{a_{\Lambda}}}{K_{a_{\Delta}}}$ le rapport des deux constantes d'affinité caractérisant les deux équilibres.
En considérant qu'un site d'association de l'ADN est constitué de p paires de bases, l'expression de la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN s'écrit donc :

$$Q^D_{obs} = \frac{A_{obs} - \epsilon_f L_T}{p \times D_T} = \frac{\nu^D}{p} \times \left(\frac{\epsilon_{b_{\Delta}} + \alpha\epsilon_{b_{\Lambda}}}{\alpha + 1} - \epsilon_f \right)$$

qui est identique en tout point à l'équation 2.4. La taille du site d'association n'est donc pas importante dans ce modèle.

On remarque que, comme le cas d'un équilibre unique, il existe pour ce modèle aussi une proportionnalité entre la variation d'absorbance par paire de bases et le taux d'occupation de l'ADN. Les résultats expérimentaux ne sont donc pas expliqués par ce modèle et il faut en proposer un autre.

1.5.1.b Deux sites d'associations en compétition avec une même molécule

Nous supposons maintenant qu'il existe deux familles distinctes de sites d'association. Par exemple un type correspondant à une intercalation entre paire de bases d'ADN et un type correspondant à une association de surface, pouvant interagir avec les molécules de RDC :

$$\mathrm{S}_1 + \mathrm{RDC} \underset{K_{a1}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}RDC})_1$$
$$\mathrm{S}_2 + \mathrm{RDC} \underset{K_{a2}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}RDC})_2$$

S_1 et S_2 sont respectivement composés d'un nombre p_1 et p_2 de paires de bases d'ADN. Pour des questions de simplification, on notera $\langle p \rangle$ la valeur moyenne de la taille des sites d'association de type 1 et 2. La concentration totale de sites d'association ($[S]_T$) est réparti en deux catégories : les sites d'association du premier mode ($[S_1]_T$) et ceux du deuxième mode ($[S_2]_T$). On note alors :

$$q = \frac{[S_1]_T}{[S_2]_T}$$

le paramètre exprimant la répartition entre les deux types de site d'association. Les constantes d'affinité s'expriment de la façon suivante :

$$\begin{aligned} K_{a1} &= \frac{[L]_{b1}}{[L]_f [S_1]_f} \\ K_{a2} &= \frac{[L]_{b2}}{[L]_f [S_2]_f} \end{aligned}$$

L'expression de l'absorbance devient alors :

$$\begin{aligned} A_{obs} &= \epsilon_f [L]_f + \epsilon_{b1}[L]_{b1} + \epsilon_{b2}[L]_{b2} \\ &= \epsilon_f (L_T - \nu^S S_T) + \epsilon_{b1}[L]_{b1} + \epsilon_{b2}(\nu^S S_T - L_{b1}) \\ &= \epsilon_f L_T - \nu^S S_T(\epsilon_f - \epsilon_{b2}) + L_{b1}(\epsilon_{b1} - \epsilon_{b2}) \end{aligned} \tag{2.5}$$

avec ϵ_{b1} et ϵ_{b2} respectivement les coefficients d'absorption molaire des complexes liés aux sites d'associations de type 1 et 2. En utilisant les lois de conservations de la matière, la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN s'écrit :

$$Q^S_{obs} = \frac{\epsilon_f L_T - A_{obs}}{S_T} = \nu^S(\epsilon_f - \epsilon_{b2}) + \frac{L_{b1}}{S_T}(\epsilon_{b2} - \epsilon_{b1})$$

avec

$$\frac{L_{b1}}{S_T} = \frac{\nu^S}{1 + \Phi(\nu^S)}$$

et

$$\Phi(\nu^S) = \frac{b + \sqrt{b^2 + 4q\frac{K_{a2}}{K_{a1}}}}{2q}$$

avec

$$b = ((q+1)\nu^S - q) - \frac{K_{a2}}{K_{a1}}((q+1)\nu^S - 1)$$

Et donc on obtient :

$$Q^S_{obs} = \frac{\epsilon_f L_T - A_{obs}}{S_T} = \nu^S(\epsilon_f - \epsilon_{b2}) + \frac{\nu^S}{1 + \Phi(\nu^S)}(\epsilon_{b2} - \epsilon_{b1}) \tag{2.6}$$

Avec cette représentation, les courbes expérimentales peuvent être analysées. Cependant, on remarque que la modélisation est donnée avec des grandeurs dépendant de la concentration totale en sites d'association (Q^S_{obs} et $\nu^S = \frac{L_b}{S_T}$). La comparaison avec les expériences est toutefois possible car la représentation expérimentale Q^D_{obs} en fonction de ν^D est la même

que le modèle : Q^S_{obs} en fonction de ν^S à un facteur de proportionnalité près. En effet, la relation existant entre S_T et D_T est : $S_T = \langle p \rangle D_T$ et la relation entre Q^S_{obs} et Q^D_{obs} est la même qu'entre ν^S et ν^D :

$$\begin{aligned} Q^D_{obs} &= \langle p \rangle \times Q^S_{obs} \\ \nu^D &= \langle p \rangle \times \nu^S \end{aligned}$$

et comme le facteur multiplicatif ($\langle p \rangle$) est le même sur les deux axes de la réprésentation il est alors possible de comparer les données expérimentales et la modélisation proposée.

1.5.2 Détermination de grandeurs caractéristiques

D'après les équations obtenues on obtient de façon indépendante la valeur de ϵ_{b1} et ϵ_{b2} en analysant les domaines linéaires extrêmes : la pente des asymptotes à la courbe expérimentale sont données par les expressions suivantes :

$$Q^D_{obs}(\nu^D) \underset{\nu^D \to 0}{\sim} \nu^D(\epsilon_f - \epsilon_{b1}) \tag{2.7a}$$

$$Q^D_{obs}(\nu^D) \underset{\nu^D \to \nu^D_{max}}{\sim} \nu^D(\epsilon_f - \epsilon_{b2}) \tag{2.7b}$$

avec ν^D_{max} le taux d'occupation des paires de bases d'ADN maximal obtenu lors d'une mesure expérimentale. Cette valeur peut varier selon les complexes étudiés. Après avoir déterminé les valeurs de ϵ_{b1} et ϵ_{b2} grâce à ces asymptotes, on peut utiliser les équations du modèle pour déterminer la valeur d'une grandeur que l'on peut noter q' et qui traduit d'une part la répartition entre les sites d'association (q) et d'autre part la taille moyenne de ces sites ($\langle p \rangle$). Cette grandeur est ajustée afin que la valeur de ν^D_{cross} corresponde à l'expérience mais aussi de manière à ce que la valeur absolue de Q_{obs} obtenue par le modèle soit superposable à celle des graphes expérimentaux. Cependant, il n'est pas possible à ce niveau d'étude d'extraire des grandeurs quantitatives de p_1, p_2 et q donnant respectivement la taille des sites d'association et la répartition du nombre de site de type 1 et 2.

Pour finir, il est alors possible d'ajuster les courbes expérimentales (voir fig 2.6 et 2.7) avec

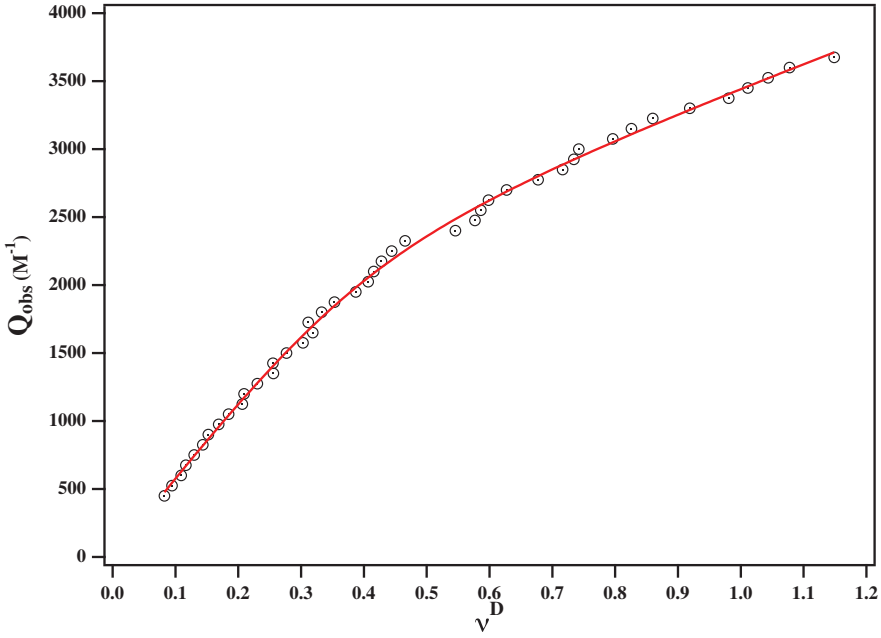


FIGURE 2.6 – Ajustement des points expérimentaux (ronds noirs) du dosage de RDC37Cl par l'ADN avec l'équation 2.6 obtenue par le modèle à deux équilibres et deux sites d'association différents. La courbe en rouge représente le résultat de l'ajustement qui permet d'obtenir les valeurs caractéristiques des équilibres : $\epsilon_f = 12550\ M^{-1}$; $\epsilon_{b1} = 6293\ M^{-1}$; $\epsilon_{b2} = 10858\ M^{-1}$ et $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0.06$.

l'équation 2.6 obtenue par le modèle et en fixant les paramètres suivants : ϵ_{b1}, ϵ_{b2} et q'. La grandeur $\alpha = \frac{K_{a2}}{K_{a1}}$ peut alors être déterminée, elle caractérise la rupture de pente au niveau de la valeur de ν^D_{cross} : plus la rupture est obtue, plus la valeur de α est petite, c'est à dire que le deuxième équilibre à une affinité beaucoup plus faible que le premier. L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus grâce à ce modèle sont donnés dans le tableau récapitulatif 2.1. Pour les complexes RDC on remarque que les valeurs de ϵ_{b1}, coefficient d'absorption molaire des complexes liés dans le premier mode d'association, sont fortement diminuées par rapport à la valeur ϵ_f, coefficient d'absorption molaire du complexe libre. Cette diminution varie de 38 % pour RDC40Cl et de 50 % pour RDC37Cl. Ceci traduit une forte modification de la structure électronique des complexes lorsque ces derniers s'associent à l'ADN par l'intermédiaire de ce premier mode. En revanche, la valeur de ϵ_{b2} pour RDC37Cl n'est diminué que de 13 % par

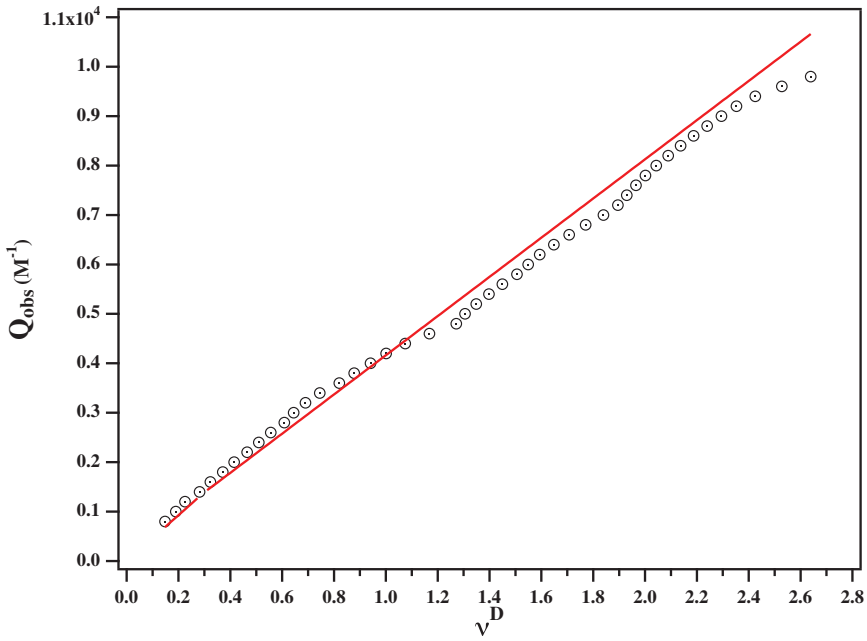


FIGURE 2.7 – Ajustement des points expérimentaux (ronds noirs) du dosage de RDC40Cl par l'ADN avec l'équation 2.6 obtenue par le modèle à deux équilibres et deux sites d'association différents. La courbe en rouge représente le résultat de l'ajustement qui permet d'obtenir les valeurs caractéristiques des équilibres : $\epsilon_f = 12260\ M^{-1}$ et $\epsilon_{b1} = 7663\ M^{-1}$.

rapport à la valeur du complexe libre ϵ_f. Donc l'association de ce complexe par le second mode modifie moins la structure électronique de RDC37Cl que le premier mode d'association. Comme énoncé précédemment, le comportement du complexe RDC40Cl est différent de celui du RDC37Cl et l'utilisation du modèle développé ne permet d'obtenir que des grandeurs caractéristiques pour le premier mode d'association (ϵ_{b1}). On suppose alors que le deuxième mode d'association développe une variation similaire pour le coefficient d'absorption molaire ($\epsilon_{b1} \approx \epsilon_{b2}$) ce qui se traduit par une courbe proche de la linéarité sur la figure 2.7. Cette hypothèse sera vérifiée lors de l'étude plus approfondie du modèle dans le chapitre suivant.

Enfin, une dernière grandeur accessible par cette analyse est le rapport entre les constantes d'affinité des deux modes d'association $\left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}}\right)$. Il est évident que cette grandeur ne peut être obtenue pour le RDC40Cl étant donné qu'il ne présente pas un comportement bi-linéaire dans cette représentation (voir fig. 2.5). Pour RDC37Cl, le deuxième mode a une affinité beaucoup plus faible que le premier car le rapport entre les constantes d'affinité des équilibres est de

l'ordre de $0,06$. Quantitativement, le deuxième mode est 17 fois plus faible que le premier mode. Une donnée importante qui n'est pas obtenue à partir de l'équation 2.6 est la valeur absolue des constantes d'affinité des deux modes d'association : K_{a1} et K_{a2}. Étant donné que cette grandeur est nécessaire pour pouvoir proposer des hypothèses sur la nature des modes d'association observés, nous utilisons une autre méthode d'analyse permettant d'obtenir cette grandeur à partir des mesures expérimentales.

1.5.3 Obtention des constantes d'affinité

Pour obtenir ces informations il faut utiliser une autre méthode d'analyse développée par Hildebrand-Benesi.[70] La difficulté est que cette méthode s'applique à un équilibre simple, il faut donc uniquement appliquer cette méthode aux points expérimentaux correspondants au premier domaine linéaire de la réprésentation graphique de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour lesquels il n'existe qu'un seul et unique équilibre. Ainsi, pour ce domaine on peut écrire :

$$\mathrm{S}_1 + \mathrm{L} \underset{K_{a1}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}L})_1$$

$$\begin{aligned} K_{a1} &= \frac{L_{b1}}{S_{f1}L_f} \\ &= \frac{L_{b1}}{(S_T - L_{b1})(L_T - L_{b1})} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} A_{obs} &= \epsilon_{b1}L_{b1} + \epsilon_f L_f \\ \Delta\epsilon_1 L_{b1} &= \Delta A \end{aligned}$$

avec $\Delta A = \epsilon_f L_T - A_{obs}$ et $\Delta\epsilon_1 = \epsilon_f - \epsilon_{b1}$

$$\begin{aligned} K_{a1}\left(S_T - \frac{\Delta A}{\Delta\epsilon_1}\right)\left(L_T - \frac{\Delta A}{\Delta\epsilon_1}\right) &= \frac{\Delta A}{\Delta\epsilon_1} \\ S_T L_T - (S_T + L_T)\frac{\Delta A}{\Delta\epsilon_1} + \left(\frac{\Delta A}{\Delta\epsilon_1}\right)^2 &= \frac{1}{K_{a1}}\frac{\Delta A}{\Delta\epsilon_1} \end{aligned}$$

et

$$\frac{S_T L_T}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{(\Delta\epsilon_1)^2} = \frac{1}{K_{a1}\Delta\epsilon_1} + \frac{S_T + L_T}{\Delta\epsilon_1} \tag{2.8}$$

La méthode consiste à tracer dans un premier temps le graphe représentant : $\frac{D_T L_T}{\Delta A}$ en fonction de $D_T + L_T$. Le terme contenant la grandeur de $(\Delta\epsilon_1)^2$ est négligé dans un premier temps. On obtient alors une droite pour les points expérimentaux correspondant au premier domaine linéaire et en comparant avec le modèle proposé on peut alors déterminer la valeur de $\Delta\epsilon_1$ grâce à la pente de la droite et la valeur de K_{a1} grâce à l'ordonnée à l'origine de la droite. Comme dans le modèle précédent, il faut faire attention à la comparaison expérience-modèle notamment avec la relation existante entre S_T et D_T. Étant donné qu'il faut opérer la même opération sur l'axe des abscisses et l'axe des ordonnées pour passer du modèle à l'expérience sur la représentation graphique utilisée (multiplier ou diviser pas p), alors on peut utiliser les équations développées par le modèle pour analyser les résultats expérimentaux. Après cette première itération on peut recalculer une grandeur pour l'ordonnée définie par : $\frac{S_T L_T}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{(\Delta\epsilon_1)^2_{n-1}}$ avec $(\Delta\epsilon_1)_{n-1}$ la valeur déterminer dans l'itération précédente. Une nouvelle valeur de $(\Delta\epsilon_1)_n$ est alors déterminée pour l'itération n et on augmente le nombre d'itération (n) jusqu'à convergence des valeurs de $\Delta\epsilon_1$ et K_{a1} (voir fig 2.8). Les résultats obtenus pour les différents RDC montrent une rapide convergence (3 à 5 itérations) et les valeurs déterminées par ce modèle sont présentées dans le tableau récapitulatif 2.1. Les valeurs obtenues pour le coefficient d'absorption molaire des complexes liés dans ce mode d'association (ϵ_{b1}) sont assez similaires aux valeurs trouvées pour cette même grandeur dans l'analyse du modèle à deux équilibres. Les deux analyses sont donc cohérentes et les résultats obtenus pour les valeurs absolues de la constante d'affinité du premier mode peuvent alors être considérées comme valides.

Les valeurs de K_{a1} déterminées par cette méthode montrent une très grande affinité des RDC pour l'ADN : $K_{a1} = 5,9.10^4\ M^{-1}$ pour RDC37Cl et $K_{a1} = 5,5.10^5\ M^{-1}$ pour RDC40Cl. La différence de valeurs de constante d'affinité pour le premier mode d'association observées entre ces deux complexes n'est pas explicable à ce niveau de l'étude. La principale information

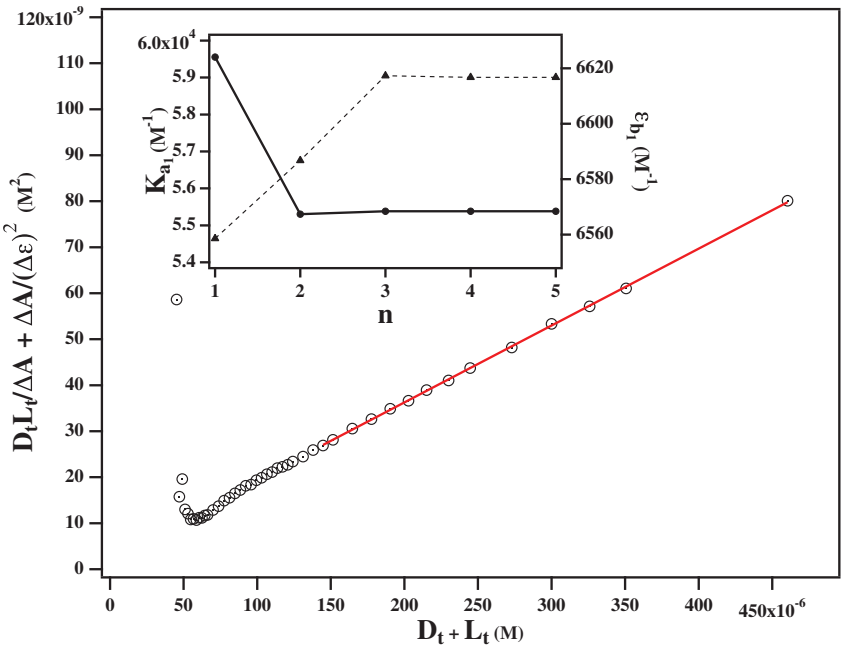


FIGURE 2.8 – Représentation des points expérimentaux du dosage de RDC37Cl par l'ADN donnée par l'équation 2.8 obtenue à partir du modèle développé par Hildebrand-Benesi. Seuls les points correspondant à l'existence d'un seul et unique équilibre (premier mode d'association) sont utilisés pour l'ajustement au modèle (droite rouge). L'équation de la droite donne une valeur de $\Delta\epsilon_1 = 5982\ M^{-1}$ (soit $\epsilon_{b1} = 6568\ M^{-1}$) et $K_{a1} = 5,9.10^4\ M^{-1}$. Insert : nombre d'itérations n réalisées dans la méthode de Hildebrand-Benesi pour obtenir des valeurs de ϵ_{b1} et K_{a1} qui convergent. Les grandeurs sont valides à partir de 5 itérations.

est que cette valeur est très grande et que l'association par l'intermédiaire de ce mode est totale. L'identification et la caractérisation précise de ces deux modes d'association par des manipulations complémentaires et des comparaisons avec des données de la littérature seront l'objet de la suite de ce chapitre.

2 Identification des modes d'association

2.1 Étude du premier mode d'association

D'après la littérature et les valeurs de constante d'affinité obtenues pour ce domaine de faible taux d'occupation des paires de bases d'ADN (équilibre 1), l'hypothèse la plus probable est de considérer que le complexe s'associe à l'ADN par intercalation entre les paires de bases.

Afin de confirmer cette supposition, une étude de l'association d'un complexe connu pour être un intercalant par la même méthode et la même technique expérimentale décrite précédemment est réalisée. Le complexe choisi est un complexe du ruthénium similaire aux RDC étudiés mais contenant un ligand aromatique plus développé qu'une phénanthroline : la dipyridophénazine. Comme énoncé dans le premier chapitre, ce ligand s'intercale facilement entre les paires de bases d'ADN par la partie phénazine grâce à sa géométrie adéquate. Les résultats des manipulations de spectrophotométrie d'absorption sur le complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ montrent un comportement similaire aux résultats obtenus pour le complexe RDC37Cl (voir fig. 2.9), c'est à dire une évolution de la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN en fonction du taux d'occupation qui présente deux domaines linéaires.

La quantification des grandeurs caractéristiques des équilibres sont données dans le tableau de résultats récapitulatif 2.1. La méthode utilisée pour obtenir ces valeurs est la même que celle décrite pour les RDC, c'est à dire l'utilisation des équations 2.7 et 2.6 (voir fig. 2.9). Les valeurs absolues des constantes d'affinité sont, de même, obtenues grâce à la méthode de Hildebrand-Benesi et l'équation 2.8 (voir fig. 2.9). Le coefficient d'absorption molaire des complexes liés dans le premier mode d'association (ϵ_{b1}) est diminué de 11 % par rapport au complexe libre en solution, tandis que pour le deuxième mode d'association (ϵ_{b2}) la diminution n'est que de 3 %. Il existe une différence par rapport aux résultats des RDC37Cl : diminution de 50 % pour le coefficient d'absorption molaire du premier mode et de 13 % pour le deuxième. Cette différence provient peut-être du fait que le RDC37Cl possède une liaison ruthénium-carbone tandis que le complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ n'a que des liaisons ruthénium-azote. Ce point ne sera pas plus étudié dans ce travail et la suite des expériences est basée sur l'existence et la caractérisation des deux équilibres. Pour le complexe connu pour être un intercalant, le premier mode d'association est caractérisé par une constante d'affinité élevée : $K_{a1} = 1,1.10^5\ M^{-1}$, similaire aux valeurs trouvées pour les RDC. À partir de ces observations, nous émettons l'hypothèse que le premier mode d'association des complexes RDC est une intercalation.

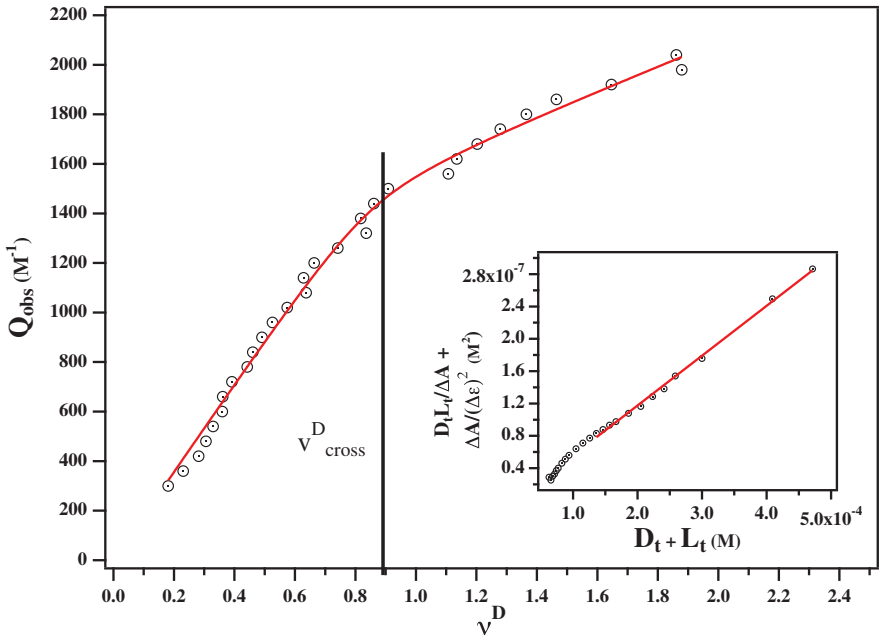


FIGURE 2.9 – Résultats expérimentaux du dosage du complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ par l'ADN. Les points (ronds noirs) montrent l'évolution de la variation d'absorbance par paires de bases d'ADN en fonction du taux d'occupation de ces paires de bases. Une valeur caractéristique de taux d'occupation (ν^D_{cross}) sépare les deux domaines du dosage montrant l'existence de deux modes d'associations. L'ajustement de cette courbe expérimentale avec les équations 2.7 et 2.6 (courbe en rouge) permet d'obtenir les grandeurs caractéristiques des équilibres : $\epsilon_f = 15725\ M^{-1}$; $\epsilon_{b1} = 13924\ M^{-1}$; $\epsilon_{b2} = 15233\ M^{-1}$ et $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0.06$. Insert : traitement de Hildebrand-Benesi appliqué aux points expérimentaux où un seul et unique mode d'association est présent. Les valeurs caractéristiques sont obtenues à partir de l'ajustement des points par l'équation 2.8 (droite rouge) : $\epsilon_{b1} = 14101\ M^{-1}$ et $K_{a1} = 1,1.10^5\ M^{-1}$.

Pour valider ces conclusions, des manipulations complémentaires de dichroïsme circulaire ont été réalisées.

Les solutions de complexes de ruthénium initiales sont des solutions racémiques et donc le signal initial en dichroïsme circulaire, l'ellipticité, est nul sur la gamme spectrale étudiée. Par contre, lors de l'ajout de petite portions d'ADN, il apparaît un signal dans la gamme spectrale caractéristique de l'ADN. Selon le complexe étudié, les bandes ne sont pas identiques : en effet, pour les RDC le signal tend vers le signal de la macromolécule d'ADN tandis que pour le complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ il tend vers un signal différent (voir figure 2.11 et 2.10). Pour expliquer cette différence nous pouvons émettre deux hypothèses :

— selon le type d'association mis en jeu l'ellipticité n'est pas modifiée de la même façon. Le ligand *dppz* intercalé ne modifie pas le signal de l'ADN de la même façon que la phénanthroline, ligand "moins" intercalant.

— selon le type d'association mis en jeu le phénomène d'énantiosélectivité, très important dans ce type de mesure, peut être très différent et donc l'ellipticité n'est aussi pas modifiée de la même façon.

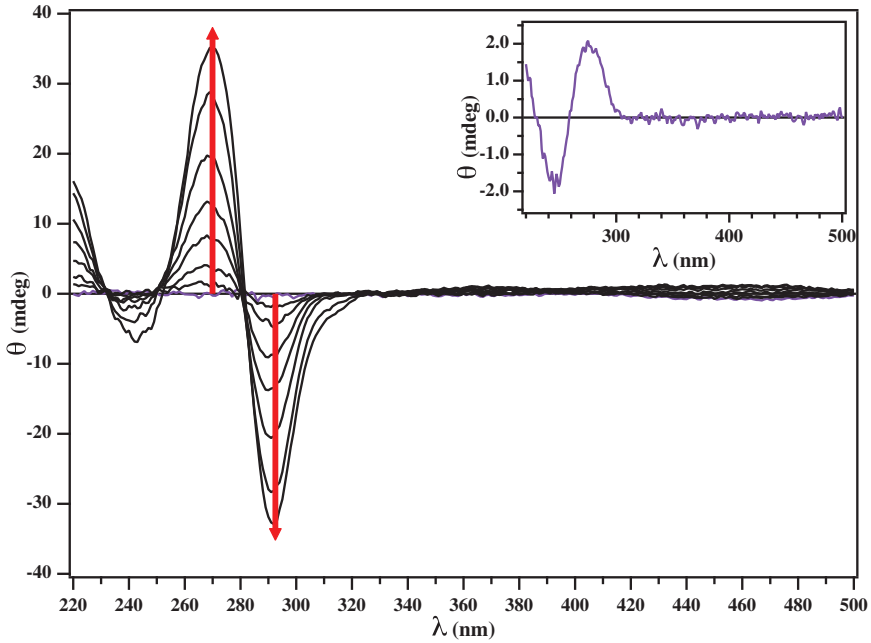


FIGURE 2.10 – Évolution des spectres de dichroïsme circulaire (ellipticité en fonction de la longeur d'onde) lors du dosage d'une solution racémique du complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ à 2.10^{-5} M dans l'eau par de l'ADN. Une bande positive à 275 nm et une négative à 290 nm augmentent en itensité lors de l'augmentation de la concentration en paires de bases d'ADN ($[D]_T$). Insert : spectre de dichroïsme circulaire de l'ADN seul dans l'eau à environ 1.10^{-6} M en paire de bases d'ADN. Il apparaît deux bandes caractéristiques : une positive à 275 nm et une négative à 250 nm.

Cependant, l'important dans ces manipulations est de pouvoir suivre l'évolution d'une observable pendant un dosage. Le sens d'évolution ou la forme du signal final importe finalement peu.

L'évolution de l'intensité de ces bandes au cours du dosage est tracée en fonction du taux d'occupation des paires de bases d'ADN (voir figures 2.12, 2.13 et 2.14). Pour connaître ces

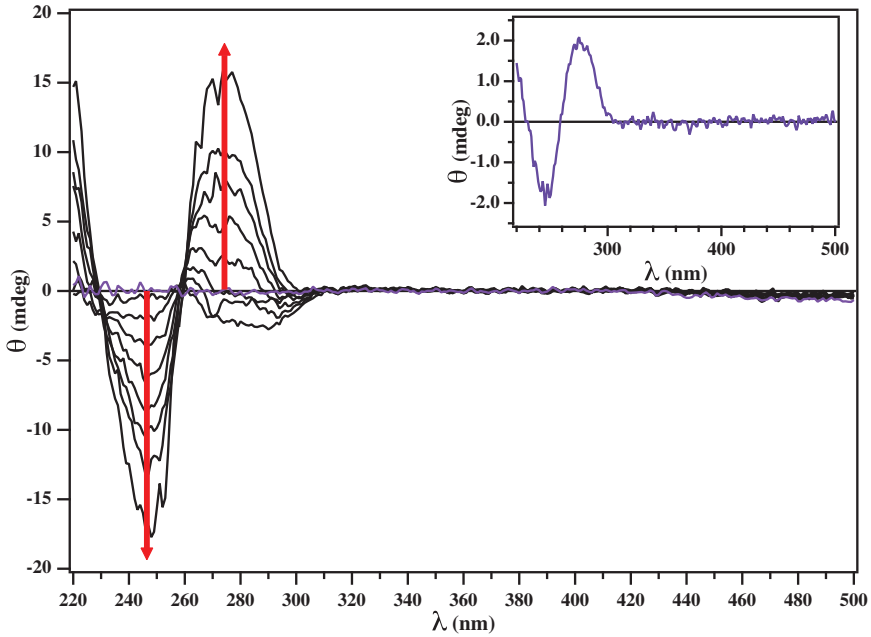


FIGURE 2.11 – Évolution des spectres de dichroïsme circulaire (ellipticité en fonction de la longeur d'onde) lors du dosage d'une solution racémique du complexe RDC37Cl à 2.10^{-5} M^{-1} dans l'eau par de l'ADN. Une bande négative à 250 nm et une positive à 275 nm augmentent en itensité lors de l'augmentation de la concentration en paires de bases d'ADN ($[D]_T$). Insert : spectre de dichroïsme circulaire de l'ADN seul dans l'eau à environ 1.10^{-6} M en paire de bases d'ADN. Il apparaît deux bandes caractéristiques : une positive à 275 nm et une négative à 250 nm.

valeurs de taux d'occupation il suffit d'utiliser les résultats des manipulations d'absorption. En effet, à chacune des valeurs de rapport entre les concentrations totales en paire de bases d'ADN et en ligand $\frac{[D]_T}{[L]_T}$ est associée une valeur de taux d'occupation ν^D. Donc lors des manipulations de dichroïsme circulaire il est possible de déterminer le taux d'occupation de l'ADN en connaissant ce rapport de concentration tout au long du dosage. Ceci nous permet de comparer directement les résultats obtenus au cours des deux types de mesure sur un graphe dont l'abscisse est commune à l'intensité du signal de dichroïsme circulaire (elliptcité θ en $mdeg$) et à la variation de l'absorbance par paire de bases d'ADN (Q_{obs} en M^{-1}). L'ellipticité étant une grandeur dépendant de la concentration de l'espèce optiquement active, il est important de justifier que, pour nos mesures, son évolution n'est pas due uniquement à l'augmentation de la concentration en paires de bases d'ADN lors du dosage. Il est montré

dans la partie expérimentale de ce manuscrit que l'analyse de l'évolution de l'ellipticité θ au cours du dosage traduit bel et bien l'association des complexes du ruthénium avec l'ADN.

D'après les graphes obtenus, on retrouve la présence des deux domaines observés lors des manipulations de spectrophotométrie d'absorption. De plus, le complexe RDC40Cl présente cette fois-ci un comportement tout à fait similaire aux autres complexes montrant bien que ce complexe ne s'associe pas de façon différente à l'ADN que le RDC37Cl mais bel et bien par l'intermédiaire de deux modes d'association. Les valeurs de taux d'occupation séparant les deux domaines linéaires des graphes (ν^D_{cross}) se situe aux alentours de $0,4$ pour les RDC et de $0,8$ pour le complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$. La cohérence des valeurs de ν^D_{cross} obtenus par les deux expériences est excellente pour le complexe avec le ligand dppz tandis qu'il y a une légère différence pour le RDC37Cl : 0,25 par le dichroïsme et 0,4 par la spectrophotométrie d'absorption. En revanche, pour l'ensemble de ces complexes, la variation du signal de dichroïsme circulaire est très grande dans le premier domaine et quasi-nulle dans le deuxième. En admettant que le signal de dichroïsme circulaire observé est uniquement dû à la présence de l'ADN en solution, seule une modification de la structure de la double-hélice d'ADN peut être à l'origine de la variation de θ enregistrée au cours du dosage. Étant donné qu'il est connu que l'intercalation d'une molécule entre les paires de bases d'ADN modifie la structure de la macromolécule, les informations apportées par ces manipulations confirment bien l'hypothèse d'une intercalation des complexes entre les paires de bases d'ADN dans le premier mode d'association étudié.

De plus, des études théoriques sur le complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ ont été réalisées par un laboratoire partenaire. Pour ces calculs, une molécule de complexe est supposée intercalée par l'intermédiaire du ligand dppz entre deux paires de bases d'ADN et les états d'énergie électronique de cet ensemble sont déterminés.[71] Les résultats montrent un spectre d'absorbance théorique du complexe associé à l'ADN très similaire au spectre expérimental. L'intercalation semble donc bien être le mode d'association de ce complexe dans le premier domaine étudié.

Pour le second mode d'association, les manipulations réalisées permettent de dire que

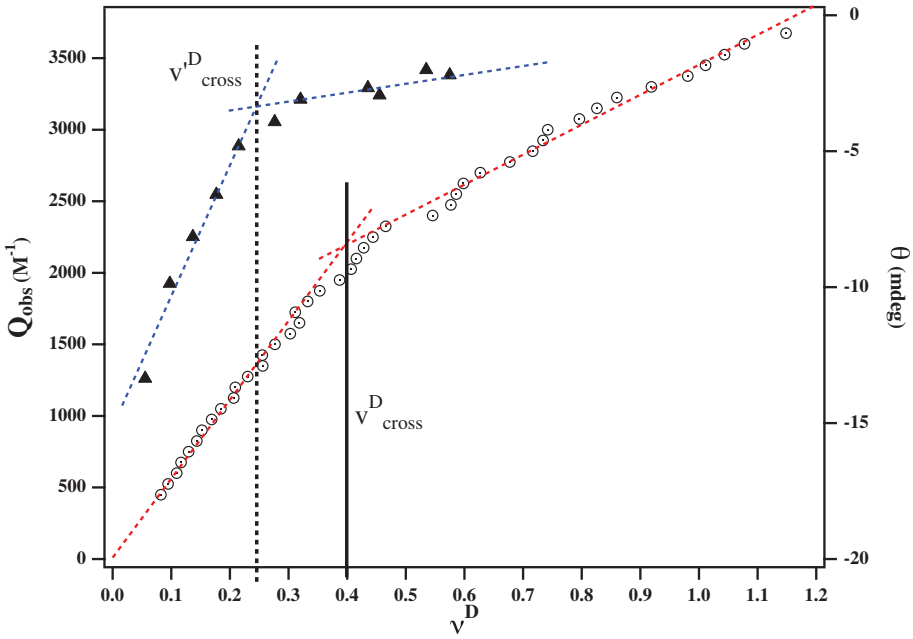


FIGURE 2.12 – Évolution de la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN du complexe RDC37Cl en fonction du taux d'occupation des paires de bases d'ADN (ronds noirs). Évolution de l'intensité de la bande du spectre de dichroïsme circulaire à 275 nm (triangles noirs) en fonction du taux d'occupation déterminé dans les manipulations de spectrophotométrie UV-visible. Les valeurs caractéristiques de taux d'occupation $\nu^D_{cross} = 0,4$ et $\nu'^D_{cross} = 0,25$ séparent les deux domaines linéaires (droites en pointillées) respectivement pour les manipulations d'absorption visible (rouge) et de dichroïsme circulaire (bleu).

l'affinité est beaucoup plus faible que le premier mode et que la structure de l'ADN n'est pas modifiée par ce deuxième mode d'association. Une hypothèse raisonnable est de considérer une association de surface et/ou une interaction faisant intervenir une forte part électrostatique à cette association.

2.2 Étude du second mode d'association

Dans ce domaine l'intercalation n'est certainement plus possible étant donné que l'ensemble des sites d'associations correspondant à cette interaction sont saturés par des complexes du ruthénium. Pour identifier la nature de ce deuxième mode nous supposons que la force de l'interaction a principalement une origine électrostatique et donc que la modification de la force ionique de la solution influence fortement l'affinité entre les complexe du ruthénium

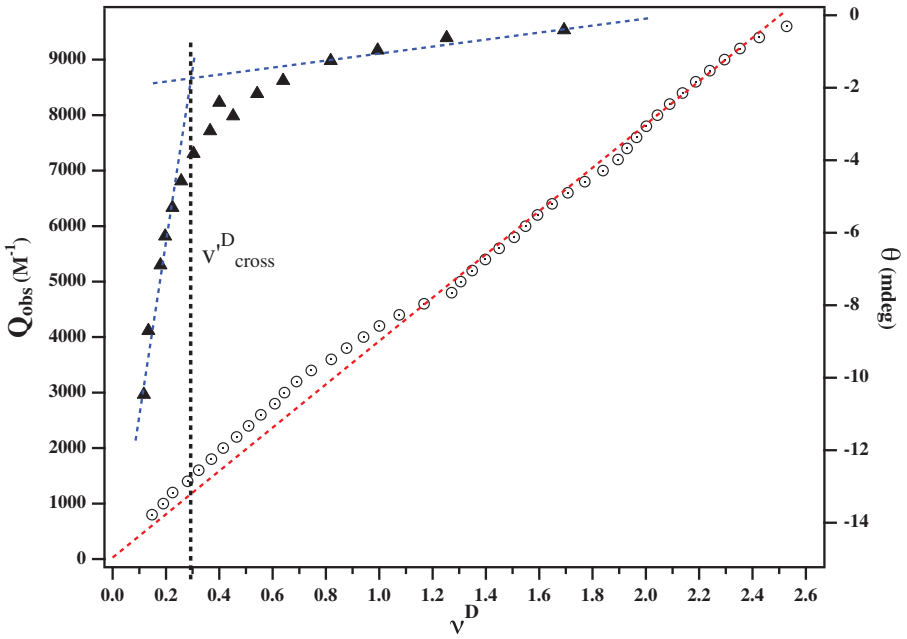


FIGURE 2.13 – Évolution de la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN du complexe RDC40Cl en fonction du taux d'occupation des paires de bases d'ADN (ronds noirs). Évolution de l'intensité de la bande du spectre de dichroïsme circulaire à 275 nm (triangles noirs) en fonction du taux d'occupation déterminé dans les manipulations de spectrophotométrie UV-visible. Contrairement aux résultats d'absorption visible où le comportement est linéaire (droite pointillée rouge), il existe pour les manipulations de dichroïsme circulaire deux domaines linéaires (droites en pointillées bleu) séparés par une valeur caractéristique $\nu'^{D}_{cross} = 0,3$ qui confirme la présence de deux modes d'associations.

et l'ADN dans ce domaine. En revanche, la force ionique a peu d'influence sur l'association par intercalation étant donné que cette interaction a pour origine des forces de Van der Waals et non électrostatiques. Pour mettre en évidence la dépendance de la force d'interaction du second domaine avec la force ionique, les manipulations de spectrophotométrie d'absorption visible pour les RDC37Cl ont de nouveau été réalisées mais dans une solution saline ($NaCl$) de concentration 40 mM. Les résultats obtenus (voir figure 2.15) montrent toujours la présence de deux domaines lors du dosage, mais les grandeurs caractéristiques obtenues à partir de cette mesure montrent que le deuxième mode d'association est fortement influencé par la présence de sel. En effet, la constante d'affinité (K_{a2}) est 10 fois plus faible en présence de sel étant donné que la constante diélectrique du milieu est augmentée par la présence des ions Na^+ et Cl^-. D'après la théorie de Manning développée dans le premier chapitre, la variation

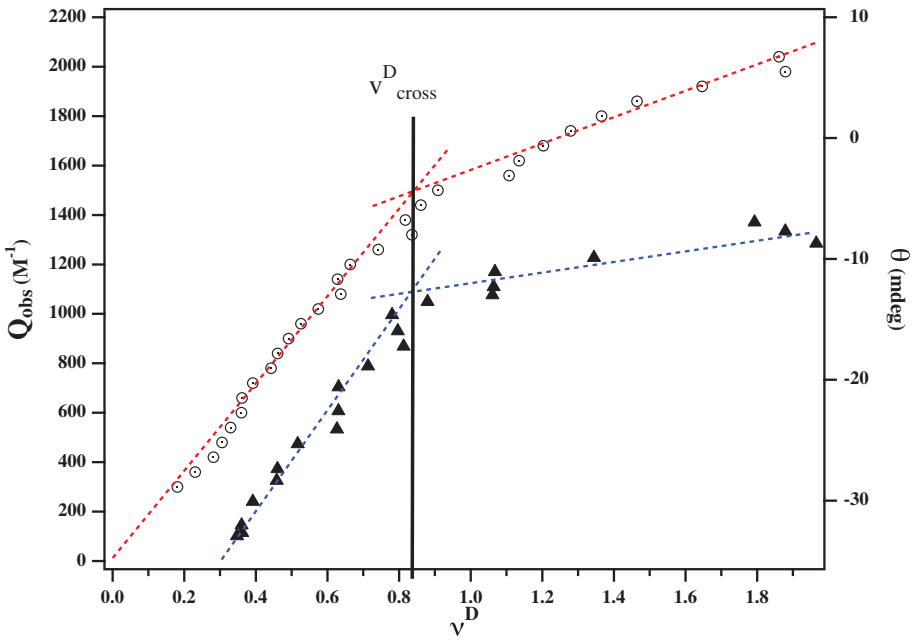


FIGURE 2.14 – Évolution de la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN du complexe $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ en fonction du taux d'occupation des paires de bases d'ADN (ronds noirs). Évolution de l'intensité de la bande du spectre de dichroïsme circulaire à 275 nm (triangles noirs) en fonction du taux d'occupation déterminé dans les manipulations de spectrophotométrie UV-visible. Les valeurs caractéristiques de taux d'occupation $\nu^D_{cross} = \nu'^D_{cross} = 0,85$ séparent les deux domaines linéaires (droites en pointillées) respectivement pour les manipulations d'absorption visible (rouge) et de dichroïsme circulaire (bleu).

de la constante d'affinité d'une association dirigée par des interactions électrostatiques par rapport à la concentration en sel dans le mileiu est donné par la relation suivante :

$$\frac{d \ln K_{a2}}{d \ln [Na^+]} = -\Psi \tag{2.9}$$

avec Ψ une grandeur stoechiométrique caractérisant le nombre d'ions sodium expulsés lors de la complexation d'une molécule de complexe à l'ADN par ce mode d'association. Pour un ligand monovalent, cette grandeur est estimée à $\Psi_{theo} = 0,88$ tandis que pour les manipulations réalisées on obtient un $\Psi_{exp} = 0,72$. La variation de constante d'affinité pour le deuxième mode semble bien correspondre à une interaction de type électrostatique même si les observations ne sont basées que sur deux valeurs de concentration en sel.

Enfin, on peut aussi noter que d'après les valeurs obtenues pour cette dernière expérience, l'affinité du premier mode d'association n'est pas influencée par la concentration en sel. En effet, l'analyse de Hildebrand-Benesi donne une valeur de $K_{a1} = 8.10^4\ M^{-1}$ similaire à la valeur sans sel : $K_{a1} = 5,9.10^4\ M^{-1}$. Ceci confirme bien que l'intercalation est un type d'association qui n'est pas influencée par la force ionique de la solution.

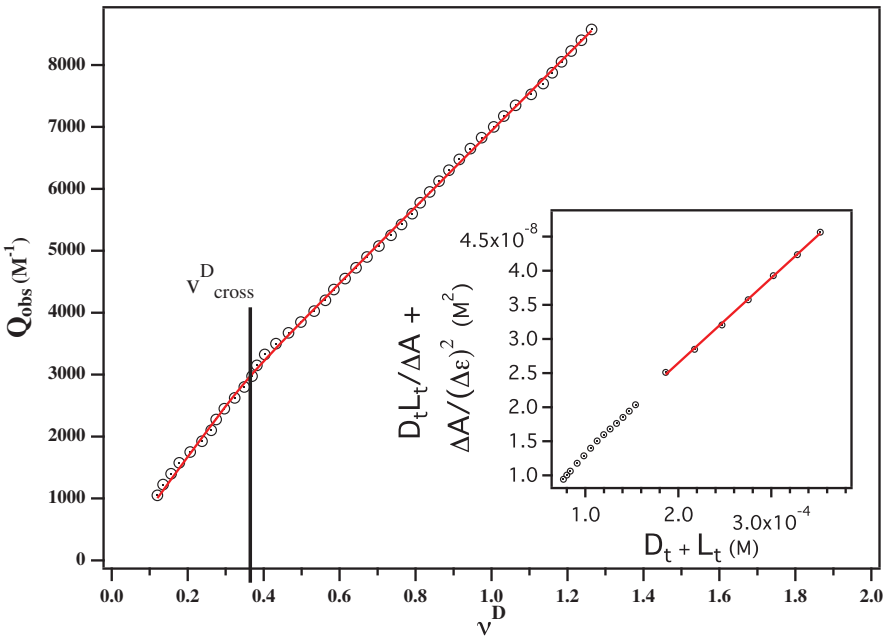


FIGURE 2.15 – Évolution de la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN en fonction du taux d'occupation des paires de bases d'ADN lors du dosage du RDC37Cl en présence d'une concentration de 40 mM en NaCl. Le taux d'occupation caractéristique $\nu^D_{cross} = 0,35$ sépare les deux domaines linéaires des points expérimentaux. L'ajustement (courbe rouge) avec l'équation 2.6 permet d'obtenir les grandeurs caractéristiques des équilibres : $\epsilon_f = 12550$ M^{-1} ; $\epsilon_{b1} = 5047\ M^{-1}$; $\epsilon_{b2} = 6363\ M^{-1}$ et $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,006$. Insert : Traitement des résultats expérimentaux par la méthode de Hildebrand-Benesi. Les points expérimentaux (ronds noirs) utilisés sont correspondent à ceux pour lesquels un seul et unique mode d'association est mis en jeu. L'ajustement par l'équation 2.8 (droite rouge) après 5 itérations d'obtenir les grandeurs caractéristiques suivantes : $\epsilon_{b1} = 4523\ M^{-1}$ et $K_{a1} = 8.10^4\ M^{-1}$.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux est publié dans un article.[72]

		ϵ_f (M^{-1})	ϵ_{b1} (M^{-1})		ϵ_{b2} (M^{-1})	$\frac{K_{a2}}{K_{a1}}$	K_{a1} (M^{-1})	K_{a2} (M^{-1})
			from $Q_{obs}(\nu^D)$	Hildebrand				
RDC37Cl	0mM NaCl	12550	6293	6568	10858	0.06	$5.9\ 10^4$	$3.5\ 10^3$
	40mM NaCl	12550	5047	4523	6363	0.006	$8\ 10^4$	$4.8\ 10^2$
RDC40Cl		12260	7623	7663			$5.5\ 10^5$	
$Ru(bpy)_2(dppz)^{2+}$		15725	13924	14101	15233	0.06	$1.1\ 10^5$	$6.6\ 10^4$

TABLE 2.1 – Tableau récapitulatif des grandeurs expérimentales obtenues à partir du traitement des résultats des dosages réalisés sur les complexes RDC. Les valeurs de ϵ_f sont déterminées en mesurant l'absorbance à différentes concentrations et en utilisant la loi de Beer-Lambert. Les valeurs de ϵ_{b1} et ϵ_{b2} sont obtenues par l'analyse des asymptotes à partir des équations 2.7. L'équation 2.1 est utilisée pour l'ajustement des courbes expérimentales afin d'obtenir les valuers du rapport des constantes d'affinité $\frac{K_{a2}}{K_{a1}}$. Pour les valeurs absolues de ces constantes, l'utilisation de la représentation de Hildebrand-Benesi est nécessaire.

3 Conclusion

Pour étudier l'association des complexes RDC sur la macromolécule d'ADN il est nécessaire de définir une grandeur expérimentale permettant de caractériser les équilibres mis en jeu lors des dosages, c'est la variation d'absorption molaire par paire de bases d'ADN notée Q^D_{obs}. De plus, l'expression de cette grandeur permet lors de l'analyse des résultats de déterminer le taux d'occupation de paires de bases ν^D et de s'affranchir de la taille des sites d'association formés par p paires de bases d'ADN.

Le résultat principal de cette partie est l'existence de deux modes d'association différents entre les RDC et la macromolécule d'ADN. La présence de ces deux modes dépend principalement du rapport entre les concentrations de paires de bases d'ADN et de complexe RDC. De plus, le premier mode, qui a une affinité très grande, a été identifié comme étant une intercalation du complexe entre les paires de bases. Cette association entraîne une forte diminution du coefficient d'absorption molaire du complexe ($\epsilon_{b1} << \epsilon_f$). En revanche, le deuxième mode, qui a une affinité plus faible et qui dépend de la force ionique de la solution, a lui été supposé comme étant une association avec une forte part d'interactions électrostatiques. Cette association entraîne une modification beaucoup plus faible du coefficient d'absorption molaire ($\epsilon_{b2} \approx \epsilon_f$).

Mais, pour obtenir ces résultats nous avons dû, d'après la méthode de Bujalowski, effectuer deux titrations et utiliser l'hypothèse que deux solutions de concentration totale de complexe différentes possèdent la même variation d'absorbance par paire de bases d'ADN Q^D_{obs} pour la même valeur de taux d'occupation de ces paires de bases ν^D. Cette hypothèse est évidente lorsqu'un seul équilibre est en jeu mais pas lorsque plusieurs équilibres existent simultanément.

Pour nos mesures, nous avons trouvé qu'il existe deux équilibres lors de l'association des RDC avec l'ADN. Le chapitre suivant est donc principalement consacré à valider l'utilisation de cette méthode d'analyse dans le cas où deux équilibres existent.

Chapitre 3

Validation de l'analyse des équilibres RDC-ADN

D'après les résultats obtenus et présentés dans le chapitre expérimental de cette thèse, le modèle décrivant le mieux l'association entre les complexes RDC et la macromolécule d'ADN est celui à deux sites d'association distincts où le premier possède une affinité beaucoup plus forte que le deuxième. Les sites d'association S_1 réagissent d'abord jusqu'à saturation complète et ensuite les sites S_2 réagissent à leur tour. Le phénomène de saturation est observé sur les résultats expérimentaux lorsque la variation d'absorbance par paire de bases d'ADN présente une rupture de pente au taux d'occupation ν^D_{cross}.

L'objectif de ce chapitre est de vérifier que la méthode utilisée pour déterminer le taux d'occupation des paires de bases d'ADN développé par Bujalowski est bien applicable aux cas de l'existence simultanée de plusieurs équilibres. Ainsi, les limites d'utilisation de cette méthode pourront être dégagées lors de cette étude théorique. De plus, l'analyse théorique permet de réaliser les calculs de la variation d'absorbance par site d'association dans le modèle proposé et de déterminer l'influence des paramètres du modèle sur les représentations graphiques proposées dans le chapitre expérimental. Enfin, une justification de l'utilisation de la méthode de Hildebrand-Benesi pour déterminer la valeur absolue de la constante d'affinité

K_{a1} est donnée à la fin de ce chapitre. Nous expliquons plus particulièrment pourquoi il n'est pas possible d'obtenir directement les valeurs absolues des constantes K_{a1} et K_{a2} directement à partir des équations du modèle proposé.

1 Taux d'occupation des sites d'association

1.1 Méthode d'analyse de Bujalowski

Pour un équilibre entre un unique type de site d'association et un ligand, l'expression des lois de conservation de la matière permettent d'exprimer les lois d'action de masse en fonction du taux d'occupation des sites d'association pour les équilibres dans le cas de deux concentrations initiales en ligand différentes : $[L]_T$ et $[L]'_T$.

$$\begin{aligned} K_a &= \frac{[L]_b}{[L]_f[S]_f} = \frac{\nu^S}{[L]_f(1-\nu^S)} \\ K_a &= \frac{[L]'_b}{[L]'_f[S]'_f} = \frac{\nu'^S}{[L]'_f(1-\nu'^S)} \end{aligned}$$

La méthode se base sur le fait que pour la même valeur de taux d'occupation des sites ν^S dans les deux dosages, la concentration en ligand libre est la même aussi. Ainsi, on obtient l'expression :

$$\nu^S = \frac{[L]'_T - [L]_T}{[S]'_T - [S]_T}$$

Pour les manipulations d'absorption, la variation d'absorbance par site d'association Q^S_{obs} est reliée proportionnellement au taux d'occupation des sites d'association ν^S. Donc, le même taux d'occupation correspond à la même valeur de Q^S_{obs}. Pour que cette méthode soit applicable au cas des systèmes présentant plusieurs équilibres avec des sites d'association différents il faut qu'une valeur de Q^S_{obs} ne soit associée qu'à une unique valeur de ν^S. Une analyse mathématique plus précise de cette fonction permet de déterminer les limites dans lesquelles cette hypothèse est vérifiée et donc la méthode utilisable.

1.2 Limites d'utilisation de la méthode

D'après le modèle développé l'expression de la variation de l'absorbance par site d'association peut s'écrire sous la forme :

$$Q_{obs}^{S} = \alpha\nu^{S} + \frac{\beta}{1+\Phi(\nu^{S})} \times \nu^{S}$$

avec $\alpha = \epsilon_f - \epsilon_{b2}$; $\beta = \epsilon_{b2} - \epsilon_{b1}$ et $\kappa = \frac{K_{a2}}{K_{a1}}$.

$$\Phi(\nu^{S}) = \frac{(2\nu^{S}-1)(1-\kappa) + \sqrt{(2\nu^{S}-1)^2(1-\kappa)^2 + 4\kappa}}{2}$$

dans le cas où on suppose que le nombre de sites d'association de type 1 et 2 sont identiques. Les limites pour les valeurs extrêmes de ν sont :

$$Q_{obs}^{S} \underset{\nu^{S}\to 0}{\sim} \left(\alpha + \frac{\beta}{1+\kappa}\right) \times \nu^{S} \tag{3.1a}$$

$$Q_{obs}^{S} \underset{\nu^{S}\to 1}{\sim} \left(\alpha + \frac{\beta}{2} - \frac{\beta}{4} \times (1-\kappa)\left(1 + \frac{1-\kappa}{1+\kappa}\right)\right) \times \nu^{S} \tag{3.1b}$$

Ces relations sont similaires aux relations données dans le chapitre de présentation des résultats expérimentaux 2.7. La différence est que pour ces dernières, la valeur de κ est considérée négligeable devant 1. Cette hypothèse est vérifiée pour les valeurs expérimentales du rapport des deux constantes d'affinité données dans le tableau récapitulatif 2.1. Ansi, pour $\kappa << 1$, les relations ci-dessus se simplifient sous la forme données dans le chapitre précédent :

$$Q_{obs}^{S} \underset{\nu^{S}\to 0}{\sim} (\alpha + \beta) \times \nu^{S} \tag{3.2a}$$

$$Q_{obs}^{S} \underset{\nu^{S}\to 1}{\sim} \alpha \times \nu^{S} \tag{3.2b}$$

Pour montrer que la fonction $Q_{obs}^{S}(\nu^{S})$ est monotone sur l'intervalle étudié il suffit de montrer que les pentes aux valeurs extrêmes de taux d'occupation des sites d'association sont de même signe. Si les deux pentes n'ont pas le même signe alors le produit des deux

limites est négatif :

$$(\alpha + \beta) \times \alpha \quad = \quad \alpha^2 + \alpha\beta$$

Ce polynôme est négatif uniquement si le produit $\alpha\beta$ est négatif, c'est à dire si une des deux grandeurs est négative. D'après la définition de ces deux termes, leur valeur n'est négative que si :

$$\epsilon_{b2} > \epsilon_f$$

dans le cas de α, et si :

$$\epsilon_{b1} > \epsilon_{b2}$$

dans le cas de β.

Pour nos manipulations, nous observons toujours que :

$$\begin{aligned} \epsilon_f > \quad \epsilon_{b2} \quad &> \epsilon_{b1} \\ \alpha \quad &> \quad 0 \\ \beta \quad &> \quad 0 \end{aligned} \tag{3.3}$$

Donc la fonction $Q^S_{obs}(\nu^S)$ est une fonction monotone sur l'intervalle étudié et la méthode d'analyse utilisée pour déterminer le taux d'occupation peut mathématiquement être appliquée sans limitation supplémentaire pour nos mesures.

D'autres conditions sont nécessaires pour que les résultats expérimentaux soient en accord avec la représentation théorique de la variation d'absorbance par site d'association en fonction du taux d'occupation de ces sites. Ces conditions vont être étudiées dans la section suivante de ce chapitre.

2 Variation de l'absorbance par site d'association

2.1 Modèle à deux sites d'association différents

$$\mathrm{S}_1 + \mathrm{RDC} \underset{K_{a1}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}RDC})_1$$
$$\mathrm{S}_2 + \mathrm{RDC} \underset{K_{a2}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}RDC})_2$$

$$[S_1]_T = \frac{q[S]_T}{q+1}$$
$$[S_2]_T = \frac{[S]_T}{q+1}$$

avec q le paramètre exprimant la répartition entre les deux types de site d'association et $[S]_T = [S_1]_T + [S_2]_T$. L'ensemble des expressions qui seront mises en place dans ce chapitre utilisent l'expression des grandeurs en fonction des sites d'associations (S) en non en fonction des paires de bases d'ADN (D) comme dans le chapitre expérimental. Ceci permet entre autre de s'affranchir des paramètres de taille des sites (p_1 et p_2) ne pouvant pas être déterminés facilement dans ce modèle.

L'expression de la variation d'absorbance par site d'association dans ce modèle s'écrit donc :

$$Q^S_{obs} = \frac{\epsilon_f L_T - A_{obs}}{S_T} = \nu^S(\epsilon_f - \epsilon_{b2}) + \frac{\nu^S}{1+\Phi(\nu^S)}(\epsilon_{b2} - \epsilon_{b1}) \tag{3.4}$$

avec

$$\begin{aligned} \Phi(\nu^S) &= \frac{b + \sqrt{b^2 + 4q\frac{K_{a2}}{K_{a1}}}}{2q} \\ b &= ((q+1)\nu^S - q) - \frac{K_{a2}}{K_{a1}}((q+1)\nu^S - 1) \end{aligned}$$

et

$$\nu^S = \frac{[L]_b}{[S]_T}$$

Dans la suite, nous utiliserons les valeurs caractéristiques des équilibres entre l'ADN et le

RDC37Cl afin d'étudier l'influence de la modification de certains paramètres dans l'évolution de Q^S_{obs} en fonction de ν^S.

2.2 Paramètres influençant le graphe $Q_{obs} = f(\nu^S)$

2.2.1 Coefficients d'absorption molaire : ϵ_{b1} et ϵ_{b2}

Les valeurs des coefficients d'absorption molaire : ϵ_{b1} et ϵ_{b2} définis dans l'équation 2.5 et représentant les coefficients d'absorption molaire des complexes liés aux sites d'association de type 1 et 2, influencent respectivement la pente à l'origine et la pente pour $\nu^S \to 1$ du graphe $Q^S_{obs} = f(\nu^S)$. Les expressions mathématiques associées à la linéarité des deux domaines du graphe $Q_{obs} = f(\nu^S)$ sont données dans les équations 3.2 et s'expriment en fonction des coefficients d'absorption molaire de la façon suivante :

$$Q^S_{obs}(\nu^S) \underset{\nu^S \to 0}{\sim} \nu^S(\epsilon_f - \epsilon_{b1})$$
$$Q^S_{obs}(\nu^S) \underset{\nu^S \to 1}{\sim} \nu^S(\epsilon_f - \epsilon_{b2})$$

Sur le graphe de la figure 3.1 il apparaît bien que l'augmentation de la valeur du coefficient d'absorption ϵ_{b1} dans le premier mode d'association modifie uniquement la pente à l'origine de la représentation de Q^S_{obs} en fonction de ν^S. Dans le cas où la valeur du coefficient d'absorption molaire ϵ_{b1} dans le premier mode est inférieur au coefficient d'absorption molaire ϵ_{b2} dans le second mode : $\epsilon_{b1} < \epsilon_{b2}$ alors la pente à l'origine est plus élevée que la pente pour $\nu^S \to 1$ et la représentation graphique présente la même allure que les résultats expérimentaux. Dans le cas limite où les valeurs de coefficient d'absorption molaire ϵ_{b1} etϵ_{b2} sont identiques dans les deux modes d'associations, la variation d'absorbance par site d'association en fonction du taux d'occupation de ces sites présente un comportement linéaire. L'obtention d'une droite lors d'une manipulation expérimentale n'est donc pas une preuve de l'existence d'un unique équilibre. En effet, comme il a été montré dans le chapitre expérimental, le RDC40Cl présente une variation d'absorbance par paire de bases proportionnelle au taux d'occupation

de l'ADN. Comme la modélisation le montre, ceci n'exclut pas la possibilité de l'existence de deux équilibres mis en évidence par les manipulations de dichroïsme circulaire mais prouve qu'un comportement linéaire peut être observé pour plusieurs équilibres si les coefficients d'absorption molaires liés sont identiques pour tous les équilibres.

Si le coefficient d'absorption molaire dans le premier mode est supérieur à celui du second : $\epsilon_{b1} > \epsilon_{b2}$ alors le graphe obtenu n'est pas similaire à celui des résultats expérimentaux mais présente une courbure inversée.

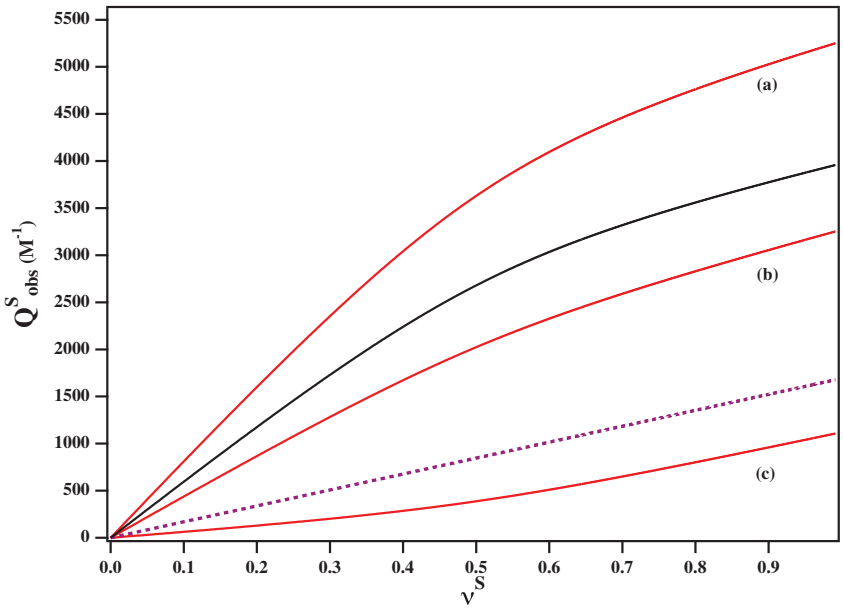


FIGURE 3.1 – Influence de la valeur du coefficient d'absorption molaire du premier mode d'association (ϵ_{b1}). Les grandeurs utilisées sont celles du RDC37Cl : $\epsilon_f = 12550\ M^{-1}$, $\epsilon_{b2} = 10858\ M^{-1}$, $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,06$ et $q = 1$. Les différentes valeurs de ϵ_{b1} choisies sont 6293 M^{-1} pour la courbe noire représentant les résultats du RDC37Cl ; 10858 M^{-1} pour la courbe en pointillée violette correspondant au cas où $\epsilon_{b1} = \epsilon_{b2}$; 4000 M^{-1} pour la courbe rouge (a), 8000 M^{-1} pour (b) correspondant à des cas où $\epsilon_{b1} < \epsilon_{b2}$ et 12000 M^{-1} pour (c) correspondant à un cas où $\epsilon_{b1} > \epsilon_{b2}$.

En revanche, d'après le graphe de la figure 3.2 la modification du coefficient d'absorption molaire lié dans le deuxième mode ne modifie que la pente pour $\nu^S \to 1$ dans cette représentation. De la même façon que précédemment, la figure présente les différents cas possibles pour les valeurs de ϵ_{b2} : le cas correspondant aux résultats expérimentaux du RDC37Cl, les

cas où $\epsilon_{b2} > \epsilon_{b1}$ et le cas particulier où $\epsilon_{b2} < \epsilon_{b1}$ ne correspondant pas au cas général observé expérimentalement.

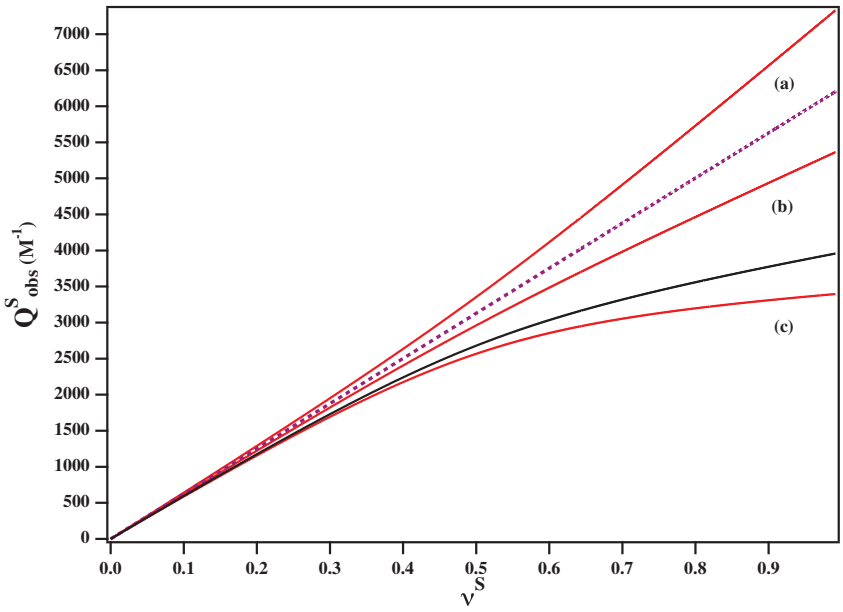


FIGURE 3.2 – Influence de la valeur du coefficient d'absorption molaire du deuxième mode d'association (ϵ_{b2}). Les grandeurs utilisées sont celles du RDC37Cl : $\epsilon_f = 12550\ M^{-1}$, $\epsilon_{b1} = 6293\ M^{-1}$, $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,06$ et $q = 1$. Les différentes valeurs de ϵ_{b2} choisies sont 10858 M^{-1} pour la courbe noire représentant les résultats du RDC37Cl ; 6293 M^{-1} pour la courbe en pointillée violette correspondant au cas où $\epsilon_{b1} = \epsilon_{b2}$; 12000 M^{-1} pour la courbe rouge (c), 8000 M^{-1} pour (b) correspondant à des cas où $\epsilon_{b1} < \epsilon_{b2}$ et 4000 M^{-1} pour (a) correspondant à un cas où $\epsilon_{b1} > \epsilon_{b2}$.

Pour finir, le cas où $\epsilon_{b2} > \epsilon_f$ n'est pas étudié ici car, comme il a été vu dans la section précédente la méthode d'analyse développée par Bujalowski que nous avons utilisé pour analyser nos résultats n'est pas utilisable pour ce cas de figure. De plus, ce sont des conditions expérimentales qui ne sont pas observées pour nos mesures.

2.2.2 Rapport des constantes d'affinité : $\left(\frac{K_{a2}}{K_{a1}}\right)$

Le graphe de la figure 3.3 présente les courbes de variation d'absorbance par site d'association en fonction du taux d'occupation de ces sites pour différentes valeurs de rapport de constante entre les deux équilibres. Les autres grandeurs du modèle correspondent toujours

aux grandeurs du complexe RDC37Cl. Les cas où le rapport des constantes d'affinité est inférieur à 1 correspond au cas où le deuxième équilibre possède une affinité plus faible que le premier. Ceci correspond au comportement expérimental observé, le mode d'intercalation développant une force d'association plus grande que les interactions électrostatiques. La représentation graphique montre un comportement qui évolue en fonction de la valeur absolue du rapport des constantes d'affinités, plus cette valeur est faible, plus la rupture de pente observée entre les deux domaines linéaire est anguleuse.

Le cas où le rapport des constantes est de 1, c'est à dire où les constantes d'affinités sont identiques pour les deux équilibres montre un comportement linéaire identique au cas où les coefficients d'absorption molaires liés sont identiques. Ainsi, les résultats expérimentaux obtenus pour le RDC40Cl peuvent soit s'expliquer par des constantes d'affinité identiques pour les deux équilibres, soit par des coefficients d'absorption molaire liés identiques. D'après les identifications des modes d'associations, le deuxième cas reste la meilleure hypothèse car les deux modes d'association supposés ont une forte différence de constante d'affinité.

Le cas particulier où le rapport des constantes d'affinité est supérieur à 1 ne traduit pas correctement les résultats expérimentaux observés mais présente un comportement similaire au cas où $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} < 1$ mais avec une courbure inversée.

2.2.3 Paramètre q

Le dernier paramètre pouvant être modifié dans ce modèle est la valeur de q qui traduit la répartition entre les sites de type intercalation et les sites de type association de surface dans le modèle développé. La variation de q modifie l'allure de la courbe (voir figure 3.4) à deux niveaux :

1. La valeur de ν^S_{cross} correspondant au lieu de la rupture de pente c'est à dire à la séparation des deux domaines linéaires.
2. La valeur absolue de Q_{obs} pour des valeurs de taux d'occupation des sites élévées (proche de 1) qui augmente avec les valeurs de q tracées.

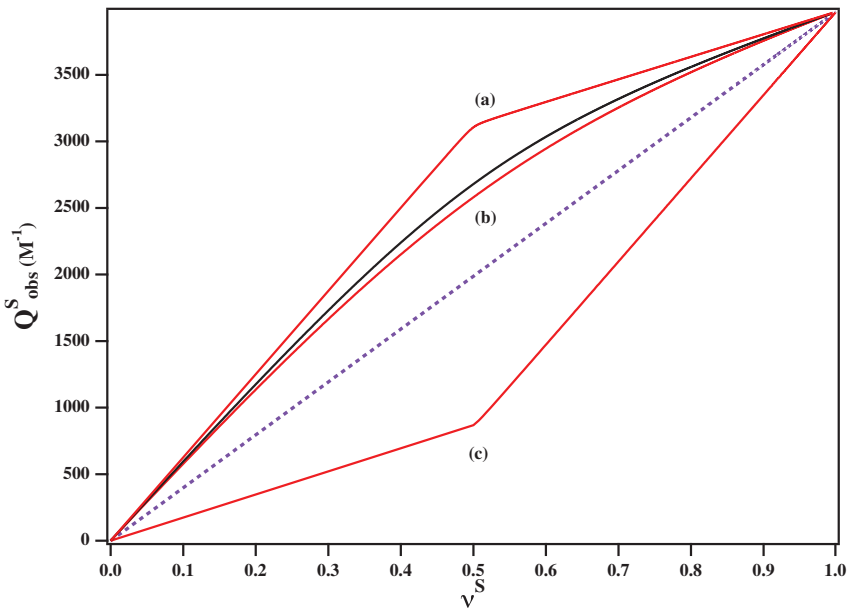


FIGURE 3.3 – Influence du rapport des constantes d'affinité entre les deux modes d'association : $\frac{K_{a2}}{K_{a1}}$, sur la variation d'absorbance par site d'association en fonction du taux d'occupation de ces sites. Les autres grandeurs utilisées pour le tracé sont celles du complexe RDC37Cl : $\epsilon_f = 12550\ M^{-1}$, $\epsilon_{b1} = 6293\ M^{-1}$, $\epsilon_{b2} = 10858\ M^{-1}$ et $q = 1$. Les différentes valeurs de $\frac{K_{a2}}{K_{a1}}$ sont choisies pour montrer les différents cas de figure possibles : si $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 1$ (droite pointillée violette) le comportement est linéaire, si $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} < 1$ (courbes rouges) le comportement est bi-linéaire et les valeurs absolues de Q^S_{obs} sont supérieures à la droite du cas précédent. Plus le rapport est petit plus le point de séparation entre les deux domaines linéaires est anguleux : $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,1$ pour (b) et $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,0001$ pour (a). Réciproquement, pour le cas $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 10000$ où la courbe rouge (c) montre un comportement différent des résultats expérimentaux.

3 Détermination des constantes d'affinité

Comme il a été énoncé dans le chapitre expérimental de ce manuscrit, la détermination des valeurs absolues des constantes d'affinité à partir de l'expression 3.4 n'est pas possible, seul le rapport entre les deux constantes $\frac{K_{a2}}{K_{a1}}$ est accessible. Pourtant en travaillant les équations nous pouvons arriver à exprimer le rapport expérimental entre la concentration totale en site d'association et la concentration totale en ligand $\frac{[S]_T}{[L]_T}$ en fonction du taux d'occupation des sites d'association ν^S.

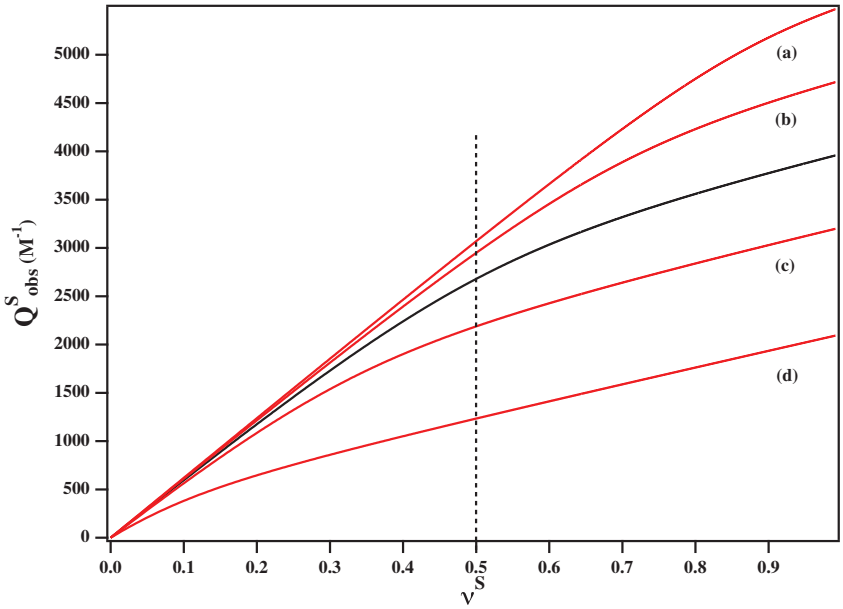


FIGURE 3.4 – Influence de la répartition du nombre de sites d'association entre les deux modes sur l'évolution de la variation d'absorbance par site d'association en fonction du taux d'occupation de ces sites d'association. Les autres grandeurs utilisées pour le tracé sont celles du complexe RDC37Cl : $\epsilon_f = 12550\ M^{-1}$, $\epsilon_{b1} = 6293\ M^{-1}$, $\epsilon_{b2} = 10858\ M^{-1}$ et $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,06$. Pour une valeur de $q = 1$ (courbe noire), la rupture de pente se trouve à une valeur de $\nu^S_{cross} = 0,5$ (droite pointillée noire). Pour une valeur de $q < 1$ la rupture de pente se fait à une valeur inférieure à 0,5 (courbes rouge). Plus la valeur de q est basse, plus la rupture de pente se fait à un ν^S_{cross} bas : $q = 0,1$ pour courbe (d) et $q = 0,5$ pour courbe (c). De même pour une valeur de $q > 1$ la rupture de pente se trouve à une valeur supérieure à 0,5 : $q = 2$ pour courbe (b) et $q = 5$ pour courbe (a).

3.1 Modèle à un unique équilibre

Dans le cas d'un équilibre unique de la forme :

$$\mathrm{S} + \mathrm{L} \underset{K_a}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S{-}L})$$

en utilisant les lois de conservation de la matière et la définition du taux d'occupation des sites d'association ν^S, la constante d'affinité s'écrit :

$$K_a = \frac{\nu^S}{[L]_T \times \left(1 - \nu^S \frac{[S]_T}{[L]_T}\right) \times (1 - \nu^S)}$$

L'expression du rapport des concentrations totales en site d'association et en taux d'occupation de ces sites est alors :

$$\frac{[S]_T}{[L]_T} = \frac{1}{\nu^S} - \frac{1}{K_a \times [L]_T \times (1 - \nu^S)} \tag{3.6}$$

et donc le tracé du rapport des concentration totales en fonction du taux d'occupation des sites d'association permet d'obtenir la valeur absolue de K_a. Pour simplifier les équations et s'affranchir du terme de concentration en ligand total dans l'expression 3.6, on définit une constante d'affinité relative notée $\tilde{K_a} = K_a \times [L]_T$. La figure 3.5 montre la représentation de $\frac{[S]_T}{[L]_T} = f(\nu^S)$ pour différentes valeurs de $\tilde{K_a}$. Il apparaît alors que pour des valeurs supérieures à 1, il est difficile de voir une différence notable sur les courbes et donc les ajustements faits sur des points expérimentaux donneraient une forte incertitude sur la valeur des constantes obtenues. Pour pouvoir utiliser cette méthode, il faut que la constante relative soit inférieure à 1 et d'après les valeurs connues de constante d'affinité proche de $10^5\ M^{-1}$ les concentrations de travail doivent se situer aux alentours de $[L]_T = 10^{-6}\ M$. Pour les mesures expérimentales de spectrophotométrie d'absorption, ces concentrations entraînent une absorbance trop faible pour être détectée. C'est pourquoi avec ce type de manipulations il est difficile d'obtenir la valeur absolue de la constante d'affinité.

3.2 Modèle à deux équilibres

Pour le modèle à deux équilibres, l'expression 3.6 devient beaucoup plus complexe et la modélisation est plus difficile. Pour réussir à obtenir un faisceau de courbe représentant différentes valeurs de constante d'affinité il faut définir différents termes : une variable

$$A = 1 - \frac{[S]_T}{[L]_T} \times \nu^S$$

dont la valeur est incrémentée artificiellement pour recréer une évolution de la grandeur au cours d'un dosage. Les grandeurs tracées dans la représentation précédente sont donc

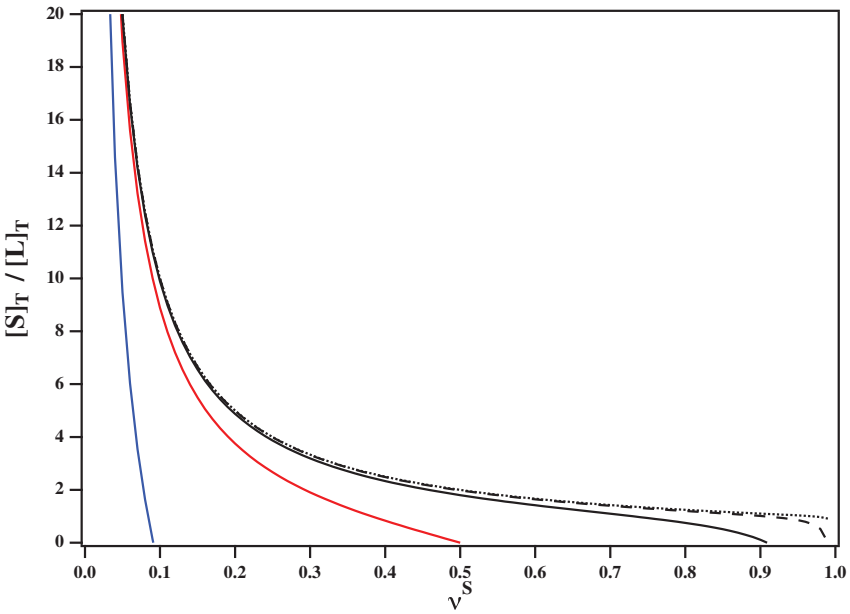


FIGURE 3.5 – Évolution de la représentation $\frac{[S]_T}{[L]_T} = f(\nu^S)$ en fonction de différentes valeurs de $\tilde{K_a}$. Pour une valeur faible de la constante relative : $0,1$, le taux d'occupation n'atteint pas des valeurs très élevées (courbe bleue) car l'affinité n'est pas suffisamment grande pour que plus de ligands s'associent à la macromolécule. Pour des valeurs de constantes d'affinité relative supérieures à 10 (courbes noires) sont très semblabes : $\tilde{K_a} = 10$ pour courbe continue noire, $\tilde{K_a} = 100$ pour courbe pointillée longs et $\tilde{K_a} = 1000$ pour courbe en pointillée courts. La valeur $\tilde{K_a} = 1$ (courbe rouge) correspond à la valeur limite pour laquelle les valeurs supérieures de $\tilde{K_a}$ présentent des courbes similaires et les valeurs inférieures des courbes assez identifiables.

calculées à partir de cette variable :

$$\nu^S = \frac{A}{2} \times \frac{2\tilde{K_{a1}}\tilde{K_{a2}}A + \tilde{K_{a1}} + \tilde{K_{a2}}}{(\tilde{K_{a1}}A + 1) \times (\tilde{K_{a2}}A + 1)} \tag{3.7}$$

$$\frac{[S]_T}{[L]_T} = \frac{1 - A}{\nu^S} \tag{3.8}$$

Les représentations sont données sur la figure 3.6. Pour le tracé il a été choisi de conserver pour l'ensemble des courbes le même rapport entre les deux constantes d'affinité : $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,06$. Cette valeur est la valeur correspondant aux résultats expérimentaux obtenus pour le complexe RDC37Cl. De la même façon que pour le modèle à un équilibre unique, les courbes sont similaires à partir d'une certaine valeur absolue de constante d'affinité relative du premier

mode : $\tilde{K_{a1}} = K_{a1} \times [L]_T$. En effet, pour des valeurs supérieures à 1 on ne peut pas utiliser les ajustements des points expérimentaux avec cette équation car les résultats de constante obtenus contiendraient une trop forte incertitude. Pour pouvoir appliquer cette méthode il faut, comme précédemment, que la concentration totale en ligand soit inférieure à 10^{-6} M ce qui ne correspond pas à la gamme de concentration détectable en spectrophotométrie d'absorption visible pour ces complexes.

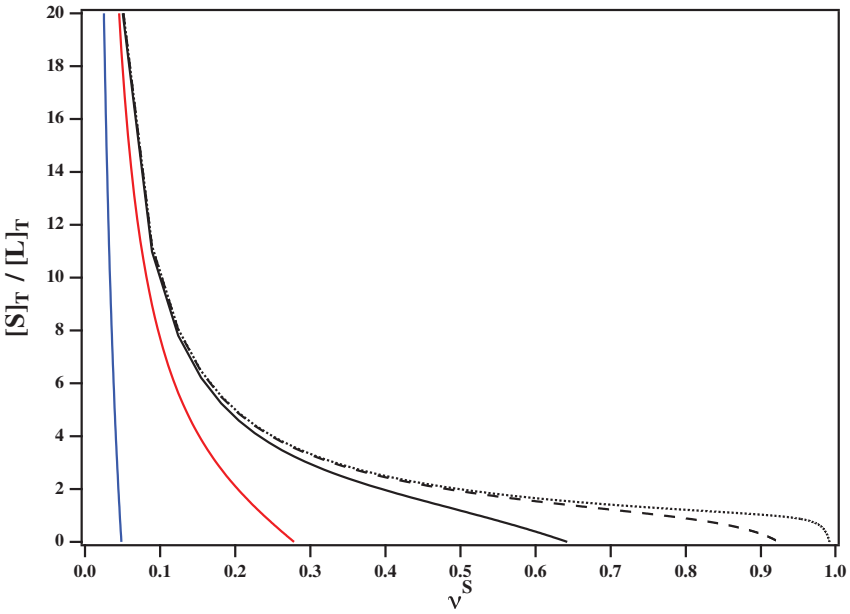


FIGURE 3.6 – Évolution de la représentation $\frac{[S]_T}{[L]_T} = f(\nu^S)$ en fonction de différentes valeurs de $\tilde{K_a}1$: constante d'affinité relative du premier mode d'association. Le rapport entre les deux constantes est choisi à $\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = 0,06$ comme la valeur trouvée pour le complexe RDC37Cl. Pour une valeur faible de la constante relative dans le mode 1 : 0,1, le taux d'occupation n'atteint pas des valeurs très élevées (courbe bleue) car l'affinité n'est pas suffisamment grande pour que plus de ligands s'associent à la macromolécule. Les courbes de valeurs de constantes d'affinité relative supérieures à 10 (courbes noires) sont très semblabes : $\tilde{K_a}1 = 10$ pour courbe continue noire, $\tilde{K_a}1 = 100$ pour courbe pointillée longs et $\tilde{K_a}1 = 1000$ pour courbe en pointillée courts. La valeur $\tilde{K_a}1 = 1$ (courbe rouge) correspond à la valeur limite pour laquelle les valeurs supérieures de $\tilde{K_a}1$ présentent des courbes similaires et les valeurs inférieures des courbes assez identifiables.

Cette méthode n'a donc pas pu être utilisée dans le chapitre expérimental et c'est pourquoi nous avons eu recours à la méthode de Hildebrand-Benesi afin de déterminer la valeur absolue de la constante d'affinité du premier mode d'association : K_{a1}. En revanche, la valeur absolue

du second mode d'association K_{a2} n'est pas déterminer car la méthode utilisée est décrite pour le cas d'un équilibre unique entre un site d'association et un ligand. La valeur de K_{a2} est donc obtenue à partir de la valeur de K_{a1} et de la valeur du rapport entre les deux constantes d'affinité obtenu à partir de l'ajustement de la représentation de la variation d'absorbance par site d'association en fonction du taux d'occupation de ces sites (voir équation 3.4).

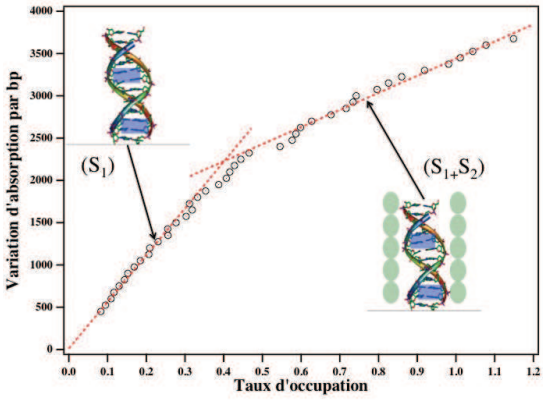
En résumé

Description de la complexation

La variation d'absorbance molaire $\left(Q_{obs}^{D} = \frac{A_0 - A_{mes}}{[D]_T}\right)$ est proportionnelle au taux d'occupation des paires de bases d'ADN dans le cas d'un équilibre unique :

$$\mathrm{S} + \mathrm{RDC} \underset{K_a}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S}-\mathrm{RDC})$$

Expérimentalement :



Plusieurs équilibres

La variation d'absorption molaire n'est pas une fonction linéaire du taux d'occupation $\Rightarrow$ il y a donc deux équilibres successifs :

$$\mathrm{S}_1 + \mathrm{RDC} \underset{K_{a1}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S}-\mathrm{RDC})_1$$
$$\mathrm{S}_2 + \mathrm{RDC} \underset{K_{a2}}{\rightleftharpoons} (\mathrm{S}-\mathrm{RDC})_2$$

Saturation de S_1 avant association avec S_2

Identification des modes d'association	
Premier mode d'association (S_1) :	Deuxième mode d'association (S_2) :
INTERCALATION	**ÉLECTROSTATIQUE**
$K_{a1} \approx 10^5\ M^{-1}$; $\Delta\epsilon_1$ important	$K_{a2} \approx 10^3\ M^{-1}$; $\Delta\epsilon_2$ faible

Troisième partie

Adhésion cellulaire

Chapitre 1

Propriétés d'adhésion cellulaire

La cellule est un organisme vivant qui répond à des signaux envoyés par son environnement en évoluant et s'adaptant par l'intermédiaire de phénomènes dynamiques. Ce chapitre n'est pas censé donner une liste exhaustive de l'ensemble des mécanismes dynamiques des différents types de cellules connus mais plutôt de donner les outils nécessaires à la compréhension des principaux résultats obtenus dans la littérature ainsi qu'aux études réalisées par notre équipe. La diversité cellulaire oblige à créer des généralités qui peuvent sembler grossières sur des exemples concrets mais qui donnent tout de même une base solide aux analyses des résultats. C'est pourquoi nous allons, comme la plupart des auteurs cités, nous limiter au cas des cellules épithéliales, musculaires et du tissu conjonctif adhérées sur un substrat mou.

Dans une premier temps nous présentons de façon générale les phénomènes dynamiques d'une cellule : adhésion et motilité. Puis, nous nous intéressons aux études déjà réalisées sur ces phénomènes au travers des techniques expérimentales utilisées et des principaux résultats connus. Enfin, la dernière section de ce chapitre est consacrée à la présentation des objectifs des travaux réalisés durant cette thèse.

1 La cellule : un système dynamique

1.1 L'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est un phénomène très important qui entre en jeu dans un grand nombre de processus dans les organismes vivants comme par exemple :

— la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire

— la différenciation et la prolifération des cellules dans les organismes

— la formation de métastase lors du développement d'un cancer à partir d'un organe infecté

Pour remplir ces rôles, les cellules sondent leur environnement[73,74] et répondent mécaniquement en conséquence à ce qu'elles ressentent : c'est la mécanotransduction.[75,76] L'adhésion cellulaire, c'est à dire la formation du "lien" entre la cellule et le substrat, constitue la première étape de ce phénomène.

Le terme "adhésion d'une cellule" désigne de façon générale deux grandes familles : l'adhésion cellule-cellule[77,78] qui est caractéristique des cellules de type épithéliales et l'adhésion cellule-matrice extracellulaire. Cependant, les cellules cancéreuses, même si elles sont issues d'un type cellulaire produisant plutôt des adhésions de nature cellule-cellule, montrent une forte capacité à modifier leurs propriétés et à s'adhérer facilement sur des supports biologiques présents dans leurs environnement direct. Ainsi, le mécanisme d'adhésion des cellules sur un support comme la matrice extracellulaire est le mécanisme principal mis en jeu dans les déplacements des cellules cancéreuses lors de la formation de métastases par exemple. C'est pourquoi nous nous limitons dans ce manuscrit à la description et à l'étude des cellules adhérées sur un substrat mou mimant cette matrice extracellulaire.

Le mécanisme de l'adhésion entre la cellule et la matrice extracellulaire (ECM) a fait l'objet d'un grand nombre de recherche[75] et montre une grande complexité. En effet, les protéines d'adhésion intervenant dans ce processus sont très nombreuses.[79–81] Les plus importantes sont les intégrines,[82,83] des protéines transmembranaires qui se lient d'une part

à des macromolécules de la matrice extracellulaire et d'autre part aux filaments d'actine contenu dans le cytosquelette des cellules. Les liaisons formées entre la cellule et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des intégrines se focalisent sur des petites surfaces sous la cellule nommées points focaux.[84] A noter que différentes protéines d'adhésion régulent l'action des intégrines[85] comme par exemple la taline.[86,87] La structure de ces points focaux est très complexe, comme le montre la figure 1.1 issue de la revue de Campbell publiée en 2010,[88] et est modifiée par les forces provoquant un déplacement cellulaire.[89,90]

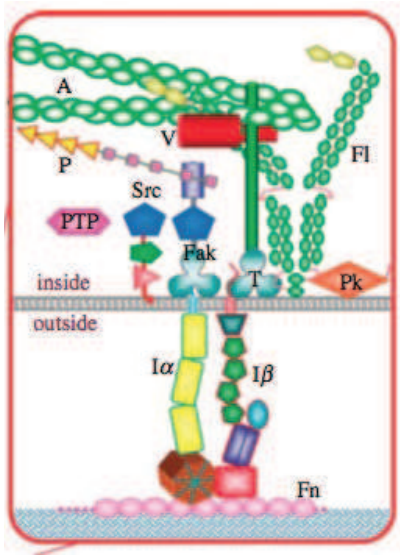


FIGURE 1.1 – Figure issue de la revue de Campbell publiée en 2010 donnant la structure d'un point focal d'adhésion liant l'intérieur d'une cellule (inside) avec une matrice à l'extérieure (outside). Le grand nombre de protéines d'adhésion mises en jeu explique la complexité du phénomène d'adhésion cellulaire. A : actine ; P : paxiline ; T : taline ; Fl : filamine ; Src et Fak : deux kinases du point focal d'adhésion ; V : vinculine ; PTP : phosphatases ; Pk : PIP kinase ; Iα et Iβ : intégrines avec des sous-unités α et β ; Fn : partie de fibronectine qui est une macromolécule de la matrice extracellulaire.

Après son adhésion, c'est à dire la formation de points focaux, un phénomène de migration (déplacement) cellulaire peut être observé. En effet, une des propriétés des cellules est leur capacité à se mouvoir : cette propriété est appelée motilité.

1.2 La motilité cellulaire

Les cellules adhérées ont la faculté de pouvoir se déplacer sur la surface d'un substrat support. Il existe différents mécanismes de migration cellulaires mais nous nous limitons au plus "classique" permettant de décrire le mouvement des cellules sur un substrat en plusieurs étapes. D'autres mécanismes existent mais pour des types cellulaires bien particuliers comme les amibes et les globules blans ou les protozoaires flagellés. Le choix de se limiter au mécanisme de migration par étape est légitime étant donné que les études se concentrent en général sur des cellules épithéliales, musculaires ou du tissu conjonctif se déplaçant sur un substrat mou.

Pour réaliser ces déplacements la cellule doit créer de nouveaux points focaux sur des parties du substrat voisines à la cellule et exercer une certaine force de traction à partir de ces nouvelles "attaches" afin que l'ensemble de la cellule se déplace. Ce mécanisme de déplacement peut être décrit en plusieurs étapes[91–94] :

1 - La protrusion : la cellule crée des extensions avec son cytosquelette qui lui permet de former un nouveau point focal d'adhésion dans une région voisine au lieu d'adhésion de la cellule. Ces extensions sont appelées lamellipodes.

2 - L'adhésion : création du nouveau point focal

2' - La désadhésion : détachement de "l'arrière" de la cellule par rapport au déplacement de la cellule

4 - La translocation : traction de la cellule à partir du nouveau point focal entraînant le mouvement cellulaire

Ces quatre étapes sont résumées sur la figure 1.2.

Le mécanisme de l'étape 4 permettant à la cellule de se mouvoir est dû à la présence dans le cytosquelette de fibres de tension constituées par des filaments d'actines[96] et des protéines apellées myosine. L'action de ces deux composés est aussi à l'origine de la contraction des tissus musculaires. Le fonctionnement du système acto-myosine est bien connu[97] : il consiste en des glissements des filaments d'actine causés par le mouvement des myosines.[98] Le modèle

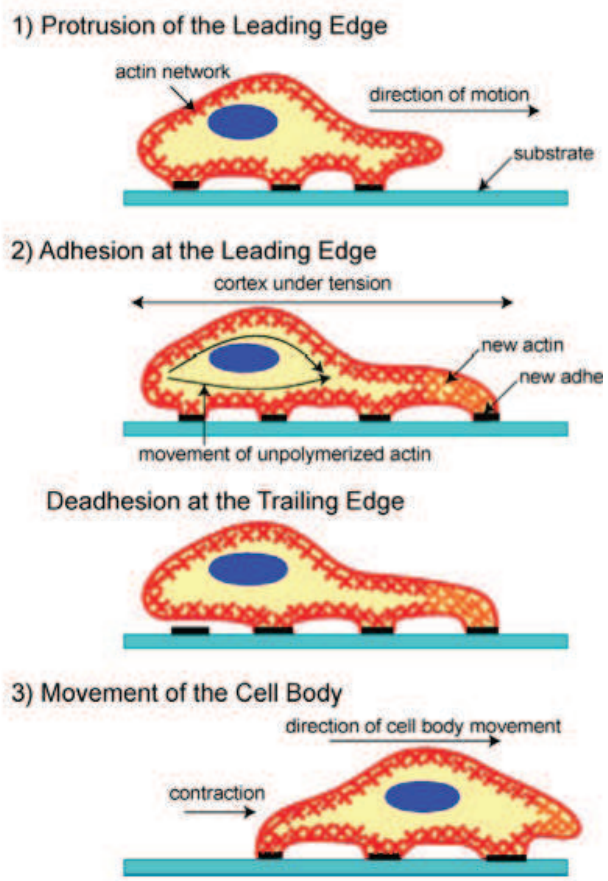


FIGURE 1.2 – Figure issue de la revue de Ananthakrishnan[95] donnant les quatre étapes clés du mécanisme de migration cellulaire. 1 - Formation d'une extension du cytosquelette de la cellule pour sonder l'environnement proche, 2 - Création d'un nouveau point focal d'adhésion, 2' - Désadhésion du point focal situé à l'arrière par rapport au déplacement et 4 - Traction entraînant le mouvement cellulaire.

proposé[99] pour décrire ces mouvements est présenté dans la figure 1.3 et montre l'importance de l'apport d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) dans la cellule. Le mouvement de l'ensemble des filaments présents dans le cytosquelette permet d'exercer des forces de traction sur les points focaux d'adhésion par l'intermédiaire des intégrines qui forment un lien direct entre ces filaments d'actine et le support sur lequel est adhérée la cellule. C'est cette force de traction résultante qui engendre le mouvement cellulaire et permet à la cellule de se déplacer.[95] La concentration des filaments d'actine dans la cellule est donc fortement augmentée au niveau des lamellipodes formés ainsi que sur le front d'avancement de la cellule.[100,101]

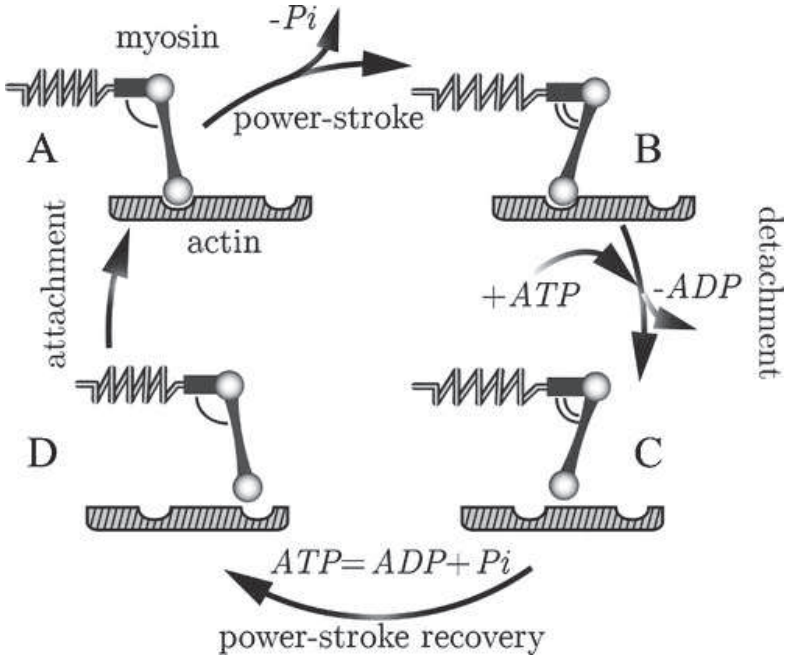


FIGURE 1.3 – Figure issue de la publication de R.Sheshka de 2010 montrant le modèle en 4 étapes de l'activité du système acto-myosine. A→B : Traction de la myosine permettant le glissement du filament d'actine ; B→C : Détachement de la myosine au site d'accroche du filament d'actine ; C→D : Détente de la myosine non-attachée pour récupérer sa forme initiale ; D→A : Création d'une nouvelle liaison entre la myosine et un nouveau site d'accroche sur le filament d'actine. Le cycle permettant l'apport d'énergie nécessaire à l'action de la myosine est aussi indiqué : ATP = ADP + P + énergie

La régulation de ces forces de traction est dirigée par la polymérisation interne des filaments d'actine.[102,103] Comme le montre la figure 1.4, il s'agit d'un phénomène polarisé car d'un côté du filament, il y a polymérisation et de l'autre côté du même filament, il y a dépolymérisation. Selon la différence entre ces deux vitesses de réaction, le filament s'agrandit ou se rétrécit. L'énergie nécessaire à ces réactions est apporté par l'adénosine tri phosphate (ATP). Des processus biochimiques complexes permettent de réguler ces vitesses de polymérisation et donc de contrôler la motilité de la cellule.

De nombreuses études ont été menées pour comprendre pourquoi les cellules décident de s'adhérer et/ou de se déplacer ? Pour répondre à ces questions, les chercheurs ont dû mettre en place des manipulations expérimentales permettant d'étudier les phénomènes cellulaires dynamiques. La suite de ce chapitre est consacrée à faire un état de l'art actuel des travaux

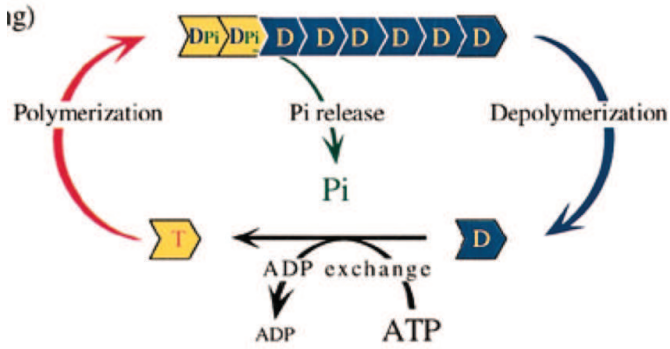


FIGURE 1.4 – Mécanisme de polymérisation des filaments d'actine. Processus polarisé avec un côté où la polymérisation alieu et l'autre côté où la dépolymérisation se déroule. Selon les vitesses de réactions aux deux extrémités le filament peut soit augmenter soit diminuer en taille. L'énergie nécessaire à ces réactions est ici aussi apportée par l'ATP.

sur ces sujets.

2 État de l'art

2.1 Techniques expérimentales

Depuis plusieurs années différentes types de manipulations ont été utilisées pour mettre en évidence les propriétés d'adhésion cellulaire. Ce paragraphe est écrit dans l'esprit de donner les principales évolution techniques réalisées pour caractériser ces phénomènes mais n'est en rien une liste exhaustive des techniques expérimentales possible.

Les premières manipulations datent des années 80 où A. K. Harris et son équipe proposent de caractériser l'adhésion et les mouvements cellulaires sur une couche de silicone mou en étudiant les plissures qui se froment lorsque les cellules exercent une force de traction sur le support.[104] Ces manipulations sont reprises plus tard, en 1999, par Burton[105] et aussi Oliver[106] mais en améliorant considérablement les techniques microscopiques et permettant ainsi d'obtenir des grandeurs caractéristiques de force de traction.

Puis en 2001, N. Q. Balavan[107] propose une mesure originale utilisant des "micro-piliers" en polymère élastique (polydiméthylsiloxane noté PDMS) sur lesquels les cellules sont cultivées. Le diamètre de ces piliers est tel que la surface des cellules en recouvre plusieurs dizaines.

Ainsi, l'enregistrement par microscopie en contraste de phase du mouvement de ces piliers représente la répartition des forces exercées par la cellule par l'intermédiaire de ses points focaux d'adhésion.

Dans la même idée, une des techniques le plus utilisée encore aujourd'hui pour caractériser les mouvements cellulaires est une technique mise en place au départ par J. Lee en 1994[108] et améliorée plus tard notamment au niveau de l'analyse et du traitement des enregistrements.[109,110]

Le principe est d'utiliser comme support un gel de polyacrylamide où des microbilles fluorescente sont dispersées à l'intérieur de la matrice. La densité et la taille de ces billes sont tels qu'il peut, selon les lignées cellulaires etudiées, y avoir une centaine de microbilles sous la surface d'une cellule (diamètre des billes $\approx$ 500 nm). Ainsi, les mouvements cellulaires à la surface de ce gel support entraînent un déplacement spatial des billes contenues dans la matrice. L'enregistrement par microscopie de fluorescence de ces déplacements permet de créer un champ de déplacement sous la cellule étudiée[109,111] (voir figure 1.5). Des travaux sur

FIGURE 1.5 – Image de l'article de M. Dembo[111] présentant un champ de déplacement des microbilles fluorescentes dispersées dans une matrice support lors du mouvement d'une cellule à la surface du gel. Les flèches indiquent les mouvements des billes.

l'amélioration de l'analyse ont permis de mettre en place des méthodes permettant d'obtenir des champs de force à partir de ces champs de déplacement enregistrés.[110,111] Grâce à cette technique il est possible d'avoir une vision d'ensemble des forces mises en jeu sur toute la

surface de la cellule pendant son déplacement.

De plus, il a été montré que l'observation du déplacement des cellules à deux dimensions (sur une surface) crée en réalité un déplacement des billes, contenues dans la matrice, à trois dimensions.[112,113] Les déplacements enregistrés doivent donc tenir compte de la profondeur séparant la surface du gel, où se trouve la cellule, et la bille dans la matrice support. La figure 1.7 proposée par S. S. Hur,[112] montre bien l'existence d'une force tangeltielle à la surface du gel ainsi que d'une force normale perpendiculaire à cette surface et dépendant de la profondeur où la bille se situe dans le gel.

Plus récemment, des manipulations sur la culture cellulaire dans une matrice tridimensionnelle (hydrogel) se sont développées pour se rapprocher encore plus de la réalité biologique.[114,115] L'utilisation de la technique avec les microbilles fluorescentes justifient la résolution à trois dimensions pour ces manipulations[116,117] (voir figure 1.6).

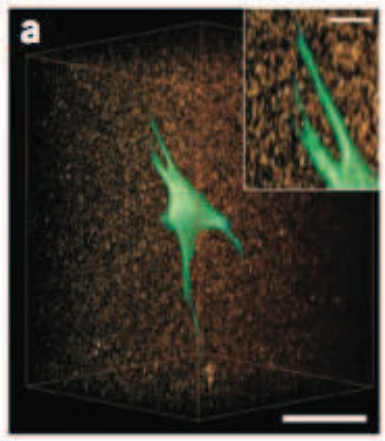


FIGURE 1.6 – Image issue de l'article de W. R. Legant[116] montrant un fibroblaste NIH 3T3 (cellule du tissu conjonctif) dans un hydrogel à trois dimmensions contenant des microbilles fluorescentes. La barre d'échelle est de 50 μm sur l'image principale et de 10 μm dans l'insert.

Enfin, contrairement aux techniques enregistrant les forces créées spontanément par les cellules lors de leur adhésion ou de leur déplacement, d'autres types de manipulations faisant cette fois-ci intervenir des stimuli mécaniques extérieurs peuvent être citées dans ce paragraphe :

— les techniques de pinces optique permettant de mesurer des forces cellulaires répondant

à une pression ou un étirement mécanique extérieur[118,119]

— les réponses cellulaires à des cisaillements créés par des flux de liquide à la surface des cellules adhérées : modifications de la structure des points focaux par l'activation des intégrines, de la myosine,[120,121] ... Ces cisaillement permettent notamment de mimer l'action les flux sanguins sur les cellules épithéliales recouvrant l'intérieur des artères et des veines.

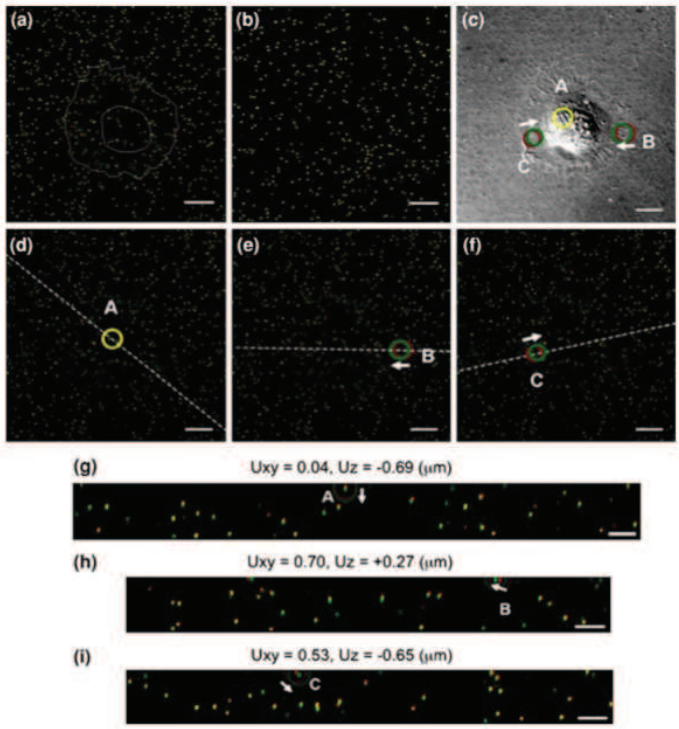


FIGURE 1.7 – Images de l'article de S. S. Hur[112] montrant les forces exercées par une cellule endothéliale bovine en utilisant la technique du déplacement de microbilles fluorescentes dispersées dans un gel support. Les images (a), (b) et (c) montrent des vues par dessus des microbilles et de la cellule avec (a) les billes et les contours de la cellule en trait blanc, (b) les billes uniquement et (c) la cellule avec les zones étudiées plus en détail sur les images (d), (e) et (f) où le mouvement à deux dimensions (x,y) et signalé par une flèche blanche. Enfin les images (g), (h) et (i) correspondent respectivement aux mouvements normaux des billes (coupe transversale) pour les déplacements associés aux images (d), (e) et (f). Les valeurs de déplacement à 2D sont données par U_{xy} tandis que les déplacements normaux (dans la profondeur du gel) sont donnés par U_z, dont la surface du gel à l'état initial est à la référence : les valeurs positives correspondent donc à un abaissement de la bille en profondeur tandis que les valeurs positives correspondent à une élévation de la bille vers la surface du gel. Les barres d'échelle sur touts les images sont d'une valeur de 10 μm.

Ces techniques ont permis de mettre en évidence des résultats intéressants sur les phénomènes dynamiques cellulaires.

2.2 Principaux résultats connus

2.2.1 Les différents types de cellules

Comme il a été remarqué dans la section précédente, plusieurs types de cellules ont été étudiées avec différentes techniques expérimentales. La justification de l'utilisation d'une lignée cellulaire plutôt qu'une autre peut provenir d'une multitude de raisons. Soit l'observation et/ou la quantification des forces mises en jeu lors du mouvement cellulaire ne peuvent être réalisées car les cellules bougent trop ou pas assez vite. Soit les auteurs ont souhaité mettre en évidence des propriétés particulières telle que la chimiotaxie sur une lignée cellulaire spécifique. Quoiqu'il en soit, les cellules étudiées dans cette littérature sont toujours des cellules épithéliales ou musculaires ou du tissu conjonctif (fibroblastes).

2.2.2 Étalement cellulaire

Cette grandeur est définie comme étant l'aire de contact des cellules adhérées avec la surface du substrat support. Les manipulations d'étalement cellulaire constituent le coeur des mesures réalisées dans ces travaux et sont donc dévellopés dans le chapitre de présentation des résultats de cette partie. Dans la littérature, les mesures de l'étalement cellulaire ont été réalisées en fonction de plusieurs variables :

— mesure de l'étalement cellulaire en fonction du temps[122,123]

— mesure de l'étalement cellulaire en fonction de la dureté du substrat support[124]

— mesure de l'étalement cellulaire en fonction de la densité des macromolécules adhérentes déposées sur la surface du substrat.[125] Les macromolécules les plus utilisées dans les manipulations sont : le collagène, la laminine, la fibronectine, ...

Le temps mis par une cellule pour atteindre son étalement maximal dépend du type de lignée cellulaire étudié. L'ordre de grandeur classique est d'environ 12 à 24 heures. La surface de

contact des cellules adhérées, c'est à dire l'étalement, augmente avec la rigidité du substrat et avec la densité de macromlécules adhérentes. A noter tout de même que pour des rigidités et pour des densités de macromolécules adhérentes trop élevées l'étalement cellulaire sature, voire même diminue.[125]

Enfin, certains travaux ont en plus essayé de quantifier la "déformation" géométrique des cellules adhérées en étudiant aussi l'évolution de la circonférence des cellules en fonction de la rigidité des substrats support.[124] En 2005, l'équipe de C. A. Reinhart-King a même proposer d'étudier l'évolution d'un paramètre de forme, défini à partir de la circonférence et de l'aire des cellules adhérées sur un substrat, en fonction de leur vitesse d'étalement.[126]

A noter que certaines manipulations mettent en évidence l'influence de la rugosité du substrat sur l'adhésion cellulaire.[127]

2.2.3 Forces d'adhésion

La détermination expérimentale des forces mises en jeu lors de phénomènes dynamiques cellulaires et l'un des axes de recherche les plus développé dans cette thématique. Les valeurs de forces mesurées sont exprimées en unité de force par point focal d'adhésion[128] ou encore en unité de pression.[111] Les forces mises en jeu lors de l'adhésion ou du mouvement cellulaire sont de l'ordre du $nN/\mu m^2$.[129]

2.2.4 Réponse à un stimulus extérieur

Il existe deux facteurs principaux qui influence les phénomènes dynamiques des cellules : la dureté du substrat et les présence d'agents chimiques.

2.2.4.a La durotaxie

C'est un phénomène où les cellules montrent un préférence pour les substrats ayant une rigidité élevée[130] et se déplacent spontanément vers eux. Ce processus est important pour la migration cellulaire mais aussi pour le développement des cellules,[131] leur différencia-

tion[115,132–134] et dans le processus de formation de métastases[135,136] au cours de l'évolution d'un cancer.

Il est possible d'observer ce phénomène de façon qualitative en enregistrant les mouvements de cellules placées à la limite entre deux substrats d'élasticité différente ou sur des substrats formés par un gradient de module élastique : les cellules ont alors une tendance générale à se déplacer vers le support le plus rigide.[137,138]

2.2.4.b La chimiotaxie

C'est un phénomène où les cellules semblent attirées vers une concentration élevée d'une substance chimique particulière.[139] Ce processus est notamment bien connu pour les bactéries qui se déplacent vers la concentration de nourriture (glucose) la plus forte.

La difficulté expérimentale est de créer un gradient de concentration d'une substance chemoattractante à l'intérieur du milieu où se trouve les cellules adhérées. Ainsi, des dispositifs expérimentaux spécifiques ont été créés pour remplir ce rôle.[140,141] Il apparaît alors que les cellules répondent favorablement à des gradients de concentration de substance comme la protéine interleukin-8 (IL-8), la protéine SDF-1 ou bien encore des facteurs de croissance pour certaines lignées cellulaires. Ce processus entraîne la polarisation de la cellule[142,143] et joue un rôle fondamental dans le déroulement des réactions biochimiques au niveau cellulaire.

2.2.5 Mécanisme de reconnaissance de l'environnement cellulaire

Les propriétés décrites précédemment nécessitent que la cellule soit capable de sonder son environnement direct pour répondre en conséquence par des phénomènes dynamiques comme la migration. Pour cela, des micro extensions du cytosquelette appelées spicules permettent d'analyser la constitution des zones voisines au lieu où la cellule est adhérée. Trois possibilités sont alors envisageables :

— l'environnement est moins favorable que l'endroit où la cellule est déjà adhérée et le spicule se retire

— l'environnement est plus favorable, plus rigide par exemple, et la cellule répond mécaniquement à ce signal en créant une extension de son cytosquelette plus importante et constituée principalement de filaments d'actine (lamellipode). Ce processus constitue une des étapes du phénomène de migration décrit précédemment et explique comment la cellule choisit de se déplacer dans une direction privilégiée (durotaxie, chimiotaxie, ...)

— l'environnement est identique et la cellule peut soit continuer à sonder son environnement si les conditions ne sont pas réunies pour une réponse dynamique (substrat mou par exemple), soit créer un nouveau point focal au travers d'un lamellipode sans pour autant déclencher un phénomène de migration en exerçant une force de traction sur ce lamellipode. La conséquence directe de la création de lamellipode sans migration cellulaire est la modification de la forme de la cellule adhérée. Cette observation est analysée en détails dans le chapitre expérimental de cette partie.

3 Objectif des travaux

L'objectif principal pour cette partie des travaux de thèse est de mettre en place des manipulations permettant de tester l'adhésion et la viabilité des cellules SW480, issues d'un cancer colo-rectal humain, sur différents gels de polyacrylamide d'élasticités proches de celles des substrats biologiques. Les images obtenues sont alors analysées pour déterminer si la rigidité du substrat influence l'adhésion de ces cellules de façon similaire à ce qui est décrit dans la littérature. De plus, la mise en place d'un montage expérimental adapté a permis de conserver les cellules en vie pendant un temps d'au moins 24 heures.

Chapitre 2

Observations expérimentales de l'adhésion cellulaire

Comme il a été montré dans le chapitre précédent, la technique expérimentale utilisant les microbilles fluorescentes dispersées dans le gel support est tout à fait adaptée pour caractériser précisément les forces cellulaires mises en jeu lors de l'adhésion ou des déplacements cellulaires. Le travail réalisé dans ce manuscrit n'est pas encore abouti au point de pouvoir réaliser l'enregistrement d'un champ de déplacement des microbilles fluorescentes afin d'obtenir le champ de force associé. En revanche, nous pouvons présenter le travail préliminaire réalisé qui consistait à :

— obtenir des cellules adhérées sur des gels ayant des modules élastiques similaires aux substrats biologiques des organismes vivants.

— caractériser les différences d'adhésion observées en fonction de la rigidité des gels étudiés

— mettre en place un dispositif d'enregistrement permettant l'observation des cellules sur un temps suffisamment long ($\approx$ 24 heures) pour, dans la suite, étudier la motilité cellulaire sur des substrats mous

Afin de remplir ces objectifs, des boîtes stériles faites spécialement pour les observations microscopiques ont été utilisées (voir la description dans la partie expérimentale). Une installation hermétique avec un système de chauffage d'air et d'insuflation de dioxyde de carbone a aussi été installé sur le microscope afin que les cellules restent dans un environnement optimal (37°C et 5% de CO_2) à leur développement et leur survie pendant une durée d'au moins 24 heures.

1 Résultats expérimentaux

1.1 Paramètres observés

Pour nos manipulations, nous avons choisi d'observer le comportement structural des cellules en réponse à une variation du module élastique du gel support. Pour cela, des boîtes contenant des gels de polyacrylamide ayant des modules élastiques variant de 1 kPa à 19 kPa et une épaisseur d'environ 50 μm ont été préparées. Ces valeurs permettent de simuler plusieurs types de support présents dans les organismes vivants humain : os (30 à 40 kPa), tissus musculaires (9 à 15 kPa), matrice extracellulaire, cerveau (inférieur à 1 kPa),[144] ...
Le dépôt de cellules de la lignée SW480 (cancer colo-rectal humain) sur ces gels est possible uniquement après l'activation de leur surface, c'est à dire le dépôt de macromolécules adhérentes, constituant de la matrice extracellulaire comme le collagène pour nos expériences.
Des images de l'ensemble de ces cellules sont alors prises avec un microscope de grossissement 20× afin d'être analysées (voir figure 2.1). Le protocole utilisé pour l'ensemble de ces manipulations est décrit précisément dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

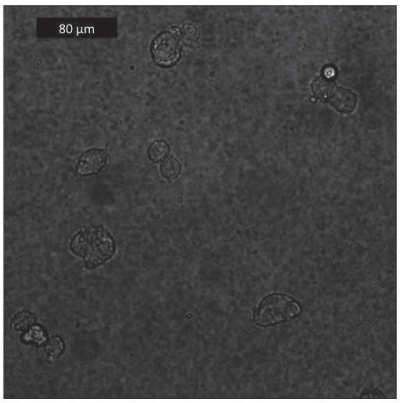
Les résultats montrent que, selon le module élastique du gel, la forme prise par les cellules n'est pas la même. Deux effets sont observés :

— Une modification du nombre de lamellipodes par cellule

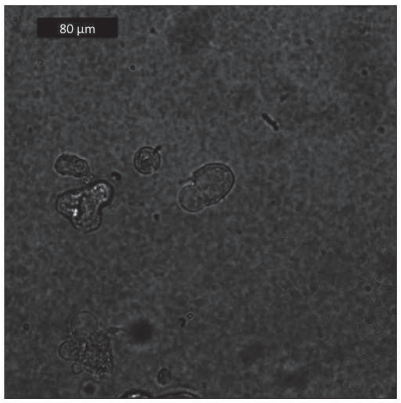
— Une modification de la surface des cellules adhérées au gel

Ce sont ces deux paramètres qui sont observés pour caractériser l'adhésion cellulaire dans

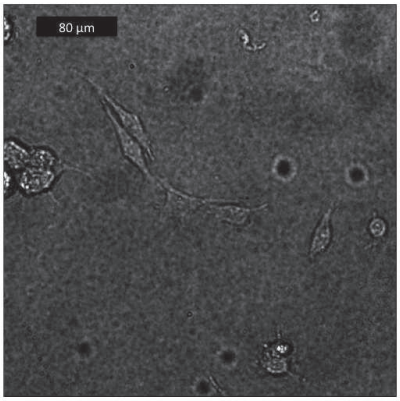
nos manipulations expérimentales.



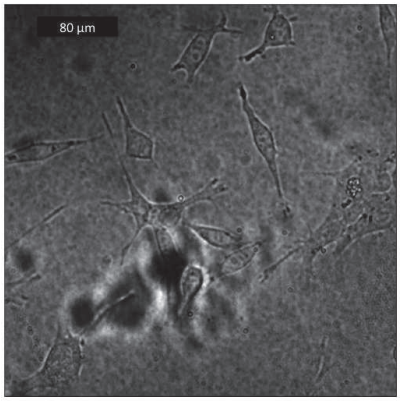
(a) $E = 0,6\ kPa$



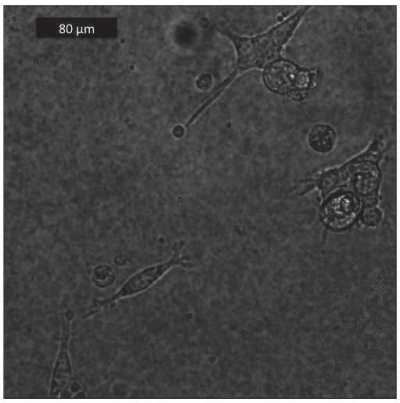
(b) $E = 1,5\ kPa$



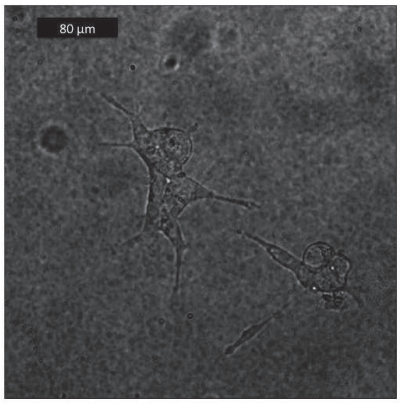
(c) $E = 2\ kPa$



(d) $E = 8,6\ kPa$



(e) $E = 13,3\ kPa$



(f) $E = 19\ kPa$

FIGURE 2.1 – Images des cellules adhérées sur des gels de différentes élastcités. Les modules élastiques E sont donnés sous l'ensemble des figures.

1.2 Présentation des résultats

1.2.1 Nombre de lamellipodes par cellule

Sur les différentes images de cellules adhérées, le nombre de lamellipodes varie selon la rigidité des gels. La géométrie de la cellule n'est donc pas toujours une sphère mais peut être soit un ovale si deux lamellipodes se sont formés, ou encore une étoile si plus de deux lamellipodes se sont formés. Pour quantifier cette observation, chaque série d'image associée à un module élastique de gel a été analysée en comptant le nombre de lamellipodes existant sur chaque cellule. La figure 2.2 représente les résultats statistiques obtenus sur les séries d'image enregistrées pour chaque module élastique de gel étudié. Il apparaît que le nombre

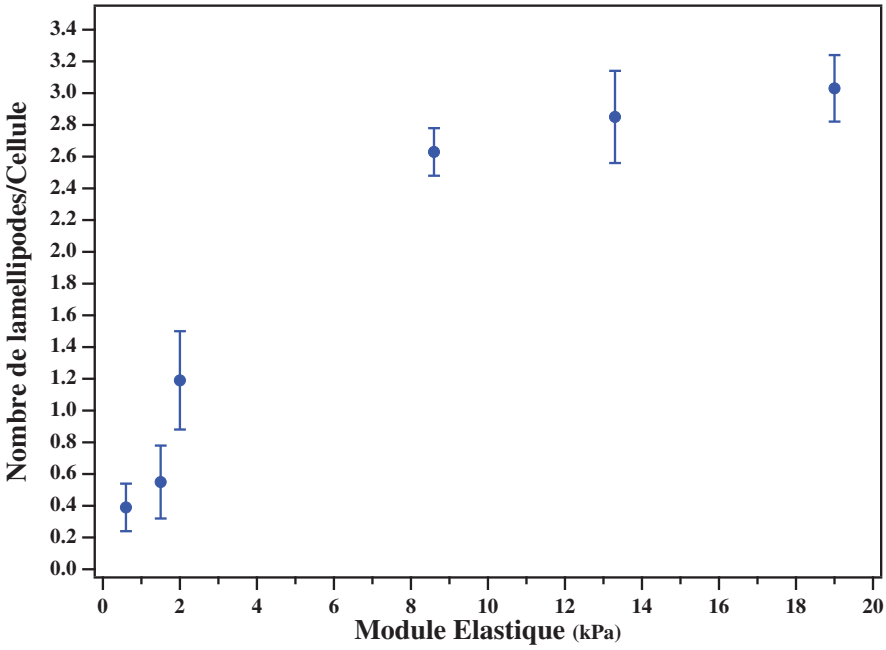


FIGURE 2.2 – Évolution du nombre de lamellipodes par cellule en fonction du module élastique du gel support. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance des mesures et sont calculées à partir d'un degré de confiance à 95 % et des écart-types obtenus pour chaque série de mesure.

de lamellipodes par cellule augmente avec la rigidité du substrat jusqu'à atteindre un plateau pour des valeurs de module élastique élevée ($E > 12\ kPa$). Cette saturation est discutée plus tard dans ce chapitre.

1.2.2 Aire des cellules

Une grandeur déjà utilisée dans la littérature[122,124,125] pour caractériser l'adhésion des cellules sur des substrats mous est l'aire de la cellule en contact avec la surface du gel aussi appelé étalement cellulaire. L'analyse des différentes série d'image est alors un peu plus précise car l'aire des cellules est déterminée à partir d'un calcul réel basé sur les coordonées spatiale des points de la surface de la cellule. En sélectionnant certains points stratégiques du contour de la cellule, il est possible de calculer l'aire de la figure géométrique schématisant la forme réelle de la cellule. Le logiciel de traitement d'image IGOR PRO nous permet de réaliser ces analyses et d'obtenir la valeur en pixel de la surface de la cellule. La connaissance de la taille d'un pixel pour la caméra utilisé lors des enregistrements ainsi que du grossissement du microscope permet d'exprimer la surface des cellules observées en unité métrique : μm^2. La figure 2.3 représente l'évolution de l'aire des cellules en fonction du module élastique du gel. Les valeurs numériques pour les aires de cellules correspondent aux valeurs attendues pour la taille de cette lignée cellulaire (voir tableau 2.1).

Module élastique E (kPa)	0,6	1,5	2	8,6	13,3	19
Aire moyenne (μm^2)	464,3	658,1	628,9	922,5	1160,0	1238,4

TABLE 2.1 – Valeurs numériques des surfaces de contact des cellules adhérées sur des gels mous ayant différents modules élastiques

D'après les résultats, l'étalement cellulaire augmente avec la rigidité des substrats comme cela est décrit dans la littérature.

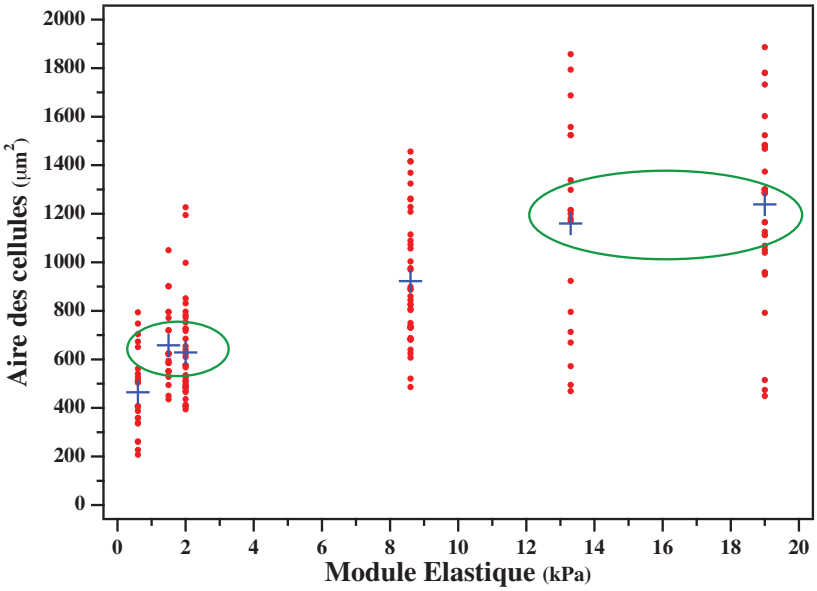


FIGURE 2.3 – Évolution de l'aire des cellules en fonction du module élastique du gel support. Les croix bleues représentent les moyennes calculées à partir de l'échantillon de cellules sélectionnées. Les ronds rouges correspondent aux valeurs de chacune des cellules de l'échantillon choisies pour les différentes valeurs de module élastique des gels support. D'après les test statistiques résumés dans le tableau 2.2, les moyennes entourées pour des ovales verts ne peuvent pas être différenciées avec ces mesures expérimentales.

2 Analyse et discussion

2.1 Traitement statistique des résultats expérimentaux

2.1.1 Grandeurs caractéristiques

Nous avons réalisé différentes séries de mesures qui nous ont permis d'obtenir les valeurs moyennes des aires de cellules données dans le tableau 2.1. Pour chaque série de mesures, un certain nombre de cellules est compté pour obtenir cette moyenne. En statistique, le nombre de mesures n prises en compte est crucial, ainsi plus ce nombre n est grand, plus les grandeurs calculées sont représentatives du système étudié. Par exemple, dans nos expériences, la quatrième série de mesures faites sur un gel d'élasticité $E = 8,6\ kPa$ comporte n_4 mesures

d'aires $a_i^{(n_4)}$ de cellules et la meilleure estimation de la moyenne de cette série $\overline{A_4}$ est :

$$\overline{A_4} = \frac{\sum_{i=1}^{n_4} a_i^{(n_4)}}{n_4} \tag{2.1}$$

La dispersion de l'ensemble des mesures de cette série autour de cette valeur moyenne est donnée par l'écart-type σ_4 dont la meilleure estimation pour nos mesures est :

$$\sigma_4 = t_S \times \sqrt{\frac{1}{n_4 - 1} \sum_{i=1}^{n_4} (a_i^{(n_4)} - \overline{A_4})^2} \tag{2.2}$$

avec t_S le facteur de Student permettant une meilleure estimation de l'écart-type réel lorsque le nombre de mesure n_4 n'est pas suffisant ($n_4 < 30$). Ce facteur correctif dépend du nombre de mesures de la série et du degré de confiance accordé par l'expérimentateur à ses mesures. En général, le facteur de confiance α, c'est à dire la probabilité que l'on considère la mesure correcte et qu'elle ne le soit en réalité pas, est choisi à $\alpha = 0,05$ (soit 5% d'erreur). La valeur numérique du facteur de Student t_S est donné en fonction de n et α dans des tables statistiques. Dans notre cas, une valeur de facteur de Student $t_S = 2$ correpond en bonne approximation à l'ensemble de nos mesures ($n \approx 20$).

Maintenant, supposons que la répartition des mesures pour chacune des séries réalisées suit une loi normale (gaussienne) autour des moyennes calculées (voir figure 2.4). La courbe est centrée sur la valeur moyenne donnée par l'équation 2.1 et sa largeur dépend de l'écart-type donné par l'équation 2.2. L'aire sous la courbe de type Gaussienne comprise dans l'intervalle $[-2\sigma, +2\sigma]$ est égale à 95% de la totalité de l'aire sous la courbe. D'après le facteur de confiance $\alpha = 0,05$ décidé par l'expérimentateur, toutes les valeurs d'aires de cellules comprises dans ce dernier intervalle sont considérées comme juste par rapport à la valeur moyenne donnée. En revanche les aires de cellules se trouvant dans la partie hors de cette intervalle ne font apparemment pas partie de la population étudiées et correspondent au 5% d'erreur admise par l'expérimentateur.

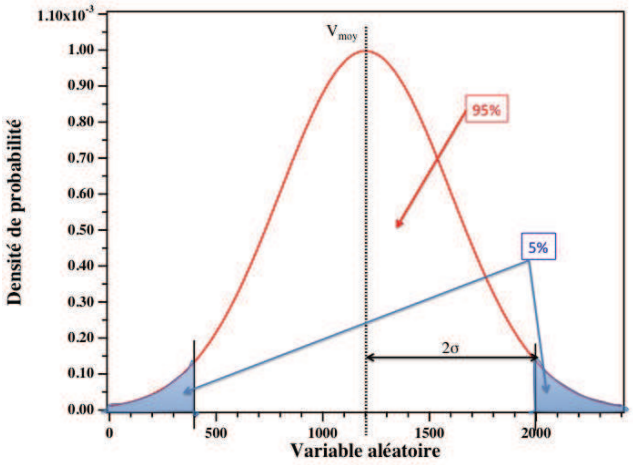


FIGURE 2.4 – Courbe gaussienne représentant la densité de probabilité d'une variable aléatoire en fonction de sa valeur absolue. Cette représentation est caractérisée par un écart-type de $\sigma = 400$, une valeur moyenne $V_{moy} = 1200$ et un facteur de confiance à 5 % nous donnant pour nos mesures ($n \approx 20$) un facteur de Student de $t_S = 2$. Ainsi, l'aire sous la courbe dans l'intervalle $[-2\sigma, +2\sigma]$ correspond à 95 % de l'aire sous la courbe totale. Les 5 % restant se partagent les deux extrémités de la courbe et correspondent à l'erreur admise par l'expérimentateur, c'est à dire considérer que ces mesures ne font pas parties de cet échantillon.

La distribution des aires obtenues pour la série de mesures effectuées sur le gel de module élastique 19 kPa ainsi que son ajustement par une Gaussienne sont donnés dans la figure 2.5. Nous considérons donc dans la suite que toutes les séries de mesure suivent une loi de cette forme.

2.1.2 Comparaison des moyennes de deux séries de mesures

Pour chacun des modules élastiques étudiés, une mesure de l'aire de plus de 20 cellules a été réalisée. Pour déterminer si les valeurs moyennes calculées sont bien différentes les unes des autres il est nécessaire de comparer ces valeurs moyennes en prenant en compte les effets statistiques. En effet, l'existence d'un écart-type sur chaque moyenne calculée entraîne des erreurs sur la différenciation ou non de deux moyennes. Par exemple, en considérant une répartition Gaussienne (loi normale) autour des différentes valeurs moyennes calculées à partir d'une série quelconque de mesure (voir figure 2.6), il semble assez intuitif que deux valeurs sont bien différentes si les répartitions de l'ensemble de leurs mesures associées ne

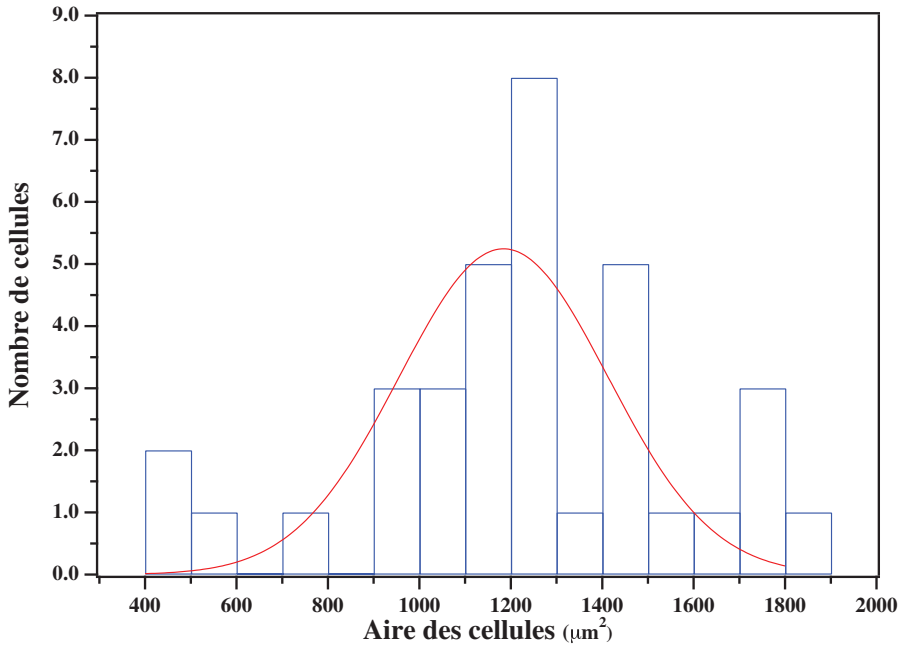


FIGURE 2.5 – Histogramme (en bleu) du nombre de cellules adhérées sur un gel de 19 kPa en fonction de l'aire de contact des cellules avec le support. La répartition suit une loi normale (Gaussienne en rouge) centrée sur la valeur moyenne donnée dans le tableau 2.1.

sont pas superposées. Dans le cas où deux moyennes sont suffisamment écartées en valeur et que leurs répartitions ne sont pas trop étalées alors on peut considérer ces deux moyennes comme différentes (par exemple $V_2 \neq V_3$ sur la figure 2.6). En revanche, si deux moyennes proches en valeur ont leurs répartitions qui se chevauchent grandement alors la différence entre ces deux moyennes n'est plus triviale (par exemple V_1 et V_2 sur figure 2.6). Il est donc nécessaire de vérifier si pour nos mesures, les moyennes calculées peuvent être différenciées avant de pouvoir discuter toute sorte d'évolution de ces grandeurs dans nos expériences.

La comparaison quantitative des deux moyennes issues de deux séries de mesures différentes peut être réalisée au travers d'un test statistique paramétrique appelé test T de Student. Pour réaliser ce test il est nécessaire que les répartitions de chaque série de mesures suivent une loi normale (Gaussienne) et de supposer que les écart-types pour chaque série sont similaires. Pour nos tests nous choisissons de comparer une série de mesures avec toutes les valeurs moyennes des autres séries mesurées. Comme tous les tests statistiques,

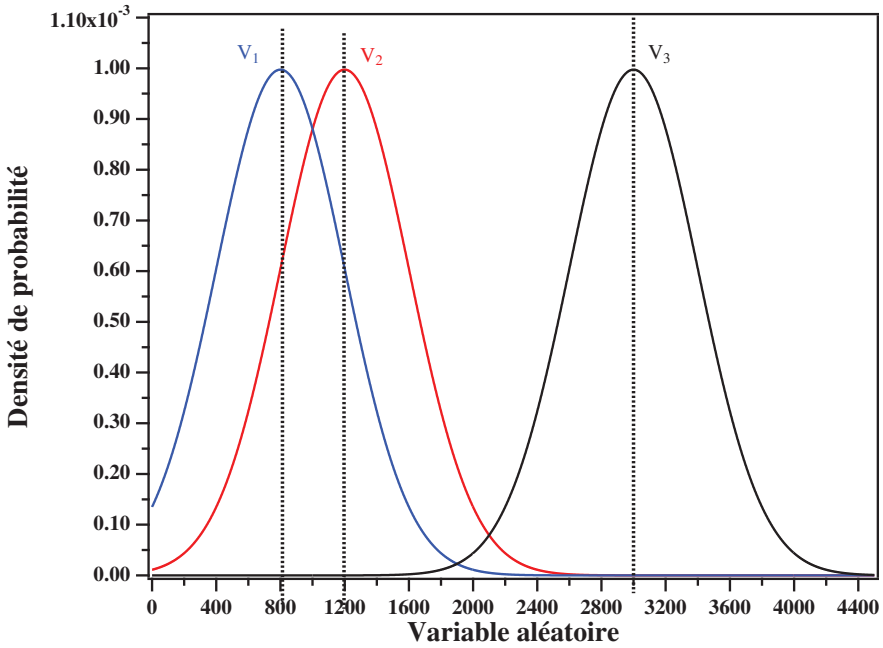


FIGURE 2.6 – Représentation Gaussienne de plusieurs valeurs moyennes calculées (V_1, V_2 et V_3) pour des séries de mesures quelconque. La courbe en noire peut facilement être différenciée des autres car le recouvrement entre les courbes est faible, ainsi la valeur $V_3 \neq V_2$ et V_1. En revanche, le recouvrement des courbes rouge et bleue ne permet pas de dire que V_1 est réellement différent de V_2.

les conclusions faites ne sont pas des affirmations mais seulement des probabilités données avec un certain pourcentage d'erreur. Comme énoncé précédemment, le pourcentage d'erreur choisi pour nos expériences est de 5 %.

Ainsi, prenons la quatrième série de mesures de l'aire des cellules adhérées sur le gel à $8,6$ kPa d'élasticité et comparons cet ensemble de données à la valeur moyenne de la cinquième série de mesure ($\overline{A_5} = 1160,0$ μm^2) pour une élasticité de $13,3$ kPa). Le test T de Student consiste à vérifier la véracité de deux hypothèses :

1 - Hypothèse nulle : H_0, les deux moyennes sont égales $\overline{A_4} = \overline{A_5}$

2 - Hypothèse alternative : H_1, les deux moyennes sont différentes $\overline{A_4} \neq \overline{A_5}$

Pour cela il faut définir une nouvelle variable aléatoire prenant en compte les paramètres des deux séries de mesures :

$$T_i = \frac{\overline{A_5} - a_i^{(n_4)}}{\sigma_4} \tag{2.3}$$

Cette nouvelle variable aléatoire suit une loi centrée réduite sur 0 sous les conditions de l'hypothèse nulle (H_0) où les deux moyennes sont supposées identiques (voir figure 2.7). L'écart-type σ_{T_i} de cette série $\{T_i\}$ est égal à celui de la quatrième série de mesures σ_4 défini par l'équation 2.2. Toutes les valeurs de T_i comprises dans un intervalle $[-2\sigma_4, +2\sigma_4]$ ont 95 % de chance de satisfaire à H_0 (voir figure 2.7). Ce domaine constitue le domaine d'acceptation de l'hypothèse nulle. Ainsi, si la valeur observée :

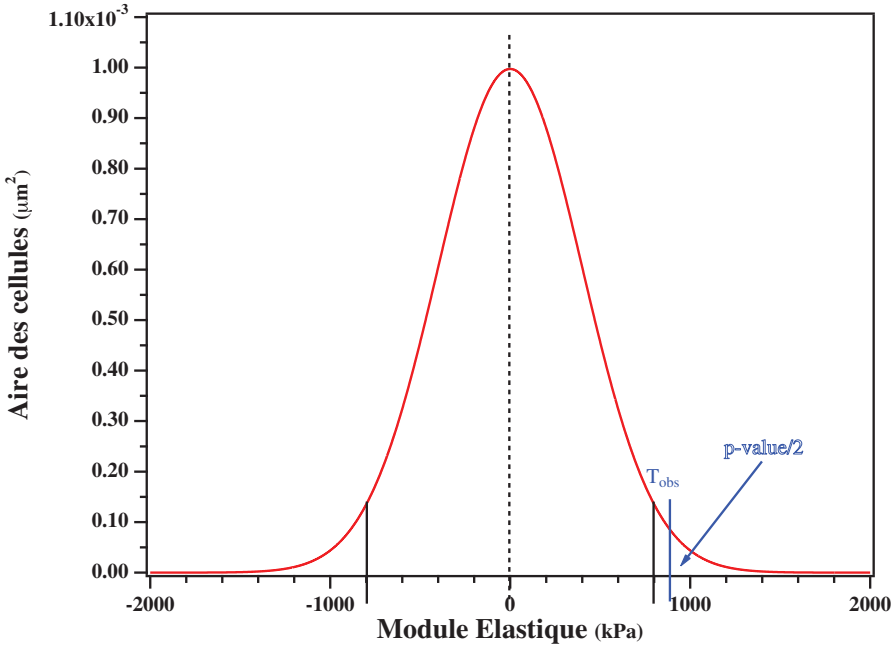


FIGURE 2.7 – Représentation de la variable aléatoire T_i (équation 2.3) suivant une loi centrée réduite sous les conditions de H_0. Si la valeur de T_{obs} ne se trouve pas dans l'intervalle $[-2\sigma, +2\sigma]$ alors l'hypothèse nulle est rejetée avec une probabilité inférieure à 5 % de faire une erreur. De plus, la valeur de T_{obs} calculée délimite l'aire permettant d'obtenir la "p-value", c'est à dire l'erreur minimale pouvant être faite de rejeter H_0 à tort.

$$T_{obs} = \frac{\overline{A_5} - \overline{A_4}}{\sigma_4} \tag{2.4}$$

calculée à partir des valeurs moyennes obtenues pour nos mesures n'est pas comprise dans cet intervalle, le résultat du test est que l'hypothèse nulle est rejetée avec 5 % de chance qu'en réalité les deux moyennes soient effectivement identiques. Pour obtenir une valeur quantitative permettant de mieux caractériser la différence existant entre les deux valeurs moyennes il faut

calculer la "p-value". Cette valeur correspond à la valeur minimale de l'erreur faite lors de la comparaison des deux moyennes, c'est à dire à la valeur de la somme des aires sous la courbe représentant la répartition de T_i dans les intervalles : $]-\infty, -T_{obs}]$ et $[+T_{obs}, +\infty[$. Ainsi, plus cette "p-value" est faible, plus l'erreur sur la conclusion du rejet de l'hypothèse nulle est faible.

Les tests sont réalisés par l'intermédiaire du logiciel de traitement des données IGOR PRO et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.2.

E (kPa)	0,6	1,5	2	8,6	13,3	19
0,6	-	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$
1,5	$P < 0,0001$	-	$P = 0,375$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$
2	$P < 0,0001$	$P = 0,394$	-	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$
8,6	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	-	$P = 0,024$	$P < 0,0001$
13,3	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	-	$P = 0,192$
19	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P = 0,423$	-

TABLE 2.2 – Valeurs numériques de la "p-value" obtenues à partir des tests statistiques (test T de Student) réalisés sur les moyennes des aires de cellules des échantillons étudiés. Les moyennes calculées pour les modules élastiques de $1,5$ et 2 kPa et celles pour $13,3$ et 19 kPa ne peuvent donc pas être considérées comme différentes car la $p-value$ est supérieure à 5% (cases rouges dans le tableau).

Ainsi la plupart des moyennes des différentes séries de mesure de l'aire des cellules peuvent être considérées comme différentes mis à part les populations des cellules cultivées sur les gels de module élastique trop proche pour les différencier : celles de $1,5$ et 2 kPa ; ou bien les populations de cellules où il apparaît une saturation et qui sont caractérisées par la même valeur moyenne : celles de $13,3$ et 19 kPa. Pour la suite nous ne prenons plus en compte les données expérimentales du gel à $1,5$ kPa afin de ne pas avoir une redondance ou une interférence trop élevée avec les résultats du gel à 2 kPa.

2.2 Analyse des résultats

L'augmentation du nombre de lamellipodes par cellule avec la dureté du substrat support n'est pas une mesure que l'on retrouve dans la littérature. Peut-être que le comptage est

trop subjectif pour constituer une grandeur plausible ? Cependant, les résultats obtenus vont dans le même sens que le comportement connu des cellules : plus le substrat est dur, plus les cellules tendent à former des nouveaux points focaux par l'intermédiaire de lamellipodes. L'augmentation de l'étalement cellulaire A avec la dureté du substrat traduit une amélioration de l'adhésion cellulaire. Dans la littérature, plusieurs travaux sur des lignées cellulaires diverses montrent le même type de comportement. Les lignées cellulaires étudiées varient des cellules endothéliales vasculaires[126] aux fibroblastes de souris[122,124] en passant par les cellules musculaires de rat.[125] De plus, les travaux de Discher[130] sur des cellules musculaires de rat montrent que l'évolution de l'étalement cellulaire en fonction de la rigidité du substrat suit une loi de type puissance :

$$A = b \times E^n \tag{2.5}$$

avec A l'aire de la cellule adhérée en contact avec le substrat ou aussi appelé étalement cellulaire, b une constante, E le module élastique du gel et n l'exposant de la loi puissance. Pour les cellules musculaires de rat adhérées sur des substrats de polyacrylamide allant de 2 à 60 kPa les résultats de l'ajustement par l'équation 2.5 de l'évolution de l'étalement cellulaire en fonction de la rigidité de ce dernier donne des valeurs de $n = 0,37$ et $b = 5500$.

Pour nos résultats sur les cellules SW480, l'ajustement de l'évolution de l'étalement cellulaire en fonction de la rigidité du substrat donne des valeurs de $n = 0,29$ et $b = 526$ (voir figure 2.8). Pour obtenir ces valeurs nous avons tracer le graphe log-log associé et utilisé l'équation linéaire suivante, issue de l'équation 2.5, pour l'ajustement :

$$\log A = \log b + n \times \log E \tag{2.6}$$

Ces résultats sont cohérents avec les résultats connus dans la littérature : la valeur de n est tout à fait similaire ce qui tend à montrer que le comportement des cellules SW480 et des cellules musculaires de rat est proche en ce qui concerne l'évolution de leur étalement en fonction de la rigidité de leur substrat.

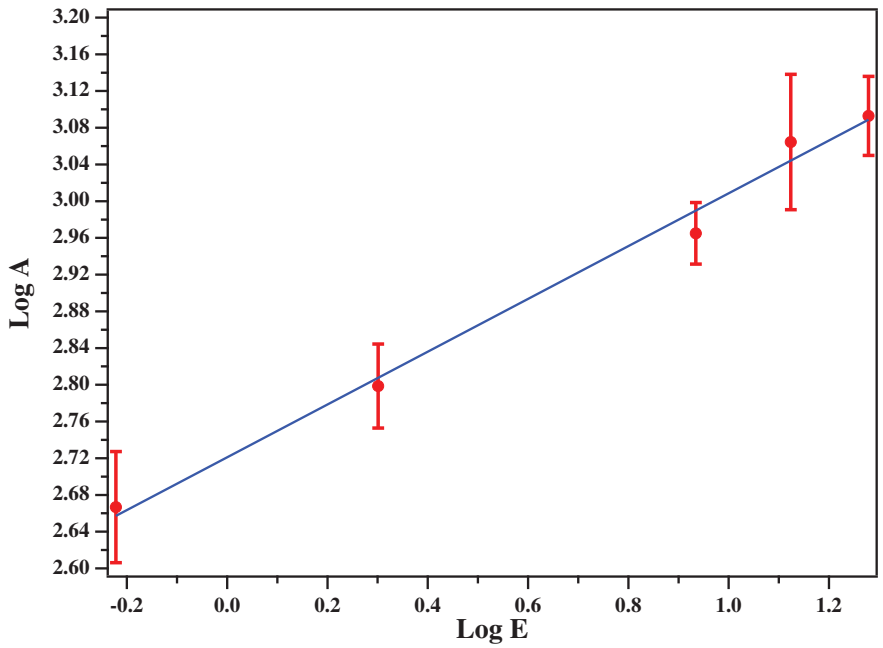


FIGURE 2.8 – Tracé Log-Log de l'évolution de l'aire de contact des cellules en fonction de la rigidité du substrat et ajustement (trait bleu) avec l'équation 2.2. Les points expérimentaux (points rouges) utilisés sont les moyennes calculées à partir des échantillons de mesure pour chaque valeur d'élasticité. Les barres d'erreurs sont déterminés en utilisant un coefficient de Student de $t_S = 2$ pour le nombre n de mesure réalisées et des écart-types déterminer avec la relation 2.2 : $A \pm t_S * \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$. L'ajustement donne des valeurs de $n = 0,29 \pm 0,02$ et $b = 526 \pm 1$. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance des mesures pour un facteur de confiance à 95%.

2.3 Discussion

Les résultats expérimentaux montrent une augmentation de l'adhésion cellulaire, caractérisée soit par le nombre de lamellipodes par cellule soit par l'étalement des cellules A, en fonction de la rigidité du gel support E. Cette évolution suit une loi de puissance de la forme :

$$A \propto E^{1/3} \tag{2.7}$$

caractérisée notamment pour l'étalement cellulaire A sur une gamme restreinte de module élastique des gels E dans nos mesures. Ce comportement a déjà été observé pour d'autres lignées cellulaires et l'origine de ce phénomène est la préférence des cellules pour les sub-

strats durs (phénomène de durotaxie). En effet, une cellule crée des micro extensions de son cytosquelette, des spicules, pour sonder la zone voisine du substrat où elle est adhérée. Si cette zone constitue un environnement favorable alors la cellule répond mécaniquement à ce signal en formant un nouveau point focal d'adhésion au travers d'un lamellipode (voir figure 2.9) ce qui a pour effet d'augmenter son étalement. Ainsi, plus l'environnement de la

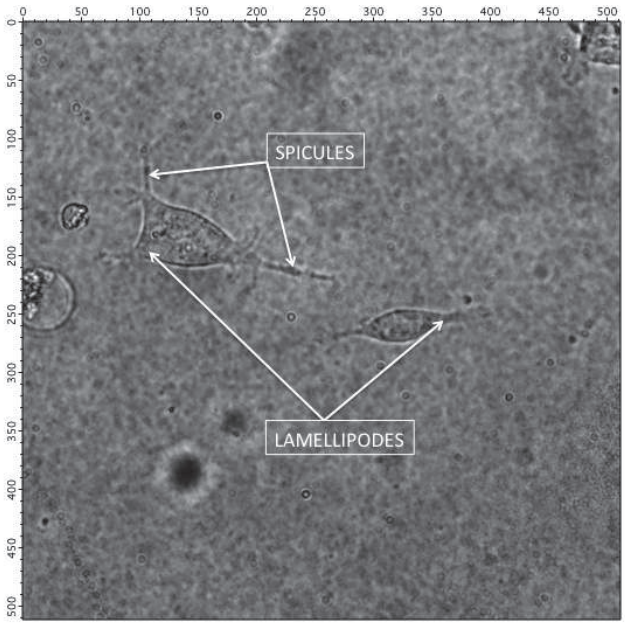


FIGURE 2.9 – Image montrant la différence entre un lamellipode et un spicule.

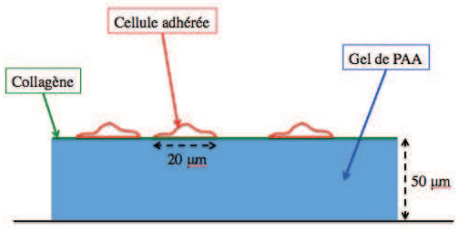
cellule est optimal c'est à dire rigide, plus l'adhésion est importante. Ceci justifie l'augmentation croissante de l'adhésion en fonction de l'élasticité du substrat mais n'explique pas la loi d'évolution de l'aire en fonction de la rigidité, ni la valeur $\frac{1}{3}$ de son exposant. D'après la littérature, on retrouve un tel facteur pour l'évolution de la viscosité du cytosquelette en fonction du cisaillement effectué sur une cellule.[145] Ce résultat pourrait laisser penser que ce facteur provient des propriétés viscoélastiques du cytosquelette des cellules. Cependant, nous ne disposons pas d'argument clair pour relier l'étalement cellulaire aux propriétés micro-rhéologiques du cytosquelette. Au contraire, il est raisonnable de faire l'hypothèse que c'est l'énergie d'adhésion de la cellule sur le substrat qui contrôle réellement l'étalement cellulaire et doit donc dépendre de l'élasticité du gel support.

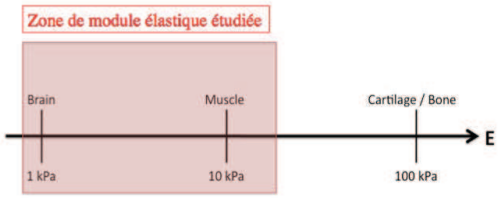
La relation de puissance étudiée jusqu'à présent n'est cependant pas capable de traduire le comportement des cellules adhérées sur une gamme plus large de module élastique des gels support. En effet, l'étalement cellulaire A ne peut pas augmenter indéfiniment lorsque le module élastique E devient très grand. Une limite biologique due à la physiologie de la cellule oblige cette étalement à atteindre une valeur limite correspondant à son étalement maximal, même si l'élasticité du support continue d'augmenter. Ainsi, une cellule adhérée sur un gel très rigide ou sur du verre aura la même morphologie. Pour observer cette saturation, il faut réaliser de nouvelles séries de mesure sur des gels plus rigides afin de voir apparaître un palier dans la représentation Log-Log de la figure 2.8. Donc, à partir d'une valeur limite E_∞, l'étalement cellulaire est maximal et Discher propose une explication pour justifier le "choix" de cette valeur par le système. La cellule synthétise des protéines et autres macromolécules qui forment un microenvironnement d'une certaine élasticité autour de cette dernière. Les auteurs suggèrent alors que l'élasticité de ce microenvironnement correspond à la valeur d'élasticité limite E_∞ uniquement ressentie par la cellule lorsque $E_\infty < E_{substrat}$ c'est à dire dans le domaine de saturation. Pour le domaine où $E_\infty > E_{substrat}$, c'est la relation 2.7 qui dirige l'étalement cellulaire.

Ces résultats nous permettent de valider la fiabilité de l'installation mise en place pour l'observation cellulaire. Toutefois des mesures complémentaires sur un plus grand nombre de cellules et d'autres valeurs d'élasticité de gel sont nécessaires pour améliorer l'analyse statistique et mieux définir le domaine de saturation.

En résumé

Dispositif expérimental

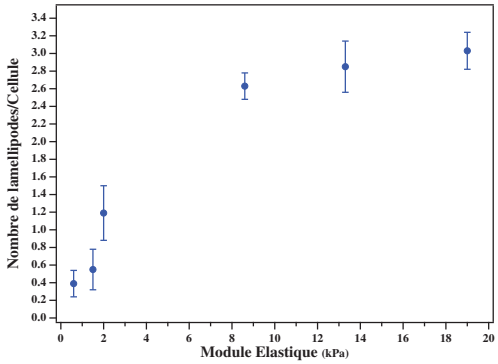




Résultats préliminaires :

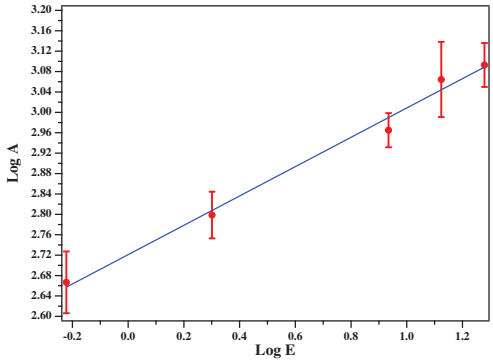
Adhésion cellulaire en fonction de l'élasticité du substrat

Nombre de lamellipodes par cellule



Le nombre de lamellipodes par cellule augmente avec le module élastique du gel support.

Aire des cellules



L'étalement cellulaire augmente en fonction du module élastique du gel support selon une loi de puissance :

$$A \propto E^{1/3}$$

Quatrième partie

Conclusions et perspectives

Interactions RDC-ADN

Les manipulations réalisées dans ces travaux ont permis de mettre en évidence la présence de deux modes d'association entre les complexes du ruthénium RDC et la macromolécule d'ADN. Ces domaines dépendent principalement du rapport entre les concentrations de paires de bases d'ADN et de complexe. Les résultats obtenus en spectrophotométrie UV-visible et en dichroïsme circulaire sont en accord et le modèle proposé permet d'obtenir des valeurs de constante d'affinité très élevées $K_a \approx 10^4\ M^{-1}$ à $10^4\ M^{-1}$ dans les deux modes d'associations. De plus, pour l'ensemble des complexes étudiés, le premier mode est identifié comme étant une association par intercalation tandis que le deuxième mode est issu en majorité par des interactions de type électrostatiques.

En ce qui concerne ces mesures, des manipulations complémentaires sont envisagées afin de poursuivre l'étude de ces systèmes :

— Réaliser d'autres mesures de spectrophotométrie d'absorption à d'autres concentration en sel afin d'avoir plusieurs valeurs expérimentales à exploiter et mieux caractériser le second mode d'association

— Réaliser des manipulations de dichroïsme circulaire sur des solutions de complexe énantiomériquement pures afin d'étudier la stéréosélectivité de l'association

— Caractériser plus précisément la structure de l'association par intercalation en utilisant d'autres méthodes telles que la spectroscopie RMN, RAMAN, ou d'autres techniques de mesure optique.

Adhésion des cellules cancéreuses

Pour cette partie, les travaux de cette thèse ne constituaient que des travaux préliminaires afin de mettre en place un dispositif d'observation cellulaire viable. Le plus gros du travail reste à faire avec la poursuite des manipulations sur l'aire de contact des cellules en fonction de l'élasticité du gel support dont les premiers résultats présentés dans ce manuscrit semblent prometteurs. En effet, comme d'autres lignées cellulaires, les cellules SW480 ont une surface de contact, c'est à dire une adhésion, qui augmente en fonction de l'élasticité de leur substrat.

Nous avons obtenu que la surface de contact augmente avec l'élasticité du gel selon une loi de puissance. L'origine de cette loi n'est pas comprise. Des mesures sur des systèmes modèles (bille déformable adhérent sur un substrat mou) seront effectuées pour établir s'il existe une origine physique simple à ce comportement.

De plus, le laboratoire souhaite mettre en place des manipulations de mesure de champ de force par la technique des microbilles fluorescentes dispersées dans la matrice support. Les gels utilisés pourront être des gels à deux dimensions, comme les manipulations présentées ici, mais aussi des hydrogels à trois dimensions où les cellules sont cultivées dans une matrice en volume (matrigel). Afin de réaliser des enregistrements des déplacements des billes avec une forte sensibilité à trois dimensions, un microscope confocal sera utilisé pour enregistrer les champs de déplacements et créer les champs de force associés. Biologiquement, ce sont les déplacements, la motilité des cellules cancéreuses placées dans des gradients de concentration de chemoattractant qui seront particulièrement étudiés. Le cadre général de ces mesures est l'étude de la formation des métastases, de l'invasion cellulaire et de l'action de molécules chimiques pouvant modifier ces propriétés (agents anti-métastatiques).

Cinquième partie

Protocoles expérimentaux

Chapitre 1

Interactions moléculaires

1 Synthèse des RDC

1.1 La cycloruthénation : originalité des composés RDC

Contrairement aux complexes du ruthénium formés uniquement avec des ligands polypyridiques et donc ne contenant que des liaisons de type coordination Ru-N, les RDC possédent une liaison covalente Ru-C leur conférant le caractère des complexes organométalliques. Cette liaison est formée lors d'une étape dite de cycloruthénation au cours de laquelle une liaison C-H doit être rompue. La rupture de ce type de liaison, peu réactive, doit être activée. Dans ce cas précis, la molécule permettant de former les RDC étudiés est la phénylpyridine où la liaison C-H rompue est celle d'un carbone contenu dans un cycle aromatique. La coordination dans un premier temps de l'azote du ligand phenyl-pyridine assure une proximité de la liaison C-H et du ruthénium ce qui permet une activation de cette liaison par le centre métallique qui joue le rôle d'acide de Lewis (voir figure 1.1). L'ajout dans un second temps d'une base permet la déprotonation et la formation de la liaison Ru-C. Cette méthode

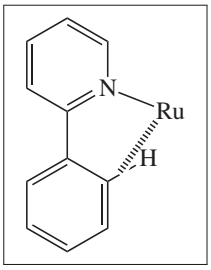


FIGURE 1.1 – Activation de la liaison C-H par le ruthénium lors de la cycloruthénation.

est appelée douce car elle ne nécessite pas l'utilisation d'un large excès de base pour réaliser l'étape de cycloruthénation (référence Organometallics S. Fernandez 1999).

1.2 $[Ru(\eta^6\text{- }C_6H_6)Cl_2]_2$

La synthèse de ce complexe suit la procédure décrite dans la littérature.[146] A partir du trichlorure de ruthenium (III) $RuCl_3 \cdot 3\,H_2O$, le dimère $[Ru(\eta^6\text{- }C_6H_6)Cl_2]_2$ est formé en suivant la procédure décrite dans la littérature.[146] $1,7\ g$ $(3,5.10^{-3}\ mol)$ de $RuCl_3 \cdot 3\,H_2O$ et 6 mL de 1,3-cyclohexadiène $(6,3.10^{-2}\ mol)$ sont dissous dans 100 mL d'une solution d'éthanol à 90%. La solution rouge est agitée pendant 3 heures à 45°C et après refroidissement, le solide rouge recueilli est lavé à l'éthanol puis séché sous vide. Le rendement de la synthèse est de 85%.

1.3 $[Ru(PhPy)(NCMe)_4]^+(PF_6)^-$: RDC8

Cette procédure est décrite dans la littérature.[147] $0,1\ g$ $(0,2\ mmol)$ de dimère, $0,057\ mL$ $(0,4\ mmol)$ de 2-phénylpyridine, $0,015\ g$ $(0,4\ mmol)$ de NaOH et $0,146\ g$ $(0,8\ mmol)$ de KPF_6 sont dissous dans environ 5 mL de CH_3CN et agités pendant 14 heures à 45°C. Le solide jaune résultant est filtré et purifié sur alumine Al_2O_3 en utilisant un mélange CH_3CN/CH_2Cl_2 à 3% comme éluant. La fraction jaune résultante est collectée puis concentrée et séchée sous vide. Le rendement de de cette synthèse est de 40%.

1.4 $[Ru(PhPy)(Phen)_2]^+(PF_6^-)$: RDC37

La synthèse de ce complexe suit la procédure décrite dans la littérature.[148] $0,04\ g$ $(0,0709\ mmol)$ de RDC8 est porté à reflux avec $0,068\ g$ $(0,37\ mmol)$ de phenanthroline dans environ 15 mL de méthanol pendant $2,5$ heures. La solution passe du jaune au brun-rouge. Après évaporation des $\frac{2}{3}$ du solvant, le milieu réactionnel est placé au réfrigérateur pendant toute une nuit. Les cristaux formés sont récupérés par filtration puis lavés avec du méthanol froid et enfin séchés sous vide. Le rendement de cette synthèse dépasse 90%.

1.5 $[Ru(NO_2{-}PhPy)(Phen)_2]^+(PF_6^-)$: RDC40

Cette synthèse suit la procédure développée dans la littérature[?] pour la synthèse du composé similaire ayant un triflate comme contre-anion ($^-$OTf). A une solution violette foncée de RDC37 (410 mg ; $0,54$ $mmol$) faite dans environ 40 mL de CH_2Cl_2 sont ajoutés $0,92$ mg ($0,55$ $mmol$) d'$AgNO_3$ et $62,5$ μL ($0,54$ $mmol$) de PhCOCl. La solution est agitée à température ambiante pendant 18 heures. Une chromatographie sur couche mince (CCM) révèle une seule tâche rouge qui est collectée par chromatographie sur colonne d'alumine en utilisant du CH_3CN comme éluant. Les solvants sont évaporés sous vide et la poudre résultante (RDC40) est dissoute dans un minimum de CH_3CN (environ 10 mL). Après l'addition d'Et_2O (environ 100 mL), un solide rouge-noir précipite. Le rendement final de la réaction est de 95%. Ce composé n'étant pas encore paru dans une publication, nous donnons le spectre RMN du proton associé. Il présente les déplacements chimiques suivants :

^1H RMN (500 MHz, CD_3CN) : δ = 8.64 (d, 1H, $^4J_{HH}$=2.3), 8.52 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=8.2, $^4J_{HH}$=1.4), 8.44 (dd, 2H, $^3J_{HH}$=8.1, $^4J_{HH}$=1.1), 8.38 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=8.2, $^4J_{HH}$=1.2), 8.33 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=5.2, $^4J_{HH}$=1.2), 8.24 (d, 1H, $^3J_{HH}$=8.4), 8.18 (m, 1H), 8.16 (d, 2H, $^3J_{HH}$=4.0, 2H), 8.12 (d, 2H, $^4J_{HH}$=1.1, 2H), 8.06 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=5.0, $^4J_{HH}$=1.4), 7.86 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=5.2, $^4J_{HH}$=1.1), 7.75 (t, 1H, $^3J_{HH}$=7.8), 7.66-7.62 (m, 3H), 7.60 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=8.2, $^4J_{HH}$=5.3), 7.48 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=8.4, $^4J_{HH}$=2.4), 7.45 (dd, 1H, $^3J_{HH}$=8.2, $^4J_{HH}$=5.5), 6.94 (ddd, 1H, $^3J_{HH}$=7.2, $^3J_{HH}$=5.6, $^4J_{HH}$=1.2), 6.64 (d, 1H, $^3J_{HH}$=8.4).

Ces caractéristiques correspondent au complexe RDC40 mais avec un contre anion PF_6^-.

La synthèse de ces composés peut se résumer par la procédure suivante :

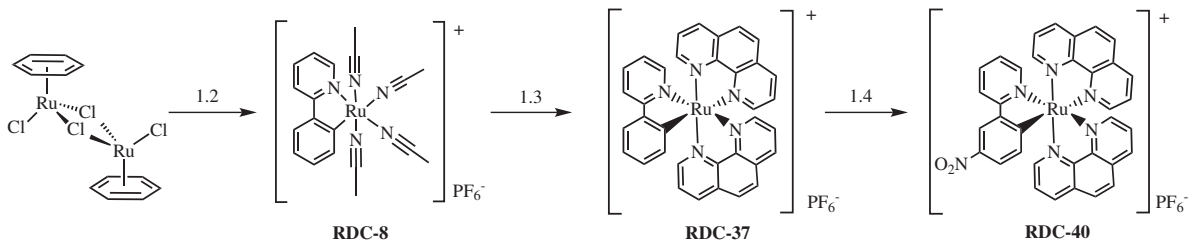


FIGURE 1.2 – Schéma des synthèses avec les étapes associées aux paragraphes décrivant précisément les protocoles expérimentaux.

1.6 Obtention des composés chlorés : RDC37Cl et RDC40Cl

Les composés avec un contre-anion PF_6^- présentent une solubilité dans l'eau assez faible. Pour augmenter cette solubilité, les composés chlorés équivalents sont produits à partir des complexes précédents. Pour cela, une résine échangeuse d'anion permet d'échanger le contre-anion PF_6^- par un anion Cl^-.[149,150] La résine échangeuse d'anion utilisée est une résine amberlite® IRA-400. Le protocole suivi est inspiré de celui décrit par Ryabov et al.[151] Pour activer la résine, trois lavages avec une solution d'acide chlorydrique concentrée à 4 mol/L puis trois lavages avec une solution saline (NaCl) à 4 mol/L et enfin un dernier lavage au méthanol sont réalisés. Sur une colonne remplie de 50 g de résine, environ 1 mL d'une solution d'un des complexes RDC37 ou RDC40 dans l'acétone et déposé en haut de la colonne. L'éluant utilisé est le méthanol. Le solvant de la fraction colorée recueilli en sortie de colonne est alors évaporé sous vide et le complexe sous forme chloré est obtenu. Les caractéristaions par spectroscopie IR et RMN permettent respectivement de montrer que l'anion PF_6^- n'est plus présent dans le composé et que la structure du complexe n'a pas été modifiée par ce procédé. La solubilité dans l'eau de ces nouveaux complexes chlorés notés RDC37Cl et RDC40Cl sera montrée dans la section décrivant les manipulations de spectrophotométrie d'absorption.

1.7 $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}(BF_4^-)_2$

La synthèse de ce complexe est connue depuis les années 90.[152?] La première étape de la synthèse consiste à former le composé $Ru(bpy)_2Cl_2 \cdot 2\,H_2O$[?] en dissolvant $1,56$ g ($5,96$ $mmol$) de trichlorure de ruthénium commercial ($RuCl_3 \cdot 3\,H_{20}$), $1,87$ g de bipyridine (12 $mmol$) et $1,68g$ g de LiCl ($0,4$ $mmol$) dans du diméthylformamide (DMF). La solution est portée à reflux sous agitation magnétique pendant 8h. Après que le mélange soit revenu à température ambiante, 150 mL d'acétone sont ajoutés au milieu réactionnel avant d'être refroidi à $0^{\circ}C$ pendant toute une nuit. Cette solution est alors filtrée, un filtrat rouge-violet et un solide microcristallin gris-noir sont obtenus. Les cristaux sont lavés trois fois avec des portions de 25 mL d'eau et trois fois avec des portions de 25 mL de diethyl éther puis séchés

sous aspiration. Le rendement de la réaction est de 64% $(1,99\ g)$.

La deuxième étape est la coordination du ligand dppz au complexe formé dans la première étape. Un solution de 148 mg $(0,28\ mmol)$ de $Ru(bpy)_2Cl_2 \cdot 2\,H_2O$ et de 84 mg $(0,3\ mmol)$ de dipyridophénazine dans 40 mL d'un mélange méthanol/eau (1/2, v/v) est portée à reflux pendant 4,5h. La solution rouge profond obtenue est concentrée par évaporation jusqu'à 10% puis diluée avec 20 mL d'eau, chauffée à ébullition pendant 10 minutes, refroidie dans un bain eau-glace et enfin filtrée. Le complexe est alors précipité sous forme de sel de tertafluoroborate par ajout d'une solution à 10% (20 mL) de $NaBF_4$ au filtrat précédent. Le solide est séché sous vide, redissout dans CH_3CN et ensuite purifié sur colonne d'alumine (Al_2O_3) en utilisant CH_3CN comme éluant. Le solvant de la fraction rouge collectée est évaporé. Le solide rouge obtenu est enfin recristallisé dans de l'éthanol. Le rendement de cette étape est de 80%.

La procédure de synthèse peut être résumée de la façon suivante :

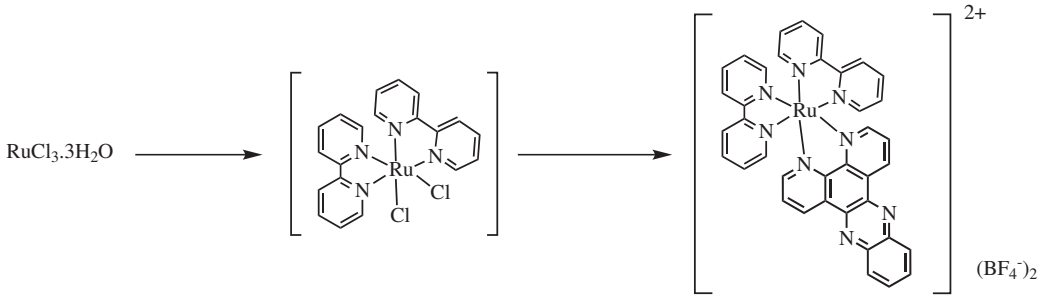


FIGURE 1.3 – Schéma de synthèse du complexe dicationique $[Ru(bpy_2(dppz)]^{2+}(BF_4^-)_2$

2 Spectrophotomètrie d'absorption UV-visible

2.1 Spectres d'absorbance

Les spectres d'absorbance sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau Uvikon XL de chez BIO-TEK Instruments et dans des cuves spéciales pour spectrosocpie d'absorption de 800 μL de volume et de 1 cm d'épaisseur optique.

Le principe de la mesure de spectrophotométrie d'absorption est de déterminer l'intensité

des longueurs d'onde absorbées par la solution étudiée. La grandeur permettant de quantifier cette propriété est l'aborbance notée A qui est défini comme le logarithme décimal du rapport de l'intensité émise par la lampe (I_0) et celle transmise après le passage du faisceau au travers de la cuve contenant la solution (I_t) :

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} \tag{1.1}$$

Le spectre obtenu représente cette valeur d'absorbance en fonction des longueurs d'onde émises par la lampe.

Pour les mesures, les complexes du ruthénium sont dilués dans de l'eau à des concentrations suffisamment faibles pour que leur absorbance dans la gamme spectrale étudiée (200 à 800 nm) ne dépasse pas une absorbance de 2 (voir chapitre de présentation des résultats expérimentaux de spectrophotométrie d'absorption). En effet, pour des valeurs d'absorbance trop élevée il est possible d'observer un phénomène de saturation à partir duquel la mesure n'est plus considérée comme valide.

De plus, ces complexes présentent une assez faible solubilité dans l'eau. Afin de déterminer la gamme de concentration pour laquelle ils sont considérés comme entièrement solubilisés dans l'eau, la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde fixe est réalisée pour plusieurs valeurs de concentration. Pour des raisons de cohérence avec les manipulations de dosage, la longueur d'onde choisie pour réaliser les mesures d'absorbance en fonction de la concentration des complexes en solution est la longueur d'onde d'absorbance maximale de la bande du domaine visible (475 nm). On considère que le complexe est entièrement solubilisé dans l'eau tant que l'évolution de cette absorbance en fonction de la concentration du complexe en solution respecte la relation linéaire de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \times l \times C \tag{1.2}$$

avec ϵ le coefficient d'absorption molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$), l la longueur de la cuve (cm) et C la

concentration de la solution (M).

La figure 1.4 montre que les complexes RDC37Cl est soluble jusqu'à 4.10^{-5} M, le RDC40Cl jusqu'à 6.10^{-5} M tandis que le composé dicationique $[\mathrm{Ru(bpy)_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$ est soluble au moins jusqu'à 1.10^{-4} M. Dans ces gammes linéaires, les coefficients d'absorption molaires des complexes sont : $\epsilon = 12550$ $M^{-1}.cm^{-1}$ pour le RDC37Cl, $\epsilon = 12260$ $M^{-1}.cm^{-1}$ pour le RDC40Cl et $\epsilon = 15725$ $M^{-1}.cm^{-1}$ pour le complexe $[\mathrm{Ru(bpy)_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$. Ces valeurs sont utilisées pour déterminer avec précision les concentrations des solutions de complexe utilisées lors des manipulations de dosages.

2.2 Dosages spectrophotométriques

Les expériences réalisées sont des dosages suivis par spectrophotométrie d'absorption UV-visible. Les complexes sont dissous dans de l'eau distillée à une concentration comprise dans la gamme linéaire de la loi de Beer-Lambert. Des petites quantités de solution d'ADN, de concentration $1,5.10^{-3}$ M en paires de bases, sont alors ajoutées pour augmenter le rapport entre les concentrations en paires de bases d'ADN ($[D]_T$) et en complexe ($[L]_T$). Le suivi du dosage se fait à la longueur d'onde d'absorbance maximale du complexe (autour de 475 nm selon le complexe). La valeur initiale, sans ADN, permet de déterminer la concentration exacte du complexe en solution en utilisant les coefficients d'absorption molaires et la relation de Beer-Lambert. Cette concentration est modifiée par dilution au cours du dosage et peut facilement être calculée à chaque ajout. Un volume de 2 μL d'une solution à $1,5.10^{-3}$ M en paires de bases d'ADN dans un volume initial de 800 μL d'une solution à 2.10^{-5} M de complexe correspond à une augmentation du rapport $\frac{[D]_T}{[L]_T}$ de $0,1$ environ. Le dosage est réalisé jusqu'à une valeur de ce rapport supérieure à 5, ce qui correspond à un volume total de solution d'ADN ajouté d'environ 100 μL. Après chaque ajout de solution d'ADN, une attente de 5 minutes est nécessaire pour laisser l'équilibre thermodynamqiue s'établir avant de réaliser la mesure de l'absorbance de la solution.

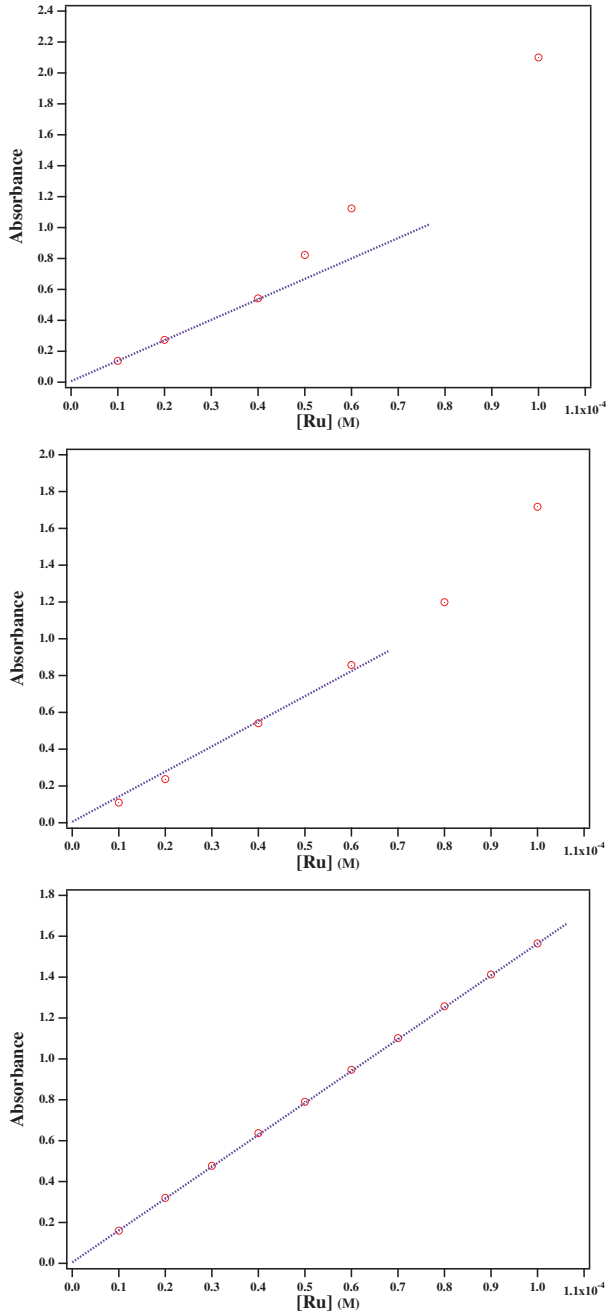


FIGURE 1.4 – Évolution de l'absorbance à $\lambda = 475nm$ en fonction de la concentration en complexe du ruthénium : RDC37Cl en haut, RDC40Cl au milieu et $[\mathrm{Ru(bpy)_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$ en bas. Le comportement linéaire respecte la loi de Beer-Lambert jusqu'à une valeur de concentration supérieur à 4.10^{-5} M pour RDC37Cl, à 6.10^{-5} M pour RDC40Cl et à 1.10^{-4} M pour $[\mathrm{Ru(bpy)_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$. Le coefficient d'absorption molaire dans la gamme linéaire est de : $\epsilon = 12260$ $M^{-1}.cm^{-1}$ pour RDC37Cl, $\epsilon = 15725$ $M^{-1}.cm^{-1}$ pour RDC40Cl et $\epsilon = 15725$ $M^{-1}.cm^{-1}$ pour $[\mathrm{Ru(bpy)_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$.

3 Dichroïsme circulaire

3.1 Spectres de dichroïsme circulaire

L'appareil de dichroïsme circulaire utilisé pour réaliser nos mesures est un J810 provenant de l'entreprise Jasco. Les spectres sont enregistrés dans des cuves spécifiques de 3 mL de volume et de 1 cm de longueur optique.

Le principe de la mesure de dichroïsme circulaire consiste à quantifier l'activité optique des molécules en solution. Pour cela, une lumière polarisée linéaire est envoyé au travers de la cuve contenant la solution étudiée. Cette lumière est constituée de la somme de deux ondes polarisées circulaires : une polarisée gauche et une polarisée droite. L'absorbance est donc divisée en deux termes : l'absorbance gauche (A_G) et l'absorbance droite (A_D). En utilisant la relation de Beer-Lambert, la différence entre ces deux grandeurs peut s'exprimer en fonction de la différence de coefficient d'absorption molaire gauche (ϵ_G) et droit (ϵ_D) aussi appelé dichroïsme circulaire ($\Delta\epsilon$), de la concentration de la solution (C) et de la longueur de la cuve (l) :

$$\begin{aligned} \Delta A &= A_G - A_D \\ \Delta A &= (\epsilon_G - \epsilon_D) \times C \times l \\ \Delta A &= \Delta\epsilon \times C \times l \end{aligned} \tag{1.3}$$

Pour des valeurs identiques d'amplitude d'aborbance des deux ondes circulaires ($A_G = A_D$), le faisceau résultant transmis après passage dans la cuve est une onde polarisée linéaire comme l'onde incidente. En revanche, si une des deux ondes est plus absorbée qu'une autre ($A_G > A_D$), l'onde lumineuse résultante est une onde polarisée elliptique caractérisée par sa valeur d'ellipticité (θ) exprimée en degré :

$$\theta = \tan \frac{a}{b}$$

avec a et b les demi axes de l'ellipse formée par la superposition des deux ondes circulaires n'ayant pas la même amplitude. La relation existant entre l'ellipticité et la différence entre les amplitudes d'absorbance gauche et droite est une relation de proportionnalité :

$$\theta \propto \Delta A \tag{1.4}$$

Plus le faisceau rencontre une quantité importante de molécules, plus la différence entre les deux absorbances augmente et donc plus l'ellipticité tend vers la valeur limite de 45°correspondant à une onde polarisée circulaire (celle n'étant pas absorbée). C'est le cas des molécules chirales qui absorbent préférentiellement une onde polarisée circulaire par rapport à son homologue tournant dans l'autre sens.
De plus, l'ellipticité molaire θ_m ($deg.L.mol^{-1}$), définie comme le rapport entre l'ellipticité et la concentration en molécule optiquement active (paires de bases d'ADN), a pour expression :

$$\theta_m = \frac{\theta}{C} \tag{1.5}$$

et est proportionnelle au dichroïsme circulaire $\Delta\epsilon$.

Ainsi, l'ajout progressif d'ADN dans une cuve de mesure de dichroïsme circulaire entraîne l'apparition des bandes d'absorbances aux longueurs d'onde caractéristiques de la macromolécule : une bande positive à $\lambda = 275\ nm$ et une bande négative à $\lambda = 250\ nm$. D'après l'équation 1.4, l'augmentation de la valeur absolue de l'éllipticité à ces longueurs d'onde est propotionnelle à la concentration en paires de bases ajoutées dans la cuve de mesure.

3.2 Dosage suivi par dichroïsme circulaire

L'enregistrement des spectres de dichroïsme circulaire est réalisé après chaque ajout de solution d'ADN en suivant les mêmes protocoles que les manipulations de spectrophotométrie d'absorption UV-visible. Le signal de dichroïsme circulaire (ellipticité) est nul pour une solution de complexe racémique est un signal apparaît avec l'ajout d'ADN : macromolécule

chirale présentant une activité optique. Les solutions utilisées dans ce travail sont toujours des solutions racémiques mais il est possible de réaliser une séparation des énantiomères[153,154] pour étudier leur différence d'association avec la macromolécule chirale d'ADN. Le suivi des dosages peut se faire aux longueurs d'onde d'absorbance maximales des bandes des spectres de dichroïsme circulaire enregistrés.

Dans le manuscrit, nous considérons que l'ellipticité constitue une observable fiable pour mettre en évidence les associations entre les complexes du ruthénium et l'ADN. Même si son évolution n'est pas uniquement due à ces phénomènes mais aussi à l'augmentation de la concentration des paires de bases d'ADN pendant le dosage (voir les équations 1.3 et 1.4), le comportement similaire de l'évolution de l'ellipticité θ et de l'ellipticité molaire θ_m (voir equation 1.5) pendant le dosage (voir figure 1.5) montrent que la variation de l'ellipticité θ observée est principalement due au phénomène d'association entre les complexes du ruthénium et l'ADN. Pour l'ellipticité molaire θ_m, l'erreur expérimentale est plus importante étant

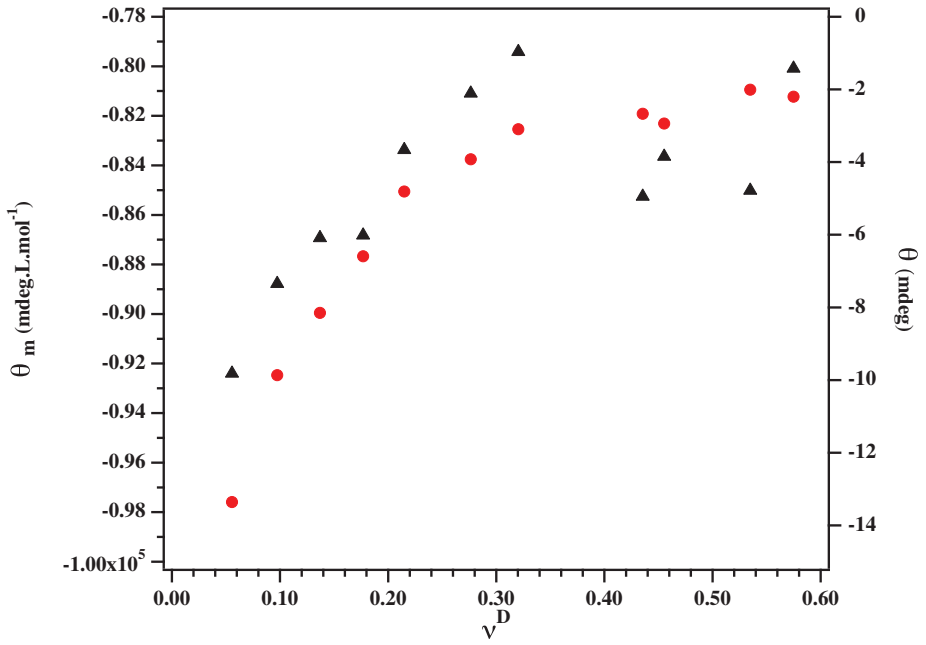


FIGURE 1.5 – Comparaison de l'évolution de θ (points rouges) et θ_m (triangles noirs) en fonction du taux d'occupation des paires de bases d'ADN au cours d'un dosage de RDC37Cl par de l'ADN.

donné que c'est une grandeur dépendant de la concentration en paires de bases d'ADN qui est très faible (entre $0,2.10^{-6}$ M et 1.10^{-4} M). Ceci peut être observé sur la courbe de la figure 1.5, les points expérimentaux associés à l'ellipticité molaire θ_m montrent un comportement moins "lisse" que ceux associés à l'ellipticité θ. Ce phénomène est certainement dû à l'augmentation du "bruit" de la mesure par un facteur de l'ordre de grandeur de l'inverse de la concentration en paires de bases d'ADN ($\approx 10^5$), qui rend l'analyse plus difficile. Étant donné qu'aucun traitement quantitatif n'est réalisé sur ces mesures de dichroïsme circulaire, c'est pourquoi nous nous limitons à étudier l'ellipticité θ pour nos analyses et nos discussions.

Chapitre 2

Adhésion cellulaire

1 Conditionnement des boîtes d'observations

1.1 Traitement des lamelles

Les boîtes de Petri utilisées sont issues de BD Bioscience et sont conçues pour la culture cellulaire c'est à dire stérile et traitée pour permettre l'adhésion des cellules. Le fond est constitué d'une lamelle de verre adaptée pour les observations microscopiques qui est liée au plastique par une colle en silicone étanche et stérile.

Pour permettre le dépôt d'un gel de polacylamide par la suite, la lamelle est traitée d'après le protocole décrit, pour la première fois en 1981,[155] et repris souvent dans la littérature depuis :

1 - Déposer 300 μL d'hydroxyde de sodium à 0.1 $mol.L^{-1}$ et laisser agir 15 minutes.

2 - Retirer la solution de base et sécher la lamelle.

3 - Déposer 300 μL de 3-aminopropyltrimethyloxysilane et laisser agir 5 minutes.

4 - Retirer la solution de silane et rincer abondemment à l'eau distillée.

5 - Déposer 300 μL de glutaraldéhyde à une concentration de 0.5 % en masse et laisser agir 30 minutes.

6 - Retirer la solution de glutaraldéhyde et laisser sécher la lamelle.

Dans ce protocole, le traitement à la soude permet d'activer la silice du verre en surface en formant des groupements Si−O$^-$. Puis, le silane se lie à ces groupements par la formation de liaisons Si−O−Si et le glutaraldéhyde réagit, par une de ses fonctions aldéhyde, avec une des fonctions amine du composé silane pour former une amide et créer ainsi un lien chimique entre ces deux molécules. La deuxième fonction aldéhyde du glutaraldéhyde est utilisé pour lié, toujours par une fonction amide, le gel de polyacrylamide à cette lamelle de verre traitée.

1.2 Formation du gel

La formation de gel de polyacrylamide sur des lamelles de verre pour permettre, par la suit, le dépôt de cellules vivantes, a été décrit dans la littérature.[156] Le protocole suivant est donné pour la formation d'un gel à 10 % en acrylamide et $0,3$ % en bis-acrylamide :

1 - Préparer une solution à $0,3$ % en masse de bis-acrylamide dans l'eau. Pour obtenir 10 mL d'une telle solution, peser 30 mg de poudre de bis-acrylamide et les dissoudre dans 10 mL d'eau distillée.

2 - Peser 250 mg d'une poudre d'acrylamide et les dissoudre dans $2,5$ mL de la solution à $0,3$ % en masse de bis-acrylamide. La solution obtenue est une solution à 10 % en acrylamide et à $0,3$ % en bis-acrylamide.

3 - Ajouter 25 μL d'une solution d'ammonium persulfate (APS) à 1 % en masse (100 mg d'eau dans 100 mL d'eau distillée) à la solution d'acrylamide.

4 - Ajouter 5 μL de TEMED (tétraméthylènediamine) à cette même solution. La réaction en chaîne de formation du gel est alors lancée et les prochaines étapes du protocole sont réalisées rapidement.

5 - Préléver 100 μL de la solution d'acrylamide contenant les initiateurs et ajouter 5 μL d'une solution de billes fluorescentes de 500 nm de diamètre.

6 - Déposer 10 μL de cette solution sur une lamelle non-traitée et placer la boîte de culture cellulaire contenant une lamelle traitée comme décrit précédemment pour que ce volume de solution soit localisée entre les deux lamelles (voir figure 2.1). L'épaisseur

du gel est dépend de la distance entre les deux lamelles qui est contrôlé par une microvis. On choisit de réaliser des gels de 50 μm d'épaisseur.

7 - Attendre 30 minutes que le gel se forme et retirer la boîte avec précaution pour permettre au gel de rester lié à la lammelle traitée formant le fond de la boîte de culture cellulaire.

8 - Rincer le gel avec une solution de tampon PBS (Phosphate Buffer Solution) concentré 1×.

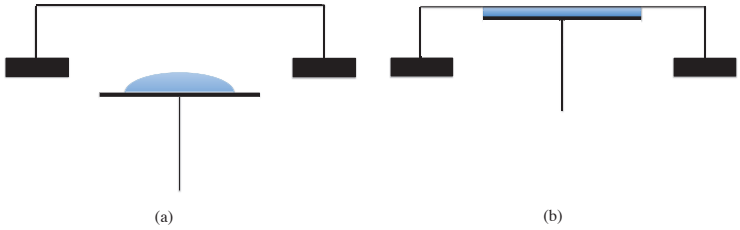


FIGURE 2.1 – Formation d'un gel de polyacrylamide avec une épaisseur contrôlée. (a) dépôt d'une goutte de solution de polyacrylamide venant d'être activée sous une boîte de culture cellulaire avec une lamelle traitée comme décrit dans le paragraphe de traitement des lamelles. (b) utilisation d'une vis micrométrique pour positionner les deux lamelles à une distance fixe permettant de contrôler l'épaisseur du gel lors de sa formation.

Les concentrations d'initiateurs influencent la vitesse de formation du gel. Les volumes et concentrations choisis permettent de réaliser les manipulations d'ajout de microbilles fuorescentes avant que la gélification ne se produise. Les réactions se réalisant lors de la formation du gel sont les suivantes :

$$\mathrm{APS} + \mathrm{TEMED} \rightleftharpoons \mathrm{APS}^*$$

$$\mathrm{APS}^* + \mathrm{M} \rightleftharpoons \mathrm{M}^*$$

$$\mathrm{M}^* + \mathrm{M} \rightleftharpoons \mathrm{M}{-}\mathrm{M}^*$$

$$\ldots$$

avec M un monomère d'acrylamide ou de bis-acrylamide. La réaction se propage dans la solution et le gel se forme.

La présence des microbilles fluorescentes dispersées dans le gel peut être vérifiée par une image enregitrée grâce à un microscope et sous lumière fluorecente (voir figure 2.2)

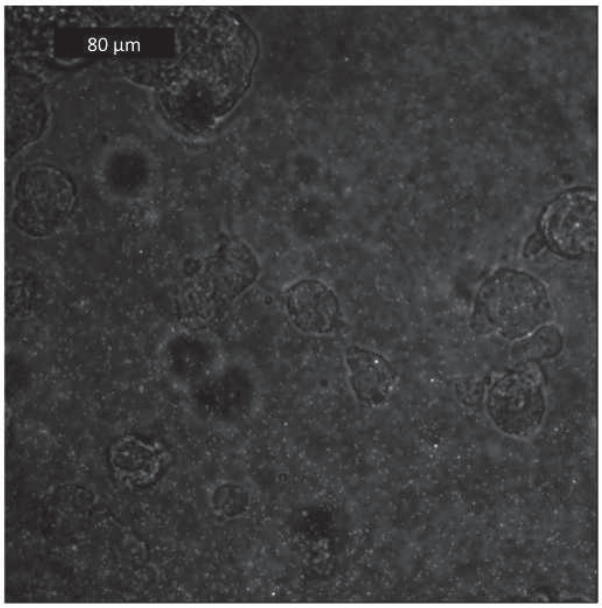


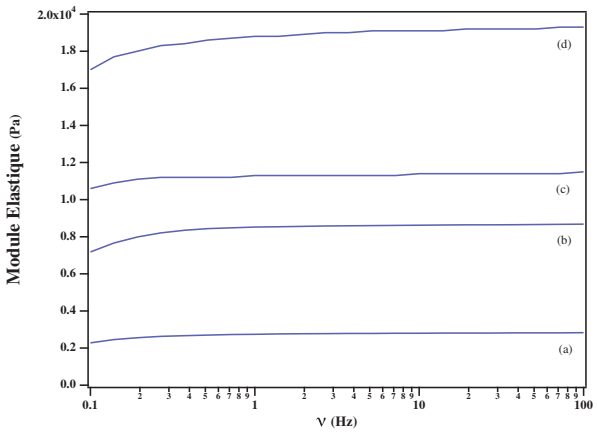
FIGURE 2.2 – Image de cellules et de microbilles fluorescentes dispersées dans un gel de polyacrylamide.

1.3 Rhéologie des gels de polyacrylamide

Le rhéomètre utilisé pour réaliser les mesures d'élasticité des gels est un appareil à rotation de type cône-plan permettant des mesures en mode oscillation (essai dynamique) : Anton Raar AR501. L'enregistrement des contraintes en fonction de la fréquence des mouvements de rotations subis par le gel donnent accès aux valeurs de module élastique des gels étudiés (voir figure 2.3). Pour différentes proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide, les modules élastiques obtenus sont donnés dans le tableau de la figure 2.3.

1.4 Traitement de la surface du gel pour culture cellulaire

Afin de pouvoir pratiquer une culture cellulaire sur la surface de ce gel il faut déposer des macromolécules de collagène qui miment la matrice extracellulaire et permettent l'adhésion



% acryl	% bis-acryl	E (Pa)
10	0,3	19000
10	0,2	13300
10	0,15	11500
10	0,1	8600
10	0,03	5000
5	0,3	3000
5	0,2	1750
5	0,1	1500
5	0,05	1000

FIGURE 2.3 – Évolution du module élastique des gels de polyacrylamide en fonction de la fréquence des oscillations lors de la mesure en rhéologie pour un essai dynamique. Les courbes représentent différents gels de composition en acrylamide/bis-acrylamide variables : (a) = 5%/0,3% ; (b) = 10%/0,1% ; (c) = 10%/0,15% et (d) = 10%/0,3%. Le tableau sur la droite résume les valeurs de module élastique E (Pa) obtenus pour les différentes proportions en acrylamide (acryl) et bis-acrylamide (bis-acryl).

des cellules. Le protocole utilisé est celui décrit dans la littérature.[156]

1 - Déposer 300 μL d'une solution de sulfo-SANPAH (N-Sulfosuccinimidyl-6-[4'-azido-2'-nitrophenylamino] hexanoate) à 1 mM et d'un tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à 200 mM sur la surface des gels formés.

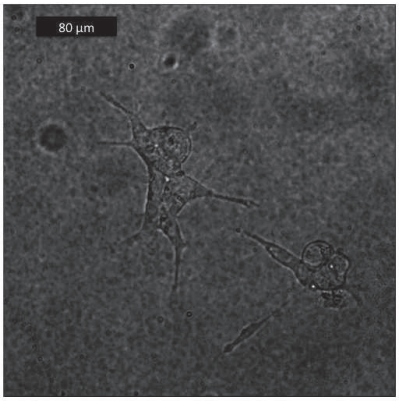
2 - Illuminer les boîtes par un rayonnement ultraviolet[157] pendant 5 minutes puis rincer abondamment la surface du gel avec une solution tampon de PBS concentré 1×.

3 - Répéter l'activation au sulfo-SANPAH et le rinçage une autre fois.

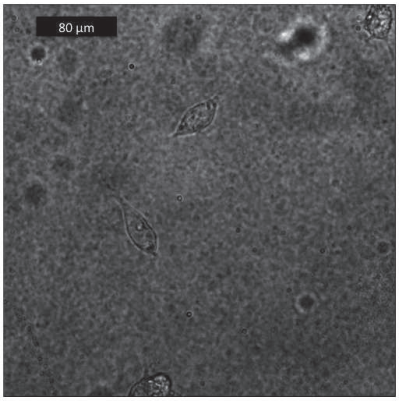
4 - Déposer 300 μL d'une solution de collagène à $0,2$ mg/mL sur la surface du gel et laisser agir pendant au moins 12 heures à 4° C (réfrigérateur).

Le sulfo-SANPAH permet de créer un lien dans un premier temps avec la surface du gel (rayonnement UV) puis avec le collagène.

Pour vérifier que ce traitement est important nous pouvons comparer deux images de cellules cultivées avec et sans l'activation de la surface des gels par dépôt de collagène. Le module élastique du gel est identique pour les deux images : 19 kPa (voir figure 2.4). D'après la forme des cellules, l'adhésion est effectivement mieux réalisée sur les gels ayant



(a) Gel avec collagène



(b) Gel sans collagène

FIGURE 2.4 – Images de cellules avec et sans collagène déposé sur la surface du gel support de module élastique 19 kPa.

été prélablement activé par dépôt de collagène sur sa surface.

1.5 Résumé du conditionnement des boîtes de culture cellulaire

L'ensemble du conditionnment des boîtes de culture peut être résumé par la figure 2.5.

2 Culture cellulaire

Pour la culture cellulaire, les boîtes utilisées sont traitées spécialement pour les cultures de cellules adhérentes. La lignée cellulaire est une lignée de cancer colorectal humain : SW480. Le milieu de culture utilisé est du DMEM avec 10% de facteur de croissance, glucose, antibiotiques (streptavidine...), ...

1 - Lorsque les cellules se trouvent à confluence, rincer la boîte avec 1 mL de versène afin de neutraliser l'action de ions Na^+ et Ca^{2+} et pour éliminer les résidus de cellules mortes.

2 - Laisser agir 1 mL de trypsine pendant quelques minutes pour décoller les cellules du fond de la boîte.

3 - Prélever 20 μL de cette suspension de cellule et les placer dans une nouvelle boîte

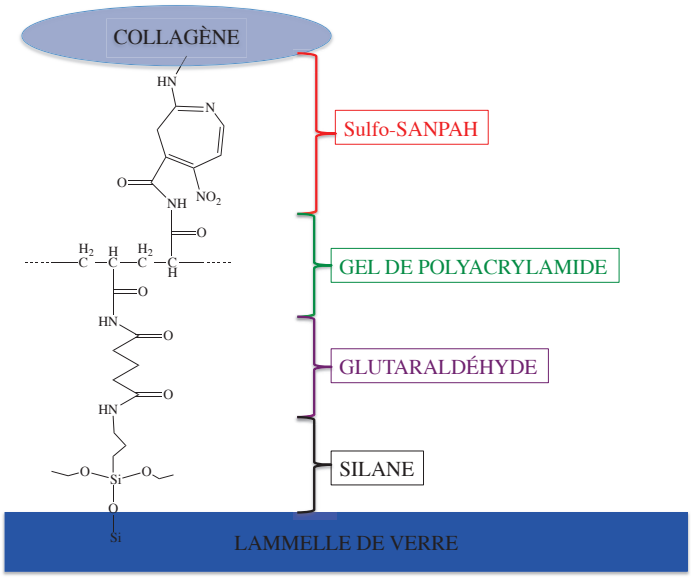


FIGURE 2.5 – Résumé des différentes étapes de conditionnement des boîtes pour la culture cellualire sur les gels de polyacrylamide. Étape de formation du silane et d'activation par le glutaraldéhyde : paragraphe 1.1. Étape de formation du gel de polyacrylamide : paragraphe 1.2. Étape d'activation de la surface du gel et de dépôt de collagène : paragraphe 1.4.

de culture cellulaire contenant 4 mL de milieu de culture. Cette dilution au 1/50 de la suspension de cellules permet une durée de culture, avant la confluence, d'environ une semaine. Cette nouvelle boîte constitue la chaîne de conservation de cette lignée cellulaire dans le laboratoire et est placée dans une étuve à 37°C et avec un air humide à 5% en CO_2.

4 - Prélever à nouveau 20 μL de cette suspension de cellule et les placer dans une boîte avec un gel de polyacrylamide activé pour la culture cellulaire par du collagène contenant 2 mL de milieu de culture.

5 - Laisser les cellules s'adhérées sur le gel en les plaçant dans une étuve à 37°C et avec un air humide à 5% en CO_2.

La boîte de suivi arrive à confluence en une semaine et donc cette opération d'entretien de la lignée cellulaire est répétée de façon hebdomadaire. Le milieu de culture est changé tous les deux jours pendant ce temps de développement des cellules.

Les boîtes de culture contenant les gels de polyacrylamide sont laissées à l'étuve pendant environ 48 heures avant l'enregistrement des images par microscopie optique.

3 Enregistrement et analyse des images cellulaires

3.1 Observations microscopiques

Les cellules sont observées grâce à un microscope Olympus IR50 de grossisement 20× surmontée d'une boîte hermétique chauffée à 37° C contenant un couvercle permettant l'insuflation d'air saturé en eau et composé à 5 % de CO_2 au dessus de l'échantillon. La caméra utilisée pour l'enregistrement des images de cellules est une Princeton PI-MAX. Le format obtenu est d'une taille de 512 × 512 pixels où un pixel correspond à 16 × 16 μm.

3.2 Traitement des images

Le logiciel IGOR PRO permet d'écrire des procédures pour exécuter les fichiers créés par la caméra et analyser les images de cellule. Il est ainsi possible de schématiser le contour des cellules par des formes géométriques et d'en déterminer les aires associées. L'image présentée sur la figure 2.6 montre une cellules et le tracé de la forme géométrique en schématisant sa forme. En tenant compte des caractéristiques de la caméra ayant réaliser ces images ainsi que du grossissement du microscope d'observation il est possible d'obtenir l'aire des cellules en unité métrique à partir de l'aire donnée en pixel par l'analyse de l'image avec le logiciel IGOR PRO :

$$A_{\mu m^2} = A_{pixel} * \left(\frac{16}{20}\right)^2 \tag{2.1}$$

Plusieurs images montrant une ou plusieurs cellules sont alors analysées par cette méthode afin d'obtenir les résultats présentés dans ces travaux de thèse.

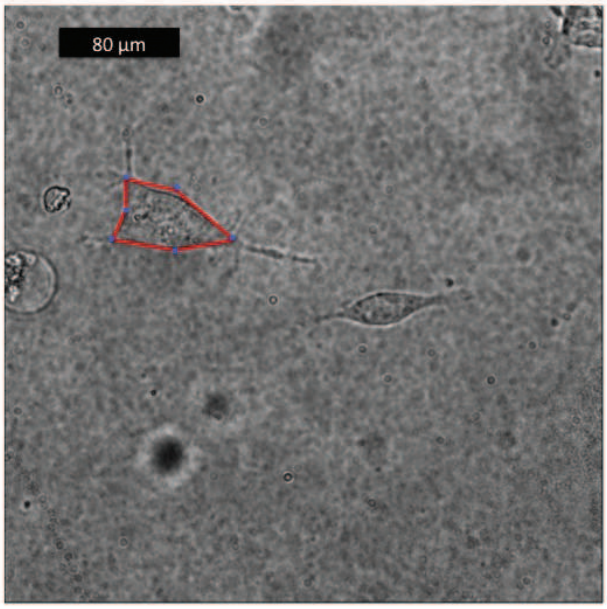


FIGURE 2.6 – Détermination de l'aire d'une cellule sur une image avec une schématisation de la forme de la cellule (traits rouges). L'aire est calculée avec les coordonnées (x,y) des points (bleus) servant de référence à la schématisation.

Bibliographie

[1] Alberts, B. ; Bray, D. ; Lewis, J. ; Raff, M. ; Roberts, K. ; Watson, J. D. *Biologie moléculaire de la cellule* ; 1983.

[2] www.azaquar.com/doc/microbiologie-generale.

[3] ladecouvertedescelluleseucaryotes.wordpress.com/2011/12/06/architecture-le-cytosquelette/.

[4] www.cours-de-biochimie.fr/structure-primaire-adn.php.

[5] ludwig-sun1.unil.ch/~vjongene/molbio/chapt_2.htm.

[6] education.mrsec.wisc.edu/background/DNA/DNAintro.htm.

[7] Rosenberg, B. ; VanCamp, L. ; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.

[8] Poklar, N. ; Pilch, D. S. ; Lippard, S. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 7606–7611.

[9] Rosenberg, B. ; Camp, L. V. ; Grimley, E. B. ; Thomson, A. J. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242*, 1347–1352.

[10] Shermann, S. E. ; Gibson, D. ; Wang, A. H.-J. ; Lippard, S. J. *Science* **1985**, *230*, 412–417.

[11] Sanna, B. ; Debidda, M. ; Pintus, G. ; Tadolini, B. ; Posadino, A. M. ; Bennardini, F. ; Sava, G. ; Ventura, C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2002**, *403*, 209–218.

[12] Sava, G. ; al., *Clinical Cancer Research* **2003**, *9*, 1898–1905.

[13] Bergamo, A. ; Masi, A. ; Dyson, P. J. ; Sava, G. *International Journal of Oncology* **2008**, *33*, 1281–1289.

[14] Bergamo, A. ; Masi, A. ; Peacock, A. ; Habtemariam, A. ; Sadler, P. ; Sava, G. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104*, 79–86.

[15] Leyva, L. ; Sirlin, C. ; Rubio, L. ; Franco, C. ; Lagadec, R. L. ; Spencer, J. ; Bischoff, P. ; Gaiddon, C. ; Loeffler, J. P. ; Pfeffer, M. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 3055–3066.

[16] `tctr.univie.oc.at/projekte/ruthenium/`.

[17] `openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3086571_om_2010-011800_0005&req=4`.

[18] `www.futurasciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/4/`.

[19] MacGhee, J. D. ; VonHippel, P. H. *Journal of Molecular Biology* **1974**, *86*, 469–489.

[20] Scatchard, G. *Annals of the New York Academy Sciences - Molecular Interaction* **1949**, *51*, 660–672.

[21] Schwarz, G. *European Journal of Biochemistry* **1970**, *12*, 442–453.

[22] Bujalowski, W. ; Lohman, T. M. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3099–3106.

[23] Halfman, C. J. ; Nishida, T. *Biochemistry* **1972**, *11*, 3493–3498.

[24] Bloomfield, V. A. ; Crothers, D. M. ; Tinoco, I. *Nucleic Acids : Structures, Properties, and Functions* ; 2000.

[25] `culturesciences.chimie.ens.fr/content/`.

[26] Clarke, M. *Electron transfer reactions : inorganic, organometallic, and biological applications, Advances in Chemistry Series* ; 1997 ; Vol. 253 ; pp 343–365.

[27] Fetzer, L. ; Boff, B. ; Ali, M. ; Xiangjun, M. ; Collin, J.-P. ; Sirlin, C. ; Gaiddon, C. ; Pfeffer, M. *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 8869–8878.

[28] Hartshorn, R. M. ; Barton, J. K. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5919–5925.

[29] Jenkins, Y. ; Friedman, A. E. ; Turro, N. J. ; Barton, J. K. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10809–10816.

[30] Hiort, C. ; Norden, B. ; Rodger, A. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 1971–1982.

[31] Hiort, C. ; Lincoln, P. ; Norden, B. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 3448–3454.

[32] Lincoln, P. ; Norden, B. *Journal of Physics and Chemistry B* **1998**, *102*, 9583–9594.

[33] Coggan, D. Z. M. ; Haworth, I. S. ; Bates, P. J. ; Robinson, A. ; Rodger, A. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38*, 4486–4497.

[34] Satyanarayana, S. ; Dabrowiak, J. C. ; Chaires, J. B. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2573–2584.

[35] Yang, G. ; Wu, J. Z. ; Wang, L. ; Ji, L. N. ; Tian, X. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1997**, 141–144.

[36] Grueso, E. ; López-Pérez, G. ; Castellano, M. ; Prado-Gotor, R. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *106*, 1–9.

[37] Yang, X. ; Liu, Y. ; Yao, S. ; Xia, Y. ; Li, Q. ; Zheng, W. ; Chen, L. ; Liu, J. *Journal of Coordination Chemistry* **2011**, *64*, 1491–1502.

[38] Klajner, M. ; Hebraud, P. ; Sirlin, C. ; Gaiddon, C. ; Harlepp, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 14041–14047.

[39] Mihailovic, A. ; Vladescu, I. ; McCauley, M. ; Ly, E. ; Williams, M. C. ; Spain, E. M. ; Nunez, M. E. *Langmuir* **2006**, *22*, 4699–4709.

[40] Vladescu, I. D. ; McCauley, M. J. ; Nunez, M. E. ; Rouzina, I. ; Williams, M. C. *Nature Methods* **2007**, *4*, 517–522.

[41] Wenner, J. R. ; Williams, M. C. ; Rouzina, I. ; Bloomfield, V. A. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 3160–3169.

[42] Haq, I. ; Lincoln, P. ; Suh, D. ; Norden, B. ; Chowdhry, B. Z. ; Chaires, J. B. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 4788–4796.

[43] Shi, S. ; Geng, X. ; Zhao, J. *Biochemistry* **2010**, *92*, 370–377.

[44] Li, L.-Y. ; Jia, H.-N. ; Yu, H.-J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, *113*, 31–39.

[45] Rehmann, J. P. ; Barton, J. K. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1701–1709.

[46] Eriksson, M. ; Leijon, M. ; Hiort, C. ; Norden, B. ; Graslund, A. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5031–5040.

[47] Chen, W. ; Turro, C. ; Friedman, L. A. ; Barton, J. K. ; Turro, N. J. *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 6995–7000.

[48] Carter, M. T. ; Bard, A. J. *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, 257–263.

[49] Hu, L. ; Bian, Z. ; Li, H. ; Han, S. ; Yuan, Y. ; Gao, L. ; Xu, G. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9807–9811.

[50] Barton, J. K. ; Goldberg, J. M. ; Kumar, C. V. ; Turro, N. J. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 2081–2088.

[51] Corral, E. ; Hotze, A. C. G. ; den Dulk, H. ; Leczkowska, A. ; Rodger, A. ; Hannon, M. J. ; Reedijk, J. *Journal of Biology and Inorganic Chemistry* **2009**, *14*, 439–448.

[52] Barton, J. K. ; Danishefsky, A. T. ; Goldberg, J. M. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 2172–2176.

[53] Friedman, A. E. ; Chambron, J.-C. ; Sauvage, J.-P. ; Turro, N. J. ; Barton, J. K. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *11*, 4960–4962.

[54] Satyanarayana, S. ; Dabrowiak, J. C. ; Chaires, J. B. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9319–9324.

[55] Biver, T. ; Cavazza, C. ; Secco, F. ; Venturini, M. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2007**, *101*, 461–469.

[56] Li, S. ; Cooper, V. R. ; Thonhauser, T. ; Lundqvist, B. I. ; Langreth, D. C. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 11166–11172.

[57] Kielkopf, C. L. ; Erkkila, K. E. ; Hudson, B. P. ; Barton, J. K. ; Rees, D. C. *Nature Structural and Molecular Biology* **2000**, *7*, 117–121.

[58] Niyazi, H. ; Hall, J. P. ; O'Sullivan, K. ; Winter, G. ; Sorensen, T. ; Kelly, J. M. ; Cardin, C. J. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 621–628.

[59] Ghosh, A. ; Das, P. ; Gill, M. R. ; Kar, P. ; Walker, M. G. ; Thomas, J. A. ; Das, A. *Chemistry A European Journal* **2011**, *17*, 2089–2098.

[60] Greguric, A. ; Greguric, I. D. ; Hambley, T. W. ; Aldrich-Wright, J. R. ; Collins, J. G. *Dalton Transactions* **2002**, 849–855.

[61] Tuite, E. ; Lincoln, P. ; Norden, B. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 239–240.

[62] Zeglis, B. M. ; Pierre, V. C. ; Barton, J. K. *Chemical Communication* **2007**, 4565–4579.

[63] Record, M. T. ; Anderson, C. F. ; Lohman, T. M. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1978**, *2*, 103–178.

[64] Manning, G. S. *The Journal of Chemical Physics* **1969**, *51*, 934–938.

[65] O'Shaughnessy, B. ; Yang, Q. *Physical Review Letters* **2005**, *94*, 1–4.

[66] Song, H. ; Kaiser, J. T. ; Barton, J. K. *Nature Chemistry* **2012**, 615–620.

[67] Lim, M. H. ; Song, H. ; Olmon, E. D. ; Dervan, E. E. ; Barton, J. K. *Inorganic Chemistry* **2009**, *48*, 5392–5397.

[68] Ruba, E. ; Hart, J. R. ; Barton, J. K. *Inorganic Chemistry* **2004**, *43*, 4570–4578.

[69] Metcalfe, C. ; Adams, H. ; Haq, I. ; Thomas, J. A. *Chemical Communication* **2003**, 1152–1153.

[70] Benesi, H. ; Hildebrand, J. *Journal of the American Chemical Society* **1949**, *71*, 2703–2707.

[71] Very, T. ; Despax, S. ; Hébraud, P. ; Monari, A. ; Assfeld, X. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14*, 12496–12504.

[72] Despax, S. ; Jia, F. ; Pfeffer, M. ; Hébraud, P. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**,

[73] Nicolas, A. *CNRS Publications "Images de la Physique"* **2007**, 87–93.

[74] Nicolas, A. ; Safran, S. A. *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 61–73.

[75] Geiger, B. ; Bershadsky, A. D. ; Pankov, R. ; Yamada, K. M. *Molecular Cell biology* **2001**, *2*, 793–805.

[76] Collin, O. ; Na, S. ; Chowdhury, F. ; Hong, M. ; Shin, M. E. ; Wang, F. ; Wang, N. *Current Biology* **2008**, *18*, 1268–1294.

[77] Jamora, C. ; Fuchs, E. *Nature Cell Biology* **2002**, E101–E108.

[78] Lambert, M. ; Thoumine, O. ; Brevier, J. ; Choquet, D. ; Riveline, D. ; Mège, R.-M. *Experimental Cell Research* **2007**, *313*, 4025–4040.

[79] Ra, H. J. ; Picart, C. ; Feng, H. ; Sweeney, H. L. ; Discher, D. E. *Journal of Cell Science* **1999**, *112*, 1425–1436.

[80] Besser, A. ; Schwarz, U. S. *New Journal of Physics* **2007**, *9*, 1–27.

[81] Calderwood, D. A. ; Shattil, S. J. ; Ginsberg, M. H. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 22607–22610.

[82] Katsumi, A. ; Orr, A. W. ; Tzima, E. ; Schwartz, M. A. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 12001–12004.

[83] Sheetz, M. P. ; Felsenfeld, D. P. ; Galbraith, C. G. *Cell Biology* **1998**, *8*, 51–54.

[84] Geiger, B. ; Spatz, J. P. ; Bershadsky, A. D. *Nature Reviews / Molecular Cell Biology* **2009**, *10*, 21–33.

[85] Ginsberg, M. H. ; Partridge, A. ; Shattil, S. J. *Current Opinion in Cell Biology* **2005**, *17*, 509–516.

[86] Tadokoro, S. ; Shattil, S. J. ; Eto, K. ; Tal, V. ; Liddington, R. C. ; de Pereda, J. M. ; Ginsberg, M. H. ; Calderwood, D. A. *Science* **2003**, *302*, 103–106.

[87] Ratnikov, B. I. ; Partridge, A. W. ; Ginsberg, M. *Journal of thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 1783–1790.

[88] Campbell, I. D. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **2008**, *363*, 2379–2391.

[89] Nicolas, A. ; Besser, A. ; Safran, S. A. *Biophysical Journal* **2008**, *95*, 527–539.

[90] Beningo, K. A. ; Dembo, M. ; Kaverina, I. ; Small, J. V. ; li Wang, Y. *The Journal of Cell Biology* **2001**, *153*, 881–887.

[91] Parsons, J. T. ; Horwitz, A. R. ; Schwartz, M. A. *Nature Reviews / Molecular Cell Biology* **2010**, *11*, 633–643.

[92] Saez, A. ; Ghibaudo, M. ; Ladoux, B. ; Buguin, A. ; Silberzan, P. *CNRS Publications "Images de la Physique"* **2007**, 94–100.

[93] Larripa, K. ; Mogilner, A. *Physica A* **2006**, *372*, 113–123.

[94] Cuvelier, D. ; Thery, M. ; Chu, Y.-S. ; Dufour, S. ; Thiery, J.-P. ; Bornens, M. ; Nassoy, P. ; Mahadevan, L. *Current Biology* **2007**, *17*, 694–699.

[95] Ananthakrishnan, R. ; Ehrlicher, A. *International Journal of Biological Sciences* **2007**, *3*, 303–317.

[96] Cooper, J. A. *Annual Review of Physiology* **1991**, *53*, 585–605.

[97] Gellert, M. F. ; VonHippel, P. H. ; Schachman, H. K. ; Morales, M. F. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, *81*, 1384–1393.

[98] Even-Ram, S. ; Doyle, A. D. ; Conti, M. A. ; Matsumoto, K. ; Adelstein, R. S. ; Yamada, K. M. *Nature Cell Biology* **2007**, *9*, 299–309.

[99] Sheshka, R. ; Truskinosky, L. *Physical Review E* **2014**, *89*, 012708–012720.

[100] Clainche, C. L. ; Carlier, M.-F. *Physiological Reviews* **2008**, *88*, 489–513.

[101] Gupton, S. L. ; Waterman-Storer, C. M. *Cell* **2006**, *125*, 1361–1374.

[102] Carlier, M.-F. ; Pantaloni, D. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *269*, 459–467.

[103] Oda, T. ; Iwasa, M. ; Aihara, T. ; Maeda, Y. ; Narita, A. *Nature* **2009**, *457*, 441–445.

[104] Harris, A. K. ; Wild, P. ; Stopak, D. *Science* **1980**, *208*, 177–179.

[105] Burton, K. ; Park, J. H. ; Taylor, D. L. *Molecular Biology of the Cell* **1999**, *10*, 3745–3769.

[106] Oliver, T. ; Dembo, M. ; Jacobson, K. *The Journal of Cell Biology* **1999**, *145*, 589–604.

[107] Balaban, N. Q. ; Schwarz, U. S. ; Riveline, D. ; Goichberg, P. ; Tzur, G. ; Sabanay, I. ; Mahalu, D. ; Safran, S. ; Bershadsky, A. ; Addadi, L. ; Geiger, B. *Nature Cell Biology* **2001**, *3*, 466–472.

[108] Lee, J. ; Leonard, M. ; Oliver, T. ; Ishihara, A. ; Jacobson, K. *Journal of Cell Biology* **1994**, *127*, 1957–1964.

[109] Butler, J. P. ; Tolic-Norrelykke, I. M. ; Fabry, B. ; Fredberg, J. J. *American Journal of Physiology* **2002**, *282*, 595–605.

[110] Ambrosi, D. ; Duperray, A. ; Peschetola, V. ; Verdier, C. *Journal of Mathematical Biology* **2009**, *58*, 163–181.

[111] Dembo, M. ; Wang, Y.-L. *Biophysical Journal* **1999**, *76*, 2307–2316.

[112] Hur, S. S. ; Zhao, Y. ; Li, Y.-S. ; Botvinick, E. ; Chien, S. *Cellular and Molecular Bioengineering* **2009**, *2*, 425–436.

[113] Delanoe-Ayari, H. ; Rieu, J. P. *Physical Review Letters* **2010**, *105*, 1–4.

[114] Zaman, M. H. ; Trapani, L. M. ; Sieminski, A. L. ; MacKellar, D. ; Gong, H. ; Kamm, R. D. ; Wells, A. ; Lauffenburger, D. A. ; Matsudaira, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *102*, 10889–10894.

[115] Zhang, H. ; Dai, S. ; Bi, J. ; Liu, K.-K. *Interface Focus* **2011**, *1*, 792–803.

[116] Legant, W. R. ; Miller, J. S. ; Blakely, B. L. ; Cohen, D. M. ; Genin, G. M. ; Chen, C. S. *Nature Methods* **2010**, *7*, 969–971.

[117] Poincloux, R. ; Collin, O. ; Lizárraga, F. ; Romao, M. ; Debray, M. ; Piel, M. ; Chavrier, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 1943–1948.

[118] Mills, J. P. ; Qie, L. ; Dao, M. ; Lim, C. T. ; Suresh, S. *Molecular and Cellular Biology* **2004**, *1*, 169–180.

[119] Allioux-Guerin, M. ; Icard-Arcizet, D. ; Durieux, C. ; Henon, S. ; Gallet, F. ; Mevel, J.-C. ; Masse, M.-J. ; Tramier, M. ; Coppey-Moisan, M. *Biophysical Journal* **2009**, *96*, 238–247.

[120] Davies, P. ; Barbee, K. ; Volin, M. ; Robotewskyj, A. ; Chen, J. *Annual Review of Physiology* **1997**, *59*, 527–549.

[121] Shyy, J. ; Chien, S. *Circulation Research* **2002**, *91*, 769–775.

[122] Dobereiner, H.-G. ; Dubin-Thaler, B. ; Giannone, G. ; Xenias, H. S. ; Sheetz, M. P. *Physical Review Letters* **2004**, *93*, 1–4.

[123] Schneider, A. ; Francius, G. ; Obeid, R. ; Schwinte, P. ; Hemmerle, J. ; Frisch, B. ; Schaaf, P. ; Voegel, J.-C. ; Senger, B. ; Picart, C. *Langmuir* **2006**, *22*, 1193–1200.

[124] Yeung, T. ; Georges, P. C. ; Flanagan, L. A. ; Marg, B. ; Ortiz, M. ; Funaki, M. ; Zahir, N. ; Ming, W. ; Weaver, V. ; Janmey, P. A. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **2005**, *60*, 24–34.

[125] Engler, A. ; Bacakova, L. ; Newman, C. ; Hategan, A. ; Griffin, M. ; Discher, D. *Biophysical Journal* **2004**, *86*, 617–628.

[126] Reinhart-King, C. A. ; Dembo, M. ; Hammer, D. A. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 676–689.

[127] Deligianni, D. D. ; Katsala, N. D. ; Koutsoukos, P. G. ; Missirlis, Y. F. *Biomaterials* **2001**, *22*, 87–96.

[128] Bershadsky, A. D.; Balaban, N. Q.; Geiger, B. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2003**, *19*, 677–695.

[129] Delanoe-Ayari, H.; Brevier, J.; Riveline, D. *Soft Matter* **2011**, *7*, 824–829.

[130] Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y.-L. *Science* **2005**, *310*, 1139–1143.

[131] Delanoe-Ayari, H.; Iwaya, S.; Maeda, Y. T.; Inose, J.; Riviere, C.; Sano, M.; Rieu, J.-P. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **2008**, *65*, 314–331.

[132] Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Cell* **2006**, *126*, 677–689.

[133] Holle, A. W.; Engler, A. J. *Nature Materials - Cell Rheology* **2010**, *9*, 4–6.

[134] Engler, A. J.; Sweeny, H. L.; Discher, D. E.; Schwarzbauer, J. E. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* **2007**, *7*, 335.

[135] Condeelis, J.; Segall, J. E. *Nature reviews / Cancer* **2003**, *3*, 921–930.

[136] Alexander, N. R.; Branch, K. M.; Parekh, A.; Clark, E. S.; Iwueke, I. C.; Guelcher, S. A. *Current Biology* **2008**, *18*, 1295–1299.

[137] Lo, C.-M.; Wang, H.-B.; Dembo, M.; li Wang, Y. *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 144–152.

[138] Pelham, R. J.; Wang, Y.-L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 13661–13665.

[139] Caterina, M. J.; Devreotes, P. N. *The FASEB Journal* **1991**, *5*, 3078–3085.

[140] Zicha, D.; Dunn, G. A.; Brown, A. F. *Journal of Cell Science* **1991**, *99*, 769–775.

[141] Wang, S.-J.; Saadi, W.; Lin, F.; Nguyen, C. M.-C.; Jeon, N. L. *Experimental Cell Research* **2004**, *300*, 180–189.

[142] Y.Chung, C. ; Funamoto, S. ; A.Firtel, R. *Trends in Biochemical Sciences* **2001**, *26*, 557–566.

[143] Iijima, M. ; Huang, Y. E. ; Devreotes, P. *Developmental Cell* **2002**, *3*, 469–478.

[144] Discher, D. E. ; Mooney, D. J. ; Zandstra, P. W. *Science* **2009**, *324*, 1673–1677.

[145] Kollmannsberger, P. ; Mierke, C. T. ; Fabry, B. *Soft Matter* **2011**, *7*, 3127–3132.

[146] Zelonka, R. A. ; Baird, M. C. *Canadian Journal of Chemistry* **1972**, *50*, 3063–3072.

[147] Fernandez, S. ; Pfeffer, M. ; Ritleng, V. ; Sirlin, C. *Organometallics* **1999**, *18*, 2390–2394.

[148] Ryabov, A. ; Sukharev, V. ; Alexandrova, L. ; Lagadec, R. L. ; Chem, M. P. I. *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 6529–6532.

[149] Bonnet, S. ; Li, J. ; Siegler, M. A. ; VonChrzanowski, L. S. ; Spek, A. L. ; van Koten, G. ; Gebbink, R. J. M. K. *Chemistry A European Journal* **2009**, *15*, 3340–3343.

[150] Diaz, M. O. G. ; Morales, S. L. ; Lagadec, R. L. ; Alexandrova, L. *Journal of polymer science part A : Polymer Chemistry* **2011**, *49*, 4562–4577.

[151] Diaz, R. O. S. ; Lagadec, R. L. ; Ryabov, A. D. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2013**, *18*, 547–555.

[152] Sullivan, B. P. ; Salmon, D. J. ; Meyer, J. *Inorganic Chemistry* **1978**, *17*, 3334–3341.

[153] Ivanova, E. V. ; Kurnikov, I. V. ; Fischer, A. ; Alexandrova, L. ; Ryabov, A. D. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* **2006**, *41*, 110–116.

[154] Jiang, C. ; Tong, M.-Y. ; Armstrong, D. W. ; Perera, S. ; Bao, Y. ; MacDonnell, F. M. *Chirality* **2009**, *21*, 208–217.

[155] Alpin, J. D. ; Hugues, R. C. *Analytical Biochemistry* **1981**, *111*, 144–148.

[156] Wang, Y.-L. ; Pelham, R. J. *Methods in Enzymology* **1998**, *298*, 489–496.

[157] Gaudet, C.; Marganski, W. A.; Kim, S.; Brown, C. T.; Gunderia, V.; Dembo, M.; Wong, J. Y. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 3329–3335.

Liste des tableaux

2.1 Tableau récapitulatif des grandeurs caractéristiques des équilibres obtenues par les manipulations expérimentales 91

2.1 Valeurs numériques des surfaces de contact des cellules adhérées sur des gels mous ayant différents modules élastiques 129

2.2 Résultats des test statistiques : test T de Student 136

Liste des figures

1 Mécanisme de l'apparition et du développement d'un cancer 15

2 Structure d'une cellule eucaryote 18

3 Structure et composition du cytosquelette d'une cellule 19

4 Liaison peptidique entre deux acides aminés 21

5 Structure des nucléotides composant l'ADN 22

6 Structure des sucres ribose et déoxyribose 22

7 Structure des nucléobases de l'ADN 23

8 Complexes du ruthénium à activité anticancéreuse 25

9 Mécanisme de formation de métastases lors du développement d'un cancer colo-rectal 26

1.1 Macromolécules de taille différentes 34

1.2 Différentes possibilités d'occupation des monomères d'une macromolécule : modèle de Scatchard et de MacGhee 37

1.3 Schématisation de l'analyse à deux dosages 43

1.4 Liaisons hydrogènes entre les nucléobases d'ADN 44

1.5 Structure de la double-hélice d'ADN 45

1.6 Structure de l'ADN en vue de dessus 46

1.7 Structure des complexes RDC 46

1.8 Les types d'association RDC-ADN 51

1.9 Structure des ligands bipyridine, phénanthroline er dipyridophénazine 52

1.10 Les différents modes d'intercalation 53
1.11 Schématisation du rayon de Manning autour de la double-hélice d'ADN . . . 56
1.12 Énantiosélectivité de l'intercalation entre les complexes du ruthénium et l'ADN 59

2.1 Spectres d'absorption de l'ADN et des complexes du ruthénium 64
2.2 Évolution de l'absorbance des complexes lors du dosage par de l'ADN 65
2.3 Évolution de Q^D_{obs} en fonction de la concentration en paire de bases d'ADN . 70
2.4 Évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour RDC37Cl 71
2.5 Évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour RDC40Cl 72
2.6 Ajustement de l'évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour RDC37Cl 77
2.7 Ajustement de l'évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour RDC40Cl 78
2.8 Représentation de Hildebrand pour le dosage du RDC37Cl 81
2.9 Ajustement de l'évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ 83
2.10 Modifications du spectre de dichroïsme circulaire de $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ lors du dosage par de l'ADN 84
2.11 Modifications du spectre de dichroïsme circulaire de RDC37Cl lors du dosage par de l'ADN 85
2.12 Comparaison des dosages suivis par spectroscopie d'absorption et par dichroïsme circulaire pour le dosage du RDC37Cl 87
2.13 Comparaison des dosages suivis par spectroscopie d'absorption et par dichroïsme circulaire pour le dosage du RDC40Cl 88
2.14 Comparaison des dosages suivis par spectroscopie d'absorption et par dichroïsme circulaire pour le dosage de $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ 89
2.15 Ajustement de l'évolution de Q^D_{obs} en fonction de ν^D pour RDC37Cl dans une solution saline à 40mM 90

3.1 Influence de ϵ_{b1} sur l'évolution de Q^S_{obs} en fonction de ν^S : modèle à deux équilibres 99

3.2 Influence de ϵ_{b2} sur l'évolution de Q^S_{obs} en fonction de ν^S : modèle à deux équilibres 100
3.3 Influence de $\frac{K_{a2}}{K_{a1}}$ sur l'évolution de Q^S_{obs} en fonction de ν^S : modèle à deux équilibres 102
3.4 Influence du paramètre q sur l'évolution de Q^S_{obs} en fonction de ν^S : modèle à deux équilibres 103
3.5 Évolution de la représentation $\frac{[S]_T}{[L]_T} = f(\nu^S)$ en fonction de différentes valeurs de $\tilde{K_a}$ 105
3.6 Évolution de la représentation $\frac{[S]_T}{[L]_T} = f(\nu^S)$ en fonction de différentes valeurs de $\tilde{K_a}1$: modèle à deux équilibres 106

1.1 Structure d'un point focal d'adhésion cellulaire 113
1.2 Étapes du mécanisme de migration cellulaire 115
1.3 Étapes d'action du système acto-myosine 116
1.4 Mécanisme de polymérisation des filaments d'actine 117
1.5 Champ de déplacement des microbilles fluorescentes dispersées dans une matrice support lors du mouvement cellulaire sur la surface 118
1.6 Image d'une cellule entourée de microbilles fluorescentes 119
1.7 Image du mouvement des billes contenues dasn le gel support à trois dimensions lors d'un déplacement de cellule sur la surface à deux dimensions . . . 120

2.1 Images des cellules adhérées sur des gels de différentes élastcités 127
2.2 Évolution du nombre de lamellipodes par cellule en fonction du module élastique du gel support 128
2.3 Évolution de l'aire des cellules en fonction du module élastique du gel support 130
2.4 Courbe gaussienne avec un écart-type de σ et un facteur de confiance à 5 % 132
2.5 Répartion des aires de cellules adhérées sur le gel à 19 kPa selon une loi normale (gaussienne) 133

2.6 Représentation Gaussienne de plusieurs moyennes calculées différenciables et non-différenciables 134
2.7 Représentation de la variable aléatoire T_i suivant une loi centrée réduite sous les conditions de H_0 135
2.8 Ajustement de l'évolution de l'aire de contact des cellules en fonction de la rigidité du substrat à une loi de type puissance 138
2.9 Image montrant la différence entre un lamellipode et un spicule 139

1.1 Activation de la liaison C-H par le ruthénium lors de la cycloruthénation . . 149
1.2 Schéma de synthèse des RDC 151
1.3 Schéma de synthèse de $[\mathrm{Ru(bpy_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$ 153
1.4 Vérification de la loi de Beer-Lambert pour l'absorbance des RDC et du complexe $[\mathrm{Ru(bpy_2(dppz)}]^{2+}(\mathrm{BF_4^-})_2$ 156
1.5 Comparaison de l'évolution de θ et θ_m au cours d'un dosage de RDC37Cl par de l'ADN 159

2.1 Protocole de formation des gels de polyacrylamide dans les boîtes de culture cellulaire 163
2.2 Image au microscope de microbilles fluorescentes dispersées dans un gel de polyacrylamide 164
2.3 Résultats de rhéologie des gels de polyacrylamide : valeurs des modules élastique E 165
2.4 Comparaison d'images de cellules avec et sans collagène déposé sur la surface du gel support 166
2.5 Protocole de traitement de surface des lamelles formant les boîtes de culture cellulaire 167
2.6 Traitement d'une image d'une cellule : détermination de l'aire 169