



**HAL**  
open science

# Étude de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante, par des expériences de diffusion dynamique de la lumière

Zakia Zidani Mokhtari

► **To cite this version:**

Zakia Zidani Mokhtari. Étude de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante, par des expériences de diffusion dynamique de la lumière. Autre [cond-mat.other]. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015. Français. NNT : 2015ENSL0990 . tel-01162986

**HAL Id: tel-01162986**

**<https://theses.hal.science/tel-01162986>**

Submitted on 11 Jun 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.

# THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon**

**Discipline : Physique**

**Laboratoire** de physique de l'École Normale Supérieure de Lyon

**École Doctorale** de Physique et Astrophysique

présentée et soutenue publiquement le 21 Mai 2015

par Madame Zakia ZIDANI épouse MOKHTARI



---

Etude de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante, par des expériences  
de diffusion dynamique de la lumière

---

*Directeur de thèse : M. Eric FREYSSINGEAS*

*Après l'avis de : M. Pascal HEBRAUD*

*M. Dominique VAUTIER*

*Devant la commission d'examen formée de :*

<i>M. Atef ASNACIOS, Professeur, Université Paris-Diderot</i>	<i>Membre</i>
<i>M. Arezki BOUDAUD, Professeur, Ecole Normale Supérieure de Lyon</i>	<i>Membre</i>
<i>M. Pierre BORGNAT, CR CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon</i>	<i>Membre</i>
<i>M. Axel BUGUIN, Professeur, Université Pierre et Marie Curie</i>	<i>Membre</i>
<i>M. Eric FREYSSINGEAS, Maitre de Conférences, Ecole Normale Supérieure de Lyon</i>	<i>Directeur</i>
<i>M. Pascal HEBRAUD, CR CNRS, Université de Strasbourg</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme Laurence SALOME, DR CNRS, Université de Toulouse,</i>	<i>Membre</i>
<i>M. Dominique VAUTIER, IR INSERM, Université de Strasbourg</i>	<i>Rapporteur</i>



# TABLE DES MATIERES

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.

1.1. MOTIVATION. ....	1
1.2. POURQUOI LA DIFFUSION DYNAMIQUE LUMIERE ? .....	2
1.3. RAPPELS DES TRAVAUX PIONNIERS DE M. SUISSA. ....	4
1.4. OBJECTIFS DE CETTE THESE. ....	9
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 1. ....	11

## CHAPITRE 2 : RAPPELS SUCCINCTS DE BIOLOGIE SUR LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU.

2.1. LE NOYAU : COMPOSITION ET ORGANISATION. ....	15
2.1.1. L'enveloppe nucléaire. ....	16
2.1.2. L'ADN. ....	17
2.1.3. La Chromatine. ....	18
2.1.4. Les compartiments nucléaires. ....	21
2.2. PROCESSUS BIOLOGIQUES ET CYCLE CELLULAIRE. ....	24
2.2.1. Processus biologiques fondamentaux à l'intérieur du noyau. ....	24
2.2.2. Le cycle cellulaire. ....	26
2.3. RAPPELS DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU. ....	27
2.3.1. Dynamique des territoires chromosomiques. ....	27
2.3.2. Dynamique de la chromatine au sein des territoires chromosomiques. ....	28
2.3.3. Dynamique du domaine interchromosomique. ....	29
2.3.4. « Résumé ». ....	31
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 2. ....	11

## CHAPITRE 3 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL, MATERIEL ET PROTOCOLES.

3.1. DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE. ....	37
3.1.1. Généralités et principes. ....	37
3.1.2. Origines de la diffusion de la lumière par un noyau. ....	40
3.2. MONTAGE DE DIFFUSION DE LA LUMIERE SPECIFIQUE POUR CETTE ETUDE. ....	42
3.2.1. Principe du montage et contraintes. ....	42
3.2.2. Dispositif expérimental. ....	43
3.2.3. Choix de la longueur d'onde, de la puissance et de la durée d'irradiation. ....	48
3.3. SYSTEMES BIOLOGIQUES ETUDIES ; CONDITIONNEMENT ET CONTROLE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES. ....	49
3.3.1. Systèmes biologiques étudiés. ....	49
3.3.2. Chambre de culture ; conditionnement des cellules. ....	50
3.3.3. Contrôle physiologique des cellules dans les chambres de culture. ....	52
3.4. VALIDATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL. ....	53
3.5. CONTROLE BIOLOGIQUE DES CELLULES ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX. ....	56
3.5.1. Présentation succincte de la technique de cytométrie en flux (CMF). ....	56
3.5.2. « Synchronisation » du cycle cellulaire des cellules SHEP et HeLa. ....	58
3.5.2.1. « Synchronisation » pour l'étude de la phase G1. ....	61
3.5.2.2. « Synchronisation » pour l'étude des phases S et G2. ....	63
3.5.3. Protocoles de préparation des cellules pour les expériences de diffusion de la lumière. ....	64
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 3. ....	66

## CHAPITRE 4 : INTENSITE LUMINEUSE DIFFUSEE PAR LE NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE ; CARACTERISTIQUES ET ANALYSE.

4.1. INTENSITE LUMINEUSE DIFFUSEE ; CARACTERISTIQUES DES SIGNAUX MESURES. ....	71
4.1.1. Mesure du signal brut ; « Etat de l'art ». ....	71
4.1.2. Choix des paramètres d'acquisition du signal de l'intensité diffusée. ....	74
4.1.3. Caractéristiques des signaux mesurés ; Exploration empirique de l'intensité diffusée par le noyau. ....	75

<b>4.2. METHODES D'ANALYSE DES SIGNAUX MESURES.</b> .....	78
4.2.1. Préambule. ....	78
4.2.2. Discussion globale. ....	78
4.2.3. Méthode développée pour analyser nos signaux. ....	79
4.2.3.1. <i>Principes généraux.</i> .....	79
4.2.3.2. <i>Décomposition des signaux.</i> .....	80
4.2.3.3. <i>Algorithme « CONTIN ».</i> .....	83
4.2.3.4. <i>Validation de l'algorithme « CONTIN ».</i> .....	84
<b>4.3. UN EXEMPLE DE L'APPLICATION DE NOTRE METHODE A L'ANALYSE DE SIGNAUX DIFFUSES PAR LE NOYAU.</b> .....	89
4.3.1. Résultats pour l'analyse des modes rapides de la dynamique interne du noyau. ....	89
4.3.2. Résultats pour l'analyse des modes lents de la dynamique interne du noyau. .....	92
<b>4.4. CONCLUSION.</b> .....	95
<b>BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 4.</b> .....	97

## CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION.

<b>5.1. ASPECTS « UNIVERSELS » DES RESULTATS OBTENUS.</b> .....	99
5.1.1. Intensité lumineuse diffusée en fonction de l'angle de détection. ....	99
5.1.2. Evolution temporelle rapide de la dynamique interne du noyau. ....	101
5.1.2.1. <i>Cas de la dynamique « rapide » (<math>10^{-5} - 1</math> s).</i> .....	101
5.1.2.2. <i>Cas de la dynamique « lente » (<math>10^{-2} - 30</math> s).</i> .....	108
<b>5.2. EVOLUTION DE LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE SHEP AU COURS DE SON CYCLE CELLULAIRE.</b> .	114
5.2.1. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante en phase G1. ....	114
5.2.1.1. <i>Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau en phase G1.</i> .	114
5.2.1.2. <i>Résultats : dynamique « rapide » en phase G1 pour les cellules SHEP.</i> .....	116
5.2.1.3. <i>Résultats : dynamique « lente » en phase G1 pour les cellules SHEP.</i>	122
5.2.2. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante SHEP en phase S. .	125
5.2.2.1. <i>Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau en phase S.</i> .....	125
5.2.2.2. <i>Résultats : dynamique « rapide » en phase S pour les cellules SHEP.</i>	125

5.2.2.3. Résultats : dynamique « lente » en phase S pour les cellules SHEP.	130
5.2.3. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante SHEP en phase G2.	131
5.2.3.1. Procédure pour l'étude de la dynamique du noyau en phase G2. ....	131
5.2.3.2. Résultats : dynamique « rapide » en phase G2 pour les cellules SHEP. .....	131
5.2.2.3. Résultats : dynamique « lente » en phase G2 pour les cellules SHEP.	133
5.2.4. Evolution de la dynamique interne du noyau de cellules SHEP au cours du cycle cellulaire. ....	134
5.2.4.1. Evolution de la dynamique interne « rapide ». ....	134
5.2.4.2. Evolution de la dynamique interne « rapide » en fonction de l'échelle spatiale. ....	135
5.2.4.3. Evolution de la dynamique interne « lente » en fonction de l'échelle spatiale. ....	136
<b>5.3. EVOLUTION DE LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE HeLa AU COURS DE SON CYCLE CELLULAIRE.</b> .....	140
5.3.1. Evolution de la dynamique interne du noyau des cellules HeLa en phase G1. .....	140
5.3.1.1. Résultats : dynamique « rapide » en phase G1 pour les cellules HeLa.	140
5.3.1.2. Résultats : dynamique « lente » en phase G1 pour les cellules HeLa.	148
5.3.2. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante HeLa en phase S. ....	149
5.3.2.1. Résultats : dynamique « rapide » en phase S pour les cellules HeLa.	149
5.3.2.2. Résultats : dynamique « lente » en phase S pour les cellules HeLa.	154
5.3.3. Evolution de la dynamique interne du noyau des cellules HeLa en phase G2. .....	154
5.3.3.1. Résultats : dynamique « rapide » en phase G2 pour les cellules HeLa.	154
5.3.3.2. Résultats : dynamique « lente » en phase G2 pour les cellules HeLa.	158
5.3.4. Evolution de la dynamique interne du noyau de cellules HeLa au cours du cycle cellulaire. ....	159
5.3.4.1. Evolution de la dynamique interne « rapide ». ....	159
5.3.4.2. Evolution de la dynamique interne « rapide » en fonction de l'échelle spatiale. ....	160
5.3.4.3. Evolution de la dynamique interne « lente ». ....	161
<b>5.4. DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE EN PHASE G1 « PERTURBEE » PAR DES CONTRAINTES.</b> .....	162
5.4.1. Dynamique du noyau de cellules fixées. ....	162
5.4.1.1 Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau des cellules fixées.	162

5.4.1.2. Résultats : dynamique « rapide » du noyau de cellules fixées. ....	162
5.4.1.3. Résultats : dynamique « lente » du noyau de cellules SHEP fixées. ....	162
5.4.2. Effet de la présence de l'hydroxyurée dans le milieu de culture sur la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante. ....	164
5.4.2.1 Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau en G1 sous HU. ....	164
5.4.2.2. Résultats : dynamique « rapide » de noyaux de cellules en phase G1 sous HU. ....	165
5.4.2.3. Résultats : dynamique « lente » de noyaux de cellules en phase G1 sous HU. ....	167
5.4.3. Effet de la température sur la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante. ....	168
5.4.3.1. Procédure pour l'étude de la dynamique interne du noyau à température ambiante (i.e. 23° C). ....	168
5.4.3.2. Résultats : dynamique « rapide » de noyaux de cellules en phase G1 à 23° C. ....	169
5.4.3.3. Résultats : dynamique « lente » de noyaux de cellules en phase G1 à 23° C. ....	173
5.4.3.4. Remise des cultures cellulaires à 37° C. ....	174
5.5. DISCUSSION. ....	175
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 5. ....	180

## CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6.1. RAPPELS SUR LA MOTIVATION ET LE CONTEXTE DU PROJET. ....	183
6.2. RESUMES DES TRAVAUX. ....	184
6.3. PERSPECTIVES. ....	187
6.4. CONCLUSION. ....	188



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1. MOTIVATION.

La motivation de ce travail tient au fait que la compréhension de la dynamique interne du noyau d'une cellule eucaryote<sup>1</sup> vivante semble nécessaire à la compréhension de son fonctionnement. En effet, la recherche en biologie cellulaire a montré que le noyau possède une architecture spatiale propre très organisée en domaines bien distincts [1–4]. Cette organisation est hautement dynamique et elle intervient dans tous les processus nucléaires [5]. Elle contrôle l'organisation dynamique du génome [5, 6] et donc, intervient dans la régulation de l'expression des gènes [7]. En conséquence, l'étude de la dynamique interne du noyau, qui est liée à toutes ces modifications, apparaît comme pouvant aider à mieux comprendre le noyau ; son organisation et son activité. C'est pour cette raison que l'étude des propriétés dynamiques des processus biologiques à l'intérieur du noyau a connu un essor important au cours de ces dernières années (typiquement depuis la fin des années 90). Néanmoins, si l'intérêt pour l'étude des propriétés dynamiques du noyau est fort chez les biologistes, elle semble peu intéresser les biophysiciens.

La dynamique interne du noyau d'une cellule eucaryote vivante est très complexe, impliquant une multitude de phénomènes différents qui doivent remplir des fonctions bien précises et qui se produisent sur des échelles de temps et d'espace très différentes et, de ce fait, elle est difficile à étudier. Quasiment tous les travaux qui ont été menés pour étudier cette dynamique ont été faits en utilisant des techniques sophistiquées de microscopie de fluorescence comme la microscopie de fluorescence en temps réel, la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ou la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence. Parmi ces travaux, on peut, par exemple, citer les travaux pionniers de Shav-Tal *et al.* sur la diffusion de complexes de protéines dans le noyau [8], ceux de Belmont sur le mouvement des territoires chromosomiques dans le noyau [9], ou encore, ceux de Davis et Bardeen sur la dynamique de la chromatine [10]. En pratique, les mouvements, les modifications, à l'intérieur du noyau d'une cellule vivante sont mis en évidence en suivant la diffusion de protéines [11–13], et de l'ADN [14, 15], marqués par des fluorophores. Ces techniques de fluorescence donnent des résultats très précis et très intéressants. Toutefois, les limites intrinsèques de ces mesures (marquage fluorescent, résolutions spatiale et temporelle) ne permettent pas d'analyser l'ensemble de la dynamique interne du noyau, en particulier, ils ne donnent aucune information sur la dynamique interne du noyau dans sa globalité. Ainsi, malgré les résultats particulièrement intéressants produits par toutes ces études en fluorescence et un intérêt non négligeable, la dynamique interne globale du noyau d'une cellule eucaryote vivante, qui reflète les corrélations à la fois en temps et en espace, est encore très mal connue, alors que sa connaissance s'avérerait probablement d'une grande utilité pour améliorer la compréhension que nous avons actuellement du noyau et de son activité. En conséquence, pour pouvoir obtenir, en même temps, l'ensemble de la dynamique interne du noyau, il faut changer de « paradigme » et

---

<sup>1</sup> Cellules eucaryotes : cellules pour lesquelles la quasi-totalité du matériel génétique est contenue dans un noyau séparé du reste de la cellule par une membrane nucléaire (cellules animales, ou végétales).

développer des techniques expérimentales qui ne soient pas basées sur la fluorescence (l'idée étant « d'écouter le bruit » de la cellule).

Le projet que nous avons mené et que nous décrivons dans cette thèse s'inscrit dans cette problématique. Il a eu pour but d'étudier, d'un point de vue expérimental, l'évolution de la dynamique interne globale du noyau de différentes lignées cellulaires (essentiellement SHEP : lignée de neuroblastome humain et HeLa : lignée de cancer du col de l'utérus) au cours du cycle cellulaire, qui est composé de différentes phases durant lesquelles la cellule duplique son matériel génétique et se divise (mitose) pour donner naissance à deux cellules filles identiques. Pour obtenir des informations sur cette dynamique, nous n'avons pas utilisé d'expériences de fluorescence, mais, une expérience originale de diffusion dynamique de la lumière.<sup>2</sup> Si cette technique est relativement classique pour étudier la dynamique des systèmes de la « matière molle »,<sup>3</sup> jusqu'à très récemment elle n'avait jamais été utilisée pour étudier la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante. Les premières études de ce type ont été menées au Laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon lors de la thèse de M. Suissa [16–19] et notre étude s'est inscrite dans la suite de ce travail pionnier.

## 1.2. POURQUOI LA DIFFUSION DYNAMIQUE LUMIERE ?

L'évolution des connaissances et le développement des techniques de microscopie ont permis d'avoir d'importantes informations sur la dynamique des composants du noyau, y compris à des échelles plus petites que le micromètre. Mais la grande limite de ces techniques est de toujours trouver un compromis entre une très grande résolution spatiale et/ou temporelle et le fait d'être suffisamment non-invasif pour éviter de modifier les propriétés des cellules étudiées pendant l'expérience. Pour bien faire comprendre l'intérêt de la diffusion de la lumière pour cette étude, et donc notre choix, nous allons ici présenter les différentes techniques pouvant donner accès à des informations sur la dynamique interne du noyau, avec leurs avantages et leurs inconvénients.

*Microscopie de fluorescence en temps réel.* Cette technique, peut-être la plus simple à mettre en œuvre, consiste à suivre, avec une caméra, des protéines, ou des régions d'intérêt, marquées par des éléments fluorescents. Cette technique ne permet de suivre qu'un nombre limité d'objets marqués,<sup>4</sup> elle ne permet donc pas d'obtenir des informations sur la dynamique globale du noyau. Les techniques de microscopie de fluorescence, FRAP, vidéo microscopie time-lapse, ..., utilisent des caméras, les mouvements de protéines d'intérêt étant ensuite analysés grâce au « film » obtenu. Même en utilisant des caméras rapides, avec ces techniques, on peut difficilement accéder à des temps très courts. En effet, la faible luminosité des protéines fluorescentes nécessite des temps d'exposition longs qui limitent grandement la vitesse d'acquisition. Les temps d'acquisition sont rarement inférieurs à la centaine de millisecondes, ce qui ne permet pas de voir des mouvements rapides. Si l'on veut diminuer ces temps d'acquisition, il faut augmenter la puissance du faisceau

---

<sup>2</sup> Cette technique est sensible aux fluctuations de l'indice de réfraction du milieu traversé par la lumière. Une description « basique » des principes de la technique de diffusion dynamique de la lumière sera donnée au chapitre 3 de ce manuscrit

<sup>3</sup> La matière molle est un domaine de recherche à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie qui s'intéresse à l'étude de systèmes physico-chimiques très variés, que l'on appelle aussi fluides complexes ; c'est tout ce qui va des matières plastiques aux bulles de savon, en passant par les gels, les élastomères, les cristaux liquides, les crèmes cosmétiques, les boues, les pâtes céramiques, etc ...

<sup>4</sup> La GFP (Green Fluorescent Proteines) protéine fluorescente la plus répandue n'est pas considérée comme étant invasive. Toutefois, on pourrait remettre cela en cause si plus de quelques protéines différentes sont fusionnées.

laser qui excite la fluorescence ce qui induira, automatiquement, des dommages dus à l'irradiation (les faisceaux laser qui excitent la fluorescence émettent dans le bleu, ou dans le vert et, même à faible dose, ils peuvent déjà provoquer des dommages au noyau [20]). De plus, pour être détectés, les mouvements des objets marqués doivent être plus grands que la résolution de l'objectif de microscope utilisé et l'observation est limitée dans le temps à cause du photo-blanchiment des fluorophores.

*Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence.* Une seconde technique, toujours basée sur la fluorescence d'objets et qui, dans son principe, s'approche de la diffusion dynamique de la lumière est la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) [21, 22]. Cette technique consiste à exciter grâce à un faisceau laser la fluorescence de particules marquées se déplaçant dans un volume d'excitation de l'ordre de  $1 \mu\text{m}^3$ , puis à collecter la fluorescence émise dans une direction grâce à un compteur de photons. Le déplacement des particules dans le volume d'excitation entraîne des variations de l'intensité de fluorescence qui sont ensuite analysées pour remonter aux coefficients de diffusion de ces objets. Cette méthode se développe, actuellement, fortement en biologie et sonde des échelles de temps qui vont de la microseconde à quelques secondes [21, 22]. Toutefois, elle présente l'ensemble des limitations liées à l'utilisation de la fluorescence. Tout d'abord, cette technique ne peut pas donner une information globale sur la dynamique interne du noyau puisqu'elle ne peut suivre que des particules marquées (donc, généralement des protéines, ou des complexes protéiques). Ensuite, une autre limitation, propre à cette technique, s'ajoute, il ne faut pas que deux particules traversent le volume d'excitation en même temps au risque de fausser l'analyse du signal. Cela implique que les particules suivies doivent être en régime dilué à l'échelle du volume d'excitation. Les concentrations dans le noyau de la plupart des éléments étant en général élevées, cette méthode ne peut s'appliquer dans le noyau que sur des volumes d'excitation très petits pour n'avoir qu'un seul objet d'intérêt. En conséquence, cette méthode ne va pouvoir donner, en général, que des informations très locales sur la dynamique du noyau.

En conséquence, pour avoir accès à la dynamique interne globale du noyau d'une cellule vivante, il semble évident qu'il faille changer de paradigme et développer des techniques qui sondent des propriétés globales caractérisant le noyau et pas un objet marqué par un fluorophore. Avec des techniques optiques, la grandeur globale naturelle qui caractérise le noyau est son indice de réfraction ; des modifications spatio-temporelles de la structure interne du noyau, de son activité, vont faire fluctuer la valeur de cet indice autour sa valeur moyenne. On peut alors penser à trois techniques : la Microscopie par Contraste Interférentiel, la Microscopie à Contraste de Phase et enfin la Diffusion Dynamique de la Lumière.

*Microscopie par Contraste Interférentiel.* Cette technique consiste à mesurer l'évolution temporelle de la figure d'interférence créée par la différence de phase existante entre un faisceau laser traversant la cellule et un faisceau laser de référence. Comme en diffusion de la lumière, nous sommes ici sensibles aux fluctuations de l'indice de réfraction du milieu traversé. A notre connaissance, cette méthode n'a été, jusqu'à présent, utilisée que par un seul groupe [23]. La résolution spatiale est de l'ordre du micromètre et la résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de millisecondes. La microscopie par contraste interférentiel a donc l'avantage de permettre d'étudier la dynamique intracellulaire de façon plus globale que les méthodes précédemment présentées, avec, de plus, une excellente résolution temporelle.

*Microscopie à Contraste de Phase.* Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple d'utilisation de cette méthode pour l'étude de la dynamique interne du noyau. L'idée serait de faire l'image du noyau à l'aide de la microscopie à contraste de phase et de faire un « film » pour suivre les évolutions temporelles de cette image. Là encore, nous sommes sensibles aux fluctuations de l'indice de réfraction du milieu traversé. Cette méthode donnerait ainsi accès à

des informations sur la dynamique globale du noyau, elle serait non-invasive et non-destructive. Mais la faible luminosité des images de contraste de phase imposerait certainement des temps d'exposition longs pour avoir des images exploitables, ce qui limiterait fortement la gamme de temps accessible.

*Diffusion dynamique de la lumière.* C'est une technique déjà ancienne, bien développée et parfaitement adaptée à l'étude des propriétés dynamiques des systèmes moléculaires organisés [24, 25], qui sonde les variations spatio-temporelles de l'indice de réfraction du milieu traversé. Elle est, depuis longtemps, utilisée avec succès en physique de la « matière molle », que ce soit pour l'étude des propriétés dynamiques des systèmes colloïdaux, des tensioactifs, des polymères en solutions, des gels ou des cristaux liquides. Comme la *Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence*, les gammes de temps sondées en *Diffusion Dynamique de la Lumière* vont de la microseconde à quelques secondes. La diffusion de la lumière a déjà été utilisée pour étudier des systèmes biologiques. Cependant, ces études ont, à ce jour, principalement porté sur des cellules en suspension pour caractériser la taille des cellules ou du noyau, *in vitro* [26, 27], ou dans des tissus vivants [28]. D'autres groupes ont étudié, avec cette technique, les propriétés mécaniques et de diffusion de colloïdes de macromolécules [29] ou encore les propriétés dynamiques des membranes [30]. Les propriétés dynamiques de l'ADN en solution ont également été étudiées [31]. À notre connaissance, aucune étude n'avait jamais porté sur l'étude de la dynamique interne d'un système vivant par l'analyse de la lumière diffusée avant les travaux de thèse de Michaël Suissa [16–19]

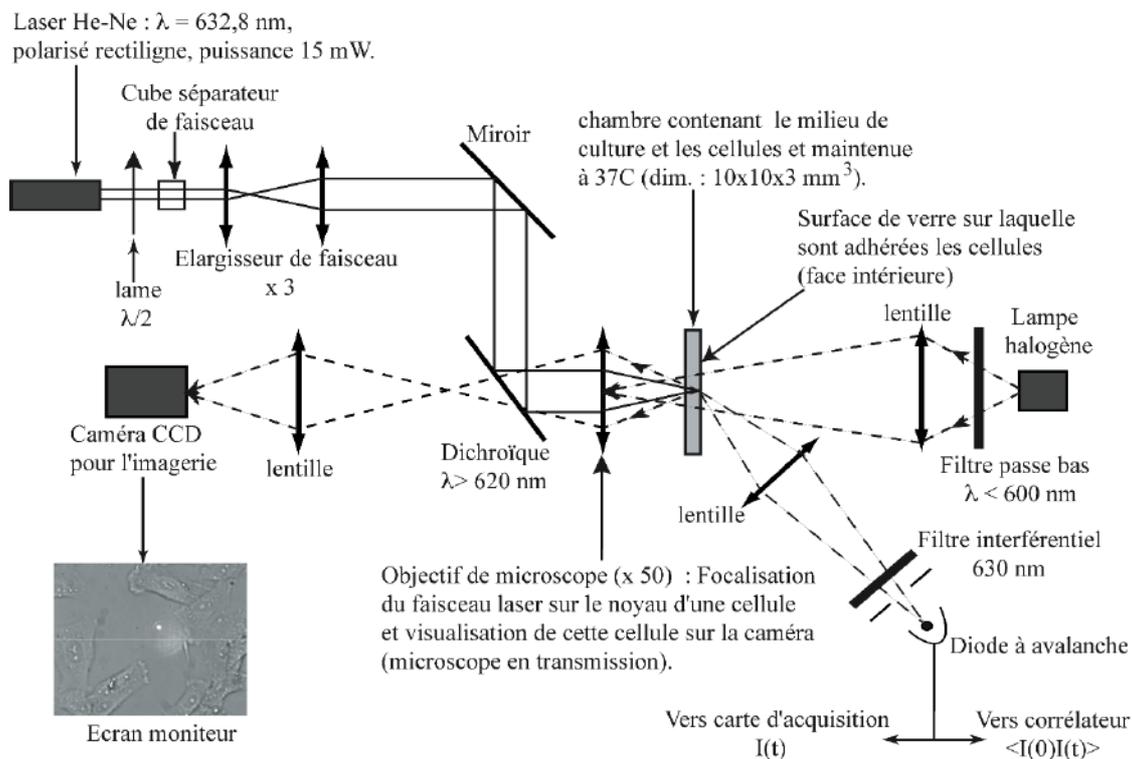
Donc, pour avoir accès à la dynamique interne globale du noyau, sur des échelles de temps assez large, la *Diffusion Dynamique de la Lumière* et la *Microscopie par Contraste Interférentiel* semblent être les techniques appropriées. Malgré tout, ces techniques présentent quelques inconvénients ; comme elles donnent des informations « globales », cela pose des problèmes d'interprétation des résultats obtenus. En effet, contrairement aux techniques basées sur la fluorescence qui suivent des processus bien identifiés (et souvent choisis), il n'est pas évident d'identifier les processus à l'origine des variations d'indice observées et donc de savoir de quels phénomènes on est en train de mesurer la dynamique. On ne peut donc pas dire que la *Diffusion Dynamique de la Lumière*, ou la *Microscopie par Contraste Interférentiel*, soient des techniques « supérieures » aux techniques de fluorescence pour étudier la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante. Ce sont des techniques qui apportent des informations différentes et qui sont complémentaires de celles que l'on obtient par les autres méthodes.

### 1.3. RAPPELS DES TRAVAUX PIONNIERS DE M. SUISSA.

Avant de décrire nos propres travaux, il nous semble important de présenter succinctement les premiers résultats concernant l'utilisation de la diffusion dynamique de la lumière comme outil pour l'étude de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante et qui ont été obtenus par Michaël Suissa au cours sa thèse au Laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon sous la direction d'Eric Freyssingeas (2002-2006 ; en collaboration avec Christophe Place et Evelyne Goillot) [16–19].

Dans un premier temps, Suissa *et al.* ont construit un montage expérimental original de diffusion dynamique de la lumière (présentée en Figure 1.1.) qui leur a permis de réaliser des expériences de diffusion dynamique de la lumière sur un seul noyau. Comme dans toute expérience de diffusion de la lumière, ils font passer un faisceau laser à travers l'échantillon, c'est-à-dire l'intérieur du noyau d'une cellule vivante et, dans une direction donnée, ils recueillent sur un détecteur la lumière diffusée par le volume éclairé. Le principe de ce montage était le suivant : un

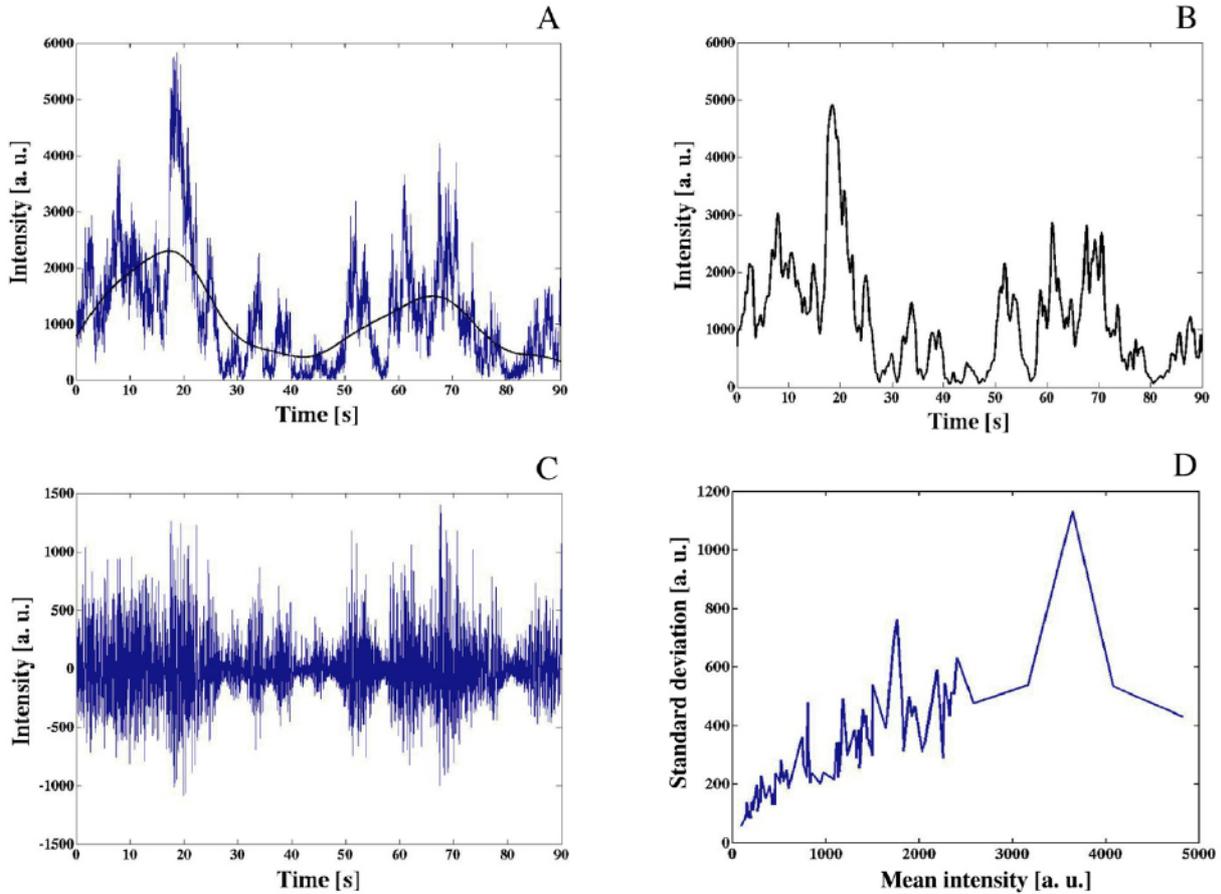
objectif de microscope (50x) focalise un faisceau Laser HeNe sur une surface de verre sur laquelle les cellules sont adhérentes et, en même temps, il permet de visualiser les cellules présentes sur cette surface et ainsi de sélectionner le noyau qui va être irradié. Une lentille fait l'image du volume diffusant (le noyau irradié) sur l'entrée d'une fibre monomode connectée à une photodiode à avalanche (ADP). L'intensité diffusée recueillie par cette optique de collection est envoyée soit vers une carte d'acquisition (DT322 de Data Translation), qui mesure le signal  $I(t)$ , soit vers une carte corrélateur (BI900AT de Brookhaven Instrument), qui mesure la fonction d'autocorrélation du signal  $\langle I(t)I(0) \rangle$ . Dans le même temps, ils ont mis au point un certain nombre de protocoles de manipulation des cellules vivantes, afin de les conserver sur ce montage dans des conditions physiologiques optimales qui leurs assurent un fonctionnement normal pendant toute la durée des expériences.



**Figure 1.1.** Représentation schématique du montage expérimental mis au point par *Suissa et al.* pour les expériences de diffusion dynamique de la lumière dans le noyau des cellules. La lame  $\lambda/2$  associée au cube séparateur permet de sélectionner la puissance lumineuse incidente que l'on focalise sur le noyau. L'élargisseur de faisceau permet d'avoir un « spot » laser inférieur au diamètre du noyau des cellules étudiées. Le miroir dichroïque permet de renvoyer le faisceau laser vers l'objectif tout en transmettant la lumière blanche vers la caméra CCD pour faire de l'imagerie (photo). Le filtre interférentiel placé avant la photodiode à avalanche (ADP) permet de ne mesurer que les « photons rouges » dans la bande 620–640 nm. Le filtre passe-bas placé après la lampe halogène permet d'éviter que des « photons rouges » émis par cette lampe et réfléchis par les surfaces de verre soient mesurés par l'ADP.

Ensuite, grâce à ce dispositif expérimental et à ces protocoles, ils ont pu étudier la dynamique globale du noyau de cellules de neuroblastome humain de la lignée SHEP [32], au cours de l'interphase, tout d'abord, en présence d'un agent pharmacologique bloquant la progression du

cycle cellulaire et ensuite dans des conditions normales de culture. Les résultats ainsi obtenus montrent clairement l'existence de quatre échelles de temps très différentes.

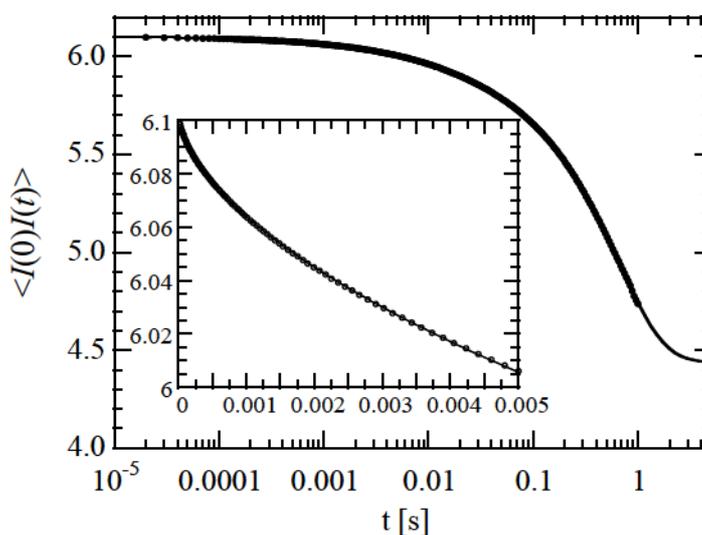


*Figure 1.2. Moyenne et bruit du signal correspondant à l'intensité de la lumière diffusée par le noyau d'une cellule vivante en fonction du temps. Le temps d'échantillonnage de la carte d'acquisition est de 1 ms. La mesure a été effectuée pendant 90 s. A) Signal brut sur 90 s et, en trait plein, modulation du signal sur temps long obtenue en faisant la moyenne glissante du signal brut sur 10 s. B) Signal brut moyenné sur 1 s. C) Bruit autour de la moyenne (Signal brut mesuré - Moyenne sur 1 s). D) Ecart type en fonction de la moyenne de l'intensité sur chaque seconde.*

La Figure 1.2, montre le signal brut diffusé au cours du temps par un noyau (donc  $I(t)$ ). Ceci permet une analyse qualitative de la dynamique interne du noyau, mais, malheureusement, ne permet pas d'aller beaucoup plus loin. En effet, un des problèmes du travail de thèse de Michaël Suissa est l'absence de procédures fiables pour sortir des informations du signal brut mesuré. Cependant, cette analyse qualitative du signal brut montre des modulations douces de l'intensité diffusée se produisant sur des périodes de temps qui sont, typiquement, de l'ordre de 30 à 40 secondes. Pour Suissa *et al.*, ces temps correspondent à ceux auxquels on peut s'attendre, dans la configuration expérimentale utilisée, pour la diffusion Brownienne des fibres de chromatine à l'intérieur des territoires chromosomiques. En effet, en utilisant les coefficients de diffusion mesurés par d'autres équipes pour la diffusion de la chromatine dans les territoires chromosomiques [33–35] pour les angles de diffusion utilisés dans leur étude, Suissa *et al.* s'attendent à des temps caractéristiques  $\tau$  ( $\tau \propto 1/Dq^2$ ) qui sont de l'ordre de 30 – 60 s, donc, du même ordre de grandeur que ceux qu'ils observent. Sur ces modulations lentes se superposent des « pics » d'intensité, c'est-

à-dire des augmentations fortes, rapides et brèves de l'intensité diffusée (typiquement sur une durée de 1 s). Ces pics d'intensité se produisent très régulièrement, environ toutes les 3 – 4 s ; par conséquent, ils pourraient être dus à une activité cyclique dans le noyau.

Pour obtenir des informations plus quantitatives sur la dynamique interne du noyau, Suissa *et al.* ont dû utiliser un corrélateur qui mesure les fonctions d'autocorrélation des fluctuations temporelles de l'intensité diffusée (Figure 1.3). Ceci réduit la fenêtre des temps sondés à l'intervalle :  $10^{-4}$  – 1 s. De plus, du fait de la non stationnarité du signal diffusée (qui est intrinsèque au système étudié), et de l'existence de temps longs, l'analyse des fonctions d'autocorrélation mesurées, qui se fait par un ajustement de ces fonctions à l'Équation 1.1, qui est la somme d'une exponentielle étirée (pour les temps « courts ») et d'une exponentielle simple (pour les temps « plus longs »), ne leur a pas permis de prendre en compte toute la richesse de ce signal.



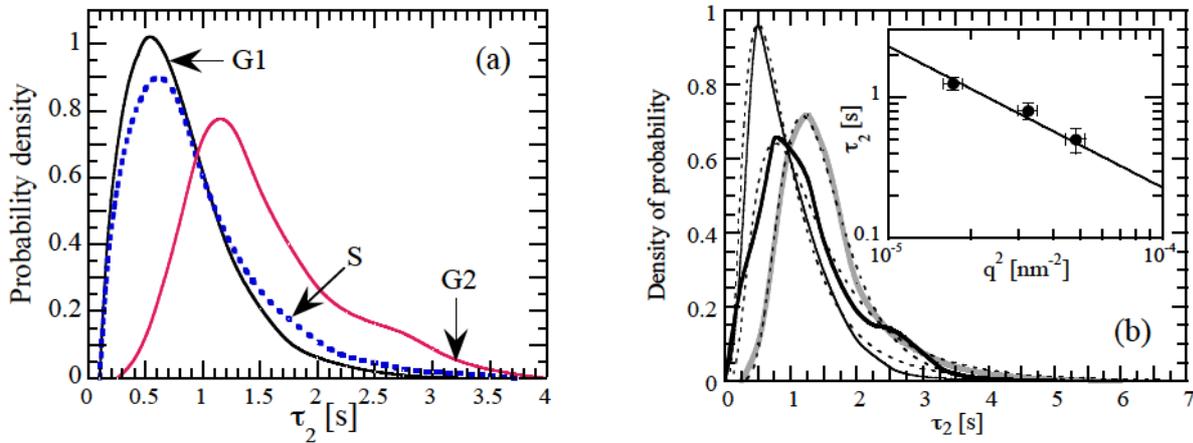
**Figure 1.3.** Fonction d'autocorrélation typique de l'intensité diffusée par un noyau de cellule ; représentation en échelle semi-logarithmique. La ligne continue est l'ajustement de cette fonction d'autocorrélation obtenue en utilisant l'équation 1.1. Insert : partie aux temps courts de la fonction d'autocorrélation, en représentation linéaire ; la ligne continue est l'ajustement de cette courbe obtenue en utilisant la fonction de test :  $A - Bt^a$ , ce qui permet d'estimer la valeur de  $a$ .

$$\langle I(0)I(t) \rangle = \left( A_1 \exp\left(-t/\tau_1\right)^\alpha + A_2 \exp(-t/\tau_2) \right)^2 + C \quad (1.1)$$

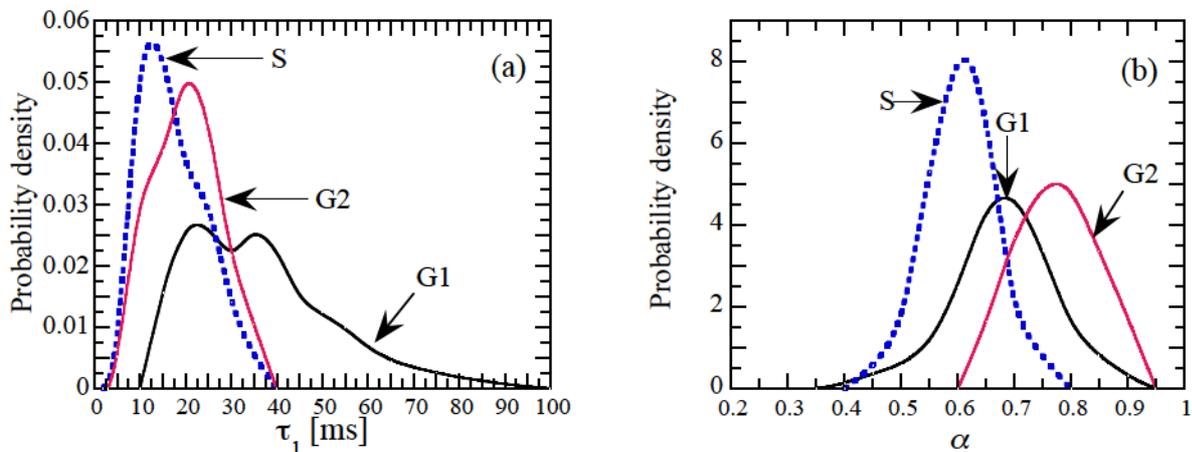
Cette analyse quantitative de la dynamique interne du noyau fait apparaître deux temps caractéristiques, bien distincts, inférieurs à la seconde :

i) Tout d'abord une dynamique « lente », avec des temps caractéristiques de l'ordre de 0,5 – 1 s (Figure 1.4). D'après leurs résultats, elle semble due à des processus diffusifs avec un coefficient de diffusion de l'ordre de  $0,04 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Sur la base de résultats obtenus par Shav-Tal *et al.* [8], ils pensent que cette dynamique correspond à la diffusion de complexes protéiques dans le noyau. Ce mode évolue en fonction de la phase du cycle cellulaire, en particulier, il semble plus lent en phase G2 que dans les autres phases. Ils supposent que ce ralentissement est dû à une augmentation de la viscosité apparente du noyau en phase G2 suite au doublement de sa

concentration en ADN. Il est à noter que la présence d'une drogue cytobloquante (l'Hydroxyurée dans ce cas) dans le milieu de culture conduit, elle aussi, à un ralentissement de ce mode.



**Figure 1.4.** Distributions du temps de relaxation associées au mode le plus lent mesuré par l'analyse des fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée: a) dans les différentes phases du cycle cellulaire, G1, S et G2 ; on observe un ralentissement important en phase G2, b) En phase G1 sous HU, pour trois angles de diffusion différents, 16°, 22°, 27°, en insert : évolution de la position du maximum de la distribution en fonction du carré du vecteur d'onde, ce résultat indique que ce mode est probablement d'origine diffusive.



**Figure 1.5.** a) Distributions du temps de relaxation associées au mode le plus rapide mesuré par l'analyse des fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée. b) Distributions de l'exposant d'étirement associées au mode le plus rapide mesuré par l'analyse des fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée. Ces 2 distributions indiquent clairement que cette dynamique rapide évolue fortement au cours du cycle cellulaire.

ii) Une dynamique plus « rapide », avec des temps de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes. Cette dynamique semble plus complexe, en effet, la partie de la fonction d'autocorrélation associée à cette dynamique rapide est décrite par une exponentielle étirée. De ce fait, ce mode correspond très probablement à un ensemble de processus dont les temps caractéristiques se distribuent sur une base très large. En ce sens, ce mode de relaxation présente des analogies avec les modes de relaxation de systèmes physiques hors équilibre en train de

« vieillir » et, de cette analogie, ils supposent que les distributions de temps sondées sont la signature de relaxations s'effectuant par un ensemble de processus hiérarchisés. Parmi les processus biologiques ayant lieu dans le noyau, c'est le cas du remodelage de la fibre de chromatine (compaction et décompaction), qui se fait par une succession ordonnée de processus différents. Ils pensent ainsi que ce mode rapide a pour origine les processus collectifs de restructuration des fibres de chromatine. Dans ce cadre-là, les différences entre les phases G1, S et G2 (Figure 1.5), pourraient s'expliquer par des états de compaction différents de la chromatine dans chacune des phases du cycle cellulaire, liés à l'activité spécifique de ces phases.

De plus, leurs résultats montrent clairement que la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante est très fortement dépendante de l'état de la chromatine à l'intérieur du noyau (à notre connaissance, cela n'avait jamais été montré expérimentalement avant, même si les gens s'en doutaient). Elle est sensible à la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule et par conséquent à la présence dans le milieu de culture d'un agent pharmacologique ayant un effet cytobloquant.

Les résultats de Suissa *et al.* montrent que la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante est à la fois riche et complexe : hétérogène en temps et en espace, avec plusieurs échelles de temps allant de quelques millisecondes à quelques dizaines de secondes. Bien sûr, la richesse et la complexité de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante ne sont pas une surprise ; cela confirme les études en fluorescence menées par d'autres groupes ces dernières années. Néanmoins, ces premiers résultats indiquent que cette technique est tout à fait prometteuse pour ce genre d'études, à condition que ces travaux « pionniers » soient complétés et approfondis. En particulier en développant des outils d'analyse fiables du signal brut pour pouvoir sonder cette dynamique dans toute sa richesse, des temps courts aux temps très longs.

#### 1.4. OBJECTIFS DE CETTE THESE.

Notre but en commençant cette thèse était donc d'aller plus loin que les premiers travaux de Michaël Suissa et, nous nous sommes fixés quatre objectifs majeurs.

1. Dans un premier temps, celui de remonter un dispositif expérimentale plus performant. Avec, en particulier, 4 angles de détection différents ( $11^\circ$ ,  $16^\circ$ ,  $27^\circ$  et  $38^\circ$ ), nous permettant ainsi de faire une mesure simultanée de la dynamique interne du noyau à différents vecteurs d'onde, afin d'étudier la nature des différents temps observés, pour savoir s'ils sont diffusifs, balistiques ....
2. Dans un second temps, trouver (en collaboration avec Pierre Borgnat) une manière d'analyser le signal brut qui nous permette d'appréhender l'ensemble de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante et d'extraire l'ensemble des temps caractéristiques contenus dans ce signal.
3. Une fois le « verrou technique » que constitue l'analyse des données débloqué, avec l'aide d'Evelyne Goillot, reprendre, tout d'abord, l'étude déjà effectuée par Michaël Suissa lors de sa thèse (*i.e.* suivre l'évolution de la dynamique au cours du cycle cellulaire dans les cellules SHEP) pour confirmer notre nouvelle approche et approfondir ces premiers travaux. Puis, ensuite étudier l'évolution de la dynamique au cours du cycle cellulaire pour d'autres types cellulaires.

4. La quatrième étape de notre projet était de trouver des liens entre le signal diffusé et des processus biologiques. Pour cela, en utilisant notre technique, nous souhaitions obtenir des mesures quantitatives sur la dynamique interne de noyaux de cellules vivantes dans des conditions de cultures différentes des conditions normales. En comparant la dynamique obtenue après de telles modifications à celle obtenue sur des noyaux dans des conditions de culture normale, nous devrions obtenir des informations sur les liens entre la dynamique interne du noyau et l'état du noyau. Parmi les modifications possibles, nous avons pensé utiliser l'effet de la température, la déplétion en ATP, le stress osmotique, malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de tout explorer.

Le plan de ce manuscrit est le suivant. D'abord, au Chapitre 2, nous allons rappeler les concepts de biologie nécessaires pour comprendre le travail que nous présentons ici, ainsi qu'un état de l'art des connaissances actuelles sur la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante. Ensuite, au troisième chapitre, nous présenterons succinctement les principes de la diffusion dynamique de la lumière, les processus que nous croyons être à l'origine de la diffusion de la lumière par un noyau, le montage expérimental de diffusion de la lumière que nous avons développé pour réaliser nos expériences, les systèmes biologiques sur lesquels nous avons travaillé ainsi que les protocoles utilisés pour le conditionnement, le contrôle et la synchronisation des cellules sur lesquelles nous avons mené nos expériences. Chapitre 4, nous présenterons les techniques de traitement du signal que nous avons mis au point pour extraire des signaux que nous avons mesurés les informations sur la dynamique interne du noyau. Chapitre 5, nous présenterons les principaux résultats que nous avons obtenus lors de cette thèse. Nous finirons, Chapitre 6, en essayant de présenter un certain nombre des perspectives ouvertes par ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 1

1. Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Müller S., Solovei I. et Fakan S., Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology*, **18** : 307-316 (2006).
2. Spector D. L., The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annual Review of Biochemistry*, **72** : 573–608 (2003)
3. Dundr M. et Misteli T., Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*, **356** : 297–310 (2001).
4. Bridger J. M., Boyle S., Kill I. R. et Bickmore W. A., Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Current biology*, **10** : 149–152 (2000).
5. Wood, Ashley M., Garza-Gongora, Arturo G., Kosak et Steven T., A Crowdsourced nucleus: Understanding nuclear organization in terms of dynamically networked protein function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1839** : 178-190 (2014).
6. Misteli T., Self-organization in the genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **106** : 6885–6886 (2009).
7. Brown K., Nuclear structure, gene expression and development. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*, **9** : 203–212 (1999).
8. Shav-Tal Y., Darzacq X., Shenoy S. M., Fusco D., Janicki S. M., Spector D. L. et Singer S. H., Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, **304** : 1797–1800 (2004).
9. Belmont A. S., Visualizing chromosomes dynamics with GFP. *Trends in Cell Biology*, **11** : 250–257 (2001)
10. Davis S. K. et Bardeen C. J., The connection between chromatin motion on the 100 nm length scale and core histone dynamics in live XTC-2 cells and isolated nuclei. *Biophysical Journal*, **86** : 555–564 (2004).
11. Belmont A. S. et Straight A. F., In vivo visualization of chromosomes using lac operator-repressor binding. *Trends in Cell Biology*, **8** : 121–124 (1998).
12. Buchenau P., Saumweber H. et Arndt-Jovin D. J., The dynamic nuclear redistribution of an hnRNP K-homologous protein during *Drosophila* embryo developments and heat shock. Flexibility of transcription sites in vivo. *Journal of Cell Biology*, **137** : 291–303 (1997).
13. Marshall W. F., Straight A., Marko J. F., Swedlow J., Dernburg A., Belmont A. S., Murray A. W., Agard D. A. et Sedat J. W., Interphase chromosome undergo constrained diffusional motion in living cells. *Current Biology*, **7** : 930–939 (1997).
14. Zink D. et Cremer T., Cell nucleus : chromosome dynamics in nuclei of living cells. *Current Biology*, **8** : R321–R324 (1998) ;
15. Zink D., Cremer T., Saffrich R., Fischer R., Trendelenburg M. F., Ansorge W. et Stelzer E. H., Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Human Genetics*, **102** : 241–251 (1998).

16. Suissa Michaël, Thèse de doctorat de l'École Normale Supérieure de Lyon : Dynamique Interne du noyau d'une cellule vivante : Etude par diffusion dynamique de la lumière. N° 06ENSL0 363 (2006)
17. Suissa M., Place C., Goillot É., Berge B. et Freyssingeas É., Dynamic Light Scattering as an Investigating Tool to Study the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus. *Europhysics Letters*, **78** : 38005 (2007).
18. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingeas É., Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus Investigated by Dynamic Light Scattering. *European Physical Journal E*, **26** : 435–448 (2008).
19. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingeas É., Evolution of the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus during Interphase. *Biophysical Journal*, **97** : 453–461 (2009).
20. With A. et Greulich K. O., Wavelength dependence of laser-induced DNA damage in lymphocytes observed by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **30** : 71–76 (1995).
21. Lamb D. C., Müller B. K. et Bräuchle C., Enhancing the sensitivity of fluorescence correlation spectroscopy by using time-correlated single photon counting. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **6** : 405–414 (2005).
22. Vukojevic V., Pramanik A., Yakovleva T., Rigler R., Terenius L. et Bakalkin G., Study of molecular events in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62** : 535–550 (2005).
23. Sosnovtseva O. V., Pavlov A. N., Brazhe N. A., Erokhova L. A., Maksimov G. V. et Mosekilde E., Interference microscopy under Double-Wavelet Analysis; A New Approach to studying Cell Dynamics. *Physical Review Letters*, **94** : No. 218103 (2005).
24. Berne B. J et Pecora R., Dynamic Light Scattering, with application to Chemistry, Biology and Physics, 2nd edition, Ed. Dover publication Inc. (2000).
25. Chu B., Laser Light Scattering. Basic Principles and Practice. Academic Press, London. (1991) et, Light Scattering: Principles and development, Monographs on the Physics and Chemistry of Materials, Oxford University Press, Wyn Brown Ed. (1996).
26. Mourant J. R., Hielscher A. H., Eick A. A., Johnson T. M. et Freyer J. P., Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells. *Cancer*, **84** : 366–374 (1998).
27. Hahn W. C., Counter C. M., Lundberg A. S., Beijersbergen R., Brooks M. W. et Weinberg R. A., Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature*, **400** : 464–468 (1999).
28. Backman V., Wallace M. B., Perelman L. T., Arendt J. T., Gurjar R., Müller M. G., Zhang Q., Zonios G., Kline E., McGillican T., Shapshay S., Valdez T., Badizadegan K., Crawford J. M., Fitzmaurice M., Kabani S., Levin H. S., Seiler M., Dasari R. R., Itzkan I., Van Dam J. et Feld M. S., Detection of preinvasive cancer cells. *Nature*, **406** : 35–36 (2000).
29. Janmey P. A., Hvidt S., Kas J., Lerche D., Maggs A., Sackmann E., Schliwa M. et Stossel T. D., The mechanical properties of actin gels. Elastic modulus and filament motions. *Journal of Biological Chemistry*, **269** : 32503–32513 (1994).

30. Tishler R. B. et Carlson F. D., A study of the dynamic properties of the human red blood cell membrane using quasi-elastic light scattering spectroscopy. *Biophysical Journal*, **65** : 2586–2600 (1993).
31. He S., Arscott P. G. et Bloomfield V. A., Condensation of DNA by multivalent cations experimental studies of condensation kinetics. *Biopolymers*, **53** : 329–341 (2000).
32. Johnsen J. I., Pettersen I., Ponthan F., Sveinbjornsson B., Flaegstad T. et Kogner P., Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon-gamma and Trail. *International Journal of Oncology*, **25** : 1849 (2004).
33. Davis S. K. et Bardeen C. J., Cross-linking of histone proteins to DNA by UV illumination of chromatin stained with Hoechst 33342. *Photochemistry and Photobiology*, **77** : 675–679 (2003).
34. Davis S. K. et Bardeen C. J., The connection between chromatin motion on the 100 nm length scale and core histone dynamics in live XTC-2 cells and isolated nuclei. *Biophysical Journal*, **86** : 555–564 (2004).
35. Davis S. K et Bardeen C. J., Time-resolved Microscopy of Chromatin In Vitro and In Vivo. *Photochemistry and Photobiology*, **81** : 548–555 (2005).



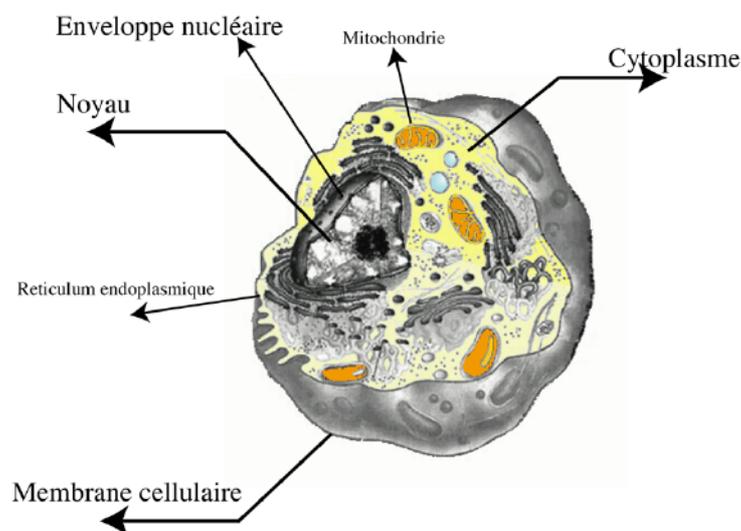
## CHAPITRE 2

### RAPPELS SUCCINCTS DE BIOLOGIE SUR LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU.

Bien que le noyau soit indissociable de la cellule, nous n'allons pas ici faire des rappels sur l'ensemble de la biologie de cellule, mais, seulement sur celle du noyau. Nous allons nous contenter de rappeler brièvement sa composition, son organisation, les processus qui ont lieu en son sein ainsi que les connaissances actuelles sur la dynamique associée à cette organisation et ces processus.

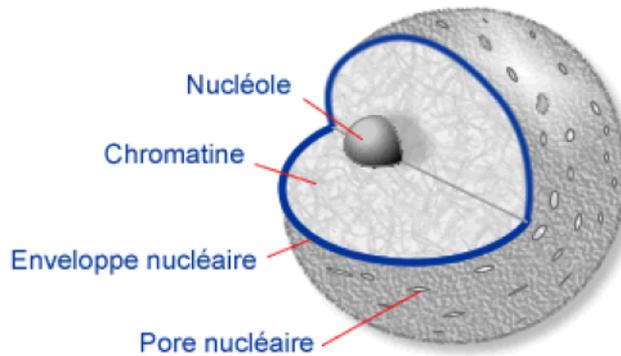
#### 2.1. LE NOYAU : COMPOSITION ET ORGANISATION.

Le noyau est le centre organisateur des cellules eucaryotes (*i.e.* des cellules animales ou végétales), c'est l'organite qui est le siège de la quasi-totalité de l'information génétique de la cellule. Dès la fin du 19ème siècle, il a été établi que chaque cellule contenait en elle toute l'information nécessaire à son développement et à son évolution. Cette information est contenue dans ce que l'on a appelé les gènes, qui sont portés par les molécules d'ADN (molécule identifiée plus tard, vers le milieu du 20ème siècle), « rassemblées » à l'intérieur du noyau en chromosomes. De plus, le noyau contient tout le matériel nécessaire à la transcription (*i.e.* à l'expression des gènes) et à la réplication de ces gènes. Le noyau a deux fonctions principales : contrôler les réactions chimiques du cytoplasme et stocker les informations nécessaires à la division cellulaire. Il est de forme plutôt sphérique et a un diamètre variant de 5 à 7 microns. En comparaison à certains organites, il s'agit donc d'une importante structure cellulaire.



**Figure 2.1.** Représentation d'une cellule eucaryote. On distingue le noyau, siège de l'information génétique, l'enveloppe nucléaire, le cytoplasme et la membrane cellulaire.

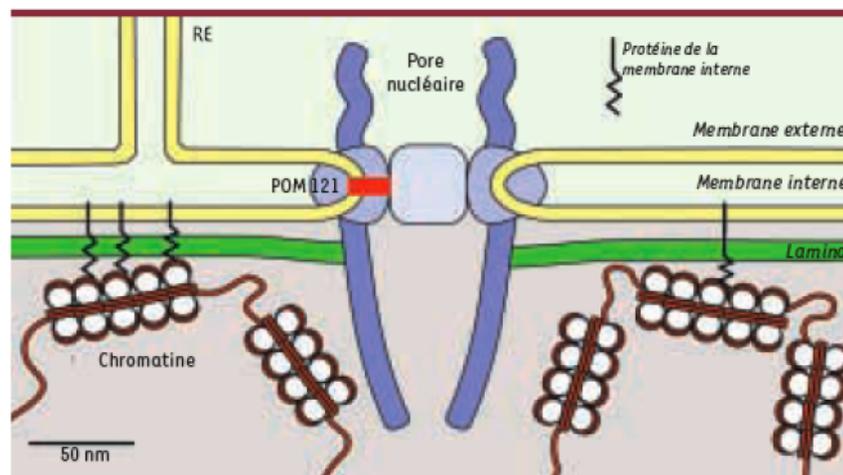
Le noyau est séparé du reste de la cellule (*i.e.* du cytoplasme) par une enveloppe appelée enveloppe nucléaire. Le volume contenu à l'intérieur de cette enveloppe est appelé nucléoplasme.



**Figure 2.2.** Schéma représentatif du noyau d'une cellule eucaryote. Les différents éléments qui apparaissent sur cette figure sont décrits dans la suite.

### 2.1.1. L'enveloppe nucléaire.

L'enveloppe nucléaire définit les contours du noyau (Figure 2.3.) ; elle permet d'isoler le noyau du cytoplasme<sup>1</sup> et protège ainsi le matériel génétique de la cellule. C'est une barrière active qui permet des échanges de flux et de matière entre le noyau et le cytoplasme. Elle joue un rôle fondamental dans de nombreux phénomènes physiologiques, comme la régulation du trafic de protéines et d'autres macromolécules [1] qui vont participer aux modifications de la chromatine.



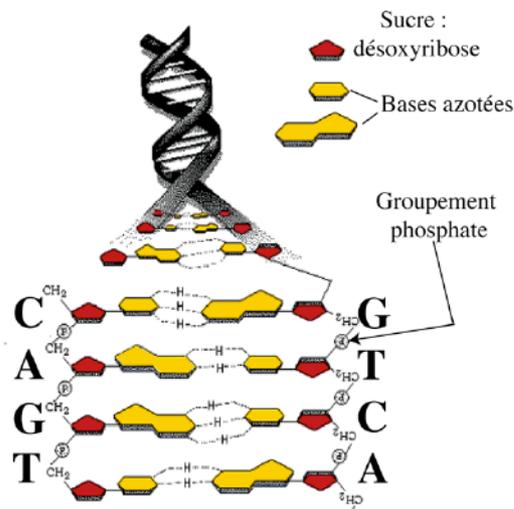
**Figure 2.3.** Représentation schématique de la structure de l'enveloppe nucléaire. La membrane interne est connectée à la lamina et sert de point d'ancrage à certains éléments du noyau. La membrane externe est au contact du cytoplasme et est reliée à la membrane interne au niveau des pores nucléaires. Ces derniers permettent un échange sélectif de molécules entre le noyau et le cytoplasme.

<sup>1</sup> Terme général désignant tout le matériel vivant se trouvant à l'intérieur des cellules, exception faite du noyau.

On parle d'enveloppe et non pas de membrane, car elle est formée par une double membrane de phospholipides : la membrane interne, qui est au contact du nucléoplasme et la membrane externe, qui, elle, est en contact avec le cytoplasme et, en particulier, avec le réticulum endoplasmique<sup>2</sup> (RE). La membrane interne est liée de façon stable à un réseau de filaments, la *lamina*. Il s'agit d'un réseau protéique fibreux, composé de filaments intermédiaires qui double la membrane interne de l'enveloppe nucléaire; la *lamina* nucléaire représente un support structural pour l'enveloppe nucléaire. Elle sert de point d'ancrage à certains éléments du noyau comme la chromatine, présente à la périphérie du noyau [2]. Les deux membranes formant l'enveloppe nucléaire se rejoignent au niveau des pores nucléaires qui sont des complexes protéiques ancrés dans la *lamina* [3] et qui permettent une circulation sélective, principalement en fonction de leurs tailles, des molécules entre le noyau et le cytoplasme.

### 2.1.2. L'ADN.

L'ADN (Acide Désoxyribonucléique) est le principal composant du noyau et le support physique des gènes et donc de l'information génétique. C'est une macromolécule dont la structure est une double hélice [4] composée de deux brins complémentaires (Figure 2.4).



**Figure 2.4.** Schéma représentatif d'une molécule d'ADN. Elle est composée de deux brins complémentaires. Chaque base A (respectivement G) est liée à une base T (respectivement C) sur l'autre brin par des liaisons hydrogène.

Le squelette de chaque brin est composé de phosphodiester et de sucre (désoxyribose) en alternance. Chaque molécule de désoxyribose porte une base azotée. Il existe quatre bases azotées différentes : la thymine (T), l'adénine (A), la guanine (G) et la cytosine (C). Le complexe moléculaire formé par un phosphodiester, un désoxyribose et une base azotée forme un nucléotide. Un brin d'ADN est formé par une séquence ordonnée de nucléotide. L'autre brin est formé par la séquence complémentaire du premier : une base A (respectivement G) sur le premier est forcément liée à une base T (respectivement C) sur le second et vice-versa. La structure en double hélice est

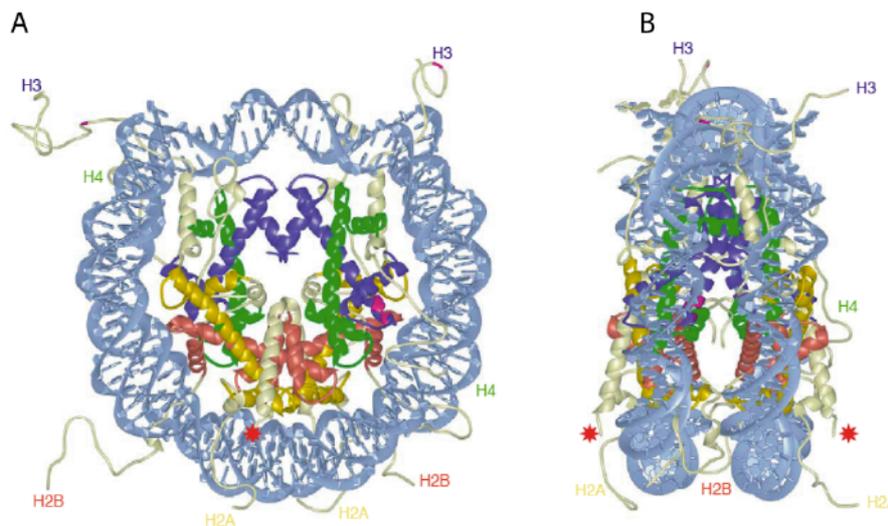
<sup>2</sup> Réticulum endoplasmique, du latin *reticulum* : réseau; et *endoplasmique* : à l'intérieur du cytoplasme, est un organite présent uniquement dans les cellules eucaryotes. Le RE modifie les protéines, produit des macromolécules et transfère des substances vers l'appareil de Golgi.

maintenue par des liaisons hydrogène qui relient entre elles les bases complémentaires (deux liaisons pour les paires A-T et trois pour les paires C-G). Chaque chromosome est constitué d'une unique molécule d'ADN [5] et un gène correspond, en fait, à une portion spécifique de l'ADN.

### 2.1.3. La Chromatine.

#### A. Structure de la chromatine.

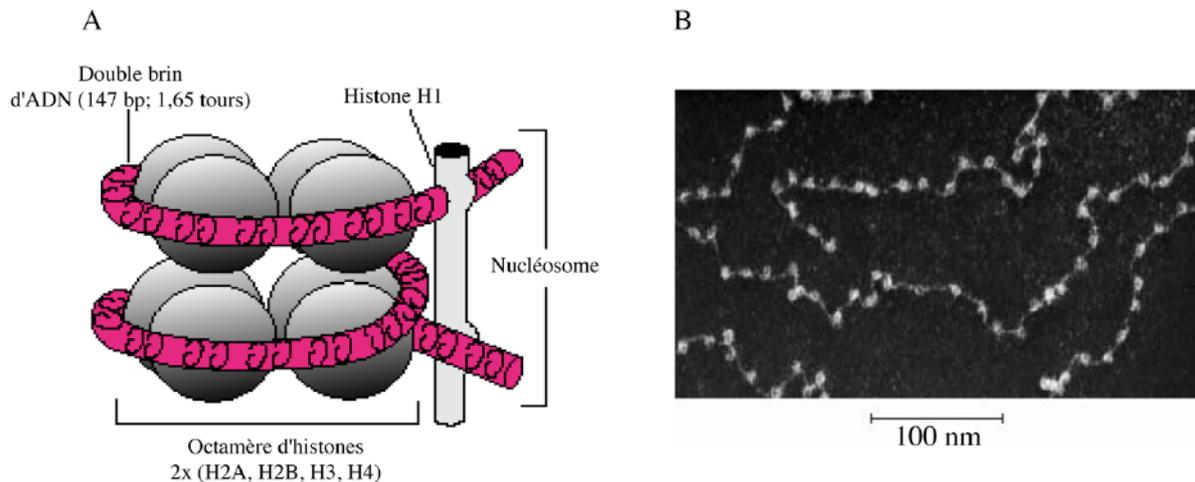
La quantité d'ADN contenue dans un noyau est très importante. Pour fixer les idées, pour les cellules humaines, la totalité de l'ADN contenu dans le noyau représente un total d'environ 3 milliards de paires de bases, comme une paire de base fait environ 4 Å de long, déroulé cela ferait un fil d'environ 1.2 m de long. De manière plus « physique », si l'on suppose la même quantité d'ADN pour chaque chromosome, alors, une fois déroulée, la longueur  $L$  de la molécule d'ADN formant un chromosome mesure environ 2,5 centimètres (46 chromosomes chez l'homme), donc, si on assimile l'ADN à un polymère en solvant  $\theta$  avec une longueur de persistance  $l_p$  de 50 nm (longueur de persistance classique pour une chaîne d'ADN dans l'eau), on trouve un rayon de giration  $R_g$  qui vaut environ :  $R_g = \sqrt{L/l_p} \cdot l_p \approx 35 \mu m$ , alors que le noyau ne mesure pas plus de 5 à 7  $\mu m$  de diamètre. En conséquence, l'ADN dans le noyau est très fortement compacté ; cette forme compactée est appelée chromatine, qui est une structure complexe d'ADN et de protéines.



**Figure 2.5.** A, Structure cristallographique du cœur du nucléosome avec une résolution de 1,9 Angström. L'ADN est enroulé autour d'un octamère d'histones ; B, Vue de côté de la structure (rotation de 90° par rapport à l'axe vertical) [6].

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome (Figure 2.5), il forme le premier niveau de compaction de l'ADN. C'est sans doute l'élément le mieux connu de la chromatine. Il est constitué de 147 paires de bases d'ADN double-brin enroulées en 1,65 tour autour d'un octamère de protéines appelées histones [6–8] (Figure 2.6). Le cœur du nucléosome est composé de 4 types d'histones : H2A, H2B, H3 et H4, réparties en un tétramère de H3-H4 et deux dimères de H2A-H2B [9] (Figure 2.6.). La chromatine est une chaîne de nucléosomes reliés entre eux par des bouts de 20 à 80 paires de bases d'ADN (ADN internucléosome) [10]. Cet enchaînement donne à la fibre chromatinienne déroulée un aspect en chapelet de perles d'environ 11 nm de diamètre (Figures 2.6 et 2.7). Cependant, cette compaction n'est pas encore suffisante. Un deuxième niveau de

compaction de la chromatine est réalisé grâce à l'histone H1. Cette histone ne fait pas partie des histones nucléosomiques. Elle est située à l'extérieur du cœur du nucléosome. Elle dispose d'une partie globulaire qui est liée à une portion spécifique du nucléosome ainsi qu'à l'ADN internucléosomique [11–14]. De cette manière, elle assure le maintien de la structure du nucléosome. Elle dispose également de bras qui se lient aux histones du cœur des nucléosomes adjacents [7] qui lui permettent de rapprocher les nucléosomes les uns des autres pour obtenir un sur-empilement de la structure en chapelets de perles en une fibre compacte de 30 nm de diamètre (Figures 2.6 et 2.7).



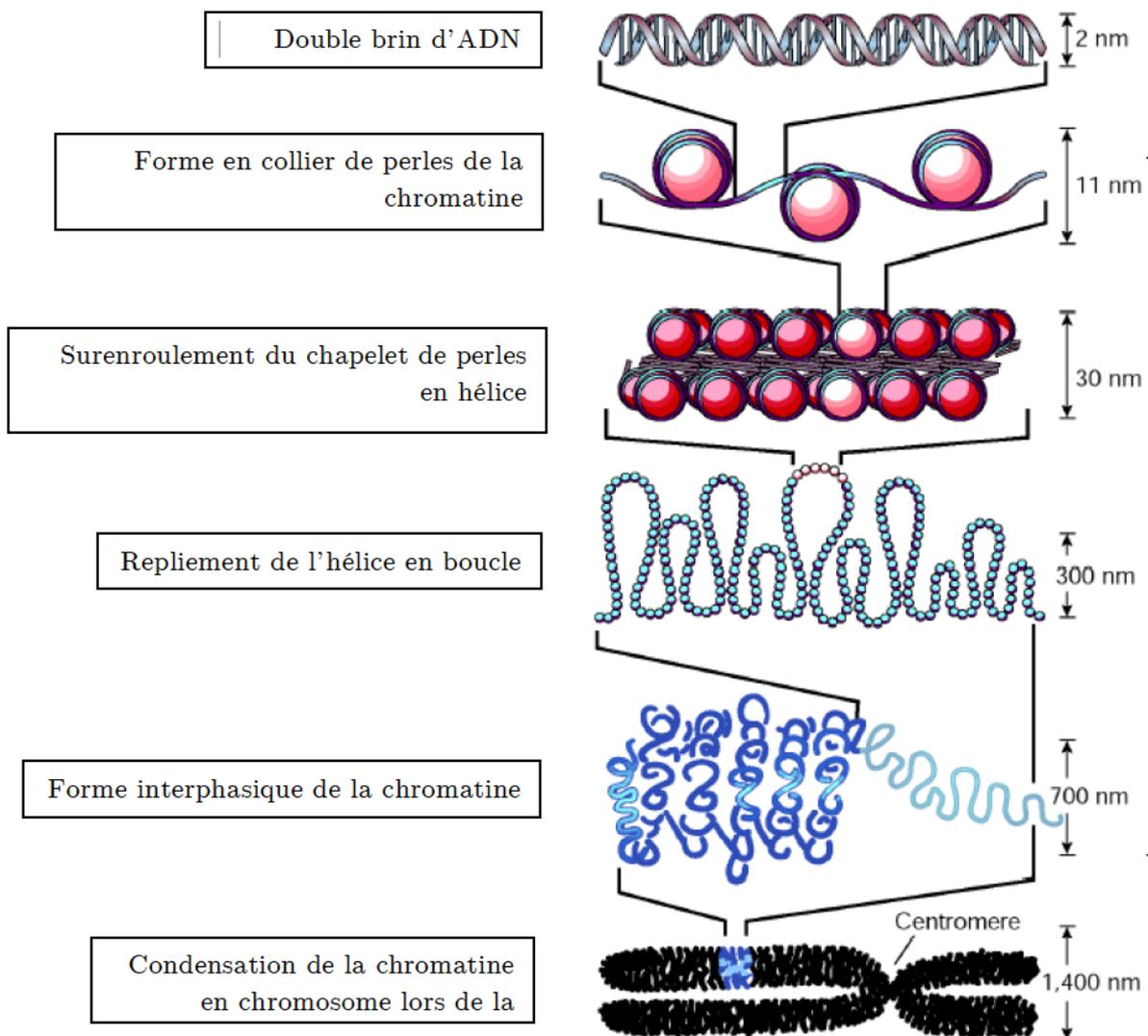
**Figure 2.6.** A, Schéma représentatif du nucléosome. (tiré de Hayes et al. [5]) ; B, Fibre chromatinienne observée par microscopie électronique après décondensation de sa forme native. La combinaison des nucléosomes et de l'ADN internucléosomale donne à cette forme décondensée l'aspect d'un chapelet de perles.

### B. La chromatine pendant l'interphase.

Les niveaux de compaction supérieurs de la chromatine durant l'interphase (la période du cycle cellulaire qui est séparée par deux divisions, ou mitose) sont encore relativement peu connus [6, 7]. On sait cependant que la « forme » de la chromatine change de niveau de compaction en fonction de l'état cellulaire. Il semble que le surenroulement du chapelet de perles s'organise en boucles d'environ 300 à 400 nm de longueur [5], ces boucles se regroupant en une spirale d'environ 700 nm, plus ou moins dense en fonction de l'état de la cellule (Figure 2.7). Toutefois, à chaque instant, la compaction de la fibre de chromatine dans le noyau n'est pas uniforme. Certaines zones de la fibre sont nettement plus compactées que d'autres. Historiquement, cette différence de compaction, qui peut être observée à l'aide d'un simple microscope optique, a conduit à définir deux types de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine [6, 7].

- **Euchromatine** : c'est la partie décondensée de la chromatine ; la chromatine y est très déspiralisée et semble formée essentiellement de fibres de 10 nm de diamètre [6, 7]. L'euchromatine (ou plus précisément les histones de celle-ci) est hyperacétylée et hypométhylée [12, 13]. Sa forme décompactée rend l'ADN, et donc les gènes, accessible ; elle correspond à des zones de gènes actifs, c'est-à-dire que les gènes y sont transcrits. Contrairement à l'hétérochromatine, l'euchromatine est la partie de chromatine active au niveau

transcriptionnel. Chez l'homme, elle constitue environ 10 – 20 % de l'ADN nucléaire. Cette forme de la chromatine est principalement répartie à l'intérieur du nucléoplasme.<sup>3</sup>



**Figure 2.7.** Représentation schématique de la compaction de l'ADN en fibre chromatine et de cette fibre en différentes « structures » de plus en plus compactées jusqu'au chromosome. Sous cette forme la molécule d'ADN est 50000 fois plus courtes [12, 13].

- **Hétérochromatine** : à l'opposé, c'est la partie de la chromatine qui reste fortement condensée quelle que soit la phase du cycle dans lequel se trouve la cellule. Elle est essentiellement formée de fibres de 30 nm de diamètre. Cette forme de la chromatine (*i.e.* ses histones) est hypoacétylée et hyperméthylée par rapport à l'euchromatine [12, 13]. Dans des conditions normales, l'hétérochromatine est principalement localisée en périphérie du noyau et du nucléole [2, 6]. Malgré cet état important de condensation, il a été montré qu'elle contenait

<sup>3</sup> Il a été montré que la proportion entre euchromatine et hétérochromatine, ainsi que leur répartition spatiale dans le noyau, variés en fonction des conditions physiologiques, mais aussi des conditions mécaniques [6, 7].

aussi des gènes susceptibles de s'exprimer [14, 15]. On distingue ainsi deux formes d'hétérochromatine. Tout d'abord la forme **constitutive** qui est principalement composée de séquences répétées d'ADN (ADN satellite). Elle contient très peu de gènes et est surtout située vers le centromère<sup>4</sup> et les télomères<sup>5</sup> du chromosome. Sa constitution la rend très stable et de ce fait elle ne change jamais d'état au cours du cycle cellulaire. À la différence de la forme **constitutive**, l'hétérochromatine **facultative** peut se décondenser. Cette forme facultative est principalement composée de régions codantes et contient des gènes susceptibles de s'exprimer [15, 16].

La chromatine atteint son niveau maximal de compaction au cours de la division cellulaire ; alors, elle se compacte plusieurs milliers de fois pour former les chromosomes, chaque chromosome étant une unité qui contient une partie de l'information génétique.

L'organisation et le degré de compaction de la chromatine sont intimement liés à l'activité du noyau. En effet, l'ADN doit pouvoir être accessible afin de permettre son interaction avec les machineries protéiques régulant les fonctions comme la réplication ou la transcription de l'ADN. Ainsi, pour assurer les fonctions du noyau, l'organisation de la structure chromatinienne doit être dynamique.

#### 2.1.4. Les compartiments nucléaires.

L'organisation nucléaire en domaines affecte toute la fonction nucléaire [17]. Ceci pose une question fondamentale sur la capacité qu'ont les complexes protéiques, nécessaires à la transcription ou à la réplication (*voir définition § 2.2.1.*), à se former et agir au bon endroit et au bon moment. En fait, ceci est en partie possible grâce à l'existence de structures morphologiques distinctes à l'intérieur du noyau [18, 19]. Ces structures ont été séparées en deux groupes distincts : les territoires chromosomiques, dans lesquels on trouve la chromatine et le domaine interchromosomique qui contient l'ensemble des éléments nécessaires à la transcription et à la réplication et qui est le lieu de la transcription et de la maturation des ARN messagers (ARNm)<sup>6</sup> [20]. Une des principales caractéristiques de ces structures est l'absence de membrane pour les délimiter à l'intérieur du noyau.

##### A. Les territoires chromosomiques.

Les techniques de fluorescence ont montré que, même sous leur forme décondensée, chaque chromosome occupe un territoire tridimensionnel bien distinct qui est le territoire chromosomique [21-26]. Ces territoires chromosomiques sont construits à partir d'une hiérarchisation de la fibre de chromatine [27]. Il existe une organisation au sein de chaque territoire : un sous-territoire pour le

---

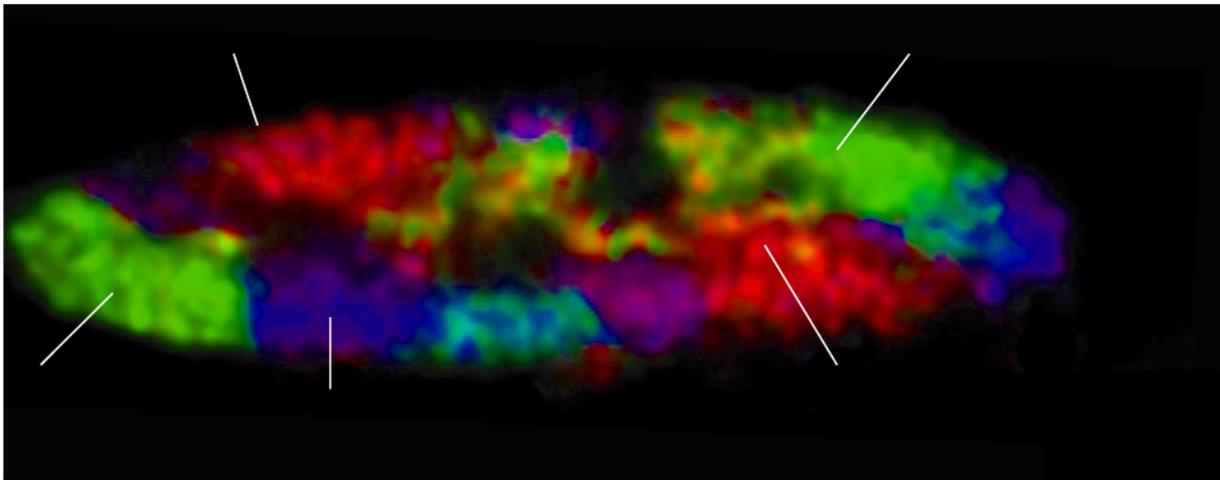
<sup>4</sup> Structure particulière du chromosome dont la fonction est d'en assurer la ségrégation lors des divisions cellulaires. Le centromère est le point de fixation du chromosome sur le fuseau mitotique.

<sup>5</sup> Extrémité d'un chromosome intervenant dans sa stabilité et dans les processus cellulaires liés au vieillissement.

<sup>6</sup> ARN : acide ribonucléique, molécule simple brin, présente dans les cellules de tous les êtres vivants, constituée par l'assemblage de 4 bases azotées A, C, G et U (U : uracile ; à la place de la Thymine pour l'ADN). Elle joue un rôle essentiel dans la synthèse des protéines. Il y existe 3 types différents d'ARN : l'ARN messager (ARNm), l'ARN de transfert (ARNt) et l'ARN ribosomique (ARNr). L'ARNm consiste en une copie sélective d'un fragment d'ADN qui est utilisée par les cellules pour fabriquer des protéines. Le rôle de l'ARN messager est de transporter l'information génétique, du noyau au cytoplasme de la cellule où se déroule la synthèse des protéines. L'interface entre l'ARN messager et la protéine est assurée par les ARN de transfert.

bras long, et un sous-territoire pour le bras court. Les sous-domaines du chromosome sont eux-mêmes ordonnés. Il est important de noter que les territoires chromosomiques ne sont pas des espaces clos à l'intérieur du noyau. En effet, de très nombreuses invaginations pénètrent à l'intérieur de ces domaines [25, 26] et permettent une grande surface de contact avec le domaine interchromosomique. Plusieurs modèles de répartitions des territoires chromosomiques et de l'espace interchromosomiques ont été proposés [27]. La position des différents territoires chromosomiques a été cartographiée en 3D lors des phases G<sub>0</sub>, S et en fin de G<sub>2</sub>, peu avant la division cellulaire, par Bolzer *et al.* en 2005 [28] (*voir la définition des différentes phases au § 2.2.2.*). Il a également été démontré [25] que la position des territoires chromosomiques était conservée dans les cellules filles après la division cellulaire. Les gènes actifs semblent être situés à la surface du territoire chromosomique [26], ces invaginations autorisent, certainement, les gènes présents à l'intérieur des territoires chromosomiques à être, eux aussi, exprimés [29].

Il semble admis que les territoires chromosomiques sont répartis dans le noyau en fonction de leur taille et de leur densité en gènes [24, 28, 30]. Ainsi, les territoires chromosomiques de grande taille se trouvent plutôt à la périphérie du noyau, tandis que les territoires chromosomiques de petite taille sont plutôt situés vers le centre. Pour deux territoires chromosomiques de tailles à peu près identiques, on a pu observer que le territoire chromosomique le plus pauvre en gènes était généralement plus proche de la périphérie du noyau que l'autre [26,31–33]. Ces résultats sont en accord avec ceux concernant la réorganisation de la position des territoires chromosomiques au cours de la transcription [34–36]. Ils montrent que suite à l'activation de la transcription d'un gène, le territoire chromosomique auquel il appartient a tendance à se déplacer vers l'intérieur du noyau. La périphérie du noyau semble donc être une zone transcriptionnellement peu active, contrairement au centre du noyau.



**Figure 2.8.** *Territoires chromosomiques. Image par microscopie de fluorescence du plan médian d'un noyau de fibroblaste de poulet qui montre l'existence de territoires chromosomiques ayant des emplacements bien séparés (la chromatine associée aux différents chromosomes a des marqueurs fluorescents différents [20]).*

### B. Le domaine interchromosomique.

Comme nous l'avons déjà écrit, le domaine interchromosomique contient, entre autres, tous les éléments nécessaires à la transcription et à la réplication (nucléotides, protéines, ARN et ADN

polymérase<sup>7</sup>), de l'ARN messager et ribosomique, mais aussi, plusieurs types de corps nucléaires dont la structure et la fonction ne sont pas toujours très bien connues.

- **Les nucléoles** : Les nucléoles sont des structures d'environ 1 µm de diamètre, visibles dans le noyau des cellules par simple observation avec un microscope optique à fond clair (ceci à cause la présence de nombreux ARN et au fait que le nucléole est associé à de l'hétérochromatine). Elles sont sans doute les structures les mieux étudiées de l'espace interchromosomique, aussi bien structurellement que fonctionnellement [37]. La fonction principale des nucléoles est la fabrication des ribosomes<sup>8</sup> [38] ; c'est le lieu où se produit la transcription des ARN ribosomiques (ARNr).
- **Les splicéosomes** : Les splicéosomes sont des complexes protéiques, caractérisés par une forte concentration en facteurs d'épissage<sup>9</sup> de l'ARN (épissage : *splicing* en anglais), facteurs permettant la suppression de certaines parties non codantes des ARN messagers<sup>10</sup>. Ce sont des structures de l'espace interchromosomique qui occupent environ 20% de l'espace du noyau [17]. Même si leur rôle n'est pas totalement élucidé, plusieurs observations permettent de penser que la transcription et l'épissage de la plupart des gènes se produit à la périphérie des splicéosomes [17].
- **Les corps de Kremer** : Les corps de Kremer ou PML (Promyelocytic Leukaemia) sont des petites structures sphériques présentes dans tout le nucléoplasme. Leur rôle est également mal connu, mais il semble qu'ils soient associés à de nombreux phénomènes comme la différenciation, la régulation de la transcription, la croissance cellulaire ou encore l'apoptose<sup>11</sup> [19]. Il a également été démontré qu'ils jouent un rôle important dans la transcription virale [39]. Ces domaines sont plus particulièrement associés à certains territoires chromosomiques et pourraient donc, comme le nucléole, concentrer des gènes particuliers dans une région propice à leur transcription.

---

<sup>7</sup> Polymérase : Enzyme capable d'enchaîner des nucléotides en polymères d'ADN, ou d'ARN. L'ARN polymérase est un complexe enzymatique responsable de la transcription. Chez les eucaryotes, il existe trois sortes d'ARN polymérase qui sont responsables de la synthèse des trois sortes d'ARN : ARNm, ARNr et ARNt. L'ADN polymérase est un complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire, mais aussi dans des processus de réparation et de recombinaison de l'ADN.

<sup>8</sup> Usine à protéines des cellules ; Les ribosomes sont des organites présentes dans le cytoplasme ou ancrés au réticulum endoplasmique rugueux. La fonction des ribosomes est de traduire le code génétique en protéines par l'intermédiaire des ARNm. Ils traduisent des triplets de nucléotides portés par l'ARNm en acides aminés.

<sup>9</sup> Chez les organismes supérieurs (eucaryotes), les gènes qui codent pour des protéines sont constitués d'une suite d'exons et d'introns alternés. Lors de la transcription un pré-ARNm est synthétisé, celui-ci va être épissé pour donner lieu à l'ARNm dit mature. L'épissage consiste en l'excision des introns et le « raboutage » des exons. Les exons ainsi retenus vont permettre à l'ARNm mature d'être traduit en protéine.

<sup>10</sup> La même molécule d'ARN messager n'est pas toujours épissée de la même manière. Le résultat est qu'elle pourra coder pour différentes protéines [6,7]. Un même gène peut donc être à l'origine de plusieurs protéines, on parle alors d'épissage alternatif.

<sup>11</sup> Apoptose : mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire. Processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation : la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par les cellules voisines.

- **Les corps de Cajal** : Les corps de Cajal sont des petites structures, souvent localisées à la périphérie de la face interne de la membrane nucléaire [40], dont la taille peut varier de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  en fonction du type cellulaire. À l'heure actuelle, leur rôle exact est encore mal connu. Comme il a été démontré qu'ils contenaient une très forte concentration en ribonucléoprotéines et en facteurs de transcription [19] et que l'on a pu observer de nombreux mouvements des corps de Cajal vers et depuis les nucléoles [40], on pense qu'ils jouent un rôle important dans la génèse des éléments des splicéosomes.

## 2.2. PROCESSUS BIOLOGIQUES ET CYCLE CELLULAIRE.

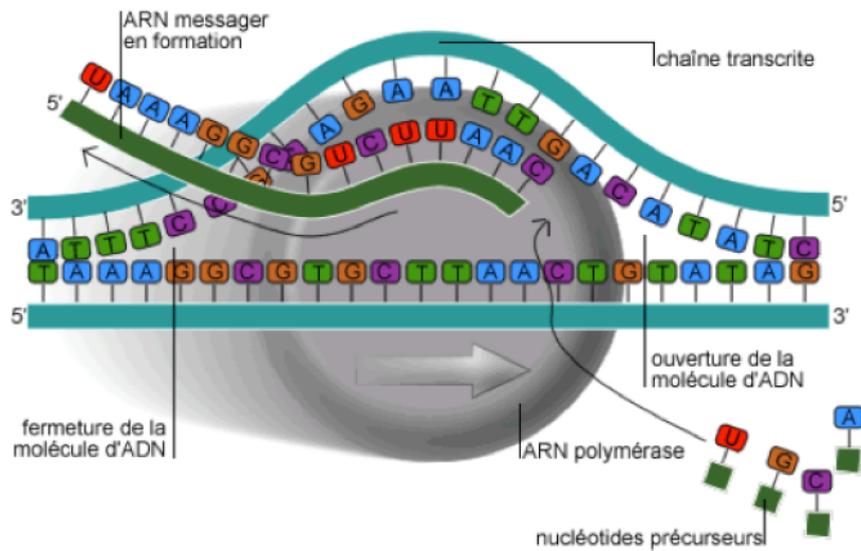
### 2.2.1. Processus biologiques fondamentaux à l'intérieur du noyau.

Les deux processus biologiques fondamentaux ayant lieu dans le noyau sont la transcription des gènes et la réplication de l'ADN. Ils permettent à la cellule de fonctionner correctement et de se diviser.

**La transcription** : La transcription d'un gène consiste en la synthèse d'une molécule d'ARN messager, copie du gène d'intérêt. La transcription des gènes permet l'adaptation de la cellule à son environnement, ainsi que sa survie, car tous les processus nécessitent en permanence la production de protéines (enzymes,...). Le code permettant la fabrication d'une protéine est donné par l'enchaînement de nucléotides qui compose le gène correspondant. Toutefois, si ce code génétique se trouve dans le noyau, les ribosomes, qui permettent de synthétiser la protéine, se trouvent dans le cytoplasme. La transmission de « l'information » se fait à l'aide d'un intermédiaire : l'ARN messager (Acide RiboNucléique). L'ARN messager est une molécule simple brin dont certains constituants diffèrent de l'ADN (le désoxyribose de l'ADN est remplacé par un ribose pour l'ARN messager). Toutefois, il s'agit également d'une macromolécule constituée de la succession de 4 bases azotées A, C, G et U (Uracile ; à la place de la Thymine). L'ARN messager porte ainsi la même information que l'ADN. La transcription consiste en la synthèse d'une molécule d'ARN messager, copie du gène d'intérêt (Figure 2.9).

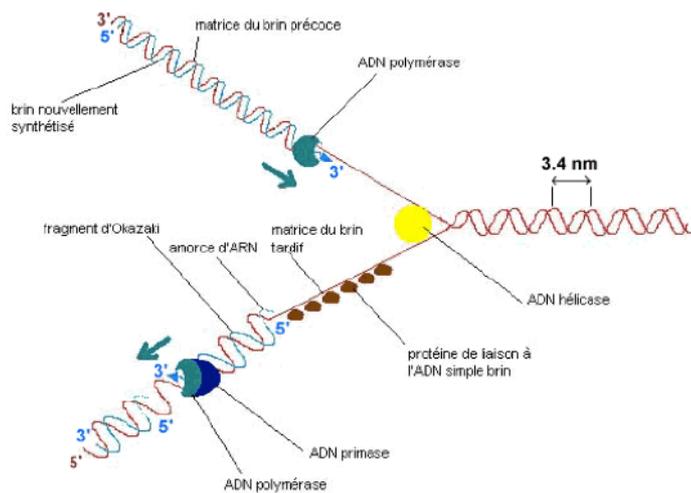
En pratique, une enzyme, l'ARN polymérase, se fixe sur un promoteur<sup>12</sup> en amont du gène d'intérêt, ce qui permet la séparation des deux brins d'ADN juste à ce niveau. Ensuite, l'ARN polymérase parcourt le brin d'ADN tout le long du gène pour synthétiser le brin d'ARN correspondant. Une fois la transcription commencée, l'ARN polymérase, engagée dans un vaste complexe protéique, le transcriptosome, est fixe dans le noyau [41, 42]. L'ADN est tracté au travers de ce complexe pour permettre à l'ARN polymérase de copier le gène et assembler les nucléotides de l'ARN messager. Une fois la transcription terminée, l'ARN messager est libéré et migre vers l'enveloppe nucléaire. Du fait de sa taille, son passage du noyau vers le cytoplasme, où se trouvent les ribosomes, nécessite un processus actif des pores nucléaires. Une fois dans le cytoplasme, l'ARN messager sera « traduit » en protéines par les ribosomes présents à la périphérie du noyau.

<sup>12</sup> Le gène à transcrire est précédé d'une séquence promoteur, sur laquelle l'ARN polymérase est recrutée. La fixation et l'activation de l'ARN polymérase sont contrôlées par des facteurs de transcription (éléments trans-régulateurs) qui se fixent au niveau de séquences cis-régulatrices, situées à des distances variables du site de démarrage de la transcription. Les facteurs de transcription peuvent agir en activateurs, ou en répresseurs de la transcription.



**Figure 2.9.** Transcription des gènes par l'ARN polymérase. Le gène est recopié sous forme d'ARN messager. L'ARN messager migre ensuite vers le cytoplasme où il sera traduit en protéines par les ribosomes. (image tiré de Wikipédia, encyclopédie en ligne).

**La réplication :** La réplication de l'ADN est un processus fondamental à l'origine de la transmission des gènes aux cellules filles lors de la division cellulaire. En pratique, pour chaque chromosome, les paires de base de la molécule d'ADN sont désappariées, par rupture des liaisons hydrogène (Figure 2.10) [43, 44]. Cette rupture est effectuée par une enzyme : l'ADN polymérase. Deux ADN polymérases parcourent ensuite chaque brin en sens opposé et synthétisent, au fur et à mesure, un nouveau brin complémentaire de l'ADN. Il y aura donc, au final, deux molécules d'ADN identiques contenant chacune un brin de l'ancienne molécule. C'est pourquoi le processus de réplication est dit semi-conservatif puisque chaque cellule fille aura un brin d'ADN de la cellule mère.

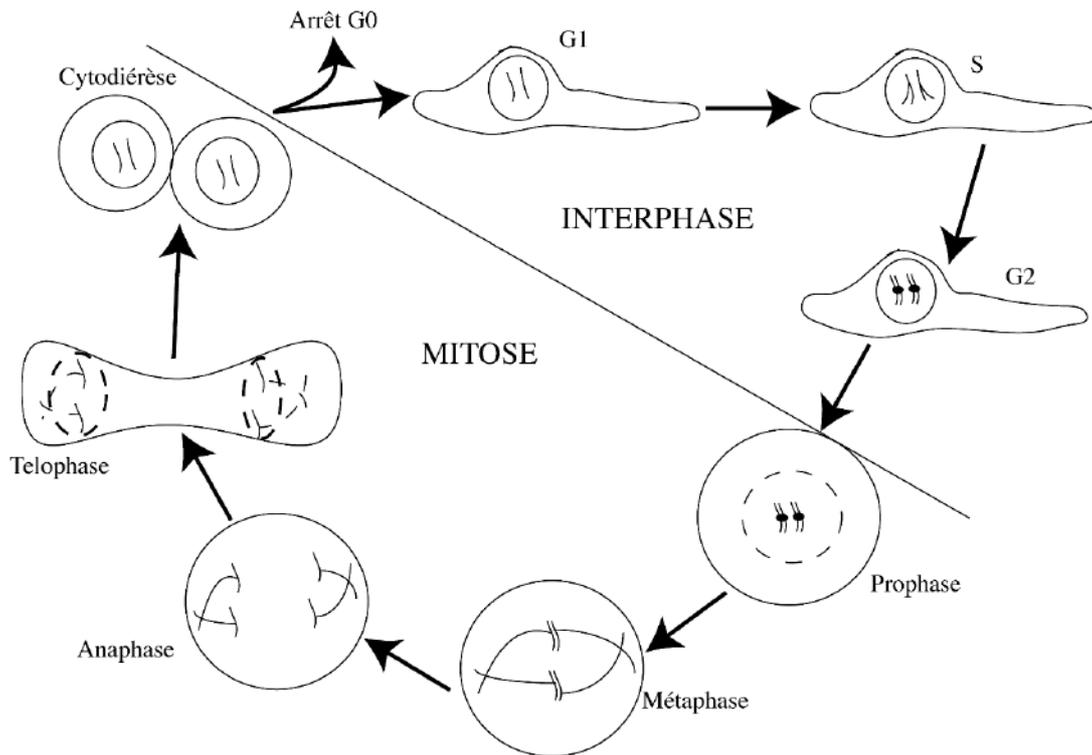


REPLICATION DE L'ADN

**Figure 2.10.** Réplication de la molécule d'ADN. Les deux brins complémentaires sont séparés puis sur chacun d'eux un nouveau brin complémentaire est synthétisé par une ADN polymérase.

### 2.2.2. Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est la période du temps qui sépare deux divisions d'une cellule mère en deux cellules filles parfaitement identiques. Il permet de créer les conditions biologiques nécessaires pour cette division. Le cycle cellulaire est divisé en quatre grandes phases : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M (Figure 2.11). Les phases G1, S et G2 forment ce que l'on appelle l'interphase, période pendant laquelle une observation des cellules au microscope optique ne permet pas de voir de changements significatifs. La phase M est la phase de mitose où la cellule se divise (celle où l'on peut observer les chromosomes).



*Figure 2.11. Le cycle cellulaire. Les deux phases principales sont l'interphase et la mitose (ou phase M). L'interphase comprend les phases G1, S et G2. La mitose comprend la prophase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytotdiérèse.*

- **La phase G1** : La première phase du cycle cellulaire est la phase G1 (de l'anglais Growth 1). La cellule croît et effectue les fonctions pour lesquelles elle est programmée génétiquement. Durant cette phase, les cellules filles, issues de la mitose précédente et donc plus petites, prennent leur taille finale. Sous l'influence de facteurs de croissance, la cellule commence à préparer le matériel nécessaire pour préparer la synthèse de l'ADN. C'est une phase de croissance durant laquelle on note une forte activité transcriptionnelle à l'intérieur du noyau, pour produire l'ARN nécessaire à l'augmentation du nombre de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN.
- **La phase S** : Lorsque la cellule a suffisamment grossi, elle effectue un premier contrôle. Si son ADN est en bon état, elle entre en phase S, sinon elle déclenche le mécanisme d'apoptose. La phase S est la phase durant laquelle se déroule la réplication de l'ADN ; chaque chromosome est copié à l'identique, le matériel génétique est doublé par réplication de chacun des chromosomes.

- **La phase G2** : La phase G2 (Growth 2) débute une fois la réplication de l'ADN terminée (la quantité d'ADN dans le noyau a donc doublé par rapport à la phase G1). La phase G2 est une phase de contrôle durant laquelle la cellule vérifie que le matériel génétique a bien été dupliqué et qu'il n'y a aucune anomalie. Le cas échéant, une réparation post-réplivative peut être effectuée. À l'issue de cette phase, chaque chromosome est parfaitement identique (morphologie et génétique) à son homologue. C'est une phase de préparation à la mitose.
- **La phase M** : La phase M est la phase durant laquelle la cellule se sépare en deux cellules filles.

Si une division supplémentaire n'est pas nécessaire, les deux cellules filles passent en phase G0 (phase de quiescence, la cellule a alors quitté le cycle cellulaire) et se différencient<sup>13</sup>. Dans le cas contraire, elles rentrent en phase G1 et recommencent un cycle. Des cellules cancéreuses continueront à cycler et ne rentreront jamais en G0 si le milieu contient suffisamment d'éléments nutritifs pour le leur permettre.

### 2.3. RAPPELS DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU.

Pendant longtemps, il a été considéré que l'organisation structurale du noyau, durant l'interphase, était peu dynamique en comparaison avec les spectaculaires réarrangements observés durant la mitose. Le développement de nouvelles méthodes d'analyse *in situ* (l'hybridation *in situ* fluorescente et l'immunofluorescence [45]), ainsi que de diverses techniques d'imagerie microscopique et des méthodes moléculaires ou génomiques comme la Capturing Chromosome Conformation [46, 47], ont permis de confirmer que l'organisation spatiale du noyau, ainsi que des sous-structures qui le composent, sont fortement dynamiques [48]. C'est même l'une des caractéristiques essentielles de ces structures, elles subissent des changements permanents. Plusieurs travaux, faits dans ce contexte, ont permis de détecter la position des territoires chromosomiques, de gènes, ou encore de complexes protéiques à l'intérieur du noyau et donc de suivre leurs mouvements ainsi que leurs réorganisations au cours du temps, mettant ainsi en évidence, au cours de l'interphase, une dynamique très riche qui semble être fonction de l'activité biologique du noyau.

Nous allons ici essayer de faire un bref résumé des connaissances actuelles sur la dynamique interne du noyau, en essayant de faire ressortir les échelles d'espace et de temps sur lesquelles se passent les différents phénomènes observés.

#### 2.3.1. Dynamique des territoires chromosomiques.

La structure moléculaire la plus large à l'intérieur du noyau est sans aucun doute celle des territoires chromosomiques, donc, des différentes sous-structures du noyau c'est probablement eux qui vont avoir la dynamique la plus lente. Pendant longtemps, les territoires chromosomiques étaient considérés comme immobiles et n'interagissent pas entre eux. Mais, on sait maintenant que pour les besoins de la transcription, de la réplication et de la différenciation le positionnement des

---

<sup>13</sup> La différenciation cellulaire est un concept de biologie du développement décrivant le processus par lequel les cellules se spécialisent en un « type » cellulaire (cellule de la peau, des muscles, neurones ...). La morphologie d'une cellule peut changer radicalement durant la différenciation, mais le matériel génétique reste le même, à quelques exceptions près.

territoires chromosomiques évolue constamment au cours du temps et qu'il y a des interactions entre les fibres de chromatine de différents territoires chromosomiques [49]. Des déplacements des territoires chromosomiques les uns par rapport aux autres ont été observés, de même que des mouvements des territoires chromosomiques de la périphérie du noyau vers le centre et vice-versa [34, 50]. Ces mouvements reflètent, généralement, les changements nécessaires aux différentes phases du cycle cellulaire. Ainsi, il a été montré que certains territoires chromosomiques se repositionnent transitoirement vers le centre du noyau au début de la phase G1 et en phase S [34].<sup>14</sup> De plus, durant la phase S, des mouvements, manifestement dus à la rupture des contacts inter-territoires chromosomiques, ou entre les territoires chromosomiques et certains corps cellulaires [50], sont observés. En début de phase G2, on a pu observer un déplacement dirigé des centromères de chacun des territoires chromosomiques, sans doute en préparation de la mitose [50]. Les territoires chromosomiques bougent les uns par rapport aux autres sur des distances comparables à l'échelle du noyau sur des échelles de temps allant de 30 minutes à 2 heures [50], donc lentement, typiquement avec des vitesses de l'ordre du nanomètre par seconde.

### 2.3.2. Dynamique de la chromatine au sein des territoires chromosomiques.

Il a aussi été montré que la dynamique propre de la chromatine à l'intérieur des territoires chromosomiques joue un rôle important dans les activités de transcription, de réplication et de réparation de l'ADN [51]. Par exemple, plusieurs études montrent le rôle important de la dynamique de la chromatine au cours du processus de réparation de l'ADN [52–55] ; la réparation des cassures double-brins de l'ADN nécessite une réorganisation et une modification structurale de la chromatine pour permettre l'accès des facteurs de réparation et des médiateurs de réponse aux dommages de l'ADN aux sites endommagés [56]. Ainsi, il a été observé aussi bien des mouvements de la chromatine à l'intérieur des territoires chromosomiques [57, 58], que des changements de conformation de la fibre de chromatine, en particulier, de la compaction et de la décompaction [37, 59, 60].

#### A. Mouvements de la chromatine.

La chromatine est une structure hautement dynamique. Des observations, par microscopie de fluorescence en temps réel [50, 51], ont permis d'observer des mouvements sur des échelles de longueur de plusieurs centaines de nanomètres, dont les temps caractéristiques semblent inférieurs à la dizaine de millisecondes. Ces mouvements sont d'amplitude assez grande et leur dynamique est très sensible à une déplétion de l'ATP.<sup>15</sup> De plus, cette dynamique est énormément restreinte par l'inhibition de l'activité transcriptionnelle. Il est donc supposé que le déplacement de la chromatine à l'intérieur des territoires chromosomiques dépend de l'action d'enzymes ATP-dépendantes, nécessaires à la transcription ou au remodelage de la chromatine [50]. Davis et Bardeen [37,59,60] ont montré que dans un espace limité, d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, les mouvements de la chromatine étaient browniens avec des coefficients de diffusion de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ces coefficients de diffusion sont très petits et dénotent donc une dynamique très lente. Levi *et al.* [58] ont affiné ces résultats. Ils ont mis en évidence l'existence de deux processus diffusifs différents. Le plus rapide des deux processus a un coefficient de diffusion de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

<sup>14</sup> Grâce à des expériences d'activation de la transcription, il a été montré [34], chez la levure, que le territoire chromosomique portant la région ciblée se repositionne vers le centre du noyau au moment de la transcription.

<sup>15</sup> ATP : adénosine triphosphate, molécule utilisée chez les animaux et les plantes pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques qui ont lieu dans la cellule.

( $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Cette diffusion est confinée dans un espace dont le rayon n'excède pas 40 nm, ce qui est comparable à la taille de la fibre chromatinienne compactée (30 nm). Le coefficient de diffusion le plus lent est de l'ordre de  $2,5 \cdot 10^{-16} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $2,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), ce qui est comparable au coefficient de diffusion donné par Davis et Bardeen [59, 60]. Ce dernier coefficient semble, toutefois, susceptible de changer en fonction du cycle cellulaire. Davis et Bardeen ont également montré que l'origine de certains des mouvements de la chromatine semblait intimement liée au remodelage de la fibre de chromatine [59, 60].

### B. Remodelage de la chromatine.

Le remodelage de la chromatine est nécessaire pour les activités de transcription, de réplication et de réparation, car il permet, localement, sa décompaction, ce qui rend l'ADN accessible aux ADN et ARN polymérase. Le remodelage de la chromatine a pour origine la modification de la structure du nucléosome ou de la structure de la fibre de chromatine qui sont, principalement, dues à deux activités enzymatiques : le remodelage du nucléosome et les modifications post-traductionnelles [59–65]. Le remodelage du nucléosome consiste en des modifications structurelles réversibles des nucléosomes rendant l'ADN plus accessible [64, 65]. Ces modifications structurelles se font en changeant la position des nucléosomes, en altérant la liaison entre l'ADN et le nucléosome, en participant à l'éviction complète de certaines histones, ou en remplaçant certaines histones par des formes variantes qui changent les propriétés biochimiques, structurales et/ou dynamiques du nucléosome [66]. Les modifications post-traductionnelles comme : l'acétylation des lysines (acide aminé présent sur la partie amino-terminale de chaque histone) [57], la méthylation des lysines et des arginines (un autre acide aminé) [57, 62], la phosphorylation (régulée par des protéines kinases et phosphatases) et la mono-ubiquitination (assurée par des enzymes, les ubiquitines ligases), affectent principalement le recrutement de certaines protéines nécessaires à la transcription et par conséquent peuvent être associées à des états de compaction différents de la chromatine.

Cependant, si on commence à connaître relativement bien les différents mécanismes biochimiques qui contrôlent le remodelage de la fibre de chromatine, on sait encore peu de chose sur la dynamique de ces mécanismes.

### 2.3.3. Dynamique du domaine interchromosomique.

De même, en plus de la dynamique des territoires chromosomiques et de la chromatine, l'activité nucléaire nécessite une dynamique propre au domaine interchromosomique. En particulier, il a été mis en évidence des déplacements et des changements de structure des différents corps nucléaires dans l'espace interchromosomique (nucléoles, corps de Cajal,...) ainsi que le trafic de « complexes » protéiques, de protéines et de nucléotides. Il semble que les différents déplacements à l'intérieur du domaine interchromosomique suivent des processus de diffusion anormale.<sup>16</sup> Ce type de diffusion a été identifié et caractérisé dans différents types de systèmes, en particulier dans les milieux fractals. Dans les cellules, l'origine de cette diffusion anormale n'est pas encore clairement identifiée, mais, on soupçonne l'influence de l'encombrement du milieu cellulaire sur la nature de la diffusion des corps nucléaires et, aussi, des protéines. Des expériences mesurant la diffusion de protéines dans des solutions de polymères montrent que la diffusion dans ces

<sup>16</sup> La diffusion anormale diffère du simple mouvement Brownien en ce que le déplacement carré moyen des objets considérés n'est pas proportionnel au temps. Dans le cadre d'une diffusion anormale on aura  $\langle r^2(t) \rangle \propto t^\alpha$  avec  $\alpha \neq 1$  (dans notre cas, le phénomène est sous-diffusif ce qui signifie que  $\alpha < 1$ ).

solutions est anormale à cause d'un couplage entre le mouvement des protéines et celui des obstacles. De plus, à larges concentrations de polymères la diffusion est anormale à un degré comparable à la diffusion à l'intérieur de la cellule [67]. Il semble que cette dynamique, elle aussi, est fonction de l'activité biologique du noyau.

### A. Dynamique des complexes macromoléculaires et des protéines.

Au-delà de la dynamique des territoires chromosomiques et des corps nucléaires, le trafic moléculaire dans le nucléoplasme (mouvements de complexes protéiques, de protéines, de nucléotides, ...) est essentiel à l'activité du noyau. Ce trafic semble reposer en partie sur des processus de diffusion [68, 69]. Cependant la diffusion de complexes protéiques dans le noyau diffère du simple mouvement Brownien, c'est de la diffusion anormale, sous-diffusive. En particulier, il a été observé la diffusion de sous-unités des ribosomes, des nucléoles vers l'enveloppe nucléaire [70]. Cette diffusion est assez proche d'une diffusion Brownienne et l'on peut estimer un coefficient de diffusion pour ces objets qui est de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $0,3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Shav-Tal *et al.* [68] ont réussi à caractériser la diffusion des complexes protéiques mRNP (messenger RiboNucleoProtein) pendant l'interphase. Ils trouvent un coefficient de diffusion de l'ordre de  $4 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $0,04 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Cette diffusion semble ralentie par une déplétion de l'ATP, mais les auteurs attribuent plutôt cette diminution aux obstacles alors formés par une fibre chromatinienne beaucoup plus rigide. Quoi qu'il en soit, la diffusion de ces objets, qui sont relativement gros à l'échelle du noyau (typiquement un rayon de quelques dizaines de nm), est très lente ; pour fixer les idées, les coefficients de diffusion mesurés sont environ 3 ordres de grandeur en dessous de ceux observés pour des colloïdes dans de l'eau.

Au contraire, pour les petites protéines nucléaires, dont les tailles sont, typiquement, inférieures à quelques nanomètres, on observe une diffusion Brownienne rapide avec des coefficients de diffusion de l'ordre de  $10^{-11}$ – $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , soit  $10$ – $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (*i.e.* comparables à ceux de colloïdes dans de l'eau) [71–75]. De plus, ces protéines présentent des échanges extrêmement rapides avec les sites sur lesquels elles viennent se fixer [71–75]. Ce comportement dynamique est supposé avoir un rôle important dans la plasticité et l'organisation de la chromatine, ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes. Cette dynamique rapide suggère que les petites protéines nucléaires trouvent les sites spécifiques sur lesquels elles se fixent par de la diffusion Brownienne à trois dimensions dans tout le noyau.

### B. Dynamique des corps nucléaires.

La structure des corps nucléaires est elle aussi fortement dynamique. Cette dynamique permet d'accélérer les changements de composition de ces corps nucléaires en réponses à des dysfonctionnements cellulaires, ou aux processus de réparation au cours de la division cellulaire [76].

- **Corps de Cajal** : ils se déplacent à l'intérieur du domaine interchromosomique, leur déplacement se fait par diffusion modifiée par leur immobilisation lors de leur fixation sur la chromatine [40] mais aussi, à cause de leur possibilité de fusionner, ou de se diviser en de plus petites structures [40].
- **Corps de Kremer** : on peut distinguer deux types de déplacements distincts [77]. Le premier type est caractérisé par des mouvements très localisés, alors que le deuxième type se caractérise par des mouvements rapides à travers tout le nucléoplasme. La particularité de ces déplacements est qu'ils semblent provenir de mécanismes ATP-dépendants puisqu'une déplétion de l'ATP réduit fortement leur vitesse moyenne.

- *Nucléoles et splicéosomes* : ils ne semblent pas avoir de déplacements particuliers lors de l'interphase, leurs positions dans le noyau sont relativement figées. Cependant, leurs structures se modifient constamment ; la taille des nucléoles varie en fonction de l'activité transformationnelle de la cellule [78] tandis que l'on peut observer des extensions de la périphérie des splicéosomes ainsi que l'association et la dissociation de facteurs d'épissage aux splicéosomes [79].

#### 2.3.4. « Résumé ».

L'ensemble de ces résultats montre que la dynamique interne du noyau est très complexe, avec des éléments très variés, d'origines différentes, se produisant sur des échelles de temps et de tailles très différentes. Il est intéressant de noter que la plupart des dynamiques observées à l'intérieur du noyau sont dues à des processus de diffusion anormale. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les éléments du noyau bougent, dans une structure très compartimentée, pour remplir un rôle bien précis. En plus de ces déplacements et de ces processus de diffusion, il y a aussi une importante activité chimique. Cependant, avec les techniques usuelles de microscopie (en particulier avec la microscopie de fluorescence) il est assez difficile d'observer ces dynamiques dans leur ensemble.

**BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 2**

1. Dingwall C. et Laskey R., The nuclear membrane. *Science*, **258** :942–947 (1992).
2. Hetzer M. W., Walther T. C. et Mattaj I. W., Pushing the envelope: Structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21** : 347–380 (2005).
3. Daigle N., Beaudouin J., Hartnell L., Imreh G., Hallberg E., Lippincott-Schwartz J. et Ellenberg J., Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, **154** : 71–84 (2001).
4. Watson, J D ; Crick, FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **248** : 765 (1974).
5. Hayes H., ADN et Chromosomes. Production Animales. HS, Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales : 13–20 (2000).
6. Luger K., Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **13** :127–135 (2003).
7. Luger K. et Hansen J. C., Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, **15** : 188–196 (2005).
8. Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W. et Richmond T. J., Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Angström resolution. *Journal of Molecular Biology*, **319** : 1097–1113 (2002).
9. Kornberg R. D. et Lorch Y., Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, **98** : 285–294 (1999).
10. Sivolob A. et Prunell A., Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, **362** : 1519–1547 (2004).
11. Kimura H., Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. *DNA Repair*, **4** : 939–950 (2005).
12. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D., *Molecular Biology of the cell*, Garland Publishing, New York (1994).
13. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P., *Essential Cell Biology*, Garland Science Publishing : Taylor and Francis Group, Second Edition (2003).
14. Hess O. et Meyer G. F., Chromosomal differentiations of the lampbrush type formed by the Y chromosome in *Drosophila Hydei* and *Drosophila Neohydei*. *Journal of Cell Biology*, **16** : 527–539 (1963).
15. Eberl D. F., Duyf B. J. et Hilliker A. J., The role of heterochromatin in the expression of a heterochromatic gene, the rolled locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **134**: 277–292 (1993).

16. Yasuhara J. C., DeCrease C. H. et Wakimoto B. T., Evolution of heterochromatic genes of *Drosophila*., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102** : 10958–10963 (2005).
17. Misteli T., Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, **291** : 843–847 (2001).
18. Ashley M. Wood, Arturo G. Garza-Gongora, Steven T. Kosak. A Crowdsourced nucleus: Understanding nuclear organization in terms of dynamically networked protein function ; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Gene Regulatory Mechanisms*, **1839** : 178-190 (2014).
19. Dunder M. et Misteli T., Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*, **356** : 297–310 (2001).
20. Cremer T. et Cremer C., Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Review Genetics*, **2** : 292–301 (2001).
21. Stack S. M., Brown D. B. et Dewey W. C., Visualization of interphase chromosomes. *Journal of Cell Science*, **26** : 281–299 (1977).
22. Zorn C., Cremer C., Cremer T. et Zimmer J., Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Experimental Cell Research*, **124** : 111–119 (1979).
23. Manuelidis L., Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Human Genetics*, **71** : 288–293 (1985).
24. Cremer T., Kreth G., Koester H., Fink R. H. A., Heintzmann R., Cremer M., Solovei I., Zink D. et Cremer C., Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*, **10** : 179–212 (2000).
25. Gerlich D., Beaudouin J., Kalbfuss B., Daigle N., Eils R. et Ellenberg J., Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells. *Cell*, **112** : 751–64 (2003).
26. Williams R. R. E., Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends in Genetics*, **6** : 298–302 (2003).
27. Thomas Cremer, Marion Cremer, Steffen Dietzel, Stefan Müller, Irina Solovei, Stanislav Fakan. Chromosome territories– a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology*, **18** : 307-316 (2006)
28. Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Müller S., Eils R., Cremer C., Speicher M. R. et Cremer T., Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLOS Biology*, **3** : 1–17 (2005).
29. Mahy N. L., Perry P. E., Gilchrist S., Baldock R. A., et Bickmore W. A., Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *Journal of Cell Biology*, **157** : 579–589 (2002).
30. Kreth G., Finsterle J., von Hase J., Cremer M., Cremer C., Radial Arrangement of Chromosome Territories in Human Cell Nuclei: A Computer Model Approach Based on Gene Density Indicates a Probabilistic Global Positioning Code. *Biophysical Journal*, **86** : 2803-2812 (2004).
31. Pombo A., Branco M.R., Functional organisation of the genome during interphase. *Current Opinion in Genetics & Development*, **17** : 451–455 (2007).

32. Cremer T., Cremer M., Chromosome territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2** : Article N°a003889 (2010).
33. Li G., Reinberg D., Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **21** : 175–186 (2011).
34. Tumber T. et Belmont A.S., Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. *Nature Cell Biology*, **3** : 134–139 (2001).
35. Razin S. V., Gavrilov A. A., Pichugin A., Lipinski M., Iarovaia O. V. et Vassetzky Yegor S., Transcription factories in the context of the nuclear and genome organization. *Nucleic Acids Research*, **39** : 9085–9092 (2011).
36. Li G. et Reinberg D., Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **21** : 175–186 (2011).
37. Davis S. K. et Bardeen C. J., The connection between chromatin motion on the 100 nm length scale and core histone dynamics in live XTC-2 cells and isolated nuclei. *Biophysical Journal*, **86** : 555–564 (2004).
38. Olson M., Dundr M. et Szebeni A., The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in Cell Biology*, **10** : 189–196 (2000).
39. Wienzek S. et Dobbelstein M., Viral and cellular factors that target the promyelocytic leukemia oncogenic domains strongly activate a glucocorticoid-responsive promoter. *Journal of Virology*, **75** : 5391–5397 (2001).
40. Platani M., Goldberg I., Swedlow J. R. et Lamond A. I., *In vivo* analysis of cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *Journal of Cell Biology*, **151** : 1561–1574 (2000).
41. Halle J. P. et Meisterernst M., Gene expression: increasing evidence for a transcriptosome. *Trends in Genetics*, **12** : 161–163 (1996).
42. Gall J. G., Bellini M., Wu Z. et Murphy C., Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and transcriptosomes. *Molecular Biology of the Cell*, **10** : 4385–4402 (1999).
43. Aparicio O. M., Weinstein D. M., Bell S. P., Components and dynamics of DNA replication complexes in *S-cerevisiae*: Redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, **91** : 59-69 (1997)
44. Shirahige K., Hori Y., Shiraishi K., Yamashita M., Takahashi K., Obuse C., Tsurimoto T., Yoshikawa H., Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature*, **395** : 618-621 (1998).
45. Robinett C. C., Straight A., Li G., Wilhelm C., Sudlow G., Murray A. et Belmont A. S., *In vivo* localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using Lac Operator/Repressor recognition. *Journal of Cell Biology*, **135** : 1685–1700 (1996).
46. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N., Capturing chromosome conformation. *Science*, **295** : 1306-1311 (2002).
47. Naumova N., Smith E. M., Zhan Y., Dekker J., Analysis of long-range chromatin interactions using Chromosome Conformation Capture. *Methods*, **58** : 192–203 (2012).

48. Cardoso M. C., Schneider K., Martin R. M., Leonhardt H., Structure, function and dynamics of nuclear subcompartments. *Current Opinion in Cell Biology*, **24** : 79-85 (2012).
49. Chuang Chien-Hui, Belmont A. S., Moving chromatin within the interphase nucleus-controlled transitions? *Seminars in Cell Developmental Biology*, **18** : 698-706 (2007).
50. Gasser S. M., Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science*, **296** : 1412-1416 (2002).
51. Swygert S. G., Peterson C. L., Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, **1839** : 728-736 (2014).
52. Zentner, G.E., and Henikoff, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20** : 259-266. (2013).
53. Altmeyer, M., and Lukas, J. Guarding against collateral damage during chromatin transactions. *Cell*, **153** :1431-1434. (2013).
54. Polo, S.E., and Jackson, S.P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Development*, **25**, 409-433. (2011).
55. Dion V., Gasser S. M., Chromatin Movement in the Maintenance of Genome Stability. *Cell*, **152** :1355-1364 (2013).
56. Price, B.D., and D'Andrea, A.D. Chromatin remodeling at DNA doublestrand breaks. *Cell* **152**, 1344-1354 (2013).
57. Ehrenhofer-Murray A. E., Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *European Journal of Biochemistry*, **271** : 2335-2349 (2004).
58. Levi V., Ruan Q., Plutz M., Belmont A. S. et Gratton E., Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope. *Biophysical Journal*, **89** : 4275-4285 (2005).
59. Davis S. K. et Bardeen C. J., Cross-linking of histone proteins to DNA by UV illumination of chromatin stained with Hoechst 33342. *Photochemistry and Photobiology*, **77** : 675-679 (2003).
60. Davis S. K et Bardeen C. J., Time-resolved Microscopy of Chromatin In Vitro and In Vivo. *Photochemistry and Photobiology*, **81** : 548-555 (2005).
61. Turner B. M., Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays*, **22** : 836-845 (2000).
62. Berger S. L., Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12** : 142-148 (2002).
63. Sun Z. W. et Allis C. D., Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418** : 104-108 (2002).
64. Boeger H., Griesenbeck J., Strattan J. S. et Kornberg R. D., Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Molecular Cell*, **11** :1587-1598 (2003).
65. Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W. H., Sen S. et Wu C., ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, **303** : 343-348 (2004).

66. Yadon A. N., Singh B. N., Hampsey M., Tsukiyamal T., DNA Looping Facilitates Targeting of a Chromatin Remodeling Enzyme. *Molecular Cell*, **50** : 93-103 (2013).
67. Banks D. S. et Fradin C., Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophysical Journal*, **89** : 2960–2971 (2005).
68. Shav-Tal Y., Darzacq X., Shenoy S. M., Fusco D., Janicki S. M., Spector D. L., Singer S. H., Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, **304** : 1797–1800 (2004).
69. Janicki S. M., Spector D. L., Nuclear choreography: interpretations from living cells. *Current Opinion in Cell Biology*, **15** : 149–157 (2003).
70. Politz J. C. R., Tuft R. A., Pederson T., Diffusion-based transport of nascent ribosomes in the nucleus. *Molecular Biology of the Cell*, **14** : 4805–4812 (2003).
71. Houtsmuller A. B., Rademakers S., Nigg A. L., Hoogstraten D., Hoeijmakers J. H. J., Vermeulen W., Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, **284** : 958 (1999).
72. Phair R. D., Misteli T., High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404** : 604–609 (2000).
73. Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown D. T., Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408** : 877 (2000).
74. Hager G. L., Elbi C., Becker M., Protein dynamics in the nuclear compartment. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12** : 137 (2002).
75. Beaudouin J., Moro-Bermudez F., Klee T., Daigle N., Ellenberg N., Dissecting the Contribution of Diffusion and Interactions to the Mobility of Nuclear Proteins. *Biophys. J.*, **90** : 1878–1894 (2006).
76. Sleeman E. J., Trinkle-Mulcahy L., Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance ; *Current Opinion in Cell Biology*, **28** : 76-83 (2014).
77. Muratani M., Gerlich D., Janicki S. M., Gebhard M., Eils R., Spector D. L., Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nature Cell Biology*, **4** : 106–110 (2002).
78. Olson M., Dundr M., The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and Cell Biology*, **123** : 203–216 (2005).
79. Misteli T., Caceres J. F., Spector D. L., The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, **387** : 523–527 (1997).

## CHAPITRE 3

### DISPOSITIF EXPERIMENTAL, MATERIEL ET PROTOCOLES.

Dans ce troisième chapitre, nous allons présenter l'ensemble de l'aspect expérimental de ce travail ; à la fois l'aspect physique avec la diffusion dynamique de la lumière et l'aspect biologique avec les systèmes étudiés et leurs conditions de culture. Tout d'abord, nous allons présenter succinctement les principes de la diffusion dynamique de la lumière. Puis, nous essayerons de lister les différents processus ayant lieu à l'intérieur du noyau, que nous pensons être à l'origine des processus de la diffusion de la lumière observée. Ensuite nous décrirons le montage expérimental de diffusion de la lumière que nous avons développé spécifiquement pour réaliser nos expériences. Pour finir ce chapitre, nous présenterons les différents systèmes biologiques sur lesquels nous avons travaillé et les protocoles que nous avons utilisés pour le conditionnement, le contrôle et la synchronisation des cellules sur lesquelles nous avons mené nos expériences.

#### 3.1. DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE.

##### 3.1.1. Généralités et principes.

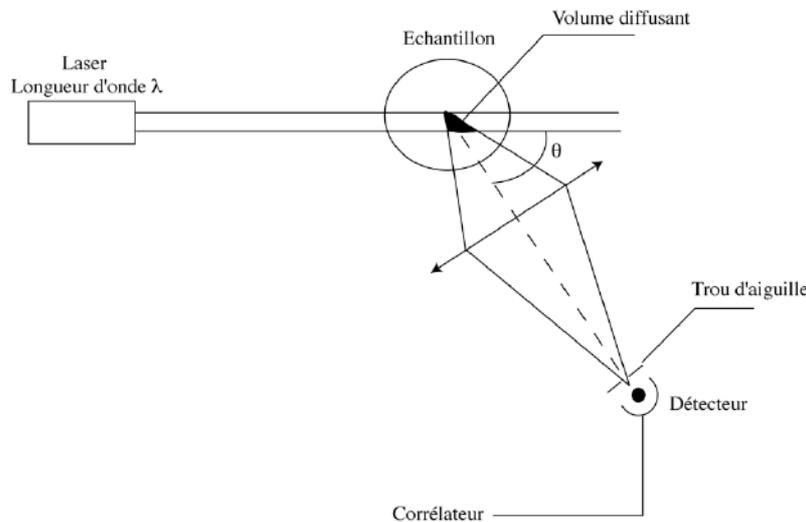
La diffusion dynamique de la lumière est une technique « classique », qui est généralement utilisée pour sonder la dynamique des systèmes de la « matière molle » depuis plus de cinquante ans [1, 2]. Elle a été utilisée, et est toujours utilisée, avec succès pour sonder les propriétés dynamiques des colloïdes [3, 4], des polymères [5, 6], des micelles [7, 8], des cristaux liquides [9, 11], mais, aussi en biophysique [12]. Dans ce dernier domaine elle a surtout été utilisée pour étudier des molécules d'intérêt biologique, les protéines [13, 14], les filaments d'actine [15], l'ADN [16, 17] ou encore la chromatine [18, 19], en solution (donc, pas exactement dans des conditions physiologiques). Quelques expériences ont aussi porté sur l'étude des propriétés morphologiques de la cellule *in vitro* [20, 21] ou dans les tissus [22], afin d'établir un diagnostic dans le cadre du dépistage du cancer. Mourant *et al.* [20] ont ainsi mis en évidence des différences significatives entre les propriétés de la lumière diffusée par des fibroblastes de rat et par des fibroblastes tumorigéniques dérivés de la même lignée. Ces différences sont dues à la taille plus importante de certaines particules de la lignée cancéreuse. Une autre expérience menée sur cette même lignée cancéreuse a consisté à comparer la contribution du noyau et de la cellule dans son ensemble à la diffusion de la lumière d'un faisceau lumineux incident [22]. Environ 30 à 40 % de la lumière diffusée par toute la cellule provient du noyau (pour le reste de l'intensité, les mitochondries semblent également responsables d'une bonne partie de la lumière diffusée), ainsi la diffusion de la lumière est très sensible aux changements de forme, de volume ou d'activité du noyau. Avec la même idée, Backman *et al.* [23] ont également établi une méthode fondée sur la diffusion de la lumière pour repérer des cellules cancéreuses sur l'épithélium d'organes humains. Cette méthode consiste à éclairer les cellules épithéliales de l'organe avec une fibre optique délivrant la lumière provenant d'un brûleur au xénon puis à analyser le spectre de la lumière réfléchi. Ils sont ainsi en mesure d'établir la taille du noyau des cellules éclairées. La taille du noyau d'une cellule épithéliale cancéreuse étant 2 à 4 fois plus important que celle du noyau d'une cellule épithéliale normale, il

est possible de repérer facilement avec cette méthode la présence de cellules cancéreuses. La diffusion de la lumière a également été utilisée pour mesurer les variations de volumes de cellules adhérentes suite à un choc osmotique [24]. Tandis que d'autres groupes ont étudié, avec cette technique, les propriétés dynamiques des membranes [25]. Des expériences récentes ont utilisé un montage classique de diffusion de la lumière pour montrer les différences entre différentes lignées cellulaires en suspension dans du milieu de culture [26]. Toujours récemment, des études utilisant la diffusion dynamique de la lumière couplée à de l'holographie ont été conduites pour étudier la dynamique interne et la croissance d'un agrégat de cellules cancéreuses [27, 28]. Une autre expérience, combinant diffusion de la lumière et tomographie par cohérence optique (OCT), a été utilisée pour étudier les vitesses axiale et transversale du flux sanguin dans le cortex cérébral et mesurer la motilité intracellulaire [29]. Cette technique permet de produire une carte 3D du coefficient de diffusion des mouvements non-translationnels des organites intracellulaires.

Le principe de cette technique consiste à faire passer un faisceau lumineux (généralement un faisceau laser dans son mode fondamental) à travers un échantillon, et à étudier l'intensité lumineuse diffusée dans une direction donnée [1, 2] (Figure 3.1). La diffusion de la lumière a pour origine les fluctuations spatio-temporelles de l'indice de réfraction du milieu traversé. Elle provient donc des propriétés optiques locales de l'échantillon, qui sont elles-mêmes liées à la structure et à la dynamique interne de l'échantillon étudié. L'indice de réfraction, en un point  $\mathbf{r}$  du milieu et au temps  $t$ , peut s'écrire sous la forme :

$$n(\mathbf{r}, t) = \langle n \rangle + \delta n(\mathbf{r}, t)$$

où  $\delta n(\mathbf{r}, t)$  représente les fluctuations spatio-temporelle de l'indice de réfraction de l'échantillon autour de sa valeur moyenne,  $\langle n \rangle$ .

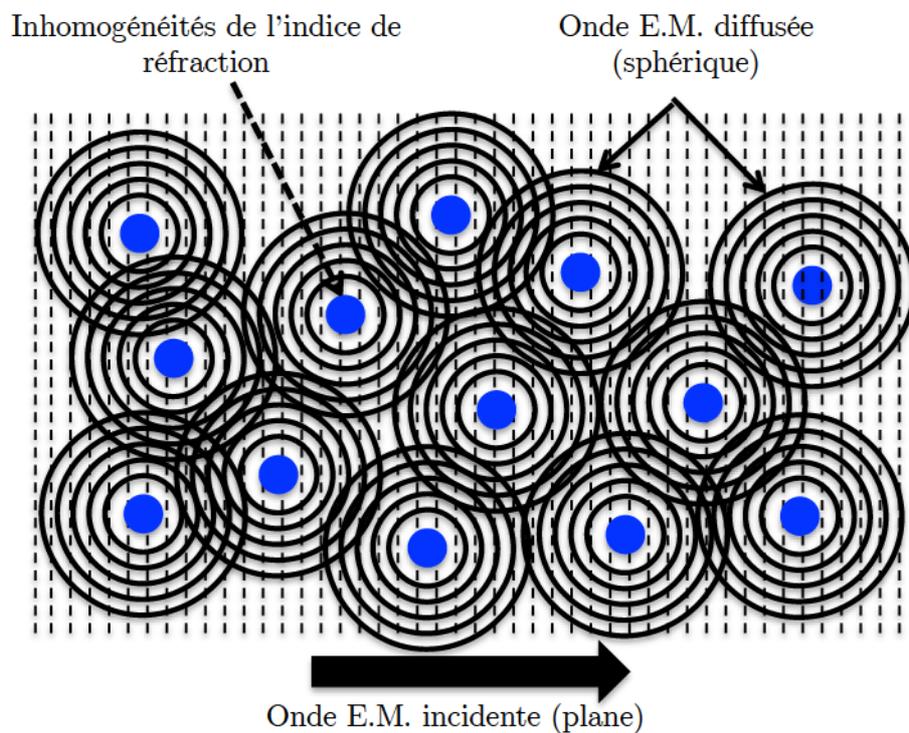


**Figure 3.1.** Schéma de principe d'une expérience « classique » de diffusion de la lumière. Un faisceau laser de longueur d'onde  $\lambda$  est envoyé sur un échantillon. Les fluctuations de l'indice de réfraction à l'intérieur de l'échantillon entraînent la diffusion de la lumière dans tout l'espace. La lumière diffusée est recueillie en plaçant un détecteur à un angle  $\theta$  du faisceau incident. La taille du volume diffusant (l'endroit d'où vient la lumière diffusée) est définie par l'optique et la taille du trou d'aiguille placé devant le détecteur.

Pour fixer les idées, imaginons une onde électromagnétique (EM) plane, de longueur d'onde  $\lambda$ , traversant un milieu d'indice  $n_0$  dans lequel sont dispersées des particules sphériques de taille  $a$  et

d'indice  $n_1$ , tel que :  $(n_1 - n_0) \cdot a \ll \lambda$ . Ici les inhomogénéités d'indice viennent de la différence d'indice entre le milieu et les particules. Cette différence va être à l'origine, pour chaque particule, d'une onde E.M. diffusée, qui est sphérique, centrée sur la particule et de longueur d'onde  $\lambda$  (Figure 3.2).

En un point M de l'espace situé loin du milieu diffusant, le champ E.M. est la somme de toutes les ondes E.M. diffusées créées par les particules. Ainsi, l'intensité diffusée peut être vue comme la « figure de diffraction » du milieu traversé. Si les objets diffusants bougent les uns par rapport aux autres (par exemple sous l'effet du mouvement Brownien, ou des fluctuations de concentration), l'intensité diffusée mesurée en M va varier dans le temps. Donc, si on analyse les fluctuations temporelles de l'intensité diffusée, on peut remonter au coefficient de diffusion des particules ou aux propriétés dynamiques du système.



**Figure 3.2.** Principe de la diffusion de la lumière : une onde électromagnétique plane traverse un milieu d'indice  $n$ , chaque inhomogénéité d'indice est source d'une onde électromagnétique sphérique diffusée dans tout l'espace. Donc, au point d'observation, l'onde électromagnétique observée est la somme des contributions produites par toutes ces inhomogénéités d'indice.

En pratique, pour réaliser une expérience de diffusion dynamique de la lumière, on place un détecteur pour mesurer les variations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée dans une direction donnée ; direction caractérisée par  $\theta$ , l'angle entre la direction du faisceau lumineux incident et la direction de l'espace dans laquelle on détecte la lumière diffusée (Figure 3.1). L'analyse de ces fluctuations temporelles conduit à la dynamique des processus à l'origine des fluctuations de l'indice de réfraction sur une échelle de longueur  $l$ , qui est liée à cet angle de diffusion. Cette échelle de longueur  $l$  sur laquelle on sonde les fluctuations de l'indice de réfraction du milieu à l'origine de l'intensité lumineuse diffusée est définie par :  $l = 2\pi/q$ , où  $q$  est le module du vecteur d'onde de diffusion,  $q$ . Pour de la diffusion élastique, c'est-à-dire quand l'énergie des

photons est conservée lors du processus de diffusion, le module de  $\mathbf{q}$  dépend de l'angle de détection  $\theta$  et s'écrit :

$$q = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2),$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement,  $n$  l'indice de réfraction moyen du milieu.

Les variations locales de l'indice de réfraction du milieu peuvent être dues à de multiples phénomènes, tels que les variations locales de la température, de la densité, de la composition (fluctuations des concentrations respectives des différents composants, réactions chimiques), des mouvements translationnels et/ou rotationnels de particules (diffusion brownienne, réorientation), ou de la structure du milieu (biréfringence), ou des changements de conformation d'objets dispersés dans le milieu (par exemple les fluctuations de conformation d'un polymère). On montre que le champ électrique diffusé est proportionnel à la transformée de Fourier spatiale des fluctuations de  $n$ , *i.e.*  $\delta\hat{n}(\mathbf{q}, t)$ . Ainsi, en faisant varier l'angle  $\theta$ , on fait varier  $\mathbf{q}$  et on peut mesurer, dans le volume diffusant, les temps caractéristiques des fluctuations d'indice sur des échelles spatiales allant de la centaine de nanomètres ( $l \approx 230$  nm pour  $\theta=170^\circ$ ,  $n=1.33$  et  $\lambda=632,8$  nm) au micromètre (environ 3  $\mu\text{m}$  pour  $\theta=10^\circ$ ,  $n=1.33$  et  $\lambda=632,8$  nm).

Ensuite, pour remonter du signal mesuré à la dynamique de l'échantillon, l'analyse des fluctuations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée, peut se faire de deux manières différentes.

- La méthode la plus courante (et aussi la plus simple à mettre en œuvre) consiste à utiliser un appareil, appelé corrélateur, qui construit automatiquement la fonction d'autocorrélation du signal diffusé, *i.e.*  $\langle I(t)I(0) \rangle$  et, ensuite, à analyser cette fonction. Cette technique marche très bien pour des échantillons dont l'état est stationnaire pendant la durée de l'expérience et dont les temps de relaxation (*i.e.* la dynamique) sont compris dans l'intervalle  $10^{-4} - 1$  s (ce qui correspond à la plupart des systèmes de la « matière molle » à l'équilibre thermodynamique).
- La seconde technique, peu utilisée, consiste à mesurer directement les fluctuations temporelles de l'intensité diffusée, *i.e.*  $I(t)$  (par exemple en comptant à l'aide d'une carte d'acquisition le nombre  $N$  de photons diffusés par intervalle de temps  $\delta t$  pendant un temps  $T$  très grand devant  $\delta t$ ), et ensuite à analyser ce signal. Cette technique permet de sonder la dynamique du système sur une gamme de temps plus large, en particulier aux temps longs et, peut s'appliquer aux échantillons dont l'état n'est pas stationnaire pendant la durée de l'expérience, par contre l'analyse du signal diffusé peut s'avérer très compliqué.

### 3.1.2. Origines de la diffusion de la lumière par un noyau.

Comme cela a déjà été écrit, la diffusion de la lumière nous offre la possibilité de sonder les variations de l'indice de réfraction sur différentes échelles de temps. Comme les processus à l'origine de ces variations sont caractéristiques de l'état de la cellule, nous pouvons espérer observer des différences notables dans les propriétés dynamiques du noyau entre les différentes phases du cycle cellulaire, ou pour des conditions de culture différentes. En conclusion, la diffusion dynamique de la lumière doit nous permettre d'appréhender, de façon plus globale que les méthodes usuelles basées sur la microscopie de fluorescence, la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante à un instant donné.

Si l'on considère le noyau d'une cellule vivante, on identifie, assez facilement, un nombre important de processus internes au noyau qui sont à même de pouvoir diffuser la lumière. Par exemple, la diffusion (au sens « brownien ») dans le noyau de complexes macromoléculaires : les

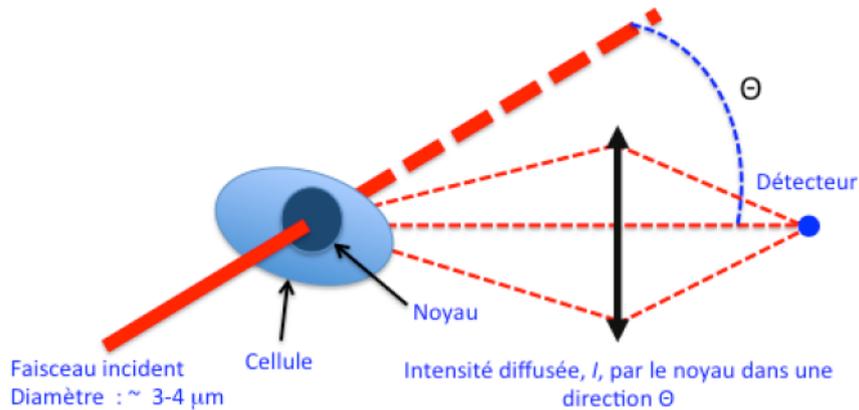
sous-unités des ribosomes, les ARN messagers, ou les ARN ribosomiques, devrait avoir une signature en diffusion dynamique de la lumière, mais, probablement aussi, la diffusion brownienne des protéines nucléaires. De même, les déplacements et la réorientation de la fibre de chromatine à l'intérieur du territoire chromosomique vont entraîner, eux aussi, des modifications locales de l'indice de réfraction (du noyau). On imagine que les processus de remodelage permanent des fibres de chromatine (compaction/décompaction) pour permettre les activités de transcription, de réplication, de réparation de l'ADN vont, eux aussi, entraîner localement des variations de l'indice de réfraction (car ils vont correspondre à des changements de structure, mais aussi de concentration en chromatine). Finalement, des variations locales de l'indice de réfraction du noyau peuvent également être engendrées par les nombreuses réactions chimiques qui se produisent à chaque instant à l'intérieur du noyau. On s'attend donc à ce que l'intensité lumineuse diffusée soit la superposition de différentes contributions, venant des processus cités plus haut, à l'origine des variations de l'indice de réfraction du noyau. La diffusion dynamique de la lumière permet de sonder la dynamique d'un système sur plusieurs échelles de temps, donc, si ces processus ont des temps caractéristiques différents, il sera possible de les distinguer. De plus, comme ces processus sont caractéristiques de l'état de la cellule, on peut espérer observer des différences notables dans les propriétés dynamiques du noyau en fonction de l'état de la cellule.

Il faut ici souligner les spécificités d'un système comme le noyau d'une cellule vivante, qui est bien plus complexe qu'un simple système à plusieurs composants. Tout d'abord, le noyau est un système hors équilibre, donc non-stationnaire, c'est-à-dire qui évolue au cours du temps. C'est aussi un système actif : en permanence il s'y produit un grand nombre de réactions chimiques différentes, nécessaires à la survie et à l'adaptation de la cellule, qui consomment et produisent de l'énergie (parmi ces réactions chimiques, on pourra citer l'hydrolyse des molécules d'ATP, la synthèse de brins d'ADN lors de la réplication, ou de ceux d'ARN lors de la transcription). À un instant donné, l'activité en deux points du noyau n'est pas, forcément, exactement la même ; il peut se passer simultanément et à très faible distance l'une de l'autre deux activités complètement différentes [30–32] (*e.g.* dans deux territoires chromosomiques voisins). Par exemple, il y a toujours, dans le noyau, à la fois des activités de transcription et de réparation, ainsi que d'autres activités dans les différents *foci* (amas) nucléaires. En conséquence, le noyau est un système « non-ergodique », ce, qui va avoir plusieurs conséquences sur l'intensité lumineuse diffusée et donc sur les mesures que nous allons réaliser (voir Chapitres 4 et 5). De plus, même sur des temps très courts, à l'intérieur d'un territoire chromosomique, l'activité peut changer : des activités de transcription, de réplication, ou de réparation, peuvent démarrer ou s'arrêter [30–32]. De ce fait, pendant nos mesures, on s'attend à sonder différents mécanismes et observer plusieurs processus biologiques concomitants. Enfin, du fait du déplacement des territoires chromosomiques, ainsi que des mouvements d'ensemble du noyau, la nature du volume diffusant peut varier au court du temps. Le volume diffusant (*i.e.* le volume sondé par notre expérience) est inférieur à celui du noyau (voir : § 3.3.2. (vi)), il fait environ  $50 \mu\text{m}^3$ , on peut donc estimer que l'on y trouvera en moyenne 6 – 7 territoires chromosomiques. De ce fait, on peut s'attendre à ce que la dynamique sondée présente des variations importantes en fonction du temps, de la position du volume diffusant dans le noyau et que les temps caractéristiques que l'on cherche à mesurer varient en fonction du temps et de l'endroit. En conséquence, une mesure sur un temps fini ne donnera qu'une information partielle sur la dynamique interne du noyau. Les implications de ces spécificités sur le protocole et l'analyse des mesures seront discutées au Chapitre 4 (Traitement du signal) et au Chapitre 5 (Expériences et Résultats).

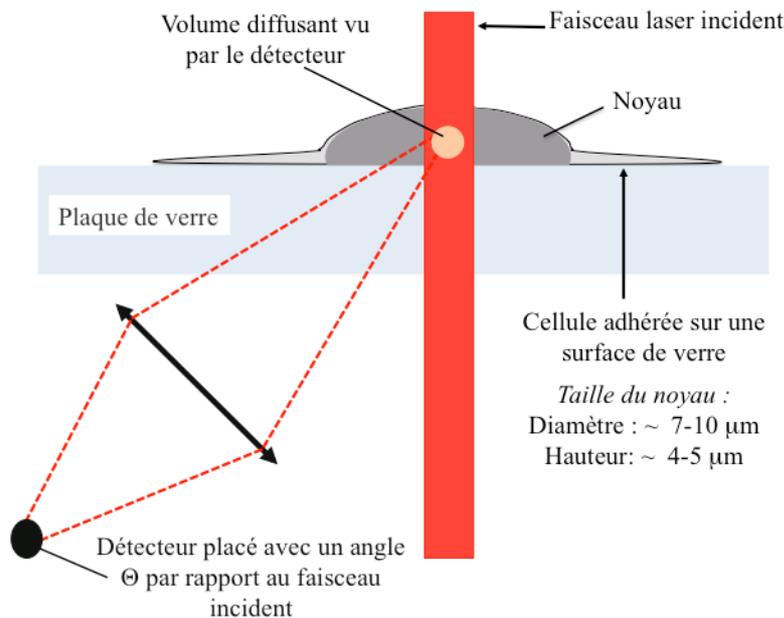
### 3.2. MONTAGE DE DIFFUSION DE LA LUMIERE SPECIFIQUE POUR CETTE ETUDE.

#### 3.2.1. Principe du montage et contraintes.

En pratique, essayer de réaliser des expériences de diffusion dynamique de la lumière sur le noyau d'une cellule vivante (principe de l'expérience Figure 3.3) impose un certain nombre de contraintes qui conditionnent fortement le montage expérimental. Ces contraintes sont intrinsèques aux systèmes étudiés ici et sont de deux ordres : physiques et physiologiques.



A)



B)

**Figure 3.3.** A) Principe de l'expérience que nous voulons réaliser. Elle consiste à « éclairer » le noyau d'une cellule vivante avec un faisceau laser. La lumière diffusée est collectée dans une direction  $\theta$  par une lentille qui fait l'image du volume diffusant sur la surface photosensible d'un détecteur. B) En pratique, pour pouvoir immobiliser les cellules pendant les mesures on les fait adhérer sur une surface de verre.

En premier lieu, il faut illuminer le noyau d'une cellule vivante, dont le diamètre caractéristique est d'environ  $7 - 10 \mu\text{m}$ , pendant un temps nécessaire à la mesure, avec un faisceau

laser dont la longueur d'onde et la puissance ne provoquent aucun dommage à la cellule. Ceci implique que la taille du faisceau soit plus petite que le diamètre du noyau (donc moins de  $7\ \mu\text{m}$ ) ; que les cellules soient quasiment immobiles (ou du moins ne bougent pas trop) pendant la durée de la mesure ; que l'on ait un dispositif de visualisation qui permette de voir les noyaux des cellules et le faisceau laser ainsi qu'un système de déplacement afin de pouvoir amener le noyau d'une cellule dans le faisceau ; que la longueur d'onde et la puissance du faisceau laser soient bien choisies pour ne pas endommager le noyau.

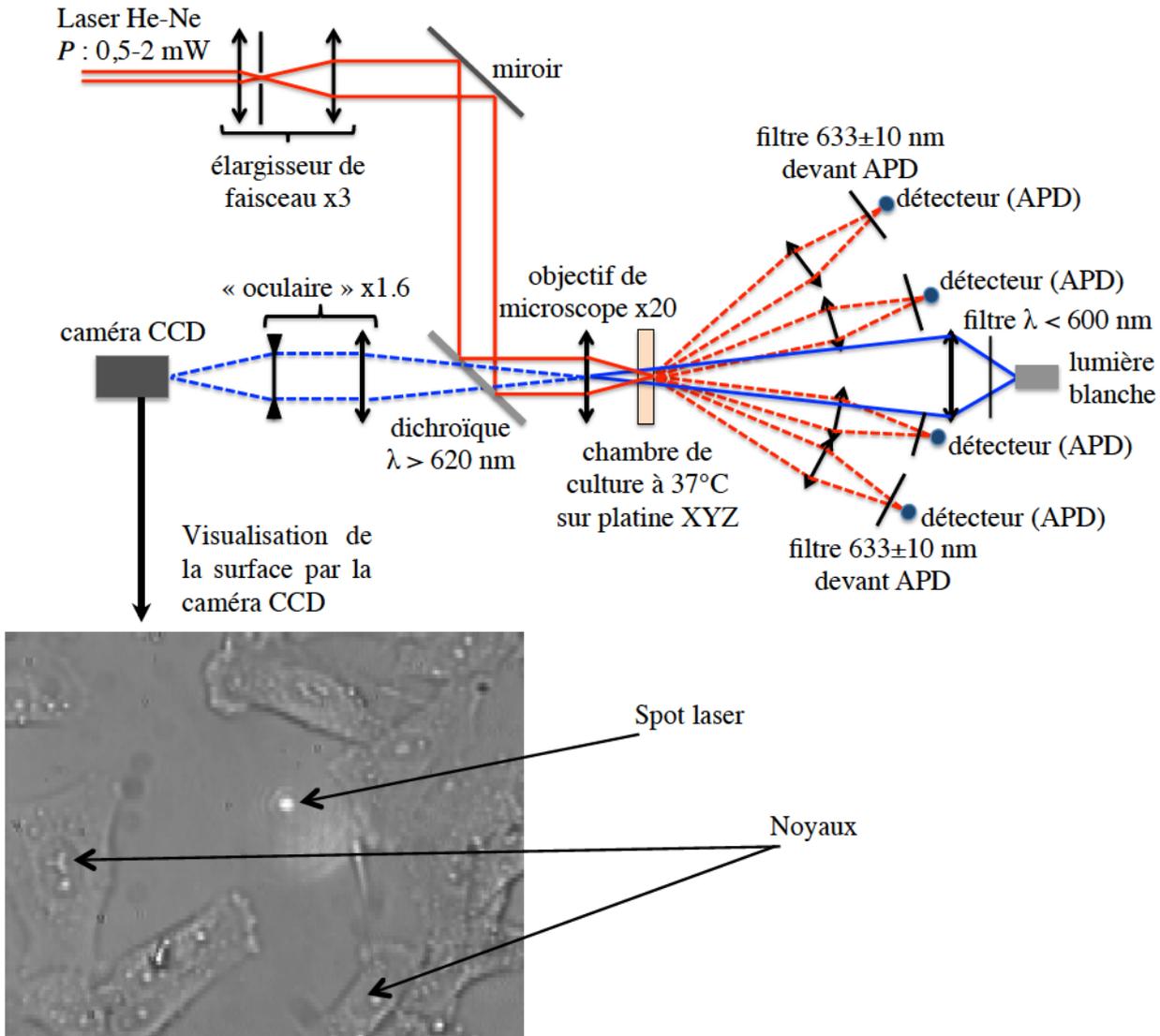
Pour que ces expériences aient un intérêt, elles doivent obligatoirement apporter des informations fiables sur les propriétés dynamiques du noyau (que ce soit au cours de son cycle cellulaire ou quand il se trouve dans des conditions de culture particulières). Il faut donc, impérativement, que pendant la durée des expériences, les cellules aient un comportement « normal » ; *i.e.* qu'elles se comportent dans notre montage comme elles se comportent dans une boîte de Pétri placée dans un incubateur. Ceci implique un contrôle physiologique strict des cellules lors des expériences pour les maintenir dans les conditions nécessaires à leur survie et à leur prolifération (milieu de culture adéquat, température maintenue à  $37^\circ\text{C}$  et pH constant autour de 7,4), en l'absence de toute contamination par des bactéries et/ou des champignons.

### 3.2.2. Dispositif expérimental.

Comme pour la thèse de Michaël Suissa, le dispositif expérimental que nous avons développé pour réaliser nos expériences (Figure 3.4), aurait très bien pu être monté sur un microscope commercial. Cependant, nous avons préféré monter l'ensemble du dispositif expérimental sur une table optique et ceci pour deux raisons. Tout d'abord, pour des raisons d'encombrement car il nous semblait important d'avoir de la place accessible autour du montage expérimental. Par exemple pour un pousse seringue pour pouvoir faire des échanges de milieu de culture en cours d'expérience. Mais, aussi, pour pouvoir recueillir l'intensité diffusée, simultanément, à plusieurs angles (*i.e.* à des vecteurs d'onde de diffusion différents), ce qui offre la possibilité d'étudier la dépendance en fonction de l'échelle spatiale, résolue en temps, des processus de relaxation que nous mesurons. Contrairement aux bancs de diffusion de la lumière classiques, le système de collection de l'intensité diffusée ne peut pas être, ici, placé sur le bras d'un goniomètre car la taille du volume diffusant est trop petite pour que le réglage de l'optique de détection soit conservé lors de la rotation du bras. C'est pour cela que nous avons monté un système qui fait la détection en simultané de l'intensité diffusée à quatre angles différents. C'est une amélioration importante par rapport au montage original qui avait été développé pendant la thèse de Michaël Suissa [33–36].

Dans la suite de ce paragraphe, nous détaillons les différents éléments de ce montage expérimental.

**i) Immobilisation des cellules.** Pour avoir des noyaux qui restent sous le faisceau laser suffisamment longtemps pour faire nos mesures, nous travaillons avec des cellules qui adhèrent sur les surfaces de verre et dont les déplacements sur ces surfaces sont, à la fois, peu fréquents et très lents (de l'ordre de  $1\text{--}2\ \mu\text{m}$  par heure au maximum). Dans plus de 9 cas sur 10, le noyau reste illuminé par le laser pendant toute la durée de l'expérience, qui est de l'ordre de trente minutes environ. Dans notre montage, les cellules sont placées verticalement et non plus horizontalement comme sur un microscope classique. Ceci aurait pu poser des problèmes, mais, pendant la thèse de Michaël Suissa il a été vérifié que cette configuration n'a strictement aucune incidence sur le comportement des cellules et qu'elles restent accrochées sur la surface à l'endroit où elles ont adhéré.



**Figure 3.4.** « Haut », représentation schématique du montage expérimental mis au point pour les expériences de diffusion dynamique de la lumière dans le noyau des cellules. Une lame  $\lambda/2$  associée à un cube séparateur permet de sélectionner la puissance lumineuse incidente que l'on focalise sur le noyau grâce à un objectif de microscope. L'élargisseur de faisceau permet d'avoir un « spot » laser inférieur au diamètre du noyau des cellules étudiées. Le miroir dichroïque permet de renvoyer le faisceau laser vers l'objectif tout en transmettant la lumière blanche vers la caméra CCD pour faire de l'imagerie. Des filtres interférentiels placés avant les photodiodes à avalanche (ADP) permettent de ne mesurer que les « photons rouges » dans la bande 620–640 nm. Un filtre passe-bas ( $\lambda < 600$  nm) placé après la source de lumière blanche permet d'éviter que des « photons rouges » émis par cette lampe et réfléchis par les surfaces de verre soient mesurés par les ADP. « Bas », image vue par la caméra CCD, image qui correspond à la visualisation de l'échantillon. On observe plusieurs cellules (ici des neuroblastomes humain de la lignée SHEP) adhérentes et étalées sur la surface de verre (champ d'environ  $200 \times 200 \mu\text{m}$ ). On distingue parfaitement le noyau de chaque cellule ainsi que la réflexion du faisceau laser focalisé sur cette surface. On remarque que la taille du spot laser est plus petite que le diamètre du noyau des cellules étudiées. A l'aide d'une platine de translation deux axes, x-y, on peut facilement déplacer la surface pour amener le noyau d'une des cellules visibles au point de focalisation du faisceau laser.

ii) **Laser.** Comme source lumineuse pour nos expériences, nous avons utilisé un laser He-Ne (REO-30993), monomode TEM 00, de longueur d'onde  $\lambda = 632,8$  nm, polarisé rectiligne uniforme (pour l'expérience, la polarisation en sortie du laser a été mise perpendiculaire au plan de diffusion). Le choix de cette source a été fait pour plusieurs raisons ; limiter la nocivité de l'irradiation tout en travaillant dans le visible (voir détails plus loin), bénéficier de la stabilité de cette source en terme de puissance de sortie (la puissance nominale de sortie du laser est de 12 mW), de pointé, de polarisation, de qualité du mode transverse, de largeur de raie ( $< 30$  GHz), qui nous assure un faisceau avec d'excellentes propriétés stables pendant toute la durée des expériences.

iii) **Contrôle de la puissance incidente.** Chacune des voies de notre système de détection (voir plus loin) ne peut pas compter plus de  $10^7$  photons par seconde. En conséquence, l'intensité lumineuse incidente doit être telle que sur aucun des compteurs on ne dépasse ce seuil. De plus, comme le faisceau doit être très fortement focalisé pour avoir une taille inférieure à celle du noyau, si on ne veut pas brûler celui-ci, ni l'endommager gravement, il faut travailler avec une puissance assez faible. Après quelques tests (voir détails § 3.2.3), nous avons choisi d'utiliser une puissance d'irradiation de 0,1 mW qui nous permet, à la fois, de ne pas endommager les cellules et d'avoir moins de  $10^7$  photons par seconde sur chacun des compteurs.

La puissance lumineuse en sortie du laser He-Ne que nous utilisons est de 12 mW et elle n'est pas modulable. Pour obtenir une puissance lumineuse incidente de l'ordre de 0,1 mW, nous utilisons un système composé d'une lame  $\lambda/2$ , qui sert à faire tourner l'orientation de la polarisation du faisceau laser (polarisé rectiligne vertical par rapport au plan de diffusion en sortie du laser) et d'un cube séparateur qui transmet la composante polarisée horizontalement de la lumière qui le traverse (*i.e.* dans le plan de diffusion) et réfléchit à  $90^\circ$  la composante polarisée verticalement. Avec ce système, en jouant sur l'orientation  $\psi$  de l'axe propre de la lame  $\lambda/2$  par rapport à la direction de polarisation du faisceau laser incident, nous pouvons faire varier continûment la puissance lumineuse d'irradiation de 12 mW à 0 (*i.e.* on suit la loi de Malus :  $I_{\text{irradiation}} \propto \cos^2 \psi$ ). La polarisation du faisceau laser après le cube est horizontale, c'est-à-dire dans le plan de diffusion, en conséquence, nous plaçons juste après le cube une seconde lame  $\lambda/2$  pour refaire tourner la polarisation de  $\pi/2$  pour que la lumière illuminant le noyau soit bien polarisée verticale.<sup>1</sup>

iv) **Focalisation du faisceau laser.** Tout d'abord, pour obtenir un faisceau laser qui illumine seulement le noyau d'une cellule, donc qui fasse moins de  $7 \mu\text{m}$  de diamètre, on focalise le faisceau du laser, sur la surface sur laquelle les cellules ont adhéré, à l'aide d'un objectif de microscope (objectif Nikon, de grossissement  $\times 20$  et d'ouverture numérique 0,45). En sortie du laser, le diamètre du faisceau est de l'ordre de  $650 - 700 \mu\text{m}$ , ce qui est trop petit pour avoir un spot laser de moins de  $7 \mu\text{m}$  de diamètre sur la surface,<sup>2</sup> donc, nous l'élargissons d'un facteur 3 à l'aide d'un système afocal placé avant l'objectif (voir Figure 3.4 ; 2 lentilles convergentes de focales

<sup>1</sup> Pendant sa thèse, Michaël Suissa avait effectué des mesures de transmission qui ont montré que plus de 96 % du faisceau incident focalisé sur le noyau était transmis. Ce résultat indique que nous pouvons complètement négliger la diffusion multiple. Ce résultat était prévisible, en effet, on peut sans problème observer le noyau d'une cellule par microscopie de contrastes de phases, ce qui signifie que le milieu nucléaire est quasiment transparent.

<sup>2</sup> Le rayon,  $w_0$ , du faisceau focalisé peut être estimé par la formule :  $w_0 = f\lambda/n\pi w_1$ , où  $f$  est la focale de la lentille,  $\lambda$  la longueur d'onde,  $w_1$  le rayon du faisceau à l'entrée de la lentille et  $n$  l'indice du milieu (ici on assimile l'objectif de microscope à une lentille convergent mince).

5 et 15 cm, avec un trou de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre pour filtrer le faisceau). Le diamètre du « spot » laser sur la surface est alors de l'ordre de 3 – 4  $\mu\text{m}$ , soit inférieur au diamètre du noyau des cellules étudiées (voir Figure 3.4.bis). Avec un tel diamètre du faisceau laser au point de focalisation, le paramètre confocal (*i.e.* 2 fois la portée de Rayleigh) est estimé être de l'ordre de 10 – 12  $\mu\text{m}$  (ce qui signifie qu'au niveau du noyau, on peut considérer le faisceau laser comme une onde plane).

v) **Visualisation des cellules.** Une fois le faisceau laser focalisé sur la surface, pour pouvoir faire des expériences de diffusion sur le noyau d'une cellule, il est nécessaire d'avoir un système qui permette d'amener précisément le noyau d'une cellule au point de focalisation du laser. Pour cela, il faut savoir exactement où se trouvent les cellules (et les noyaux) sur la surface de verre et où « tape » le faisceau laser. Il est donc impératif de pouvoir visualiser les cellules adhérentes à la surface et, cette image doit être de suffisamment bonne qualité pour que l'on puisse clairement distinguer les noyaux de ces cellules. En pratique, on a reconstruit un microscope en transmission à fond clair à l'aide de l'objectif de microscope utilisé pour focaliser le laser. Pour cela, on éclaire la surface de verre avec une lumière blanche qui se propage dans le sens opposé au laser (voir schéma du montage Figure 3.4.). Cette source de lumière blanche est une lampe à LED qui émet quatre longueurs d'onde distinctes : 470 nm, 530 nm, 590 nm et 625 nm. Pour éviter que des « photons rouges » émis par cette lampe et réfléchis par la surface de verre ne soient « vus » par le système de détection, un filtre passe-bas ( $\lambda < 600$  nm) est placé entre cette source de lumière blanche et la lentille qui focalise cette lumière sur l'échantillon. Grâce à cet éclairage et à l'objectif de microscope, on fait l'image de la surface de verre à l'infini. Cette image est projetée sur une caméra CDD (caméra JAI CB-080 GE, pilotée par un programme LabVIEW que nous avons développé), à l'aide d'un système optique, qui fait office d'oculaire. Ce système optique est constitué d'une lentille divergente de focale – 5 cm et d'une lentille convergente de focale 10 cm ; la première lentille (la divergente) est placée 16 cm de la sortie de l'objectif, la distance entre les deux lentilles est de 8 cm et la caméra est mise à 3,4 cm de la lentille divergente pour avoir une image nette.<sup>3</sup> Cet « oculaire » donne un grandissement supplémentaire de l'ordre de  $\times 1,6 - \times 1,7$ , ainsi, le grandissement total du dispositif (objectif de microscope + « oculaire ») est d'environ  $\times 34$ . (On peut noter que notre grandissement est environ 2 fois plus petit que celui qu'avait Michaël Suissa, mais, avec un capteur de caméra plus petit, on peut voir un champ plus grand, ce qui est plus « confortable pour nos expériences.)

Ce microscope « homemade », nous permet de visualiser un champ de la surface de verre de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$  de côté, où l'on peut bien voir les cellules qui sont adhérentes, ainsi que la réflexion du faisceau laser sur cette surface. Le grossissement et la qualité de l'image permettent de distinguer, sans difficulté, les noyaux des cellules adhérentes à la surface (voir photographie Figure 3.4). Ensuite, en déplaçant la surface de verre, par rapport au faisceau, à l'aide d'une platine de translation deux axes, on peut très facilement amener le noyau d'une des cellules visualisées au point de focalisation du faisceau laser.

vi) **Détection de l'intensité lumineuse diffusée.** On détecte simultanément la lumière diffusée dans quatre directions différentes par rapport à la direction du faisceau incident ; les quatre angles de détection (angle entre le faisceau incident et la direction de détection) sont : 11°, 16°, 27° et 38°. Pour chaque angle, on fait l'image du volume du noyau illuminé par le faisceau

---

<sup>3</sup> Si on appelle  $f_c$  la focale de la lentille convergente,  $f_d$  la focale de la lentille divergente et  $d_1$  la distance entre les deux lentilles, la distance  $d_2$  entre la lentille divergente et la caméra est obtenue à l'aide des formules de conjugaison et elle vaut :  $d_2 = f_d(f_c - d_1) / (f_c - d_1 + f_d)$  ; le grandissement est égal à :  $M = d_2 / (f_c - d_1)$ .

laser sur la face d'entrée d'une fibre optique monomode à l'aide d'une lentille convergente de focale 7,5 cm. Le diamètre de cœur de ces fibres monomodes est de  $5 \mu\text{m}$  et l'ouverture numérique d'environ 0.6.<sup>4</sup> Le grandissement du volume diffusant par les lentilles de collimation est de l'ordre de 1 (on est, approximativement, dans un montage « 4f » ; *i.e.* les distances échantillon/lentille et lentille/fibre sont à peu près égales et de l'ordre de 15 cm), en conséquence, le dispositif de détection nous permet de sélectionner la lumière diffusée uniquement par un volume de l'ordre de  $45 - 55 \mu\text{m}^3$  (*i.e.* légèrement plus grand que le volume diffusant utilisé par Michaël Suissa dans sa thèse  $\approx 35 \mu\text{m}^3$ ). Une fois réglé, ce petit volume diffusant nous permet de ne pas être « pollué » accidentellement par de la lumière diffusée par le milieu de culture, ou par l'interface avec le verre. Des filtres interférentiels centrés sur 630 nm sont placés juste devant les entrées des fibres optiques pour ne laisser passer que les « photons rouges » dans la bande 620–640 nm. Les photons arrivant sur ces fibres optiques sont « conduits » sur les surfaces photosensibles de photodiodes à avalanche (APD ; une par angle de diffusion), qui transforment chaque photon détecté en un pulse TTL délivré en sortie. Plutôt que 4 APD indépendantes, nous avons choisi d'utiliser un module Perkin Elmer SPCM-AQ4C qui est une carte SPCM à 4 voies de détection de photons en parallèles (*i.e.* une APD par voie), alimentée par une alimentation stabilisée triple BK-Precision modèle BK9130. Ceci a pour avantage que les quatre détecteurs ont exactement la même horloge. La largeur d'un pulse TTL produit par un photon est de 40 ns environ, c'est cette largeur qui fixe le nombre maximum de photons que l'on peut détecter (typiquement  $2.10^7$  photons/s) ; à la longueur d'onde à laquelle on travaille, environ 65 – 70 % des photons reçus sont détectés ; le « bruit noir » est, suivant la voie de mesure, de l'ordre de 150 – 200 coups par seconde, donc très inférieur au nombre de photons détectés lors de nos expériences (de l'ordre de  $10^5$  par seconde).

Les pulses délivrés par les photodiodes sont ensuite transmis à une carte d'acquisition National Instrument (NI DAQ USB-6341) avec 4 voies « compteurs » indépendantes, fonctionnant sur 32 bits et pouvant chacune acquérir à 20 MHz. Cette carte est pilotée par un programme LabVIEW que nous avons écrit, et qui nous permet de compter, pour les 4 voies de détection en parallèle, le nombre de photons qui est détecté par chaque APD pendant chaque intervalle de temps  $\delta t$  pour toute la durée choisie pour l'expérience. En fait, comme nous travaillons avec des intervalles de temps très courts (typiquement  $10^{-5}$  s), la carte n'a pas le temps de remettre les compteurs à 0 à la fin de chaque intervalle de temps  $\delta t$ . Donc, en pratique, on « accumule » les photons, en fonction du temps, pendant toute la durée de l'acquisition, en ajoutant le nombre de photons comptés entre  $t_i$  et  $t_i + \delta t$  aux photons qui ont déjà été comptés jusqu'au temps  $t_i$  et, une fois la mesure finie on fait la différence entre le nombre de photons comptés au temps  $t_i$  et celui comptés au temps  $t_i + \delta t$ .<sup>5</sup>

**Remarque 1.** Il faut noter que toutes nos mesures ont été réalisées sans polariseur placé dans le système de détection pour sélectionner des polarisations particulières de la lumière diffusée, c'est-

<sup>4</sup> A chaque expérience, au lieu de faire le réglage pour une optique de collection, pour chacune de ces directions, on doit régler le système de collection pour faire l'image du volume diffusant sur la face d'entrée de la fibre monomode, ce qui augmente sérieusement la difficulté des réglages du montage par rapport à la thèse de M. Suissa.

<sup>5</sup> À l'instant  $t_k$  ( $t_k = k\delta t = \sum_{j=1}^k j\delta t$ , où  $\delta t$  est l'intervalle de temps de comptage), le nombre de photons mesurés associé à ce temps (c'est-à-dire le nombre qui est stocké dans le fichier de mesure) est :  $N(t_k) = \sum_{j=1}^k n(t_j)$ , où  $n(t_j)$  est le nombre de photons qui a été détecté pendant l'intervalle  $[t_{j-1}, t_j]$  ; c'est la quantité qui nous intéresse pour remonter à la dynamique du noyau. Donc, pour avoir le nombre de photons « diffusés » à cet instant, c'est-à-dire  $n(t_k)$ , une fois la l'acquisition finie, on fait sous MatLab la différence :  $N(t_k) - N(t_{k-1})$ .

à-dire que nous mesurons toutes les polarisations. C'est un choix que nous avons fait pour des raisons pratiques. En effet, avec un polariseur placé dans le système de détection, il faut augmenter fortement la puissance du faisceau laser incident pour obtenir un signal exploitable, ce qui peut ne pas être sans conséquence sur le comportement des cellules. Donc, nous avons choisi de ne pas mettre d'analyseur devant les détecteurs.

**Remarque 2.** La direction dans laquelle on détecte la lumière diffusée fait un angle  $\phi$  avec la direction du faisceau laser incident. Ici, contrairement aux montages classiques de diffusion de la lumière, cet angle de détection  $\phi$  n'est pas identique à l'angle de diffusion  $\theta$  que nous avons défini au début de ce chapitre parce que nous travaillons avec une interface verre-air plane et que l'indice de réfraction du noyau est différent de celui du verre (l'indice de réfraction du noyau est estimé être de l'ordre de 1,37 – 1,39). Donc, d'après la loi de Descartes, un photon diffusé par le noyau avec un angle  $\theta$  sera d'abord dévié en entrant dans la lame de verre et, finalement, sortira de celle-ci dans une direction  $\phi$  telle que :  $n_{\text{noyau}} \times \sin\theta = n_{\text{verre}} \times \sin\theta_{\text{verre}} = \sin\phi$ , soit :  $1,37 \times \sin\theta \approx \sin\phi$ , *i.e.* :  $\theta \approx \text{Arcsin}(\sin\phi/1,37)$ . La gamme des angles de diffusion  $\theta$  qui sont accessibles pour les mesures est environ  $8^\circ - 47^\circ$ . On ne peut pas descendre en dessous d'un angle  $\theta$  inférieur à  $8^\circ$ , car alors  $\phi < 10^\circ$  et, le système de collection ne peut pas faire un angle  $\phi$  inférieur à  $10^\circ$  sans empêcher la bonne visualisation de l'échantillon (l'optique de détection coupe l'éclairement par la lumière blanche). Pour des angles  $\theta$  supérieurs à  $47^\circ$ , nous sommes à des angles  $\theta_{\text{verre}}$  qui sont plus grand que  $42^\circ$ , donc au-delà de la réflexion totale de la lumière à l'interface verre-air ;  $\phi = 90^\circ$ , on ne mesure plus de lumière diffusée. On peut estimer que la gamme des vecteurs d'onde de diffusion accessibles avec notre montage est comprise entre  $1,82 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$  et  $1,08 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$ .

### 3.2.3. Choix de la longueur d'onde, de la puissance et de la durée d'irradiation.

Comme indiqué au paragraphe précédent, la source lumineuse que nous utilisons pour nos expériences est un laser He-Ne (REO-30993), monomode TEM 00, de longueur d'onde  $\lambda = 632,8$  nm, dont la puissance focalisée sur le noyau est de l'ordre de 0,1 mW. Nous avons choisi de travailler avec une longueur d'onde dans le visible plutôt qu'avec une longueur d'onde dans l'infrarouge, pourtant réputée moins nocive pour les cellules [37–39], à cause de la plus grande facilité de réglage du montage. Ensuite, le choix de cette longueur d'onde s'est fait car dans la gamme des longueurs d'onde correspondant au visible, les dommages provoqués par l'irradiation sont réputés beaucoup moins importants dans le rouge [37]. Cependant, les effets de l'irradiation par des longueurs d'onde dans le rouge, 630–700 nm, sont très variables d'une lignée cellulaire à l'autre. Plusieurs travaux montrent que l'irradiation avec un laser He-Ne à 632,8 nm peut induire des mutations pour certains types cellulaires. Y.G. Schkorbatov *et al.* [40] observent une décondensation de la chromatine chez les cellules épithéliales après irradiation et un changement des propriétés rhéologiques des globules rouges a été vu après irradiation [41]. D'autres expériences [42] mettent en évidence l'augmentation des capacités prolifératrices des ostéoblastes suite à une irradiation à 632,8 nm, alors que les fibroblastes ont plutôt tendance à rester en G0/G1, voir à apoptoser [43]. Dans certains cas, les mutations peuvent même se produire pour des intensités assez faibles et des temps d'irradiations assez courts.

Avant de commencer nos expériences, nous avons cherché à voir les effets de l'irradiation sur les lignées cellulaires que nous voulons étudier. Nous nous sommes mis dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les expériences : même milieu de culture, température de la chambre où sont placées les cellules à  $37^\circ\text{C}$ , laser He-Ne avec un diamètre au « beam waist » de l'ordre de  $4 \mu\text{m}$ . Tout d'abord, nous nous sommes mis à la puissance maximale ne saturant pas nos compteurs ; donc, autour de 2 – 3 mW. À cette puissance (qui correspond à environ  $2 \cdot 10^7 \text{ J/m}^2$ ),

nous avons des résultats très différents d'une cellule à l'autre ; certaines cellules semblent supporter, sans problème, une irradiation de plus de 30 minutes, d'autres entrent en apoptose 2 ou 3 heures après la fin de l'irradiation, certaines déclenchent leur apoptose sous le faisceau. Manifestement, la sensibilité des cellules à l'irradiation dépend de leur état. Pour ne pas avoir ce problème lors de nos expériences, nous avons décidé d'essayer avec une puissance plus faible, similaire à celle utilisée par Michaël Suissa pendant sa thèse ; nous nous sommes mis à 0,1 mW (ce qui correspond à environ  $8.10^6 \text{ J/m}^2$ ). Nos résultats sont quelques peu différents de ceux obtenus par Michaël Suissa lors de sa thèse [33], « nos cellules » semblent moins résistantes que les siennes, mais, nous ne sommes pas capables d'expliquer ces différences.<sup>6</sup>

Dans ces conditions, les effets de l'irradiation sont quasiment identiques pour les deux lignées cellulaires que nous utilisons. Si nous irradiions les cellules juste après leur mitose, typiquement dans les deux premières heures suivant la division cellulaire, avant que les cellules produites n'aient convenablement adhéré sur la surface, nous observons qu'une irradiation de plus de 30 minutes conduit à l'apoptose des cellules 3 ou 4 heures après l'irradiation. Si nous irradiions les cellules après qu'elles aient eu le temps d'adhérer, alors nous avons trois cas en fonction de la durée d'irradiation. i) Si nous irradiions les cellules pendant moins de 45 – 50 minutes, la durée de leur cycle cellulaire n'est pas modifiée et les deux cellules produites après la mitose survivent. ii) Pour une durée d'irradiation comprise entre 50 et 80 minutes environ, la durée de leur cycle cellulaire augmente de plusieurs heures (3 à 5 heures de plus), néanmoins, les deux cellules produites après la mitose survivent. iii) Au-delà de 80 minutes d'irradiation, les cellules irradiées ne se divisent plus, même plus de 24 heures après leur irradiation et finissent par mourir par nécrose.

On peut donc imaginer que pour des cellules qui sont parfaitement adhérentes, une irradiation de moins de 45 minutes à 0,1 mW ne perturbe pas leur fonctionnement naturel. Par contre, il semble certain que des irradiations de plus de 50 minutes modifient fortement le cycle normal de la cellule. En conséquence, nous n'avons jamais fait de mesure sur la même cellule pendant plus de 40 minutes d'affilée.

### 3.3. SYSTEMES BIOLOGIQUES ETUDIES ; CONDITIONNEMENT ET CONTROLE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES.

#### 3.3.1. Systèmes biologiques étudiés.

Comme système d'étude, nous avons choisi deux lignées cellulaires humaines différentes ; nous avons utilisé des cellules de la lignée de neuroblastomes humains SHEP [44], qui étaient déjà les cellules étudiées par Michaël Suissa pendant sa thèse et des cellules HeLa [45]. Ces cellules nous sont toutes fournies par Evelyne Goillot du laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon.

Les neuroblastomes SHEP sont des cellules cancéreuses du système nerveux sympathique tandis que les HeLa sont des cellules cancéreuses de l'utérus. Comme toutes les cellules cancéreuses, si les conditions physiologiques le leur permettent, elles ne s'arrêtent jamais en phase G0 après la mitose, mais, poursuivent leur cycle cellulaire indéfiniment. Pour ces deux lignées cellulaires, le

---

<sup>6</sup> Pour la thèse de Michaël Suissa, le mesureur de puissance laser utilisé était moins sensible et donc il était peut être bien en-dessous de 0,1 mW, de plus, la régulation de température était un peu moins bonne, et donc il était peut-être un peu en dessous de 37°C (36,5° – 36° C). La sensibilité des cellules à l'irradiation semble très fortement dépendante de ces deux paramètres et donc de légères différences entre nos conditions expérimentales et celles de Michaël Suissa pourraient expliquer les différences observées.

cycle cellulaire est relativement rapide, il dure entre 15 et 16 heures : la phase G1 dure environ 10 heures, la phase S environ 2 – 3 heures et les phases G2/M environ 3 heures. Le choix de ce type de cellules pour nos expériences s'est fait pour diverses raisons. Tout d'abord, les cellules de ces deux lignées ont un gros noyau (un diamètre d'environ 7–8  $\mu\text{m}$ ) et ce sont des cellules adhérentes<sup>7</sup> qui adhèrent rapidement et sans difficulté sur des surfaces de verre. De plus, leur robustesse et leurs grandes capacités prolifératives rendent leur utilisation et leur culture relativement aisée. Enfin, les biologistes avec lesquels nous avons collaboré ont une grande habitude de la culture de ce type cellulaire.<sup>8</sup>

### 3.3.2. Chambre de culture ; conditionnement des cellules.

Il faut impérativement que pendant toute la durée des expériences les cellules aient un comportement « normal » ; placées sur le montage de diffusion de la lumière, elles doivent pouvoir se diviser avec la même durée de cycle cellulaire que si elles étaient dans un incubateur (*i.e.* dans un environnement stérile, avec un pH constant à 7,4, une température de 37°C et un taux de CO<sub>2</sub> de 5%). Là encore, le type d'expériences que nous souhaitons réaliser impose un certain nombre de contraintes quant au conditionnement et au contrôle physiologique des cellules. Comme nous ne pouvons pas mettre notre dispositif expérimental dans un incubateur, nos cellules doivent être dans une chambre fermée hermétiquement pour éviter toute contamination par des bactéries et/ou des levures. Dans ces conditions, il est évident que le pH du milieu de culture ne peut pas être maintenu constant grâce à une atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub>, comme cela est le cas dans un incubateur. Il faut donc utiliser un milieu de culture tamponné pour pouvoir conserver le pH constant dans la chambre pendant plusieurs jours. De plus, il faut pouvoir maintenir le milieu de culture à 37°C pendant toute la durée des expériences. Bien sûr, les faces d'entrée et de sortie de cette chambre doivent être transparentes et son épaisseur doit être faible, pour que le milieu de culture dans lequel baignent les cellules n'affecte pas la propagation du faisceau laser, ni celle de la lumière blanche. Cependant, il faut que cette épaisseur soit suffisante pour qu'il y ait assez de milieu pour conserver les cellules pendant la durée des expériences (plusieurs heures).

Pour le conditionnement des cellules, nous avons repris les même type de chambres de culture que celles développées pendant sa thèse par Michaël Suissa. Il avait réussi à tenir compte de toutes ces contraintes en prenant des plaques d'inox de 65 mm de long, 35 mm de large et 3 mm d'épaisseur, dans lesquelles il avait percé un trou carré de 1 cm de côté (voir Figure 3.5a), en collant sur chacune des deux faces de ce trou une lamelle de microscope et il avait ainsi obtenu une chambre de culture de faible épaisseur dont les faces d'entrée et de sortie de la lumière sont en verre.

Deux canaux de 1 mm de diamètre percés dans la tranche de la plaque permettent d'introduire dans cette chambre les cellules avec leur milieu de culture, mais aussi de changer le milieu de culture en cours d'expérience si nécessaire. Pour cela, il suffit de relier l'un d'entre eux à un réservoir de milieu, chauffé à 37° C, grâce à un capillaire. Le débit dans le capillaire est contrôlé par une pompe péristaltique. L'entrée du milieu neuf dans la chambre fait sortir l'ancien par le deuxième canal. Pour rester stérile, celui-ci est relié, par un capillaire, à un flacon vide qui servira de poubelle. Les capillaires utilisés ont un diamètre de 1 mm et bouchent suffisamment le trou pour

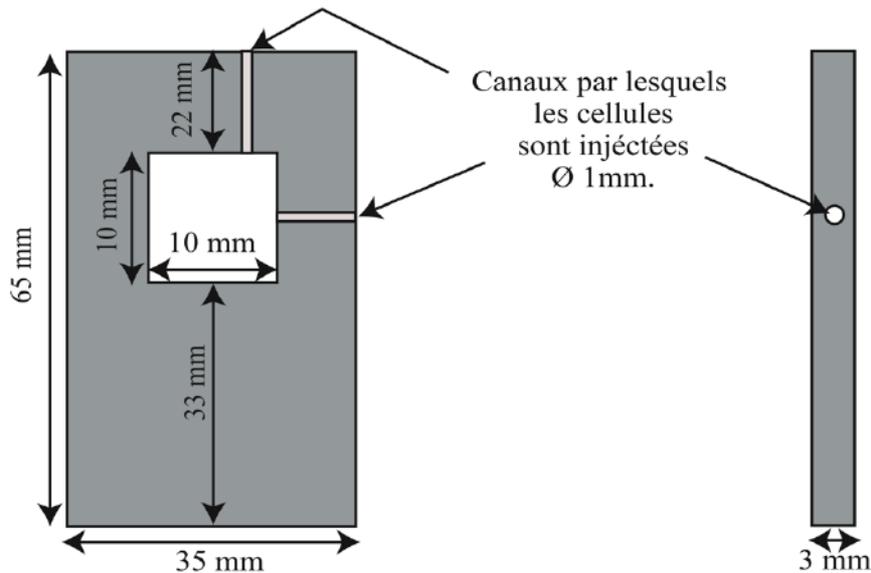
---

<sup>7</sup> Au cours de nos expériences, nous avons remarqué une autre caractéristique remarquable des SHEP : elles n'ont pas d'inhibition de contact. Autrement dit, si le milieu de culture est encore bon, elles poussent les unes sur les autres si elles n'ont pas de place sur le substrat.

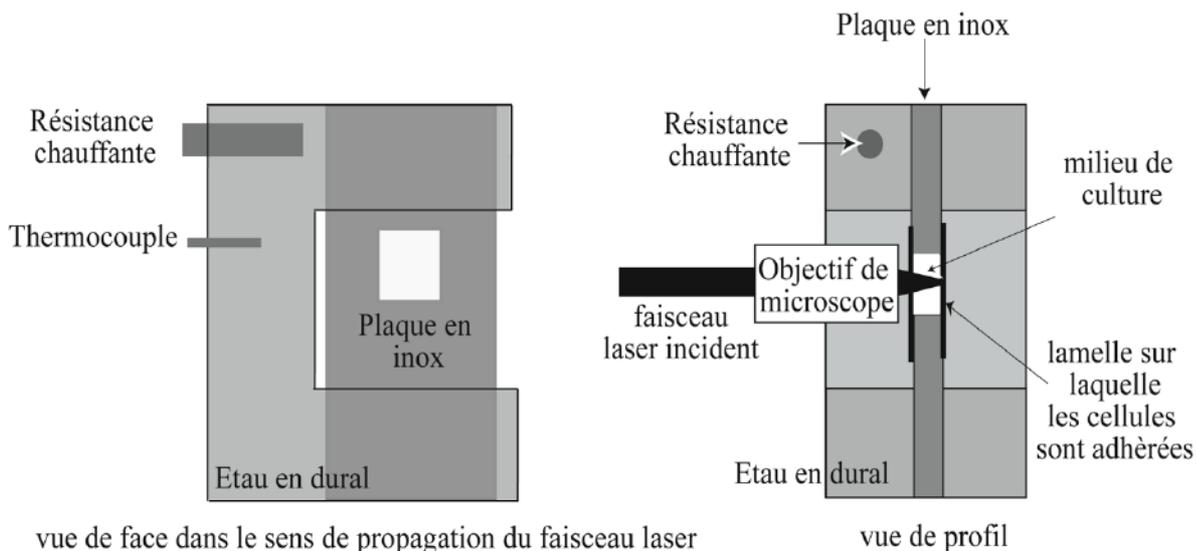
<sup>8</sup> On peut noter que parmi les nombreuses lignées de neuroblastomes existantes, la lignée SHEP se caractérise par sa sensibilité à des facteurs apoptotiques comme le ligand FAS [46].

qu'aucune contamination venant de l'environnement ne puisse se produire. Les capillaires sont autoclavés avant utilisation.

Sur le montage de diffusion de la lumière, cette plaque en inox est coincée verticalement dans un étau en dural (Figure 3.5b) monté sur la platine de translation deux axes, les surfaces de verres de la chambre étant perpendiculaires à la direction de propagation de la lumière. Cet étau est porté à 37°C grâce une résistance chauffante et, par diffusion thermique à travers la plaque, le milieu de culture à l'intérieur de la chambre se met, lui aussi, rapidement à 37°C. En plaçant un thermocouple dans le milieu de culture, on peut observer des variations de la température, autour de 37°C, de l'ordre de 0,1 – 0,2 °C, qui sont sans conséquence pour les cellules.



a) Plaque en inox pour chambre de culture ; vue de face et de profil.

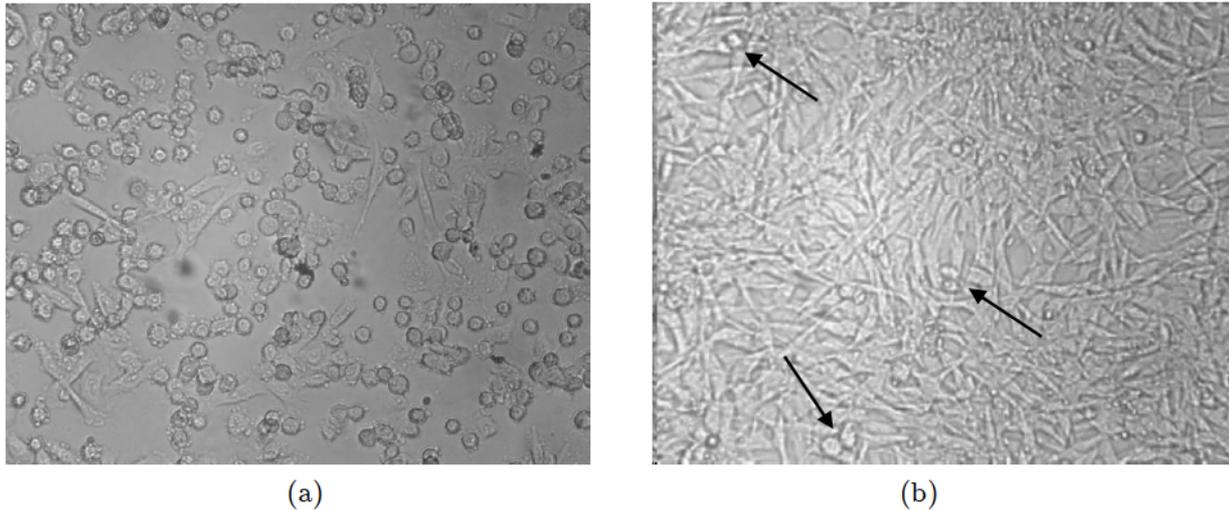


b) Chambre de culture montée dans l'étau.

Figure 3.5. Représentation schématique des chambres de culture créées pour le conditionnement et le contrôle physiologique des cellules sur le montage de diffusion de la lumière

### 3.3.3. Contrôle physiologique des cellules dans les chambres de culture.

Le milieu de culture doit répondre aux exigences strictes nécessaires au bon développement des cellules. Il doit apporter les éléments indispensables à la survie des cellules : acides aminés, facteurs de croissance, ions minéraux, source d'énergie, il doit aussi être maintenu à un pH autour de 7,4 et à la température physiologique de 37°C. Nous avons donc composé notre milieu de culture en fonction de ces contraintes et de celles qui nous sont imposées par notre montage.

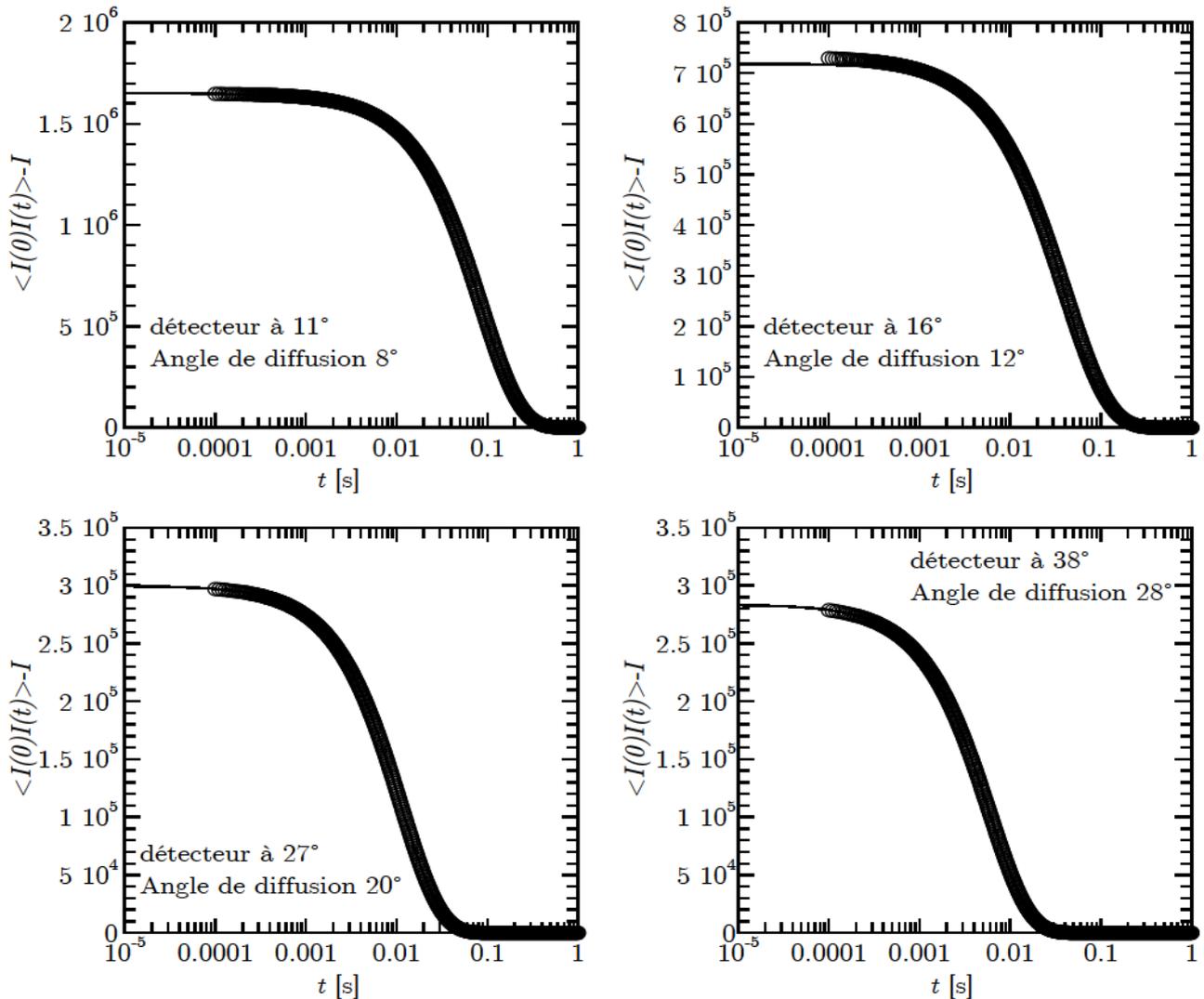


**Figure 3.6.** a) Photographie de la surface 1 heure après que les cellules ont été introduites dans la chambre (grossissement  $\times 10$ ) ; les cellules ont adhéré, mais ne se sont pas toutes encore étalées complètement sur la surface. b) Photographie de la même surface 54 heures plus tard ; les flèches indiquent des mitoses en cours.

La base de notre milieu est du DMEM commercialisé par Gibco contient des sels minéraux, des acides aminés essentiels sont la glutamine nécessaire à la synthèse des purines et pyrimidines et donc de l'ADN, du glucose source d'énergie et des vitamines. Le milieu contient également du rouge de phénol ; un indicateur coloré du pH et un système tampon constitué soit de bicarbonate de sodium et du CO<sub>2</sub> de l'étuve. Pour contrôler le pH du milieu et le garder constant à 7,4 pendant plusieurs jours en l'absence de CO<sub>2</sub>, nous avons dû utiliser une solution tampon n'ayant pas besoin de dioxyde de carbone : l'HEPES (Gibco). La concentration efficace est de 25 mM, soit 2,5% du mélange total pour une solution d'HEPES à 1M. L'ajout de Sérum qui contient également de l'insuline pour permettre l'assimilation du glucose par les cellules et des protéines d'adhésion pour faciliter l'adhésion des cellules sur leur support. A ce milieu est ajouté du sérum de veau fœtal qui contient des facteurs mitogènes permettant la division cellulaire. La concentration de sérum est de 10%. La composition du sérum est extrêmement complexe. Il contient notamment des facteurs de croissance et des hormones, des facteurs d'attachement et des éléments nutritifs tels les oligoéléments. Avec ce dispositif et ce milieu de culture, les cellules se développent normalement et la durée de leur cycle cellulaire est identique à celle observée dans un incubateur. Nous pouvons les conserver en bon état (on n'observe pas de nécrose ou d'apoptose, mais au contraire des mitoses) pendant plus de 50 heures comme le montrent les 2 photographies de la Figure 3.6.

### 3.4. VALIDATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL.

Une fois le dispositif expérimental de diffusion dynamique de la lumière monté, avant de commencer les expériences sur les noyaux de cellules vivantes, nous avons cherché à valider notre montage. Pour cela, nous avons vérifié que dans le cas de la diffusion brownienne de particules sphériques, l'on mesurait bien une fonction d'autocorrélation de l'intensité lumineuse diffusée qui est conforme à ce qui est attendu.



*Figure 3.7. Fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée par une solution très diluée de billes de Latex mesurées sur notre montage de diffusion pour les quatre angles de détection à l'aide d'un corrélateur Brookhaven BI9000. Par souci de clarté, nous montrons les fonctions d'autocorrélation mesurées auxquelles nous avons soustrait leur ligne de base. Les courbes noires sont les ajustements de ces fonctions d'autocorrélation par une monoexponentielle :  $A \exp(-\Omega t)$ .*

L'expérience est assez simple, nous avons introduit une solution aqueuse très diluée de billes de latex de 220 nm de diamètre ( $c \ll 1\%$ ) à l'intérieur de l'une des chambres de culture mises au point pour les cellules (cf. § 3.3.2). Ce système est à l'équilibre thermodynamique et, comme nous avons veillé à ce que la concentration en billes de latex dans la solution soit très faible, nous sommes en régime dilué, il n'y a donc pas d'effets collectifs. La dynamique sondée par la diffusion

dynamique de la lumière dans ce cas est simplement due au mouvement des billes du fait de l'agitation thermique. Le déplacement de chaque bille est complètement indépendant de celui des autres, il s'agit juste de la diffusion brownienne des billes. Alors, la fonction d'autocorrélation de l'intensité de la lumière diffusée doit être une monoexponentielle décroissante, dont le taux de relaxation dépend du coefficient de diffusion des billes de latex  $D$  [1]. Dans le cas où la géométrie du montage de diffusion est hétérodyne (*i.e.* une partie du faisceau incident est superposée au faisceau diffusé), ce taux de relaxation vaut  $\omega$ , où  $\omega$  est égal à  $Dq^2$ ,  $q$  étant le vecteur d'onde de diffusion. Par contre, si la géométrie du montage est homodyne (*i.e.* seul le faisceau diffusé par le volume diffusant atteint le détecteur), ce taux de relaxation vaut  $2\omega$  ( $2Dq^2$ ).

Nous avons placé cette chambre de culture sur le montage de diffusion de la lumière (les expériences ont été faites à température ambiante  $-23^\circ\text{C}$ - et aussi à  $37^\circ\text{C}$ ). Nous avons focalisé le faisceau laser sur la face interne de la seconde fenêtre de verre de la chambre (de manière identique à ce qui est montré sur la Figure 3.5b et comme nous le ferons ensuite pour les expériences sur les noyaux), puis réglé les quatre optiques de collection et ensuite, nous avons mesuré le signal diffusé par la solution. Nous avons fait ces mesures de deux façons.

- 1) D'abord en enregistrant le signal diffusé exactement comme nous le ferons ensuite lors de nos expériences sur les noyaux des cellules (et comme décrit rapidement au § 3.2.1. (v)), ces résultats seront présentés au Chapitre 4, car ils nous serviront à « valider » la technique d'analyse du signal spécifique que nous avons mise au point.
- 2) En branchant les différentes APD (les unes après les autres) sur une carte corrélateur Brookhaven BI9000 afin de construire directement la fonction d'autocorrélation du signal diffusé.<sup>9</sup> Les fonctions d'autocorrélation ainsi obtenues sont présentées Figure 3.7.

Dans ce dernier cas, nous avons ajusté les différentes fonctions d'autocorrélation obtenues à l'aide d'une exponentielle décroissante de la forme  $A\exp(-\Omega t)$ . Nous remarquons que les ajustements sont très bons (Figure 3.7) et qu'ils montrent une relaxation monoexponentielle pour les quatre angles. Figure 3.8, nous présentons les fréquences retournées par ces ajustements en fonction du carré du vecteur d'onde.<sup>10</sup> La variation de  $\Omega$  avec  $q^2$  est linéaire, ce qui indique un processus diffusif, et le coefficient directeur de cette droite vaut  $4.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ . Nous savons que le coefficient de diffusion  $D$  pour des particules sphériques browniennes est donné par la relation de Stokes-Einstein :  $D = k_B T / 6\pi\eta R$ , où  $T$  est la température,  $\eta$  la viscosité dynamique du solvant et  $R$  le rayon des billes. Dans notre cas, pour  $T=23^\circ\text{C}$  et un rayon de 110 nm, on trouve une valeur de  $D$  qui est égale à  $2,11.10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ . Donc, nous mesurons deux fois le coefficient de diffusion des billes de latex. Nous pouvons donc en conclure que notre montage est « valide » (en tout cas, il permet de mesurer correctement la diffusion brownienne de particules sphériques) et que la géométrie de ce montage est homodyne (ce qui avait déjà été vu pour le montage utilisé par Michaël Suissa).

<sup>9</sup> L'autocorrélation consiste à comparer une fonction avec une version d'elle-même décalée d'un temps  $\tau$ . Les temps caractéristiques du signal sont donnés par les décroissances de la courbe d'autocorrélation.

<sup>10</sup> Dans ce cas, la relation entre l'angle de détection  $\phi$  et l'angle de diffusion  $\theta$  est :  $\theta \approx \text{Arcsin}(\sin\phi/1,33)$ . Donc, pour des angles de détection de  $11^\circ$ ,  $16^\circ$ ,  $27^\circ$  et  $38^\circ$ , les angles de diffusion correspondant sont de  $8^\circ$ ,  $12^\circ$ ,  $20^\circ$  et  $28^\circ$ , ce qui correspond à des vecteurs d'onde de diffusion égaux à :  $1,9.10^6$ ,  $2,75.10^6$ ,  $4,58.10^6$  et  $6,3.10^6 \text{ m}^{-1}$ .

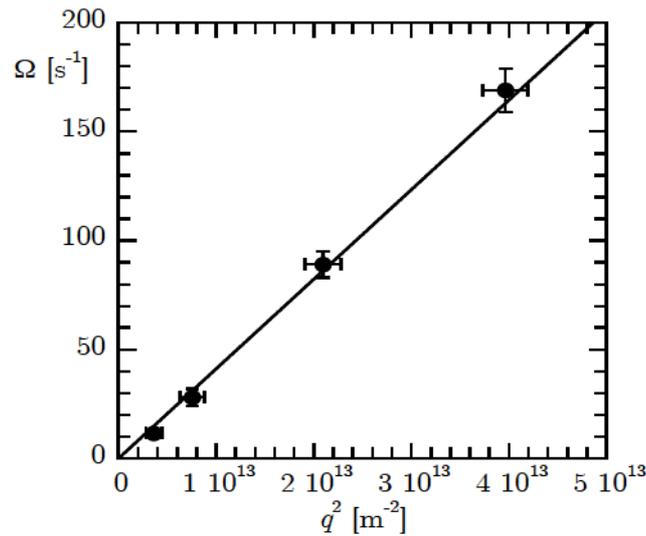


Figure 3.8. Valeurs des fréquences obtenues par l'ajustement des fonctions d'autocorrélation en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion.

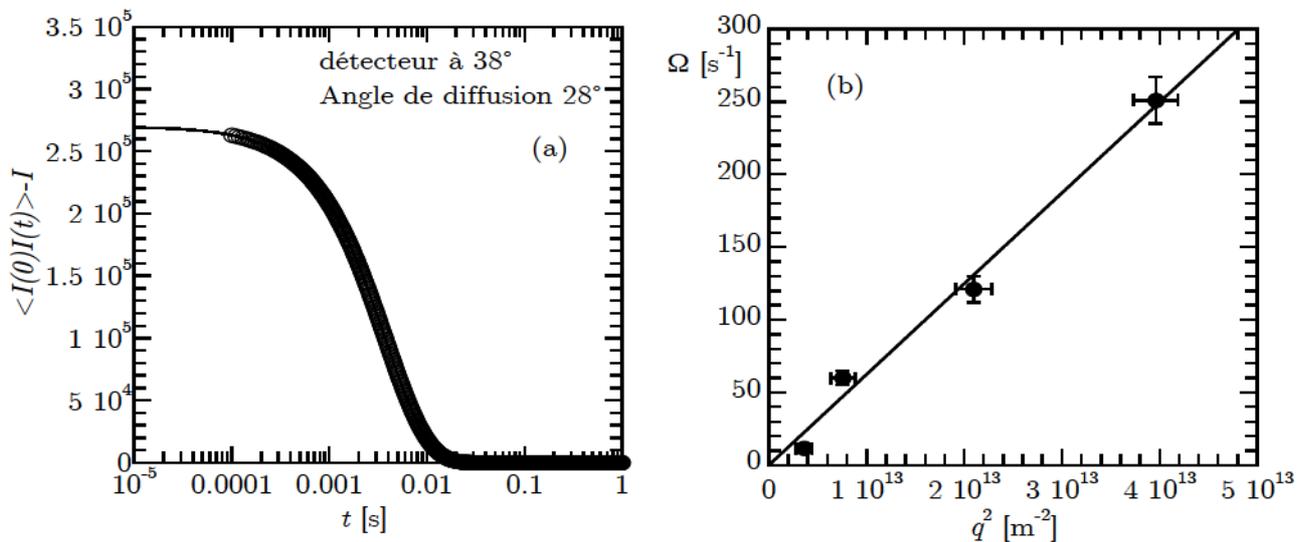


Figure 3.9. a) Fonction d'autocorrélation mesurée à l'angle de détection de 38°, en trait plein, l'ajustement de cette fonction par une monoexponentielle décroissante. b) Valeurs des fréquences obtenues par l'ajustement des fonctions d'autocorrélation en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion.

Nous avons vérifié ce résultat en faisant aussi la mesure à 37°C (donc à la température à laquelle nous allons faire les mesures sur les noyaux de cellules). Nous avons laissé 30 minutes à l'échantillon pour s'équilibrer thermiquement avant de faire les mesures. Pour tous les angles, nous obtenons une fonction d'autocorrélation qui est une parfaite monoexponentielle décroissante. Figure 3.9a, nous présentons la fonction d'autocorrélation mesurée à l'angle de détection de 38° et son ajustement par la fonction test  $A \exp(-\Omega t)$  ; en Figure 3.9b, nous montrons les valeurs de  $\Omega$  ainsi mesurées en fonction de  $q^2$ . Le comportement est linéaire et, le coefficient directeur de la droite vaut  $6,2 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , alors que le coefficient de diffusion attendu est  $3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

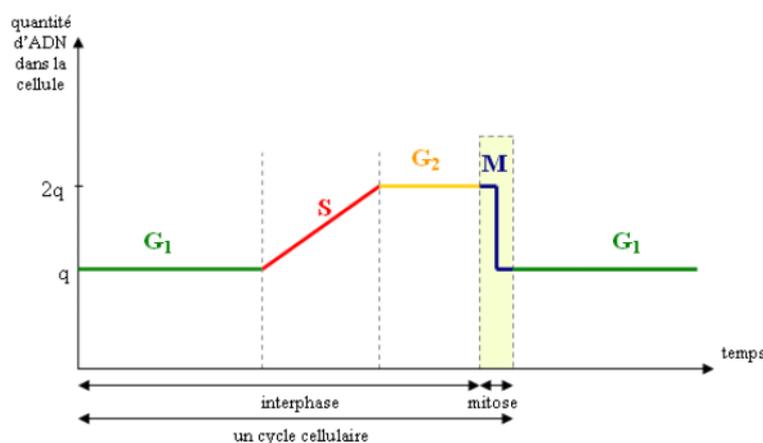
### 3.5. CONTROLE BIOLOGIQUE DES CELLULES ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.

Comme nous l'avons écrit en introduction, dans un premier temps, nous souhaitons étudier la dynamique interne des noyaux des cellules SHEP et HeLa au cours des différentes phases de leur cycle cellulaire, ceci afin de comparer la dynamique du noyau pour différentes lignées cellulaires humaines. Ensuite, nous avons examiné l'effet de modifications des conditions de culture des cellules, (baisse de la température, présence d'une drogue dans le milieu de culture). La fixation (et donc la mort) des cellules avec du paraformaldéhyde a permis de vérifier la disparition des signaux observés sur la dynamique interne de ces noyaux.

#### 3.5.1. Présentation succincte de la technique de cytométrie en flux (CMF).

Tous les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus à l'aide d'expériences de cytométrie en flux (CMF). Pour permettre la compréhension de ces résultats nous présentons succinctement cette technique. Nous ne décrivons cette méthode que très sommairement, car plusieurs ouvrages de référence peuvent être trouvés [47].

La cytométrie en flux consiste à déterminer la phase du cycle où se trouve une cellule en fonction de son contenu en ADN. Une population de cellules (même lignée) est fixée au moment où l'on souhaite l'analyser. Ces cellules sont ensuite mises en solution et, on ajoute un intercalant fluorescent de l'ADN à cette suspension cellulaire. Ce marqueur rentre dans le noyau des cellules et se fixe sur l'ADN ; la quantité de molécules fluorescentes qui se fixe dans le noyau est proportionnelle à sa quantité d'ADN. Ainsi la phase du cycle où se trouve chaque cellule est déterminée par l'intensité de la fluorescence qu'elle émet. Une cellule en G<sub>2</sub> ayant deux fois plus d'ADN qu'une cellule en G<sub>0</sub>, ou G<sub>1</sub>, la fluorescence venant d'une cellule en G<sub>2</sub> sera deux fois plus intense que celle venant d'une cellule en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ; entre les deux se trouvent les cellules en phase S (*cf.* Figure 3.10).



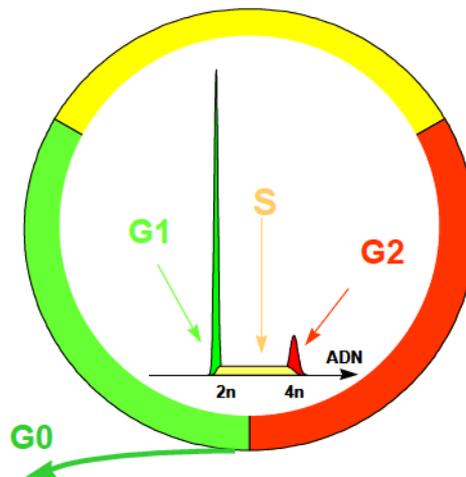
**Figure 3.10.** Représentation schématique de la variation de la quantité d'ADN intranucléaire au cours du cycle cellulaire.

En pratique, pour mesurer la fluorescence de chaque cellule, on fait défiler les cellules marquées, une par une, à vitesse constante, devant un faisceau laser. La fluorescence émise par chaque cellule est recueillie par un détecteur placé à 90° du faisceau incident.

Par ailleurs, lors de son passage devant le faisceau laser, chaque cellule diffuse la lumière incidente. L'intensité diffusée par la cellule est recueillie, à la fois aux petits angles (sur un détecteur placé près de l'axe du faisceau incident, typiquement  $<12^\circ$ , appelé FSC), ce qui permet d'obtenir une estimation de la taille de la cellule et, à  $90^\circ$  du faisceau incident (appelé SSC), ce qui autorise des informations sur la réfringence du cytoplasme, du noyau et donc sur le rapport nucléocytoplasmique. Grâce à ces deux paramètres, on obtient la taille et les propriétés optiques des cellules en fonction de leur fluorescence, ce qui permet d'exclure les débris cellulaires ou les agrégats de cellules (doublets, triplets de cellules) du comptage et ainsi de définir proprement la population de cellules à analyser. C'est la première étape de l'analyse où l'on rejette les débris et les agrégats de cellulaires pour ne conserver que les cellules uniques.

Ensuite, le logiciel d'analyse construit, à partir des mesures de l'intensité de fluorescence émise par chaque noyau l'histogramme de la fluorescence, *i.e.* de la quantité d'ADN contenue dans les noyaux (*cf.* Figure 3.11). Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle est déterminé par la mise en place de fenêtres d'intérêt. Le cytomètre que nous utilisons est un FACScan (Fluorescent Activated Cell Sorter ; BDBiosciences) et les données sont traitées grâce au logiciel CellQuest (BDBiosciences).

- Un pic correspondant aux cellules en phase G1 (ou en phase G<sub>0</sub>) dont le contenu en ADN est  $2n$ .
- Un pic correspondant aux cellules en phase G<sub>2</sub>-M dont le contenu en ADN est  $4n$ .
- Un rectangle entre les 2 pics, correspondant aux cellules en phase S dont le contenu en ADN est intermédiaire.



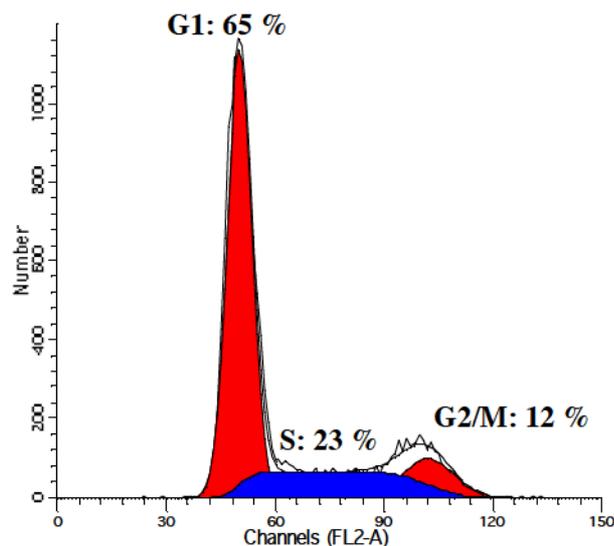
**Figure 3.11.** Histogramme d'ADN et cycle cellulaire.

Avant l'analyse en cytométrie, les cellules sont d'abord « trypsinées », puis rincées et centrifugées. Le culot est resuspendu dans 200  $\mu$ l de PBS, puis une numération est effectuée. Ensuite, les cellules sont fixées à l'éthanol 70° (l'éthanol perméabilise la membrane nucléaire) : 1 ml d'alcool refroidi à  $-20^\circ\text{C}$  pour 1 million de cellules dans une cuvette placée dans une cuve à glace. Après incubation 1 h à  $4^\circ\text{C}$ , les cellules peuvent être conservées ainsi fixées à  $-20^\circ\text{C}$ . La dernière étape consiste à l'élimination des ARN et la coloration de l'ADN. Pour cela, on ajoute de la RNase et de l'iodure de propidium dans chaque tube que l'on laisse incubé pendant 1 h à  $4^\circ\text{C}$  avant l'analyse au cytomètre.

### 3.5.2. « Synchronisation » du cycle cellulaire des cellules SHEP et HeLa.

Notre souhait est de mesurer la dynamique interne du noyau pendant les différentes phases du cycle cellulaire. Le problème est que quand on prend une population de cellules SHEP ou HeLa dans des conditions normales de culture, environ 65 % des cellules sont en phase G1, 20 % en phase S et 15 % en phase G2/M (Figure 3.12).<sup>11</sup> Comme ces différentes phases du cycle ne sont pas différenciables par observation au microscope (sauf la phase M), il est donc impossible de savoir dans quelle phase du cycle se trouve une cellule prise au hasard dans cette population. Il est évident qu'une telle dispersion de la population cellulaire sur les différentes phases du cycle cellulaire est une gêne importante pour l'interprétation des résultats obtenus. Il nous faut donc, impérativement, trouver une solution pour réaliser nos mesures sur des populations de cellules qui, à tout instant, sont quasiment « homogènes » ; c'est-à-dire que les cellules sont presque toutes dans le même état cellulaire et évoluent ensemble dans le cycle cellulaire.

Un procédé classiquement utilisée par les biologistes pour mettre la quasi-totalité d'une population de cellules dans le même état cellulaire (on peut dire synchroniser) est d'utiliser un agent pharmacologique (*i.e.* une drogue) cytobloquant qui va arrêter les cellules à un endroit particulier de leur cycle cellulaire. La technique consiste à laisser cette drogue agir pendant un certain temps, pour que quasiment toute la population de cellules arrive à ce point, puis à rincer afin qu'elles redémarrent leur cycle ensemble à partir du même point [48].



**Figure 3.12.** Histogramme de la répartition d'une population de cellules SHEP-Neuroblastomes, dans des conditions de culture normales, sur les différentes phases du cycle cellulaire ; résultat obtenu au moyen d'une expérience de cytométrie en flux qui donne le nombre de cellules en fonction de la fluorescence émise par leur noyau (unités arbitraires). Expérience réalisée sur une population de 20 000 cellules, cultivées en boîte de Pétri. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle est déterminé par la surface de chaque pic défini par des zones d'intérêt.

La synchronisation des cellules a été utilisée par Michaël Suissa pendant sa thèse pour obtenir des populations de cellules de la lignée SHEP qui, à chaque instant de l'expérience, sont quasiment

<sup>11</sup> Ces pourcentages correspondent, à peu près, aux pourcentages des durées des différentes phases par rapport à la durée du cycle. Pour ces deux lignées la durée du cycle est d'environ 15 heures, les cellules passent environ 10 heures en phase G1, 3 heures en phase S et 2 heures en phase G2.

toutes dans la même phase du cycle cellulaire. Le protocole qu'il a mis au point et utilisé pendant sa thèse pour obtenir ces populations est le suivant [33,36]. Il met les cellules SHEP dans un milieu de culture contenant 0,5 mM d'hydroxyurée (HU) pendant 10 ou 15 heures.

Cette procédure assure que plus de 90% des cellules sont alors en phase G1. Puis, il rince les cellules en remplaçant le milieu avec HU par du milieu sans HU. Grâce à des expériences de cytométrie en flux, il a suivi l'évolution de la répartition des populations de cellules sur les différentes phases du cycle cellulaire après le rinçage (Tableaux 3.1 et 3.2 respectivement pour 10 et 15 heures sous HU).

Temps après HU (Heures)	% de cellules en phase G1	% de cellules en phase S	% de cellules en phase G2/M
0 :00	91 ± 3	4 ± 3	5 ± 3
1:50	88 ± 3	7 ± 3	5 ± 3
4:00	66 ± 3	28 ± 3	6 ± 3
7:00	43 ± 3	45 ± 3	12 ± 3
10:00	40 ± 3	44 ± 3	16 ± 3

*Tableau 3.1. Évolution au cours du temps après élimination de HU de la répartition dans le cycle cellulaire d'une population de cellules SHEP restée pendant 10 heures sous HU (analyse par cytométrie en flux). Là encore, chaque mesure est réalisée sur 20 000 cellules. (Données de la thèse de M. Suissa [33–36].)*

**Remarque : description sommaire du mode d'action de l'hydroxyurée.**

L'hydroxyurée, ou hydroxycarbamide ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ ), est une drogue qui empêche la cellule d'entrer en phase S en inhibant l'action d'une enzyme essentielle à la réplication de l'ADN : la ribonucléotide réductase, entraînant ainsi une accumulation des cellules en fin de phase G1 [49,50]. Chez tous les organismes, la synthèse des dNTPs augmente au cours de la phase S pour satisfaire la demande lors de la réplication [51–53], car les dNTPs sont requis pour la réplication de l'ADN. Les ratios entre les différents nucléotides et leur concentration absolue sont hautement régulés. La modification du niveau intracellulaire de nucléotides affecte la dynamique de la réplication. Dans la voie de synthèse des nucléotides, une des trois enzymes importante pour la production de dNTPs est la ribonucléotide reductase (RNR) [51, 52]. La RNR est impliquée dans la synthèse des quatre nucléotides et joue un rôle critique dans la régulation du « pool » de nucléotides et leur équilibre [54]. Elle est impliquée dans l'étape limitante de la synthèse des nucléotides en permettant la réduction du groupement 2'OH des ribonucléotides (di ou tri phosphates selon les organismes) pour donner des Desoxyribonucléotides. Le blocage de la RNR ainsi que d'autres enzymes nécessaires à la réplication par l'hydroxyurée entraîne une inhibition de la synthèse d'ADN, un ralentissement de la progression des fourches de réplication et entraîne la mort des cellules qui rentrent en phase S et la synchronisation des autres en fin de phase G1.

Temps après HU (Heures)	% de cellules en phase G1	% de cellules en phase S	% de cellules en phase G2/M
0 :00	91 ± 3	5 ± 3	4 ± 3
1:50	92 ± 3	4 ± 3	4 ± 3
4:00	24 ± 3	60 ± 3	16 ± 3
7:00	20 ± 3	35 ± 3	45 ± 3
10:00	79 ± 3	12 ± 3	9 ± 3
13:00	92 ± 3	4 ± 3	4 ± 3

*Tableau 3.2. Évolution au cours du temps après élimination de HU de la répartition dans le cycle cellulaire d'une population de cellules SHEP restée pendant 15 heures sous HU (analyse par cytométrie en flux). Mesures de cytométrie en flux toujours réalisées sur 20 000 cellules. (Données de la thèse de M. Suissa [33–36].)*

Pour les cellules restées 10 heures sous HU, le pourcentage de cellules en phase G1 diminue relativement lentement (66 % de cellules en phase G1 4 heures après le retrait de HU), alors que cette diminution est beaucoup plus rapide pour les cellules restées 15 heures sous HU (30 % de cellules en phase G1 4 heures après le retrait de HU). De plus, dans ce dernier cas, on observe une très forte réaugmentation du nombre de cellules en phase G1 10 heures après l'élimination de HU, ce qui indique que la grande majorité des cellules ont fait leur mitose entre la 7<sup>ième</sup> et la 10<sup>ième</sup> heures suivant l'élimination de HU. L'observation de cellules, placées dans des chambres de culture montées sur le montage de diffusion de la lumière, a montré que pour les cellules restées 15 heures sous HU, elles font quasiment toutes (environ les 3/4) leur mitose au même moment, à peu près 9 heures après l'élimination de HU. Pour celles qui sont restées 10 heures sous HU, il n'est pas observé de « pic » de mitoses, mais, au-delà de 7 heures après l'élimination de HU, on voit régulièrement des cellules isolées entrer en mitose.

L'étude de la dynamique de la phase G1 a été faite sur des cellules qui étaient restées soit 10 heures, soit 15 heures, sous HU pendant les 3 premières heures qui suivent le rinçage. L'étude de la dynamique des phases S et G2 a été menée sur des cellules qui étaient restées 15 heures, sous HU, entre 3 et 6 heures après le retrait de HU du milieu pour la phase S et plus de 7 heures après l'élimination de HU, jusqu'au début des mitoses, pour la phase G2.

Cependant, on peut trouver quelques inconvénients à ce protocole. D'abord, les cellules sont bloquées en fin de phase G1, typiquement on étudie que les 3-4 dernières heures de cette phase, ce qui ne permet pas d'avoir accès à la dynamique sur toute la durée de la phase G1 (qui dure une dizaine d'heures). Rien ne dit que la dynamique interne du noyau en début de phase G1 soit la même que celle en fin de phase G1. Ensuite, du fait de la légère désynchronisation des cellules, les mesures sur les phases S et G2 se font sur des populations de cellules dans lesquelles ces phases ne sont que faiblement majoritaires, ce qui n'autorise pas une étude précise de la dynamique pour ces deux phases.

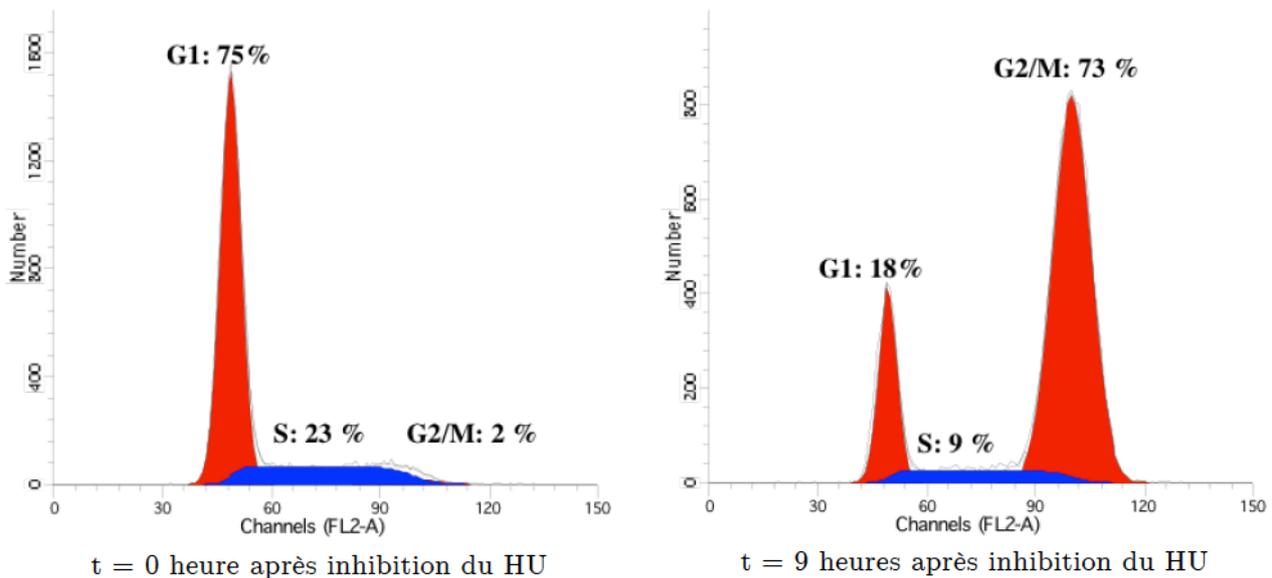
En conséquence, nous avons essayé de mettre au point de nouvelles méthodes pour mieux synchroniser nos populations de cellules et ainsi pouvoir avoir accès au début la phase G1 et aussi mieux extraire la dynamique des phases S et G2. Après plusieurs tests, nous sommes arrivés à la

conclusion qu'il fallait utiliser deux méthodes de synchronisation différentes ; une pour étudier l'ensemble de la phase G1 et une pour l'étude des phases S et G2.

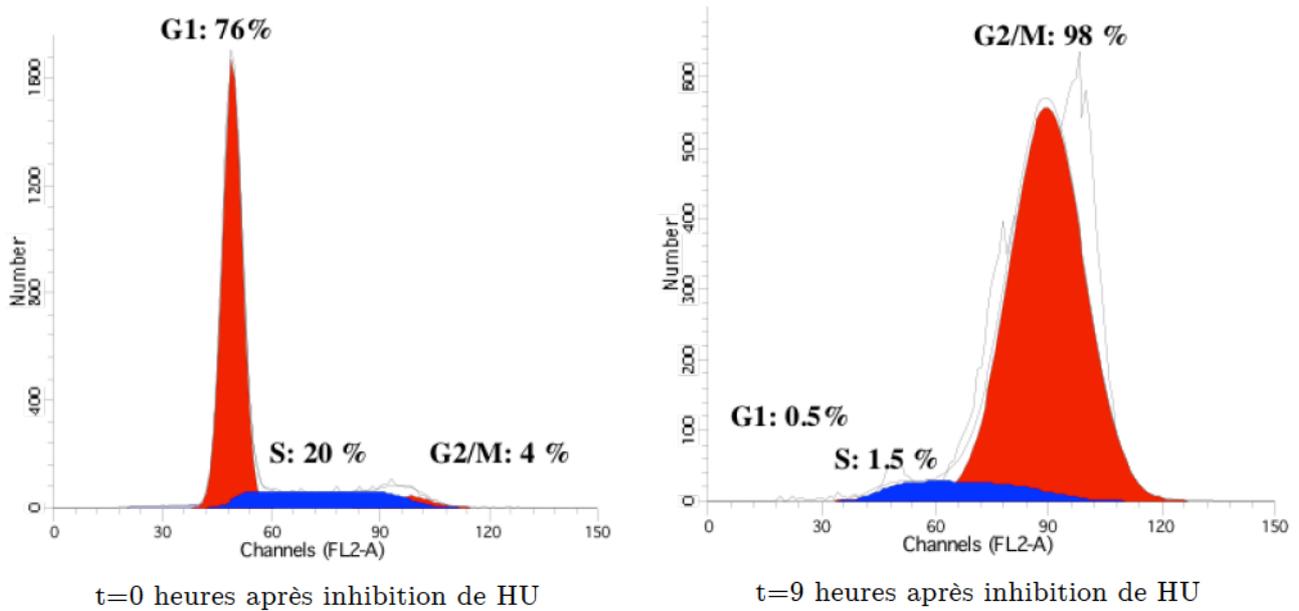
### 3.5.2.1. « Synchronisation » pour l'étude de la phase G1.

Pour pouvoir étudier la phase G1, nous avons décidé de reprendre, en partie, une des deux méthodes de synchronisation développées par Michaël Suissa. Nous mettons les cellules en culture dans un milieu contenant 0,5 mM de HU pendant 15 heures. Puis, nous remplaçons ce milieu de culture avec HU par du milieu sans HU, mais, au lieu de commencer nos mesures juste après le rinçage, nous laissons la population de cellules évoluer naturellement ; nous savons qu'une dizaine d'heures après le rinçage il y aura un « pic de mitoses » et, donc qu'après ce « pic », nous aurons une population de cellules qui sera très majoritairement en début de phase G1. C'est à partir de là que nous commencerons nos expériences.

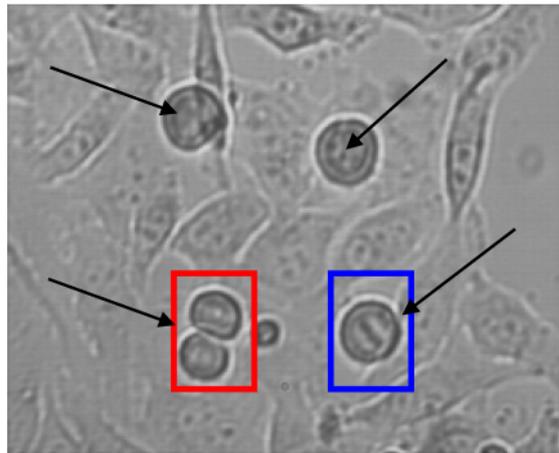
Avant d'appliquer cette méthode, nous avons d'abord vérifié que pour les cellules de la lignée SHEP nous retrouvions bien les résultats de Michaël Suissa [33,36] et que pour les cellules de la lignée HeLa l'effet de HU était similaire à celui observé pour les SHEP. Figures 3.13 et 3.14, nous présentons les résultats d'analyses par CMF de populations de cellules SHEP et HeLa, bloquées 15 heures sous HU, 0 heure et 9 heures après inhibition du HU. On peut observer que l'effet de HU semble quasiment identique pour les 2 lignées cellulaires. Cependant, de manière assez surprenante, nous remarquons que le taux de cellules en phase G1 juste après l'inhibition de HU est nettement moins important dans notre cas que celui qui avait été observé par Michaël Suissa lors de sa thèse ; il avait observé 90% de cellules en phase G1 alors que nous n'en observons que 75%. Nous n'avons pas essayé de comprendre cette différence. Par, contre, comme Michaël Suissa, nous observons, 9h après l'inhibition de HU, une très forte majorité de cellules en phase G2/M, ce qui indique clairement qu'autour de 10 heures après l'inhibition, il y aura bien un « pic de mitoses », *i.e.* la très grande majorité des cellules vont faire leur mitose quasiment en même temps.



**Figure 3.13.** Analyse par CMF des cellules SHEP ; histogramme de la répartition des cellules, à gauche à t=0 heure après inhibition de HU, à droite 9 heures après inhibition de HU.



**Figure 3.14.** Analyse par CMF des cellules HeLa ; histogramme de la répartition des cellules, à gauche à  $t=0$  heures après inhibition du HU, à droite 10 heures après inhibition du HU.



**Figure 3.13.** Photographie de cellules SHEP prises à la caméra sur le montage de diffusion de la lumière un peu moins de 10 heures après avoir enlevé le HU du milieu de culture. On observe les premières mitoses (indiquées par des flèches), dans le cadre à droite, une cellule en phase M juste avant la division (sur le film on la voit se diviser dans les minutes qui suivent, comme les deux cellules « rondes » qui sont au dessus). Dans le cadre à gauche, une cellule en train de faire sa mitose.

Ces résultats de cytométrie en flux ont été confirmés par des observations visuelles (Figure 3.13). Nous avons placé sur notre montage de diffusion de la lumière des chambres de culture contenant des cellules SHEP ou HeLa ayant passées 15 heures dans un milieu de culture avec 0,5 mM de HU. Environ, 10 heures après l'inhibition de HU, pour les deux lignées cellulaires on commence à voir les premières mitoses dans les chambres de culture et, en une heure, quasiment toutes les cellules qui sont dans le champ commencent leur mitose. A partir de ce moment là, nous savons que pour les dix prochaines heures nous aurons dans les chambres de culture des populations de cellules qui seront majoritairement en phase G1.

### 3.5.2.2. « Synchronisation » pour l'étude des phases S et G2.

Pour synchroniser nos populations de cellules très majoritairement en phase S et en phase G2, nous avons mis en place une méthode spécifique qui utilise un autre agent cytobloquant : la Thymidine.

La Thymidine est une drogue très utilisée par les biologistes pour pouvoir bloquer les cellules au début de la phase S [48] en inhibant seulement l'action de la ribonucléotide réductase [55]. Ainsi de fortes concentrations de Thymidine ont un effet négatif sur la synthèse de dCTP à partir de CTP. Ceci entraîne une inhibition de la réplication et un blocage des cellules en phase S. Il existe, dans la littérature, des descriptions de plusieurs méthodes utilisant la Thymidine pour arriver à bloquer les cellules au début de la phase S. Nous avons testé plusieurs d'entre elles et, il nous a semblé que le plus « efficace » pour nous était la méthode dite du « double blocage » qui a l'avantage de bien synchroniser les cellules, ce qui nous donne d'abord une population de cellules très majoritairement en phase S, puis, dans un second temps, une population de cellules très majoritairement en phase G2.,

La méthode du « double blocage » par la Thymidine que nous avons utilisée est la suivante [48]. D'abord, on introduit les cellules dans le milieu de culture contenant 2 mM de Thymidine et on les laisse dans ce milieu pendant 17 heures pour un premier blocage. On rince les cellules avec du PBS (Phosphate Buffered Saline ; Gibco) et on les remet dans un milieu de culture normal (i.e. sans Thymidine) pour que les cellules redémarrent leur cycle. On les laisse dans ce milieu pendant 9 heures. Ensuite, on remplace, de nouveau, le milieu de culture dans lequel se trouvent les cellules par du milieu de culture contenant 2 mM de Thymidine et on laisse agir pendant 18 heures pour un obtenir deuxième blocage. On rince les cellules avec du PBS et, on les remet dans un milieu de culture normal.

Les évolutions de la répartition des cellules des lignée SHEP et HeLa sur les différentes phases du cycle cellulaire après ce double blocage sont présentés Tableaux 3.3 et 3.4, où nous montrons les résultats des mesures de cytométrie en flux réalisées sur des populations de cellules (SHEP, 3.3 et HeLa, 3.4) ayant subi le double blocage décrit plus haut à 0, 2, 4, 5 et 6 heures après l'inhibition de la Thymidine suite au second rinçage. Pour obtenir ces résultats, nous avons laissé des populations de cellules (SHEP et HeLa) cultivées en boîte de Pétri dans un incubateur à CO<sub>2</sub> jusqu'à ce que ces populations soient presque à confluence, typiquement autour de 80%. Une fois les cellules arrivées à ce stade, nous les avons remises en culture à une densité inférieure dans différentes boîtes de Pétri avec du milieu de culture contenant 2 mM de Thymidine. On a appliqué le protocole du double blocage à toutes ces boîtes tel que nous l'avons décrit. Après le second rinçage, les populations de certaines boîtes ont été immédiatement fixées et analysées par des expériences de cytométrie en flux, d'autres populations (avec un nombre équivalent de cellules) ont été fixées et analysées au FACScan 2 heures, 4 heures, 5 heures et 6 heures après le second rinçage.

Grâce à cette méthode du double blocage, on obtient des populations de cellules (aussi bien pour les SHEP que pour les HeLa) qui sont à plus de 80% en phase S entre 0 et 4 heures après le second rinçage. Puis, elles rentrent en phase G2/M entre 5 et 6 heures après l'inhibition de la Thymidine. Pour les chambres de cultures installées sur le montage de diffusion de la lumière, on commence à observer beaucoup de mitoses environ 6 heures après le second rinçage, tandis qu'au FACScan nous mesurons une majorité de cellules en phase G1 7 heures après le rinçage.

Temps après Thymidine (Heures)	% de cellules en phase G1	% de cellules en phase S	% de cellules en phase G2/M
0	0	85	14
2	12	84	4
4	9	80	11
5	0	37	63
6	13	37	50

*Tableau 3.3. Évolution au cours du temps après élimination de la Thymidine de la répartition dans le cycle cellulaire d'une population de cellules SHEP ayant subi un double blocage (analyse par cytométrie en flux). Mesures de cytométrie en flux réalisées au FACScan sur 20 000 cellules.*

Temps après Thymidine (Heures)	% de cellules en phase G1	% de cellules en phase S	% de cellules en phase G2
0	20	75	5
2	1	90	9
4	2	82	16
5	8	25	67
6	15	29	56

*Tableau 3.4. Évolution au cours du temps après élimination de la Thymidine de la répartition dans le cycle cellulaire d'une population de cellules HeLa ayant subi un double blocage (analyse par cytométrie en flux). Mesures de cytométrie en flux toujours réalisées au FACScan sur 20 000 cellules.*

### 3.5.3. Protocoles de préparation des cellules pour les expériences de diffusion de la lumière

Quelles que soient les expériences que nous avons réalisées, nous avons toujours suivi le protocole décrit ci-dessous.

La chambre de culture dans laquelle sont placées les cellules pour nos expériences devant être parfaitement stérile pour éviter toute contamination, avant chaque expérience, la pièce en inox qui va être utilisée est nettoyée avec beaucoup de soin. La pièce est d'abord brossée, puis rincée abondamment à l'eau ultra-pure (USF Elga) et à l'éthanol, puis séchée à l'azote avant d'être, finalement, autoclavée. Elle est ensuite stockée sous une hotte à flux laminaire stérile jusqu'à utilisation. Les lamelles de verre qui vont être collées sur cette pièce sont d'abord laissées pendant plusieurs heures dans une solution savonneuse (Décon à 4 %), puis deux fois une heure dans de l'eau distillée avant d'être rincées abondamment à l'eau ultra-pure et à l'éthanol et séchées à l'azote avant d'être autoclavées. Ces lamelles sont ensuite collées sur la pièce en inox grâce à un joint en silicone (AS 310). Une fois les lamelles collées, la chambre de culture est conservée sous une hotte à flux laminaire stérile jusqu'à ce que le joint soit sec. La chambre de culture est alors prête et les cellules peuvent y être introduites.

Pour nos expériences, les cellules (aussi bien pour les SHEP que pour les HeLa) sont généralement plantées dans la chambre de culture à une densité initiale de 2/5 (soit environ 40 % de la surface est couverte de cellules), suivant le protocole décrit dans la suite. Nous partons de cellules cultivées dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre placée dans un incubateur à CO<sub>2</sub>, baignant dans 10 mL de milieu de culture. Nous partons avec une densité assez faible et nous laissons proliférer les cellules jusqu'à ce que leur densité soit environ 80% de la surface couverte (c'est-à-dire presque à confluence pour que les cellules soient très majoritairement en phase G1). Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées avec environ 5 mL de PBS 1X (Gibco) afin de s'assurer qu'il ne reste plus du tout de milieu car celui-ci inhibe l'enzyme servant à détacher les cellules de leur support (on utilise une enzyme du suc pancréatique, la trypsine, qui hydrolyse les liaisons entre la cellule et le substrat). Environ 0,5 mL de trypsine non diluée (Gibco) est mise sur les cellules. Une fois les cellules détachées, elles sont remises avec 10 mL de milieu de culture avec de l'HEPES (*i.e.* celui utilisé pour conserver les cellules dans les chambres de cultures ; *cf.* § 3.3.3.). On prélève  $x$  mL de cette solution que l'on complète avec  $(10 - x)$  mL de milieu seul pour avoir la concentration en cellules désirée. Le mélange effectué, on prélève 0,3 mL de la nouvelle solution pour l'injecter dans la chambre de culture, par l'un des deux canaux, à l'aide d'une seringue.

Une fois les cellules introduites dans la chambre de culture, celle-ci est laissée à l'horizontale dans un incubateur à cellules, dont la température est à 37°C, pendant au moins trois heures avant toute manipulation pour permettre aux cellules d'adhérer et de s'étaler correctement sur la surface du bas. Une fois les cellules complètement étalées sur cette surface, on leur applique une des procédures particulières que nous avons décrites au dessus, dont le but est de nous permettre d'obtenir une population de cellules qui se trouve dans un état bien spécifique pour nos expériences de diffusion de la lumière ; soit pour avoir une population de cellules en début de phase G1, ou en fin de phase G1 ou encore en début de phase S. Les différentes procédures utilisées pour obtenir de telles populations seront décrites au Chapitre 5.

Une fois la procédure spécifique terminée et les cellules prêtes pour nos expériences, les canaux sont bouchés grâce à un capillaire (tuyau silatic d'un diamètre de 1 mm de VWR) rempli avec du milieu de culture, qui relie les deux canaux entre eux. On scelle hermétiquement les entrées des capillaires pour éviter tout contact de la chambre de culture avec l'extérieur, et on la place dans l'étau en dural (préalablement chauffé à 37°C) sur le montage de diffusion dynamique de la lumière (*cf.* § 3.3.2.).

## BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 3

1. Berne B. J et Pecora R., *Dynamic Light Scattering, with application to Chemistry, Biology and Physics*, 2nd edition, Ed. Dover publication Inc. (2000)
2. Chu B., *Laser Light Scattering. Basic Principles and Practice*. Academic Press, London. (1991)  
et, *Light Scattering: Principles and development*, Monographs on the Physics and Chemistry of Materials, Oxford University Press, Wyn Brown Ed. (1996).
3. Doty P., et Steiner F. R., *Light Scattering and Spectrophotometry of Colloidal Solutions. Journal of Chemical Physics*, **18** : 1211 (1950).
4. Vanmegen W., Pusey P. N., *Dynamic Light Scattering study of the glass-transition in colloidal suspension. Physical Review A*, **43** : 5429-5441 (1991).
5. Burchard W., *Static and Dynamic Light Scattering from branched polymers and bio-polymers. Advanced In Polymer Science*, **48** : 1-124 (1983).
6. Wiczorek S. A., Freyssingeas É., Holyst R., *Relaxation processes in semidilute solutions of polymers in liquid crystal solvent. Journal of Physical Chemistry B*, **109** (34) : 16252–16262, (2005).
7. Brown W., Fundin J., Miguel M. D., *Poly(Ethylene Oxide)-Sodium Dodecyl-Sulfate interactions studied using Static and Dynamic Light Scattering. Macromolecules*, **25** : 7192-7198 (1992).
8. Tse-Ve-Koon K., Tremblay N., Constantin D., Freyssingeas É., *Structure, Thermodynamics and Dynamics of the isotropic phase of spherical non-ionic surfactant micelles. Journal of Colloids and Interface Sciences*, DOI information: 10.1016/j.jcis.2012.10.039 (2013).
9. Belini T., Clark N. A., Schaeffer D.W., *Dynamic Light Scattering of nematic and smectic-A liquid-crystal ordering in Silica Aerogel. Physical Review Letters*, **74** : 2740-2743 (1995).
10. Freyssingeas, É., Nallet F. et Roux D., *Measurement of the membrane flexibility in lamellar and "sponge" phases of the C(12)E(5)/hexanol/water system. Langmuir*. **12** : 6028-6035 (1996).
11. Freyssingeas, É., Martin A. et Roux, D., *Role of dislocation loops on the elastic constants of lyotropic lamellar phases. European Physical Journal E*, **18** : 219–230, (2005).
12. Bloomfield V. A., *Biological Applications dans Dynamic Light Scattering (Chapitre 10)*. Edité par Pecora R. Plenum Press. New York (1985).
13. Schurr J. M., *Dynamic Light Scattering of bio-polymers and bio-colloids. CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **4** : 371-431 (1977).
14. Fletcher GC., *Dynamic light scattering from collagen solutions. I. Translational diffusion coefficient and aggregation effects. Biopolymers*, **15** : 2201-2217 (1976).
15. Janmey P. A., Hvidt S., Kas J., Lerche D., Maggs A., Sackmann E., Schliwa M. et Stossel T. D., *The mechanical properties of actin gels. Elastic modulus and filament motions. Journal of Biological Chemistry*, **269** : 32503–32513 (1994).

16. Mandelkern M., Elias J.G., Eden D. et Crothers D. M., The dimensions of DNA in solution. *Journal of Molecular Biology*, **152** : 153-161 (1981).
17. He S., Arscott P. G. et Bloomfield V. A., Condensation of DNA by multivalent cations experimental studies of condensation kinetics. *Biopolymers*, **53** : 329-341 (2000).
18. Fulmer A.W. et Bloomfield V.A., Higher-order folding of 2 different classes of chromatin isolated from chicken erythrocyte nuclei – a Light Scattering Study. *Biochemistry*, **21** : 985-992 (1982).
19. Lowary P. T. et Widom J., Higher-order structure of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **86** : 8266-8270 (1989).
20. Mourant J. R., Hielscher A. H., Eick A. A., Johnson T. M. et Freyer J. P., Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells. *Cancer*, **84** : 366-374 (1998).
21. Hahn W. C., Counter C. M., Lundberg A. S., Beijersbergen R., Brooks M. W. et Weinberg R. A., Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature*, **400** : 464-468 (1999).
22. Mourant J. R., Canpolat M., Brocker C., Esponda-Ramos O., Johnson T. M., Matanock A., Stetter K et Freyer J. P., Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status. *Journal of Biomedical Optics*, **5** : 131-137 (2000).
23. Backman V., Wallace M. B., Perelman L. T., Arendt J. T., Gurjar R., Müller M. G., Zhang Q., Zonios G., Kline E., McGillican T., Shapshay S., Valdez T., Badizadegan K., Crawford J. M., Fitzmaurice M., Kabani S., Levin H. S., Seiler M., Dasari R. R., Itzkan I., Van Dam J., Feld M. S., Detection of preinvasive cancer cells. *Nature*, **406** : 35-36 (2000).
24. Srinivas S. P., Bonanno J. A., Lariviere E., Jans D., Van Driessche W., Measurement of rapid changes in cell volume by forward light scattering. *Pflügers Archiv – European journal of physiology*, **447** : 97-108 (2003).
25. Tishler R. B. et Carlson F. D., A study of the dynamic properties of the human red blood cell membrane using quasi-elastic light scattering spectroscopy. *Biophysical Journal*, **65** : 2586-2600 (1993).
26. Lin X. G., Wang R. R., Guo Y. C., Gao C., Guo X. E., Comparative Study of Light Scattering from Hepatoma Cells and Hepatocytes. *International Journal of Thermophysics*, **33** : 1795-1800 (2012).
27. Nolte D. D., An R., Turek J., Jeong K., Tissue Dynamics Spectroscopy for Three-Dimensional Tissue-Based Drug Screening. *Journal of Laboratory Automation*, **16** : 431-442 (2011).
28. Nolte D. D., An R., Turek J., Jeong K., Holographic tissue dynamics spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **16** : Article Number: 087004 (2011).
29. Lee J., Radhakrishnan H., Wu W. C., Daneshmand A., Klimov M., Ayata C., Boas D. A., Quantitative imaging of cerebral blood flow velocity and intracellular motility using dynamic light scattering-optical coherence tomography . *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **33** : 819-825 (2013).
30. Zink D. et Cremer T., Cell nucleus : chromosome dynamics in nuclei of living cells. *Current biology*, **8** : R321-R324 (1998) ; Zink D., Cremer T., Saffrich R., Fischer R., Trendelenburg M.

- F., Ansorge W. et Stelzer E. H., Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Human Genetics*, **102** : 241–251 (1998).
31. Jong A. Y., Yu K., Zhou B., Frgala T., Reynolds C. P. et Yen Y., A simple and sensitive ribonucleotide reductase assay. *Journal of Biomedical Science*, **5** : 62 (1998).
32. Pombo A., Cuello P., Schul W., Yoon J. B., Roeder R. G., Cook P. R. and Murphy S., Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle. *EMBO Journal*, **17** : 1768–1778 (1998).
33. Suissa Michaël, Thèse de doctorat de l'École Normale Supérieure de Lyon : Dynamique Interne du noyau d'une cellule vivante : Etude par diffusion dynamique de la lumière. N° 06ENSL0 363 (2006)
34. Suissa M., Place C., Goillot É., Berge B. et Freyssingéas É., Dynamic Light Scattering as an Investigating Tool to Study the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus. *Europhysics Letters*, **78** : 38005 (2007).
35. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingéas É., Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus Investigated by Dynamic Light Scattering. *European Physical Journal E*, **26** : 435–448 ; Art. No. 10346-5 (2008).
36. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingéas É., Evolution of the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus during Interphase. *Biophysical Journal*, **97** : 453–461, (2009).
37. With A. et Greulich K. O., Wavelength dependence of laser-induced DNA damage in lymphocytes observed by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **30** : 71–76 (1995).
38. Ashkin A., Dziedzic J. M. et Yamane T., Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, **330** : 769–771 (1987).
39. Neuman K. C., Chadd E. H., Liou G. F., Bergman K. et Block S. M., Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps. *Biophysical Journal*, **77** : 2856–2863 (1999).
40. Shckorbatov Y. G., He-Ne laser light induced changes in the state of chromatin in human cells. *Naturwissenschaften*, **86** : 452–453 (1999).
41. Mi X. Q., Chen J. Y., Liang Z. J., Zhou L. W., In vitro effects of helium-neon laser irradiation on human blood: blood viscosity and deformability of erythrocytes. *Photomedicine and Laser Surgery*, **22** : 477–482 (2004).
42. Stein A., Benayahu D., Maltz L. et Oron U., Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*, **23** : 161–166 (2005).
43. Shu B., Wu Z., Hao L., Zeng D., Feng G. et Lin Y., Experimental study on He-Ne laser irradiation to inhibit scar fibroblast growth in culture. *Chinese journal of traumatology*, **5** : 246–249 (2002).
44. Johnsen J. I., Pettersen I., Ponthan F., Sveinbjornsson B., Flaegstad T. et Kogner P., Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon-gamma and Trail. *International Journal of Oncology*, **25** : 1849 (2004).

45. Gong X. F., Wang M. W., Wu Z., Tashiro S., Onodera S., Ikejima T., Pseudolaric acid B induces apoptosis via activation of c-Jun N-terminal kinase and caspase-3 in HeLa cells. *Experimental and Molecular Medicine*, **36** : 551-556 (2004).
46. Goillot E., Raingeaud J., Ranger A., Tepper R. I., Davis R. J., Harlow E. et Sanchez I., Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94** : 3302-3307 (1997).
47. Owens M. A. et Loken M. R., *Flow Cytometry: Principles for Clinical Laboratory Practice.*, New York: Wiley-Liss. (1995) ; Nunez R., *Flow Cytometry for Research Scientists: Principles and Applications.*, Wymondham, Norfolk, UK: Horizon Press (2001) ; Givan A., *Flow Cytometry: First Principles.*, New York: Wiley-Liss (2001).
48. Whitfield L. M., State-of-the-art in human cell synchronization. *Molecular and Cellular Biology*, **13** : 1977 – 2000 (2002).
49. Khayat A. S., Guimaraes A. C., Cardoso P. C., de Lima P. D. L., Bahia M. D., Antunes L. M. G., Burbano R. R., Mutagenicity of hydroxyurea in lymphocytes from patients with sickle cell disease. *Genetics and Molecular Biology*, **27** : 115-117 (2004).
50. Koc A., Wheeler L. J., Mathews C. K., Merrill G. F., Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *Journal of Biological Chemistry*, **279** : 223-230 (2004).
51. Hofer A., Ekanem J. T., Thelander L., Allosteric regulation of Trypanosoma brucei ribonucleotide reductase studied in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. **273** : 34098-34104 (1998).
52. Hofer A., Crona M., Logan D. T., Sjoberg B.M., DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **47** : 50-63 (2012) ; DOI: 10.3109/10409238.2011.630372.
53. Niida H., Shimada M., Murakami H., Nakanishi M., Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Science*, **101** : 2505-2509 (2010) ; DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01719.x.
54. Mathews C.K., DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB Journal*, **20** : 1300-1314 (2006) ; DOI: 10.1096/fj.06-5730rev
55. Torrents E., Aloy P., Gibert I., Rodríguez-Trelles F., Ribonucleotide Reductases: Divergent Evolution of an Ancient Enzyme, *Journal of Molecular Evolution*, **55** : 138-152 (2002).



## CHAPITRE 4

### INTENSITE LUMINEUSE DIFFUSEE PAR LE NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE ; CARACTERISTIQUES ET ANALYSE.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les caractéristiques de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule vivante et les techniques de traitement du signal que nous avons mises au point pour extraire des signaux que nous avons mesurés des informations sur la dynamique interne du noyau.

Pour cette partie nous avons bénéficié de l'aide précieuse de Pierre Borgnat (chercheur au Laboratoire de Physique, dans le groupe SIgnaux, SYstèmes et PHysiquE -SISYPHE), sans qui peu de progrès dans ce domaine aurait été possibles. L'analyse des signaux mesurés a été un des gros problèmes de cette thèse. Trouver un moyen fiable d'analyser les variations temporelles de l'intensité diffusée par le noyau a constitué une grosse partie de ce travail de thèse (pour ne pas dire la plus grosse partie) et surtout, cela a vraiment été le point clef de cette étude. Sans analyse correcte des signaux obtenus, il nous aurait été quasiment impossible d'aller beaucoup plus loin que les premières études faites par Michaël Suissa lors de sa thèse [1–4]. Comme nous l'avons déjà décrit plus haut (Chapitre 3, § 3.2.2. (vi)), en pratique, quand nous faisons une mesure de l'intensité diffusée par un noyau, nous comptons le nombre de photons détectés pour chaque intervalle de temps de  $10^{-5}$  s pendant une durée totale de 10 minutes. L'information sur la dynamique interne du noyau est contenue dans les fluctuations temporelles du nombre de photons détectés. La mise au point d'une technique fiable pour l'analyse de ces signaux s'est faite de manière empirique et a nécessité beaucoup de tests d'adaptation pour trouver une méthode de traitement de signal qui s'adapte bien aux propriétés intrinsèques de nos signaux, à savoir la non-stationnarité et la présence de plusieurs échelles de temps.

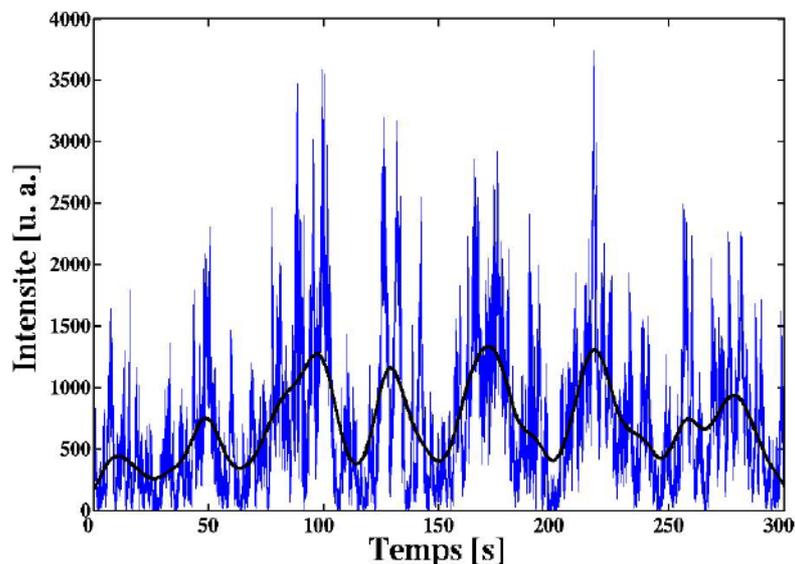
Tout d'abord, nous allons commencer par rappeler ce que l'on savait sur les variations temporelles de l'intensité diffusée au début de cette thèse, ceci afin d'expliquer les raisons du choix des paramètres d'acquisition des signaux que nous avons fait. Puis, nous exposerons et commenterons l'allure générale des signaux obtenus avec ces paramètres d'acquisition (analyse qualitative), avant de détailler la méthode que nous avons mise au point pour analyser ces signaux et ainsi extraire des informations sur la dynamique interne du noyau.

#### 4.1. INTENSITE LUMINEUSE DIFFUSEE ; CARACTERISTIQUES DES SIGNAUX MESURES.

##### 4.1.1. Mesure du signal brut ; « Etat de l'art ».

La Figure 4.1. montre un signal caractéristique de l'intensité diffusée par le noyau d'une cellule vivante en fonction du temps. Cet enregistrement a été réalisé par Michaël Suissa pendant sa thèse ; la mesure a été faite sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G1, à une fréquence d'acquisition de  $10^3$  Hz pendant une durée de 5 minutes (donc à une fréquence moins élevée et sur

un temps plus court que nos propres mesures).<sup>1</sup> On remarque que ce signal est particulièrement complexe : non-stationnaire, avec plusieurs échelles de temps apparaissant très clairement. En particulier, on observe distinctement des variations sur des temps longs, avec une modulation assez régulière de l'intensité lumineuse diffusée sur des temps de l'ordre de quelques dizaines de seconde ; typiquement 40 à 60 s. On voit aussi des pics d'intensité (*i.e.* des variations brutales sur une période très courte) assez réguliers ; typiquement toutes les 3 – 4 s. L'ensemble de ces variations très lentes de l'intensité diffusée au cours du temps indique l'existence d'une dynamique très lente à l'intérieur du noyau. À ces variations lentes de l'intensité diffusée se superposent bien sûr des fluctuations rapides. Ces fluctuations rapides sont celles que Michaël Suissa a pu étudier grâce à une carte corrélateur Brookhaven BI9000 (voir la Figure 1.3 du Chapitre 1), qui construit directement la fonction d'autocorrélation de l'intensité lumineuse détectée en fonction du temps mettant ainsi en évidence plusieurs temps caractéristiques inférieurs à la seconde, typiquement, des temps compris entre quelques millisecondes et la seconde [1–4]. De plus, les résultats de la thèse de Michaël Suissa, suggèrent que la dynamique interne du noyau a aussi une composante très rapide, probablement très inférieure à la milliseconde.

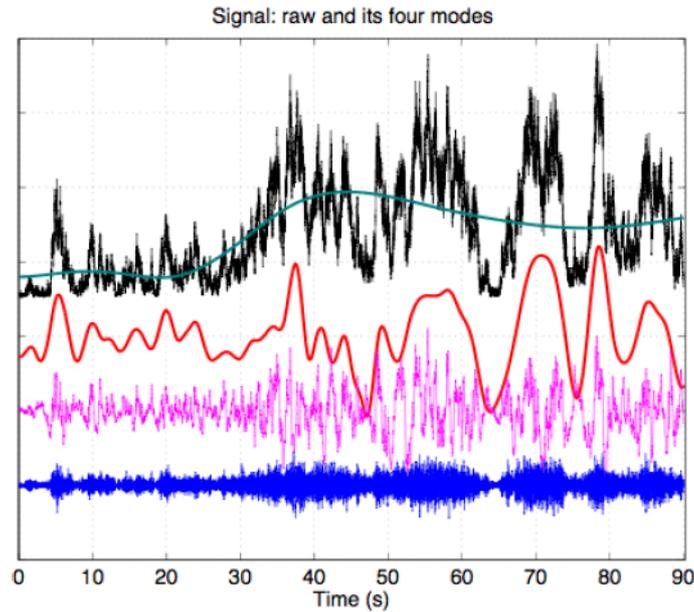


*Figure 4.1. Variation de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule en phase G1 en fonction du temps (mesure effectuée par Michaël Suissa pendant sa thèse). Le temps d'échantillonnage de la carte d'acquisition est de 1 ms. L'acquisition a été réalisée sur 5 minutes. La courbe en trait gras est la moyenne glissante sur 10 s.*

Faire la transformée de Fourier d'un tel signal ne donne strictement rien. Ainsi, la toute première approche pour traiter les signaux de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule a été d'essayer d'utiliser une nouvelle technique de traitement du signal qui est développée actuellement par le groupe SISYPHE. Cette technique est l'*Empirical Mode décomposition* (EMD) [5]. Nous n'allons pas décrire ici en détails cette technique, il faut juste savoir qu'elle permet d'extraire les différents temps caractéristiques d'un signal non-stationnaire contenant plusieurs temps, en le décomposant sous la forme d'une superposition (*i.e.* d'une somme) de plusieurs composantes stationnaires et d'une composante non stationnaire. Cette technique nous semblait

<sup>1</sup> On peut aussi se reporter à la Figure 1.2 du Chapitre 1 qui, pour un autre signal mesuré, montre exactement les mêmes caractéristiques.

particulièrement adaptée aux signaux que nous pouvions obtenir. En effet, nous nous attendons à ce que l'intensité diffusée par le noyau contienne des informations sur plusieurs processus différents, ayant des temps caractéristiques bien distincts, avec, de plus, une variation temporelle irréversible due à l'évolution de la cellule dans son cycle cellulaire.



*Figure 4.2.* « Empirical Mode décomposition » d'un signal brut de diffusion de la lumière. Après une telle décomposition du signal brut en mode autonome, on peut observer 4 « modes » : l'un correspondant à des variations très lentes (de l'ordre de 30 à 40 s) ligne verte ; un second qui correspond aux variations de l'ordre de 3-4 s (ligne rouge) ; un troisième correspond à des fluctuations dans la gamme de 0,3 à 1 s (ligne rose) ; et un dernier, qui correspond à très fluctuations rapides, plus rapides que 0,3 s (ligne bleue). On constate que l'amplitude des fluctuations rapides est d'autant plus grande que l'amplitude du second mode est élevée, suggérant que ces deux modes pourraient être corrélés.

Les premières analyses faites par la technique de l'EMD des signaux mesurés par Michaël Suissa ont donné des résultats qui semblaient intéressants et prometteurs (Figure 4.2.). En particulier, l'étude qui a été faite par cette méthode des signaux de Michael Suissa a permis de conclure qu'il y avait un maximum de non stationnarité des signaux de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau autour de 10 s [5]. C'est-à-dire que si l'on regarde des périodes de temps qui sont plus grandes que 10 secondes, alors, nous ne pouvons pas considérer le signal diffusé comme un signal stationnaire.<sup>2</sup> Malheureusement, après quelques essais, nous nous sommes vite rendus compte que pour nos propres signaux cette technique de l'EMD ne pouvait pas être utilisée. La raison de cela est que nos fichiers de mesures sont beaucoup plus gros que ceux de Michaël Suissa (environ 1000 fois plus de points) et, couvrent une gamme de temps beaucoup plus importante, puisque l'on regarde la dynamique du noyau sur 7 ordres de grandeurs ( $10^{-5}$  – 100 s) au lieu de 4 ( $10^{-3}$  – 10 s). De plus l'EMD à un caractère adaptatif qui, s'il est un atout dans bien des situations, complique quelque peu l'interprétation des différentes composantes en terme physique ou biologique. Un mode physique peut être décomposé en plusieurs composantes pour l'EMD s'il a des temps

<sup>2</sup> La non-stationnarité des signaux de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau n'est pas une surprise, le noyau étant un système hors équilibre.

caractéristiques très étalés, ou une composante de l'EMD pourrait regrouper plusieurs modes si ils ont des temps caractéristiques peu séparés. Pour le moment, dans l'état actuel de son développement, cette technique n'est pas encore suffisamment rapide et surtout assez fiable pour analyser correctement de tels signaux. En conséquence, il nous a fallu trouver une méthode d'analyse alternative.

#### 4.1.2. Choix des paramètres d'acquisition du signal de l'intensité diffusée.

Le choix des paramètres de l'acquisition du signal de l'intensité diffusée par le noyau est très important pour que les signaux apportent des informations fiables sur les propriétés dynamiques du noyau. Ce choix est soumis aux contraintes spécifiques liées à la nature de nos signaux.

En nous basant sur ces résultats de la thèse de Michaël Suissa, et aussi sur ce qui est déjà connu de la dynamique à l'intérieur du noyau (*cf.* Chapitre 2, § 2.3.), nous imaginons très bien que pour avoir l'ensemble du spectre de la dynamique du noyau, nous allons devoir acquérir le signal de l'intensité lumineuse diffusée, à la fois, à très hautes fréquences, pour pouvoir avoir accès aux temps rapides et, sur une durée relativement longue, pour pouvoir avoir accès aux temps lents. Par exemple, les coefficients de diffusion associés à la diffusion brownienne des nucléotides et des petites protéines nucléaires (dont les tailles sont, typiquement, inférieures à 50 nm) à l'intérieur du noyau, sont, respectivement, de l'ordre de  $10^{-9}$ – $10^{-10}$   $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour les nucléotides [6,7] et de l'ordre de  $10^{-11}$ – $10^{-12}$   $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour les protéines nucléaires [8-12]. Donc, avec les vecteurs d'onde auxquels nous avons accès sur notre montage, nous nous attendons à trouver, pour la diffusion brownienne de ces objets, des temps de relaxation ( $\tau=1/Dq^2$ ) dans la gamme allant de quelques  $10^{-5}$  s à  $10^{-3}$  s. De même, pour un processus comme la diffusion brownienne des fibres de chromatine à l'intérieur même des territoires chromosomiques, dont le coefficient de diffusion est de l'ordre de  $10^{-16}$ – $10^{-15}$   $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [13–15], nous nous attendons à des temps caractéristiques très longs, typiquement de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes (typiquement 30 – 100 s). En conséquence, pour avoir accès à toute la dynamique du noyau, il faudrait pouvoir acquérir le signal diffusé à une fréquence au moins égale à  $10^5$  Hz, sur des temps de l'ordre, ou supérieur à 1000 secondes. Nous nous heurtons ici à un problème technique. Avec nos moyens de calcul (un ordinateur de bureau « classique »), il est difficile de manipuler aisément avec MatLab des fichiers ayant plus  $10^8$  points. En conséquence, il nous a fallu trouver un compromis entre fréquence d'acquisition et durée de la mesure.

- **Choix de la fréquence d'acquisition.** Pour le choix de la fréquence d'acquisition du signal, nous nous sommes basés sur une observation. Nous avons remarqué que pour la puissance incidente utilisée dans nos mesures (qui permet de ne pas endommager les cellules), sur les deux détecteurs les plus éloignés de l'axe du faisceau laser (donc à  $27^\circ$  et  $38^\circ$ ), le taux de comptage moyen est de l'ordre de quelques  $10^5$  photons par seconde. En conséquence, ce n'est pas la peine de prendre une fréquence d'acquisition de l'ordre du MHz, ou plus élevée, car alors, pour un nombre important d'intervalles de temps de comptage il n'y aura pas de photon détecté et, de ce fait, nous n'aurons probablement jamais assez de statistique pour extraire proprement un temps caractéristique de l'ordre de  $10^{-6}$  s. Par contre, avec une fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz, nous pouvons espérer, pour les quatre compteurs, détecter des photons pour chaque intervalle de temps de comptage et avoir des fluctuations importantes de ce nombre d'un intervalle à l'autre. Nous avons donc choisi d'acquérir le signal diffusé à cette fréquence.

- **Choix de la durée des mesures.** Une fois la fréquence d'acquisition fixée à  $10^5$  Hz, nous savons que la durée de l'acquisition doit être inférieure à  $10^3$  s pour avoir un fichier « manipulable » facilement. Comme les temps les plus longs semblent être de l'ordre de 30 – 100 s, on peut penser qu'une acquisition de 10 minutes sera suffisante pour nous permettre de

mesurer proprement cette dynamique lente. C'est sur cette hypothèse que nous avons choisi la durée des acquisitions. À la fin de ces 10 minutes, nous avons un fichier avec  $6.10^7$  points.

Comme nous l'avons déjà expliqué, le nombre de photons diffusés pour chaque angle de détection est enregistré sur un des quatre compteurs de photons de la carte d'acquisition (un compteur par angle) en accumulant le nombre de photons compté par chaque compteur à l'instant  $t$  avec le nombre de photons comptés à l'instant  $t+10^{-5}$  s. En d'autres mots, le fichier de mesure brut (celui qui est enregistré) et un fichier qui au temps  $t_k$  (avec  $t_k = k.10^{-5}$  s) associe le nombre de photons compté depuis le début de la mesure, c'est-à-dire :  $N(t_k) = \sum_{j=1}^k n(t_j)$  où  $n(t_j)$  est le nombre de photons qui a été détecté pendant l'intervalle de temps  $[(j-1).10^{-5} \text{ s}, j.10^{-5} \text{ s}]$ . À la fin de la mesure, pour obtenir un fichier qui au temps  $t_k$  associe la quantité  $n(t_k)$  (qui est la quantité qui nous intéresse pour remonter à la dynamique interne du noyau), nous faisons un premier prétraitement pour reconstruire le signal brut en calculant le décrétement des compteurs entre les deux instants  $t$  et  $t+10^{-5}$ . Ceci est réalisé sous MatLab en faisant simplement la différence (à l'aide avec la fonction « diff ») entre  $N(t_k)$  et  $N(t_{k-1})$  (*i.e.*  $N(t_k) - N(t_{k-1})$ ). Ce dernier fichier nous donne accès aux fluctuations de l'intensité diffusée en fonction du temps, c'est le fichier que nous allons maintenant essayer d'analyser pour avoir accès à la dynamique interne du noyau.

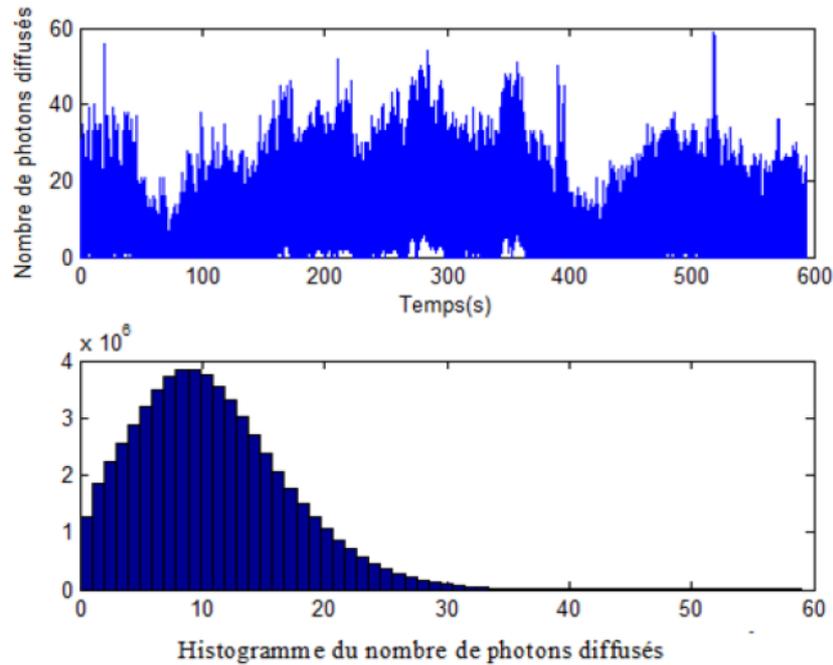
#### 4.1.3. Caractéristiques des signaux mesurés ; Exploration empirique de l'intensité diffusée par le noyau.

Une première analyse qualitative de nos signaux est de représenter, comme sur la Figure 4.3, un signal brut de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule avec plusieurs fréquences d'échantillonnage. SHEP en phase G1. Il s'agit ici d'un signal typique obtenu sur le compteur placé à  $16^\circ$  du faisceau incident, lors d'une expérience de 10 minutes sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 (donc un « système » identique à celui qui a donné le signal de la Figure 4.1.).

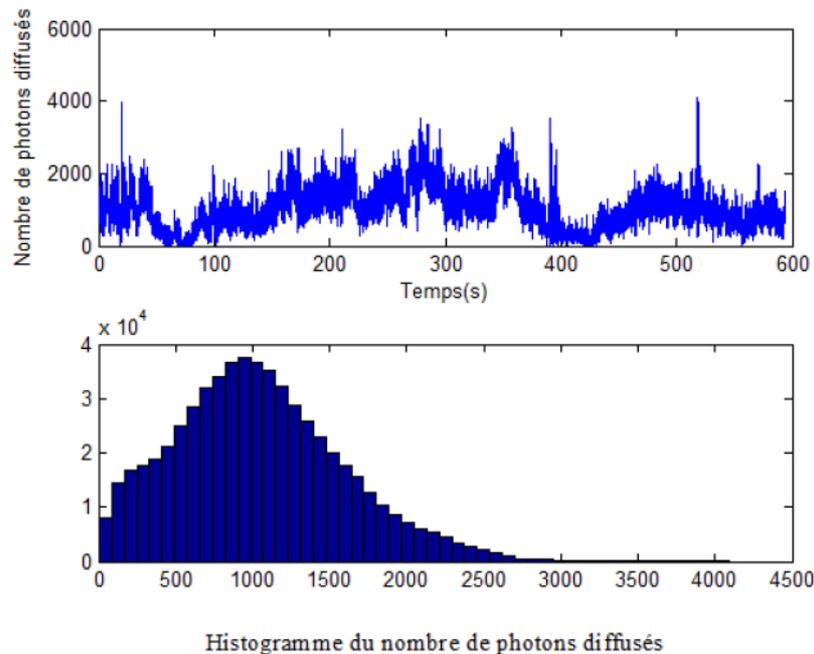
La Figure 4.3a, montre le nombre de photons diffusés détectés par intervalle de temps de comptage de  $10^{-5}$  s en fonction du temps.<sup>3</sup> Nous montrons aussi l'histogramme marginal du nombre de photons détectés par intervalle de temps de comptage lors de cette mesure.

Une fois le fichier de mesure brut enregistré, on peut très facilement diminuer, de façon artificielle, la fréquence d'acquisition du signal diffusé. Pour cela, au lieu de prendre tous les points du fichier de mesure brut et de faire la différence entre deux intervalles successifs, on prend un point tous les  $X$  intervalles pour faire un nouveau fichier de mesure de  $6.10^7/X$  points, ce qui revient à faire une mesure avec, cette fois, un intervalle de temps de comptage « effectif » qui est de  $X.10^{-5}$  s, donc une fréquence d'acquisition de  $10^5/X$  Hz. Ensuite, on fait la différence de comptage entre deux intervalles « effectif » successifs pour avoir les fluctuations de l'intensité diffusée en fonction du temps à une fréquence plus faible. Ceci revient à faire l'agrégation du signal mesuré sur  $X.10^{-5}$  s. Figures 4.3b et 4.3c, nous présentons le signal que nous avons montré Figure 4.3a, mais, cette fois avec une fréquence d'acquisition de  $10^3$  Hz (Figure 4.3b ; donc identique à la fréquence d'acquisition utilisée par M. Suissa), et avec une fréquence d'acquisition de 1 Hz (Figure 4.3c), c'est-à-dire l'agrégation du même signal sur, respectivement, des fenêtres de temps de  $10^{-3}$  s et 1 s. Dans ces deux cas, nous montrons aussi les histogrammes correspondants.

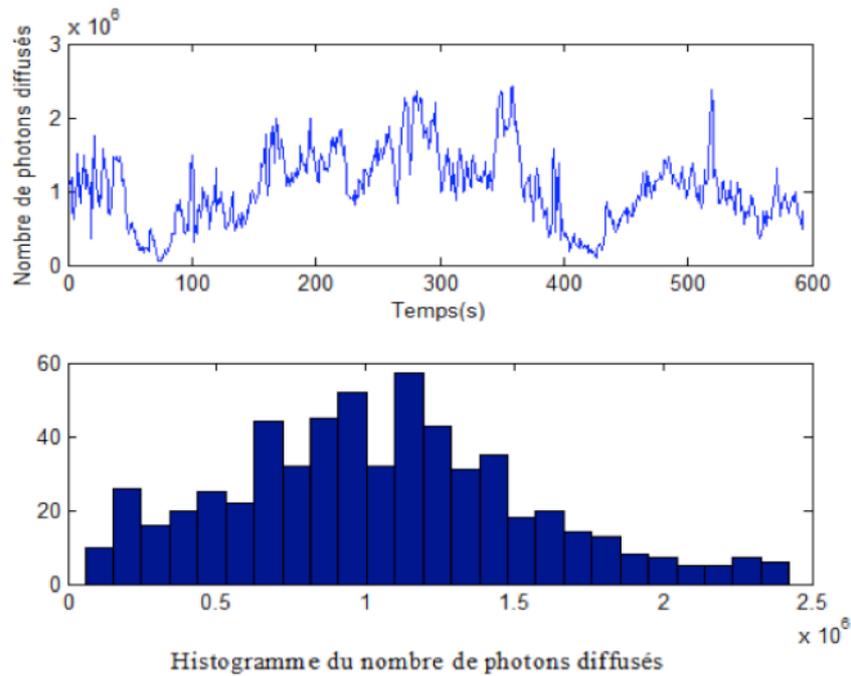
<sup>3</sup> Grâce au système de visualisation, nous avons pu vérifier que pendant l'acquisition de ce signal, les mouvements de la cellule étaient infimes (du moins pas observables) et qu'aucun objet à l'intérieur de la chambre de culture (cellules mortes, particules du milieu, etc ...) n'était passé entre le faisceau laser et le noyau de la cellule, ce qui aurait pu provoquer de brusques variations de l'intensité de la lumière diffusée.



**Figure 4.3a.** Haut : variations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule vivante ; i.e. le nombre de photons diffusés détectés pendant chaque intervalle de temps de  $10^{-5}$  s (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse) pour une durée de l'acquisition 600 s (soit  $6 \cdot 10^7$  intervalles). Bas : histogramme du nombre de photons détectés par intervalle de temps de comptage ( $10^{-5}$  s).



**Figure 4.3b.** Haut : variations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule vivante ; i.e. le nombre de photons diffusés détectés pendant chaque intervalle de temps de  $10^{-3}$  s (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse) pour une durée de l'acquisition 600 s (soit  $6 \cdot 10^5$  intervalles). Bas : histogramme du nombre de photons détectés par intervalle de temps de comptage ( $10^{-3}$  s).



**Figure 4.3c.** Haut : variations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule vivante ; i.e. le nombre de photons diffusés détectés pendant chaque intervalle de temps de 1 s (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse) pour une durée de l'acquisition 600 s (soit 600 intervalles). Bas : histogramme du nombre de photons détectés par intervalle de temps de comptage (1 s).

La première constatation que nous pouvons faire en regardant les histogrammes de ces figures, est que quelle que soit l'échelle de temps considérée en jouant sur la fenêtre de comptage, on est toujours en dessous du temps caractéristique le plus grand du système. En effet, si le temps de comptage était plus grand que l'ensemble des temps caractéristiques, l'histogramme du nombre de photons diffusés serait symétrique, centré sur la valeur moyenne,  $\langle N \rangle$ , du nombre de photons mesurés pendant un intervalle, avec un écart-type égal à  $\sqrt{\langle N \rangle}$ .

Donc, à partir de l'allure des histogrammes, nous pouvons déjà en déduire que nous avons des temps caractéristiques qui sont bien plus longs que la seconde. Ceci se voit aussi très bien sur les trois figures montrant le signal brut où nous pouvons, immédiatement, remarquer la présence de modulations lentes (sur quelques dizaines de seconde) de l'intensité diffusée. Ceci est particulièrement visible sur les Figures 4.3b et 4.3c où l'on voit aussi que ces modulations ne sont pas des modulations du signal autour d'une valeur moyenne, ce qui suggère que le signal est non-stationnaire sur de telles échelles de temps. Sur les figures 4.3b et 4.3c (i.e. fréquences d'échantillonnages respectivement de  $10^3$  Hz et 1 Hz), nous observons que sur ces modulations lentes se superposent des « pics » d'intensité, c'est-à-dire des augmentations fortes, rapides et brèves de l'intensité diffusée, qui se produisent très régulièrement. Si maintenant nous regardons, plus en détail, les fichiers qui donnent les figures 4.3a et 4.3b (i.e. fréquence échantillonnage respectivement de  $10^5$  Hz et  $10^3$  Hz), nous observons des fluctuations importantes du nombre de photons détectés d'un intervalle de comptage à l'autre, ce qui indique l'existence de temps de relaxations très rapides.

Nous retrouvons donc l'ensemble des caractéristiques déjà décrites par Michaël Suissa, c'est-à-dire : un signal non-stationnaire, avec plusieurs échelles de temps caractéristiques, allant des temps

très rapides aux temps très lents. Mais, cette fois, les signaux mesurés devraient nous permettre d'avoir accès à la totalité de la dynamique interne du noyau.

## 4.2. METHODES D'ANALYSE DES SIGNAUX MESURES.

### 4.2.1. Préambule.

Nous sommes rapidement arrivés à la conclusion que nous ne pourrions pas analyser en une seule fois l'ensemble des temps caractéristiques des signaux mesurés, et surtout, qu'en cherchant à avoir des informations sur les temps lents, nous ne pourrions pas voir l'évolution des temps rapides sur la durée d'une mesure et donc que nous perdrons de l'information. En conséquence, nous avons fait le choix de faire deux analyses distinctes ; une analyse pour les temps rapides (*i.e.* les temps caractéristiques compris entre  $10^{-5}$  s et 1 s) et une analyse pour les temps lents (*i.e.* les temps caractéristiques compris entre  $10^{-1}$  s et 100 s).

Nous avons d'abord cherché une méthode d'analyse pour les temps rapides. Ceci pour une raison toute simple, il nous était assez facile de valider, ou non, nos approches en confrontant les résultats ainsi obtenus avec ceux obtenus par Michaël Suissa lors de sa thèse puisqu'il avait étudié une gamme de temps similaire ( $10^{-3}$  s à 1 s). Ensuite, une fois cette méthode mise au point, nous nous sommes rendu compte, que l'analyse que nous avons développée pour étudier les temps rapides pouvait être modifiée, assez facilement, pour permettre l'étude des temps lents.

### 4.2.2. Discussion globale.

Une des méthodes classiques utilisées pour l'analyse des signaux issus des expériences de diffusion dynamique de la lumière est l'ajustement paramétrique de la fonction d'autocorrélation des fluctuations temporelles du signal mesuré (*i.e.* des fluctuations temporelles de l'intensité lumineuse diffusée). La fonction d'autocorrélation de l'intensité lumineuse diffusée mesure « l'homologie » de celle-ci à deux instants différents décalés en temps, ceci en calculant la valeur moyenne du produit de l'intensité lumineuse diffusée à l'instant  $t$  par l'intensité lumineuse diffusée à l'instant  $t+\tau$ . La décroissance de cette fonction avec le temps, due à la perte de corrélation du signal entre deux instants, donne accès aux temps caractéristiques associés à la diffusion de la lumière. Ainsi, pour des mesures faites sur un système qui est à l'équilibre thermodynamique, cet ajustement permet d'estimer les temps caractéristiques du signal mesuré et ainsi de remonter à la dynamique du système étudié. Cependant, cette méthode est mal adaptée pour estimer les temps caractéristiques des systèmes physiques hors équilibres. En effet, pour de tels systèmes, du fait de leur évolution temporelle naturelle, les signaux issus des expériences de diffusion dynamique de la lumière sont intrinsèquement non-stationnaires (*i.e.* la valeur moyenne temporelle du signal diffusé évolue au cours du temps). Le caractère non-stationnaire du signal vient perturber la construction de sa fonction d'autocorrélation, ce qui en gêne l'analyse et réduit, en pratique, la fenêtre des temps que l'on peut sonder.<sup>4</sup> En conséquence, cette méthode ne va pas être adaptée à l'analyse de nos signaux. À cet égard, dans la thèse de Michaël Suissa [1–4], un ajustement paramétrique de la fonction d'autocorrélation avec le carré de la somme d'une exponentielle étirée et d'une exponentielle simple n'a permis de sonder que deux processus ayant des temps caractéristiques bien distincts.

---

<sup>4</sup> L'ajustement paramétrique de la fonction d'autocorrélation du signal mesuré suppose la stationnarité du signal.

Les signaux non-stationnaires peuvent être étudiés par une autre méthode s'appuyant sur l'analyse de Fourier. Cette méthode, bien connue dans le cadre stationnaire car elle est spécialement adaptée à la description de ces signaux [16], a été élargie au cadre non stationnaire grâce aux approches dites temps-fréquence [17]. Dans le cas stationnaire, cela consiste en l'analyse spectrale (*i.e.* une analyse en fréquence) de la fonction d'autocorrélation du signal de l'intensité lumineuse diffusée ; la fonction d'autocorrélation d'un tel signal stationnaire étant indépendante du temps, son analyse spectrale a une très haute résolution en fréquence. Mais dans le cas d'un signal non-stationnaire, l'analyse spectrale devient dépendante du temps et utilise localement la transformation de Fourier de la fonction d'autocorrélation dépendante du temps. Ces méthodes considèrent qu'une situation non stationnaire correspond à une juxtaposition de situations quasi-stationnaires et que l'on peut faire l'analyse de Fourier sur des fenêtres locales de temps, par exemple glissantes. Mais le champ d'applications de telles méthodes se trouve limité quant on cherche à analyser sur une large gamme d'échelle de temps, car la résolution intrinsèque de la méthode temps-fréquence est bonne en quand on regarde en fréquence, mais inadaptée (et trop basse) quand on cherche à séparer des temps de corrélation. En effet, la transformé de Fourier est mal adaptée aux signaux pour lesquels on cherche à analyser des corrélations qui décroissent exponentiellement vite plutôt que des fréquences caractéristiques. Donc les méthodes existantes sont peu adaptés pour l'analyse de signaux non-stationnaires ayant une large gamme d'échelles de temps de décorrélation ; donc typiquement les signaux que nous obtenons avec notre expérience. Nous avons donc cherché une approche spécifique pour pouvoir les analyser.

### 4.2.3. Méthode développée pour analyser nos signaux.

#### 4.2.3.1. Principes généraux.

La méthode que nous avons finalement mis au point est basée sur l'analyse non paramétrique des fonctions d'autocorrélation non-stationnaires, pour éviter de prédéfinir un modèle *a priori*, ou un nombre fixé de temps caractéristique de corrélation à trouver. Pour cela, on va chercher les temps de corrélation grâce à une méthode qui les décrit dans le domaine de Laplace.

Une fonction d'autocorrélation non-stationnaire est la fonction d'autocorrélation d'un signal non-stationnaire, qui, en plus du paramètre de retard  $\tau$  qui est sondé, dépend du temps  $t$  auquel on la mesure et aussi de la fenêtre temporelle  $T_0$  sur laquelle on analyse le signal. Ces fonctions d'autocorrélation sont de la forme :  $\hat{C}_x(\tau, t, T_0)$  et, la description que l'on veut en faire est donnée par :

$$\hat{C}_x(\tau, t, T_0) = \int \hat{g}(s, t, T_0) e^{-\tau/s} ds \quad (1)$$

où  $\hat{g}$  est la transformée de Laplace inverse régularisée et  $s$  le paramètre inverse de Laplace (soit les temps caractéristiques que l'on souhaite estimer).

La méthode proposée pour l'ajustement non paramétrique de la fonction  $\hat{g}$  s'appuie sur une approche de type problème inverse régularisé. Cette approche sera dite « CONTIN », car un algorithme générique portant ce nom fut proposé et développée par Provencher en 1982 [18,19], pour résoudre les problèmes d'analyse des données de diffusion dynamique de la lumière qui seraient issues d'expériences ayant des imperfections de détection, ou des « imperfections » du système étudié [18]. Cette approche est basée sur le fait que la transformée de Laplace est mieux adaptée à l'analyse de signaux issus de processus de relaxation, comme dans notre cas, que la transformée de Fourier. L'algorithme de cette approche est détaillé au-dessous. Mais, cet algorithme n'est pas appliqué à l'ensemble du signal mesuré en bloc. En effet, et c'est là que réside

l'originalité de notre approche, on décompose le signal de l'intensité lumineuse diffusée mesuré sur 10 minutes en tranches de signaux dont la durée qui va dépendre de la gamme d'échelles de temps que l'on souhaite analyser. Pour chacune de ces tranches on crée la fonction d'autocorrélation, l'algorithme étant ensuite appliqué à chacune de ces fonctions d'autocorrélation. Cette décomposition en tranches permet de rendre compte du caractère non stationnaire des signaux en nous permettant de suivre l'évolution des temps caractéristiques en fonction du temps et, elle est nécessaire pour que l'on puisse sonder la dynamique du noyau sur toutes les échelles de temps sur lesquelles ils s'étendent et ainsi élargir la fenêtre des temps caractéristiques sondés par rapport aux travaux pionniers de Michaël Suissa.

#### 4.2.3.2. Décomposition des signaux.

Pour toutes nos expériences, nous appliquons la même procédure pour analyser nos signaux. Dans une première étape, pour un même signal brut mesuré sur 10 minutes nous faisons deux décompositions en tranches différentes :

- i) Tout s'abord une première décomposition pour analyser des modes rapides (c'est-à-dire pour sonder les temps caractéristiques inférieurs à la seconde). Dans ce cas là, on décompose le signal brut total en tranches de signaux de 1 minute (Figure 4.4), Ce choix de 1 minute a été fait après avoir procédé à plusieurs tests, réalisés sur des tranches de durées différentes : 15, 30, 60, 120 et 180 secondes. Ainsi, nous avons pu remarquer que la décomposition du signal en tranches de durées inférieures à la minute (15 et 30 secondes) augmentait le « bruit » autour des temps rapides et la décomposition du signal en tranches de durées supérieures à la minute (2 et 3 minutes) dissimulait (du fait de la non stationnarité du signal) certains aspects des temps rapides. Il nous a donc semblé que le choix de tranches de durée de 1 minute était un bon compromis, car il réduisait le « bruit » tout en ne masquant pas trop les informations sur certains temps rapides. Un recouvrement de 50 % entre chaque tranche et la tranche adjacente suivante est utilisé pour éviter les problèmes liés aux effets de bords (*i.e.* perdre de l'information au début et à la fin de chaque tranche). Ainsi, le signal de chaque tranche (à l'exception de la première et la dernière tranche) est un mélange de 50 % du signal de la tranche  $i$  et 50 % du signal de la tranche  $i+1$ . Au total, pour analyser les modes rapides contenus dans un signal de 10 minutes, nous avons 18 tranches.
- ii) Puis, une décomposition pour analyser les modes plus lents (*i.e.* pour sonder les temps caractéristiques supérieurs à 0,1 s). Dans ce cas là, nous avons décidé de décomposer le signal brut total en tranches de signaux de 5 minutes. Mais, avant toute chose nous avons d'abord agrégé les signaux pour descendre à une fréquence d'échantillonnage « effective » de  $10^2$  Hz (voir § 4.1.3), ceci afin de réduire le nombre de points. Il est à noter que comme, ici, nous voulons sonder les temps plus lents que 0,1 s, ce temps de comptage « effectif » de  $10^{-2}$  s ne nous pose strictement aucun problème. De manière identique à ce qui a été fait pour les modes rapides, le choix de sonder des tranches de signaux d'une durée de 5 minutes a été pris après plusieurs tests réalisés sur des durées différentes de : 3, 4, 5, 6, 8 et 10 minutes. Nous avons remarqué que la décomposition du signal en tranches de durées inférieures à 5 minutes (3 et 4 minutes) augmentait sensiblement le bruit autour des temps lents alors que la décomposition du signal en tranches de durées supérieures à 5 minutes (6, 8 et 10 minutes) dissimulait une partie de l'information sur certains de ces temps lents. Là encore, nous prenons un recouvrement de 50 % entre chaque tranche et la tranche adjacente suivante. Au total, pour analyser les modes rapides contenus dans un signal de 10 minutes, nous avons 3 tranches.

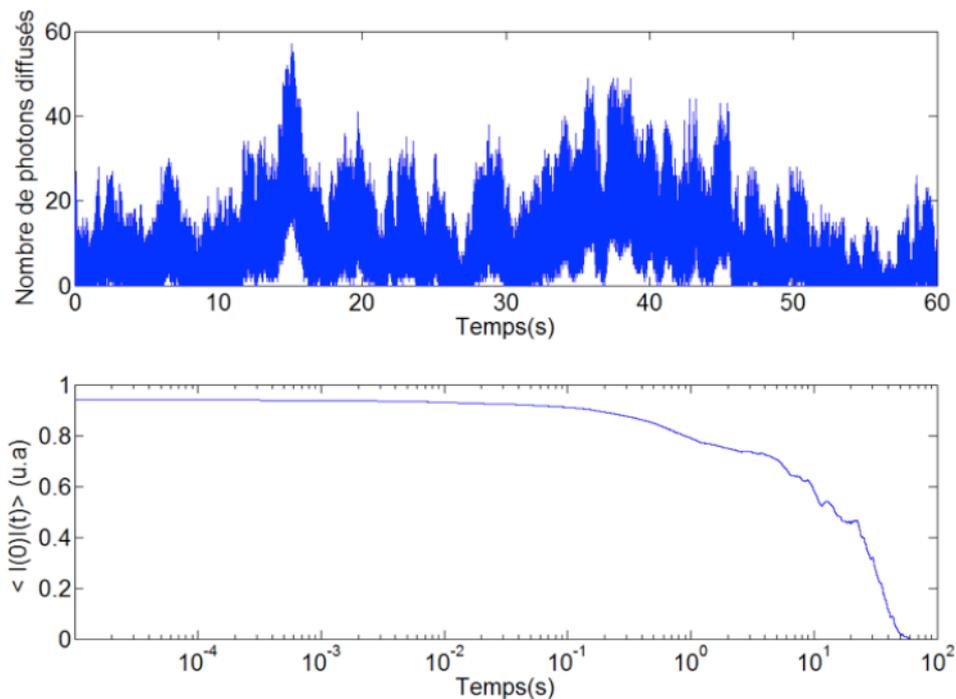
Après la décomposition du signal brut en tranches de signaux de 1 ou 5 minutes, nous calculons les fonctions d'autocorrélation de chacune de ces tranches en utilisant la fonction « xcorr » de MatLab. En pratique, pour une variable aléatoire  $x$ , la fonction « xcorr » calcule d'abord une matrice de taille  $N$  :  $\hat{R}_x(m)$ , qui contient les valeurs de la fonction d'autocorrélation, à partir de l'équation suivante :

$$\hat{R}_x(m) = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-m-1} x(n)x(n+m) \tag{2}$$

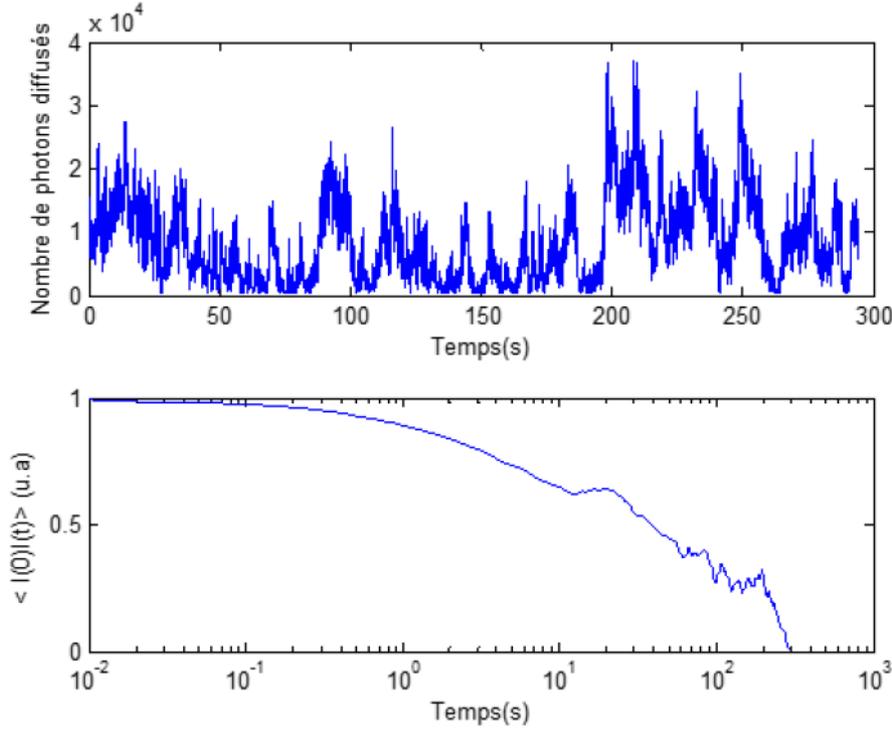
Puis, la fonction d'autocorrélation de la variable aléatoire  $x$  est obtenue après la normalisation de  $\hat{R}_x(m)$ . Ainsi, la fonction d'autocorrélation du signal de l'intensité lumineuse diffusée sur une tranche est donnée par la relation :

$$\hat{C}_x(m) = \frac{\hat{R}_x(m)}{\hat{R}_x(0)} \tag{3}$$

Figures 4.4 et 4.5, nous illustrons notre démarche en présentant la décomposition en tranches d'un signal de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule SHEP en phase G1. Figure 4.4, nous montrons une tranche de 1 minute de ce signal avec un temps de comptage de  $10^{-5}$  s sur une minute. Juste en dessous, nous montrons la fonction d'autocorrélation du signal obtenue pour cette tranche, pour des temps de décalage allant de  $10^{-5}$  s à 60 s par pas de  $10^{-5}$  s (ce qui fait  $6 \cdot 10^6$  points). Figure 4.5, nous montrons une tranche de 5 minutes pour le même signal, mais ici le signal brut a été agrégé pour avoir une fréquence d'acquisition « effective » de  $10^2$  Hz. Là encore, juste en dessous, nous avons la fonction d'autocorrélation du signal associée à cette tranche, pour des temps de décalage allant de  $10^{-2}$  s à 300 s par pas de  $10^{-2}$  s (soit  $3 \cdot 10^4$  points).



**Figure 4.4.** Décomposition du signal de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 : tranche de 1 minute du signal mesuré avec une fréquence d'échantillonnage de  $10^5$  Hz, en dessous, la fonction d'autocorrélation associée à cette tranche.



**Figure 4.5.** Décomposition du signal de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 : tranche de 5 minutes, « mesuré » avec une fréquence d'échantillonnage de  $10^2$  Hz, en dessous la fonction d'autocorrélation associée à cette tranche.

#### 4.2.3.3. Algorithme « CONTIN ».

Une fois les fonctions d'autocorrélation obtenues pour l'ensemble des différentes tranches du signal mesuré, la seconde étape de notre processus d'analyse des données consiste à chercher les temps caractéristiques contenues dans ces fonctions d'autocorrélation grâce à un ajustement non paramétrique basée sur la méthode CONTIN. Cette méthode a été initialement développée par Provencher [18,19]. Les articles originaux de Provencher décrivent comment formuler l'ajustement d'une fonction d'autocorrélation par la transformée de Laplace d'une densité de temps caractéristiques  $g(\tau)$ . Comme les mesures sont potentiellement imparfaites, avec du bruit de mesure et peut-être une adéquation limitée du modèle en exponentiel décroissant supposé par la transformée de Laplace, cet ajustement va se faire par l'intermédiaire de la résolution d'un problème inverse quadratique, régularisé pour promouvoir une solution à variation lente (et donc plutôt parcimonieuse, ou économe, en terme de nombre de pics estimés dans le spectre de Laplace). Plus précisément, la régularisation se fait en ajoutant la norme quadratique de la dérivée seconde au critère à minimiser (avec un paramètre  $\alpha$  de régularisation). Le spectre de Laplace devant être positif, on contraint de plus la solution à rester positive. Formellement, le problème inverse est alors écrit comme suit :

$$\hat{g} = \operatorname{argmin}_{g \geq 0} \left( \|LT(g) - \hat{C}\|^2 + \alpha^2 \|D^{(2)}(g)\|^2 \right) \quad (4)$$

où  $LT(g)$  est la transformée de Laplace discrétisée :

$$LT(g) = \sum_{s_{\min}}^{s_{\max}} g(s)e^{-\tau/s} \tag{5}$$

Et  $D^{(2)}$  est la différence finie d'ordre 2 qui s'exprime :

$$D^{(2)}(g(s_k)) = g(s_{k+1}) - 2g(s_k) + g(s_{k-1}) \tag{6}$$

Ce problème inverse est quadratique, mais mal conditionné, du fait de l'instabilité liée au calcul de la transformée de Laplace inverse (ILT). La solution explicite n'est donc pas utilisable. Pour le résoudre, l'algorithme CONTIN utilise des outils classiques de minimisation d'un problème quadratique contraint convexe. Dans notre cas, on fait appel à la fonction « fminsearch » de MatLab, qui implémente un algorithme du convexe pour minimiser la fonction sans calcul explicite du gradient. La contrainte de positivité est imposée par un simple seuillage au sein de la recherche de la solution. Pour cela, on prend une valeur de  $\alpha$  égale à 0.01, le choix de cette valeur résultant d'essais préliminaires et donnant un compromis correct pour la résolution des pics.

En pratique, pour estimer les temps caractéristiques contenus dans la fonction d'autocorrélation d'une tranche à l'aide de notre méthode, on ne prend pas tous les points de cette fonction car alors le temps de calcul divergerait complètement (pour rappel, il y a  $6.10^6$  points pour les fonctions d'autocorrélation des tranches de 1 minute et  $3.10^4$  points pour celles de 5 minutes). À partir de la fonction d'autocorrélation du signal mesuré que nous avons calculée dans la première étape, on crée une seconde fonction d'autocorrélation, qui est une réplique de la première, avec seulement 40 points qui sont équirépartis logarithmiquement (Figure 4.6) ; c'est cette seconde fonction qui est analysée par la méthode que nous avons décrite juste au-dessus.

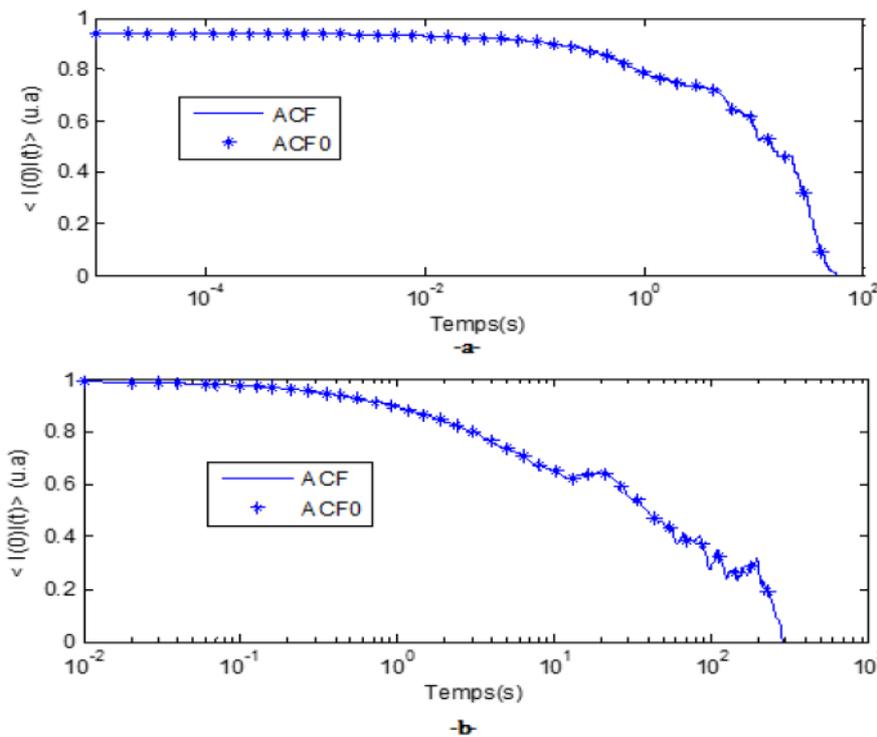


Figure 4.6. a) Superposition de la fonction d'autocorrélation montrée sur la Figure 4.4 et de sa réplique avec 40 points ; b) superposition de la fonction d'autocorrélation montrée sur la Figure 4.5 et de sa réplique avec 40 points. On remarque que dans les deux cas les répliques décrivent très bien les fonctions d'autocorrélation complètes.

Pour faire l'analyse à l'aide de l'algorithme « CONTIN », on utilise 10 points par décade de temps dans le domaine de Laplace et, on ne restreint pas le domaine de temps sondé au domaine sur lequel la fonction d'autocorrélation a un sens physique. Par exemple, pour les temps rapides, comme la fonction d'autocorrélation est calculée sur des tranches de 60 secondes, on peut estimer que pour des temps de décalage supérieurs à 4 – 5 secondes cette fonction n'a plus beaucoup de pertinence. Donc, on pourrait penser restreindre son analyse seulement à la gamme de temps « utile », soit  $10^{-5} - 3$  s, mais, en faisant cela on se rend compte que l'on estime mal les temps supérieurs à 0,1 s. En fait, si on veut estimer correctement tous les temps qui sont dans le domaine  $10^{-5} - 3$  s, alors, il faut analyser la fonction d'autocorrélation sur une gamme de temps qui va de  $10^{-5}$  à 100 s (soit avec 70 points dans le domaine de Laplace). De même, pour les temps longs, comme la fonction d'autocorrélation est calculée sur des tranches de 300 secondes, on peut estimer que pour des temps de décalage supérieurs à 30 secondes la fonction d'autocorrélation n'a plus beaucoup de pertinence, mais pour pouvoir sonder les temps sur le domaine  $10^{-2} - 30$  s, alors, il faut analyser la fonction d'autocorrélation sur une gamme de temps qui va de  $10^{-2}$  à 1000 s (soit avec 50 points dans le domaine de Laplace).

#### 4.2.3.4. Validation de l'algorithme « CONTIN ».

Avant d'appliquer cette méthode d'analyse aux signaux mesurés sur des noyaux de cellules vivantes, nous avons cherché à la valider. Pour cela, nous l'avons d'abord appliquée à un système modèle pour lequel nous savons que l'ajustement paramétrique de la fonction d'autocorrélation marche correctement. Nous pouvons ainsi comparer les deux méthodes et vérifier que notre analyse de type « CONTIN » donne des résultats qui sont corrects. Comme système modèle, nous avons repris la solution diluée de billes de latex de 220 nm de diamètre que nous avons déjà utilisée pour valider le montage expérimental (Chapitre 3 § 3.4.). Mais, cette fois, au lieu de mesurer simplement, pour chaque angle de détection, comme nous l'avons fait au chapitre 3, la fonction d'autocorrélation de l'intensité lumineuse diffusée à l'aide d'un corrélateur Brookhaven BI9000, nous mesurons directement, sur notre montage expérimental, l'intensité lumineuse diffusée par la solution, pour les quatre angles simultanément. Pour ce système, qui est un système à l'équilibre thermodynamique, le seul processus physique que nous sondons avec notre expérience est la diffusion brownienne des billes de Latex. Donc, nous devons obtenir un signal stationnaire dont le seul temps caractéristique est égal à  $1/Dq^2$ , où  $D$  est le coefficient de diffusion des billes de Latex et  $q$  le module du vecteur d'onde de diffusion.

Figures 4.7 à 4.10, nous montrons, pour les 4 angles de détection, le signal brut de l'intensité lumineuse diffusée par la solution de billes de latex mesuré sur une minute avec une fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz, la « réplique » avec 40 points de la fonction d'autocorrélation « réelle » calculée pour ce signal et son ajustement avec notre méthode d'analyse « CONTIN », le spectre des temps caractéristiques contenus dans ce signal estimé par cette méthode (*i.e.*  $g(s)$  en fonction de  $s$ ). La présentation est la même pour chacune de ces quatre figures : en haut à gauche le signal brut de l'intensité lumineuse diffusée mesuré sur 1 minute ; en haut à droite la réplique de la fonction d'autocorrélation de ce signal et son ajustement par notre méthode d'analyse (en trait plein) ; en bas à gauche le spectre  $g(s)$  en fonction de  $s$ , en échelle logarithmique ; en bas à droite la même chose, en échelle semi-logarithmique. Pour toutes les fonctions d'autocorrélation présentées, nous pouvons observer une coupure exponentielle autour de 4 s ; cette décroissance n'est pas due à un processus de relaxation lent dans la solution diluée de billes de Latex, mais, à la durée finie de la mesure du signal diffusé (ici une minute). (Figure 4.7 : signal détecté sur le compteur placé à  $11^\circ$  de l'axe du faisceau incident ; Figure 4.8 : signal détecté à  $16^\circ$  ; Figure 4.9 : signal détecté à  $27^\circ$  ; Figure 4.10 : signal détecté à  $38^\circ$ .)

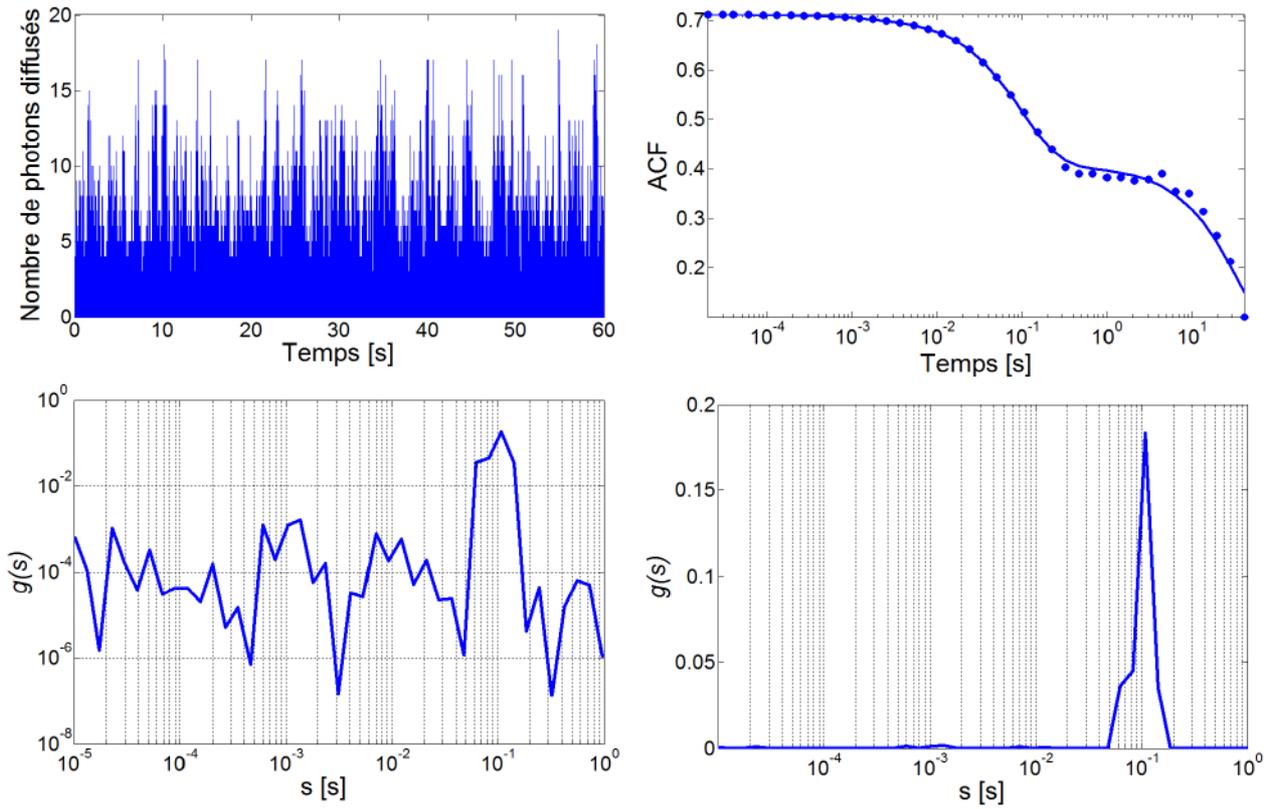


Figure 4.7. Analyse de l'intensité diffusée par la solution de billes de latex mesuré sur une minute sur le compteur placé à  $11^\circ$  de l'axe du faisceau incident.

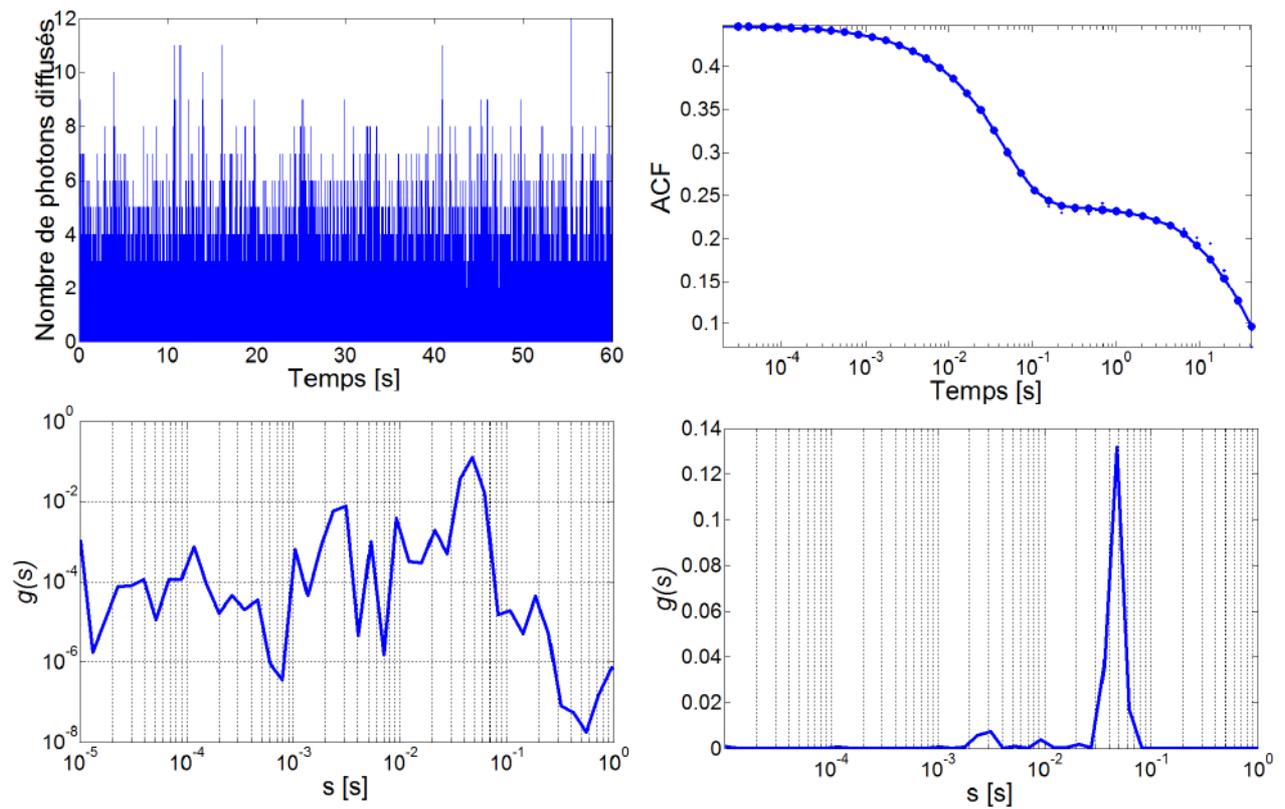


Figure 4.8. Figure similaire à la Figure 4.7, mais, ici pour le compteur placé à  $16^\circ$  de l'axe du faisceau incident.

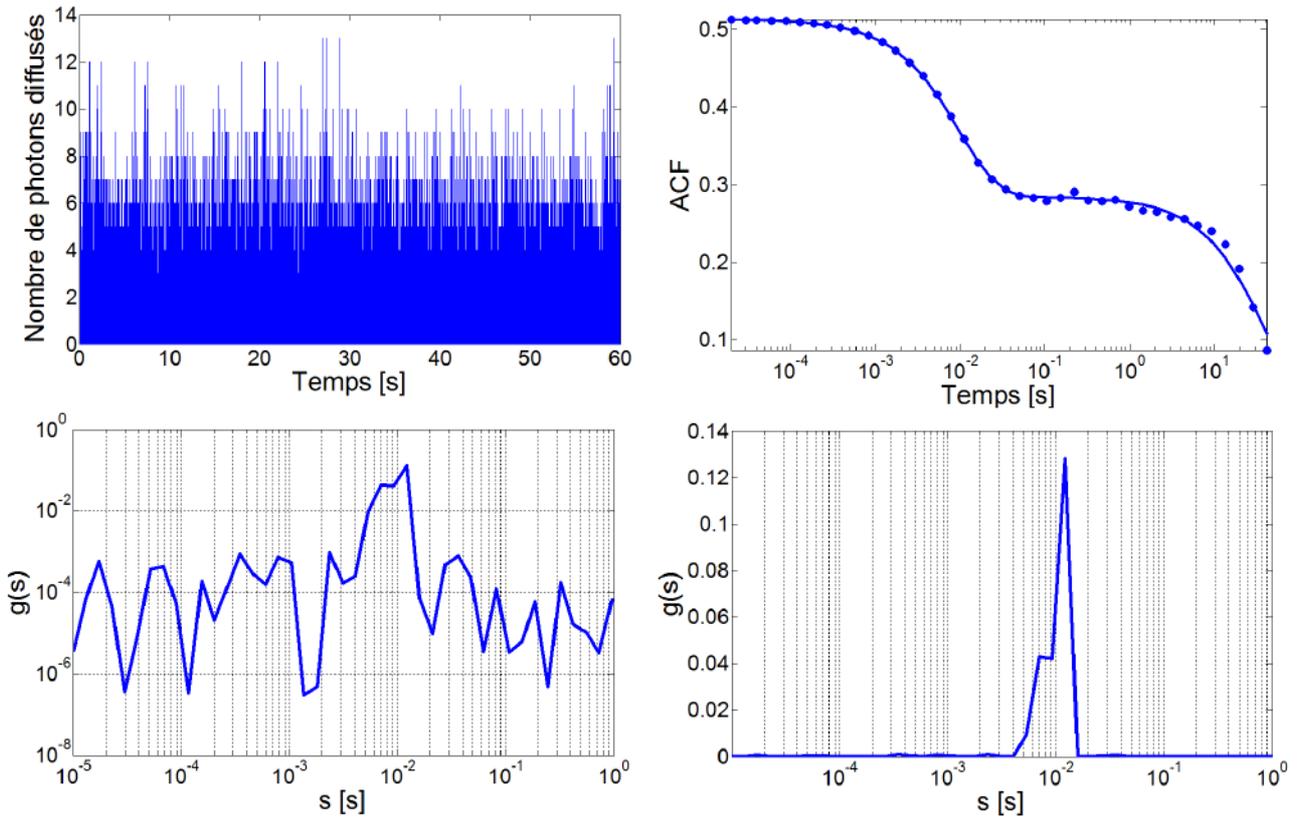


Figure 4.9. Figure similaire à la Figure 4.7, mais, ici pour le compteur placé à  $27^\circ$  de l'axe du faisceau incident.

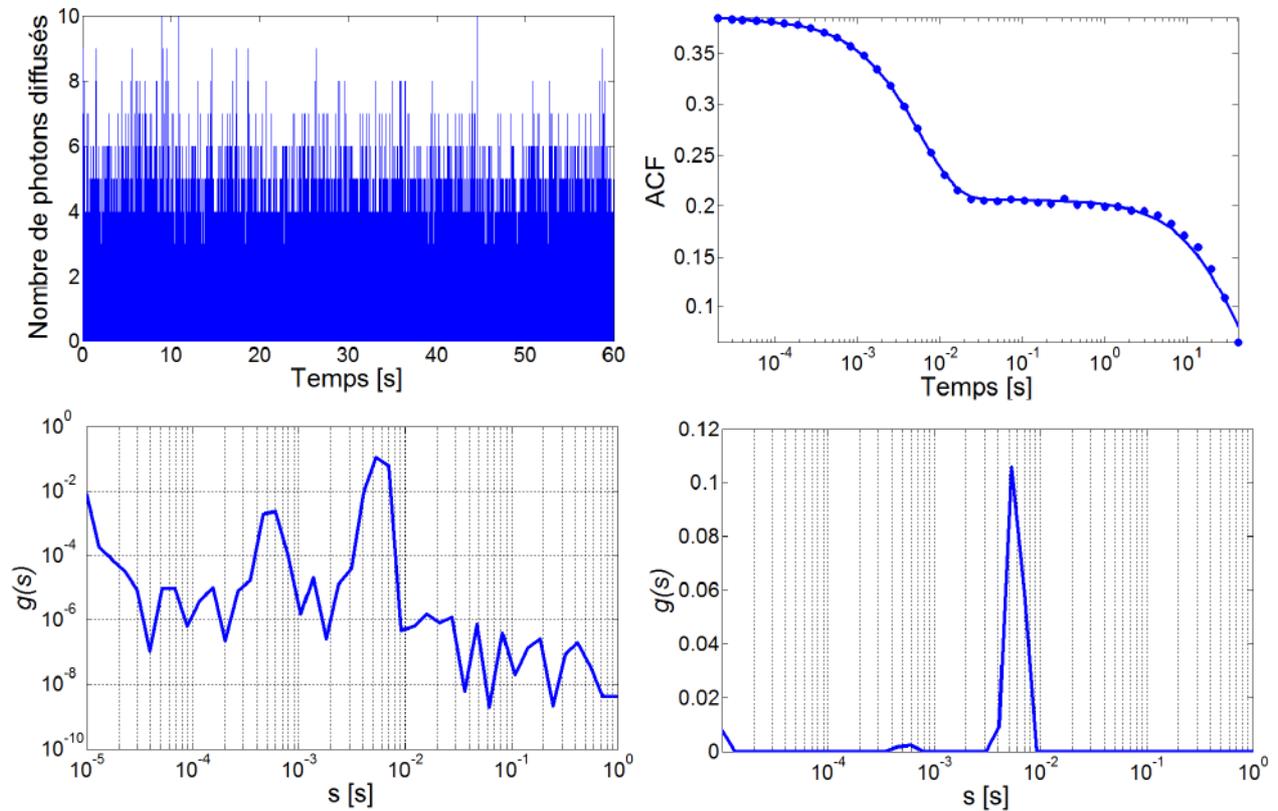
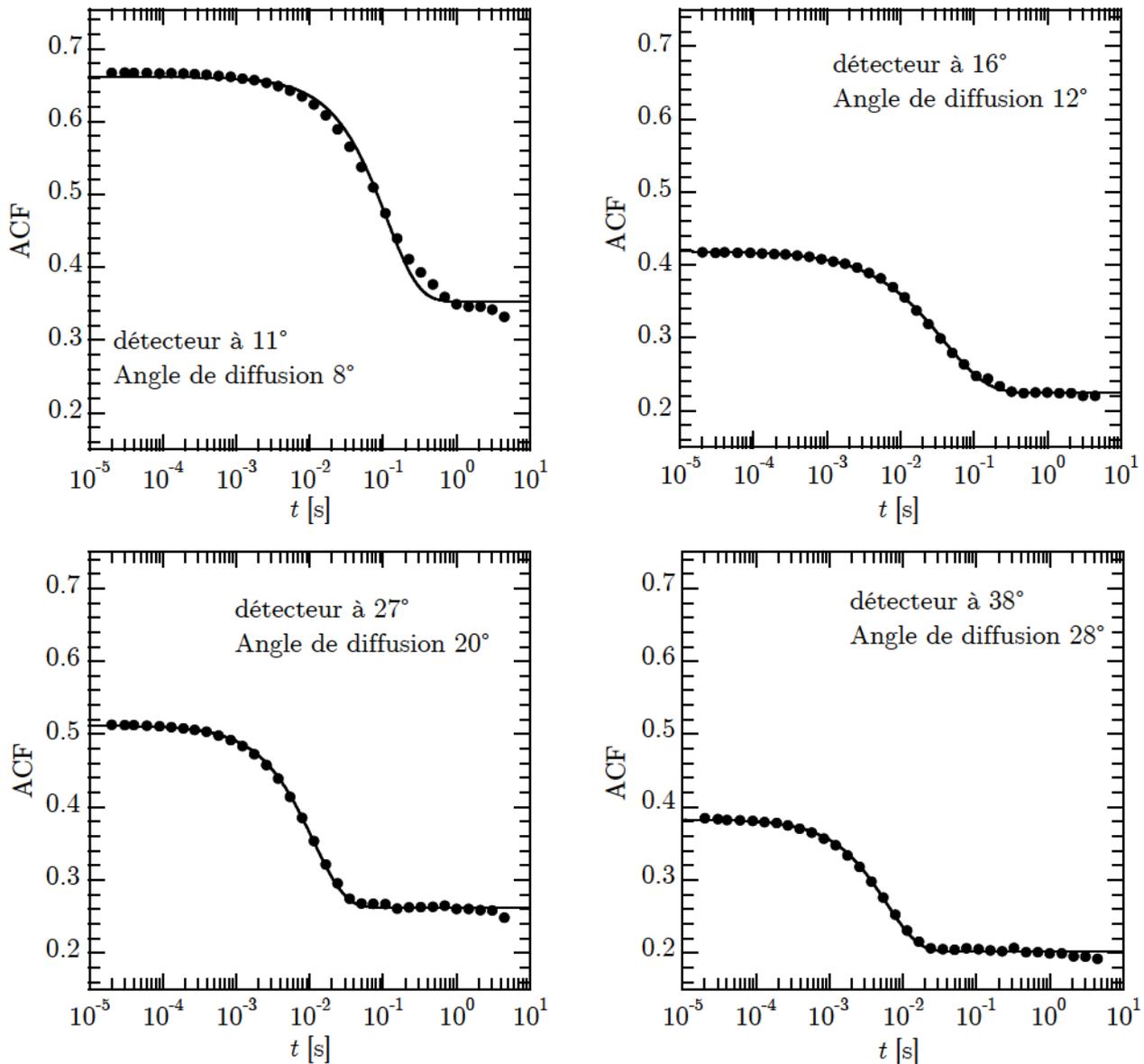


Figure 4.10. Figure similaire à la Figure 4.6, mais, ici pour le compteur placé à  $38^\circ$  de l'axe du faisceau incident.

Nous remarquons que notre méthode d'analyse permet un très bon ajustement de ces fonctions d'autocorrélation (les courbes en traits pleins) et, que les spectres obtenus présentent tous un maximum d'amplitude très marqué pour un temps bien particulier. Ceci suggère l'existence d'un processus de relaxation dominant dans le système, ce qui est en accord avec ce que l'on s'attend à avoir. On peut aussi remarquer que la position de ce maximum d'amplitude se déplace vers les temps rapides quand la valeur de l'angle augmente. La question est : est-ce que ces temps caractéristiques que l'on mesure correspondent bien à ceux de la diffusion brownienne des billes de Latex ?

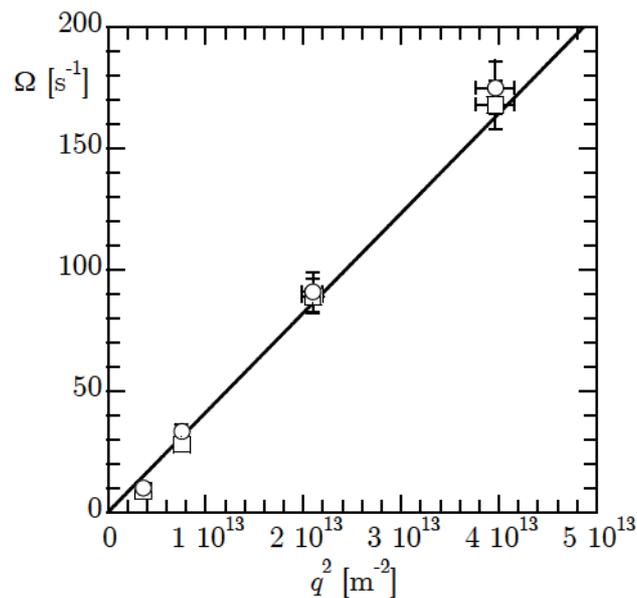


**Figure 4.11.** Fonctions d'autocorrélation « répliques » de l'intensité lumineuse diffusée par une solution très diluée de billes de Latex mesurées sur notre montage de diffusion pour les quatre angles de détection. Les courbes en traits pleins noirs sont les ajustements de ces fonctions d'autocorrélation par une fonction de la forme :  $A \exp(-\Omega t) + B$ .

Figure 4.11, nous présentons l'ajustement, par une fonction test de la forme :  $A \exp(-\Omega t) + B$ , des répliques des fonctions d'autocorrélation de l'intensité lumineuse diffusée par la solution de

billes de Latex qui ont été obtenues sur notre montage expérimental pour les quatre angles de détection (*i.e.* les fonctions à 40 points qui sont montrées dans les Figures 4.6 à 4.9). Il faut noter que nous avons « coupé » ces fonctions d'autocorrélation à 4 secondes pour ne conserver que leur partie « pertinente », c'est-à-dire la partie qui physiquement a un sens (*i.e.*  $10^{-5}$  à 4 s). On observe que pour les quatre angles, l'ajustement par une décroissance monoexponentielle est bon. Ceci est cohérent avec le maximum d'amplitude très marqué observé pour les analyses par la méthode « CONTIN ».

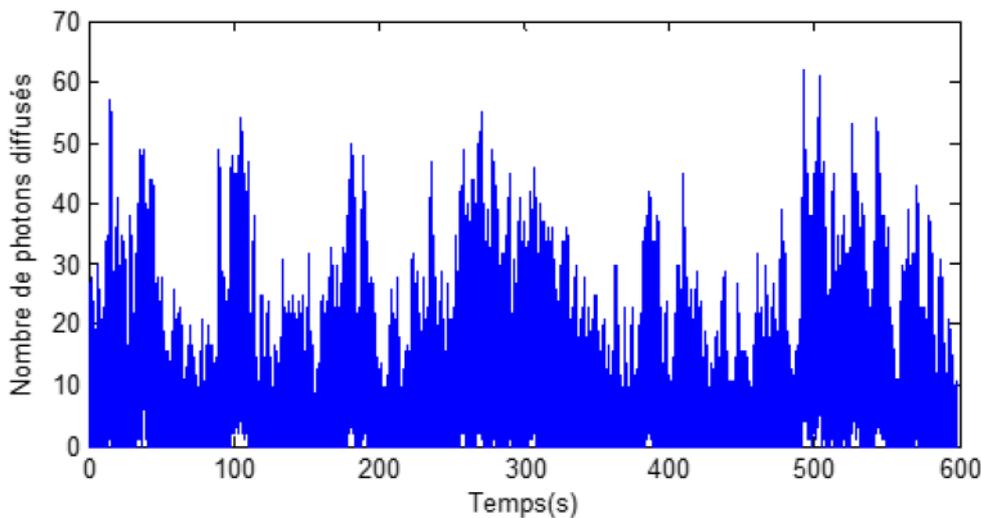
Figure 4.12 nous présentons sur le même graphe, en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion, à la fois les fréquences  $\Omega$  obtenues par l'ajustement paramétriques des fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée (*i.e.* les courbes en traits pleins Figure 4.11) et l'inverse des temps caractéristiques correspondants au maximum d'amplitude de l'analyse « CONTIN » de ces fonctions d'autocorrélation. Nous observons une coïncidence parfaite entre les deux, ce qui indique que les deux analyses donnent bien le même résultat. La variation de la fréquence caractéristique avec  $q^2$  est linéaire, ce qui indique un processus diffusif, et le coefficient directeur de cette droite vaut  $4,1 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . C'est exactement la valeur que nous avons mesurée en utilisant les fonctions d'autocorrélation obtenues grâce à la carte corrélateur Brookhaven BI9000 (*cf.* Chapitre 3 § 3.4). C'est deux fois la valeur du coefficient de diffusion des billes de latex, ce qui est normal puisque nous sommes dans le cas d'un montage homodyne. Nous pouvons donc en conclure que notre méthode d'analyse fonctionne correctement.



**Figure 4.12.** Fréquences  $\Omega$  obtenues par l'ajustement des « répliques » des fonctions d'autocorrélation de l'intensité lumineuse diffusée par une fonction de la forme :  $A \exp(-\Omega t) + B$  (carrés) et inverse des temps caractéristiques correspondants au maximum d'amplitude de l'analyse « CONTIN » de ces différentes fonctions d'autocorrélation (cercles), portées en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion. Tous les points représentés sur cette figure ont été obtenus en faisant une moyenne des résultats des analyses effectuées sur 12 mesures indépendantes ; les incertitudes sur les fréquences représentent la dispersion des mesures autour des valeurs moyennes obtenues.

### 4.3. UN EXEMPLE DE L'APPLICATION DE NOTRE METHODE A L'ANALYSE DE SIGNAUX DIFFUSES PAR LE NOYAU.

Après la validation de notre méthode d'analyse sur les signaux de diffusion de la solution de billes de Latex, nous présentons maintenant un exemple de l'application de cette méthode à l'analyse des signaux diffusés par le noyau d'une cellule vivante. Nous partons d'un signal de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule SHEP en phase G1, enregistré à la fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz, pendant une durée de 600 secondes, sur le détecteur placé à  $38^\circ$  du faisceau incident (Figure 4.13). Dans la première partie, nous montrons l'analyse des modes rapides de la dynamique du noyau, puis, dans une seconde partie, nous présentons l'analyse des modes lents de la dynamique interne du noyau (sur le même signal).



**Figure 4.13.** Nombre de photons diffusés par le noyau d'une cellule SHEP en phase G1, détectés par le détecteur placé à  $38^\circ$  du faisceau incident, en fonction du temps pour une durée de l'acquisition 600 s ; fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz.

#### 4.3.1. Résultats pour l'analyse des modes rapides de la dynamique interne du noyau.

Nous appliquons notre première procédure pour obtenir les temps rapides telle que nous l'avons décrite au § 4.2.3. Nous décomposons le signal en 18 tranches d'une minute, avec un recouvrement de 50% entre les tranches et, pour chacune de ces tranches, nous calculons la fonction d'autocorrélation du signal, puis leur « répliques » avec 40 points, avant d'appliquer notre algorithme « CONTIN » sur le domaine temporel  $10^{-5} - 100$  s, avec 10 points par décade.

Figures 4.14 à 4.17, nous montrons, pour 4 tranches d'une minute (la 4<sup>ème</sup>, la 5<sup>ème</sup>, la 9<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup>), le signal brut de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau mesuré avec une fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz, la « réplique » avec 40 points de la fonction d'autocorrélation « réelle » calculée pour ce signal et son ajustement avec notre méthode d'analyse « CONTIN », le spectre des temps caractéristiques contenus dans ce signal estimé par cette méthode (*i.e.*  $g(s)$  en fonction de  $s$ ). La présentation est la même pour chacune de ces quatre figures : en haut à gauche le signal brut de l'intensité lumineuse diffusée ; en haut à droite la réplique de la fonction d'autocorrélation de ce signal et son ajustement par notre méthode d'analyse (en trait plein) ; en bas à gauche le spectre  $g(s)$  en fonction de  $s$ , en échelle logarithmique ; en bas à droite la même chose, en échelle semi-logarithmique.

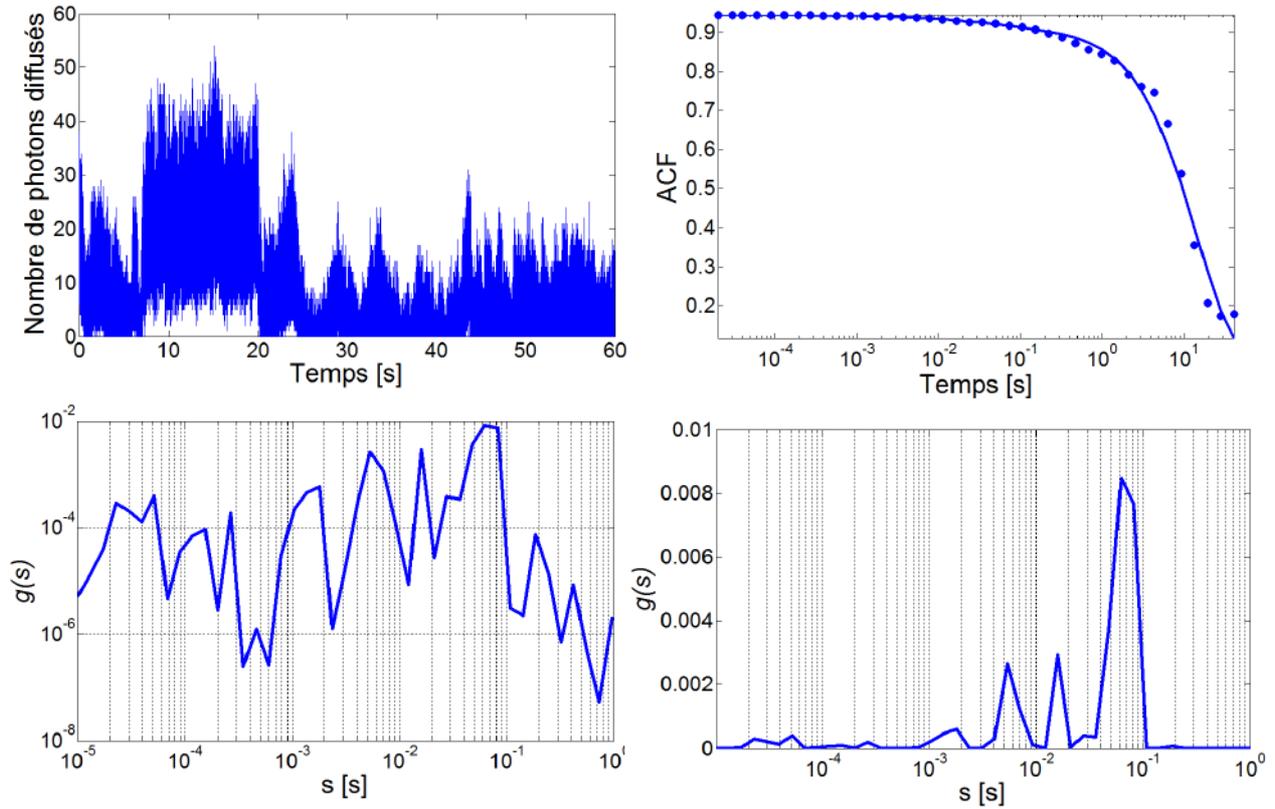


Figure 4.14. Analyse du signal de l'intensité diffusée par le noyau pendant la tranche n°4 de la décomposition en tranches pour les temps rapides du signal présenté à la Figure 4.13.

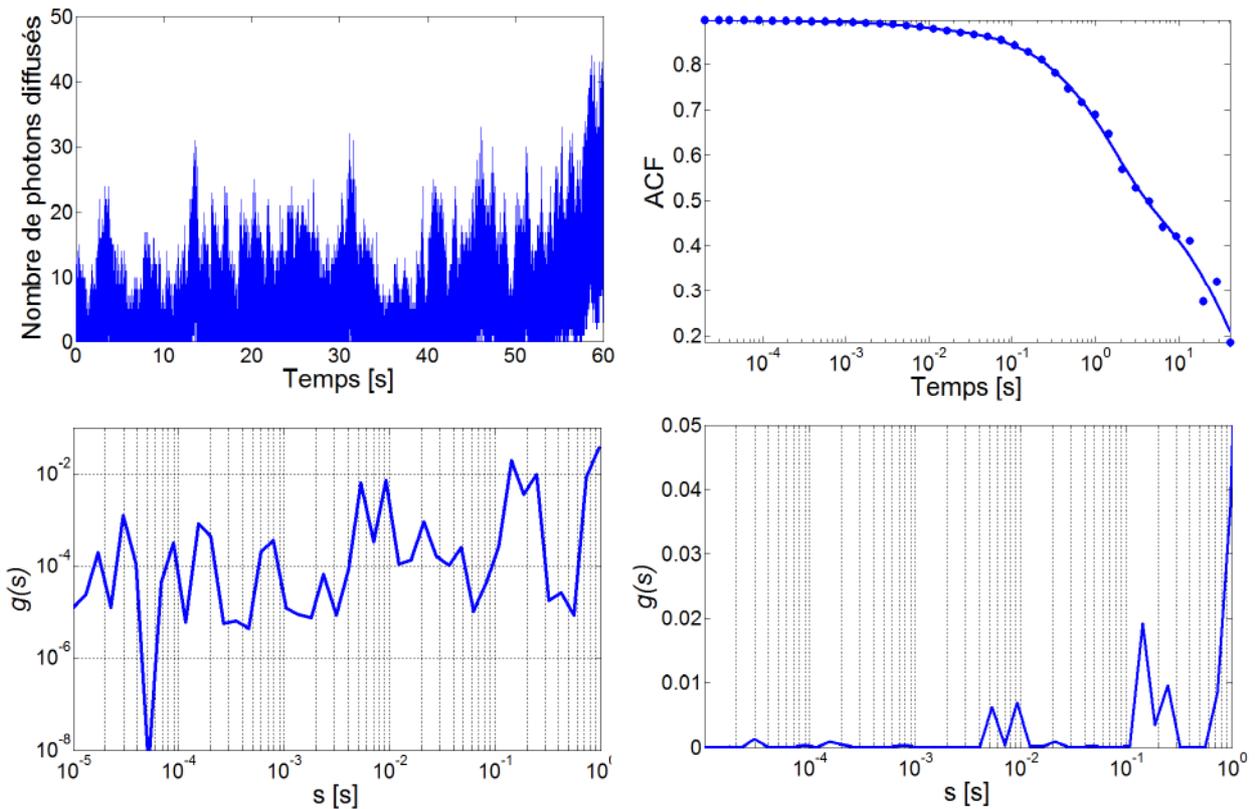


Figure 4.15. Idem à la Figure 4.14 pour la tranche n°5.

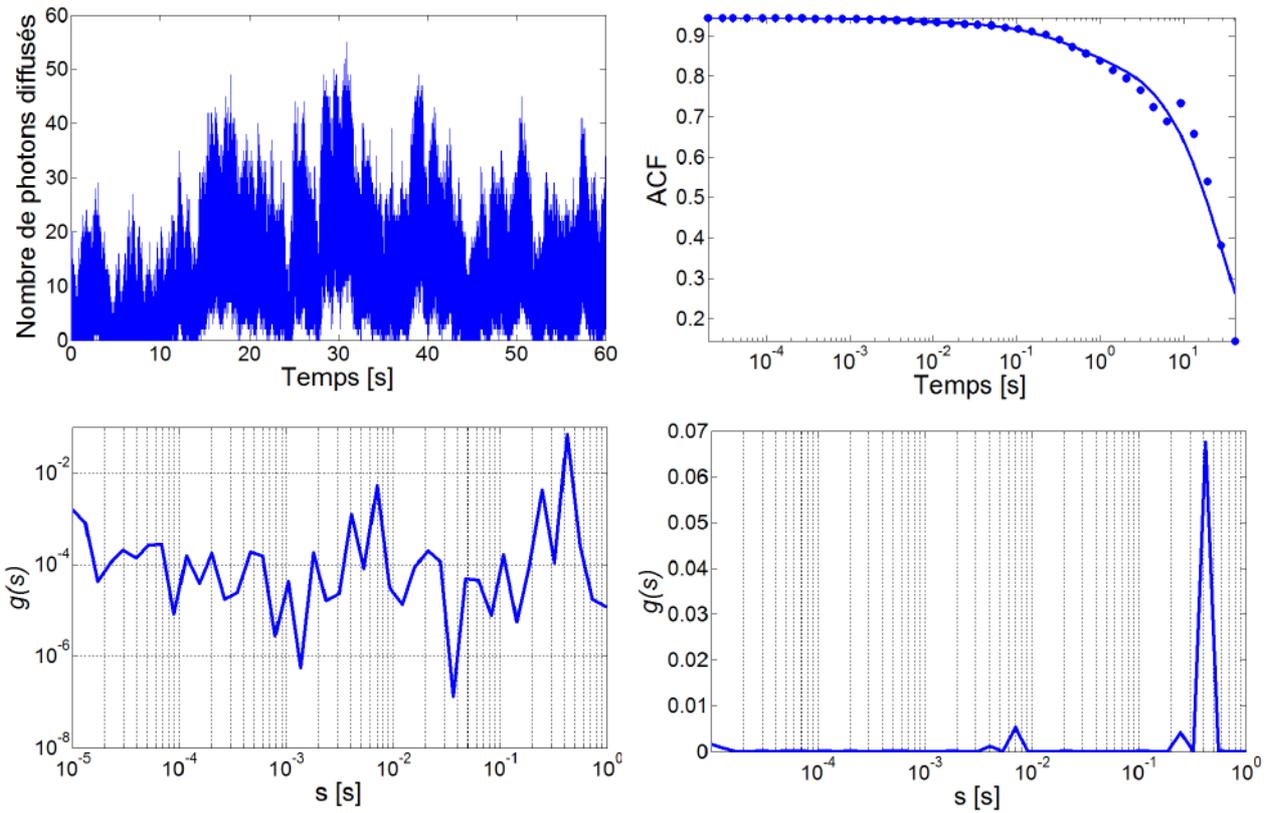


Figure 4.16. Idem à la Figure 4.14 pour la tranche n°9.

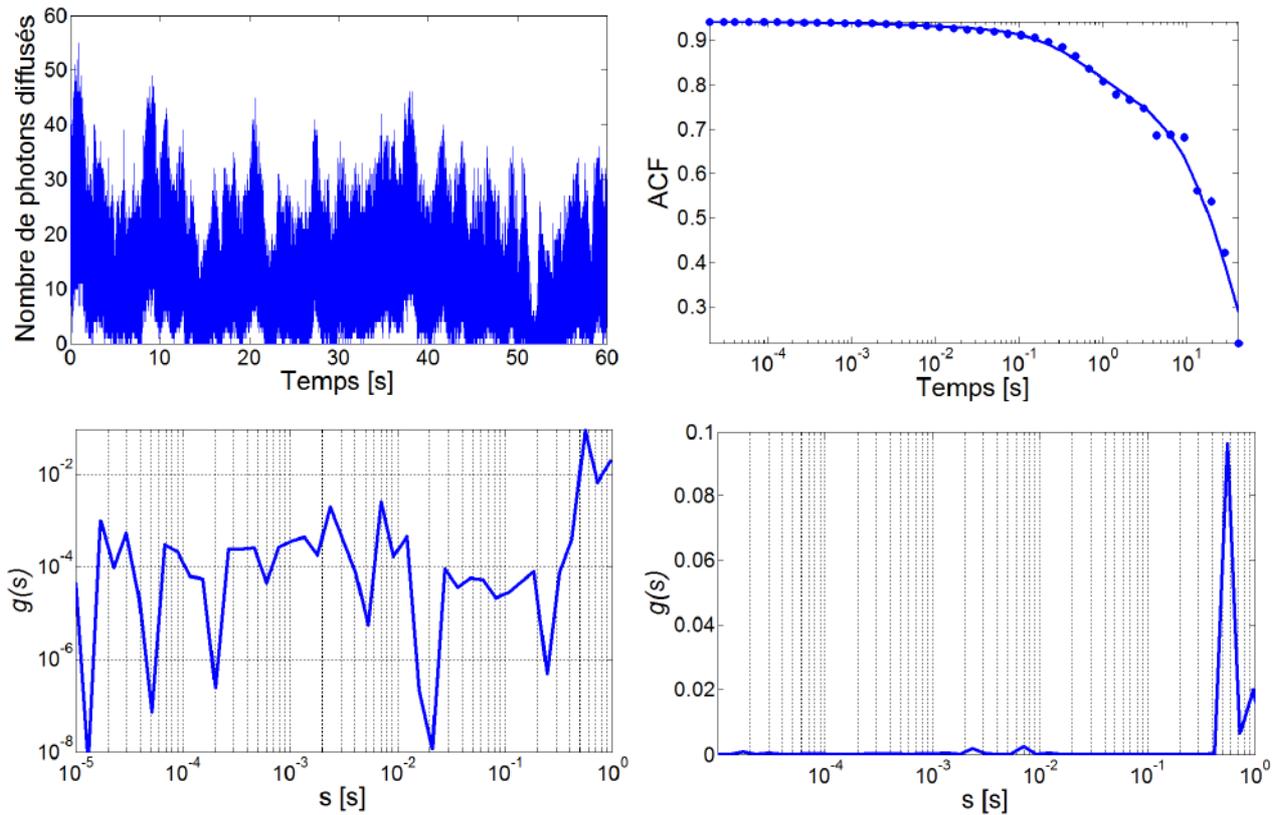
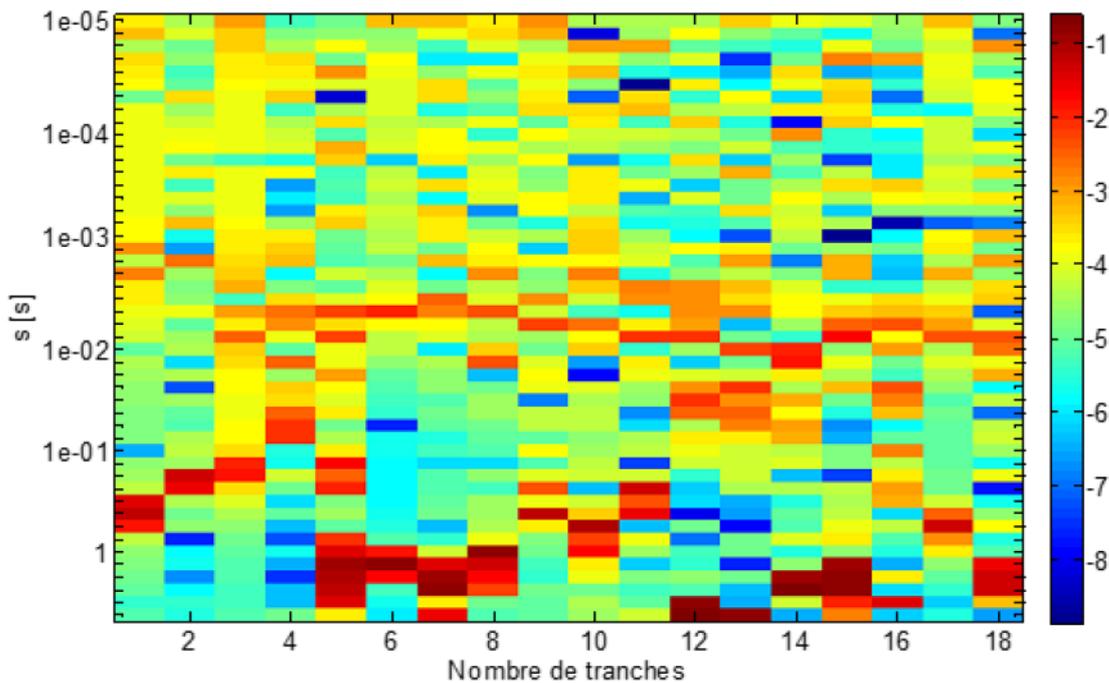


Figure 4.17. Idem à la Figure 4.14 pour la tranche n°10.

Nous remarquons que notre méthode d'analyse permet un très bon ajustement des fonctions d'autocorrélation (les courbes en traits pleins). Nous ne considérons que les temps caractéristiques inférieurs à 3 s, car pour les temps plus lents, l'estimation est biaisée par la durée de la tranche. Nous pouvons remarquer que les spectres obtenus sont très différents d'une tranche à l'autre, même pour des tranches successives qui ont un recouvrement de 50%. Même si il y a toujours un temps caractéristique qui domine (jamais le même), on observe une dynamique à toutes les échelles de temps sur la gamme :  $10^{-5} - 1$  s.

Une manière de faire une première analyse qualitative du degré de variation de nos signaux en fonction du temps est de faire une représentation des résultats obtenus sur ce signal sous la forme d'une « carte » à deux dimensions (Figure 4.18) qui, pour chaque tranche d'une minute, représente les amplitudes associées aux différents temps du domaine de Laplace. Cette carte n'est rien d'autre que la matrice contenant les valeurs de  $g(s)$  pour toutes les tranches. Sur cette image, à chaque élément de la matrice des amplitudes correspond une surface rectangulaire sur la carte ; la valeur de chaque élément de cette matrice (l'amplitude) est figurée par un code couleur, où le bleu représente la valeur minimale de l'amplitude et, le rouge représente sa valeur maximale. Cette carte permet de visualiser immédiatement les variations temporelles de la dynamique rapide du noyau d'une cellule vivante et son hétérogénéité dynamique.



**Figure 4.18.** « Carte » des amplitudes associées aux différents temps du domaine de Laplace pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes mesuré sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G1.

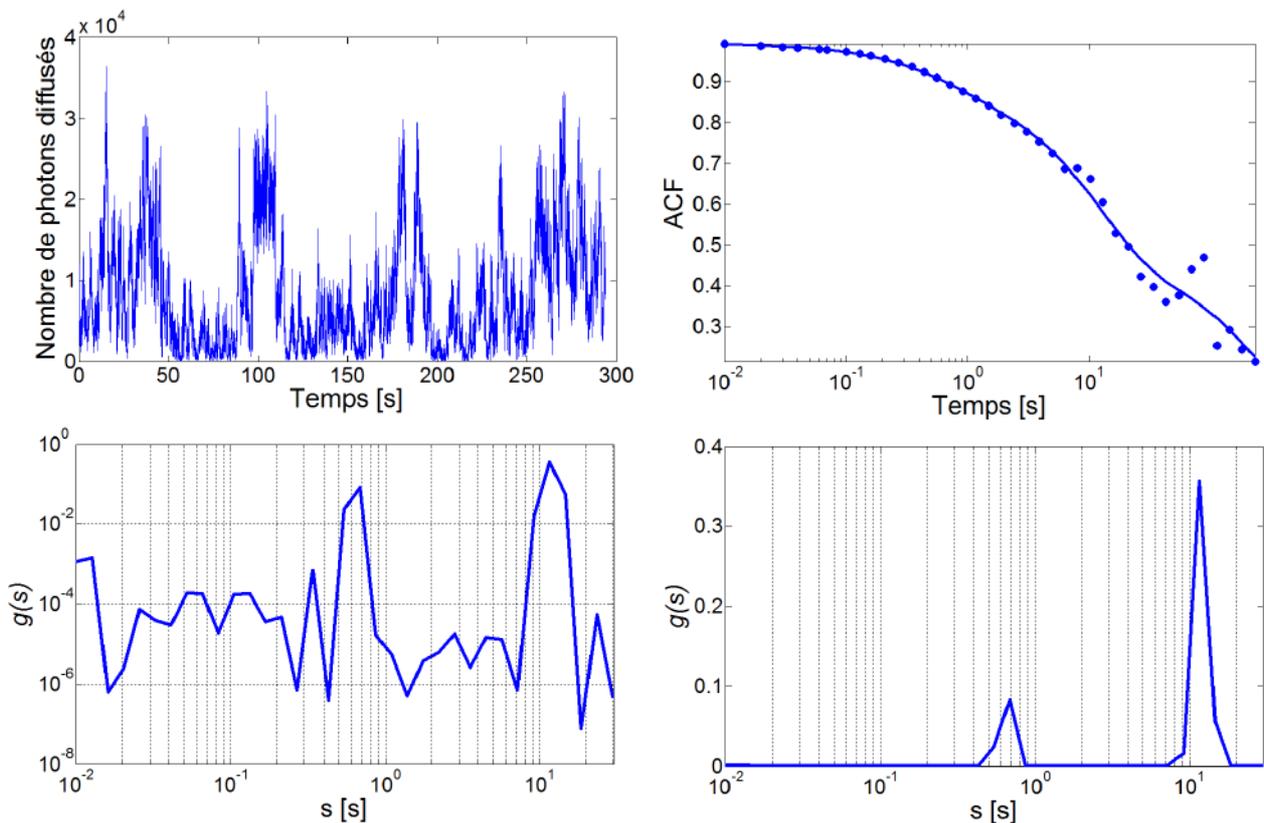
#### 4.3.2. Résultats pour l'analyse des modes lents de la dynamique interne du noyau.

Nous appliquons la seconde procédure, telle que nous l'avons décrite au § 4.2.3, pour obtenir maintenant les temps lents. Nous commençons par agréger le signal pour nous ramener à une fréquence d'échantillonnage effective de  $10^2$  Hz, puis nous décomposons le signal en 3 tranches de 5 minute, avec un recouvrement de 50% entre les tranches et, pour chacune de ces tranches, nous calculons la fonction d'autocorrélation du signal, puis leur « répliques » avec 40 points, avant

d'appliquer notre algorithme « CONTIN » sur le domaine temporel  $10^{-2} - 1000$  s, avec 10 points par décade.

Figures 4.19 à 4.21, nous montrons, pour les 3 tranches, le signal brut de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau mesuré avec une fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz, la « réplique » avec 40 points de la fonction d'autocorrélation « réelle » calculée pour ce signal et son ajustement avec notre méthode d'analyse « CONTIN », le spectre des temps caractéristiques contenus dans ce signal estimé par cette méthode (*i.e.*  $g(s)$  en fonction de  $s$ ). La présentation est la même pour chacune de ces quatre figures : en haut à gauche le signal brut de l'intensité lumineuse diffusée ; en haut à droite la réplique de la fonction d'autocorrélation de ce signal et son ajustement par notre méthode d'analyse (en trait plein) ; en bas à gauche le spectre  $g(s)$  en fonction de  $s$ , en échelle logarithmique ; en bas à droite la même chose, en échelle semi-logarithmique.

Là encore, nous voyons que notre méthode d'analyse permet un très bon ajustement des fonctions d'autocorrélation (les courbes en traits pleins). Nous ne considérons que les temps caractéristiques inférieurs à 30 s, car pour les temps plus lents que ça, l'estimation est biaisée par la durée de la tranche. Comme pour les temps rapides, nous observons que les spectres obtenus sont très différents d'une tranche à l'autre.



**Figure 4.19.** Analyse du signal de l'intensité diffusée par le noyau pendant la tranche n°1 de la décomposition en tranches pour les temps lents du signal présenté à la Figure 4.13.

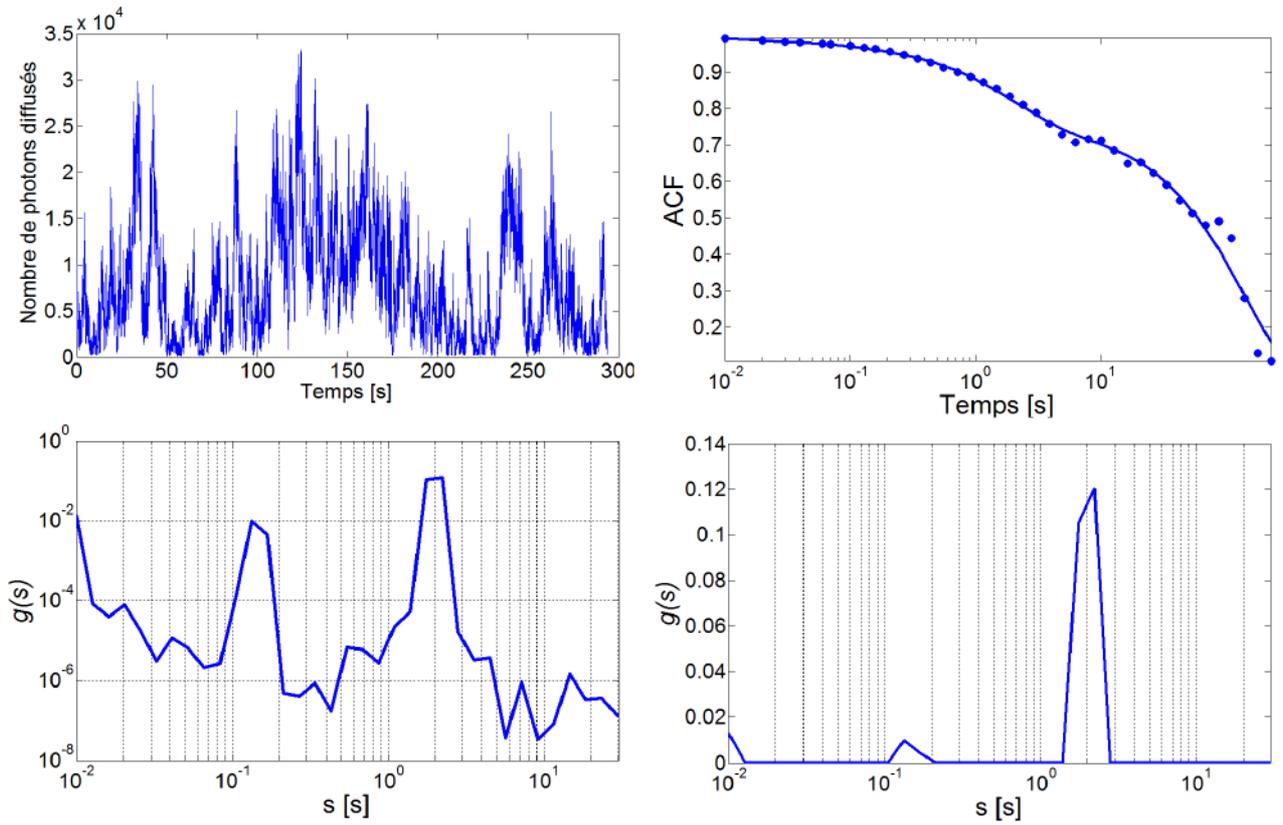


Figure 4.20. Idem à la Figure 4.19 ; tranche n°2.

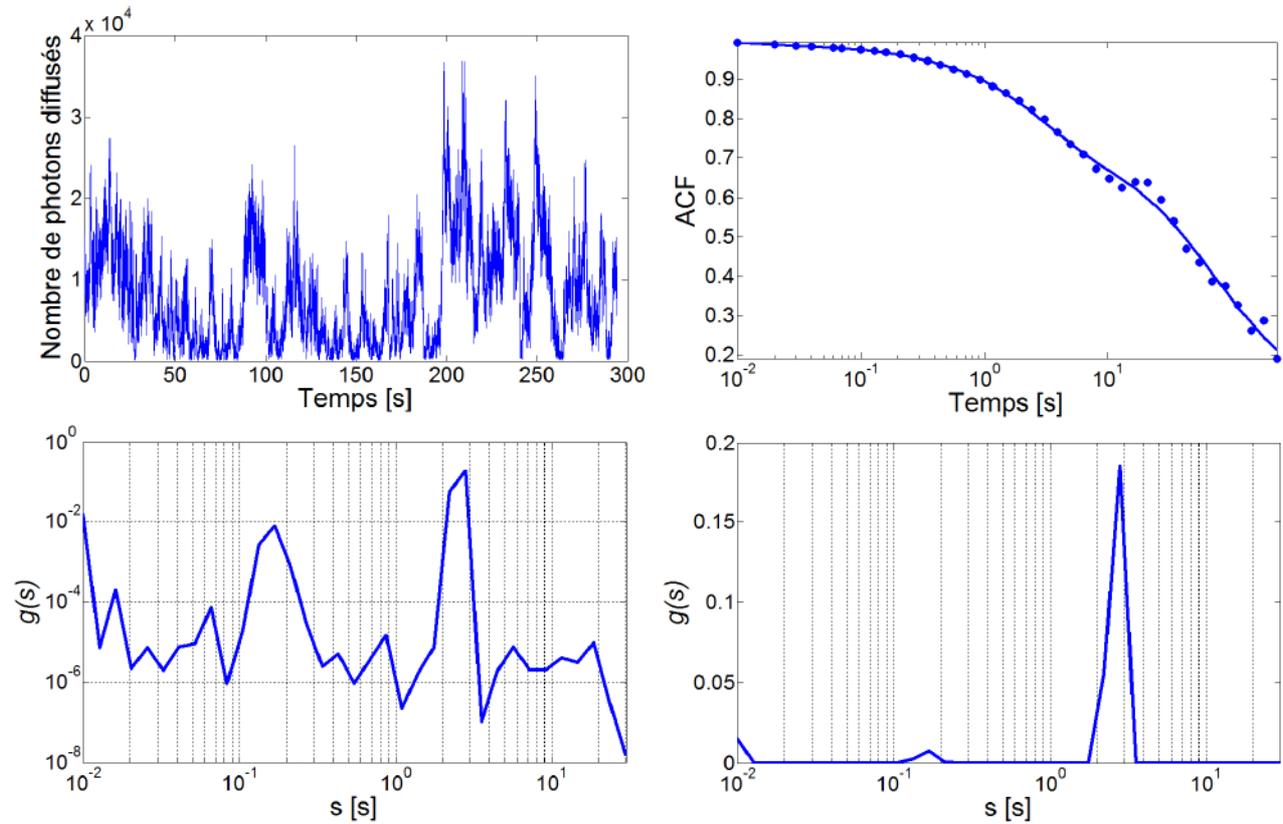
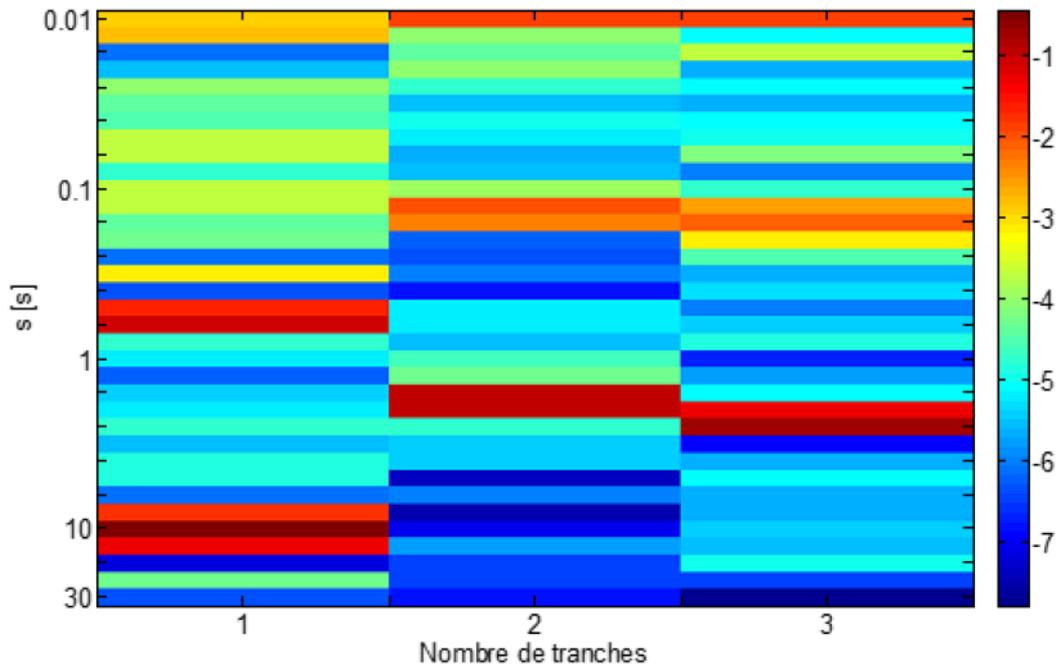


Figure 4.21. Idem à la Figure 4.19 ; tranche n°3.

Comme pour les temps rapides, une manière de faire une première analyse qualitative du degré de variation de nos signaux en fonction du temps et de faire une représentation des résultats obtenus sur ce signal sous la forme d'une « carte » à deux dimensions (Figure 4.22) qui, pour chaque tranche de 5 minutes, représente les amplitudes associées aux différents temps du domaine de Laplace. À chaque élément de la matrice des amplitudes correspond à une surface rectangulaire sur la carte, dont l'amplitude est figurée par le même code couleur que celui de la Figure 4.18. De même que pour les temps rapides, cette carte permet de visualiser immédiatement les variations temporelles de la dynamique lente du noyau d'une cellule vivante ainsi que son hétérogénéité dynamique à ces échelles de temps.



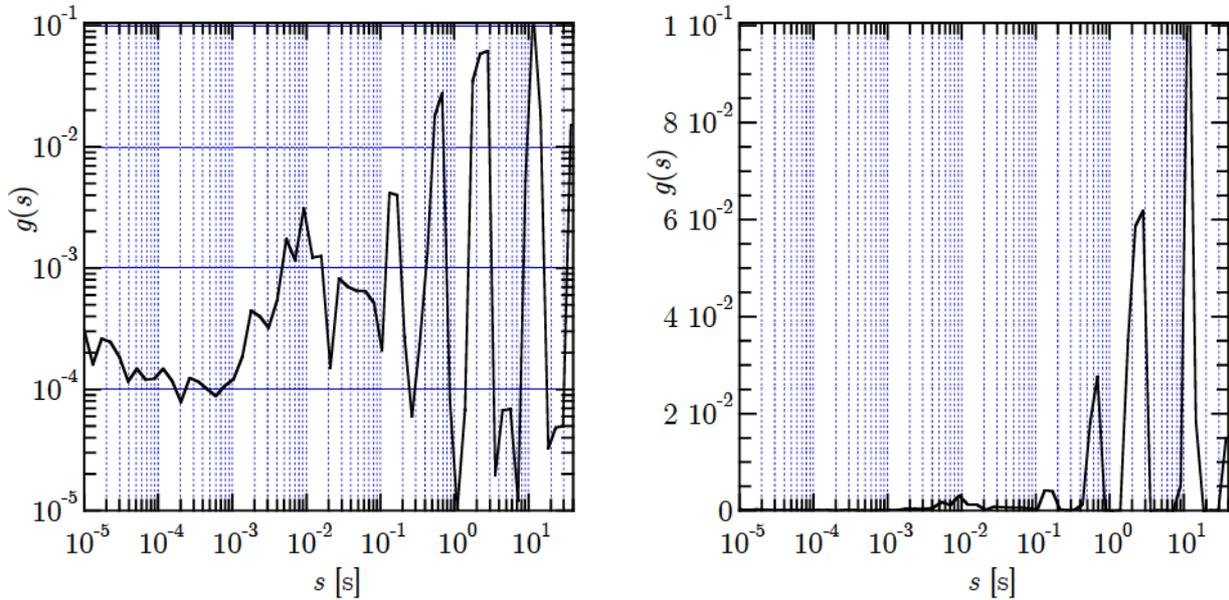
**Figure 4.22.** « Carte » des amplitudes associées aux différents temps du domaine de Laplace pour les 3 tranches de 5 minutes d'un signal de 10 minutes mesuré sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 avec une fréquence d'acquisition de  $10^9$  Hz.

#### 4.4. CONCLUSION.

Dans ce chapitre, nous avons présenté les caractéristiques de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule vivante ainsi que les techniques de traitement du signal que nous avons mises au point pour extraire des signaux que nous avons mesurés des informations sur la dynamique interne du noyau. La mise au point d'une technique d'analyse de ces signaux fiable (et suffisamment rapide en temps de calculs) s'est faite de manière empirique, par tâtonnements successifs, et a nécessité beaucoup de tests d'adaptation et de temps pour enfin trouver une méthode de traitement de signal qui s'adapte bien aux propriétés de nos signaux qui sont la non-stationnarité et la présence de plusieurs échelles de temps, typiquement réparties entre  $10^{-5}$  s et la minute.

Par rapport aux premières études faites par Michaël Suissa lors de sa thèse, avec la mise au point de cette méthode d'analyse de l'intensité lumineuse diffusée par le noyau, nous apportons une vraie plus-value pour l'utilisation de cette technique, qui nous permet maintenant d'estimer le spectre de la dynamique du noyau sur quasiment sept ordres de grandeurs :  $10^{-5}$  – 100 s. Ceci est

illustré par la Figure 4.23, où nous montrons le spectre moyen estimé pour le signal présenté à la Figure 4.13 sur un domaine temporel qui va de  $10^{-5}$  s à 30 s ; ce spectre a été obtenu par l'agrégation de la moyenne faite sur tous les spectres obtenus pour les 18 tranches de l'analyse des modes « rapides » et de la moyenne faite sur les spectres obtenus pour les 3 tranches de l'analyse des modes « lents ».



**Figure 4.23.** Spectre moyen estimé grâce à notre méthode du signal présenté Figure 4.13 ; i.e. agrégation du spectre moyen pour les modes « rapides » (moyenne de tous les spectres obtenus pour les 18 tranches de cette analyse) et du spectre moyen pour les modes « lents » (moyenne des spectres obtenus pour les 3 tranches cette l'analyse) ; à gauche en représentation logarithmique et à droite en représentation semi-logarithmique.

Nous avons maintenant à notre disposition un dispositif expérimental et une technique d'analyse des signaux issus de la diffusion de la lumière qui vont pouvoir nous permettre de sonder la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante dans un certain nombre de conditions physiologiques.

**BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 4.**

1. Suissa Michaël, Thèse de doctorat de l'École Normale Supérieure de Lyon : Dynamique Interne du noyau d'une cellule vivante : Etude par diffusion dynamique de la lumière. N° 06ENSL0363 (2006)
2. Suissa M., Place C., Goillot É., Berge B. et Freyssingéas É., Dynamic Light Scattering as an Investigating Tool to Study the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus. *Europhysics Letters*, **78** : 38005 (2007).
3. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingéas É., Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus Investigated by Dynamic Light Scattering. *European Physical Journal E*, **26** : 435–448 (2008).
4. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingéas É., Evolution of the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus during Interphase. *Biophysical Journal*, **97** : 453–461 (2009).
5. Borgnat P., Flandrin P., Stationarization via surrogates. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. Special issue UPoN 2008, P01001, (2009).
6. Wang Z., Kriegs H., Wiegand S., Thermal diffusion of Nucleotides. *J Phys Chem B.*, **116** : 7463-7469, doi: 10.1021/jp3032644 (2012).
7. Werner A., Predicting translational diffusion of evolutionary conserved RNA structures by the nucleotide number. *Nucleic Acids Res.*, **39**, doi: 10.1093/nar/gkq808 (2011)
8. Houtsmuller A. B., Rademakers S., Nigg A. L., Hoogstraten D., Hoeijmakers J. H. J. et Vermeulen W., Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, **284** : 958 (1999).
9. Phair R. D., Misteli T., High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404** : 604–609 (2000).
10. Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M. and Brown D. T., Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408** : 877 (2000).
11. Hager G. L., Elbi C. and Becker M., Protein dynamics in the nuclear compartment. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12** : 137 (2002).
12. Beaudouin J., Moro-Bermudez F., Klee T., Daigle N., Ellenberg N., Dissecting the Contribution of Diffusion and Interactions to the Mobility of Nuclear Proteins. *Biophysical Journal*, **90** : 1878–1894 (2006).
13. Levi V., Ruan Q., Plutz M., Belmont A. S. et Gratton E., Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope. *Biophysical Journal*, **89** : 4275–4285 (2005).
14. Davis S. K. et Bardeen C. J., The connection between chromatin motion on the 100 nm length scale and core histone dynamics in live XTC-2 cells and isolated nuclei. *Biophysical Journal*, **86** : 555–564 (2004).
15. Davis S. K. et Bardeen C. J., Time-resolved Microscopy of Chromatin In Vitro and In Vivo. *Photochemistry and Photobiology*, **81** : 548–555 (2005).

16. Allen J. B., Rabiner L. R., A unified approach to short-time Fourier analysis and synthesis. *Proc. IEEE*, **65** : 1558-1564 (1977).
17. Flandrin P., Time-Frequency/Time-Scale analysis. San Diego, CA: Academic Press, 1999.
18. Provencher S. W., A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*, **27** : 213-227 (1982).
19. Provencher S. W., CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, **27** : 229-242 (1982).

## CHAPITRE 5

### RESULTATS ET DISCUSSION.

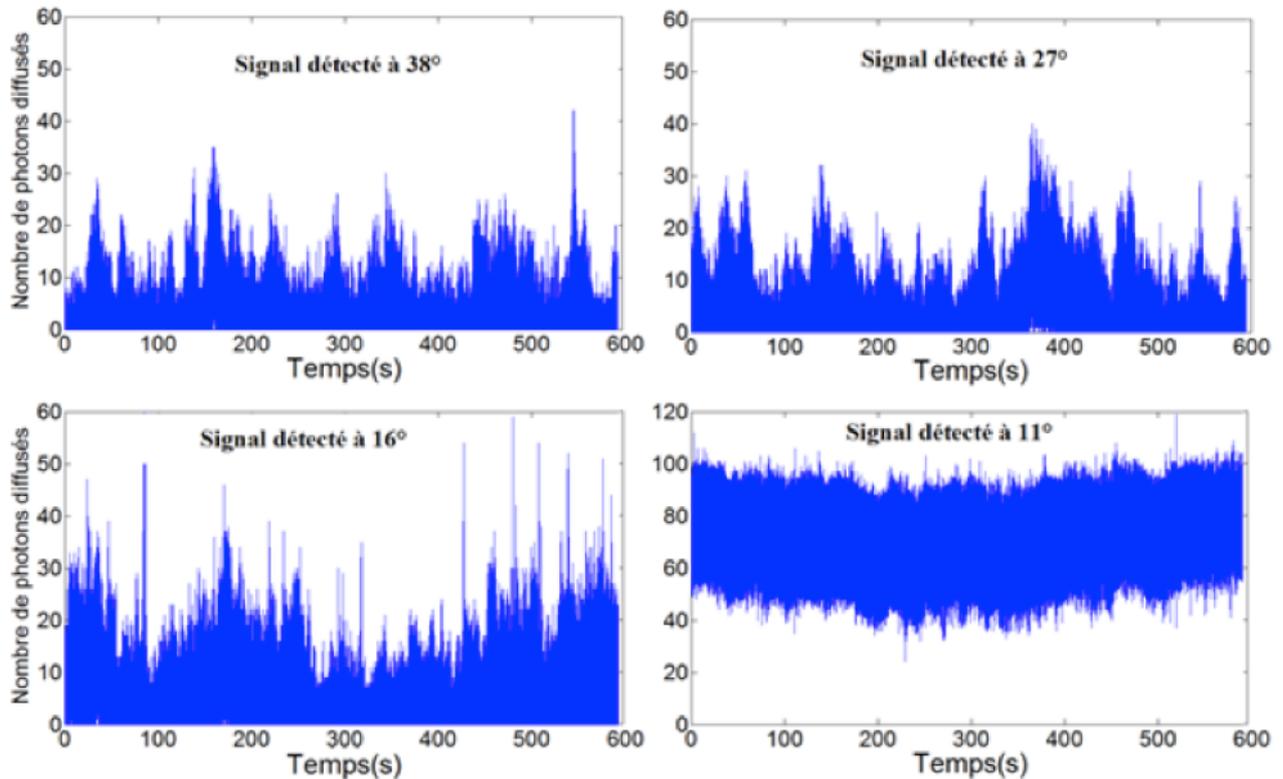
Dans ce cinquième chapitre, nous allons présenter les investigations que nous avons menées, grâce au montage expérimental et à la méthode de traitement du signal que nous avons développés, pour étudier la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante. Dans une première partie, nous exposerons l'ensemble de nos résultats expérimentaux, puis, dans une seconde partie, nous discuterons ces résultats, nous les confronterons à ce que l'on connaît déjà de la dynamique interne du noyau et nous présenterons un certain nombre d'hypothèses qui pourraient les expliquer.

Comme nous l'avons déjà indiqué aux Chapitres 1 et 3, nous avons conduit nos études sur des noyaux de cellules vivantes issues de deux lignées cancéreuses humaines : les cellules SHEP et les cellules HeLa. Tout d'abord, nous avons cherché à explorer l'évolution de la dynamique interne du noyau au cours du cycle cellulaire. Lors de sa thèse, Michaël Suissa avait déjà tenté d'étudier cette évolution pour les cellules SHEP [1–4] ; nous espérons retrouver ses résultats, mais surtout, grâce aux outils que nous avons mis en place, nous souhaitons pouvoir aller beaucoup plus loin dans l'examen de cette dynamique et voir si elle est « générique », ou si elle dépend de la lignée cellulaire. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la dynamique interne du noyau de cellules SHEP et HeLa, en phase G1, en présence d'une drogue cytobloquante dans le milieu de culture (là encore, c'est un sujet que Michaël Suissa avait abordé pendant sa thèse et, de manière identique, nous avons d'abord cherché à retrouver ses résultats avant d'essayer d'aller plus loin dans l'examen de cette dynamique). Pour finir, nous avons sondé l'effet de la température sur la dynamique interne du noyau de ces deux lignées. Mais, avant de présenter les différents résultats obtenus, nous allons revenir sur leurs aspects « universels » : intensité lumineuse diffusée en fonction de l'angle ; évolution temporelle de la dynamique interne du noyau sur quelques minutes, sur une mesure, une cellule.

#### 5.1. ASPECTS « UNIVERSELS » DES RESULTATS OBTENUS.

##### 5.1.1. Intensité lumineuse diffusée en fonction de l'angle de détection.

Comme nous l'avons expliqué au Chapitre 3, nous avons construit une expérience avec une mesure simultanée de l'intensité lumineuse diffusée à 4 angles (détection à 11°, 16°, 27° et 38° du faisceau incident). Figure 5.1, nous montrons le signal brut de l'intensité diffusée mesuré pour chacun de ces 4 angles, dans le cas d'un noyau d'une cellule SHEP ; signal mesuré à une fréquence d'acquisition de  $10^5$  Hz pendant 600 s. Sur cette figure, la première chose que nous remarquons est que l'intensité diffusée est très importante à 11° et ceci ne peut pas être expliqué seulement par une augmentation du volume diffusant aux petits angles. En effet, celui-ci varie comme  $1/\sin(\theta)$  où  $\theta$  est l'angle de diffusion, donc, si l'intensité diffusée était indépendante de l'angle de diffusion, on devrait juste observer une augmentation d'un facteur 3 ou 4 entre l'intensité diffusée à 11° et celle diffusée à 38°. Ceci indique que l'intensité lumineuse diffusée par le noyau d'une cellule vivante est très forte aux petits angles, ce qui suggère l'existence de structures de « grandes tailles » à l'intérieur du noyau (probablement de l'ordre du micron ou plus larges).



*Figure 5.1.* Signal brut de l'intensité diffusée par le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 suivant les 4 directions de détection de notre montage ; mesure réalisée avec une fréquence d'échantillonnage de  $10^5$  Hz pendant 600 secondes. En haut à gauche, le signal détecté par le détecteur placé à  $38^\circ$  du faisceau incident ; en haut à droite le signal enregistré sur le détecteur placé à  $27^\circ$  ; en bas, à gauche, le signal enregistré sur le détecteur à  $16^\circ$  ; en bas à droite, le signal détecté par le détecteur à  $11^\circ$ .

La seconde chose que l'on peut observer est que pour les trois angles de détection les plus éloignés du faisceau incident (donc à  $16^\circ$ ,  $27^\circ$  et  $38^\circ$ ), le nombre de photons qui est détecté par intervalle de comptage (*i.e.* dans un intervalle de  $10^{-5}$  s) ne dépasse jamais les 60 photons. Par contre, dans la quatrième direction, donc pour l'angle de détection le plus proche du faisceau incident (à  $11^\circ$ ), qui est celle qui reçoit l'intensité diffusée la plus forte, on observe la présence de très nombreux pics d'intensité qui dépassent 100 photons pour un intervalle de comptage, c'est-à-dire au-delà du maximum de comptage « correct » de nos photodiodes à avalanche (voir Chapitre 3 § 3.2.2). La conséquence de cette saturation partielle de ce détecteur est que les signaux mesurés à cet angle sont souvent difficilement analysables car pollués par ces quelques très forts taux de comptage. Il est possible d'utiliser des procédures numériques qui permettent de « filtrer » ces signaux de manière à pouvoir ensuite les analyser, mais, ces procédures sont assez lourdes en temps de calcul et surtout nous n'avons pas eu le temps de les valider complètement. En conséquence, dans la suite de ce manuscrit, nous ne présenterons que les résultats des mesures enregistrées aux trois angles de détection les plus éloignés du faisceau incident :  $16^\circ$ ,  $27^\circ$  et  $38^\circ$ , nous ne parlerons jamais des mesures faites à  $11^\circ$ . Il est à noter que nous avons essayé de baisser l'intensité lumineuse incidente, pour pouvoir obtenir un signal exploitable à  $11^\circ$ , mais alors, l'intensité incidente est si

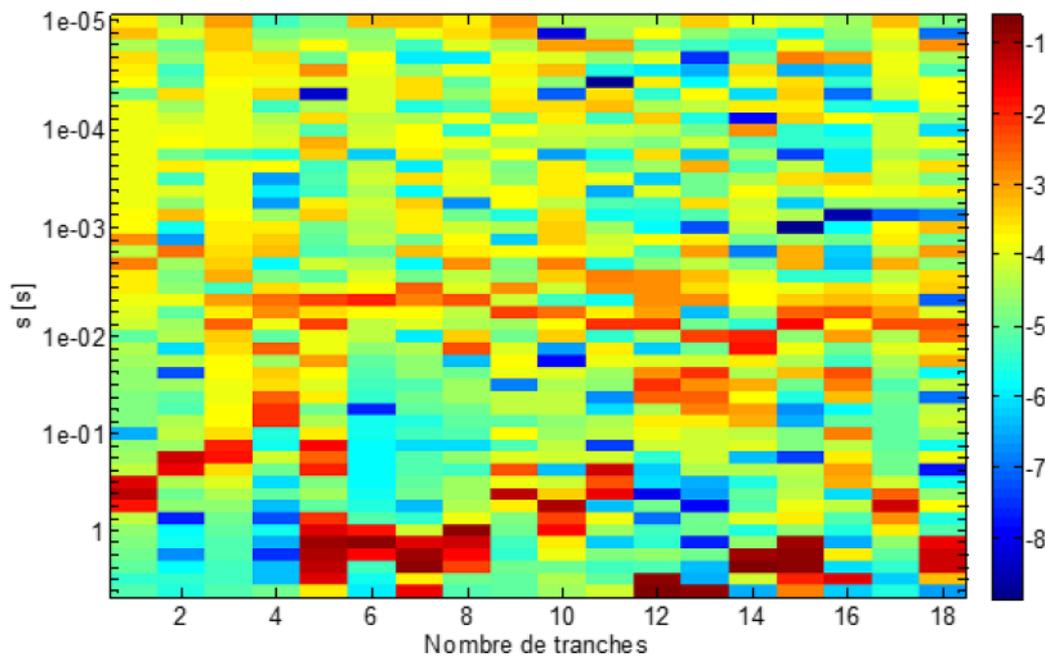
faible que l'on ne mesure plus assez d'intensité diffusée à  $27^\circ$  et  $38^\circ$  et donc, nous avons alors 2 angles pour lesquels les mesures sont inexploitable au lieu de 1.<sup>1</sup>

### 5.1.2. Evolution temporelle rapide de la dynamique interne du noyau.

Nous savons déjà que la dynamique interne du noyau évolue au cours du temps, ainsi la question que l'on peut se poser est peut-on observer cette évolution dans nos mesures ?

#### 5.1.2.1. Cas de la dynamique « rapide » ( $10^{-5} - 1$ s).

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux analyses que nous avons faites pour extraire les temps « rapides ». Est-ce que sur une mesure de 10 minutes nous pouvons suivre une évolution de cette dynamique ? Figure 5.2, nous montrons la « carte » des amplitudes  $g(s)$  pour les différents temps du domaine de Laplace obtenue pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes mesuré à  $38^\circ$  sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 (il s'agit de la « carte » que nous avons déjà présentée Figure 4.18 au chapitre précédent).



*Figure 5.2.* « Carte » des amplitudes associées aux différents temps du domaine de Laplace (les  $g(s)$ ) pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes (noyau d'une cellule SHEP en phase G1, mesure à  $38^\circ$  ; mesure présentée Figure 4.18).

En regardant attentivement cette carte des amplitudes, on peut observer que pour un temps donné dans le domaine de Laplace la valeur de l'amplitude  $g(s)$  peut varier de façon considérable d'une tranche à l'autre ; il ne semble donc pas y avoir de ressemblances (ou de similarités) importantes entre deux tranches successives et ceci malgré 50% de recouvrement, ce que l'on peut observer encore plus facilement si on représente les spectres de ces tranches (Figure 5.3). Ces

<sup>1</sup> Pour quasiment toutes les signaux enregistrés à  $11^\circ$ , le nombre d'intervalles de comptage pour lesquels on compte plus de 100 photons est très inférieur au nombre d'intervalles de comptage pendant la durée de la mesure, donc nous espérons vraiment pouvoir arriver à sortir des informations valables de ces signaux.

variations fortes des valeurs de  $g(s)$  d'une tranche à l'autre traduisent la très forte hétérogénéité des modes « rapides » de la dynamique interne du noyau en phase G1, ce qui suggère que les processeurs qui sont à l'origine de ces modes « rapides » évoluent très vite en fonction du temps (ce que les résultats de la thèse de Michaël Suissa laissaient déjà supposer).

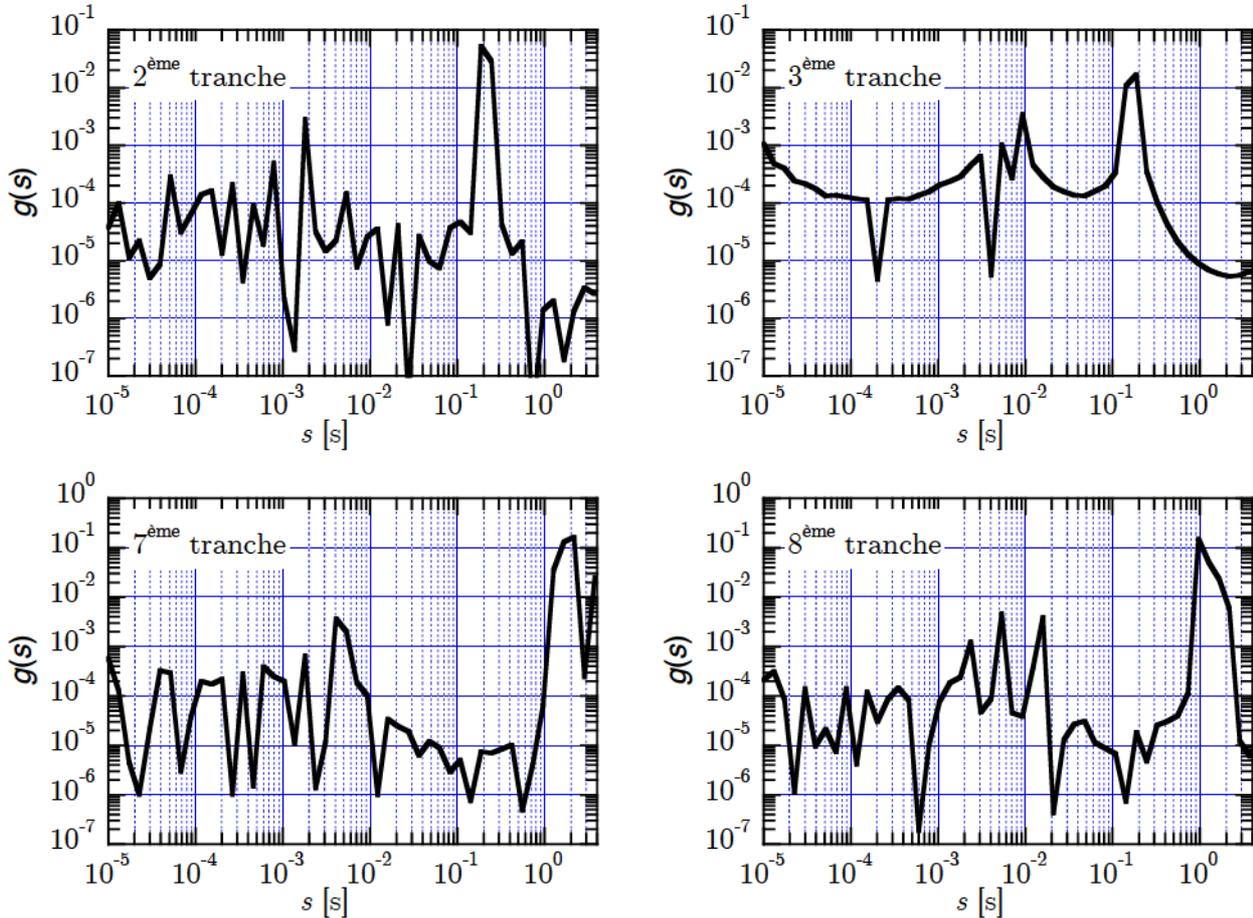


Figure 5.3. Spectres des temps caractéristiques ( $g(s)$  en fonction de  $s$ ) des 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> tranche de la mesure présentée sous forme de carte Figure 5.2.

Ces observations sont aussi vérifiées pour les noyaux des cellules en phase S et, des cellules en phase G2, comme le montrent les Figures 5.4 à 5.7.

- Figure 5.4 et Figure 5.5, on montre la « carte » des amplitudes  $g(s)$  pour les différents temps du domaine de Laplace obtenue pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes mesuré à  $38^\circ$  sur le noyau d'une cellule SHEP en phase S (Figure 5.4) et les spectres des temps caractéristiques ( $g(s)$  en fonction de  $s$ ) des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> tranches de cette mesure (Figure 5.5).
- Figure 5.6 présente la « carte » des amplitudes  $g(s)$  pour les différents temps du domaine de Laplace obtenue pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes mesuré à  $38^\circ$  sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G2 et, Figure 5.7 on montre les spectres des temps caractéristiques ( $g(s)$  en fonction de  $s$ ) des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> tranches de cette mesure.

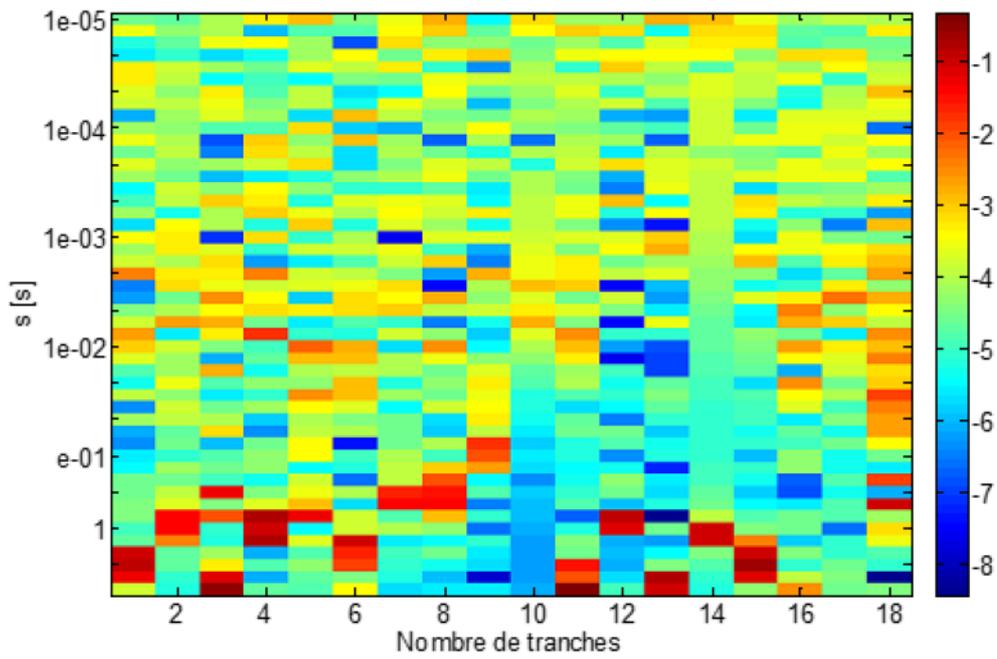


Figure 5.4. « Carte » des  $g(s)$  pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes pour le noyau d'une cellule SHEP en phase S (mesure à  $38^\circ$ ).

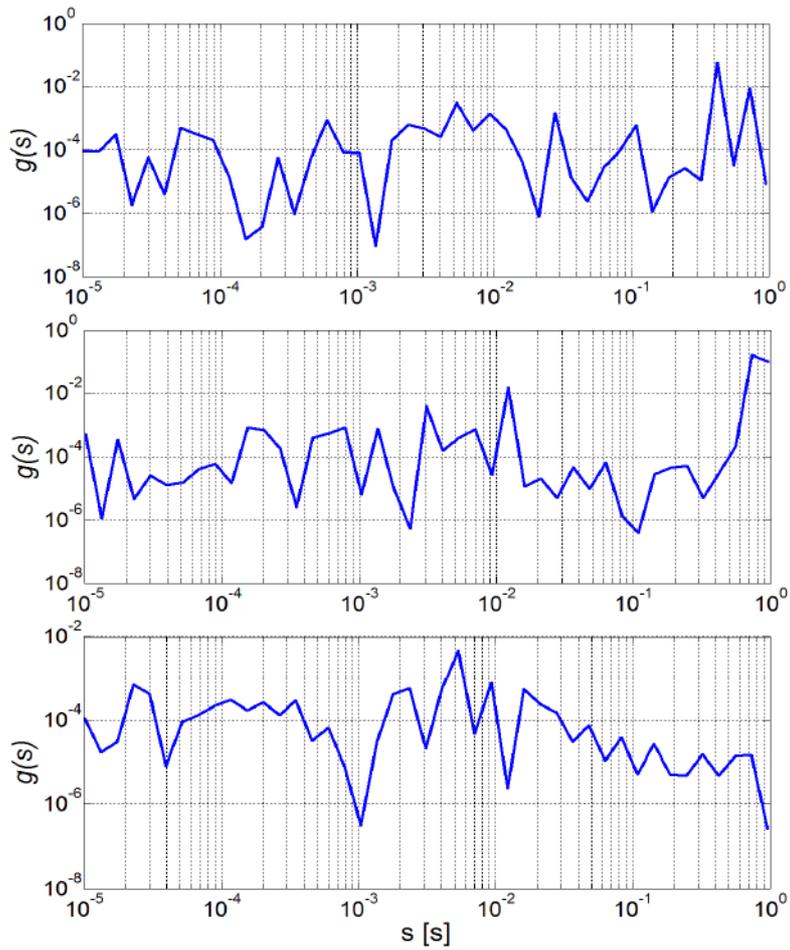


Figure 5.5. Spectres des temps caractéristiques des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> tranches.

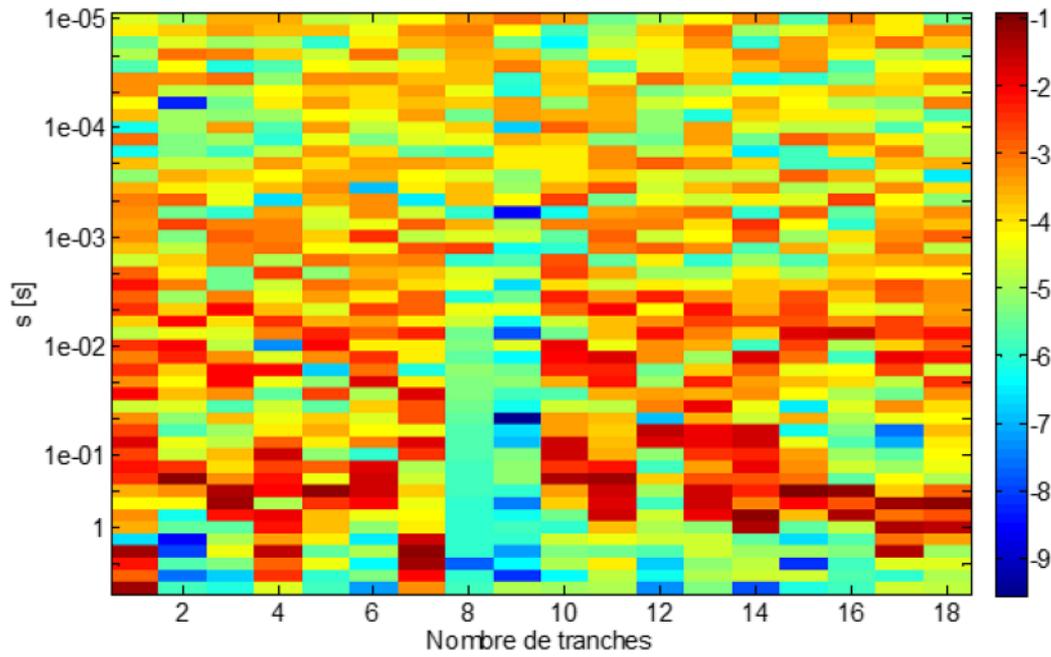


Figure 5.6. « Carte » des  $g(s)$  pour les 18 tranches d'une minute d'un signal de 10 minutes pour le noyau d'une cellule SHEP en phase G2 (mesure à  $38^\circ$ ).

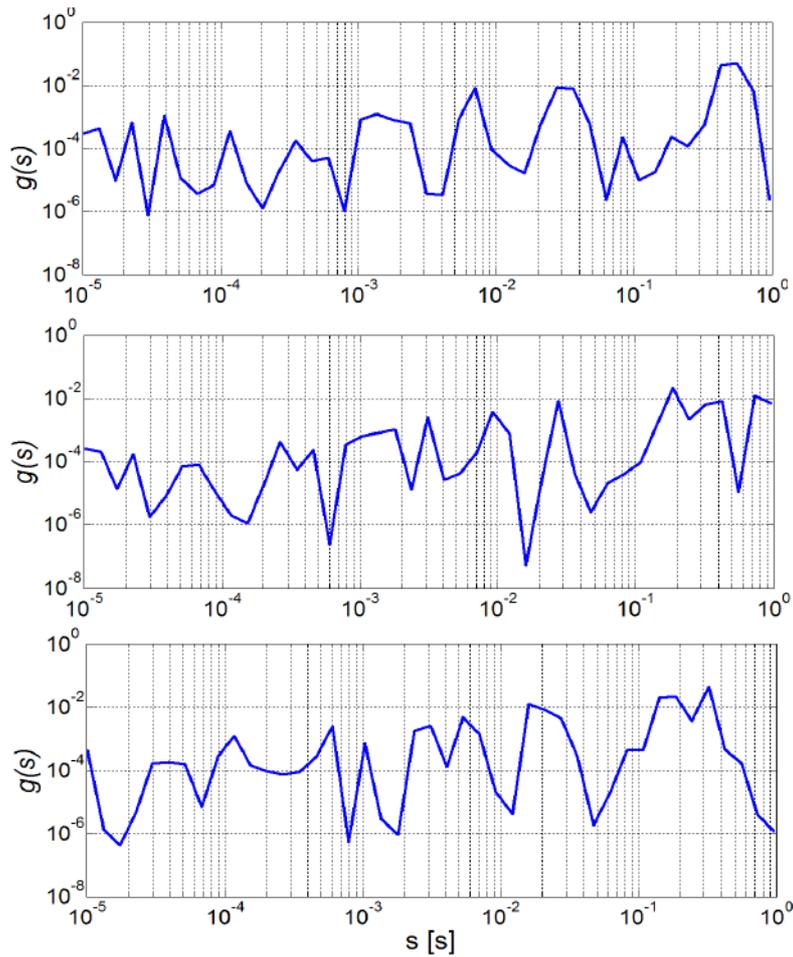
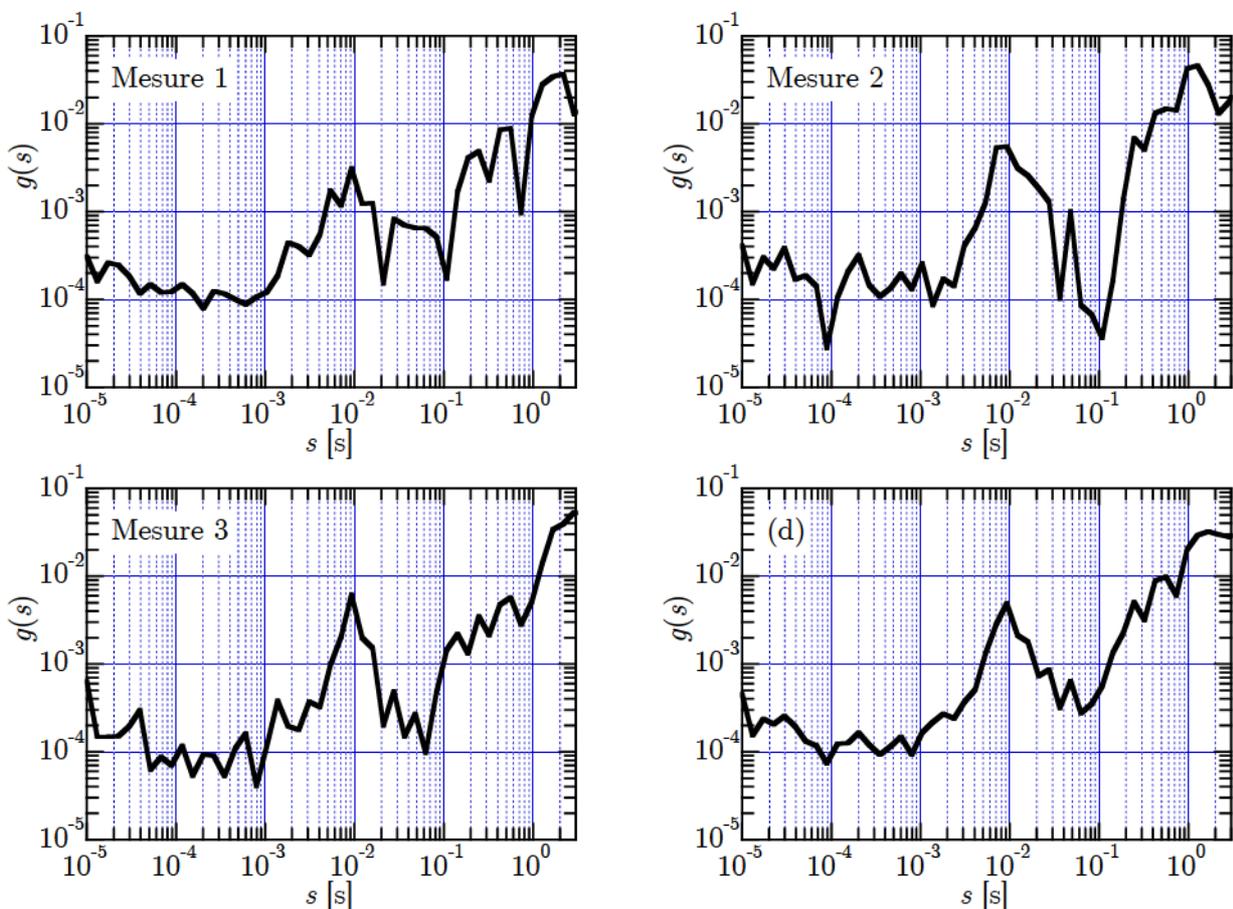


Figure 5.7. Spectres des temps caractéristiques des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> tranches.

Donc, quelque soit la phase du cycle cellulaire (et aussi, nous le verrons plus loin, quelques soient les conditions de cultures dans lesquelles se trouvent les cellules), les temps caractéristiques de leur dynamique « rapide » (donc pour nous la dynamique dont les temps caractéristiques sont compris en  $10^{-5}$  et 1 s) varient fortement et brusquement en fonction du temps ; cette dynamique est très hétérogène en temps. Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, ceci laisse à penser que les différents processus qui sont à l'origine de cette dynamique « rapide » changent très vite en fonction du temps. Ce résultat est cohérent avec les observations qu'avait faites Michaël Suissa et aussi avec ce que l'on supposait au départ sur les caractéristiques de cette dynamique. Mais, la conséquence pratique de cela est que l'analyse de tous les spectres individuels ne nous permettra pas de suivre et de comprendre l'évolution de la dynamique « rapide » du noyau.

Néanmoins, quand on regarde attentivement les différentes cartes des amplitudes  $g(s)$ , on peut remarquer que certains temps présentent des valeurs de  $g(s)$  qui sont grandes très régulièrement. Donc, même si des processus à l'origine de la dynamique « rapide » changent très vite en fonction du temps, il semblerait que les mêmes processus se répètent régulièrement. En conséquence, on peut espérer voir se dessiner des tendances en prenant les moyennes des spectres.

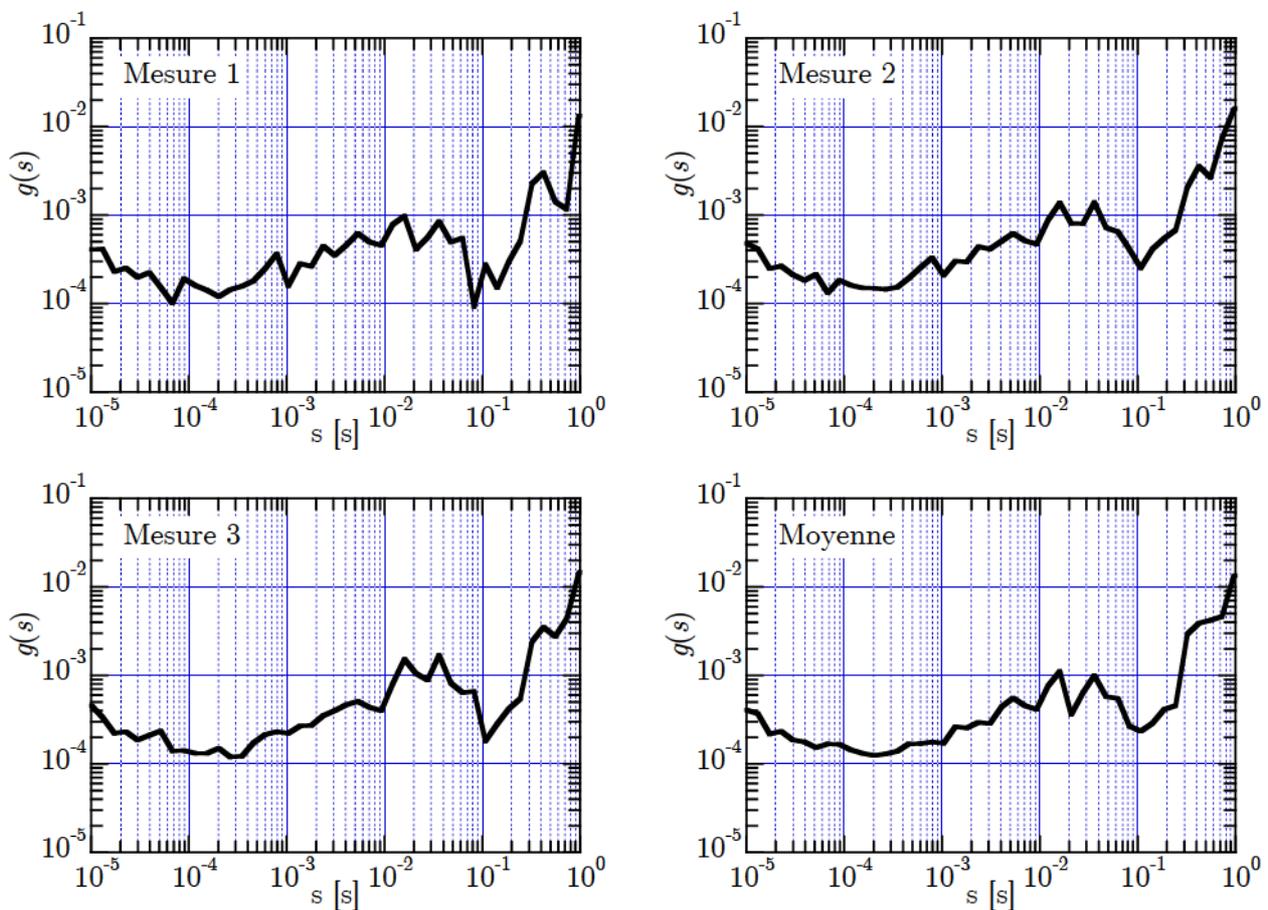


**Figure 5.8.** a) En haut à gauche, spectre moyen des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 1 sur une cellule SHEP en phase G1 à  $38^\circ$  (qui est celle présentée Figure 5.2). b) En haut à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 2 sur la même cellule c) En bas à gauche, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 3 sur la même cellule. d) En bas à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne des trois mesures faites sur le même noyau (i.e. sur 54 tranches d'une minute).

Figures 5.8, nous présentons les spectres moyennés (à chaque fois moyenne de  $g(s)$  sur les 18 tranches de la mesure) de 3 mesures différentes faites sur le même noyau de cellule SHEP en phase G1 (les trois mesures s'enchaînent l'une après l'autre, avec juste une ou deux secondes de délai entre deux mesures successives ; cf. Chapitre 3). La Figure 5.8d montre la moyenne sur la cellule, donc une moyenne sur les trois mesures de 10 minutes, *i.e.* sur 54 tranches d'une minute chacune.

On remarque tout de suite que les moyennes sur les trois mesures se ressemblent beaucoup ; elles ont toutes les trois les mêmes caractéristiques. Tout d'abord, on observe une décroissance douce de  $g(s)$  entre  $10^{-5}$  et  $10^{-3}$  s ; puis une bosse assez marquée, entre  $10^{-3}$  s et, environ,  $2 \cdot 10^{-2}$  s, qui a son maximum vers  $10^{-2}$  s ; deux petits « pics » entre  $2 \cdot 10^{-2}$  s et  $10^{-1}$  s ; une augmentation de l'amplitude de  $g(s)$  au-delà de  $10^{-1}$  s. Toutes ces caractéristiques se retrouvent dans la moyenne de  $g(s)$  obtenue sur les 3 mesures réalisées sur la cellule.

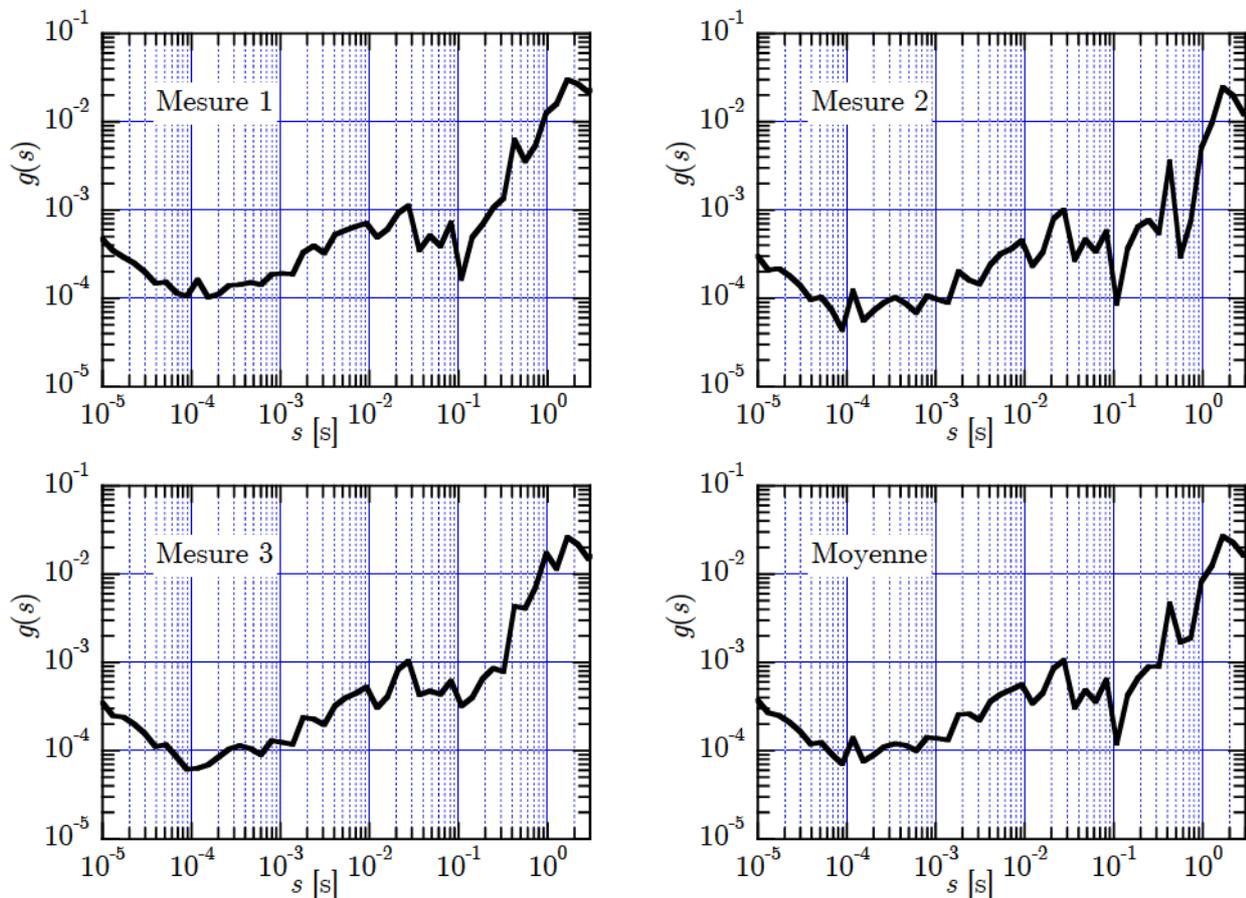
Nous faisons la même chose pour les mesures obtenues sur une cellule SHEP en phase S à  $38^\circ$  (celle qui a servi pour les Figures 5.4 et 5.5) ; les différentes moyennes sont présentées Figure 5.9.



**Figure 5.9.** a) En haut à gauche, spectre moyen des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 1 sur une cellule SHEP en phase S à  $38^\circ$  (qui est celle présentée Figure 5.4). b) En haut à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 2 sur la même cellule c) En bas à gauche, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 3 sur la même cellule. d) En bas à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne des trois mesures faites sur le même noyau.

Comme pour la cellule en phase G1, on remarque que les moyennes sur les trois mesures se ressemblent beaucoup ; elles présentent toutes les trois des caractéristiques similaires. Ces caractéristiques se retrouvent dans la moyenne de  $g(s)$  obtenue sur les 3 mesures réalisées sur cette cellule. Nous pouvons aussi voir que le spectre moyen obtenu sur la cellule en phase G1 (Figure 5.8d) est très différent de celui obtenu sur la cellule en phase S (Figure 5.9d).

Figure 5.10, nous présentons les moyennes obtenues sur les différentes mesures réalisées sur une cellule SHEP en phase G2 à 38°, ainsi que la moyenne sur la cellule. Là encore, nous pouvons voir que les moyennes sur les trois mesures présentent des caractéristiques similaires qui se retrouvent dans la moyenne de  $g(s)$  obtenue sur ces 3 mesures. Nous pouvons aussi voir que le spectre moyen obtenu sur la cellule en phase G2 (Figure 5.10d) semble assez proche de celui obtenu sur la cellule en phase S (Figure 5.9d).



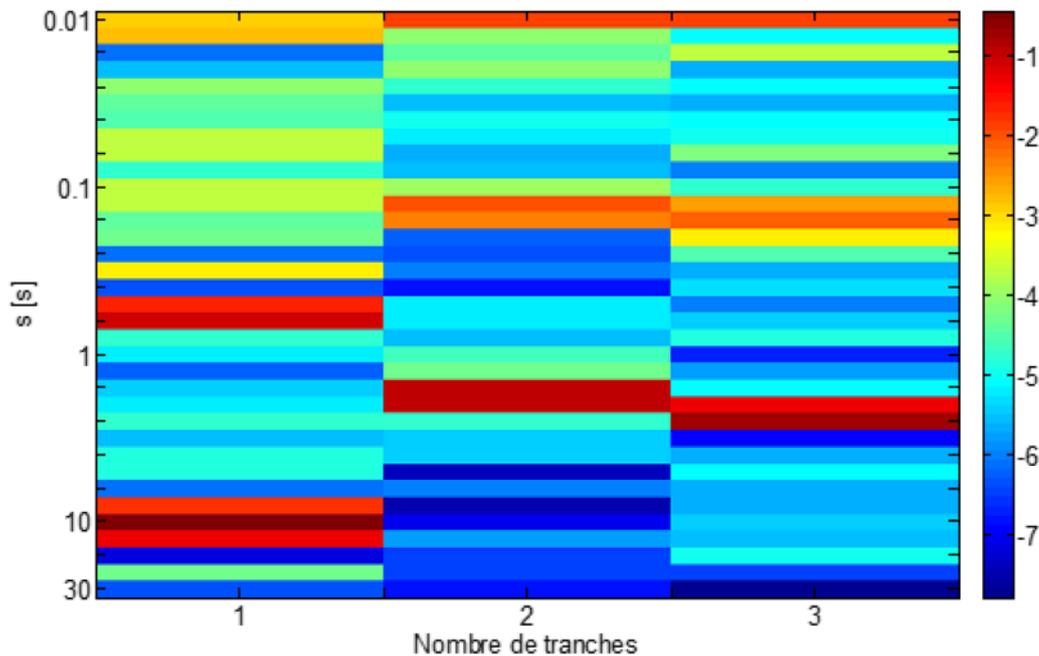
**Figure 5.10.** a) En haut à gauche, spectre moyen des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 1 sur une cellule SHEP en phase G2 à 38°. b) En haut à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 2 sur la même cellule c) En bas gauche, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 18 tranches de la mesure 3 sur la même cellule. d) En bas à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne des trois mesures faites sur le même noyau.

Donc, sur ces trois exemples, il semble que la moyenne des spectres sur l'ensemble des mesures faites sur une cellule<sup>2</sup> permet de caractériser assez bien la dynamique interne du noyau et de voir des évolutions qui se font sur des temps assez long comme le changement de phase lors du cycle cellulaire. En conséquence, pour toutes les analyses de la dynamique « rapide » présentées dans ce manuscrit de thèse, nous avons fait le choix de ne considérer que les moyennes de  $g(s)$  obtenues pour chaque cellule étudiée (donc la moyenne sur les 3 mesures successives de 10 minutes faites sur la cellule, soit sur 54 tranches).

Nous avons conscience qu'il y a des informations dans les variations brutales des spectres d'une tranche à l'autre, mais, à ce point de notre étude, nous ne savons comment obtenir ces informations et encore moins comment les interpréter. Par contre, nous pensons que l'étude de la dynamique « rapide » moyennée sur une cellule (donc sur 30 minutes) va quand même nous permettre de suivre l'évolution de cette dynamique lors du cycle cellulaire ainsi que les effets des conditions de culture.

### 5.1.2.2. Cas de la dynamique « lente » ( $10^2 - 30$ s).

Les tranches de 5 minutes créées pour permettre l'étude des modes « lents » montrent, elles aussi, une variabilité importante entre les trois tranches d'une même mesure. Figures 5.10 et 5.11, nous présentons les valeurs de  $g(s)$  obtenues pour une mesure sur le noyau d'une cellule SHEP en phase G1, à  $38^\circ$  (sous forme d'une carte : Figure 5.11 et, des spectres : Figures 5.12), Figures 5.13 et 5.14 pour une cellule en phase S et Figures 5.15 et 5.16 pour les cellules en phase G2.



**Figure 5.11.** « Carte » des  $g(s)$  pour les 3 tranches de 5 minutes d'un signal de 10 minutes pour le noyau d'une cellule SHEP en phase G1 (mesure à  $38^\circ$  ; signal identique à celui des Figures 4.18 et 5.2).

<sup>2</sup> Pour chaque cellule étudiée, nous avons toujours réalisé 3 mesures de 10 minutes, enchaînées l'une après l'autre, avec un délai très court entre deux mesures (typiquement 1 ou 2 secondes).

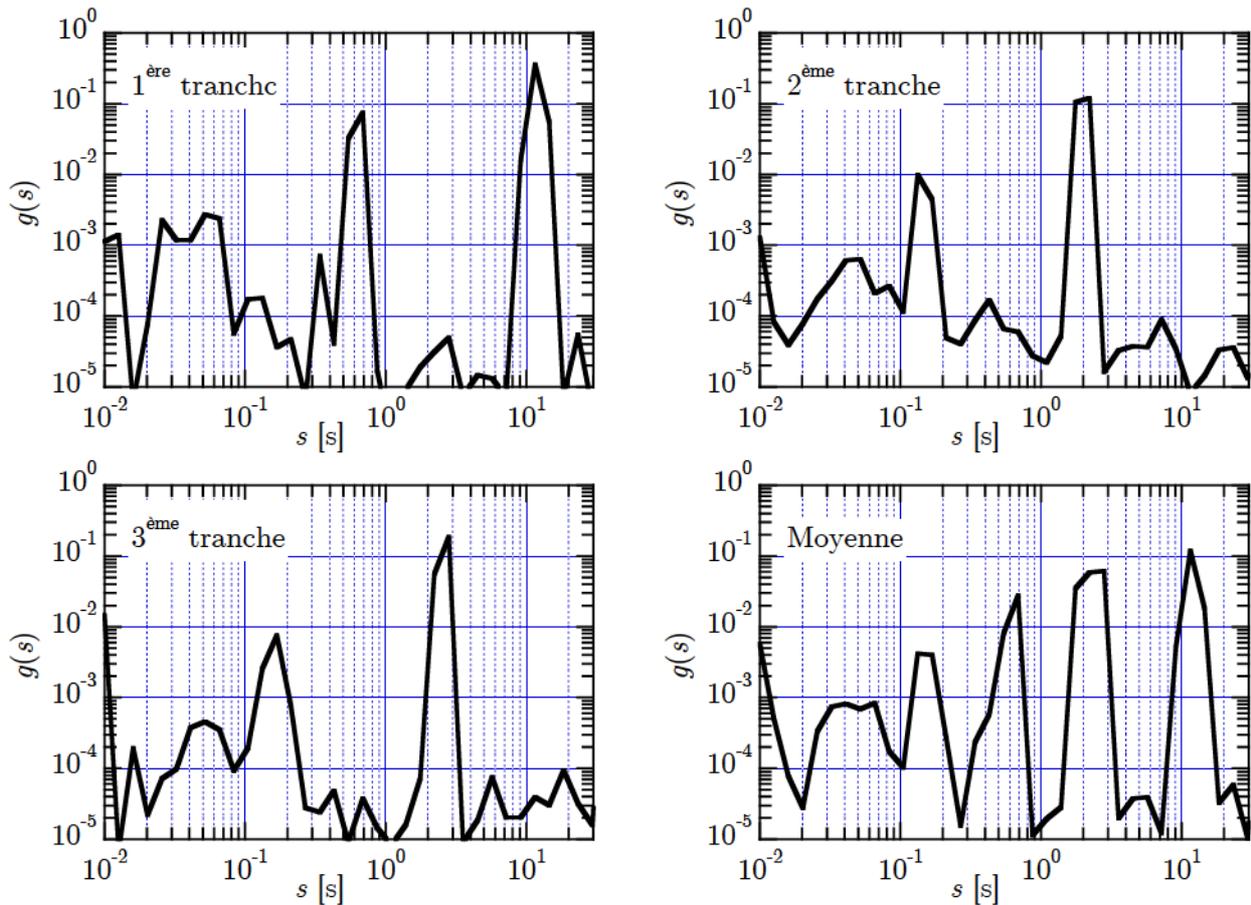


Figure 5.12. Spectres des temps caractéristiques de la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> tranche de 5 minutes d'une mesure de 10 minutes et leur moyenne (même signal que pour la Figure 5.11).

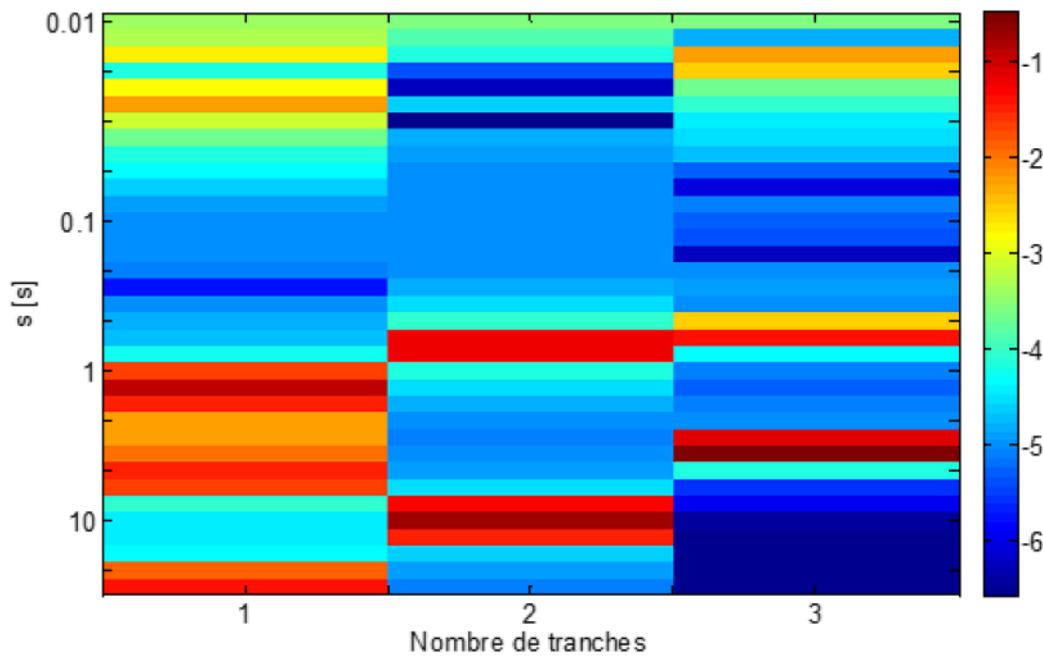


Figure 5.13. « Carte » des  $g(s)$  pour les 3 tranches de 5 minutes d'un signal de 10 minutes pour le noyau d'une cellule SHEP en phase S (mesure à 38° ; signal identique à celui des Figure 5.4).

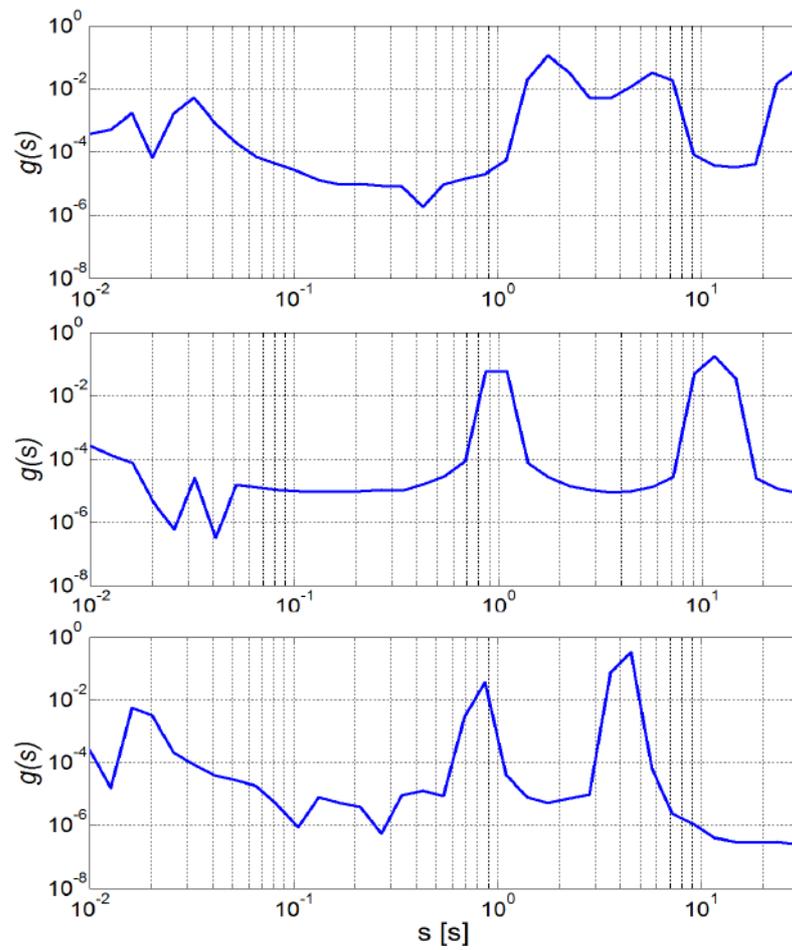


Figure 5.14. De haut en bas, spectres des temps caractéristiques de la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> tranche de 5 minutes (même signal que pour la Figure 5.12).

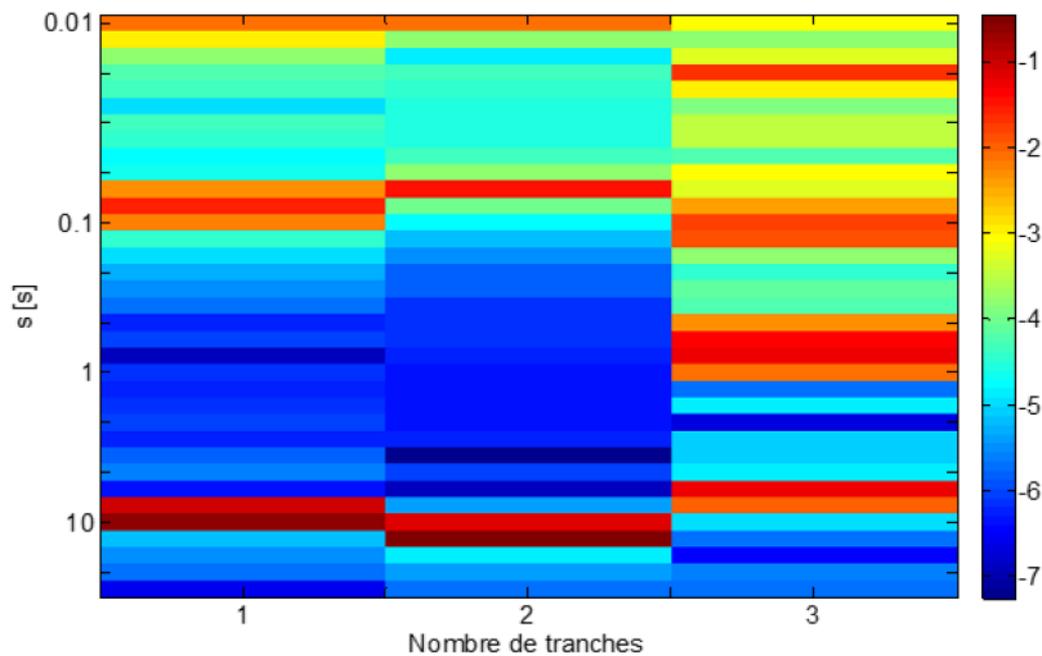
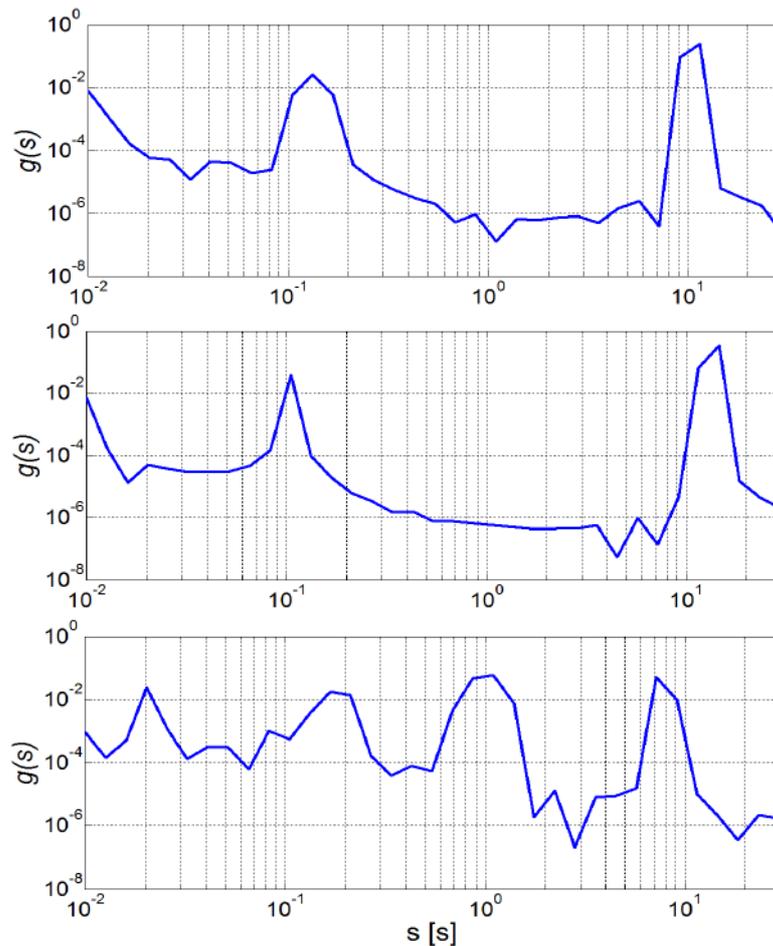


Figure 5.15. « Carte » des  $g(s)$  pour les 3 tranches de 5 minutes d'un signal de 10 minutes pour le noyau d'une cellule SHEP en phase G2 (mesure à 38° ; signal identique à celui des Figure 5.6).

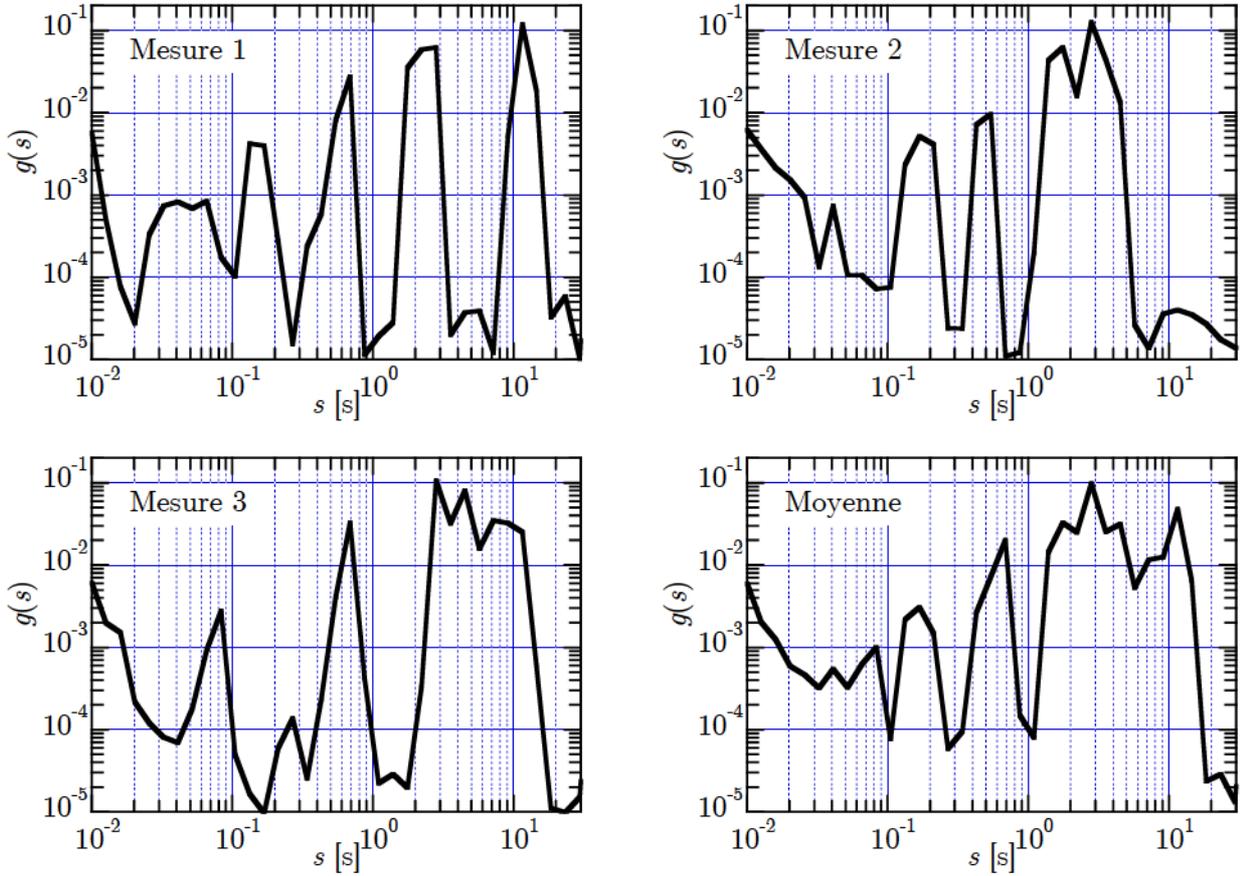


**Figure 5.16.** De haut en bas, spectres des temps caractéristiques de la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> tranche de 5 minutes (même signal que pour la Figure 5.15).

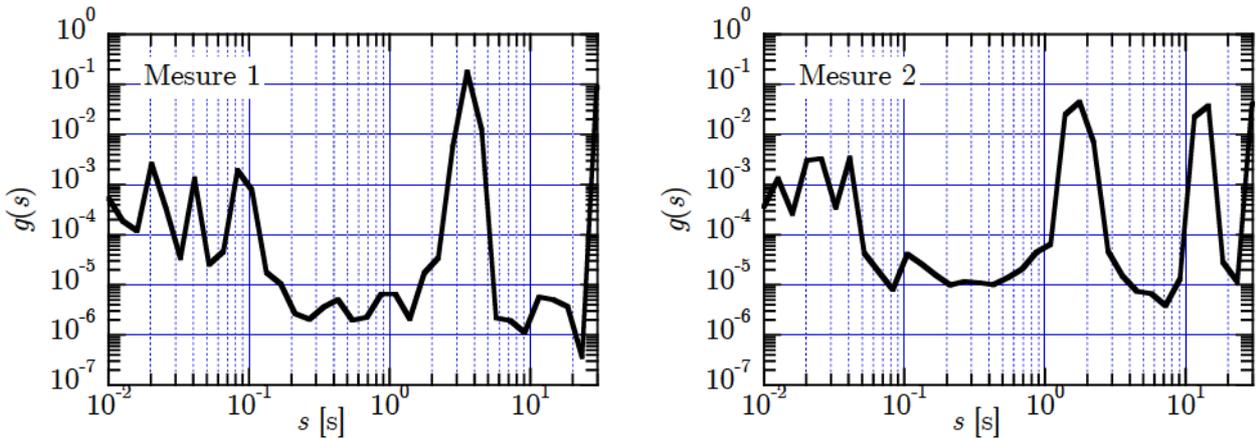
Comme pour l'analyse des modes « rapides », une façon de pouvoir observer des tendances se dessiner est peut être de faire des moyennes sur les spectres  $g(s)$  obtenus pour chaque tranche d'une mesure, puis sur les différentes mesures d'une cellule.

C'est ce que nous avons fait et les résultats sont présentés sur les Figures 5.17 à 5.19 pour, respectivement, une cellule en phase G1, une cellule en phase S et une cellule en phase G2. Pour ces trois figures les moyennes sont montrées de la même manière. a) En haut à droite, le spectre moyen des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace ( $g(s)$ ) obtenu en faisant la moyenne sur les 3 tranches de la mesure 1 faite sur cette cellule. b) En haut à gauche, le spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 3 tranches de la mesure 2 faite sur la même cellule. c) En bas à droite, le spectre moyen obtenu en faisant la moyenne sur les 3 tranches de la mesure 3 faite sur cette cellule. d) En bas à gauche, le spectre moyen obtenu en faisant la moyenne des spectres moyens des trois mesures faites sur le même noyau.

Pour toutes les phases du cycle, la ressemblance entre 2 mesures successives semble moindre que dans le cas de l'analyse des modes « rapides », très probablement parce que l'on moyenne sur moins de spectres, néanmoins, on peut voir des tendances sortir. Donc, comme pour l'analyse des temps « rapides », pour toutes les analyses de la dynamique « lente » présentées dans ce manuscrit de thèse, nous ne considérerons que les moyennes de  $g(s)$  obtenues pour chaque cellule étudiée (donc la moyenne sur les 3 mesures successives de 10 minutes faites sur la cellule, soit sur 9 tranches).



*Figure 5.17. Spectres moyens des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenus en faisant la moyenne sur les 3 tranches d'une mesure sur une cellule SHEP en phase G1 à 38° ; a) En haut à gauche, Mesure 1. b) En haut à droite, Mesure 2. c) En bas à gauche, Mesure 3. d) En bas à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne de ces trois mesures.*



*Figure 5.18A. Spectres moyens des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenus en faisant la moyenne sur les 3 tranches d'une mesure sur une cellule SHEP en phase S à 38° ; a) à gauche, Mesure 1 ; b) à droite, Mesure 2.*

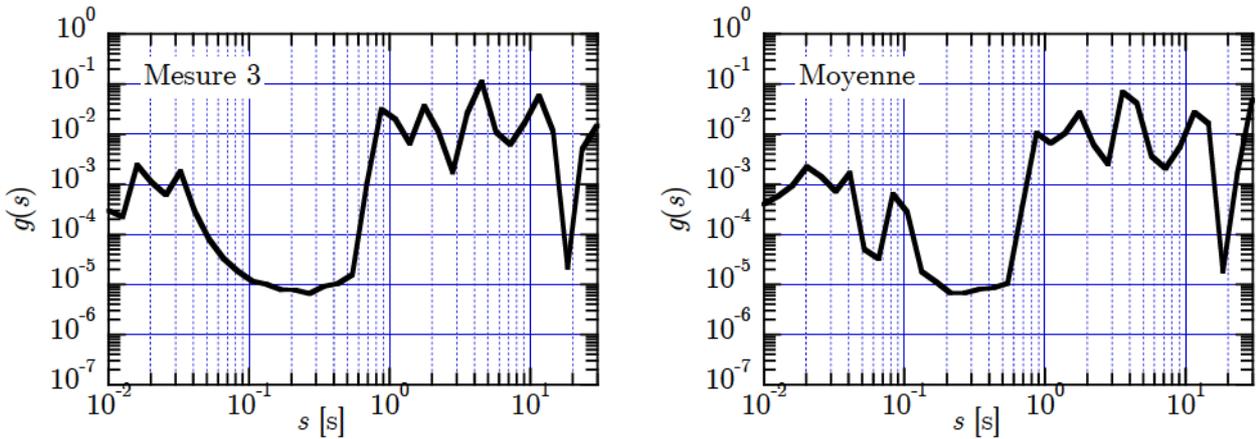


Figure 5.18B. Spectres moyens des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenus en faisant la moyenne sur les 3 tranches d'une mesure sur une cellule SHEP en phase S à 38° ; c) à gauche, Mesure 3. d) à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne de ces trois mesures.

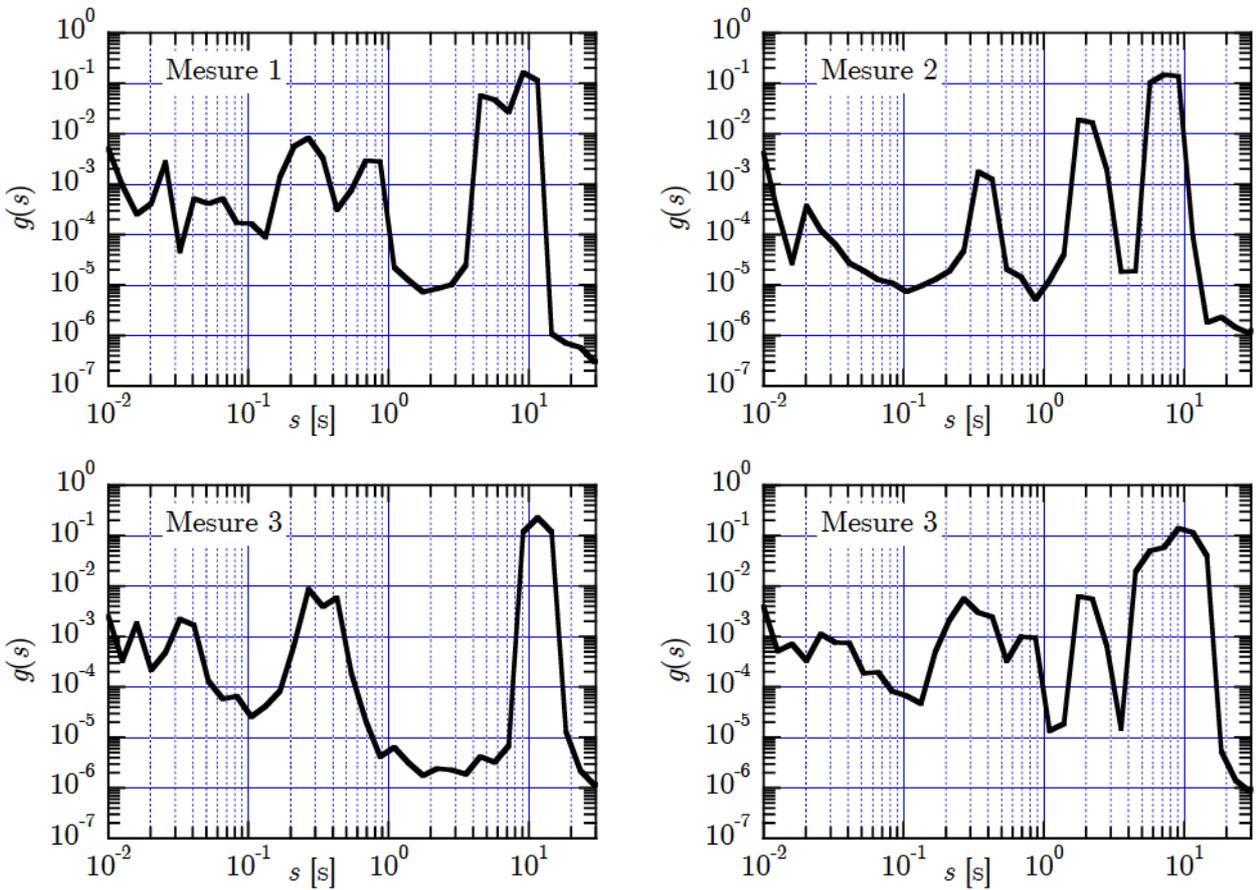


Figure 5.19. Spectres moyens des temps caractéristiques dans le domaine de Laplace obtenus en faisant la moyenne sur les 3 tranches d'une mesure sur une cellule SHEP en phase G2 à 38° ; a) En haut à gauche, Mesure 1. b) En haut à droite, Mesure 2. c) En bas à gauche, Mesure 3. d) En bas à droite, spectre moyen obtenu en faisant la moyenne de ces trois mesures.

Sur ces trois figures, nous pouvons voir que pour la gamme de temps qui va de  $10^{-2}$  à 1 s, (qui correspond à la gamme de recouvrement entre nos deux analyses ; modes « rapides », modes

« lents »), nous n'avons pas exactement la même allure des spectres pour les deux types d'analyse. Les maxima de  $g(s)$  sont placés aux mêmes endroits pour les deux analyses, mais, pour l'intervalle  $10^{-1} - 1$  s, les temps caractéristiques sont bien plus marqués (ou bien plus piqués) dans le cas de l'analyse pour les modes « lents ». Ceci vient probablement du fait que dans un cas, nous faisons la moyenne sur 18 tranches « courtes » d'une minute et, dans l'autre, sur 3 tranches « longues » de 5 minutes chacune.

## 5.2. EVOLUTION DE LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE SHEP AU COURS DE SON CYCLE CELLULAIRE.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous ne présenterons ici que des spectres moyens, c'est-à-dire des spectres qui sont calculés en faisant la moyenne sur tous les spectres obtenus, au moyen de nos analyses, sur les 3 mesures de 10 minutes réalisées sur un noyau (*i.e.* pour sonder les modes « rapides » la moyenne se réalise sur 54 spectres, pour les modes « lents » la moyenne se calcule sur 9 spectres).

Chaque mesure a été faite simultanément à 3 angles et, nous présenterons toujours les 3 spectres. C'est-à-dire le spectre obtenu pour l'angle de détection de  $16^\circ$ , ce qui correspond à un angle de diffusion de l'ordre de  $11^\circ - 12^\circ$ , et donc à un vecteur d'onde de diffusion dont le module vaut environ  $q \approx 2,75 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ . Le spectre obtenu pour l'angle de détection de  $27^\circ$ , soit pour un angle de diffusion de l'ordre de  $19^\circ$  et donc un vecteur d'onde  $q \approx 4,57 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ . Le spectre pour l'angle de détection de  $38^\circ$ , donc pour un angle de diffusion de l'ordre de  $26^\circ - 27^\circ$ , ce qui donne un vecteur d'onde  $q \approx 6,28 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ .

### 5.2.1. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante en phase G1.

Avant de décrire les résultats obtenus sur la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante en phase G1, nous allons d'abord décrire les différentes procédures expérimentales qui nous ont permis d'obtenir des populations de cellules qui étaient soit majoritairement en début de phase G1, soit en fin de phase G1, nous autorisant ainsi à mener à bien notre étude.

#### 5.2.1.1. Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau en phase G1.

En pratique, une fois les cellules introduites dans leur chambre de culture et complètement étalées sur la surface du bas (voir description détaillée au Chapitre 3 § 3.5.3), on remplace le milieu de culture dans lequel baignent les cellules par du milieu de culture contenant 0,5 mM d'hydroxyurée (HU). On laisse les cellules dans ce milieu pendant 15 heures pour obtenir une accumulation des cellules en fin de phase G1 (voir Chapitre 3 § 3.5.2.1). Après 15 heures, on rince les chambres avec du PBS (Phosphate Buffered Saline ; Gibco) pour enlever le milieu de culture avec HU et on remet les cellules dans un milieu de culture normal (*i.e.* avec HEPES et sans HU, *cf.* Chapitre 3 § 3.3.3.). Les canaux de la chambre de cultures sont alors bouchés grâce à un capillaire (tuyau silatic d'un diamètre de 1 mm de VWR) rempli avec du milieu de culture, qui relie les deux canaux entre eux et on scelle hermétiquement les entrées des capillaires pour éviter tout contact de la chambre de culture avec l'extérieur. Pour finir, on installe la chambre de culture dans l'étau en

---

<sup>3</sup> Pour rappel :  $q = \left(4\pi n \sin(\theta/2)\right) / \lambda$  avec :  $n \approx 1.37$  et  $\lambda = 632,8 \cdot 10^{-9} \text{ m}$ , l'angle de diffusion  $\theta$  est lié à l'angle de détection  $\phi$  par la relation :  $\theta \approx \arcsin(\sin(\phi)/1.37)$  (*cf.* Chapitre 3 § 3.2.2).

dural (préalablement chauffé à 37°C) sur le montage de diffusion dynamique de la lumière (*cf.* Chapitre 3 § 3.3.2.).

À partir de là, nous avons utilisé deux procédures différents pour pouvoir sonder aussi bien le « début » que la fin de la phase G1 :

- i) **Pour l'étude de la dynamique du « début » de la phase G1.** (*Par début de la phase G1, on entend entre la troisième et la huitième heure après la mitose.*) Dans ce cas, on ne démarre pas les expériences tout de suite. On laisse la population de cellules évoluer et passer le « pic » de mitoses qui a lieu environ 9 à 10 heures après le rinçage (*cf.* Chapitre 3 § 3.5.2.1). On ne commence nos expériences qu'une fois que les cellules ont parfaitement réadhéré sur la surface de verre après leur division, soit environ 3 heures après la mitose (comme on l'a vu, les cellules sont très sensibles à l'irradiation laser pendant les 2, 3 heures suivant la division ; *cf.* Chapitre 3 § 3.2.3) ; donc environ 12 heures après le rinçage de HU.

En pratique, on filme les cellules qui sont dans la chambre de culture sur le montage de diffusion de la lumière, grâce à la caméra placée sur le montage, dès que l'on met en place la chambre de culture dans l'étau (acquisition à une image toutes les 5 minutes). Ainsi on peut vérifier que la très grande majorité des cellules font bien leur mitose entre 9 et 10 heures après le rinçage de HU, ce qui nous assure que le « blocage » avec HU a bien marché. Ensuite, ceci nous permet d'avoir « l'âge » exact des cellules visibles dans le champ (l'âge de la cellule est compté à partir du moment où les deux cellules issues d'une mitose se séparent). Quand la chambre de culture est installée sur le montage, il y a 4 à 5 cellules présentes dans le champ d'observation, après la 10<sup>ème</sup> heure on en a 8 à 10. Mais, comme les cellules bougent lors de leur réadhésion, quand on commence les expériences de diffusion dynamique de la lumière, il n'en reste plus que 6 ou 7 dans le champ d'observation dont on connaît exactement l'âge. On choisit une première cellule, on focalise le faisceau laser sur son noyau et l'on fait 30 minutes d'acquisition du signal de l'intensité lumineuse diffusée par ce noyau (3 mesures de 10 minutes enchainées), puis on passe à une deuxième cellule pour à nouveau 30 minutes d'acquisition du signal diffusé par le noyau de cette seconde cellule et ainsi de suite. Le champ sur lequel on visualise nos cellules, nous ne permet pas de sonder cette dynamique pour les deux dernières heures de la phase G1.

Avec cette procédure, lors de 2 expériences différentes, nous avons pu étudier 10 noyaux de cellules SHEP, dont « l'âge » dans la phase G1 varie entre 3 et 8 heures (Tableau 1)

Noyau	« Age » du noyau en phase G1	Noyau	« Age » du noyau en phase G1
1	3h – 3h30	6	5h30 – 6h
2	3h30 – 4h	7	6h – 6h30
3	4h – 4h30	8	6h30 – 7h
4	4h30 – 5h	9	7h – 7h30
5	5h – 5h30	10	7h30 – 8h

*Tableau 5.1. Age des noyaux de cellules SHEP sondées en « début » de phase G1.*

- ii) **Pour l'étude de la dynamique de la fin de la phase G1.** Pour sonder la dynamique des noyaux de cellules lors des deux dernières heures de la phase G1, nous avons utilisé la même procédure que Michaël Suissa a employée lors de sa thèse [1–4]. Celui-ci commençait les expériences de diffusion dynamique de la lumière dès que la chambre de culture est installée

sur le montage de diffusion de la lumière ; donc juste après le rinçage de HU. Normalement, si l'on en croit les références [1–4], dans les 2 heures, 2 heures et demie, suivant le retrait de HU du milieu de culture plus de 80% des cellules sont en de phase G1, puis ce pourcentage chute brutalement en dessous de 30% en moins d'une heure. Ceci suggère qu'au moment du retrait de HU du milieu de culture, la grande majorité des cellules est en fin phase G1 (et ceci pendant encore les 2 heures suivantes). Donc, en commençant nos mesures seulement quelques minutes après avoir remis les cellules dans un milieu de culture normal, nous avons de très grandes chances d'étudier la dynamique du noyaux lors des deux dernières heures de la phase G1.

Grâce à cette procédure, nous avons pu faire des mesures sur 9 noyaux de cellules SHEP supposées en fin de phase G1 (ces cellules ont été mesurées sur 3 cultures cellulaires différentes – 3, 4, 2). Bien sûr, dans ce cas là il est impossible de donner « l'âge » de la cellule, mais, néanmoins, on espère pouvoir observer des caractéristiques qui nous permettront de comparer la dynamique interne du noyau entre le début et la fin de la phase G1.

De plus, on peut noter qu'il existe un second intérêt pour nous à faire des mesures dans les mêmes conditions que celles qu'avait utilisées Michaël Suissa, car cela nous permet de comparer nos résultats avec les siens.

### 5.2.1.2. Résultats : dynamique « rapide » en phase G1 pour les cellules SHEP.

« Début » de la phase G1. Pour commencer, nous présentons tous les spectres « moyens » obtenus pour chacun des 10 noyaux du tableau 1 ; donc, pour des noyaux de cellules qui sont entre la troisième et la huitième heure de la phase G1.

Figure 5.20, nous montrons les 10 spectres qui ont été obtenus pour l'angle de détection de  $16^\circ$  (i.e.  $q \approx 2,75 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ ) ; Figure 5.21, nous présentons les 10 spectres pour l'angle de détection de  $27^\circ$  (soit  $q \approx 4,57 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ ) et Figure 5.22, nous affichons les 10 spectres pour l'angle de détection de  $38^\circ$  (soit  $q \approx 6,28 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ ). Nous pouvons remarquer que pour les 3 angles de détection, l'allure générale des spectres obtenus est relativement similaire.

Très grossièrement, on observe toujours :

- Une décroissance assez douce de  $g(s)$  aux temps très courts. On peut noter que la gamme de temps sur laquelle  $g(s)$  décroît semble d'autant plus étendue que l'angle de détection est petit, typiquement cette gamme s'étend de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  s pour  $16^\circ$  et de  $10^{-5}$  à  $4\text{--}5 \cdot 10^{-4}$  s pour  $27^\circ$  et  $38^\circ$ .
- Une « bosse », assez large, typiquement un peu plus d'une décade, qui est d'autant plus prononcée que la détection se fait à petit angle. Le maximum de cette bosse se trouve autour de  $2\text{--}3 \cdot 10^{-2}$  s pour  $16^\circ$ , autour de  $3 \cdot 10^{-3}$  s pour les noyaux les plus « jeunes » mesurés à  $27^\circ$  et vers  $3 \cdot 10^{-2}$  s pour les plus « vieux », autour de  $10^{-2}$  s pour les noyaux les plus « jeunes » à  $38^\circ$  et autour de  $3 \cdot 10^{-2}$  s pour les noyaux les plus « vieux ».
- Un ou deux petits « pics » (ou petites bosses), moins hauts et moins larges que la première « bosse » et à des temps plus « lents » ; au-delà de  $10^{-1}$  s à  $16^\circ$  et entre  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$  s à  $27^\circ$  et  $38^\circ$ . Ces petits pics sont plus marqués pour les noyaux les plus « jeunes » que pour les noyaux les plus « vieux » où ils ont tendance à s'élargir pour former une seule bosse assez large.
- Une augmentation forte de  $g(s)$  autour de 1 s, surtout pour les mesures à  $27^\circ$  et à  $38^\circ$ .

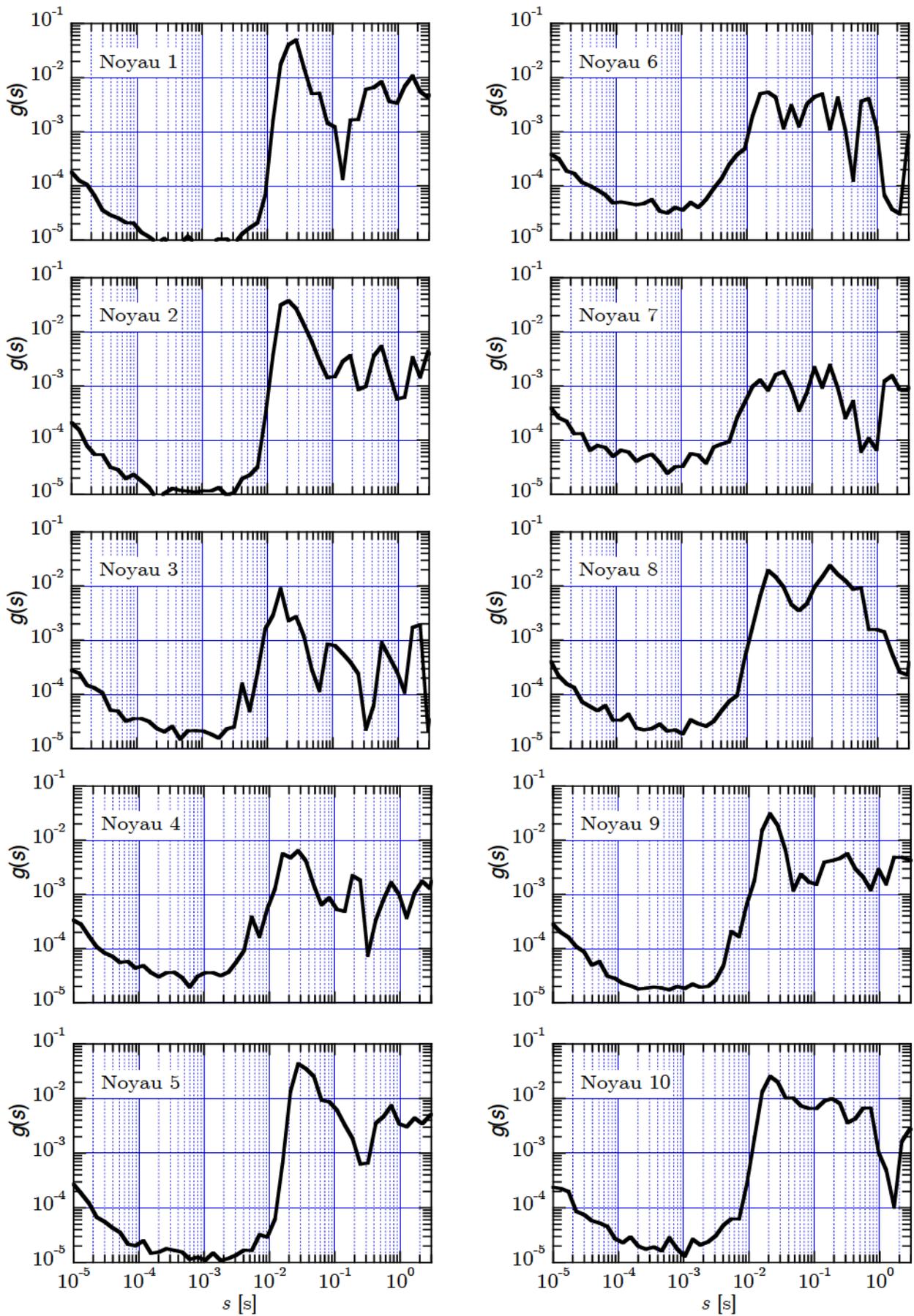


Figure 5.20. Spectres moyens pour les noyaux du tableau 1 obtenus à l'angle de détection de  $16^\circ$ .

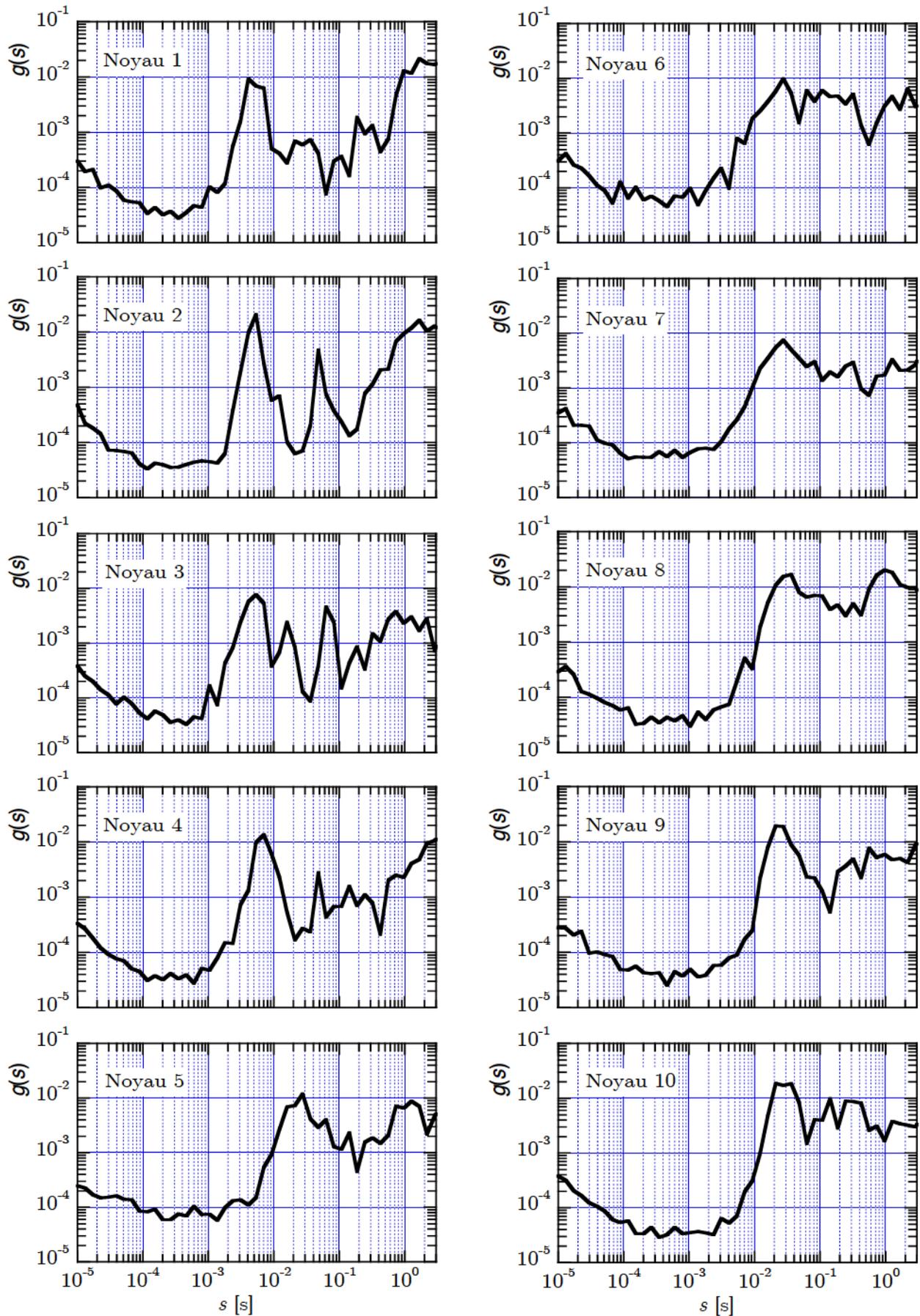


Figure 5.21. Spectres moyens pour les noyaux du tableau 1 obtenus à l'angle de détection de  $27^\circ$ .

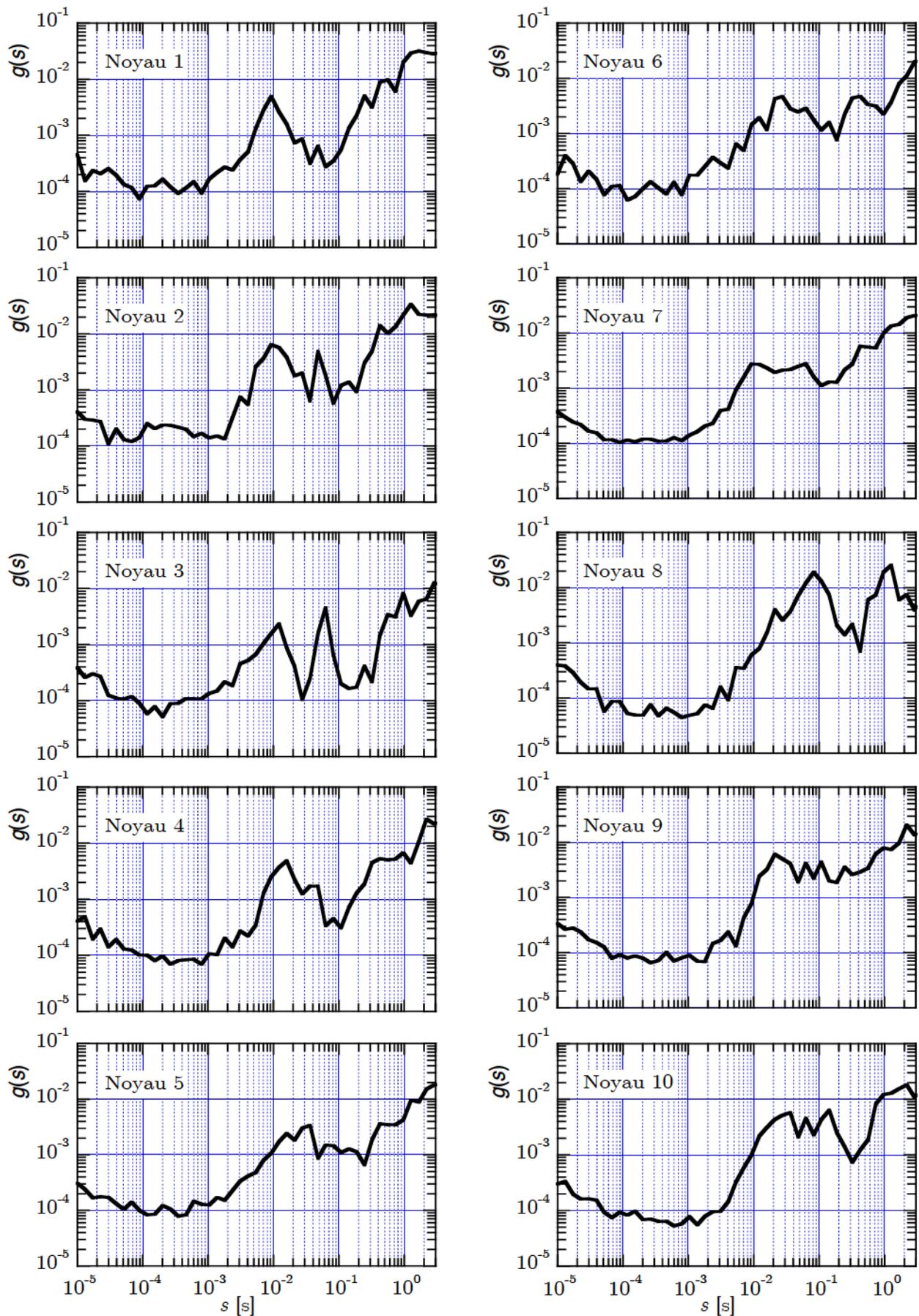
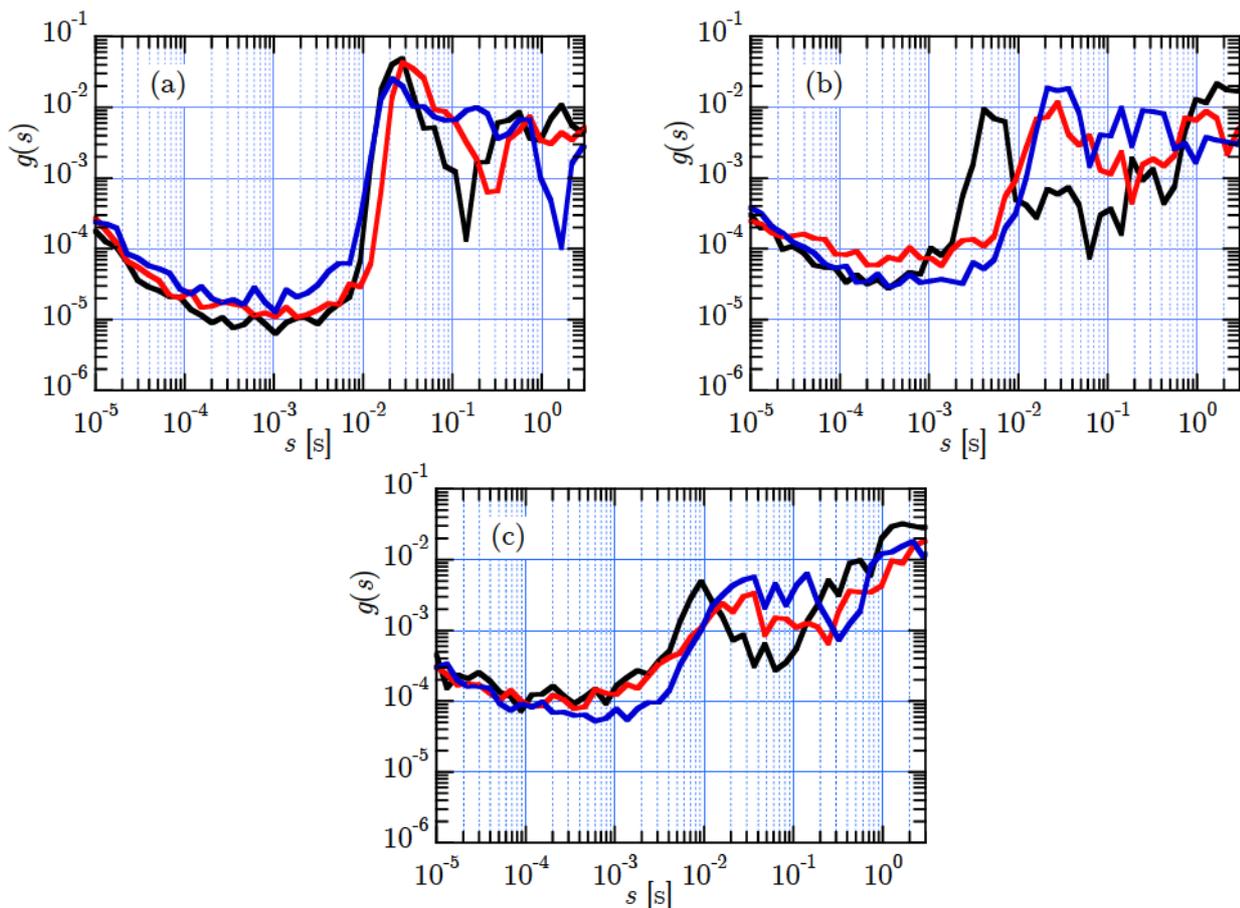


Figure 5.22. Spectres moyens pour les noyaux du tableau 1 obtenus à l'angle de détection de  $38^\circ$ .

Si on regarde plus en détail ces figures, nous pouvons aussi voir que pour les trois angles de détection il existe une évolution similaire des spectres  $g(s)$  quand le noyau « vieillit ».

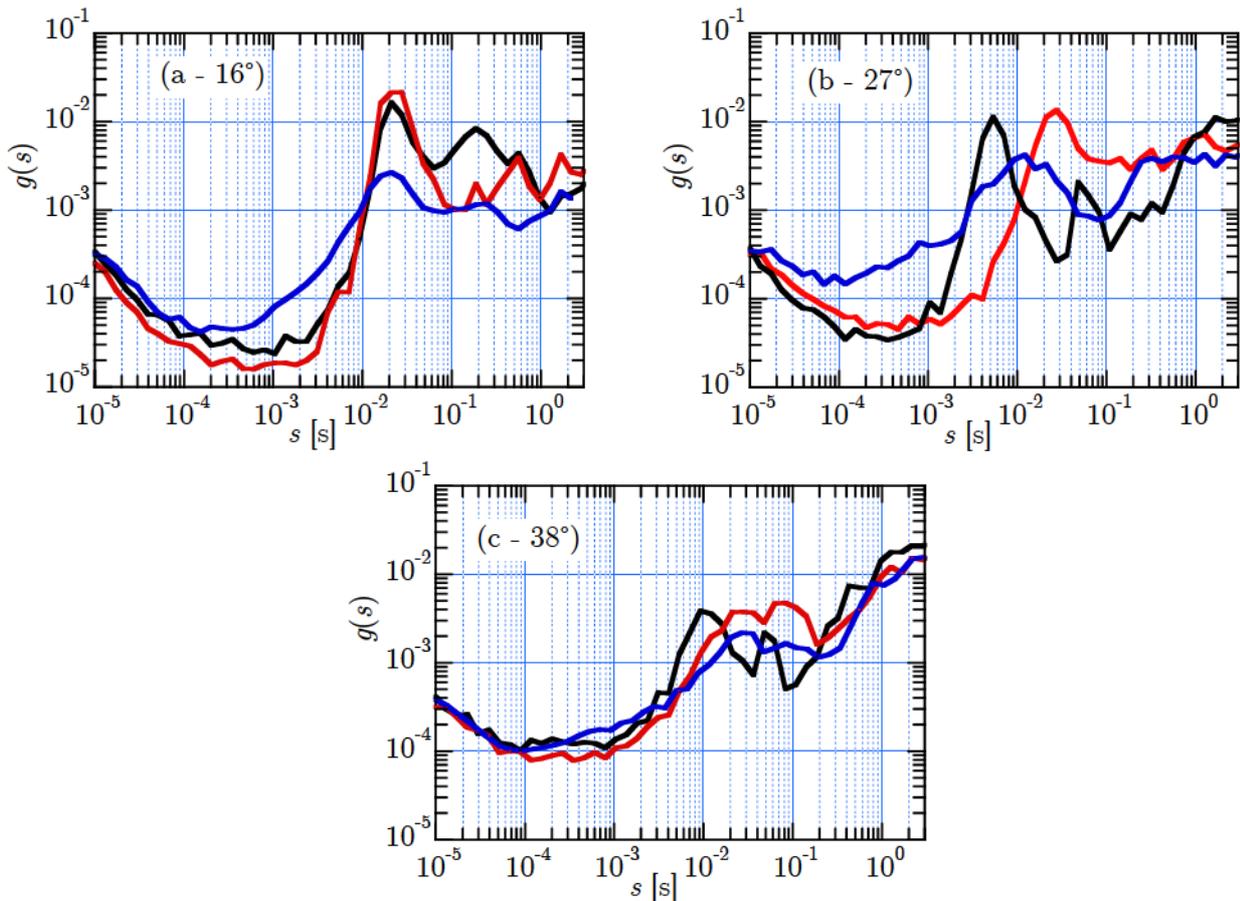
- Pour les quatre premiers noyaux, les spectres, pour un même angle, ont tous une forte ressemblance ; en particulier, les maxima de la première « bosse » sont tous très proches les uns des autres (autours de  $10^{-2}$  s) et toutes ces bosses sont assez symétriques.
- Pour les six noyaux suivants, à  $27^\circ$  et  $38^\circ$  on observe, à la fois, un glissement et un élargissement de cette « bosse » vers les temps plus lents ; ce glissement étant d'autant plus important que la détection se fait aux grands angles. On remarque aussi que cette première bosse perd sa symétrie et que les pics qui se trouvent à droite de la « bosse » disparaissent (ceci très probablement à cause du glissement de la première « bosse » vers les temps plus longs). Par contre, la décroissance de  $g(s)$  aux temps très courts ainsi que l'augmentation forte de  $g(s)$  autour de 1 s ne sont pas affectées. A  $16^\circ$ , la première bosse ne semble pas évoluer, mais on observe une modification importante de la dynamique autour de  $10^{-1}$  s.

Afin de mettre, plus clairement, en évidence cette évolution, pour chaque angle de détection, nous présentons sur le même graphe les spectres des noyaux 1, 5 et 10 (Figure 5.23), donc, environ 3h, 5h30 et 7h30 après leur mitose, *i.e.* après le début de la phase G1. Sur cette Figure, on voit clairement que les spectres du noyau 1 sont différents des spectres des noyaux 5 et 10, qui eux, semblent assez similaires.



**Figure 5.23.** Spectres moyens des noyaux 1 (3h après la mitose ; la courbe noire), 5 (5h30 après la mitose ; la courbe rouge) et 10 (7h30 après la mitose ; la courbe bleue), pour les différents angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ).

Avec cette première procédure nous observons un changement de comportement de la dynamique « rapide » assez net à partir du cinquième noyau, nous avons calculé la moyenne des spectres sur les quatre premiers noyaux et la moyenne des spectres sur les six noyaux suivants. Ceci nous donne une estimation de la dynamique interne « rapide » du noyau entre la troisième et la cinquième heure en phase G1 (*i.e.* moyenne des spectres des noyaux 1 à 4) ainsi qu'une estimation de cette dynamique entre la cinquième et la huitième heure en phase G1 (*i.e.* moyenne des spectres des noyaux 5 à 10). Ces moyennes sont présentées, pour les trois angles de détection, Figure 5.24 (courbes noires : dynamique « rapide » entre la troisième et la cinquième heure ; courbes rouges : dynamique « rapide » entre la cinquième et la huitième heure).



**Figure 5.24.** Pour chaque angle de détection (*a* :  $16^\circ$  ; *b* :  $27^\circ$  ; *c* :  $38^\circ$ ), moyenne des spectres entre la troisième et la cinquième heure en phase G1 (la courbe noire), moyenne des spectres entre la cinquième et la huitième heure en phase G1 (la courbe rouge) et la moyenne des spectres entre la huitième et la dixième heure en phase G1 (la courbe bleue).

**Dernières heures de la phase G1.** Pour l'étude de la dynamique du noyau lors des deux dernières heures de la phase G1, nous ne pouvons pas classer les noyaux en fonction de leur « âge » dans la phase G1. En effet, du fait de la procédure utilisée pour ces expériences, nous ne pouvons pas savoir depuis quand les cellules sur lesquelles ont fait les mesures sont en phase G1. Nous savons juste que dans les 2 à 3 heures qui suivent le rinçage de HU, les cellules étudiées ont de grandes chances d'être en toute fin de G1. Cependant, quand on choisit une cellule pour faire une mesure, il y a quand même une possibilité non négligeable qu'elle soit à un autre moment de la phase G1 ou même en phase S. On peut donc s'attendre à avoir des résultats qui sont assez différents d'une mesure à l'autre. D'ailleurs, nous pouvons remarquer une dispersion de la forme

des spectres obtenus sur ces noyaux. Certains de ces spectres (3 sur 9) ressemblent beaucoup aux spectres que l'on peut voir pour les noyaux 5 à 10, par contre, les 6 autres sont différents ; ils ne ressemblent à aucun des spectres montrés au-dessus. Pour les 3 angles de détections, leur allure générale est assez similaire. On observe toujours une décroissance de  $g(s)$  au temps courts, puis une bosse, mais, celle-ci est moins haute que dans les cas précédents et son maximum se trouve entre les maxima des spectres des noyaux 1 à 4 et les maxima des spectres des noyaux 5 à 10, puis un « trou » et, finalement, une remontée importante de  $g(s)$  entre  $10^{-1}$  et 1 s. Une des caractéristiques de ces spectres est une valeur bien plus élevée de  $g(s)$  pour les temps courts (typiquement dans la gamme  $10^{-4} - 10^{-3}$  s). On pourrait se dire que 3 cellules sont entre la cinquième et la huitième heure de la phase G1 et les 5 autres dans les deux dernières heures de G1, mais, ce serait peut être un peu optimiste. En conséquence, pour estimer la dynamique interne « rapide » du noyau lors des deux dernières heures de la phase G1, nous avons choisi de faire la moyenne des 8 spectres obtenus avec cette procédure. Cette moyenne est présentée, pour les trois angles de détection, Figure 5.24 (les courbes bleues).

Ceci est en assez bon accord avec les résultats de Michaël Suissa [1–4], qui, en utilisant la seconde procédure, trouvait que les distributions de temps caractéristiques qu'il mesurait étaient très larges, avec des comportements très différents d'un noyau à l'autre, ce qui l'avait conduit à faire l'hypothèse que la dynamique interne « rapide » du noyau d'une vivante en phase G1 n'était pas la même pour tous les instants de la phase G1 ; en somme qu'elle était fortement hétérogène. Nos résultats confirment cette hypothèse et montrent clairement que la dynamique interne « rapide » du noyau d'une cellule vivante en phase G1 évolue avec la progression de la cellule dans cette phase. Cette observation est intéressante parce qu'elle montre l'existence de « sous-phases » avec des dynamiques différentes, donc probablement avec des activités différentes, dans la phase G1. Cependant, à cette étape de notre étude, nous ne sommes pas capable d'aller plus loin dans notre analyse.

### 5.2.1.3. Résultats : dynamique « lente » en phase G1 pour les cellules SHEP.

Figure 5.25, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , obtenus pour les temps « lents », pour 3 des noyaux du tableau 1. Comme nous pouvons le voir sur cette figure et, comme nous l'avons déjà mentionné au § 1.2.2 de ce chapitre, la variabilité des spectres d'un noyau à l'autre est très importante et, nous avons du mal à voir une tendance sortir de ces spectres. Figure 5.26, nous présentons, les spectres moyens obtenus pour les 10 noyaux du tableau 1 mesurés à  $38^\circ$ . À part dans la gamme qui va de  $10^{-2}$  s à quelques  $10^{-1}$  s où l'on peut observer un changement de comportement assez net après le 4<sup>ème</sup> noyau, (mais, cette gamme de temps correspond à la gamme qui est aussi sondée par notre analyse « temps rapides »), aucune tendance ne semble se dégager pour les temps supérieurs à 1 s. Contrairement à ce l'on observe pour la dynamique « rapide », nous n'observons aucune évolution manifeste de la dynamique « lente » du noyau avec l'âge de la cellule.

Pour chaque angle de détection, si l'on prend l'ensemble des spectres obtenus et que l'on cherche la position des « pics » de  $g(s)$ , alors, on peut voir sortir une dizaine de temps caractéristiques différents, dans cette gamme des temps lents qui va de  $10^{-2}$  s à 30 s ( $11$  à  $16^\circ$ , et  $12$  à  $27^\circ$  et  $38^\circ$ ). Tous ces temps ne sont pas visibles sur tous les spectres (et quand ils sont visibles, leur amplitude respective varie d'un spectre à l'autre), il y a en moyenne 6–7 temps caractéristiques différents qui sortent par spectre, et ceci quelque soit l'angle de détection. Figure 5.25d, nous montrons la position des différents « pics » qui peuvent être observés (cercles noirs : position des « pics » à  $16^\circ$  ; carrés rouges : position des « pics » à  $27^\circ$  ; disques bleus : position des « pics » à  $38^\circ$ ). On peut remarquer que quelque soit l'angle de détection, la position des « pics »

varie exponentiellement avec leur ordre :  $A(\phi)\exp(\beta.N)$ , où  $A$  dépend de l'angle de détection et  $\beta$  vaut environ 0,6 pour les 3 angles (en d'autres mots l'ordre des « pics » varie logarithmiquement avec  $s$ ). De plus, pour un « pic » donné, le temps caractéristique mesuré à  $16^\circ$  est plus grand que celui à  $27^\circ$  qui est lui même plus grand que celui à  $38^\circ$  (i.e.  $A(\phi)$  diminue  $\phi$  quand augmente). Ceci suggère que la dynamique « lente » du noyau est d'autant plus lente que l'angle de détection est petit.

À ce point là de notre étude il est difficile d'aller très loin dans la description de ces résultats. Nous poursuivrons la discussion sur les modes lents une fois que nous aurons présenté les résultats obtenus pour toutes les phases.

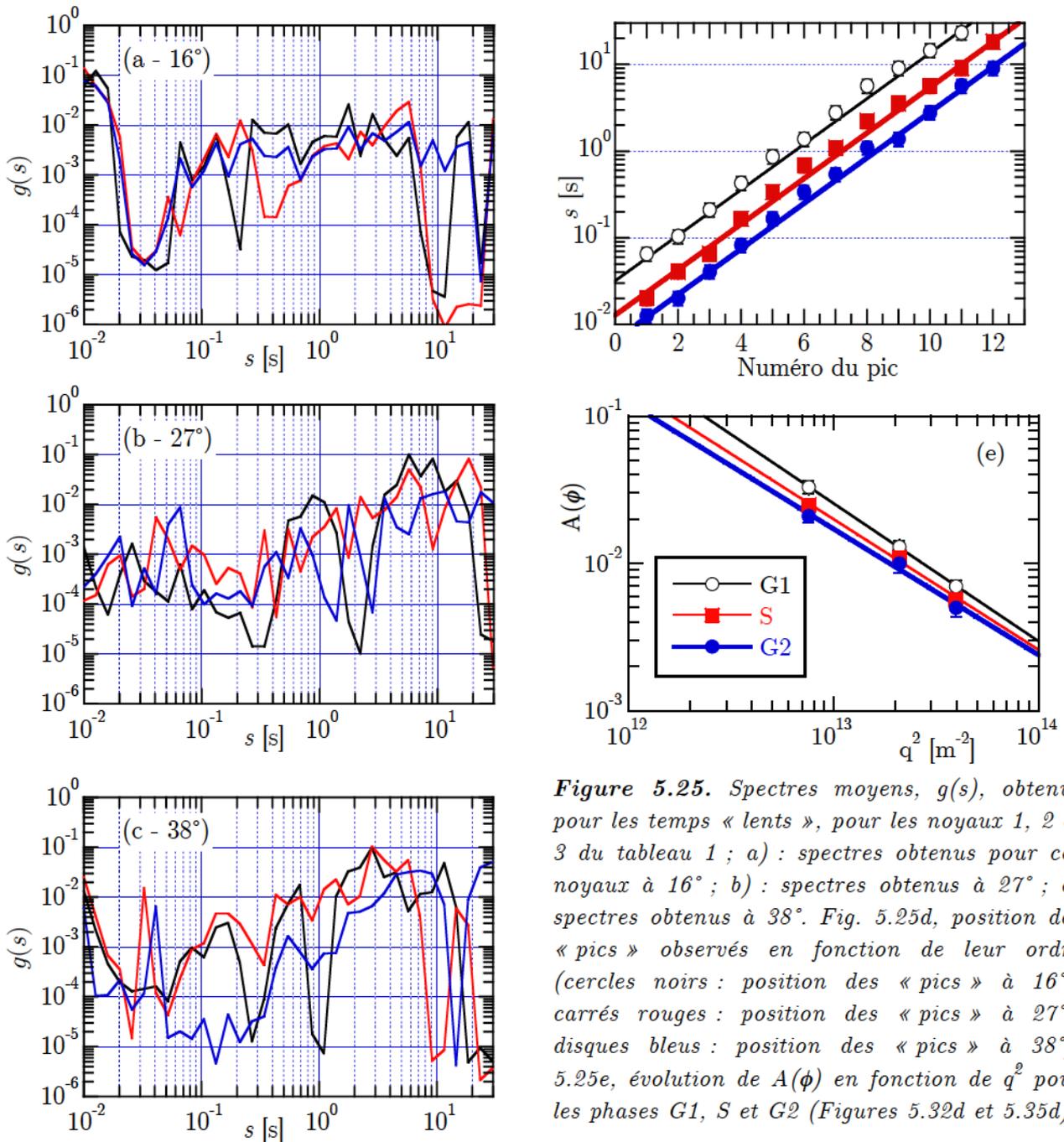
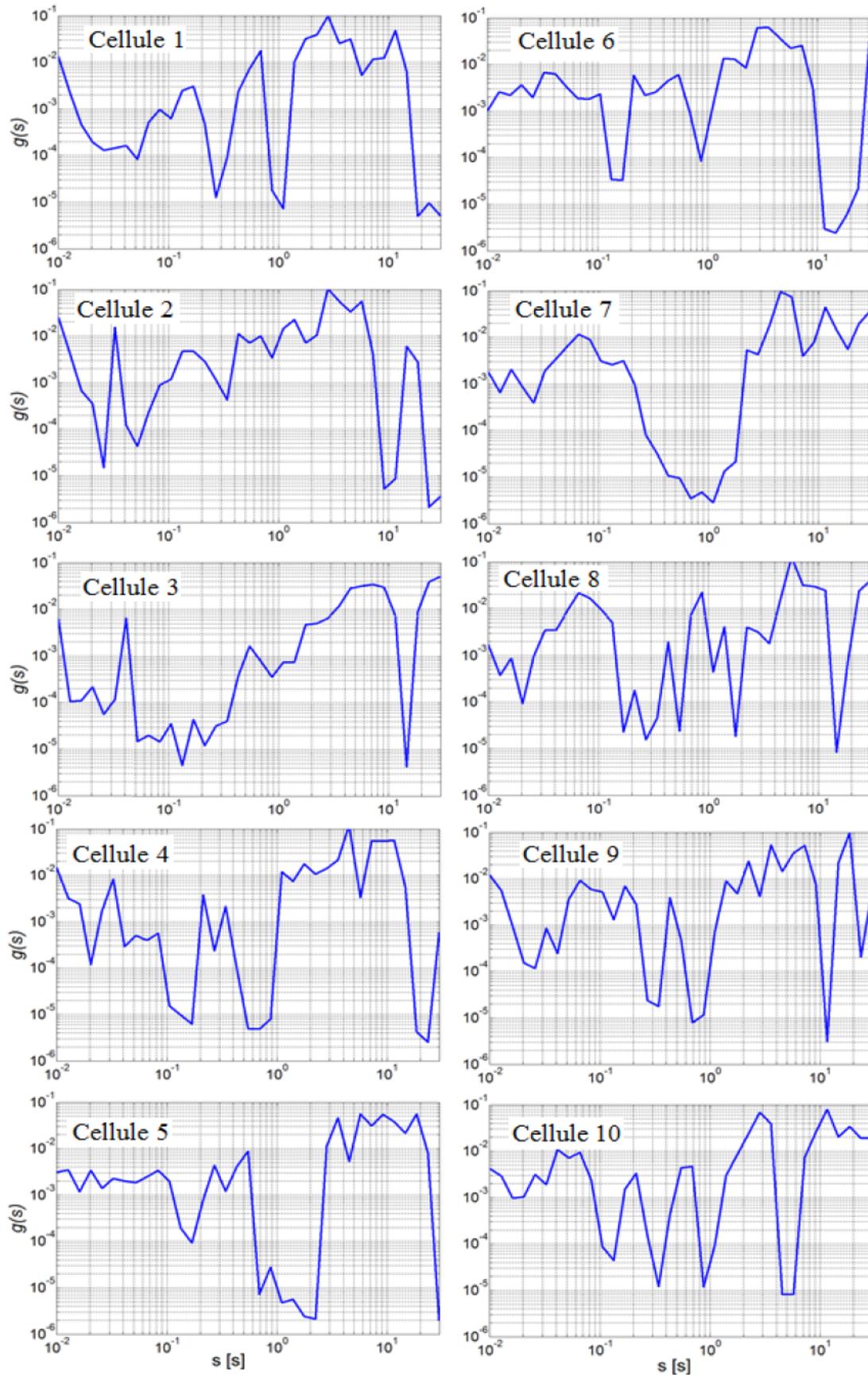


Figure 5.25. Spectres moyens,  $g(s)$ , obtenus pour les temps « lents », pour les noyaux 1, 2 et 3 du tableau 1 ; a) : spectres obtenus pour ces noyaux à  $16^\circ$  ; b) : spectres obtenus à  $27^\circ$  ; c) spectres obtenus à  $38^\circ$ . Fig. 5.25d, position des « pics » observés en fonction de leur ordre (cercles noirs : position des « pics » à  $16^\circ$  ; carrés rouges : position des « pics » à  $27^\circ$  ; disques bleus : position des « pics » à  $38^\circ$ ). 5.25e, évolution de  $A(\phi)$  en fonction de  $q^2$  pour les phases G1, S et G2 (Figures 5.32d et 5.35d).



**Figure 5.26.** Spectres moyens des temps caractéristiques « lents » obtenus pour les 10 cellules SHEP en phase G1 du tableau 1 à l'angle de détection de  $38^\circ$ .

### 5.2.2. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante SHEP en phase S.

Là encore, nous commençons cette partie par la description de la procédure expérimentale que nous avons utilisée pour nous permettre d'obtenir des populations de cellules qui sont majoritairement en phase S.

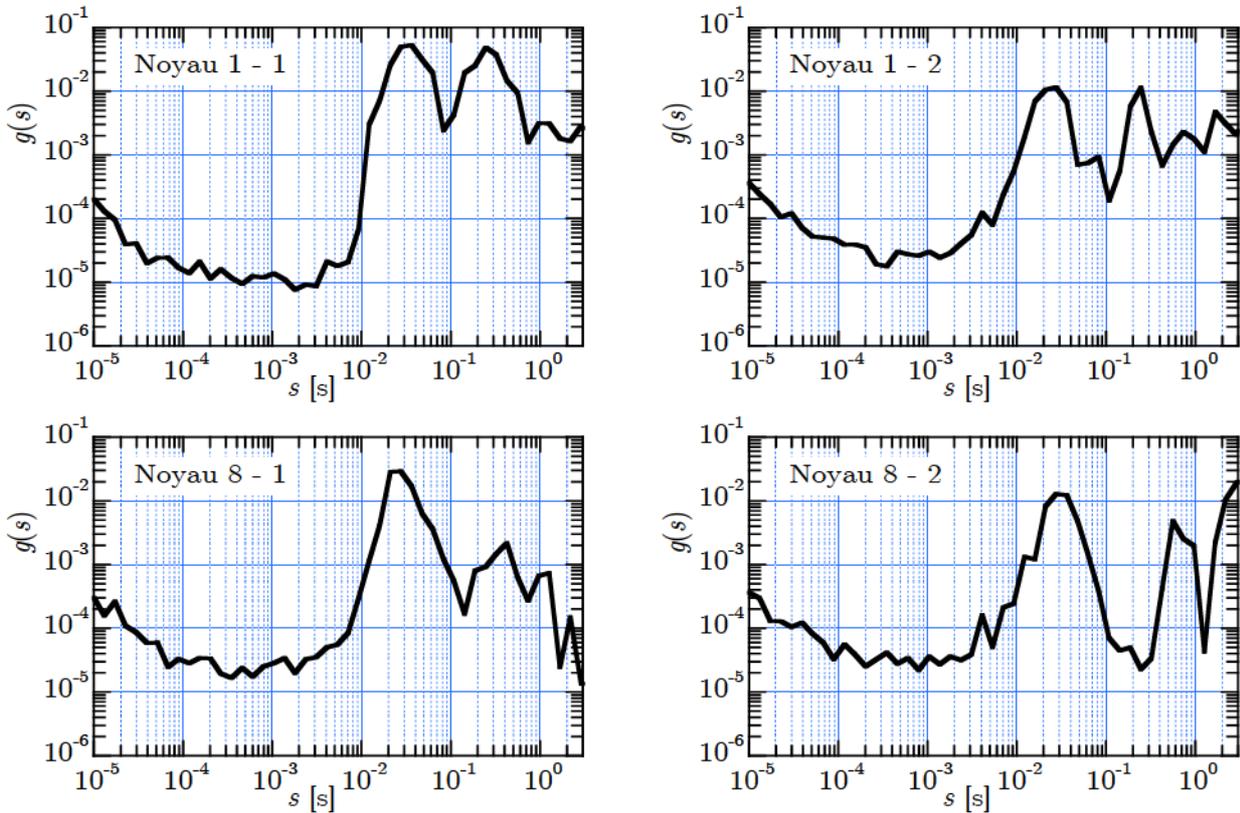
#### 5.2.2.1. Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau en phase S.

En pratique, on commence par appliquer exactement le même protocole que pour obtenir des populations en G1 jusqu'au moment où les cellules sont introduites dans leur chambre de culture et ont complètement adhéré sur la surface du bas (voir Chapitre 3 § 3.5.3). À partir de ce moment-là, on applique, dans la chambre de culture la procédure de « double blocage » telle que nous l'avons décrite au chapitre 3 § 3.5.2.2). Tout d'abord, on remplace le milieu dans lequel baignent les cellules par du milieu de culture contenant 2 mM de Thymidine. On laisse les cellules dans ce milieu de culture pendant 17 heures, puis on rince avec du PBS et on remet les cellules dans du milieu de culture normal (*i.e.* avec HEPES et sans Thymidine, *cf.* Chapitre 3 § 3.3.3.). On laisse les cellules dans ce milieu pendant 9 heures pour faire redémarrer le cycle cellulaire, puis on remplace, à nouveau, ce milieu de culture normal par du milieu de culture contenant 2 mM de Thymidine que l'on laisse agir pendant 18 heures. Ensuite, on rince les chambres avec du PBS pour enlever le milieu de culture avec la Thymidine et on remet les cellules dans un milieu de culture normal. Les canaux de la chambre de cultures sont alors bouchés grâce à un capillaire (tuyau silatic d'un diamètre de 1 mm de chez VWR) rempli avec du milieu de culture, qui relie les deux canaux entre eux et on scelle hermétiquement les entrées des capillaires pour éviter tout contact de la chambre de culture avec l'extérieur. Pour finir, on installe la chambre de culture dans l'étau en dural (préalablement chauffé à 37°C) sur le montage de diffusion dynamique de la lumière (*cf.* Chapitre 3 § 3.3.2.).

Si l'on en croit nos mesures de FACS (Chapitre 3 § 3.5.2.2) dans les 4 heures qui suivent le second retrait de la Thymidine du milieu de culture plus de 85% des cellules sont en de phase S. Ce pourcentage va chuter brutalement en dessous de 35% entre la quatrième et la cinquième heure suivant le retrait de la Thymidine. Donc, comme la phase S dure 4 heures pour les lignées cellulaires que nous avons étudiées, en commençant nos mesures seulement quelques minutes après avoir remis les cellules dans un milieu de culture normal, nous avons la possibilité d'étudier la dynamique interne du noyaux lors de la durée complète de la phase S. Bien sûr, avec cette procédure, il est impossible de donner « l'âge » exacte de la cellule, mais, néanmoins, on peut espérer observer des caractéristiques qui nous permettront de comparer la dynamique interne du noyau entre le début et la fin de la phase S et surtout entre la phase S et les phase G1 et G2. Grâce à cette procédure, nous avons pu faire des mesures sur 16 noyaux de cellules SHEP, normalement, en phase S (ces cellules ont été mesurées sur 2 cultures cellulaires différentes – 8 et 8).

#### 5.2.2.2. Résultats : dynamique « rapide » en phase S pour les cellules SHEP.

Pour chaque angle de détection, les spectres obtenus sur ces 16 noyaux présentent des ressemblances assez importantes. Nous n'allons pas ici présenter les trois spectres obtenus pour chacun des 16 noyaux étudiés, mais seulement 4, pris au début et à la fin des deux expériences.



**Figure 5.27.** Spectres du premier noyau de la première expérience (Noyau 1-1), du huitième noyau de la première expérience (Noyau 8-1), du premier noyau de la seconde expérience (Noyau 1-2) et du huitième noyau de la seconde expérience (Noyau 8-2), obtenus à  $16^\circ$ .

Donc, pour les 3 angles (Figures 5.27, 5.28 et 5.29), nous présentons les spectres obtenus pour les deux premiers noyaux et les deux derniers noyaux de chaque culture cellulaire étudiée. En haut à gauche le spectre obtenu sur le premier noyau de la première expérience (Noyau 1-1) ; en bas à gauche le spectre obtenu sur le huitième noyau de la première expérience (Noyau 8-1) ; en haut à droite le spectre obtenu sur le premier noyau de la seconde expérience (Noyau 1-2) ; en bas à droite le spectre obtenu sur le huitième noyau de la seconde expérience (Noyau 8-2).

- À  $16^\circ$  (Figure 5.27), on observe une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, typiquement dans la gamme  $10^{-5} - 3 \cdot 10^{-3}$  s, puis une bosse dont le maximum se trouve vers  $3 \cdot 10^{-2}$  s, un minimum de  $g(s)$  autour de  $10^{-1}$  s et, une ou deux bosses entre  $10^{-1}$  et 1 s. Les amplitudes de  $g(s)$  semblent moins grandes pour les derniers noyaux (Noyau 8-1 et Noyau 8-2), mais en dehors de cette observation, tous les noyaux montrent des spectres assez similaires ; on ne voit pas de différences prononcées.
- À  $27^\circ$  (Figure 5.28), on observe toujours une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, dans la gamme  $10^{-5} - 10^{-3}$  s, donc sur une plage un peu moins étendue qu'à  $16^\circ$ . On peut aussi remarquer que cette décroissance est moins marquée qu'à  $16^\circ$  puisque la valeur de  $g(s)$  ne passe jamais en dessous de  $7 \cdot 10^{-5}$ . On voit ensuite une bosse, dont le maximum se trouve autour de  $10^{-2} - 2 \cdot 10^{-2}$  s, puis un minimum de  $g(s)$  autour de  $10^{-1}$  s suivi d'une remontée de  $g(s)$ . Là encore, on n'observe pas de différences marquées entre les différents spectres.
- À  $38^\circ$  (Figure 5.29), on observe encore la décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, mais sur une gamme encore plus réduite,  $10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$  s et avec une valeur de  $g(s)$  qui ne passe quasiment pas en dessous de  $10^{-4}$ . Ensuite, on a une augmentation lente de  $g(s)$  jusque vers

$2.10^{-2}$  s, puis un minimum de  $g(s)$  vers  $10^{-1}$  s suivi par une remonté de  $g(s)$ . Pour cet angle aussi, il n'y a pas de dissemblances remarquables entre les différents spectres.

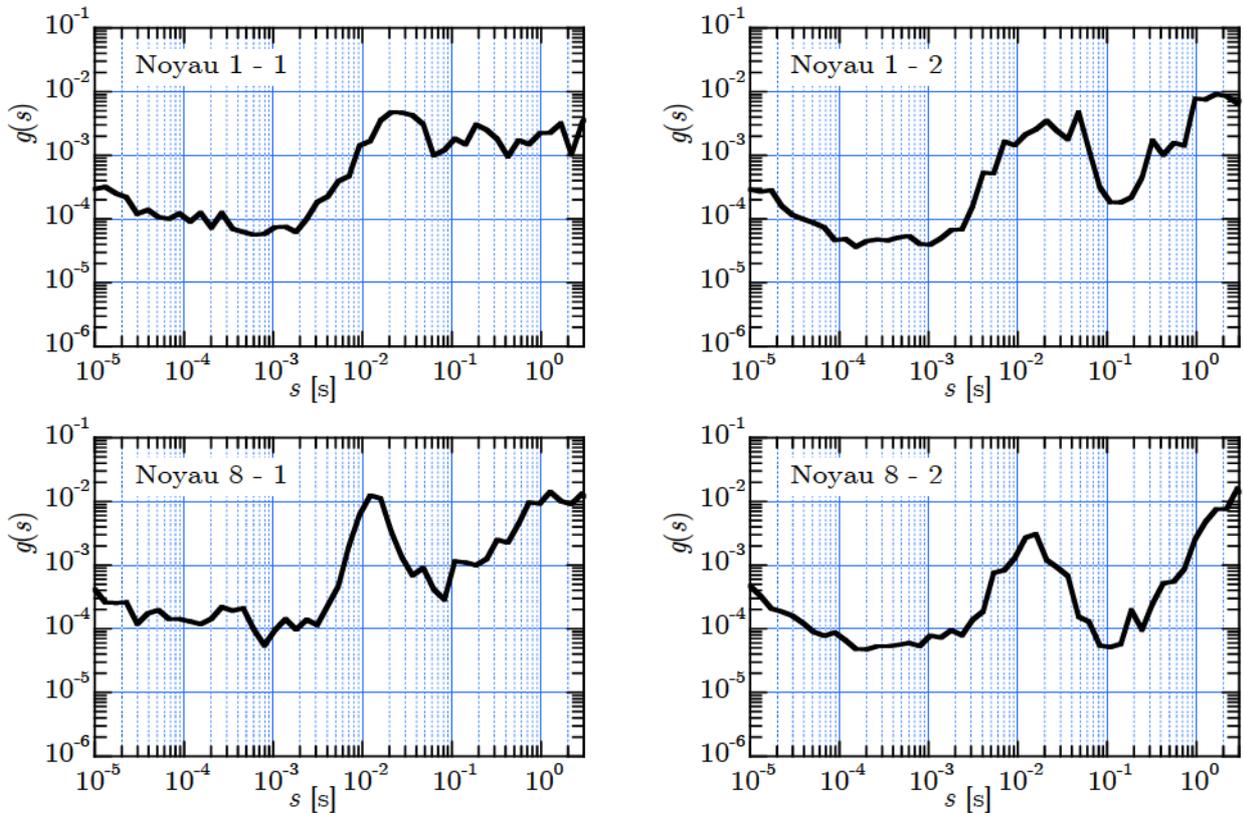


Figure 5.28. Spectres à  $27^\circ$  pour les quatre mêmes noyaux que pour la Figure 5.27.

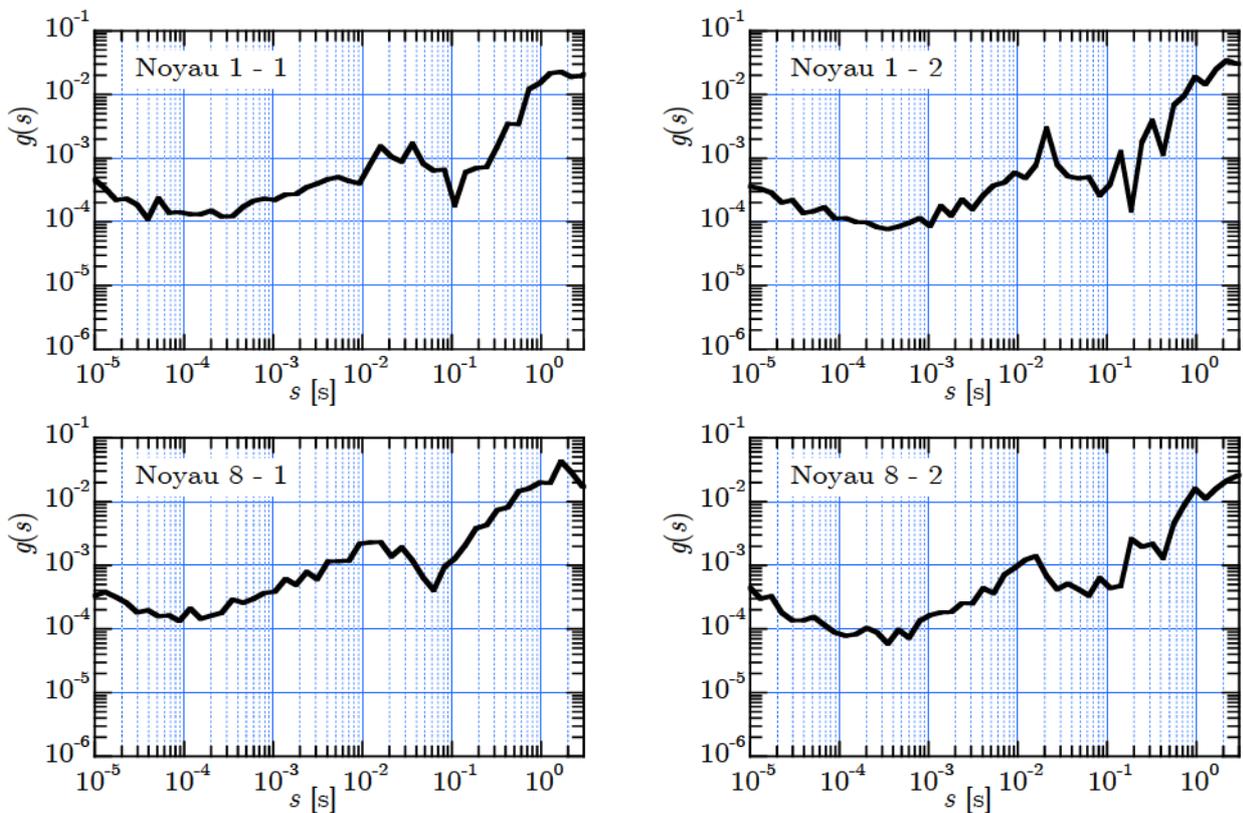
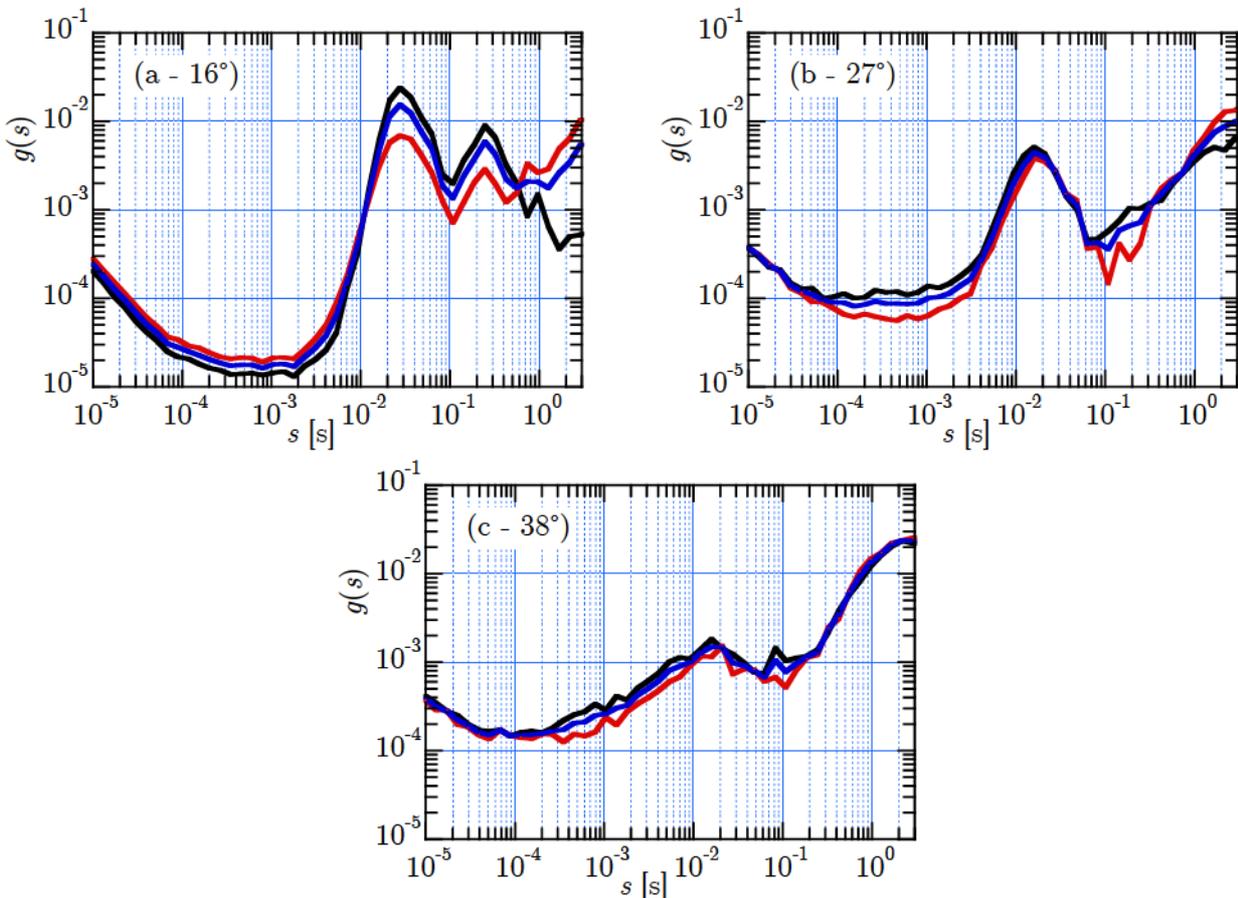


Figure 5.29. Spectres à  $38^\circ$  pour les quatre mêmes noyaux que pour la Figure 5.27.

La variabilité des spectres est faible. Même s'il existe une probabilité forte pour que les cellules que l'on étudie en début d'expérience soient en début de phase S et que celles que l'on investigate en fin d'expérience soient en fin de phase S, nous ne connaissons pas précisément l'âge des cellules sur lesquelles on fait les mesures. Cette incertitude associée à la faible variation des spectres ne nous permet pas de conclure si les petites disparités entre les spectres sont justes le fait de « fluctuations », ou d'une vraie évolution temporelle de la dynamique « rapide » du noyau en phase S. Cependant, d'après nos résultats, on peut penser que s'il existe une évolution temporelle de la dynamique « rapide » du noyau en phase S, celle-ci doit être faible.

Figure 5.30, nous montrons les moyennes réalisées sur chacune des deux expériences, ces moyennes ont été calculées sur les huit spectres obtenus dans les deux cas (les courbes noires pour les moyennes réalisées sur la première expérience ; les courbes rouges pour les moyennes réalisées sur la seconde expérience). Les courbes bleues sont, elles, les moyennes sur les deux expériences réunies (donc sur les 16 spectres). Les deux expériences donnent des résultats très proches et l'on peut penser que nous avons là une bonne estimation de la dynamique « rapide » d'un noyau en phase S. La dynamique « rapide » de la phase S, semble donc relativement homogène tout au long de la durée de cette phase.

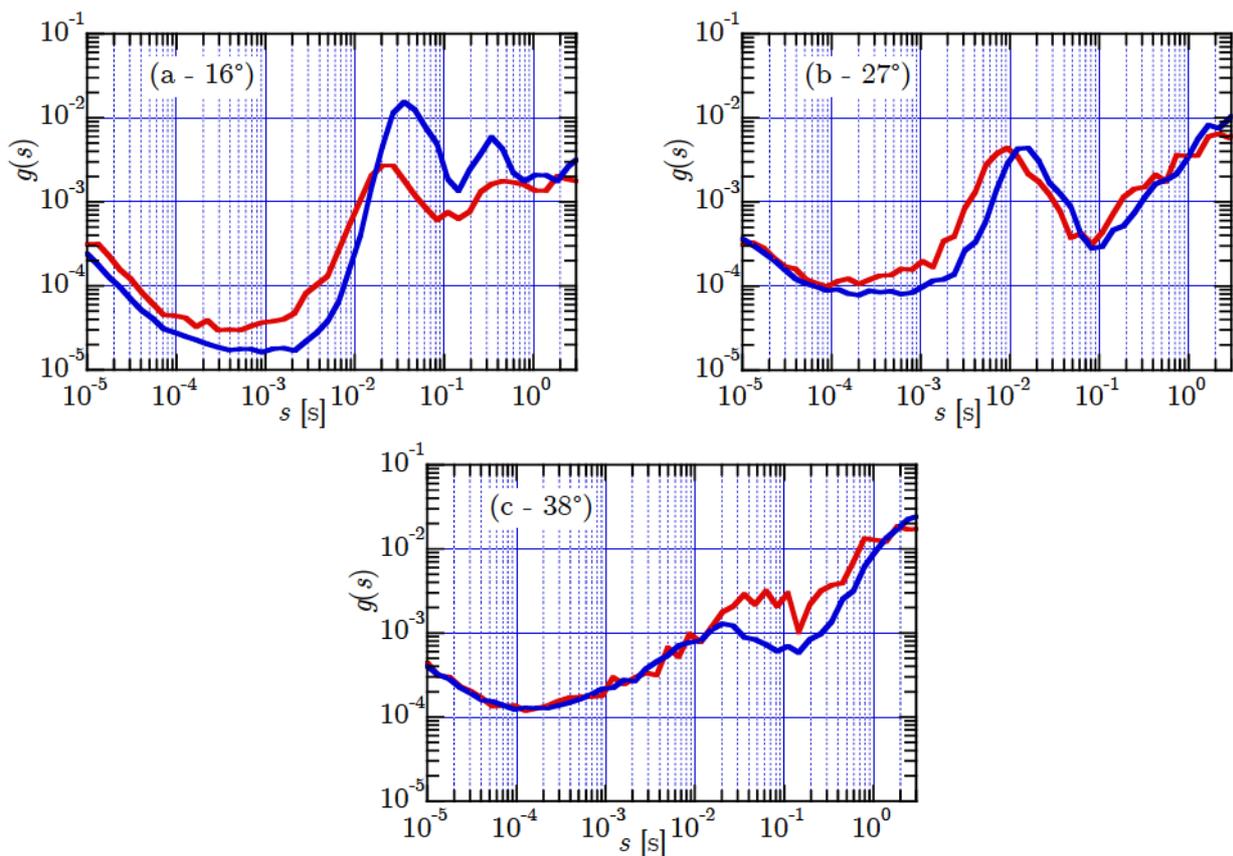


**Figure 5.30.** Pour chaque angle de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), moyennes des spectres obtenus sur des noyaux de cellules en phase S ; courbes noires : moyennes réalisées sur les 8 noyaux de la première expérience ; les courbes rouges : moyennes réalisées sur les 8 noyaux de la seconde expérience ; courbes bleues : moyennes calculées sur les 16 noyaux étudiés.

Pour confirmer cela, nous avons cherché à comparer ces résultats avec des résultats obtenus sur des populations de cellules où seulement 60% des cellules sont en phase S (au lieu de 85% pour

les résultats présentés au dessus). Travailler avec de telles populations est suffisant pour obtenir une estimation « grossière » de la dynamique « rapide » de la phase S. Donc, normalement, si nos mesures sont correctes, les spectres ainsi obtenus ne devraient pas être trop différents de ceux présentés Figure 5.30. Obtenir des populations avec ce pourcentage de cellules en phase S est relativement facile. En effet, nous savons [1–4] que pour une population de cellules SHEP ayant passé 15 heures dans un milieu de culture contenant 0,5 mM de HU, entre 3 heures et, à peu près, 7 heures après le rinçage de HU, environ de 60% des cellules sont en phase S. Donc, nous avons simplement poursuivi les mesures sur les cultures cellulaires que nous avons préparées pour étudier les deux dernières heures de la phase G1

Nous avons mesuré 10 noyaux (5 par cultures cellulaires étudiées), normalement, nous devons avoir 6 noyaux de cellules en phase S et 2 ou 3 en fin de phase G1 et en phase G2. Nous observons des différences, parfois importante, entre les spectres obtenus, ce qui est certainement dû à l'hétérogénéité des populations de cellules. Mais, avec 60% de cellules en phase S, les moyennes de ces spectres devraient quand même refléter les grandes tendances de la dynamique « rapide » du noyau pour la phase S. Les moyennes des spectres sur ces 12 noyaux sont présentées pour chaque angle de détection Figure 5.31 (les courbes rouges ; les courbes bleues sont les moyennes obtenues sur les 16 noyaux en phase S déjà présentées Figure 5.30 que nous remontrons à titre de comparaison).



**Figure 5.31.** Pour chaque angle de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), moyennes des spectres obtenus sur les 12 noyaux étudiés entre 3 et 6 heures après le retrait du milieu de culture avec HU (répartition d'environ 60% de cellules en phase S, 20% en phase et 20% en phase G2), les courbes rouges ; les courbes bleues sont les moyennes obtenues sur les 16 noyaux en phase S déjà présentées Figure 5.30.

Comme nous l'avons déjà écrit, ces dernières mesures ne sont que des estimations « grossières » de la dynamique « rapide » de la phase S, néanmoins, on retrouve assez bien les caractéristiques principales des résultats obtenus sur des populations de cellules qui sont très majoritairement en phase S. En conséquence, on peut raisonnablement supposer que grâce à la méthode du double blocage à la Thymidine, nous avons réussi à mesurer proprement la dynamique interne « rapide » des noyaux de cellules en phase S.

Une chose importante que l'on peut faire remarquer sur ces mesures sur des populations de cellules majoritairement en phase S, c'est que les largeurs de la première « bosse » de  $g(s)$  sont inférieures à celles obtenues sur les noyaux des cellules en fin de phase G1 (Figure 5.24), comme si la distribution des temps caractéristiques en phase S était moins large qu'en fin de phase G1. Ceci était une hypothèse formulée par Michaël Suissa [1-4] sur la base de ses résultats ; il lui semblait que la dynamique « rapide » en phase S était « moins riche » qu'en phase G1 (les valeurs des exposants d'étirement des exponentielles étirées qu'il utilisait pour analyser ses résultats étaient nettement plus petits en phase G1 qu'en phase S, indiquant ainsi une distribution de temps caractéristiques plus larges). Nos résultats confirment cette hypothèse. Michaël Suissa avait aussi l'impression que la phase S était beaucoup moins « hétérogène » que la phase G1, ce que nos résultats confirment aussi.

### 5.2.2.3. Résultats : dynamique « lente » en phase S pour les cellules SHEP.

Figure 5.32, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules SHEP en phase S.

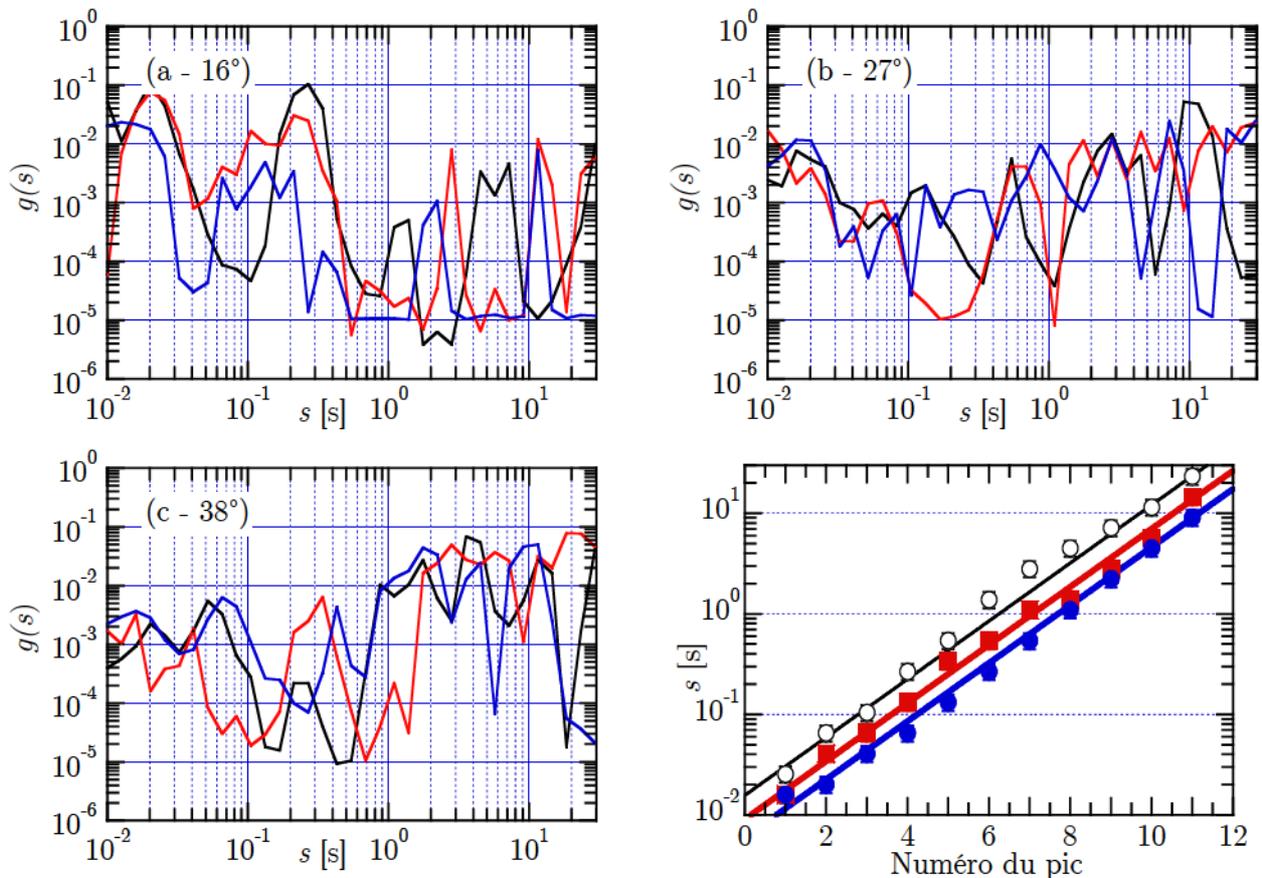


Figure 5.32. Pour chaque angle de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), spectres moyens des temps caractéristiques « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules SHEP en phase S. Fig. 5.32d, position des « pics » observés en fonction de leur ordre.

Si l'on prend l'ensemble des spectres obtenus et que l'on cherche la position des « pics » de  $g(s)$ , on voit sortir 12 temps caractéristiques différents quelque soit l'angle de détection. Comme pour la phase G1, tous ces temps ne sont pas visibles sur tous les spectres, il y a en moyenne 6–7 temps caractéristiques différents qui sortent par spectre. Figure 5.32d, nous montrons la position des différents « pics » qui peuvent être observés (cercles noirs : position des « pics » à 16° ; carrés rouges : position des « pics » à 27° ; disques bleus : position des « pics » à 38°). Là encore, quelque soit l'angle de détection, la position des « pics » varie exponentiellement avec leur ordre :  $A(\phi)\exp(\beta.N)$ , où  $A(\phi)$  diminue quand l'angle de détection augmente et  $B$  vaut environ 0,6 (similaire au coefficient  $\beta$  de la phase G1).

Comme pour les noyaux de cellules en phase G1, l'analyse brute de ces données n'est pas évidente. Comme nous l'avons indiqué plus haut, nous poursuivrons la discussion sur les modes lents, plus loin, une fois que nous aurons présenté les résultats obtenus pour toutes les phases.

### 5.2.3. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante SHEP en phase G2.

Comme pour l'étude de la dynamique en phase G1 et en phase S, nous commençons cette partie par la description de la procédure expérimentale que nous avons utilisée pour obtenir des populations de cellules qui sont majoritairement en phase G2.

#### 5.2.3.1. Procédure pour l'étude de la dynamique du noyau en phase G2.

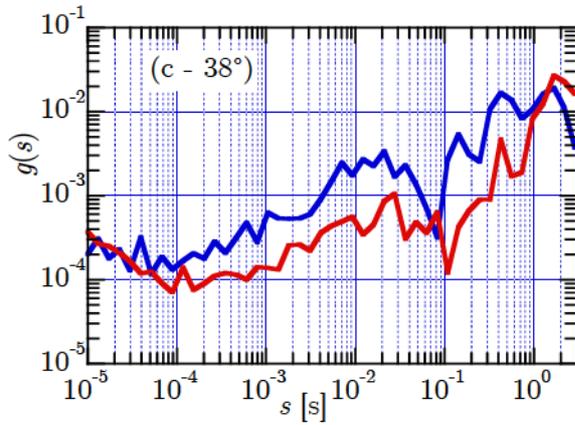
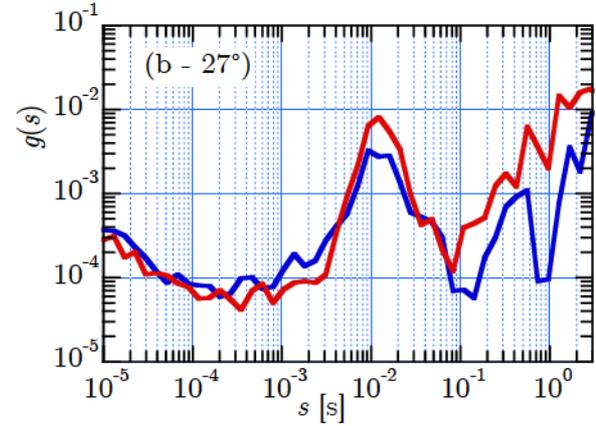
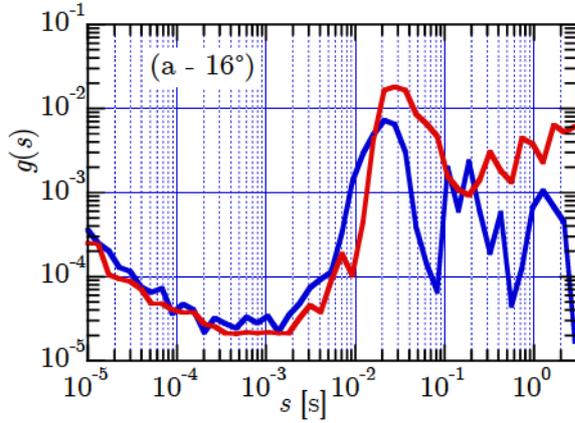
La procédure est très simple, on continue simplement les mesures sur les cultures cellulaires que nous avons préparées pour avoir des populations de cellules majoritairement en phase S. Nous avons vu avec les expériences de FACS (Chapitre 3 § 3.5.2.2) que 4 heures après que nous avons remplacé le milieu de culture contenant de la Thymidine par du milieu de culture normal, le pourcentage de cellules en phase S chutait dramatiquement. Et, de ce moment là jusqu'au moment où la majorité des cellules de cette culture font leur mitose (autour de la 7<sup>ème</sup> heure suivant le rinçage), nous avons entre 2 heures et 2 heures et demie pour faire des mesures sur une population de cellules majoritairement en phase G2 (typiquement autour de 60% ; durant cette période il y a environ entre 30% et 35% de cellules en phase S et 5% à 10% en phase G1). Vu le peu de temps disponible pour ces mesures, nous n'avons pu sonder que 8 noyaux de cellules SHEP, potentiellement en phase G2, sur les 2 cultures cellulaires que nous avons préparées (4 et 4).

#### 5.2.3.2. Résultats : dynamique « rapide » en phase G2 pour les cellules SHEP.

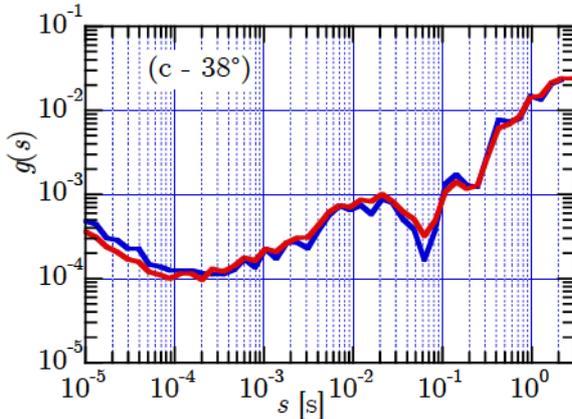
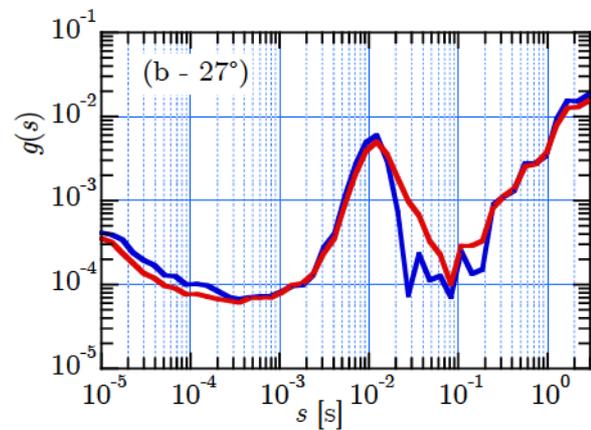
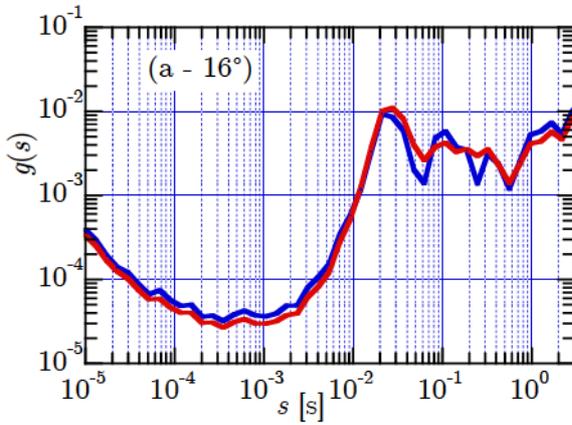
La variabilité des spectres d'un noyau à l'autre nous semble plus importante que celle que nous pouvons observer dans le cas des mesures réalisées sur des noyaux de cellules phase S (Figure 5.33). Ceci, soit parce que nous mesurons aussi bien des noyaux de cellules en phase S que des noyaux de cellules en phase G2 (ce qui est pleinement probable du fait de la répartition cellulaire), soit parce qu'il y a, intrinsèquement, une grande hétérogénéité au sein de la phase G2 (ce qui est aussi tout à fait possible). Comme en regardant les spectres, il est difficile de dire, sans aucun doute, si tel spectre correspond au noyau d'une cellule en phase G2 ou, au contraire, d'une cellule en phase S, nous ne pouvons pas trancher entre ces deux hypothèses.

Donc, pour essayer, néanmoins, d'estimer la dynamique « rapide » des noyaux en phase G2, nous allons reprendre la méthode utilisée par Michaël Suissa pour estimer la dynamique des différentes phases [1–4]. Nous faisons l'hypothèse que les populations de cellules que étudions dans ce cas sont composées de 65% de cellules en phase G2 et 35% en phase S, donc le spectre moyen obtenu pour l'ensemble de ces mesures (que l'on appelle  $g(G2^*)$ ) est un mélange du spectre de la phase G2 pure ( $g(G2)$ ) et de celui de la phase S pure ( $g(S)$ ) ;  $g(G2^*)=0,35.g(S)+0,65.g(G2)$ . On

estime alors simplement le spectre de la phase G2 pure,  $g(G_2)$ , à partir des spectres  $g(G_2^*)$  et de  $g(S)$  que nous avons mesurés, en disant que :  $g(G_2) = (g(G_2^*) - 0,35 \cdot g(S)) / 0,65$ .



*Figure 5.33. Pour 2 cellules mesurées entre la 4<sup>ème</sup> heure et la 7<sup>ème</sup> heure après rinçage de la Thymidine, spectres moyens obtenus pour les différents angles de détection.*

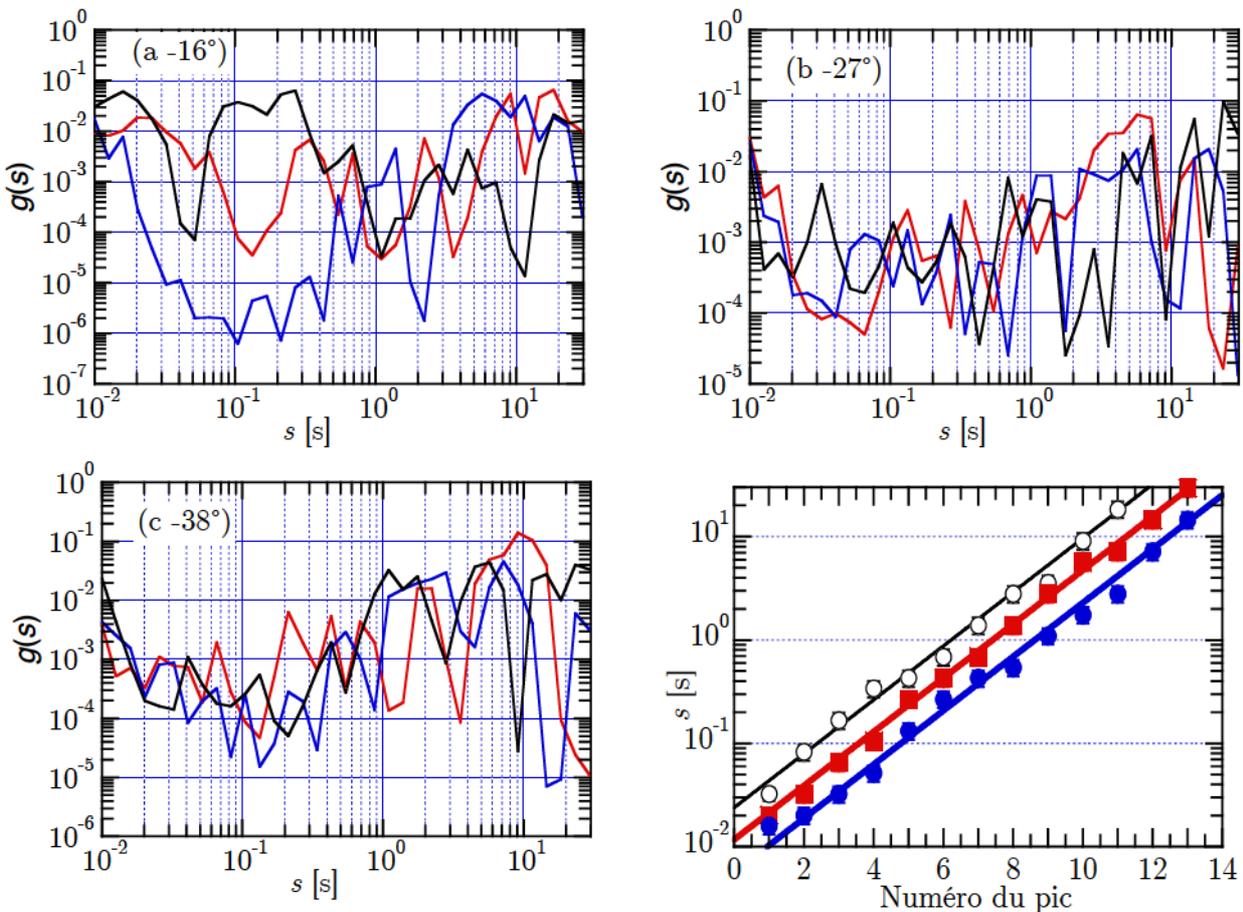


*Figure 5.34. Pour chaque angle de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), spectres moyens estimés pour la phase G2 (courbes bleues ;  $g(G_2)$ ) et spectres moyens calculés sur les 8 noyaux de cellules mesurés sur des populations de cellules majoritairement en phase G2 (courbes rouges ;  $g(G_2^*)$ ).*

Pour les 3 angles de détection, les spectres moyens ainsi estimés pour la phase G2 sont présentés Figure 5.34 (ce sont les courbes bleues ; les courbes rouges sont les spectres moyens « bruts » obtenus sur l'ensemble des 8 mesures,  $g(G2^*)$  que l'on montre aussi à titre de comparaison).

**5.2.2.3. Résultats : dynamique « lente » en phase G2 pour les cellules SHEP.**

Figure 5.35, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules SHEP en phase G2. Comme pour les noyaux de cellules en phase G1 ou en phase S, l'analyse brute des spectres moyens de la dynamique « lente » est loin d'être évidente. Juste en regardant les différents spectres obtenus, il est difficile de dire quelque chose de pertinent. En tout cas, il ne semble pas y avoir d'évolution claire (ou évidente) de cette dynamique « lente » avec le cycle cellulaire. Si l'on cherche la position des « pics » de  $g(s)$  pour l'ensemble des spectres obtenus et on voit maintenant sortir 13 temps caractéristiques différents. Là encore, tous ces temps ne sont pas visibles sur tous les spectres, il y a en moyenne 6 temps caractéristiques différents qui sortent par spectre. Figure 5.35d, nous montrons la position des différents « pics » qui peuvent être observés en fonction de leur ordre (toujours cercles noirs : position des « pics » à  $16^\circ$  ; carrés rouges : position des « pics » à  $27^\circ$  ; disques bleus : position des « pics » à  $38^\circ$ ). Quelque soit l'angle de détection, la position des « pics » varie exponentiellement avec l'ordre :  $A(\phi)\exp(\beta.N)$ , où  $A(\phi)$  varie inversement à l'angle de détection et  $B$  vaut environ 0,6 (donc similaire aux coefficients  $\beta$  pour les phases G1 et S).



**Figure 5.35.** Pour chaque angle de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), spectres moyens des temps caractéristiques « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules SHEP en phase G2. Fig. 5.35d, position des « pics » observés en fonction de leur ordre.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous poursuivrons la discussion sur les modes lents au paragraphe suivant.

#### 5.2.4. Evolution de la dynamique interne du noyau de cellules SHEP au cours du cycle cellulaire.

##### 5.2.4.1. Evolution de la dynamique interne « rapide ».

Figure 5.36, nous présentons pour les 3 angles de détection, les spectres associés à la dynamique « rapide » du noyau que nous avons mesuré en phase G1 (entre la 3<sup>ième</sup> et la 5<sup>ième</sup> heure, entre la 5<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> heure et entre la 8<sup>ième</sup> et la 10<sup>ième</sup> heure), en phase S (courbes rouges), et en phase G2 (courbes rouges pointillées).

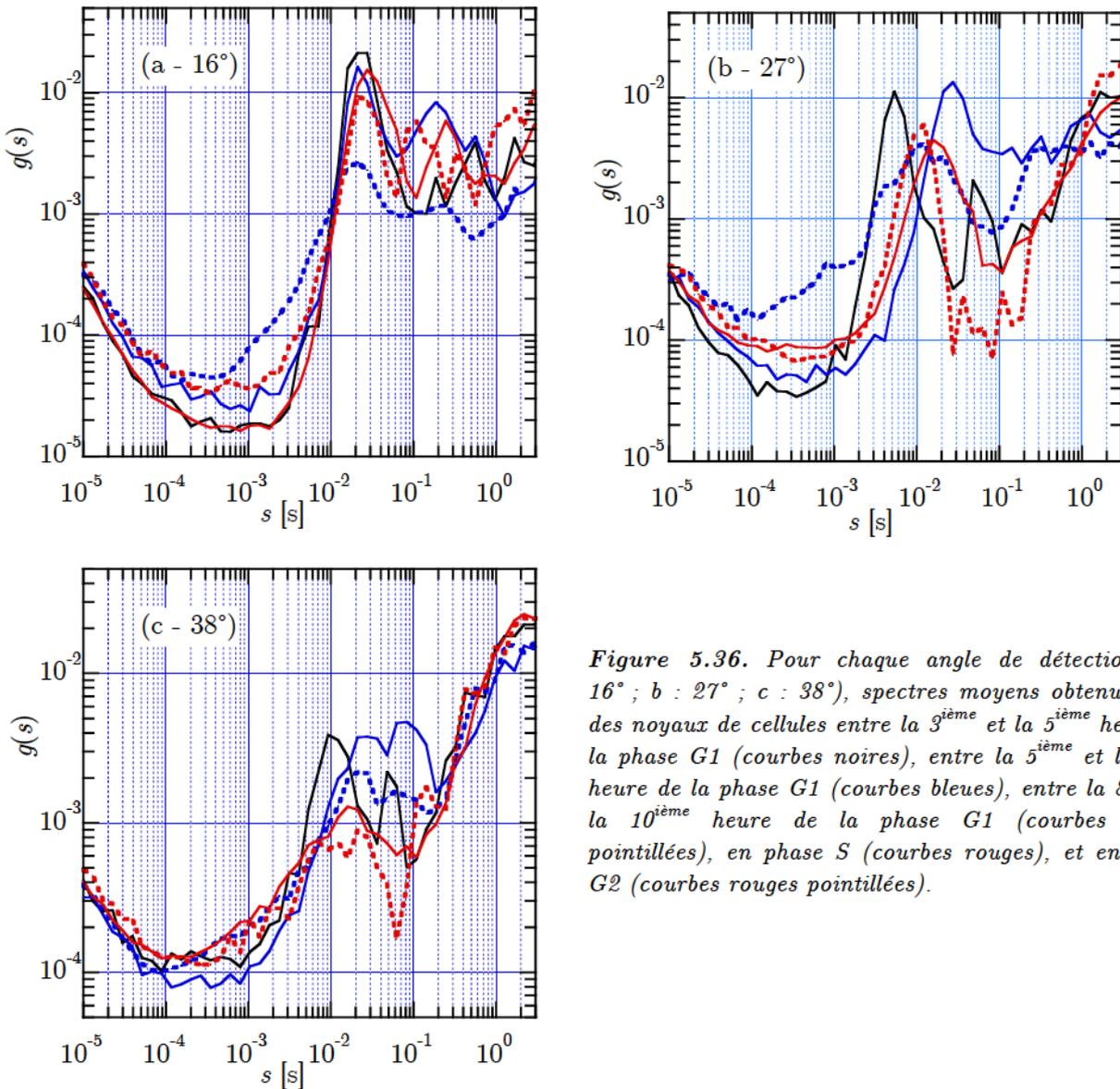


Figure 5.36. Pour chaque angle de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), spectres moyens obtenus pour des noyaux de cellules entre la 3<sup>ième</sup> et la 5<sup>ième</sup> heure de la phase G1 (courbes noires), entre la 5<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> heure de la phase G1 (courbes bleues), entre la 8<sup>ième</sup> et la 10<sup>ième</sup> heure de la phase G1 (courbes bleues pointillées), en phase S (courbes rouges), et en phase G2 (courbes rouges pointillées).

Cette Figure montre clairement l'évolution de la dynamique interne « rapide » du noyau d'une cellule SHEP au cours du cycle cellulaire. On remarque immédiatement que pour les 3 angles de détection les évolutions de cette dynamique avec la progression du cycle sont similaires, même si

celles-ci sont moins marquées pour  $16^\circ$  que pour les 2 autres angles. D'abord, on observe un ralentissement de la dynamique (déplacement des maxima de la 1<sup>ère</sup> bosse vers les temps lents), puis dans un second temps, ces maxima repartent vers les temps courts et les bosses s'élargissent (en particulier avec une augmentation des valeurs de  $g(s)$  en dessous de  $10^{-2}$  s), puis de nouveau un « amincissement » de la 1<sup>ère</sup> bosse en phase G2.

On remarque, ainsi l'existence de « sous-phases » dans la phase G1 ayant des dynamiques « rapides » différentes et donc, probablement avec des activités biologiques, ou des organisation de la chromatine, différentes. Si la dynamique « rapide » semble varier continûment au cours de la phase G1, la dynamique « rapide » de la phase S, par contre, semble relativement homogène tout au long de la durée de cette phase. Il est à noter que ces deux résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Michaël Suissa lors de sa thèse.

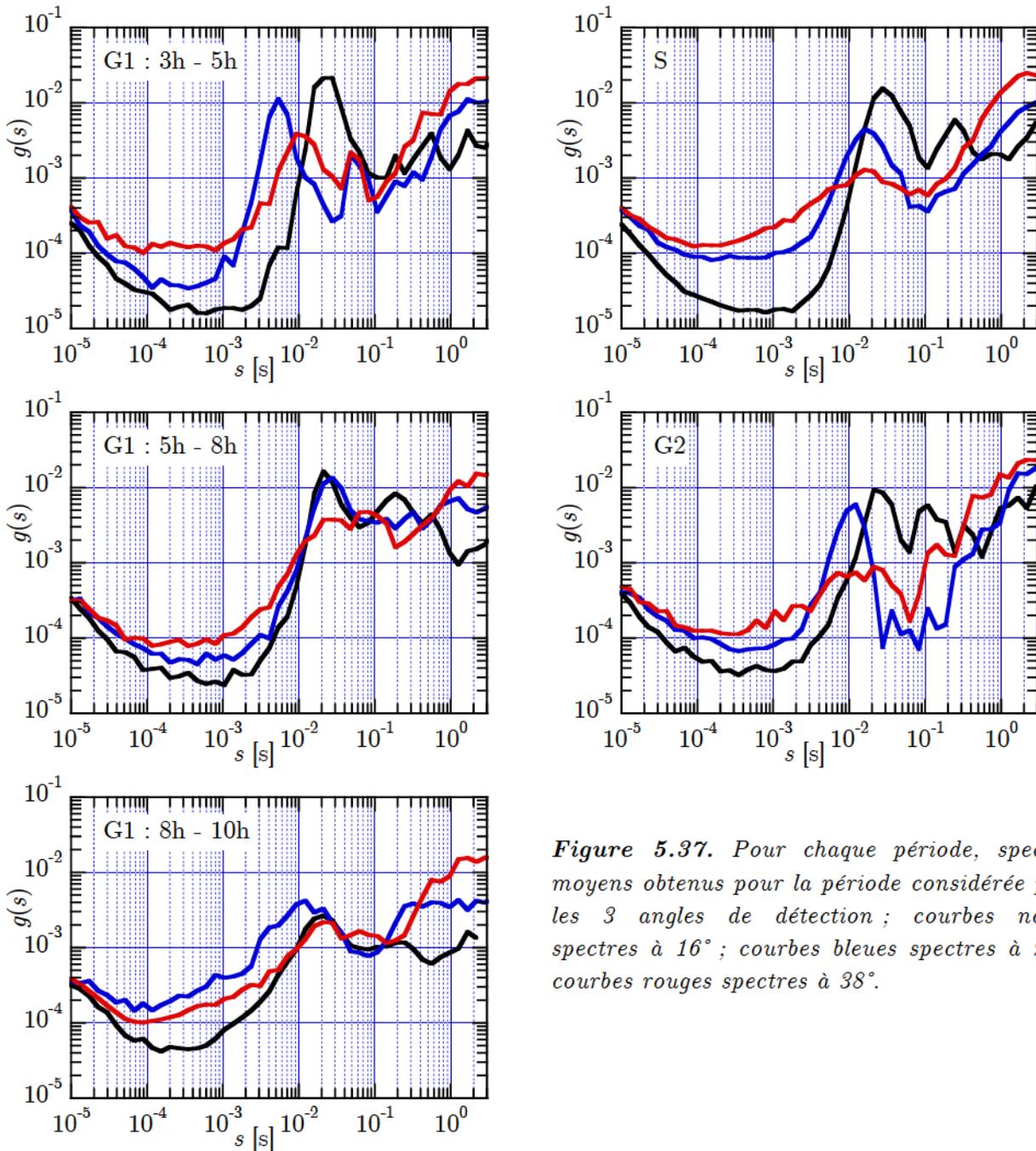
#### 5.2.4.2. Evolution de la dynamique interne « rapide » en fonction de l'échelle spatiale.

Nous avons installé plusieurs angles de détection sur notre montage dans le but de mesurer la dynamique interne du noyau en fonction de l'échelle spatiale, qui est donnée par l'inverse du vecteur d'onde de diffusion (l'idée étant de voir une « relation de dispersion »).

Figure 5.37, nous présentons, pour chaque période, les spectres moyens obtenus pour la période considérée pour les 3 angles de détection. Les résultats observés sont très surprenants ; il ne semble n'y avoir aucune « cohérence ». Par exemple, pour la première période de la phase G1, la dynamique la plus rapide (la position du maximum de la première « bosse ») est observée pour  $27^\circ$ , puis pour  $38^\circ$  et enfin la plus lente pour  $16^\circ$  ; pour la seconde période, la dynamique « rapide » semble être très proche pour les trois angles ; pour les phases S et G2, les dynamiques à  $27^\circ$  et  $38^\circ$  se ressemblent beaucoup, celle à  $16^\circ$  semble être plus lente. On s'attendait soit à voir un déplacement des maxima des bosses de ces spectres vers les temps plus long en diminuant l'angle de détection (par exemple un déplacement des bosses proportionnel à  $1/q^2$  si les processus étaient diffusifs, comme pour les billes de latex au Chapitre 3 ; ou alors proportionnel à  $1/q$  si les processus étaient balistiques), soit à des maxima qui ne bougeaient pas avec l'angle de diffusions (donc des processus indépendants de l'échelle spatiale). Là, nous n'avons rien de cela.

Nous sommes d'abord dit que ce comportement étrange pouvait venir du fait que nous moyennons les spectres de plusieurs cellules et que peut-être c'était l'effet du spectre d'une seule cellule avec un comportement « étrange ». Nous sommes donc revenus au niveau des spectres des cellules et, pour toutes les cellules, nous avons comparé les spectres pour les 3 angles, les comportements que l'on observe sont très similaires à ceux de la Figure 5.37. Nous sommes donc revenus au niveau des tranches et nous avons essayé de voir si pour une même tranche, il y avait une corrélation entre les 3 angles ; nous n'avons rien trouvé. Nous avons aussi imaginé que ceci pouvait venir du fait que l'on ne regardait pas exactement le même volume diffusant. Comme nous l'avons déjà mentionné, le volume diffusant varie en  $1/\sin(\phi)$ , *i.e.* il augmente quand l'angle de diffusion diminue et, le « pointé » de l'optique de détection n'est pas parfait. Donc, si la dynamique interne du noyau est inhomogène spatialement (ce qui est très probable puisque le noyau est non-ergodique), on peut penser que si l'on regarde des volumes diffusant distincts, alors on peut voir des dynamiques différentes. Cependant, nous avons effectué nos expériences sur plusieurs noyaux différents, ce qui devrait « lisser » ce problème.

À l'heure actuelle, nous n'avons aucune explication pour ce comportement. Il est cependant intéressant de noter que Michaël Suissa lors de sa thèse avait cherché une « relation de dispersion » pour sa dynamique rapide (qui correspond à peu près à la gamme de temps que nous sondons ici) et, il n'avait pas trouvé de relation évidente entre cette dynamique et l'échelle spatiale [1–4].



*Figure 5.37.* Pour chaque période, spectres moyens obtenus pour la période considérée pour les 3 angles de détection ; courbes noires spectres à  $16^\circ$  ; courbes bleues spectres à  $27^\circ$  ; courbes rouges spectres à  $38^\circ$ .

#### 5.2.4.3. Evolution de la dynamique interne « lente » en fonction de l'échelle spatiale.

Par contre, lors de sa thèse, Michaël Suissa a observé pour sa dynamique lente (qui correspond seulement à la gamme  $10^{-1}$  s à 2–3 secondes) une évolution proportionnelle au carré du vecteur d'onde (i.e. cette dynamique ralentit quand on augmente l'échelle spatiale, typiquement comme son carré, ce qui tend à indiquer que cette dynamique est due à des processus diffusifs). Est-ce que l'on peut retrouver ce résultat avec nos mesures ?

Le fait que  $A(\phi)$  (le coefficient de la fonction exponentielle qui lie la position des « pics » de la dynamique « lente » avec leur ordre) augmente quand l'angle de diffusion diminue suggère que la dynamique « lente » du noyau ralentit quand on diminue le vecteur d'onde de diffusion (donc

quand on augmente l'échelle spatiale). La première chose que l'on peut regarder, c'est la Figure 5.32e, où l'on présente les valeurs de  $A(\phi)$  en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion. On remarque que, pour les 3 phases du cycle cellulaires, les valeurs de  $A(\phi)$  varient comme  $q^{-\alpha}$  où  $\alpha$  vaut : 1,85, 1,79 et 1,75 ; ceci conduit à penser que l'ensemble de la dynamique « lente » (donc sur toute la gamme  $10^{-2} - 30$  s) est due à des processus diffusifs ou sous-diffusifs.

On peut confirmer cette « déduction » en regardant directement les spectres  $g(s)$ . Si on met sur un même graphe les spectres moyennés des temps caractéristiques « lents » obtenus pour une cellule pour chacun des 3 angles de détection (par exemple Figures 5.38, 5.39 et 5.40), on peut remarquer certaines caractéristiques de  $g(s)$  en fonction de  $s$  qui sont similaires pour les trois angles, mais qui semblent se décaler vers les temps lents quand on diminue la valeur de l'angle de détection. Donc, pour toutes les cellules, nous avons cherché, pour les angles de détection de  $27^\circ$  et  $38^\circ$ , si l'on pouvait trouver un facteur multiplicatif  $a(\phi)$  tel que le spectre  $g(s)$  obtenu à l'angle de détection  $\phi$  porté en fonction du produit  $a(\phi).s$  se superpose avec le spectre  $g(s)$  en fonction de  $s$  obtenu à  $16^\circ$  (en somme, on cherche  $a(\phi)$  tel que :  $g(a(\phi).s)$ , à l'angle  $\phi \approx g(s)$ , à  $16^\circ$ )).

Pour tous les noyaux étudiés, nous avons toujours réussi à trouver des valeurs de  $a(\phi)$  qui nous permettent de superposer les trois spectres. C'est ce que l'on a cherché à illustrer avec les Figures 5.38, 5.39 et 5.40.

- Figure 5.38, pour deux noyaux de cellules en phase G1 ; sur le côté gauche,  $g(s)$  pour un noyau de cellule entre la 3<sup>ième</sup> et la 5<sup>ième</sup> heure en phase G1 ; sur le côté droit,  $g(s)$  pour un noyau de cellule entre la 5<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> heure en phase G1.
- Figure 5.39, pour deux noyaux de cellules en phase S ; à gauche,  $g(s)$  pour un noyau de cellule de la première culture cellulaire étudiée ; à droite,  $g(s)$  pour un noyau de cellule de la seconde culture.
- Figure 5.40, pour deux noyaux de cellules en phase G2 ; sur le côté gauche,  $g(s)$  pour un noyau de cellule de la première culture cellulaire étudiée ; à droite,  $g(s)$  pour un noyau de cellule de la seconde culture.

Sur chacune de ces figures, les deux graphes sur la ligne du haut représentent les spectres moyennés des temps caractéristiques « lents », en fonction de  $s$ , obtenus pour les 3 angles de détection. Les graphes sur la ligne du bas de ces figures représentent, pour les mêmes noyaux de cellules, toujours les spectres  $g(s)$ , mais, cette fois en fonction de la variable  $a(\phi).s$ . On remarque qu'ainsi les spectres des trois angles se superposent assez bien ; ils ne superposent pas en terme d'amplitude, mais de position des maxima de  $g(s)$  (des « pics »).

Nous avons appliqué cette approche à tous les noyaux que nous avons sondés pour étudier le comportement de la dynamique interne du noyau lors du cycle cellulaire (ce qui fait un peu plus de cinquante noyaux au total). Dans plus de 3 cas sur 4, donc pour une très grande majorité des noyaux sondés, nous arrivons à trouver des valeurs de  $a(\phi)$  qui permettent de superposer correctement les spectres des 3 angles. Nous avons ensuite porté les valeurs de  $a(\phi)$  ainsi trouvées en fonction du vecteur d'onde de diffusion,  $q$ . Nous avons pu observer que, pour tous ces noyaux, les valeurs obtenues de  $a(\phi)$  augmentent avec le vecteur d'onde de diffusion comme  $q^\alpha$ , où  $\alpha$  est toujours trouvé dans l'intervalle 1,6 – 2,1 (la valeur moyenne de  $\alpha$  sur tous ces noyaux est égale à  $1,8 \pm 0,1$ ). C'est ce que nous illustrons Figure 5.41, où nous montrons pour les 6 noyaux de cellules présentés au dessus (Figures 5.38 à 5.40), les valeurs de  $a(\phi)$  trouvées en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion (ceci pour dilater un peu l'échelle des abscisses).

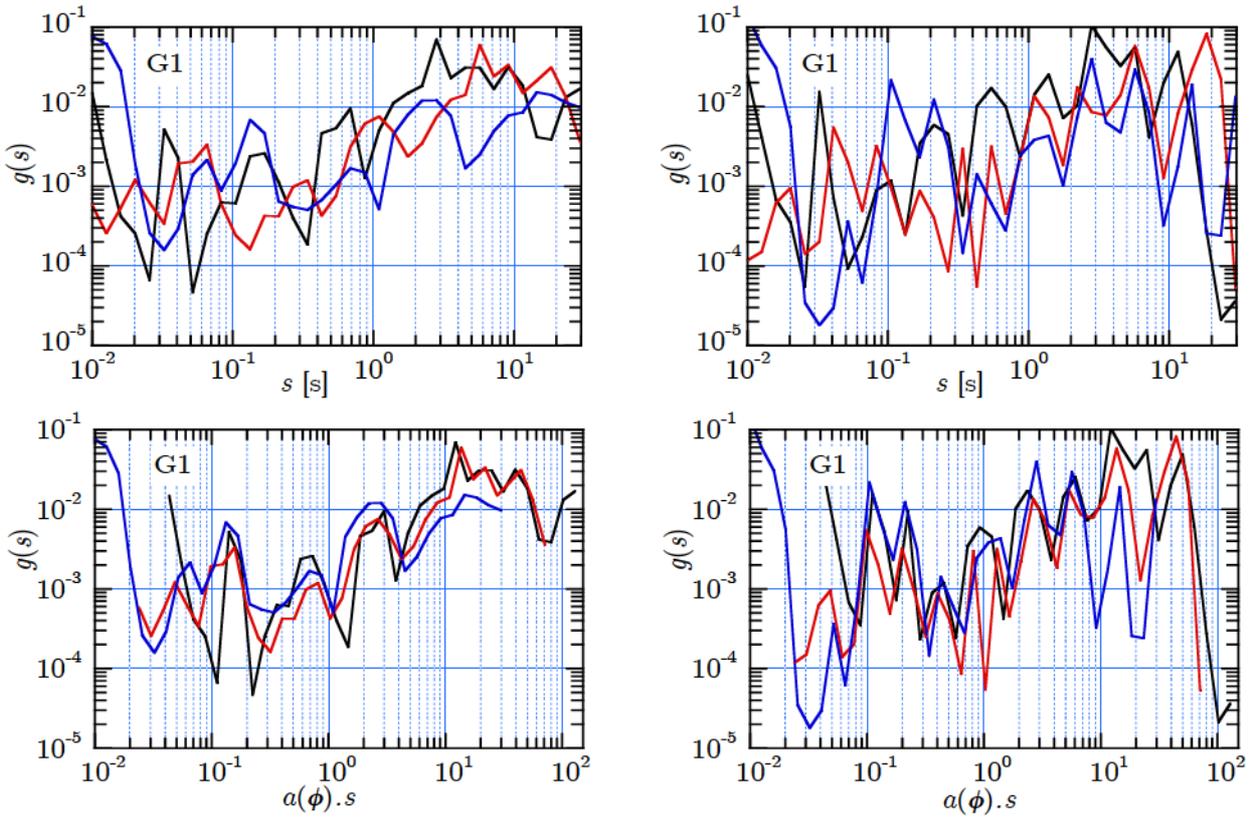


Figure 5.38. Haut :  $g(s)$  en fonction de  $s$  ; bas :  $g(s)$  en fonction de  $a(\phi).s$ , pour deux noyaux de cellules en phase G1.

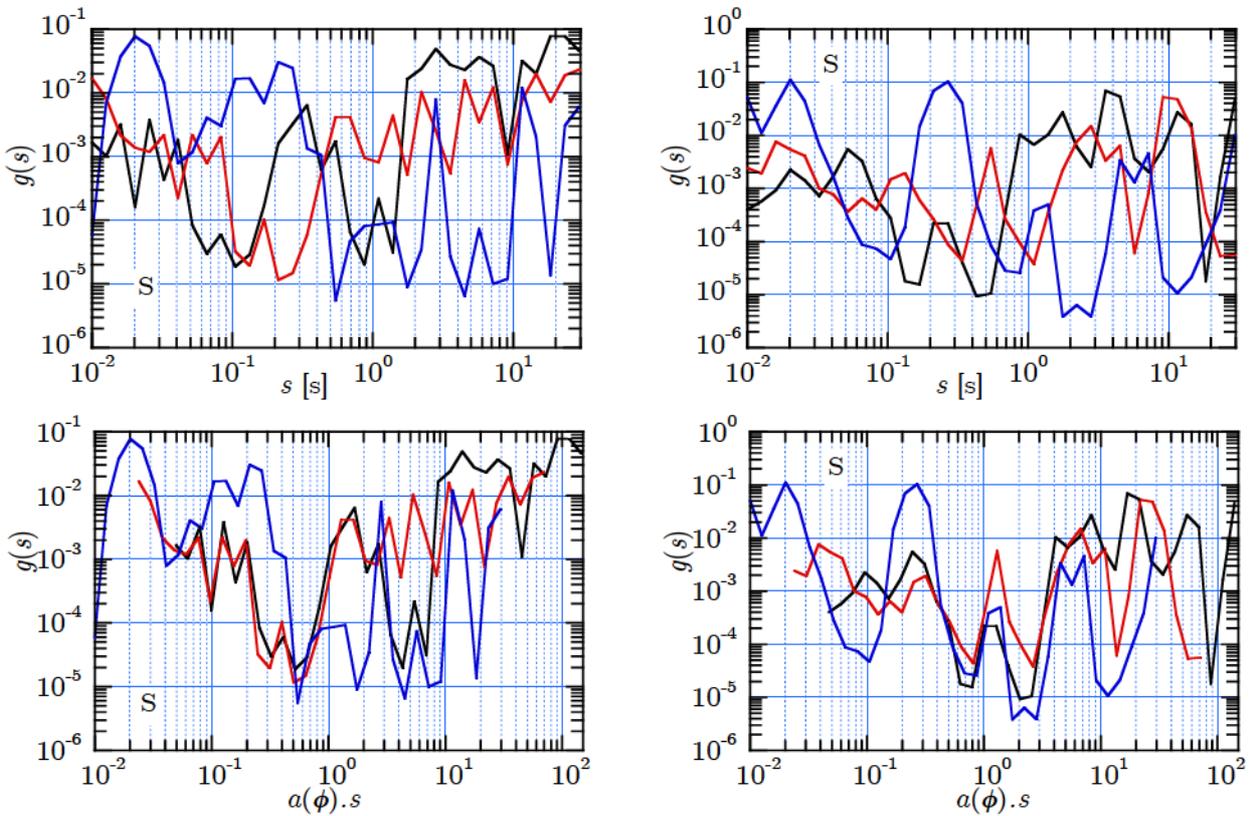


Figure 5.39. Haut :  $g(s)$  en fonction de  $s$  ; bas :  $g(s)$  en fonction de  $a(\phi).s$ , pour deux noyaux de cellules en phase S.

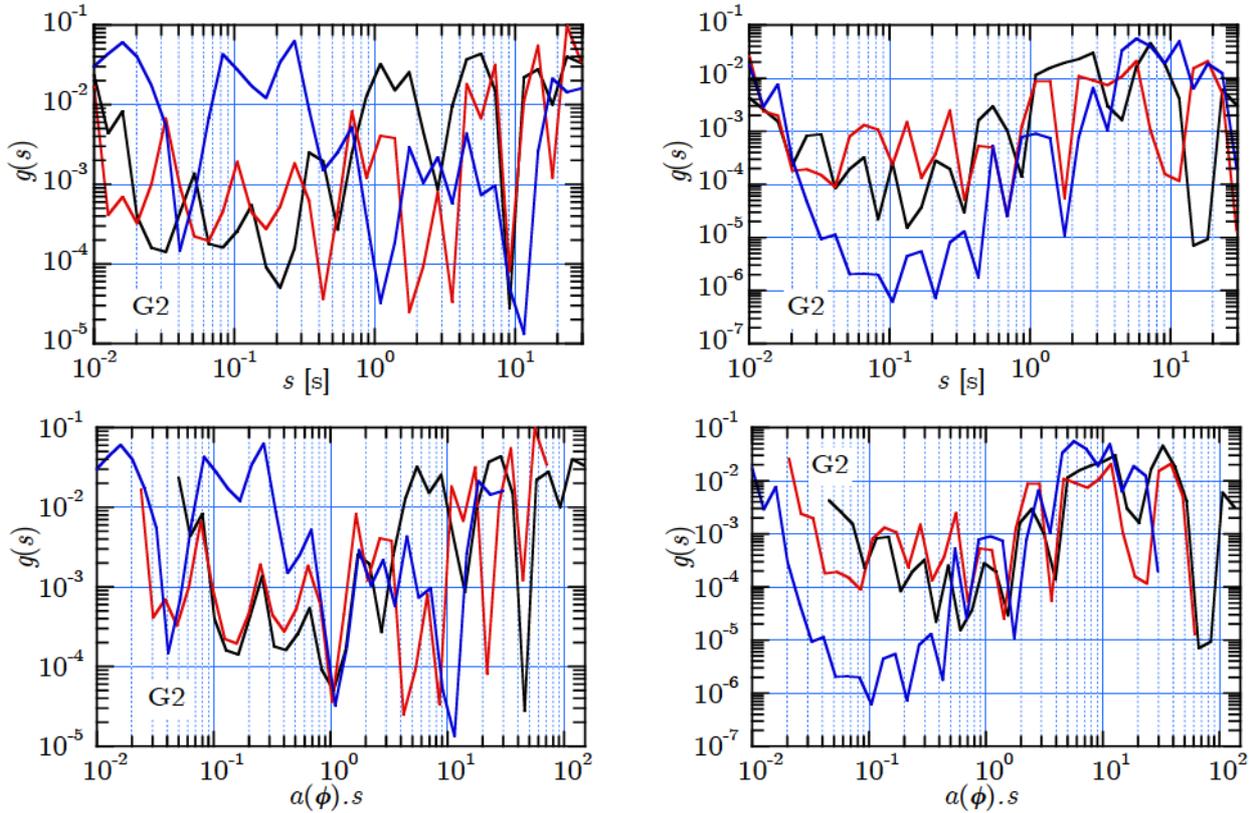


Figure 5.40. Haut :  $g(s)$  en fonction de  $s$  ; bas :  $g(s)$  en fonction de  $a(\phi).s$ , pour deux noyaux de cellules en phase G2.

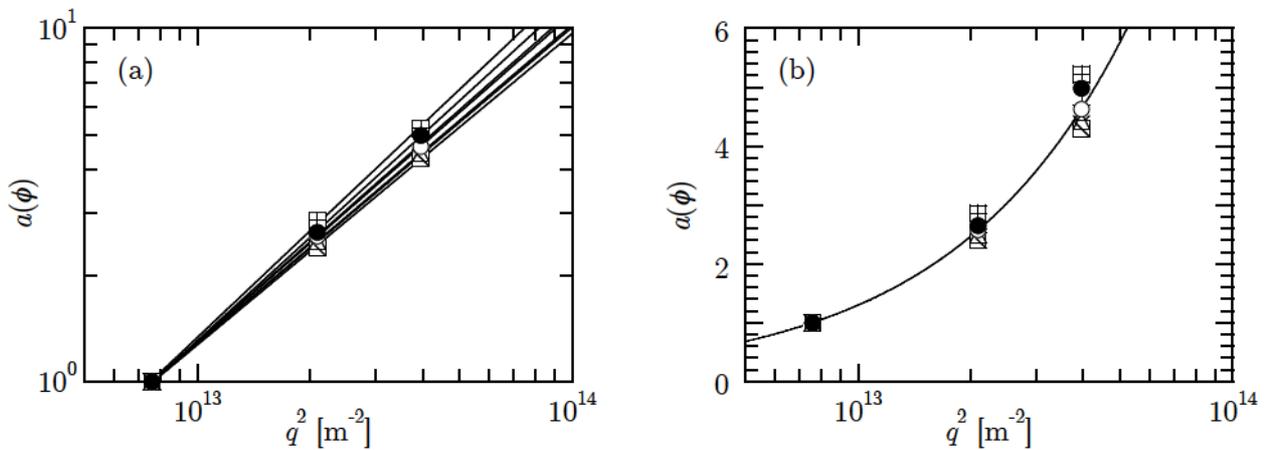


Figure 5.41. Valeurs de  $a(\phi)$  obtenues pour les spectres présentées sur les Figures 5.38 à 5.40 en fonction du carré du vecteur d'onde de diffusion ; a) représentation log-log, les valeurs de  $a(\phi)$  trouvées pour chaque noyau sont ajustées par une fonction de la forme  $Aq^\alpha$  ; b) représentation semi-log, la courbe noire est l'ajustement de l'ensemble de valeurs de  $a(\phi)$  par une fonction de la forme  $Aq^{1,85}$ .

Figure 5.41, on voit que pour les six noyaux présentés plus haut (Figures 5.38 à 5.40), les valeurs de  $a(\phi)$  varient bien comme  $q^\alpha$ , où la valeur de  $\alpha$  est comprise entre 1,8 et 2. Figure 5.41b,

nous montrons ces mêmes valeurs de  $\alpha$  avec un ajustement de l'ensemble de ces valeurs par une fonction proportionnelle à  $q^{1,85}$ .

Il est à noter, que nous avons aussi utilisé cette démarche sur un certain nombre de spectres de tranches de 5 minutes. Là encore, on trouve des valeurs de  $a(\phi)$  qui permettent de superposer les 3 spectres de ces tranches (avec une superposition souvent bien meilleure que pour les spectres moyennés sur toutes mesures faites sur le noyau) et qui croissent comme  $q^\alpha$ , avec  $\alpha$  compris entre 1,7 et 2.

Ces résultats montrent que la dynamique « lente » (ou du moins la majorité des modes qui la composent) varie avec l'échelle spatiale comme  $q^\alpha$ , où  $\alpha$  semble légèrement inférieur à 2. Ceci indique que la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante sur toute la gamme  $10^{-1} - 30$  s est très probablement due à un ensemble de processus diffusifs (ou sous-diffusifs), avec une distribution de coefficients de diffusion ( $D = 1/\tau q^2$ ) allant de  $10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à  $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

Par contre, nous n'arrivons pas à voir d'évolution de cette dynamique « lente » avec le cycle cellulaire. Ceci probablement parce que l'on n'analyse pas correctement les spectres. En effet, si cette dynamique est diffusive, elle va dépendre de la viscosité du milieu, qui doit croître lors du cycle cellulaire à cause de l'augmentation de la quantité d'ADN. On devrait donc observer un ralentissement. De son côté, lors de sa thèse, Michaël Suissa avait observé (pour la gamme  $10^{-1}$  s à 2-3 secondes) un ralentissement dans la phase G2.

### 5.3. EVOLUTION DE LA DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE HELA AU COURS DE SON CYCLE CELLULAIRE.

#### 5.3.1. Evolution de la dynamique interne du noyau des cellules HeLa en phase G1.

Pour les cellules HeLa, nous avons seulement étudié la dynamique interne du noyau en « début » de la phase G1 (*i.e.* entre la troisième et la huitième heure après la mitose). Pour cela, nous avons utilisé la même procédure expérimentale que celle décrite au § 5.2.1.1, pour étudier la dynamique du noyau des cellules SHEP au début de la phase G1. Avec cette procédure, lors de deux expériences différentes, nous avons pu étudier 10 noyaux de cellules HeLa, dont l'âge dans la phase G1 varie entre 3 et 8 heures. L'âge du noyau en phase G1 en fonction de son numéro de noyau est exactement le même que pour les cellules SHEP (*cf.* tableau 5.1).

##### 5.3.1.1. Résultats : dynamique « rapide » en phase G1 pour les cellules HeLa.

Pour commencer, et comme pour les cellules SHEP, nous présentons tous les spectres « moyens » obtenus pour chacun des 10 noyaux des cellules HELA; donc, pour des noyaux de cellules qui sont entre la troisième et la huitième heure de la phase G1. Sur la Figure 5.42, nous montrons les 10 spectres qui ont été obtenus pour l'angle de détection de  $16^\circ$  (*i.e.*  $q \approx 2,75 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ ); Figure 5.43, les 10 spectres pour l'angle de détection de  $27^\circ$  (soit  $q \approx 4,57 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ ) et Figure 5.44, les 10 spectres pour l'angle de détection de  $38^\circ$  (soit  $q \approx 6,28 \cdot 10^6 \text{ m}^{-2}$ ).

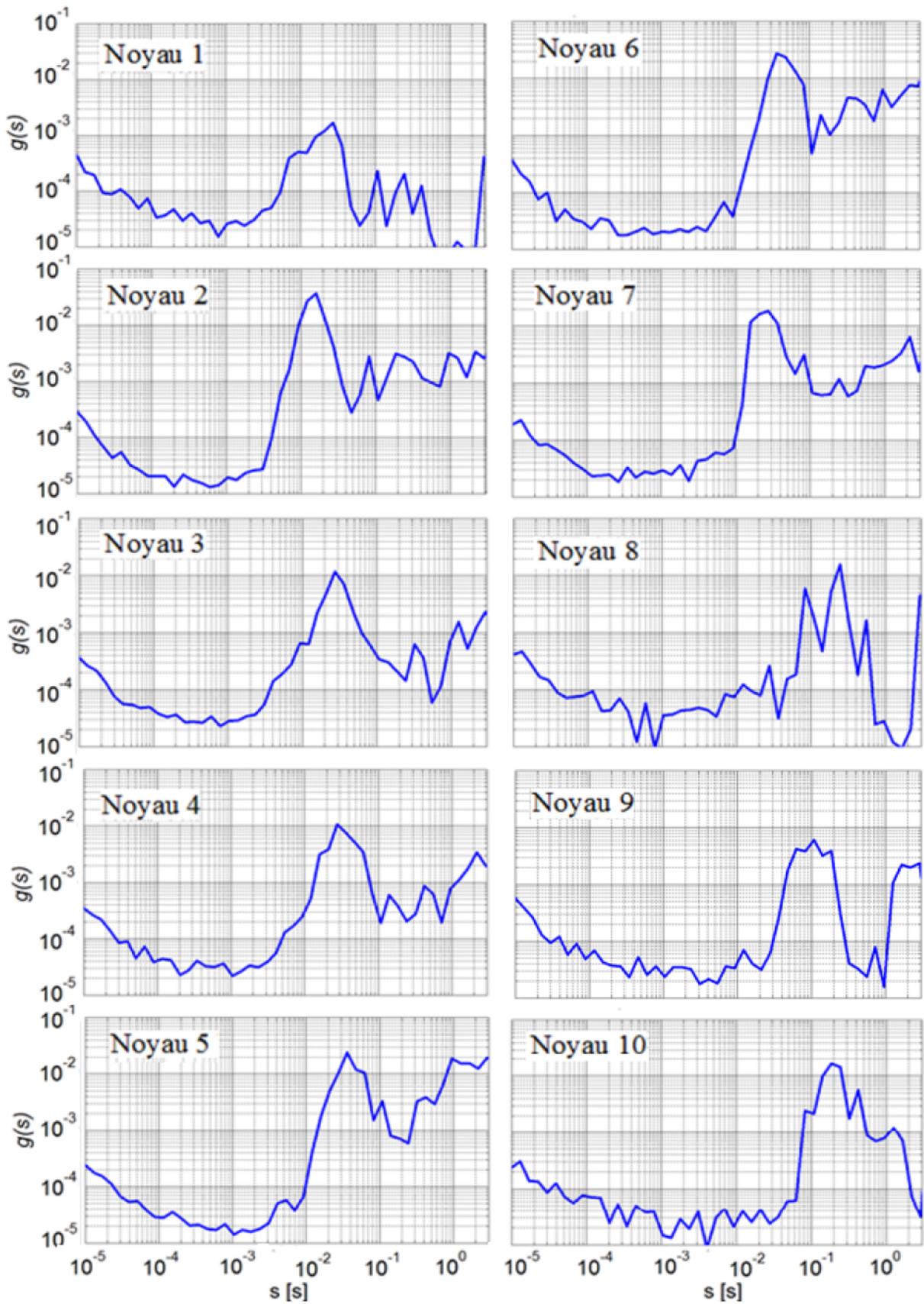
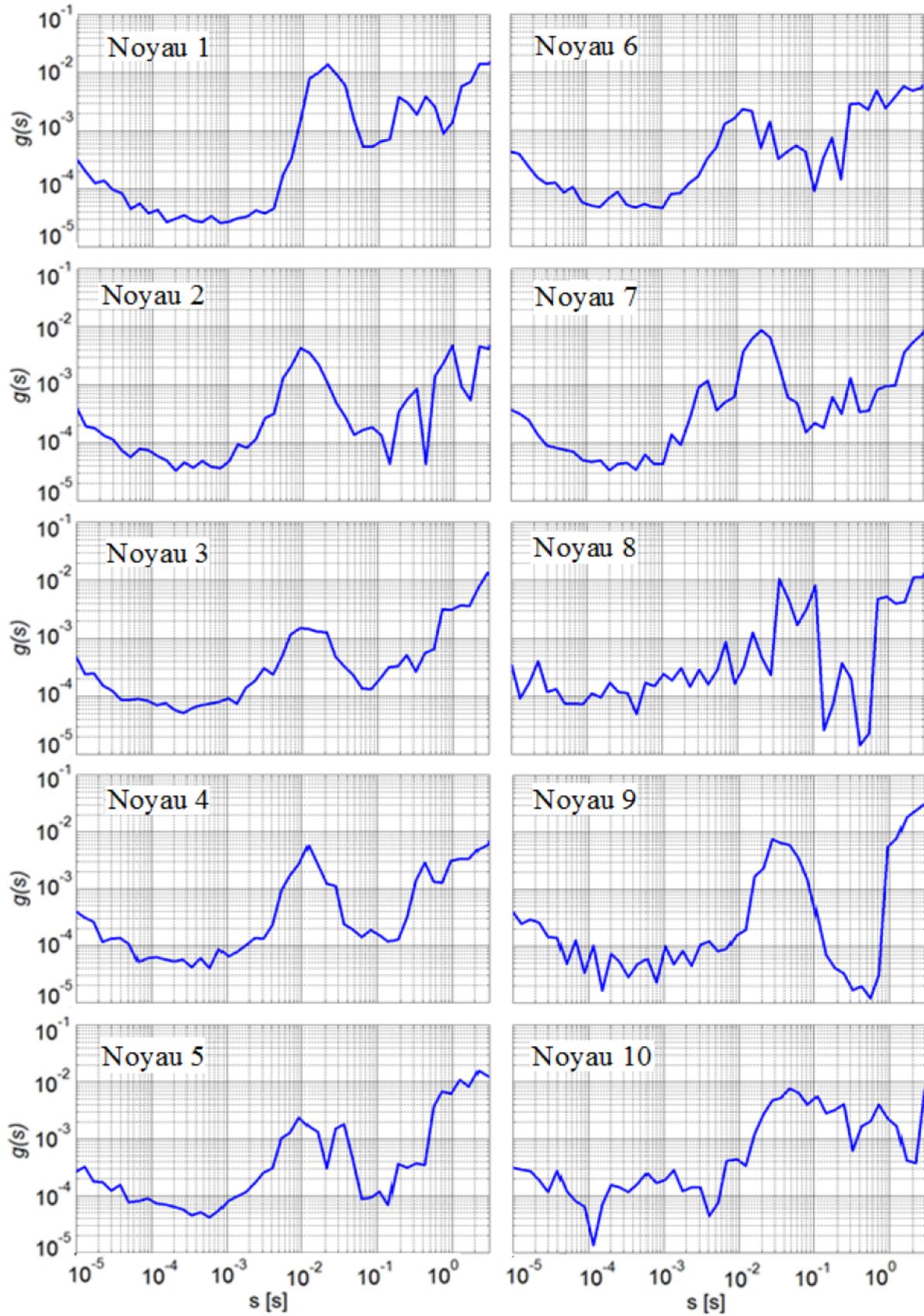


Figure 5.42. Spectres moyens pour les 10 noyaux de cellules HeLa obtenus en début de phase G1 à l'angle de détection de  $16^\circ$ .



*Figure 5.43. Spectres moyens pour les 10 noyaux de cellules HeLa obtenus en début de phase G1 à l'angle de détection de  $27^\circ$ .*

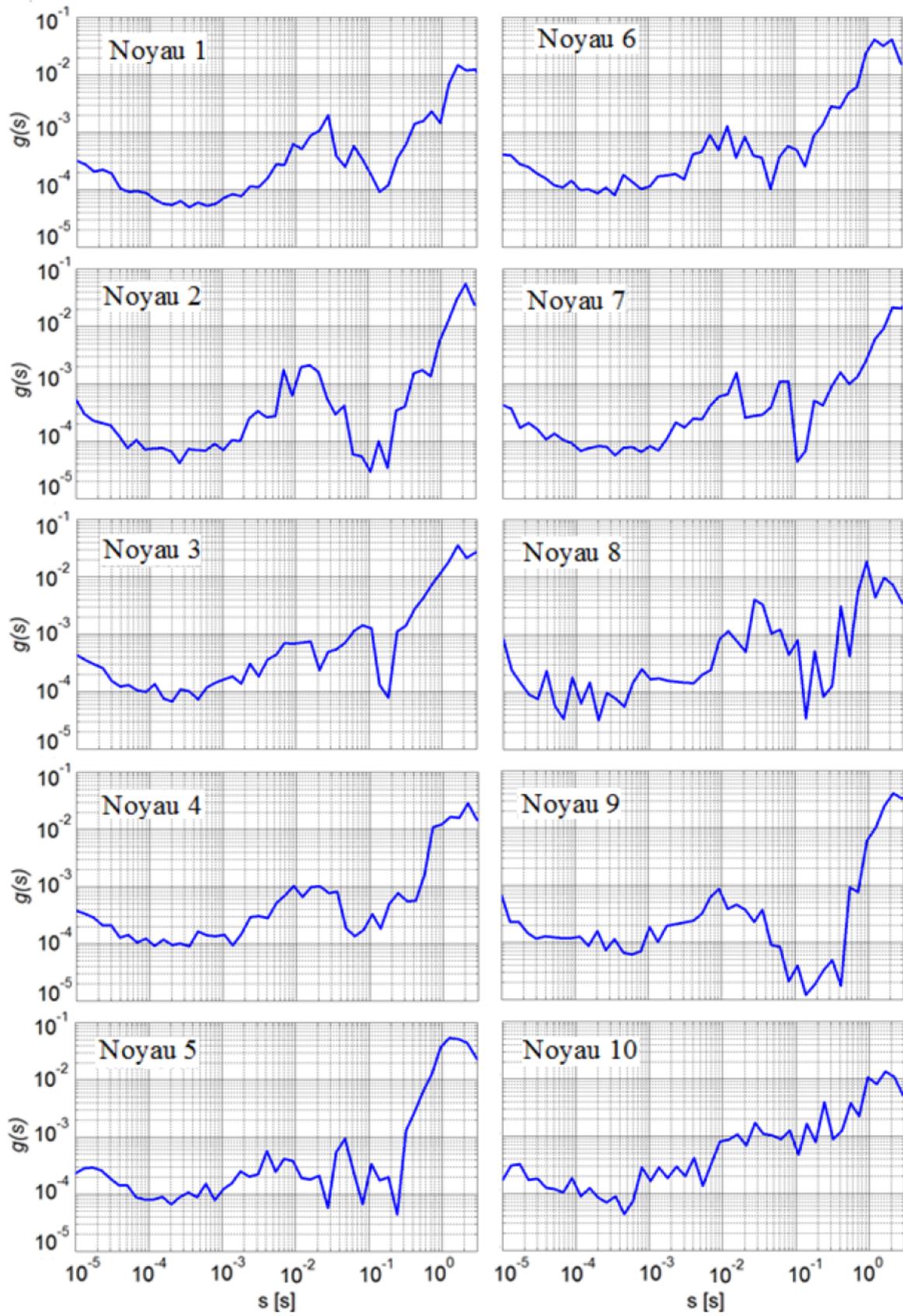
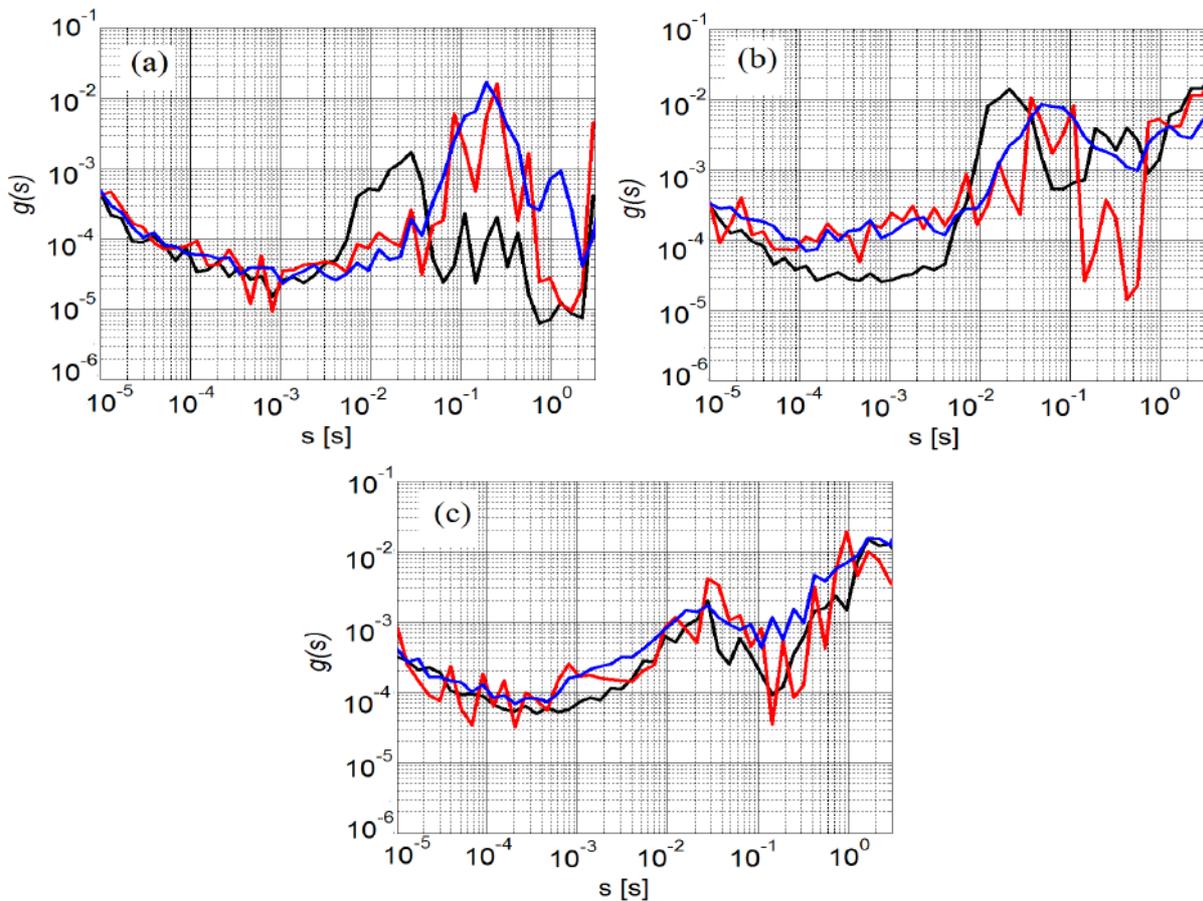


Figure 5.44. Spectres moyens pour les 10 noyaux de cellules HeLa en début de phase G1 obtenus à l'angle de détection de  $38^\circ$ .

Très grossièrement, on observe, toujours :

- Une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps très courts. On peut noter, comme pour les cellules SHEP, que la gamme de temps sur laquelle  $g(s)$  décroît semble d'autant plus étendue que l'angle de détection est petit, typiquement cette gamme s'étend de  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  s pour  $16^\circ$  et de  $10^{-5}$  à  $1 - 4 \cdot 10^{-4}$  s pour  $27^\circ$  et  $38^\circ$ .
- Une « bosse », assez large, typiquement un peu plus d'une décade. Pour les noyaux mesurés à  $16^\circ$ , le maximum de cette bosse se trouve autour de  $2 - 4 \cdot 10^{-2}$  s pour les noyaux de 1 à 7 et autour de  $1 - 3 \cdot 10^{-1}$  s pour les noyaux 8,9 et 10. Pour les noyaux mesurés à  $27^\circ$ , le maximum de cette bosse se trouve autour de  $1 - 2 \cdot 10^{-2}$  s pour les noyaux de 1 à 7 et autour de  $3 - 5 \cdot 10^{-2}$  s pour les noyaux 8, 9 et 10. Enfin, et pour les noyaux mesurés à  $38^\circ$ , le maximum de cette bosse est très variable d'un noyau à un autre, il se trouve autour de  $1 - 3 \cdot 10^{-2}$  s pour les noyaux de 1, 2, 4, 6, 8 et 9 et on retrouve deux bosses pour les noyaux 3, 5, 7 et 10 avec des maxima entre  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$  s.
- Un ou deux petits « pics » (ou petites bosses), moins hauts et moins larges que la première « bosse » et à des temps plus « lents » ; entre  $10^{-1}$  et 1 s pour les 3 directions.

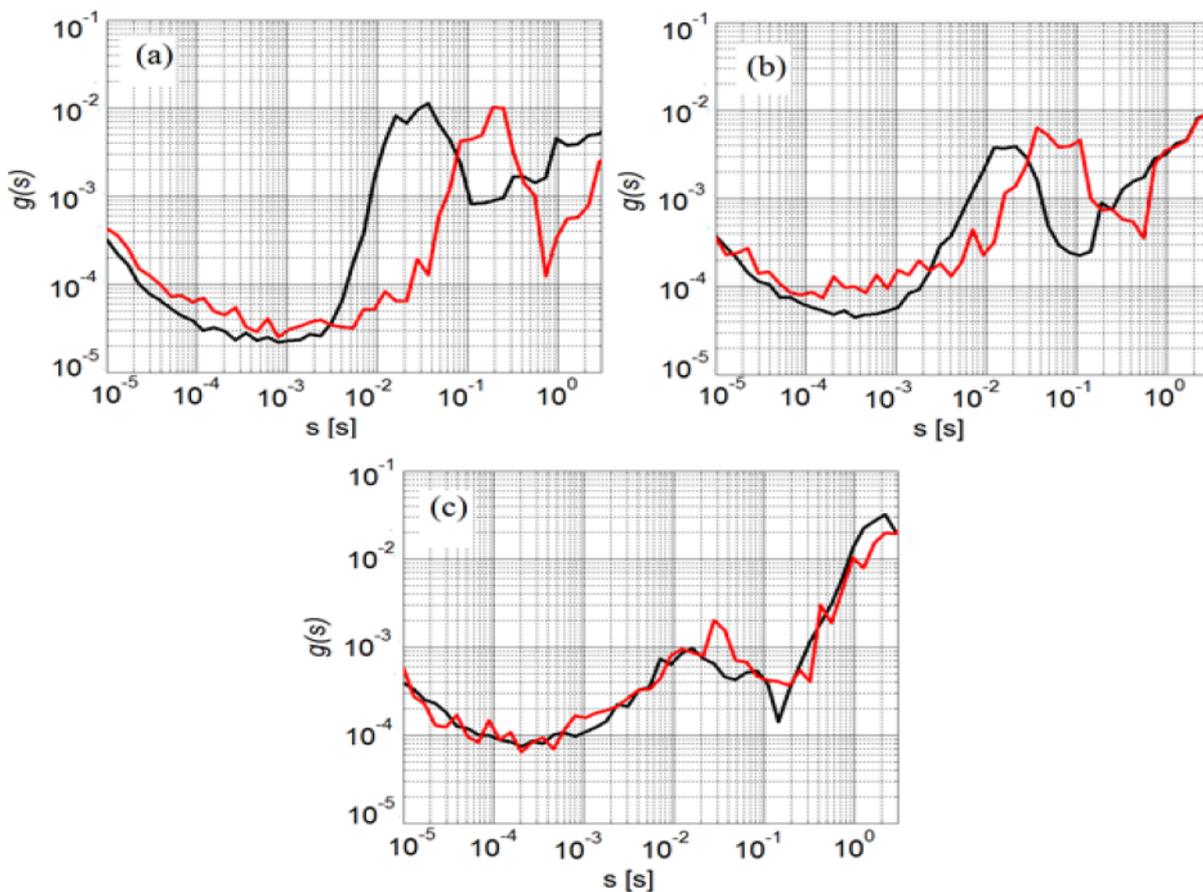
Afin de montrer l'évolution avec l'âge du noyau, pour chaque angle de détection, nous présentons sur le même graphe les spectres des noyaux 1, 8 et 10 (Figure 5.45), donc, environ 3h, 6h30 et 7h30 après leur mitose. Sur cette figure, on voit clairement (en particulier à  $16^\circ$  et  $27^\circ$ ), que les spectres du noyau 1 sont différents des spectres des noyaux 8 et 10, qui eux, se ressemblent.



**Figure 5.45.** Spectres moyens des noyaux 1 (3h après la mitose ; la courbe noire), 8 (6h30 après la mitose ; la courbe rouge) et 10 (7h30 après la mitose ; la courbe bleue), pour les différents angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ).

Si on regarde plus en détail les figures 5.42 à 5.44, nous pouvons voir qu'il existe, comme pour les cellules SHEP, une évolution des spectres  $g(s)$  quand le noyau « vieillit », avec une transition entre deux « comportements » différents. Cependant, dans le cas des cellules HeLa cette transition n'a pas exactement lieu au même temps que pour les SHEP ; ici elle se passe autour du 6<sup>ème</sup> noyau (au lieu du 4<sup>ème</sup>). Pour les six premiers noyaux, les spectres obtenus, pour un même angle, ont tous une forte ressemblance ; en particulier, les maxima de la première « bosse » sont tous très proches les uns des autres. Pour les quatre noyaux suivants, on observe un glissement de cette « bosse » vers les temps plus lents (c'est particulièrement visible à 16° et 27°, où ce glissement est d'autant plus important que la détection se fait aux grands angles ; à 38°, c'est moins net, mais, dans ce cas là, la première bosse est aussi bien moins marquée). En somme, nous trouvons des spectres qui ressemblent fortement à ceux qui ont été obtenus dans des conditions identiques sur les cellules SHEP.

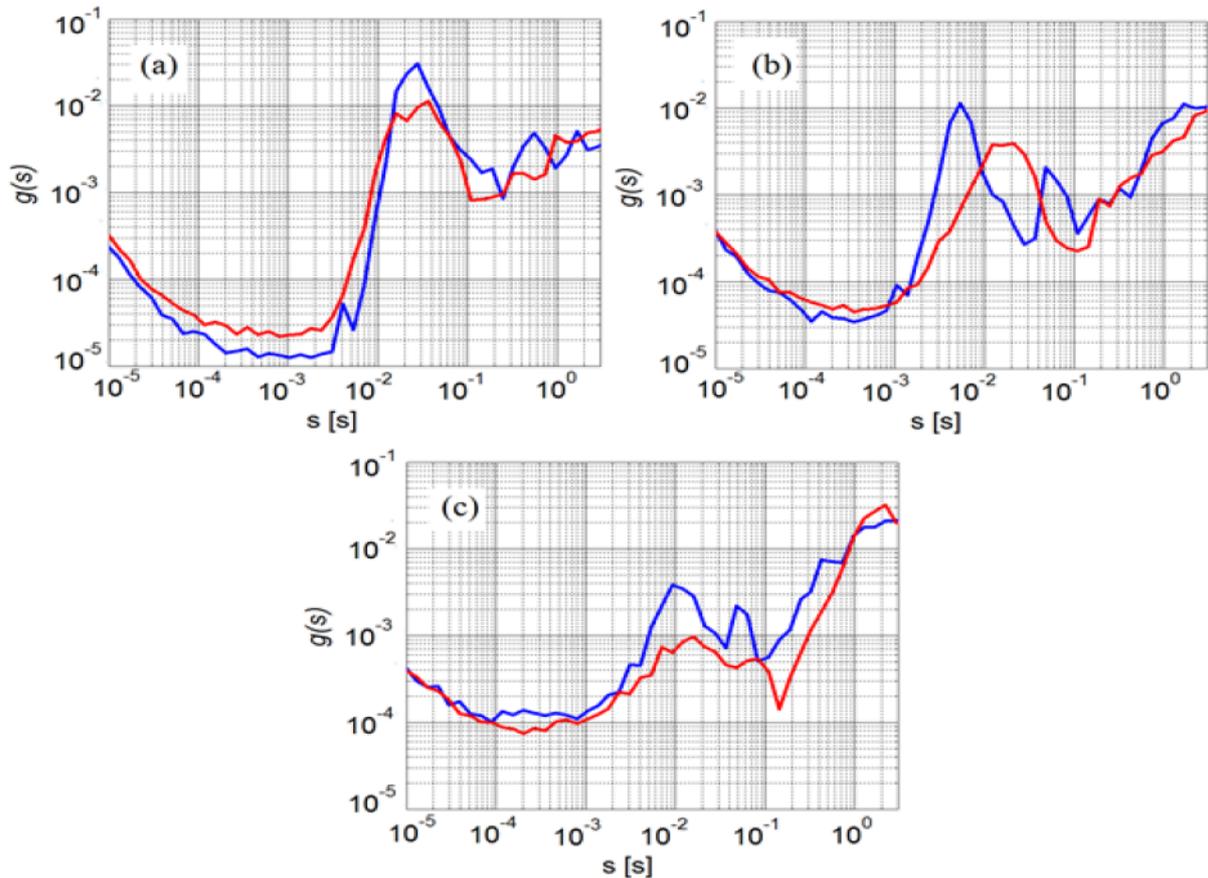
Nous avons calculé la moyenne des spectres sur les six premiers noyaux et la moyenne des spectres sur les quatre noyaux suivants. Ceci nous donne une estimation de la dynamique interne « rapide » du noyau entre la troisième et la sixième heure en phase G1 (*i.e.* la moyenne des spectres des noyaux 1 à 6) ainsi que cette dynamique entre la sixième et la huitième heure en phase G1 (*i.e.* moyenne des spectres des noyaux 7 à 10). Ces moyennes sont présentées, Figure 5.46, pour les trois angles de détection, (courbes noires : dynamique « rapide » entre la troisième et la sixième heure ; courbes rouges : dynamique « rapide » entre la sixième et la huitième heure).



**Figure 5.46.** Pour les trois angles de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), moyenne des spectres entre la troisième et la sixième heure en phase G1 (la courbe noire), moyenne des spectres entre la sixième et la huitième heure en phase G1 (la courbe rouge).

Figures 5.47 et 5.48, nous présentons les comparaisons des spectres  $g(s)$  pour les deux lignées cellulaires, SHEP et HeLa en phase G1.

Figure 5.47, nous comparons les spectres moyens obtenus sur les noyaux les plus jeunes, *i.e.* la « première » période, entre la troisième et la cinquième heure après la mitose pour les cellules SHEP (donc, moyennes des spectres sur les noyaux 1 à 4) et, entre la troisième et la sixième heure après la mitose pour les cellules HeLa (moyennes de  $g(s)$  sur les noyaux 1 à 6).



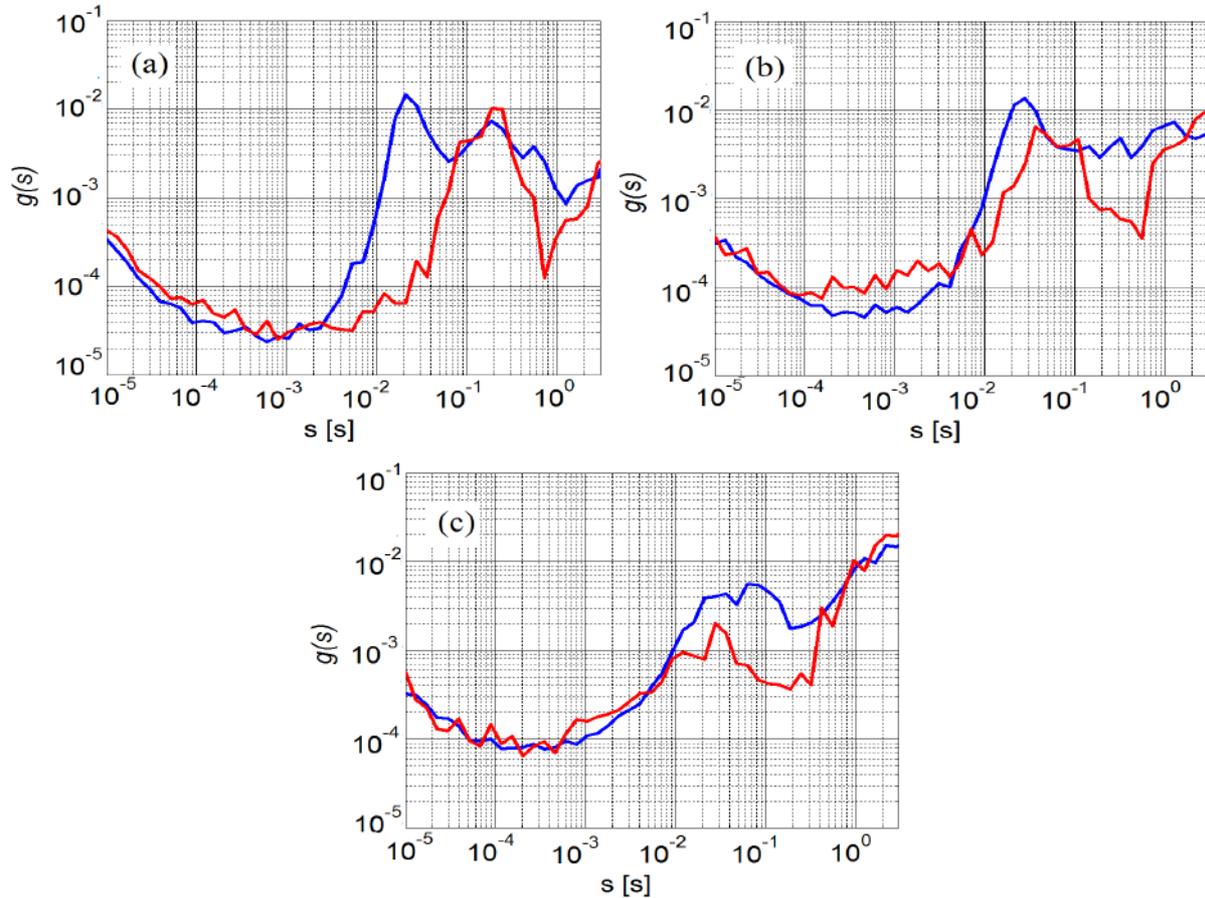
**Figure 5.47.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), moyennes des spectres  $g(s)$  obtenus sur les noyaux de cellules SHEP et HeLa lors de la « première » période du début de la phase G1 ; courbes bleues : moyenne réalisée sur les noyaux 1 à 4 des cellules SHEP ; courbes rouges : moyenne réalisée sur les noyaux 1 à 6 des cellules HeLa.

Cette comparaison montre :

- Pour les 3 angles de détection, la décroissance lente de  $g(s)$  aux temps très courts est la même pour les deux lignées cellulaires.
- À  $16^\circ$  et à  $38^\circ$ , on peut observer une ressemblance importante des spectres entre les noyaux des cellules HeLa et SHEP. La position du maximum de la première bosse est quasiment la même pour les spectres des deux lignées cellulaires. Seule l'amplitude de  $g(s)$  est un peu différente, elle est moins importante pour les cellules HeLa.
- À  $27^\circ$ , les spectres des deux lignées cellulaires se ressemblent avant  $10^{-3}$  s (la décroissance lente de  $g(s)$ ) et au-delà de  $10^{-1}$  s. Mais on remarque une légère différence dans le milieu du spectre, avec un décalage de la position de la première bosse vers les temps les plus longs pour les

cellules HeLa par rapport aux cellules SHEP. Néanmoins l'allure générale des spectres pour les deux lignées est très similaire.

Figure 5.48, nous comparons les spectres moyens pour les plus vieux, *i.e.* pour la « seconde » période de la phase G1, entre la cinquième et la huitième heure après la mitose pour les cellules SHEP (donc, moyennes des spectres sur les noyaux 5 à 10) et, entre la sixième et la huitième heure après la mitose pour les cellules HeLa (moyennes des spectres sur les noyaux 7 à 10).



**Figure 5.48.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), moyennes des spectres  $g(s)$  obtenus sur des noyaux de cellules SHEP et HeLa pour la deuxième période du début de la phase G1 ; courbes bleues : moyennes réalisées sur les noyaux 5 à 10 des cellules SHEP ; courbes rouges : moyennes réalisées sur les noyaux 8 à 10 des cellules HeLa.

Cette comparaison montre :

- Pour les 3 angles, la décroissance lente de  $g(s)$  aux temps très courts est la même pour les deux lignées cellulaires.
- À  $16^\circ$ , le premier pic observé pour la lignée SHEP (celui à  $2.10^{-2}$  s) a totalement disparu pour les cellules HeLa.
- À  $27^\circ$ , on remarque, par rapport aux cellules SHEP, un léger déplacement du maximum de la bosse centrale du spectre vers les temps les plus longs pour les cellules HeLa. Néanmoins l'allure générale des spectres pour les deux lignées cellulaires est très similaire ; ils se ressemblent beaucoup.

- À 38°, l'allure générale des spectres pour les deux lignées cellulaires est, là encore, très similaire, même si l'amplitude du maximum de la bosse centrale du spectre  $g(s)$  est plus grande pour les noyaux des cellules SHEP.

Donc, même si certains points de détails sont différents pour les deux lignées cellulaires, nous observons quand même de grandes similitudes entre la dynamique « rapide » du noyau d'une cellule en début de phase G1 des cellules SHEP et des cellules HeLa. Dans les deux cas, on observe une décroissance similaire de  $g(s)$  pour les temps très courts (typiquement  $10^{-5} - 10^{-3}$  s), une bosse large (entre  $10^{-3}$  s et  $10^{-1}$  s) dont les positions des maxima sont, dans l'ensemble assez proche, et un troisième comportement en dessous de  $10^{-1}$  s. Pour les deux lignées cellulaires, nous observons un changement de comportement de la dynamique « rapide » avec l'âge de cellule en phase G1, qui, dans un premier temps, se traduit surtout par un ralentissement de la dynamique « centrale » (i.e. un léger décalage de la bosse entre  $10^{-3}$  s et  $10^{-1}$  s vers des temps plus longs).

Les quelques différences qui sont observées entre les spectres des deux lignées et leurs évolutions peuvent venir du fait que la durée du cycle cellulaire, et donc celle des différentes phases, n'est pas identique pour les cellules SHEP et les cellules HeLa.

Le fait d'observer les mêmes tendances pour les deux lignées cellulaires confirme, encore une fois les résultats de Michael Suissa [1,4] et son hypothèse sur l'existence de « sous-phases » avec des dynamiques « rapides » différentes en phase G1.

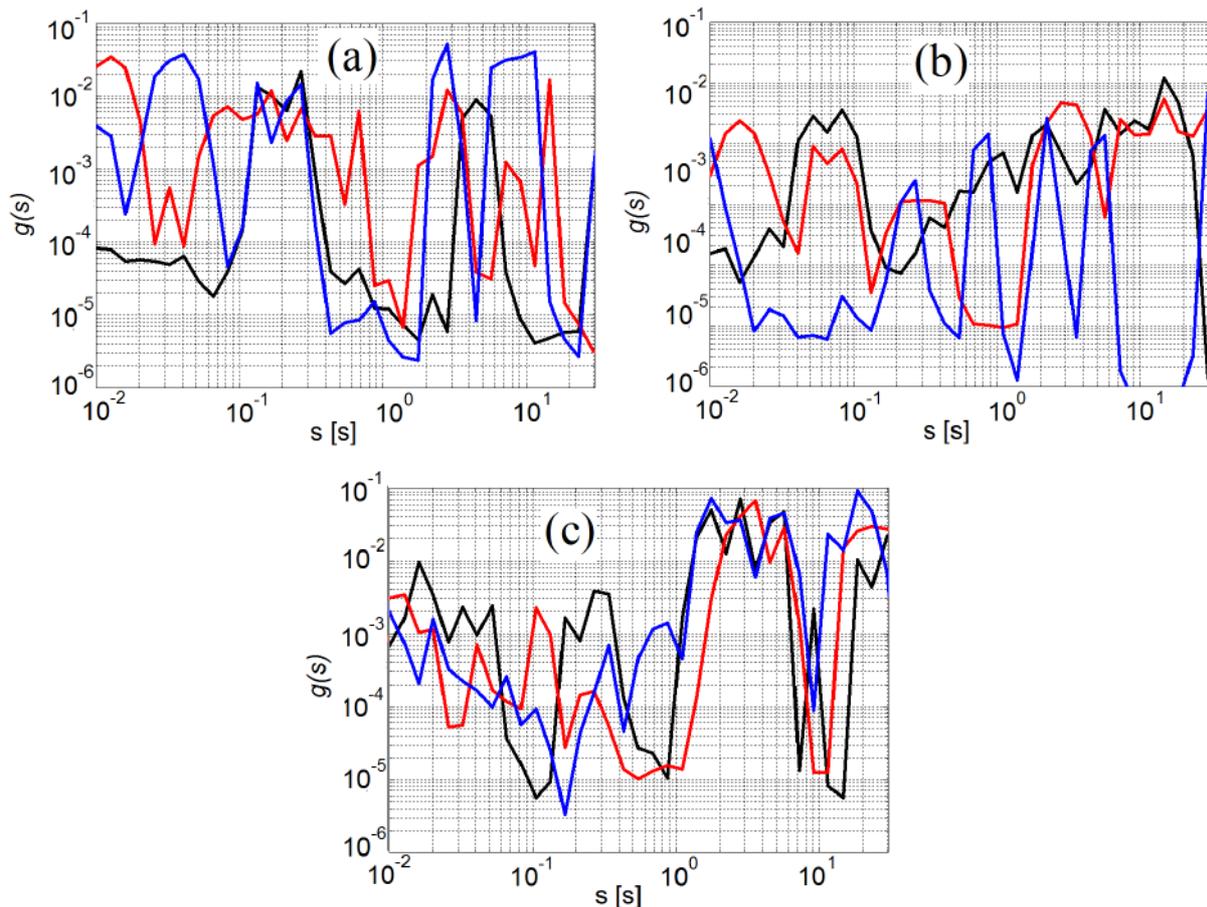
Comme nous l'avons déjà indiqué au début de ce paragraphe, par manque de temps, nous n'avons pas mené d'expériences pour étudier la dynamique interne de noyaux de cellules HeLa en fin de phase G1, nous ne pouvons donc pas comparer aux cellules SHEP.

### 5.3.1.2. Résultats : dynamique « lente » en phase G1 pour les cellules HeLa.

Figure 5.49, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour 3 des 10 noyaux de cellules HeLa. Comme pour les cellules SHEP, la variabilité des spectres de la dynamique « lente » d'un noyau à l'autre est très importante. Nous voyons 4-5 pics sortir par spectre, mais, ce ne sont jamais les mêmes d'un spectre à l'autre. Sur l'ensemble des noyaux de cellules HeLa en phases G1, nous voyons sortir une dizaine de temps caractéristiques différents. Nous n'arrivons pas à voir une tendance se dessiner ; comme pour les cellules SHEP, nous sommes totalement incapables de dire s'il y a une évolution de cette dynamique avec l'âge de la cellule.

La superposition des spectres « lents » obtenus sur des noyaux de cellules HeLa en phase G1 et sur des noyaux de cellules SHEP aussi en phase G1, n'apporte pas grand-chose. Dans les deux cas, on observe une succession de « pics » (4-5), mais, du fait de la variabilité des spectres, nous sommes, là encore, dans l'impossibilité de dire s'il y a une différence ou une ressemblance entre la dynamique « lente » des deux lignées cellulaires. Comme il n'y a pas de différence notable, on peut penser que la dynamique « lente » en phase G1 est quasiment identique pour les deux lignées.

Par contre, comme pour les cellules SHEP, on peut trouver, pour tous les noyaux, un facteur multiplicatif  $a(\phi)$ , tel que le spectre  $g(s)$  obtenu à l'angle de détection  $\phi$  ( $\phi$  égal à 27° et 38°), porté en fonction du produit  $a(\phi).s$  se superpose avec le spectre  $g(s)$  en fonction de  $s$  obtenu à 16° (donc  $a(\phi)$  tel que :  $g(a(\phi).s)$ , à l'angle  $\phi$ )  $\approx g(s)$ , à 16°). Pour tous les noyaux, les valeurs de  $a(\phi)$  trouvées varient comme  $q^\alpha$ , avec  $\alpha$  légèrement inférieur à 2, ce qui suggère que la dynamique « lente » est bien due à des processus diffusifs.



**Figure 5.49.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), spectres moyens des temps caractéristiques « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules HeLa en phase G1.

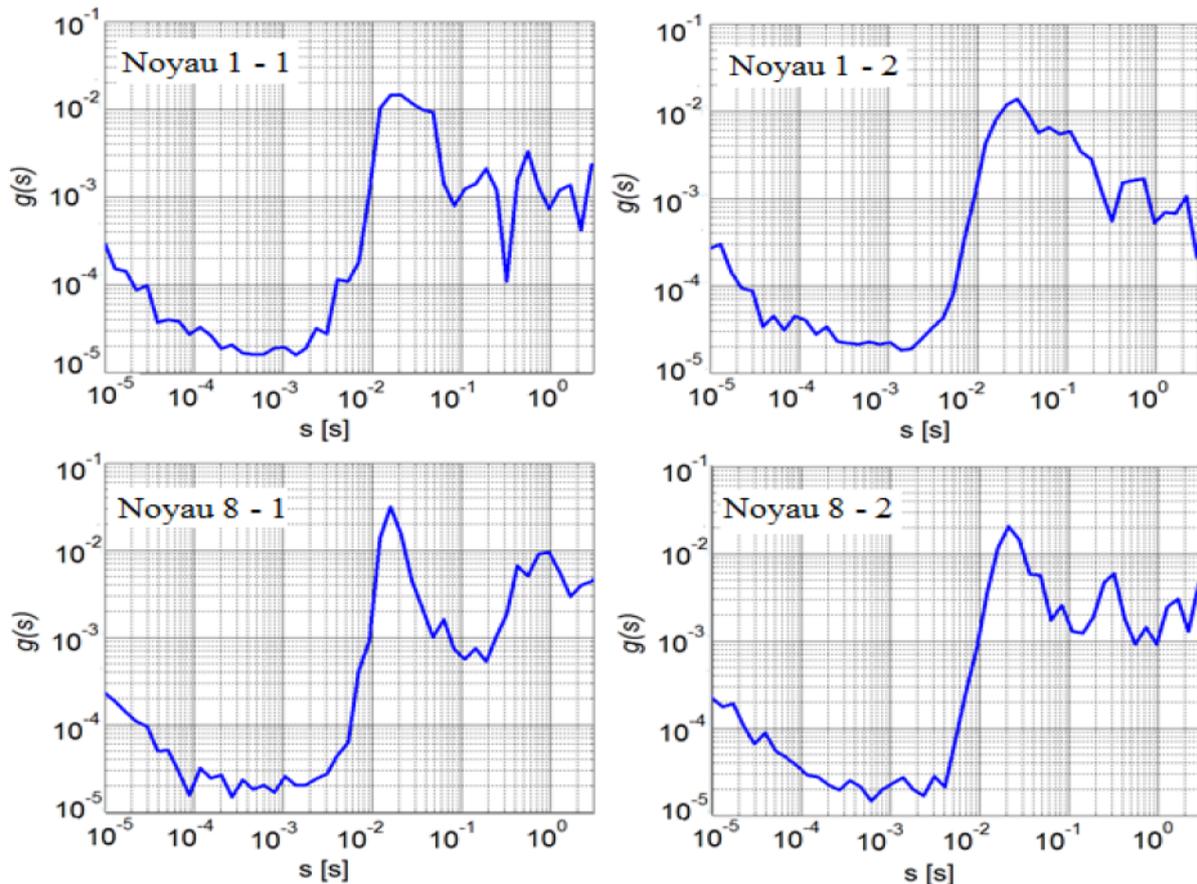
### 5.3.2. Dynamique interne du noyau d'une cellule vivante HeLa en phase S.

Pour étudier la dynamique des noyaux des cellules HeLa en phase S, on a utilisé la même procédure expérimentale que celle décrite au § 5.2.2, pour étudier la dynamique du noyau des cellules SHEP en phase S. Nous avons pu faire des mesures sur 16 noyaux de cellules SHEP en phase S. Comme pour les cellules SHEP, les mesures sur les 16 noyaux ont été faites sur deux cultures cellulaires différentes lors de 2 expériences (8 noyaux par expérience).

#### 5.3.2.1. Résultats : dynamique « rapide » en phase S pour les cellules HeLa.

Pour chaque angle de détection, les spectres obtenus sur ces 16 noyaux supposés être en phase S présentent des ressemblances assez importantes. Comme nous l'avons fait pour les cellules SHEP, nous n'allons pas ici présenter les trois spectres obtenus pour chacun des 16 noyaux étudiés, mais seulement les spectres des deux premiers noyaux et les deux derniers noyaux de chacune des cultures cellulaires étudiées. Figure 5.50 :  $\phi = 16^\circ$  ; Figure 5.51 :  $\phi = 27^\circ$  et Figure 5.52 :  $\phi = 38^\circ$ , à chaque fois, nous présentons en haut à gauche le spectre obtenu sur le premier noyau de la première expérience (Noyau 1-1) ; en bas à gauche le spectre obtenu sur le huitième noyau de la première expérience (Noyau 8-1) ; en haut à droite le spectre obtenu sur le premier noyau de la seconde expérience (Noyau 1-2) ; en bas à droite le spectre obtenu sur le huitième noyau de la seconde expérience (Noyau 8-2).

- À  $16^\circ$  (Figure 5.50), nous observons une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps très courts, typiquement dans la gamme  $10^{-5} - 10^{-3}$  s, puis une bosse dont le maximum se trouve entre  $1.10^{-2}$  s et  $3.10^{-2}$  s, un minimum de  $g(s)$  autour de  $10^{-1}$  s et, une ou deux bosses entre  $10^{-1}$  et 1 s. Les amplitudes de  $g(s)$  semblent moins grandes pour les derniers noyaux (Noyau 8-1 et Noyau 8-2), mais en dehors de cette observation, tous les noyaux montrent des spectres assez similaires ; on ne voit pas de différences prononcées.
- À  $27^\circ$  (Figure 5.51), on observe toujours une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts sur une plage un peu moins étendue qu'à  $16^\circ$ , dans la gamme  $10^{-5} - 3.10^{-4}$  s, puis une bosse, dont le maximum se trouve autour de  $3 - 4.10^{-3}$  s, un minimum de  $g(s)$  autour de  $10^{-2}$  s et deux ou trois bosses entre  $10^{-2}$  et 1 s. L'amplitude de  $g(s)$  des bosses entre  $10^{-2}$  s et 1 s semble moins grande pour le dernier noyau de la première expérience (Noyau 8-1), là encore, et en dehors de cette observation, on n'observe pas de différences marquées entre les différents spectres.
- À  $38^\circ$  (Figure 5.52), on observe encore la décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, mais sur une gamme encore plus réduite,  $10^{-5} - 10^{-4}$  s. Ensuite, une ou trois petites bosses entre  $10^{-4} - 10^{-1}$  s, puis un minimum de  $g(s)$  vers  $10^{-1}$  s suivi par une remontée de  $g(s)$ . Pour cet angle aussi, il n'y a pas de dissemblances remarquables entre les différents spectres.



**Figure 5.50.** Spectres du premier noyau de la première expérience (Noyau 1-1), du huitième noyau de la première expérience (Noyau 8-1), du premier noyau de la seconde expérience (Noyau 1-2) et du huitième noyau de la seconde expérience (Noyau 8-2), obtenus à  $16^\circ$ .

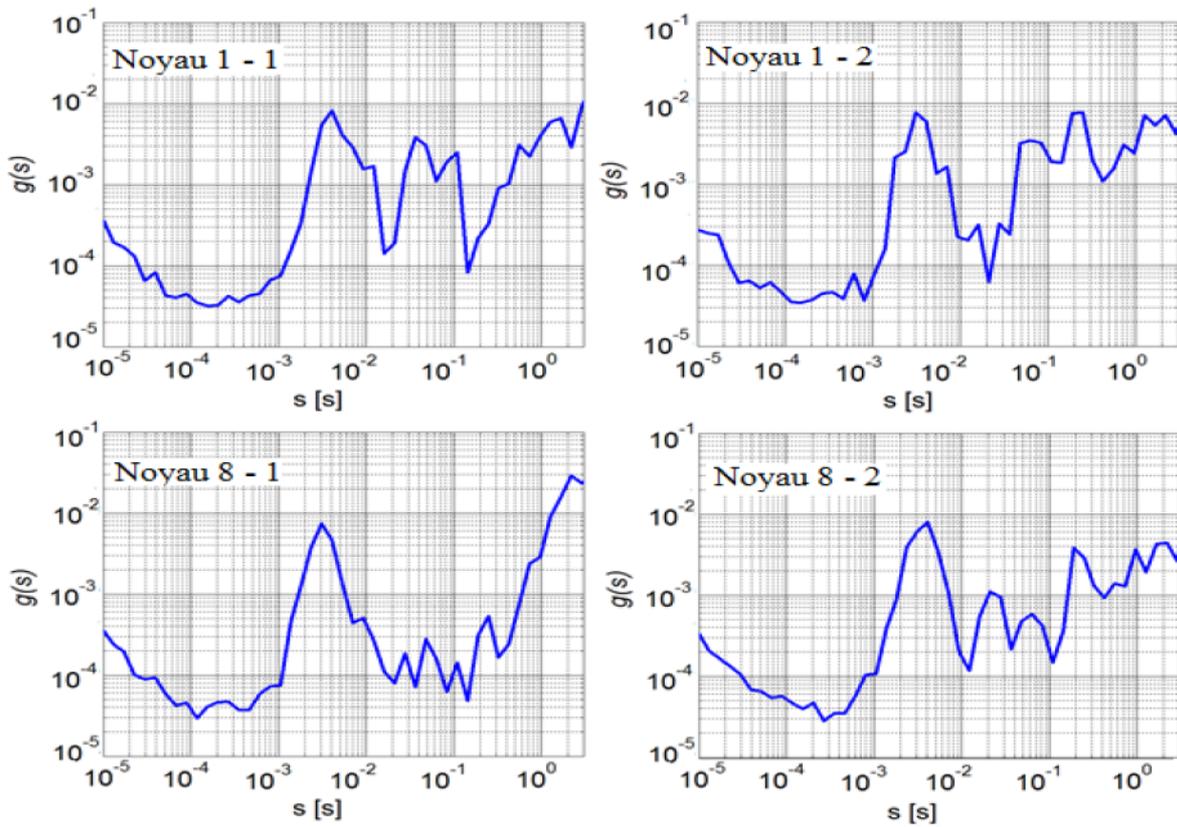


Figure 5.51. Spectres à 27° pour les quatre mêmes noyaux que pour la Figure 5.50.

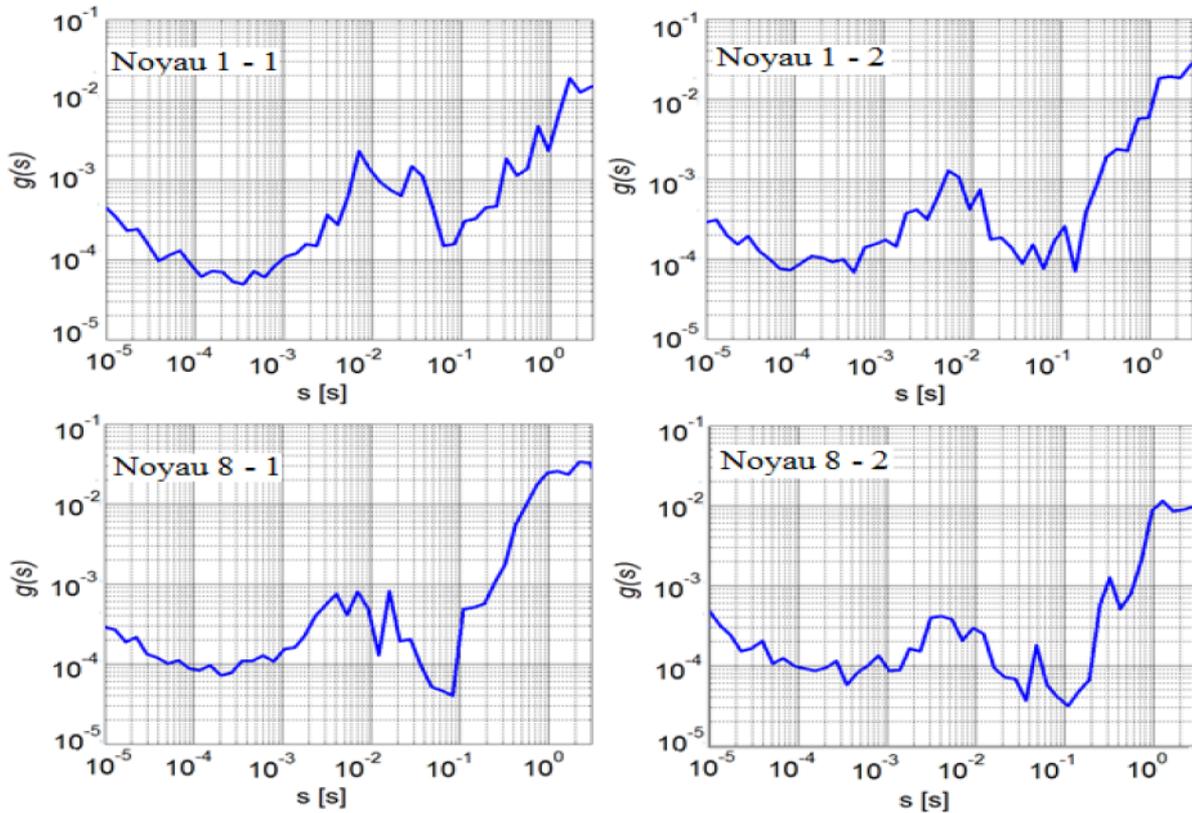
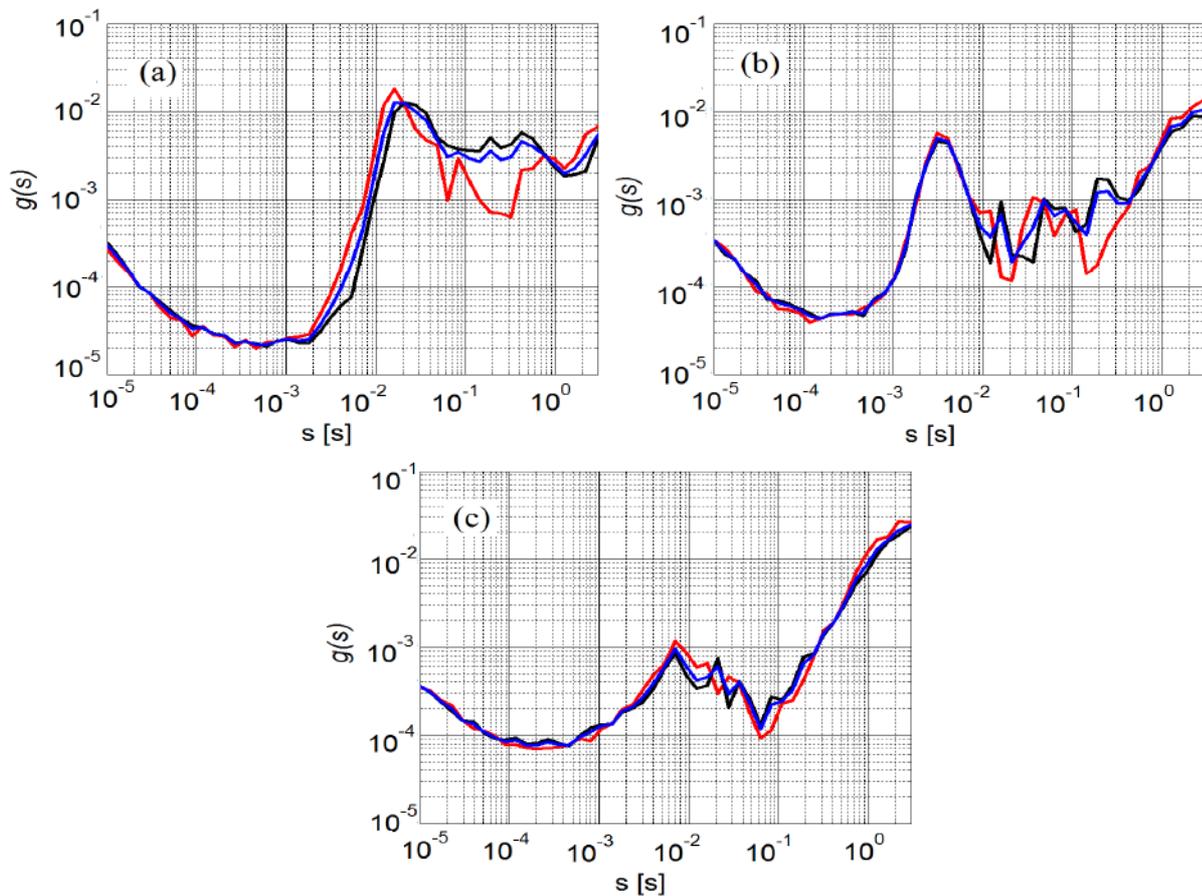


Figure 5.52. Spectres à 38° pour les quatre mêmes noyaux que pour la Figure 5.50.

Donc comme pour les noyaux de cellules SHEP en phase S, la variabilité des spectres est très faible. Nous ne pouvons donc pas conclure si les petites disparités observées entre les spectres sont justes le fait de « fluctuations » ou, une vraie évolution temporelle de la dynamique « rapide » du noyau en phase S. Cependant, et comme pour les cellules SHEP, on peut penser que s'il existe une évolution temporelle de la dynamique « rapide » du noyau en phase S, celle-ci doit être faible.

Figure 5.53, nous montrons les moyennes réalisées sur chacune des deux expériences, ces moyennes ont été calculées sur les huit spectres obtenus dans les deux cas (les courbes noires pour les moyennes réalisées sur la première expérience ; les courbes rouges pour les moyennes réalisées sur la seconde expérience). Les courbes bleues sont, elles, les moyennes sur les deux expériences réunies (donc sur les 16 spectres). Comme pour les cellules SHEP, les deux expériences donnent des résultats très proches et là encore, on peut penser que nous avons une bonne estimation de la dynamique « rapide » d'un noyau en phase S. La dynamique « rapide » de la phase S, semble donc relativement homogène tout au long de la durée de cette phase.

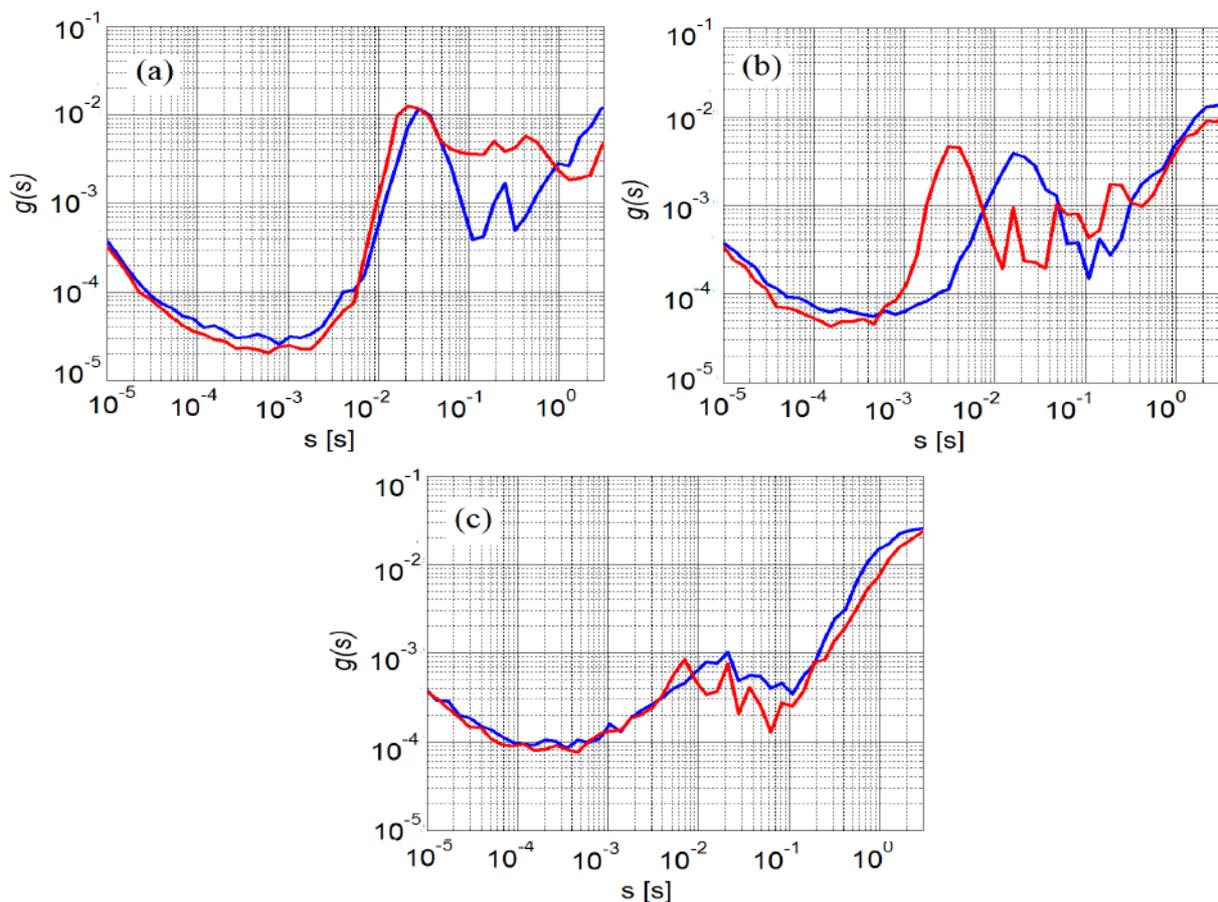


**Figure 5.53.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), moyennes des spectres obtenus sur des noyaux de cellules en phase S ; courbes rouges : moyennes réalisées sur les 8 noyaux de la première expérience ; courbes noires : moyennes réalisées sur les 8 noyaux de la seconde expérience ; courbes bleues : moyennes calculées sur les 16 noyaux étudiés.

Figure 5.54, on compare la dynamique « rapide » en phase S des noyaux des cellules HeLa à celle des noyaux des cellules SHEP. On a choisi de comparer la moyenne des spectres  $g(s)$  des 16 noyaux en phase S mesurés pour chacune des deux lignées cellulaires. Pour chaque angle de détection, on présente ces moyennes ainsi ; courbes bleues : moyennes des spectres des 16 noyaux

en phase S pour les cellules SHEP ; courbes rouges : moyennes des spectres des 16 noyaux en phase S pour les cellules HeLa. On observe :

- À  $16^\circ$  et  $38^\circ$ , on remarque qu'il y a une forte ressemblance entre les deux spectres des noyaux des cellules SHEP et HeLa. La décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts est la même pour les deux lignées cellulaires, dans la gamme  $10^{-5} - 10^{-3}$  s à  $16^\circ$  et,  $10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4}$  s à  $38^\circ$ . Le maximum de la bosse centrale est quasiment à la même position pour les deux lignées, aussi bien à  $16^\circ$  et  $38^\circ$ . Au-delà de  $10^{-1}$  s, les spectres des deux lignées cellulaires se ressemblent à  $38^\circ$ , mais, à  $16^\circ$ , on remarque une amplitude de  $g(s)$  un peu plus grande pour les noyaux des cellules HeLa.
- À  $27^\circ$ , on observe la même ressemblance entre les deux lignées cellulaires concernant la décroissance lente de  $g(s)$  et, au-delà de  $10^{-1}$  s, mais, le maximum de la bosse centrale est à un temps plus long pour les noyaux des cellules SHEP.

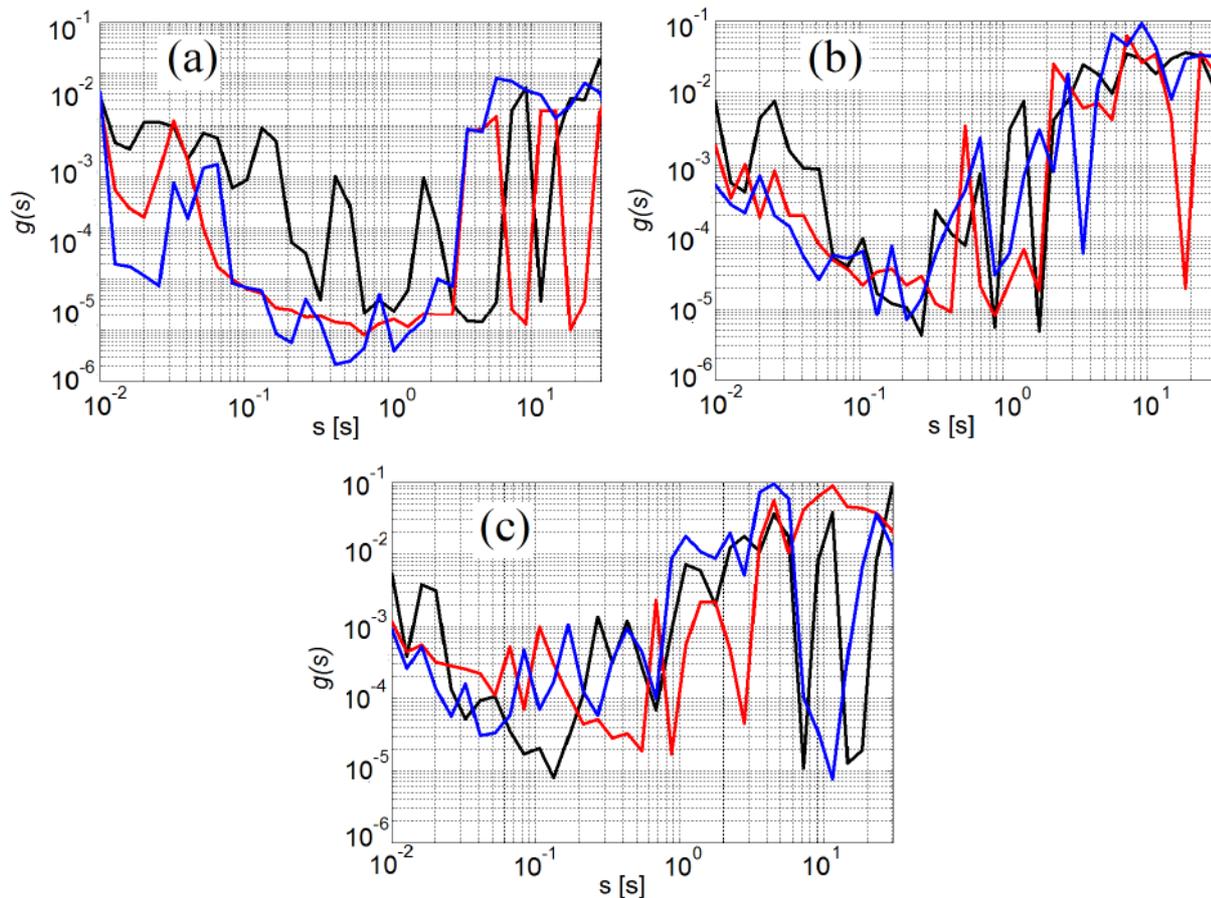


**Figure 5.54.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), moyennes des spectres obtenus sur des noyaux de cellules SHEP et HeLa en phase S ; courbes bleues : moyennes des spectres obtenus sur les 16 noyaux des cellules SHEP en phase S ; courbes rouges : moyennes réalisées sur les 16 noyaux des cellules HeLa en phase S.

Néanmoins, en dehors de ces quelques dissemblances, on peut dire que la dynamique « rapide » en phase S des noyaux des cellules HeLa, est assez analogue à celle des noyaux des cellules SHEP en phase S.

### 5.3.2.2. Résultats : dynamique « lente » en phase S pour les cellules HeLa.

Figure 5.55, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules SHEP en phase S. Comme pour les noyaux de cellules HeLa en phase G1, ou pour les noyaux des cellules SHEP, l'analyse brute de ces données n'est pas évidente du fait de la grande variabilité des spectres. Par contre, on a toujours l'impression que cette dynamique « lente » est due à des processus diffusifs (ou légèrement sous-diffusifs).



**Figure 5.55.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), spectres moyens des temps caractéristiques « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules HeLa en phase S.

### 5.3.3. Evolution de la dynamique interne du noyau des cellules HeLa en phase G2.

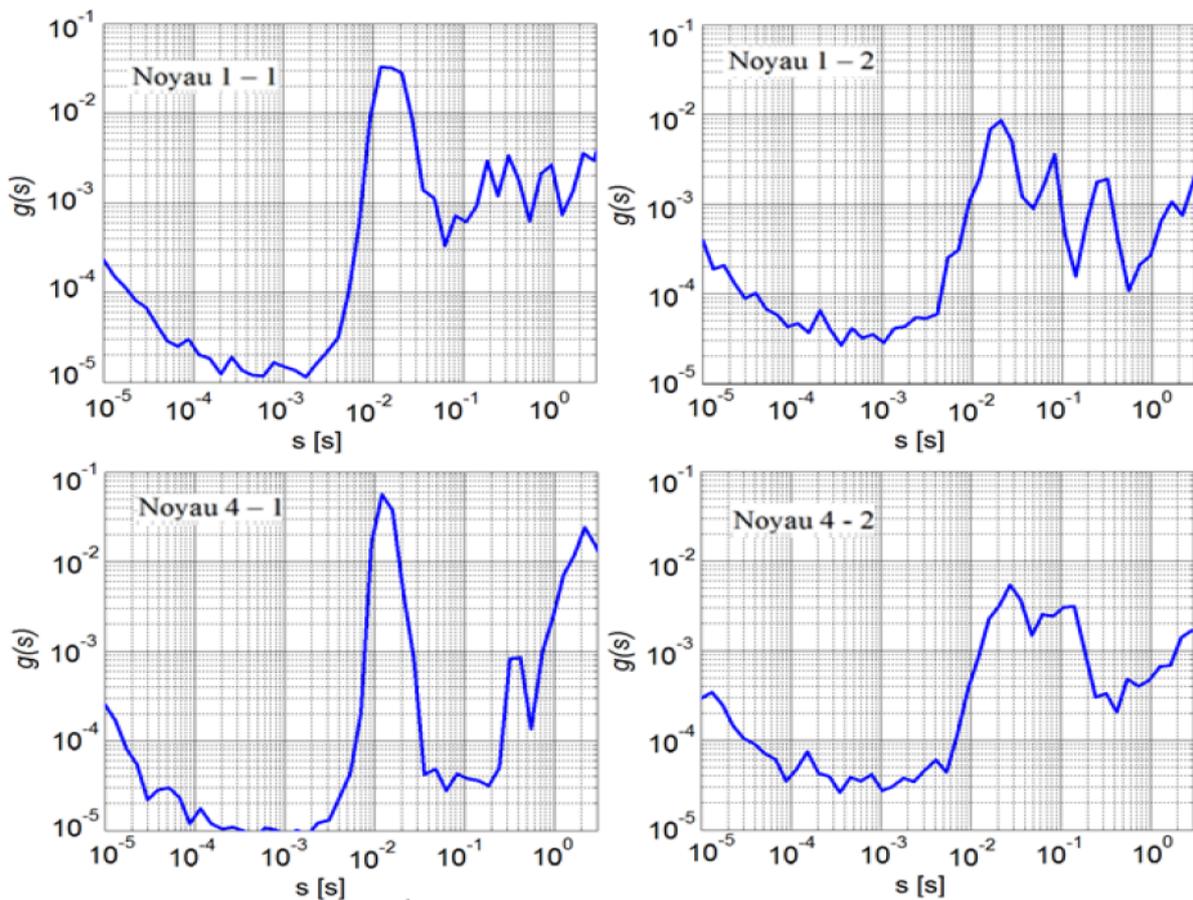
Pour étudier la dynamique des noyaux des cellules HELA en phase G2, nous avons utilisé la même procédure expérimentale que celle décrite au § 5.2.3, pour étudier la dynamique du noyau des cellules SHEP en phase G2. Nous avons ainsi pu faire des mesures sur 8 noyaux de cellules HeLa en phase S. Comme pour les cellules SHEP, les mesures ont été faites lors de 2 expériences distinctes, sur deux cultures cellulaires différentes (4 noyaux par expérience).

#### 5.3.3.1. Résultats : dynamique « rapide » en phase G2 pour les cellules HeLa.

Pour tous les angles de détection, les spectres obtenus sur les 4 noyaux d'une même expérience présentent des ressemblances très fortes, mais, les spectres obtenus sur les 4 noyaux de la première expérience sont très différents de ceux obtenus sur les 4 noyaux de la deuxième expérience.

Nous n'allons pas présenter ici les trois spectres obtenus pour chacun des 8 noyaux étudiés, mais, seulement pour les 4 noyaux, pris au début et à la fin des deux expériences. Pour les 3 angles (Figures 5.56, 5.57 et 5.58), nous présentons les des spectres deux premiers et des deux derniers noyaux de chaque culture cellulaire étudiée. En haut à gauche le spectre obtenu sur le premier noyau de la première expérience (Noyau 1-1) ; en bas à gauche le spectre obtenu sur le quatrième noyau de la première expérience (Noyau 4-1) ; en haut à droite le spectre obtenu sur le premier noyau de la seconde expérience (Noyau 1-2) ; en bas à droite le spectre obtenu sur le quatrième noyau de la seconde expérience (Noyau 4-2).

- À  $16^\circ$  (Figure 5.56), on observe une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, typiquement dans la gamme  $10^{-5} - 10^{-3}$  s, pour les 4 noyaux. Cependant, l'amplitude de  $g(s)$  dans cette gamme est 4 ou 5 fois plus élevée pour la seconde expérience que pour la première. Puis, une bosse dont le maximum se trouve vers  $1-2 \cdot 10^{-2}$  s pour le Noyau 1-1 et le Noyau 4-1 et vers  $2-3 \cdot 10^{-2}$  s pour le Noyau 1-2 et le Noyau 4-2, on peut aussi remarquer que cette bosse est plus marquée, moins large et plus haute pour les deux noyaux de la première expérience. Ensuite, on observe un minimum de  $g(s)$  autour de  $10^{-1}$  s suivi par un ou deux pics entre  $10^{-1}$  et 1 s.



**Figure 5.56.** Spectres du premier noyau de la première expérience (Noyau 1-1), du quatrième noyau de la première expérience (Noyau 4-1), du premier noyau de la seconde expérience (Noyau 1-2) et du quatrième noyau de la seconde expérience (Noyau 4-2), obtenus à  $16^\circ$ .

- À  $27^\circ$  (Figure 5.57), on observe toujours une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts sur une plage un peu moins étendue qu'à  $16^\circ$ , sur la gamme  $10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4}$  s pour les 4 noyaux, mais, là encore, l'amplitude de  $g(s)$  dans cette gamme est 4 ou 5 fois plus élevée pour la seconde

expérience. Puis, on a une bosse, dont le maximum se trouve autour de  $3 - 4 \cdot 10^{-3}$  s pour les 4 noyaux. Là encore, on peut aussi remarquer que cette bosse est plus marquée et moins large pour les deux noyaux de la première expérience. De plus, l'amplitude du maximum de la bosse des spectres obtenus sur les noyaux de la première expérience est au moins 10 fois plus grande que celle des spectres obtenus sur les noyaux de la seconde expérience. Ensuite, on observe un minimum de  $g(s)$  jusqu'à  $10^{-1}$  s suivi par un pic et une remontée de  $g(s)$  jusqu'à 1 s.

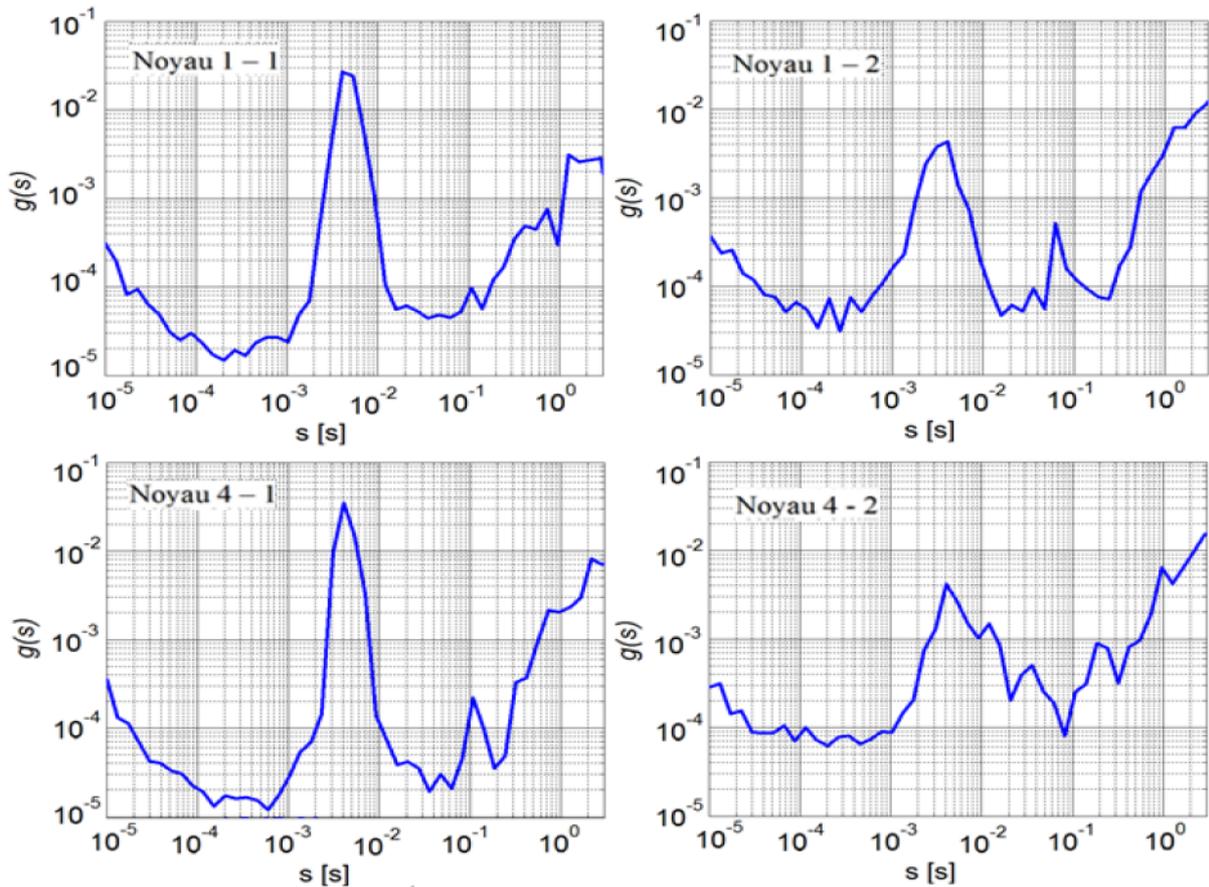


Figure 5.57. Spectres à  $27^\circ$  pour les quatre mêmes noyaux que pour la Figure 5.56.

- À  $38^\circ$  (Figure 5.58), on observe encore la décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, mais sur une gamme encore plus réduite :  $10^{-5}$  à  $1-2 \cdot 10^{-4}$  s pour les 4 noyaux. Maintenant, l'amplitude de  $g(s)$  dans cette gamme est quasiment 10 fois plus élevée pour la seconde expérience. Ensuite, on a une bosse dont le maximum se trouve vers  $7-8 \cdot 10^{-3}$  s suivie par un pic à  $10^{-1}$  s et, une remontée de  $g(s)$  jusqu'à 1 s pour le Noyau 1-1 et le Noyau 4-1. Pour le Noyau 1-2 et le Noyau 4-2, on remarque une bosse quasiment au même endroit, mais, beaucoup moins marqué et surtout beaucoup moins haute, puis un minimum de  $g(s)$  vers  $10^{-1}$  s suivi par une remontée de  $g(s)$  jusqu'à 1 s.

Pour les trois angles de détection, on remarque que la largeur et l'amplitude de la bosse centrale est plus grande et surtout beaucoup moins haute pour les noyaux de la deuxième expérience que pour ceux de la première.

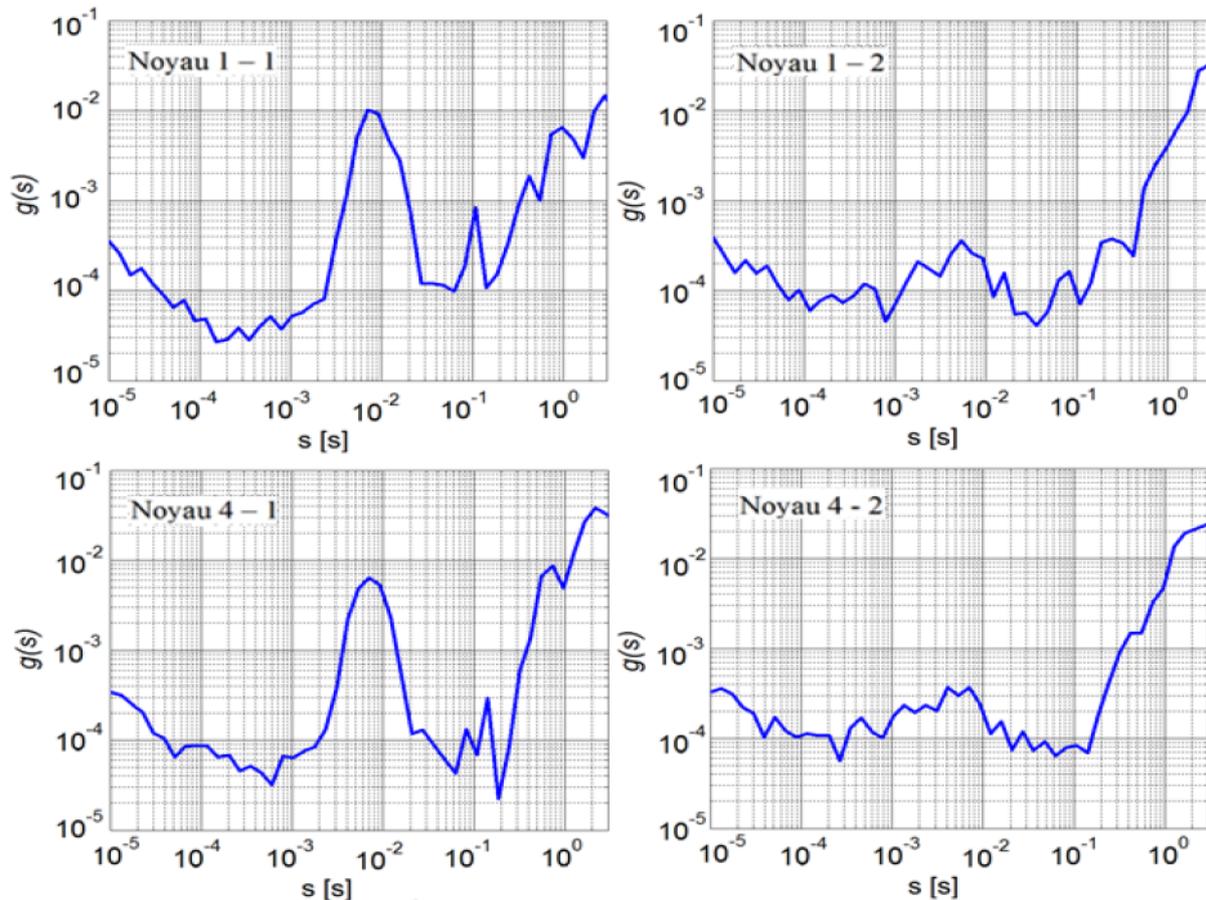


Figure 5.58. Spectres à  $38^\circ$  pour les quatre mêmes noyaux que pour la Figure 5.56.

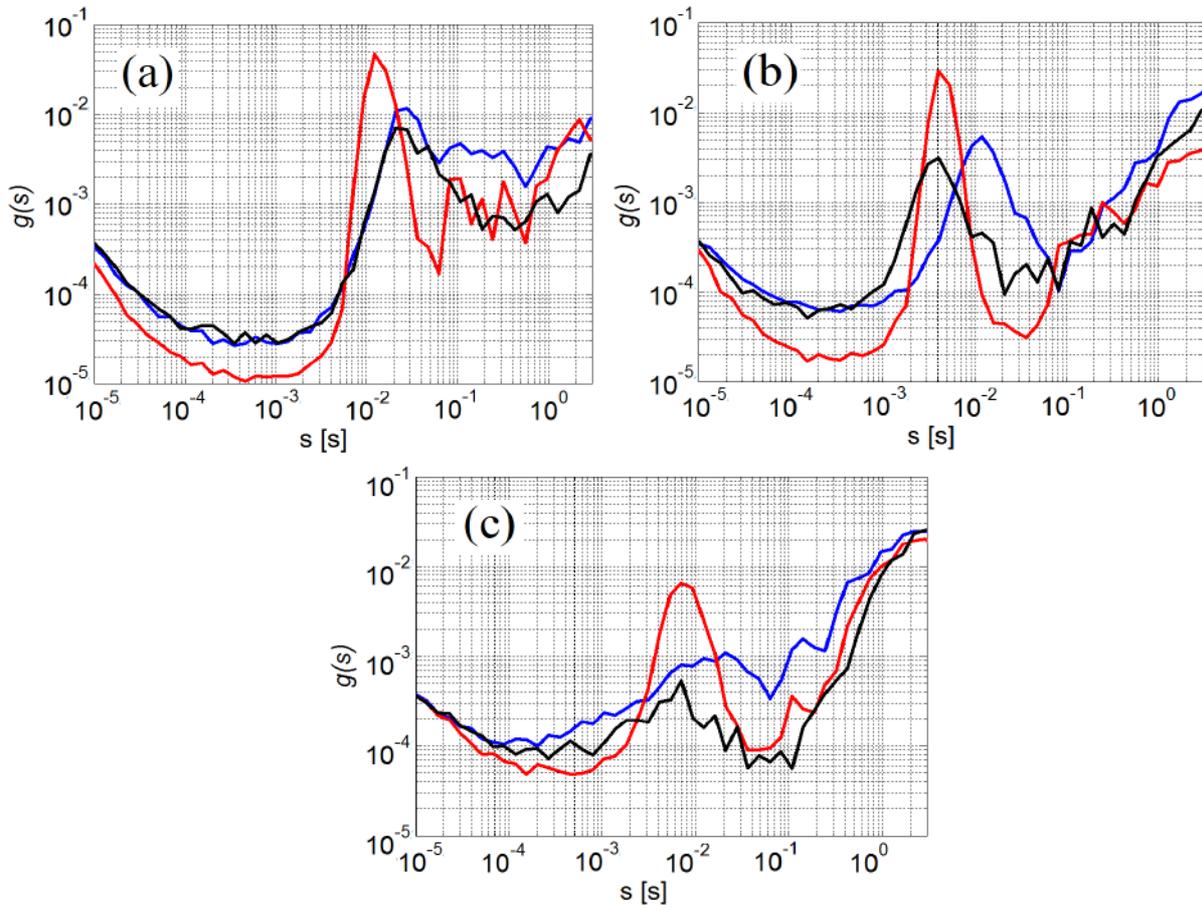
Contrairement à la phase S, où l'on avait remarqué une grande ressemblance entre tous les spectres mesurés, et où la moyenne des spectres des 8 noyaux de la première expérience et celle des 8 noyaux de la deuxième expérience étaient quasiment identiques, ici, les deux expériences produisent des spectres qui sont notablement différents. Il est donc difficile de savoir laquelle de ces deux expériences reflètent vraiment la dynamique « rapide » du noyau dans la phase G2.

Figure 5.59, nous présentons, pour les trois détecteurs, la moyenne calculée pour les spectres des 4 noyaux des cellules HeLa de la première expérience en phase G2 (les courbes rouges), la moyenne calculée pour les spectres des 4 noyaux des cellules HeLa de la deuxième expérience en phase G2 (les courbes noires) et, le spectre moyen calculé pour les noyaux des cellules SHEP en phase G2 (cf. § 5.2.3 ; les courbes bleues).

Très grossièrement, on peut remarquer, que, quelque soit l'angle de détection, les trois spectres moyennés sont différents :

- À  $16^\circ$  et  $38^\circ$ , même si les trois types de spectres moyennés sont différents, on peut toutefois remarquer que les moyennes des spectres des noyaux des cellules HeLa de la deuxième expérience ressemblent assez aux moyennes des spectres obtenus sur les noyaux des cellules SHEP en phase G2 ; l'allure est similaire, mais l'amplitude est différente. Par contre, il y a peu de points communs avec les moyennes des spectres des noyaux des cellules HeLa de la première expérience.
- A  $27^\circ$ , les moyennes des trois spectres sont toujours différents, mais, la position ainsi que la largeur de la bosse centrale des spectres des noyaux des cellules HeLa de la première et de la

deuxième expérience se ressemblent, mais, n'ont que peu de points communs avec les spectres moyens des noyaux des cellules SHEP en phase G2.



**Figure 5.59.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), moyennes des spectres obtenus sur des noyaux de cellules SHEP et HeLa en phase G2. Courbes bleues : moyennes des spectres obtenus sur les noyaux des cellules SHEP en phase G2 ; courbes rouges : moyennes réalisées sur les 4 noyaux des cellules HeLa de la première expérience en phase G2 ; courbes noires : moyennes réalisées sur les 4 noyaux des cellules HeLa de la deuxième expérience en phase G2.

### 5.3.3.2. Résultats : dynamique « lente » en phase G2 pour les cellules HeLa.

Figure 5.60, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules HeLa en phase G2.

Comme pour les noyaux de cellules en phase G1 ou en phase S, ou ceux des cellules SHEP, l'analyse brute des spectres de la dynamique « lente » est loin d'être évidente, et ceci toujours à cause de la grande variabilité des spectres. Nous sommes dans l'incapacité de comparer ces spectres avec ceux obtenus pour les autres phases du cycle cellulaire, ou pour les noyaux de cellules SHEP. À ce stade de notre étude, nous ne pouvons rien dire. Par contre, là encore, cette dynamique « lente » semble due à des processus diffusifs (ou légèrement sous-diffusifs).

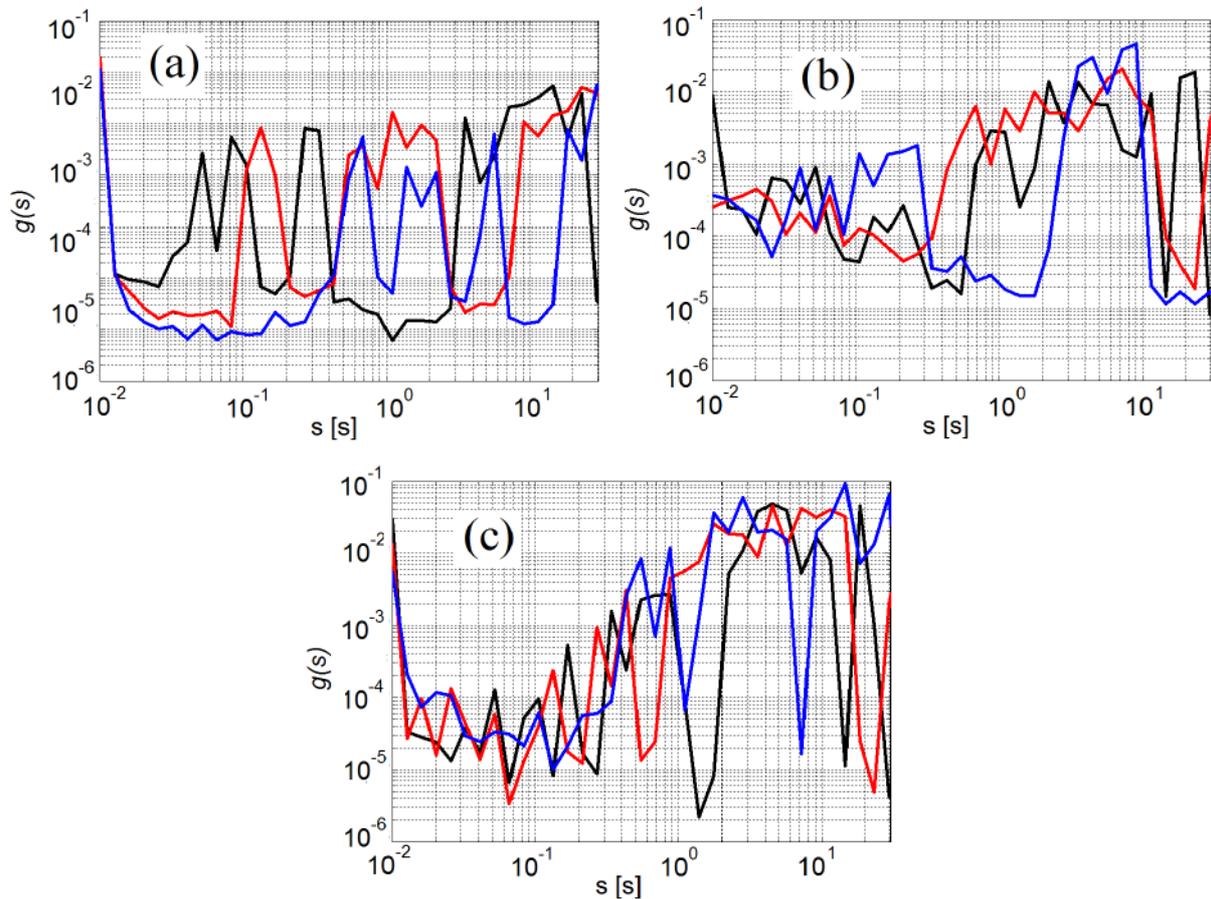


Figure 5.60. Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), spectres moyens des temps caractéristiques « lents » obtenus pour 3 noyaux de cellules HeLa en phase G2.

### 5.3.4. Evolution de la dynamique interne du noyau de cellules HeLa au cours du cycle cellulaire.

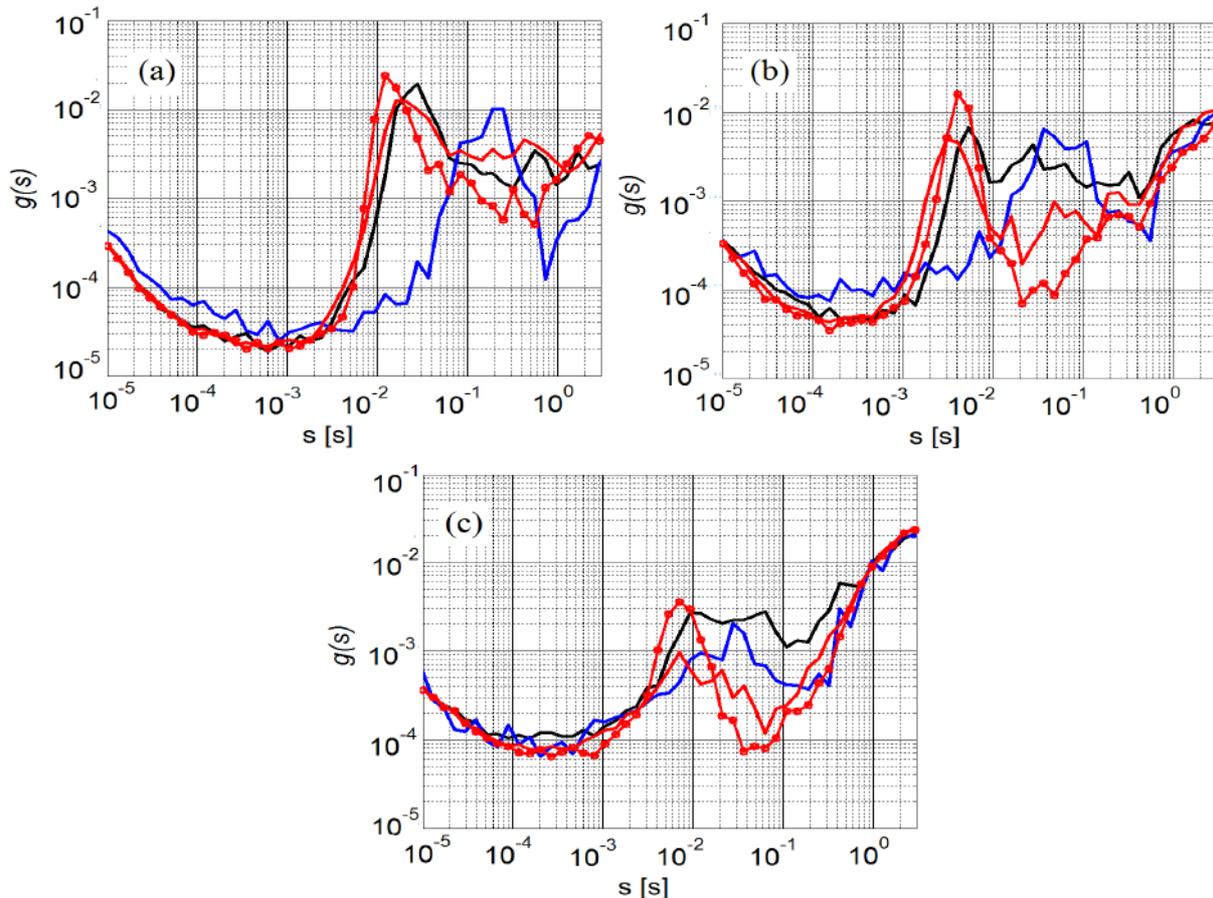
#### 5.3.4.1. Evolution de la dynamique interne « rapide ».

Sur la Figure 5.61, nous présentons pour les 3 angles de détection, les spectres associés à la dynamique « rapide » des noyaux des cellules HeLa que nous avons mesurés en phase G1 (entre la 3<sup>ième</sup> et la 6<sup>ième</sup> heure et, entre la 6<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> heure), en phase S et en phase G2. Cette figure montre l'évolution de la dynamique interne « rapide » du noyau d'une cellule HeLa au cours du cycle cellulaire. En première approximation, la dynamique interne « rapide » des noyaux des cellules HeLa est très similaire à celle des noyaux des cellules SHEP que nous avons observée au § 5.2. Ceci aussi bien pour l'allure générale des spectres, que pour leur évolution au cours du cycle cellulaire, mais aussi, pour les temps caractéristiques, qui, s'ils ne sont pas exactement les mêmes, sont très proches pour les deux lignées cellulaires. Du fait de leur accord avec les résultats que nous avons obtenus pour les noyaux des cellules SHEP, ils confirment aussi les résultats de la thèse de Michael Suissa.

Comme pour les cellules SHEP, on remarque d'abord l'existence de « sous-phases » ayant des dynamiques « rapides » distinctes, et donc, probablement avec des activités et/ou des organisations de la chromatine différentes, dans la phase G1. Les dynamiques « rapides » des phases S et G2 sont notablement différentes des dynamiques observées en phase G1, avec un glissement vers des

temps plus rapides. De plus, la dynamique « rapide » de la phase S, semble relativement homogène tout au long de la durée de cette phase.

La dynamique interne « rapide » des noyaux de cellules vivantes semble donc avoir un comportement « générique », ce qui n'est pas une véritable surprise car les processus biologiques, chimiques qui ont lieu au cours du cycle cellulaire sont les mêmes pour les différentes lignées. Comme nous l'avons déjà mentionné, les quelques différences qui sont observées entre les spectres des lignées SHEP et HeLa ainsi que dans leur évolution peuvent venir du fait que la durée du cycle cellulaire, et donc celle des différentes phases, n'est pas identique pour les deux lignées cellulaires.



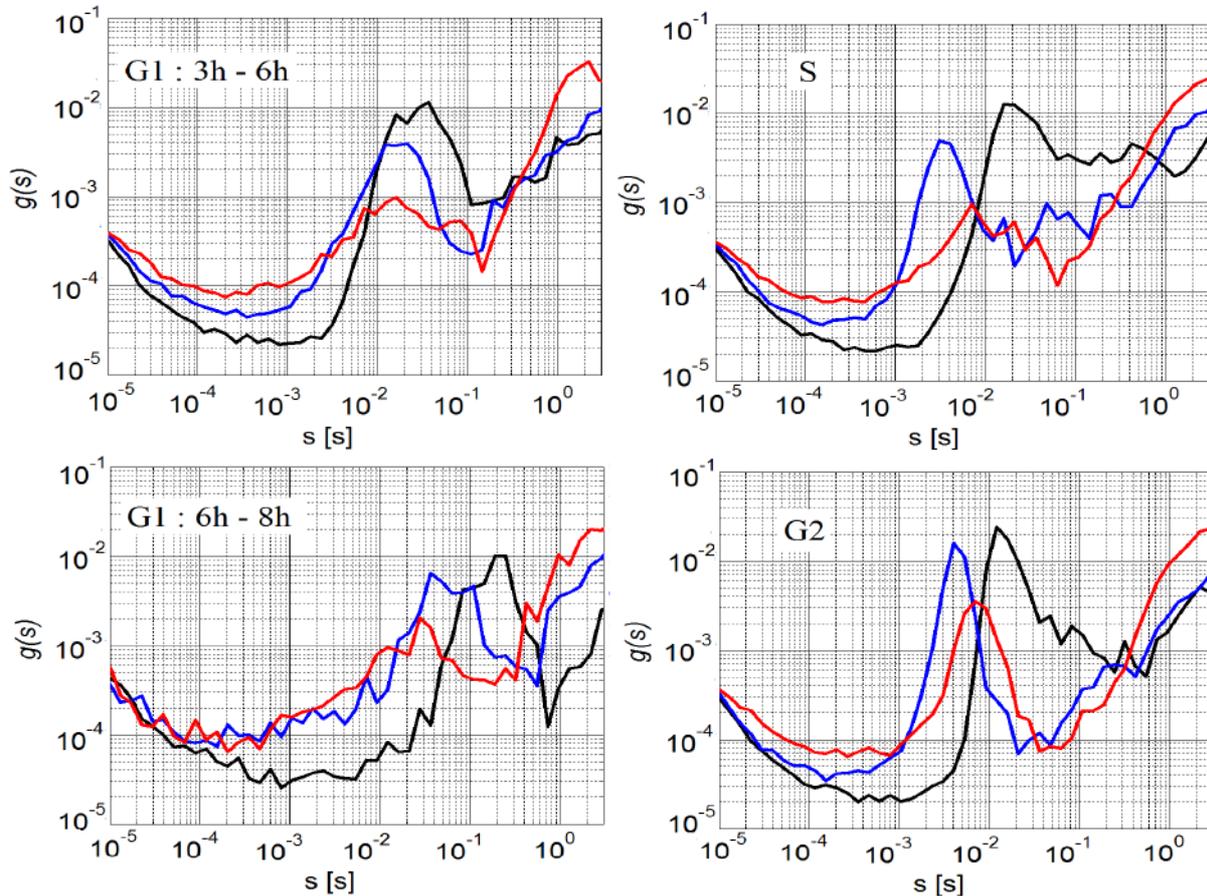
**Figure 5.61.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), spectres moyens obtenus pour des noyaux de cellules entre la 3<sup>ième</sup> et la 6<sup>ième</sup> heure de la phase G1 (courbes noires), entre la 6<sup>ième</sup> et la 8<sup>ième</sup> heure de la phase G1 (courbes bleues), des 8 noyaux en phase S (courbes rouges), et des 8 noyaux en phase G2 (courbes rouges avec des cercles).

#### 5.3.4.2. Evolution de la dynamique interne « rapide » en fonction de l'échelle spatiale.

Figure 5.62, pour chacune des périodes ayant une dynamique différente, nous présentons les spectres moyens obtenus sur les noyaux des cellules HeLa pour les 3 angles de détection. Comme pour les cellules SHEP, ces résultats sont très intrigants car ils ne semblent suivre aucune logique ; par exemple, pour les phases S et G2, la dynamique à  $27^\circ$  apparaît plus rapide que la dynamique  $38^\circ$ , ce qui est très étrange. Cependant le fait que ce résultat soit identique à celui déjà observé pour les cellules SHEP (Figure 5.37) et aussi avec ce qu'avait vu Michaël Suissa sur des noyaux de cellules en phase G1 lors de sa thèse, nous fait penser qu'il y a vraiment quelque chose derrière ça.

Est-ce la signature du fait que les volumes diffusants pour les trois angles ne sont pas les mêmes et donc que l'on sonde l'hétérogénéité spatiale du noyau ?

En tout cas, ces observations, ne nous permettent pas de conclure si les processus à l'origine de la dynamique interne « rapide » sont diffusifs, balistiques (pas de déplacement en  $1/q^2$  ou en  $1/q$ ) ou indépendants de l'échelle spatiale.



**Figure 5.62.** Pour chaque période avec une dynamique « rapide » différente, moyenne des spectres obtenus sur les noyaux de la phase considérée pour les 3 angles de détection ; courbes noires spectres à  $16^\circ$  ; courbes bleues spectres à  $27^\circ$  ; courbes rouges spectres à  $38^\circ$ .

#### 5.3.4.3. Evolution de la dynamique interne « lente ».

Comme nous l'avons déjà indiqué, nous sommes dans l'incapacité de comparer entre eux les spectres de la dynamique « lente » obtenus pour les différentes phases du cycle cellulaire sur les noyaux des cellules HeLa, pas plus que nous ne pouvons comparer ces spectres avec ceux obtenus sur les noyaux des cellules SHEP. Comme pour les noyaux des cellules SHEP, nous voyons 4-5 pics sortir par spectre, mais, ces pics ne sont jamais les mêmes d'un spectre à l'autre. Sur l'ensemble des noyaux de cellules HeLa dans une phase donnée, nous voyons sortir 10 à 12 temps caractéristiques différents (comme pour les cellules SHEP). Comme pour les cellules SHEP, les temps caractéristiques qui émergent varient exponentiellement avec l'ordre des pics. Mais, nous ne voyons aucune tendance se dessiner, aucune caractéristique bien définie qui nous permettrait de dire si cette dynamique évolue au cours du cycle cellulaire, ou en fonction de la lignée cellulaire.

À ce stade de notre étude, nous ne pouvons rien dire. Par contre, là encore, cette dynamique « lente » semble due à des processus diffusifs (ou légèrement sous-diffusifs), avec une distribution de coefficients de diffusion allant de  $10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à  $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 5.4. DYNAMIQUE INTERNE DU NOYAU D'UNE CELLULE VIVANTE EN PHASE G1 « PERTURBEE » PAR DES CONTRAINTES.

Après avoir présenté dans les paragraphes précédents les résultats sur l'étude de la dynamique interne du noyau des cellules SHEP et HeLa au cours de leur cycle cellulaire, nous présentons ici des résultats sur l'étude de la dynamique interne du noyau des cellules SHEP et HeLa (dans ce cas toujours en phase G1), dans des conditions de culture « anormales ». Dans un premier cas, nous avons fixé les cellules avant d'étudier la dynamique interne du noyau (c'était un test pour vérifier que la dynamique d'une cellule vivante est différente de celle d'une cellule morte). Dans le second, nous avons étudié la dynamique de noyaux de cellules qui sont en contact avec de l'hydroxyurée (ceci pour refaire une expérience similaire à une des expériences qu'avait faites Michaël Suissa pendant sa thèse et aussi pour voir comment la présence d'une drogue dans le milieu de culture pouvait modifier la dynamique du noyau). Dans le troisième cas, nous avons étudié la dynamique de noyaux de cellules qui ne sont pas à température physiologique (*i.e.* à  $37^\circ \text{ C}$ ), mais à température ambiante (environ  $23^\circ \text{ C}$ ). Il est connu que l'activité du noyau dépend fortement de la température ; en dessous de  $25^\circ \text{ C}$ , la cellule est normalement en état de quiescence, elle est sortie du cycle cellulaire, elle a stoppé son activité de « multiplication », on peut imaginer que sa dynamique sera différente de celle d'une cellule à  $37^\circ \text{ C}$ .

##### 5.4.1. Dynamique du noyau de cellules fixées.

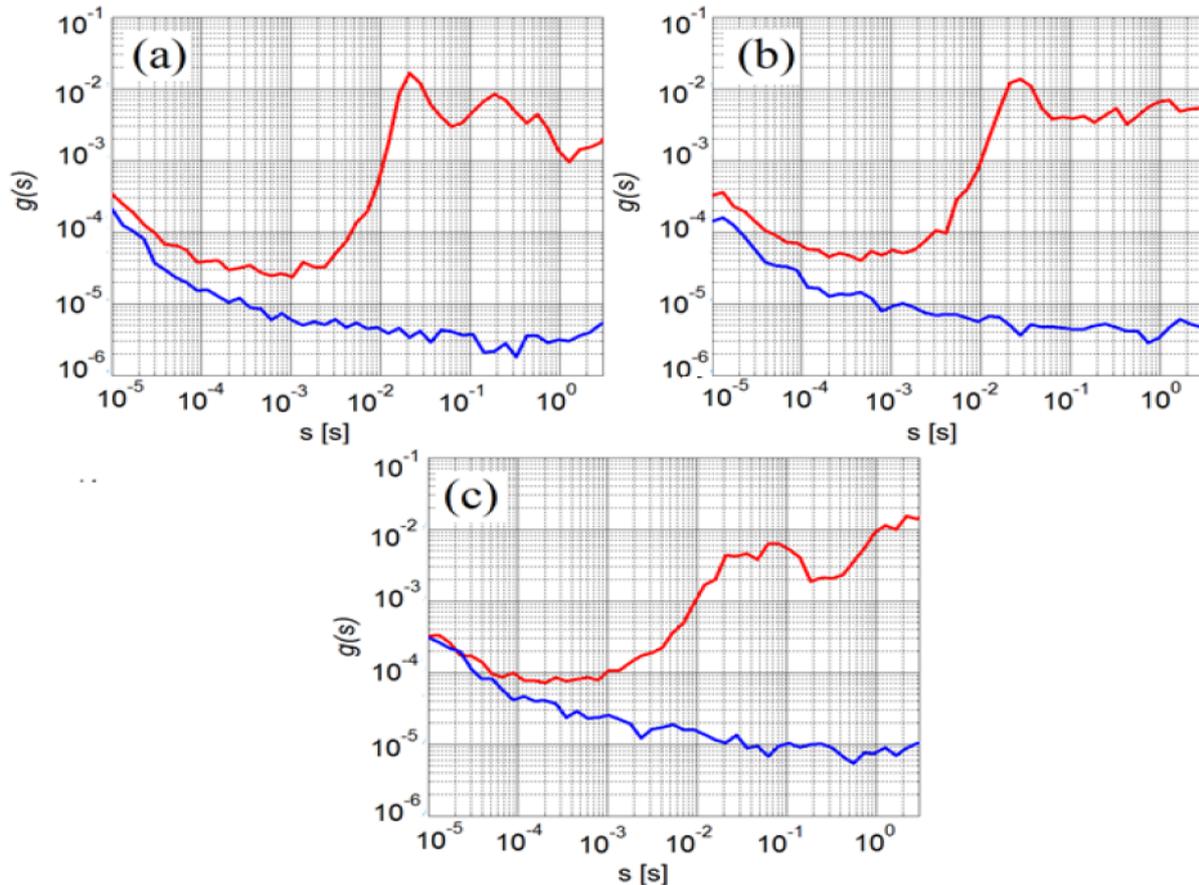
###### 5.4.1.1 Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau des cellules fixées.

On utilise le même protocole pour les deux lignées cellulaires. En pratique, une fois les cellules introduites dans leur chambre de culture et complètement étalées sur la surface du bas, on applique le protocole qui permet de synchroniser les cellules en fin de phase G1 (voir description détaillée au § 5.2.1.1.). Mais, juste après le rinçage de HU, on fixe les cellules. La fixation des cellules a pour objet de tuer les cellules tout en conservant leur structure. Certaines méthodes de fixation permettent de maintenir l'intégrité de la composition chimique cellulaire. C'est le type d'analyse qui détermine le choix d'un fixateur approprié. Pour l'étude du noyau et des chromosomes, on utilise toujours des fixateurs acides comme l'acétone, le formaldéhyde ou le glutaraldéhyde, fixateurs qui causent une dénaturation minimale et conservent plusieurs systèmes enzymatiques [6]. Donc, à  $t = 0$  heures après rinçage de HU, on rajoute le formaldéhyde au milieu de culture qu'on va introduire à l'intérieur de la chambre de culture, on laisse agir 30 minutes, puis, on rince le formaldéhyde avec du PBS. Ensuite, on met la chambre de culture qui contient les cellules fixées sur notre montage à  $37^\circ \text{ C}$ , pour étudier la dynamique interne du noyau de ces cellules (nous avons mesuré 5 noyaux de cellules SHEP fixées et 5 noyaux de cellules HeLa fixées).

###### 5.4.1.2. Résultats : dynamique « rapide » du noyau de cellules fixées.

Figure 5.63, nous présentons les résultats des mesures sur les noyaux cellules SHEP fixées ; nous avons exactement la même chose pour les cellules HeLa. Pour chaque angle de détection, on présente sur cette figure les spectres moyens sur les noyaux de cellules SHEP en fin de phase G1

(les courbes rouges ; ce qui, normalement, devrait correspondre à ce que l'on devrait mesurer si les cellules n'avaient pas été fixées) et la moyenne des spectres obtenus sur les noyaux des cellules SHEP fixées (les courbes bleues). On remarque tout de suite qu'à part aux temps très courts, où les spectres ne sont pas très différents, au delà de quelques  $10^{-4}$  s, l'amplitude de  $g(s)$  pour les noyaux de cellules SHEP en fin de G1 est beaucoup plus élevée (entre 10 fois et 1000 fois) que celle des spectres des noyaux des cellules SHEP fixées. En d'autres mots, à part aux temps très courts, une fois les cellules fixées, il n'y a plus de dynamique interne « rapide » dans le noyau. La fixation des cellules arrête tous les processus de la dynamique « rapide » du noyau des cellules.

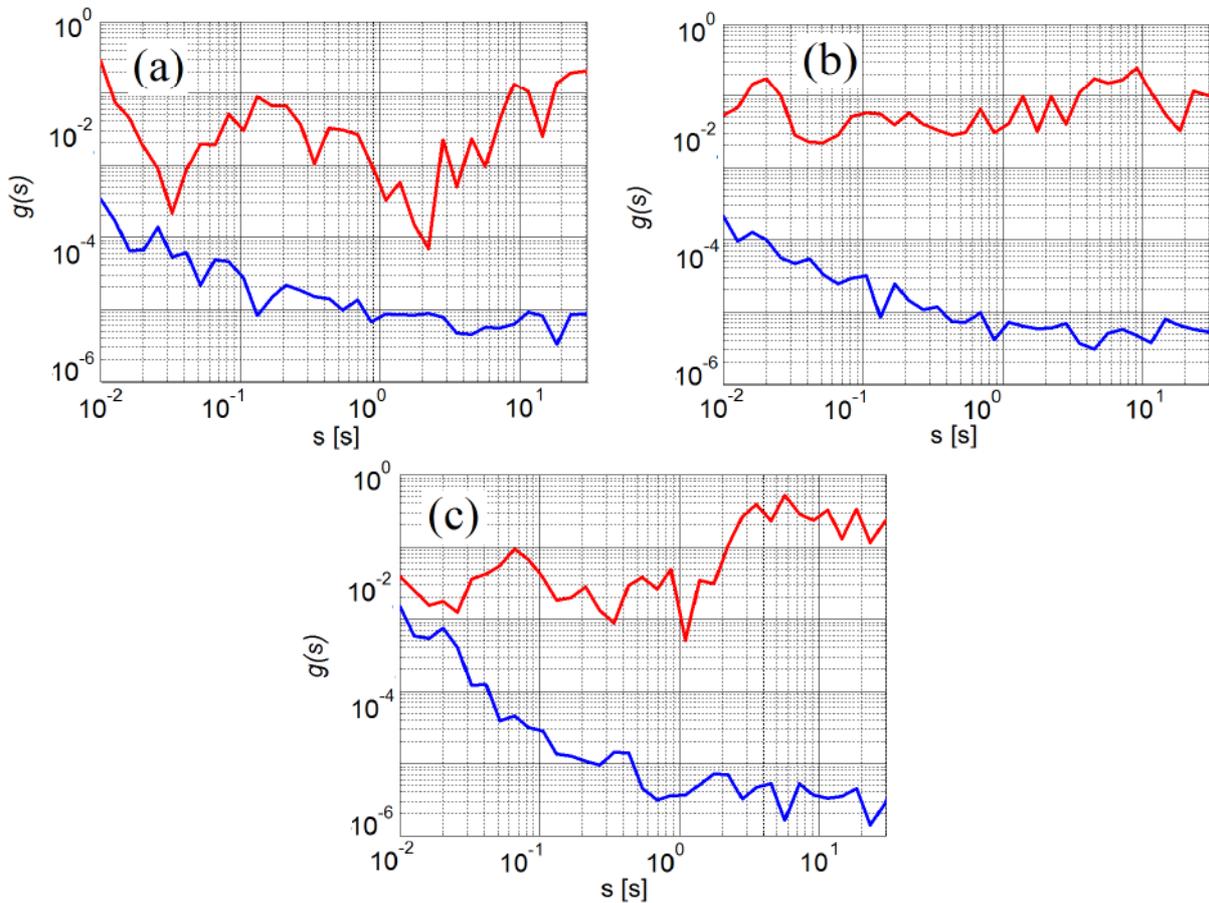


**Figure 5.63.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), courbes rouges : spectres moyens des noyaux de cellules SHEP en fin de phase G1 ; courbes bleues : moyennes des spectres des noyaux des cellules SHEP en fin de G1 fixées.

#### 5.4.1.3. Résultats : dynamique « lente » du noyau de cellules SHEP fixées.

Figure 5.64, on présente, pour chaque angle de détection, les spectres moyens obtenus pour les temps « lents » sur les noyaux de cellules SHEP en fin de phase G1 (les courbes rouges) et la moyenne des spectres obtenus pour les temps « lents » sur les noyaux des cellules SHEP fixées (les courbes bleues). Nous avons exactement la même chose pour les cellules HeLa. Là encore, on observe que l'amplitude de  $g(s)$  pour les noyaux de cellules SHEP en fin de G1 est beaucoup plus élevée (entre 10 fois et 10000 fois) que celle des spectres des noyaux des cellules SHEP fixées et, dans ce dernier cas, on ne voit plus aucun pic sur  $g(s)$ . Une fois les cellules fixées, il n'y a plus de

dynamique interne « lente » dans le noyau ; la fixation des cellules arrête aussi tous les processus de la dynamique « lente » du noyau des cellules.



**Figure 5.64.** Pour les trois angles de détection (*a* :  $16^\circ$  ; *b* :  $27^\circ$  ; *c* :  $38^\circ$ ), courbes rouges : spectres moyens des noyaux de cellules SHEP en fin de phase G1 ; courbes bleues : moyennes des spectres des noyaux des cellules SHEP en fin de G1 fixées.

Donc, de manière extrêmement rassurante, à part aux temps très courts (typiquement en dessous de  $10^{-4}$  s) où il reste encore quelque chose, la fixation des cellules arrête complètement la dynamique interne du noyau des cellules ; les cellules mortes n'ont plus de dynamique. En conséquence, nous sommes sûrs que les résultats présentés aux § 5.2 et 5.3 reflètent bien la dynamique interne du noyau de cellules vivantes.

#### 5.4.2. Effet de la présence de l'hydroxyurée dans le milieu de culture sur la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante.

##### 5.4.2.1 Procédures pour l'étude de la dynamique du noyau en G1 sous HU.

On applique le protocole utilisé pour synchroniser les cellules en fin de phase G1 (voir description détaillée au § 5.2.1.1.). Une fois que les cellules dans la chambre de culture sont complètement étalées sur la surface du bas, on remplace le milieu dans lequel elles baignent par un milieu contenant 0,5 mM d'hydroxyurée (HU). La chambre est ensuite scellée hermétiquement et

installée sur le montage de diffusion de la lumière, laissant les cellules dans un milieu de culture contenant 0,5 mM de HU. D'après les résultats de Michael Suissa [1-4] sur l'évolution des cellules SHEP placées dans un milieu de culture contenant 0,5 mM de HU, nous avons 9 heures, typiquement entre la 6<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> heure, après l'introduction de HU dans le milieu de culture, pour réaliser des expériences sur des cellules qui sont à plus de 90 % en phase G1. Nous avons choisi de réaliser nos expériences entre la 9<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure après la mise en contact des cellules avec HU. Avec cette procédure, nous avons pu étudier 7 noyaux de cellules (SHEP et HeLa) en phase G1 sous HU, dont les numéros, de 1 à 7 sont donnés en fonction de la durée pendant laquelle les cellules sont restées sous HU (tableau 5.2).

Noyau	1	2	3	4	5	6	7
Durée sous HU (en heures)	9	9,5	10	10,5	11	11,5-	12

Tableau 5.2. Numéros des cellules en fonction de la durée sous HU.

#### 5.4.2.2. Résultats : dynamique « rapide » de noyaux de cellules en phase G1 sous HU.

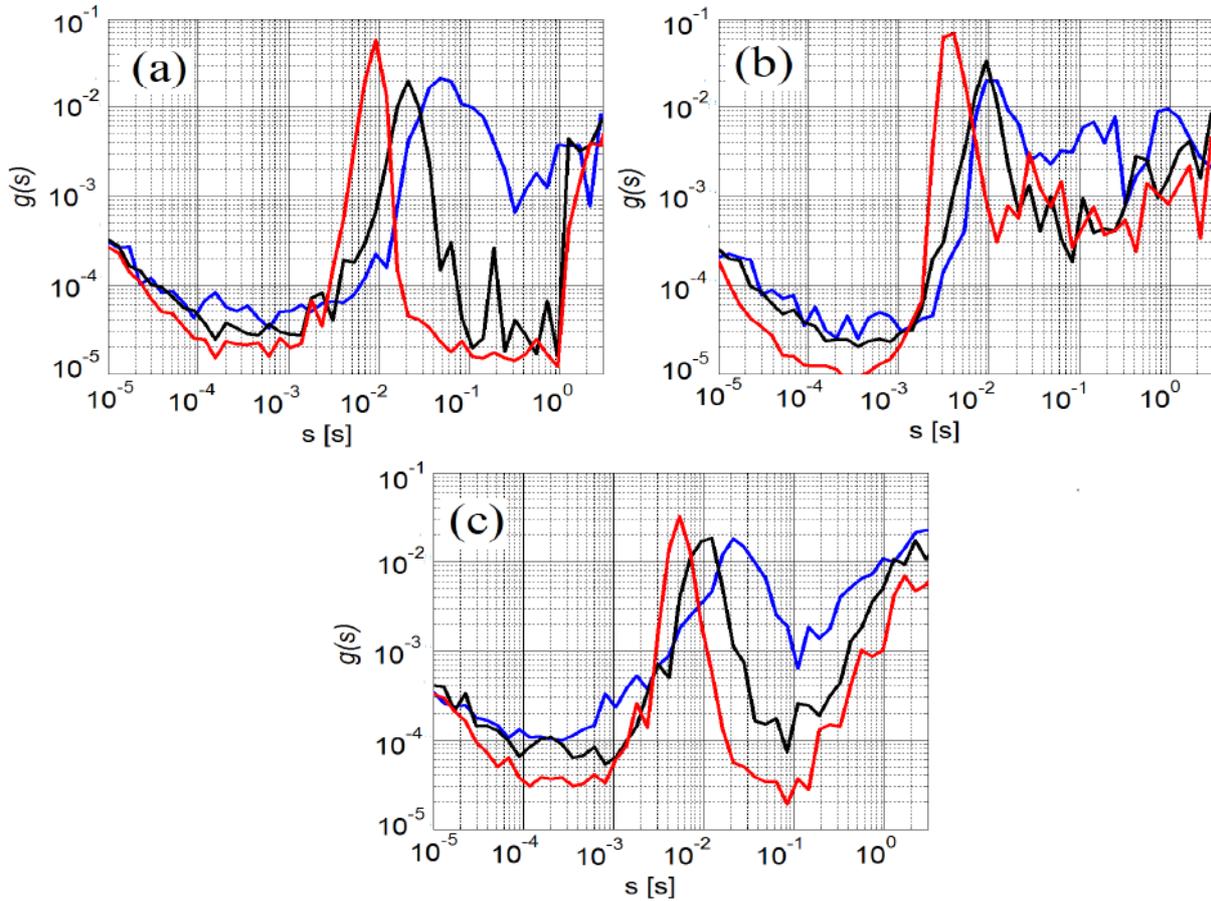
Pour les trois angles de détection nous ne remarquons pas de différences majeures pour les spectres des 4 premières noyaux (1 à 4), par contre, à partir du 5<sup>ème</sup> noyau, on commence à voir un décalage important du spectre vers les temps plus courts ; plus particulièrement, on remarque que le maximum de la première bosse se décale vers des temps plus rapides tout en s'affinant (cette première bosse est de moins en moins large). Figure 5.65, nous présentons, pour les trois angles de détection, les spectres  $g(s)$  obtenus pour les 1<sup>er</sup>, 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> noyau du tableau 5.2 (courbes bleues : noyau 1, 9 – 9,5 heures sous HU ; courbes noires : noyau 5, 11 – 11,5 heures sous HU et courbes rouges : noyau 7, 12 – 12,5 heures sous HU).

Sur cette figure, on remarque :

- À 16°, une décroissance lente de  $g(s)$  typiquement entre  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  s pour les trois noyaux. Ensuite une première bosse assez haute et assez large avec un maximum autour de  $5 \cdot 10^{-2}$  s pour le noyau 1, autour de  $2 \cdot 10^{-2}$  s pour le noyau 5 et, autour de  $10^{-2}$  s pour le noyau 7. On remarque que cette bosse est nettement plus fine pour les noyaux 5 et 7 que pour le noyau 1. Enfin, une remontée de  $g(s)$  après  $3 \cdot 10^{-1}$  s pour le noyau 1, deux pics entre  $10^{-1}$  et 1 s pour le noyau 5 et un minimum de  $g(s)$  entre  $10^{-1}$  à 1 s pour le noyau 7.
- À 27°, toujours une décroissance lente de  $g(s)$  typiquement entre  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  s pour les trois noyaux. Une première bosse bien marquée avec un maximum autour de  $10^{-2}$  s pour le noyau 1 et 5 et autour de  $3 \cdot 4 \cdot 10^{-3}$  s pour le noyau 7. Un ou deux pics au-delà de  $10^{-1}$  s pour les trois noyaux 1, 5.
- À 38°, la décroissance lente de  $g(s)$ , entre  $10^{-5}$  à  $3 \cdot 10^{-4}$  s pour le noyau 1 et entre  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  s pour les noyaux 5 et 7. Ensuite une bosse large avec un maximum autour de  $2 \cdot 10^{-2}$  s pour le noyau 1, des bosses beaucoup moins larges avec des maxima respectivement à  $10^{-2}$  s pour le noyau 5 et vers  $5 \cdot 10^{-3}$  s pour le noyau 7. Enfin, au-delà de  $10^{-1}$  s, une remontée de  $g(s)$  pour les trois noyaux.

On retrouve un comportement quasiment identique pour les cellules HeLa dans les mêmes conditions de culture. En conséquence, la dynamique interne « rapide » des noyaux de cellules en phase G1 sous HU semble évoluer de façon importante avec la durée du contact des cellules avec la

drogue. Dans la gamme de temps que l'on sonde, on semble avoir deux états avec des dynamiques bien différentes et, avec une transition assez brutale entre ces deux états.

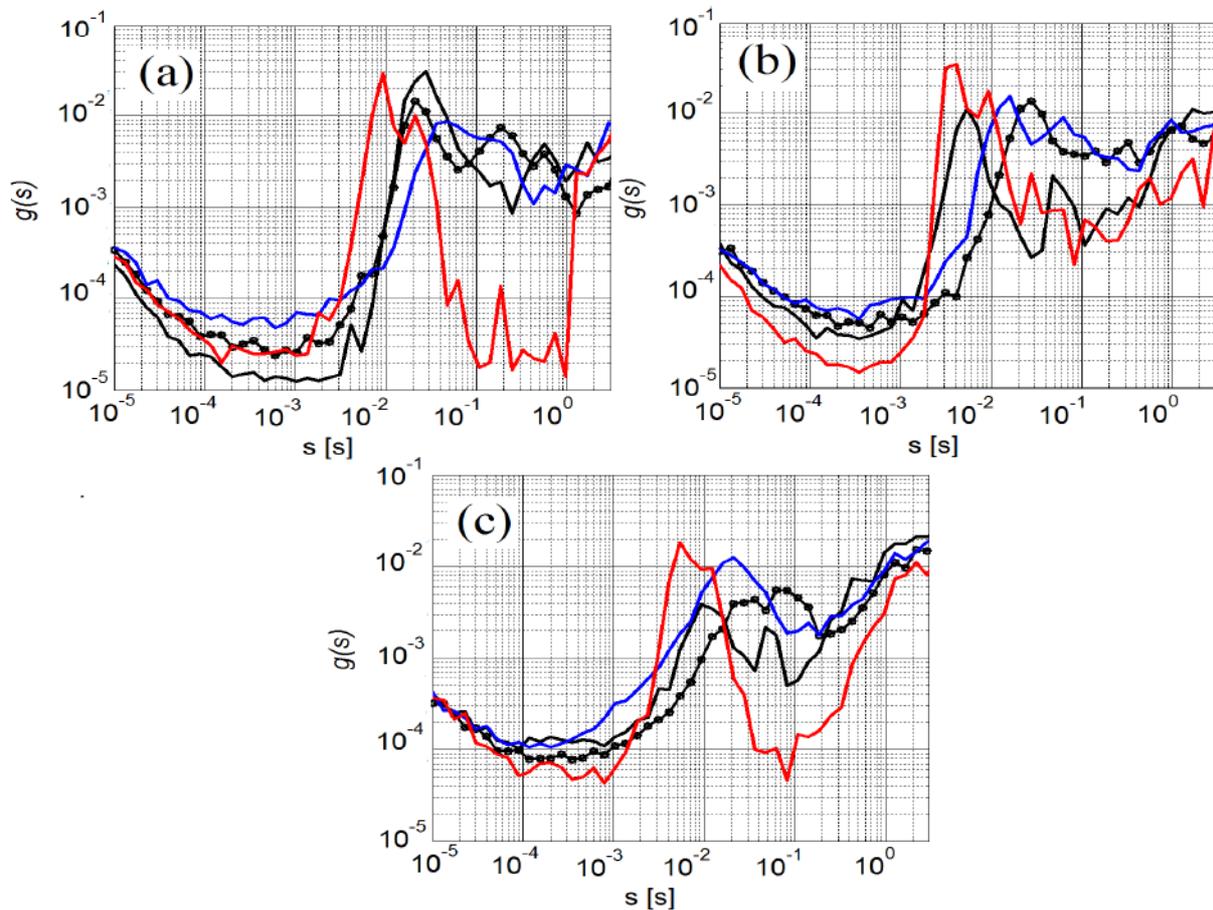


**Figure 5.65.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), courbes bleues : spectres du noyau 1 ; courbes noires : spectres du noyau 5 ; courbes rouges : spectres du noyau 7.

Figure 5.66, on compare pour les cellules SHEP (on a pratiquement le même résultat pour les cellules HeLa) la dynamique interne « rapide » des noyaux des cellules en phase G1 sous HU avec la dynamique interne « rapide » des noyaux des cellules en phase G1 dans des conditions normales de culture. (Courbes noires : spectres moyens pour les noyaux de cellules SHEP dans la période 3 à 5 heures en phase G1 dans des conditions de culture normales ; courbes noires avec des disques : spectres moyens pour les noyaux de cellules SHEP dans la période 5 à 8 heures en phase G1 dans des conditions de culture normales ; courbes bleues moyenne des spectres des noyaux 1 à 4 du tableau 5.2 ; courbes rouges : moyenne des spectres des noyaux 5 à 7 du tableau 5.2.)

Sur cette figure, on observe une différence manifeste entre les dynamiques « rapides » des noyaux des cellules SHEP en phase G1 dans des conditions de culture normales et celles des noyaux des cellules SHEP en phase G1 sous HU. Cette différence est plus particulièrement marquée pour le « second » état sous HU (donc après plus de 10,5 heures en contact avec la drogue). Alors, on remarque le décalage important de la première bosse du spectre vers des temps plus rapides, son « affinement » (typiquement on passe d'une bosse qui s'étale sur plus de deux décades,  $10^{-3}$  s à quelques  $10^{-1}$  s, à une bosse qui occupe moins de deux décades,  $10^{-3}$  s à quelques  $10^{-2}$  s), ainsi que la décroissance brutale de l'amplitude  $g(s)$  vers  $10^{-1}$  s. Donc la présence de HU dans le milieu de culture modifie fortement la dynamique interne « rapide » du noyau ; la présence de HU semble

« accélérer » la dynamique « rapide » du noyau des cellules en phase G1. Ce résultat est en accord avec les résultats de Michaël Suissa [1-4] qui lui aussi avait observé une dynamique « rapide » plus rapide pour des noyaux de cellules SHEP en phase G1 sous HU depuis plus d'une dizaine d'heures.



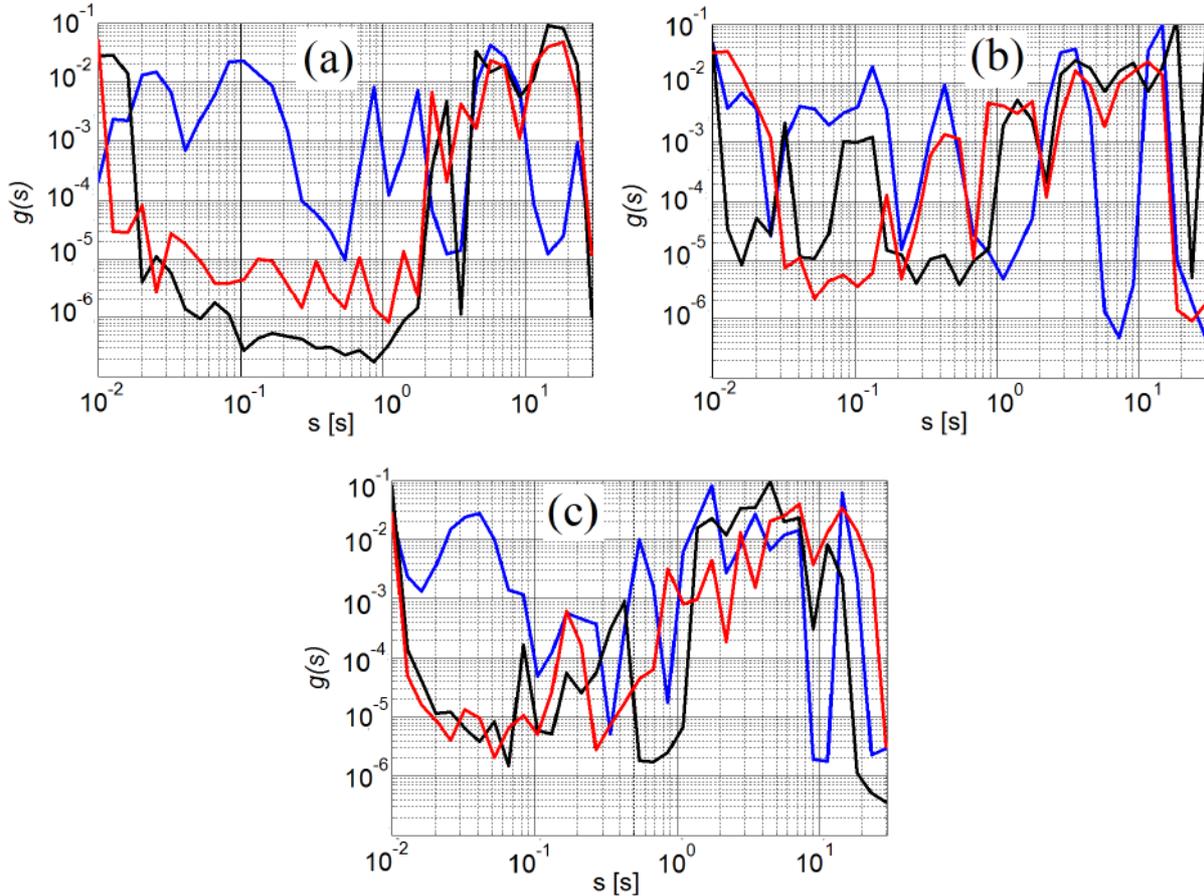
**Figure 5.66.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), courbes noires : moyenne des spectres des noyaux 1 à 4 en G1, courbes noires avec des ronds : moyenne des spectres des noyaux 5 à 10 en G1, courbes bleues : moyenne des spectres des noyaux 1 à 4 en G1 sous HU et courbes rouges : moyenne des spectres des noyaux 5 à 7 en G1 sous HU.

#### 5.4.2.3. Résultats : dynamique « lente » de noyaux de cellules en phase G1 sous HU.

Figure 5.67, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour les noyaux 1, 5 et 7 du tableau 5.2. Comme pour les spectres des temps caractéristiques « lents » des phases du cycle cellulaire, une analyse brute de ces spectres ne nous ne permet pas de remarquer une différence entre eux. De même, nous ne voyons pas de différences nettes avec les spectres des temps « lents » obtenus pour les noyaux de cellules SHEP en phase G1. Pourtant, Michaël Suissa, lors de sa thèse, avait observé un ralentissement de la dynamique dans la gamme  $10^{-1}$  s – quelques secondes en présence de HU par rapport aux conditions normales de culture. Ce n'est pas clair dans notre cas, même si l'on semble observer une amplitude de  $g(s)$  plus faible dans cette gamme de temps pour les noyaux de cellules en présence de la drogue (en particulier pour le 5<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup>) que pour ceux dans un milieu normal. En fait, le ralentissement dans la gamme  $10^{-1}$  s – quelques secondes, semble bien plus visible sur la Figure 5.66 où pour les moyennes des spectres des temps « rapides » sur les noyaux 5 à 7 du tableau 5.2 on

peut observer des amplitudes de  $g(s)$  bien inférieures à celles que l'on voit pour les noyaux dans des conditions normales de culture.

Là encore, cette dynamique « lente » semble due à des processus diffusifs (ou légèrement sous-diffusifs).



**Figure 5.67.** Pour les trois angles de détection ( $a : 16^\circ$  ;  $b : 27^\circ$  ;  $c : 38^\circ$ ), courbes bleues : spectres  $g(s)$  pour les temps « lents » du noyau 1 du tableau 5.2 ; courbes noires : spectres  $g(s)$  pour les temps « lents » du noyau 5 du tableau 5.2 ; courbes rouges : spectres  $g(s)$  pour les temps « lents » du noyau 7 du tableau 5.2.

### 5.4.3. Effet de la température sur la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante.

#### 5.4.3.1. Procédure pour l'étude de la dynamique interne du noyau à température ambiante (i.e. $23^\circ\text{C}$ ).

Afin de montrer l'effet de la température sur la dynamique interne du noyau des cellules, on va comparer la dynamique interne du noyau de cellules SHEP et HeLa en phase G1 dans des conditions normales ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) avec la dynamique du noyau de cellules SHEP et HeLa en phase G1 à la température ambiante de la pièce dans laquelle se trouve le montage expérimental (c'est-à-dire à environ  $23^\circ\text{C}$ ). Pour cela, on applique d'abord le même protocole que celui utilisé pour synchroniser les cellules SHEP et HeLa en fin de phase G1. Une fois les cellules dans leur chambre

de culture complètement étalées sur la surface du bas, on remplace le milieu de culture « normal » par du milieu de culture avec 0,5 mM de HU. On laisse les cellules dans ce milieu de culture pendant 15 heures avant de rincer la chambre et de remettre du milieu de culture « normal ». Normalement, à  $t=0$  heure après le rinçage de HU, le pourcentage de cellules en phase G1 est important ; d'après nos mesures un peu plus de 75 % et on sait que ce taux va rester important pendant environ 3 heures.

On installe la chambre de culture sur le montage de diffusion dynamique de la lumière, dans l'étau en dural préalablement chauffé à 37° C. On fait une première mesure de 30 minutes sur un premier noyau pour s'assurer que la dynamique pour cette culture cellulaire est celle qui est attendue. Puis, nous coupons le chauffage de l'étau en dural, dont la température chute « brutalement », en 20 – 25 minutes, de 37° C à température ambiante (environ 23° C). Nous avons fait un test avec un thermocouple introduit dans la chambre de culture, et nous avons vu que le milieu refroidissait un plus lentement que l'étau et atteignait la température ambiante en 25 – 27 minutes. Nous commençons donc nos mesures sur des noyaux de cellules en phase G1 à 23° C, 30 minutes après avoir coupé le chauffage de l'étau (c'est notre temps 0). Nous avons fait des expériences pendant les trois heures (donc 6 mesures de 30 minutes sur 6 noyaux ; cf. Tableau 5.3, noyaux numéroté de 1 à 6). Après ces trois heures, nous avons remis la température à 37° C et, après 30 minutes d'attente pour que le milieu atteigne les 37° C, nous avons fait 2 autres mesures de 30 minutes chacune sur 2 noyaux de cellules pour voir l'effet de la remise à la température physiologique (noyaux appelés 7 et 8).

Noyau	1	2	3	4	5	6
Temps à 23° C	0h – 0.5h	0.5h – 1h	1h – 1.5h	1.5h – 2h	2h – 2.5h	2.5h – 3h

**Tableau 5.3.** Numéros de noyaux mesurés en fonction du temps passé à 23° C (aussi bien pour les cellules SHEP que HeLa).

Il est à noter que nous avons effectué des tests sur les cellules SHEP et HeLa mises sur notre montage dans leur chambre de culture à température ambiante de la pièce ; les vidéos faites avec notre caméra montrent que les cellules restent bien vivantes pendant au moins 48 heures, mais elles ne se divisent plus. Ceci conforte l'idée que les cellules sont bien en quiescence et que l'on peut faire 3 heures d'expériences dans ces conditions sans problème.

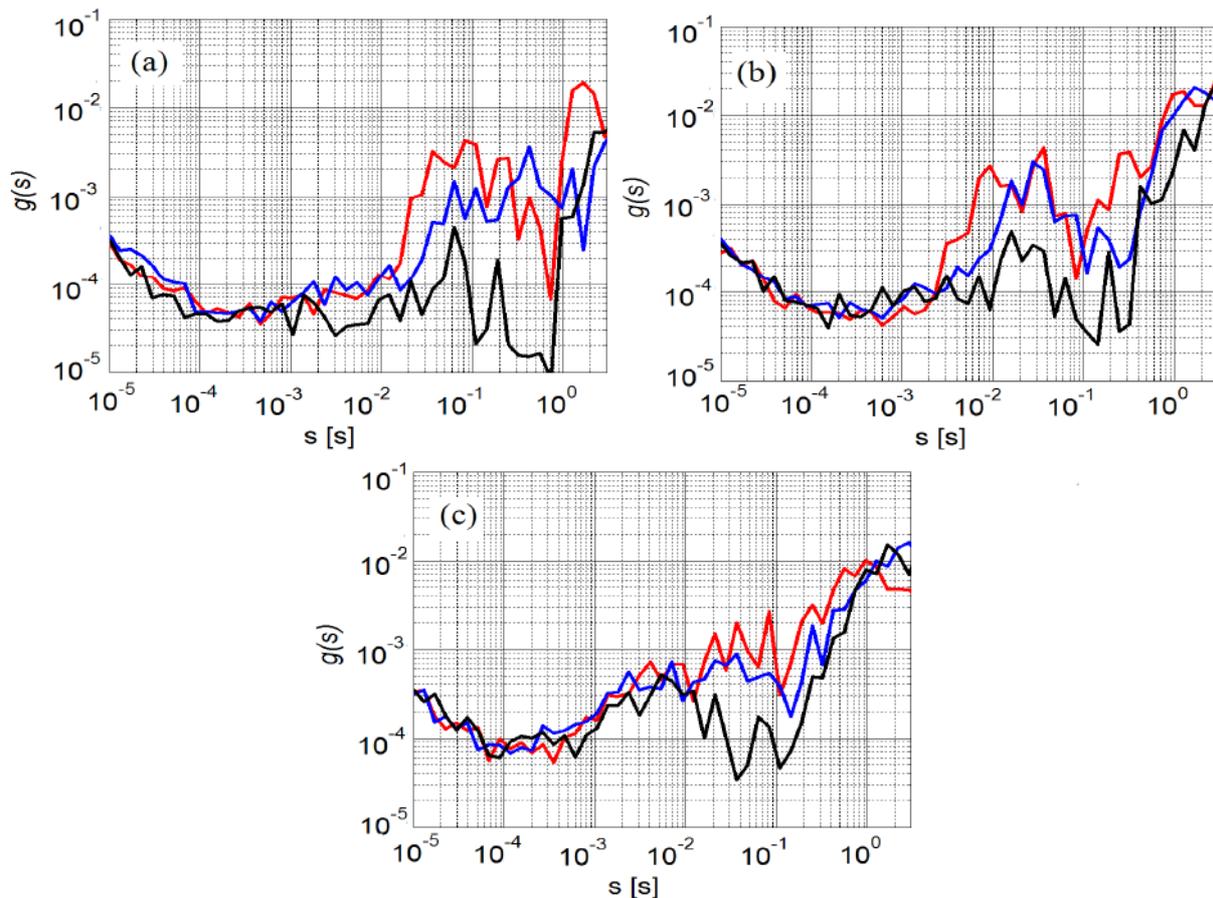
#### 5.4.3.2. Résultats : dynamique « rapide » de noyaux de cellules en phase G1 à 23° C.

Pour les trois premiers noyaux de cellules mesurés après la mise à température ambiante, on remarque immédiatement que l'amplitude  $g(s)$  des spectres « rapides » pour ces noyaux diminue avec l'augmentation de la durée pendant laquelle les cellules sont laissées à 23° C (Figure 5.68). Par contre, à partir du 4<sup>ème</sup> noyau, on ne voit pas de différences majeures entre l'amplitude du spectre du 3<sup>ème</sup> noyau et celles des 3 derniers noyaux du tableau 5.3 (Figure 5.69).

La chose la plus remarquable que l'on peut observer sur ces deux figures, c'est la disparition progressive (du mois sa forte diminution) de la première bosse, cette bosse centrale qui est présente sur tous les spectres que nous avons mesurés jusqu'à maintenant (sauf dans le cas des cellules fixées). Figure 5.68, nous montrons pour les trois angles de détection les spectres  $g(s)$  des noyaux 1 (donc 0 – 0,5 heure à 23° C ; les courbes rouges), 2 (*i.e.* 0,5 – 1 à 23° C ; les courbes bleues) et 3

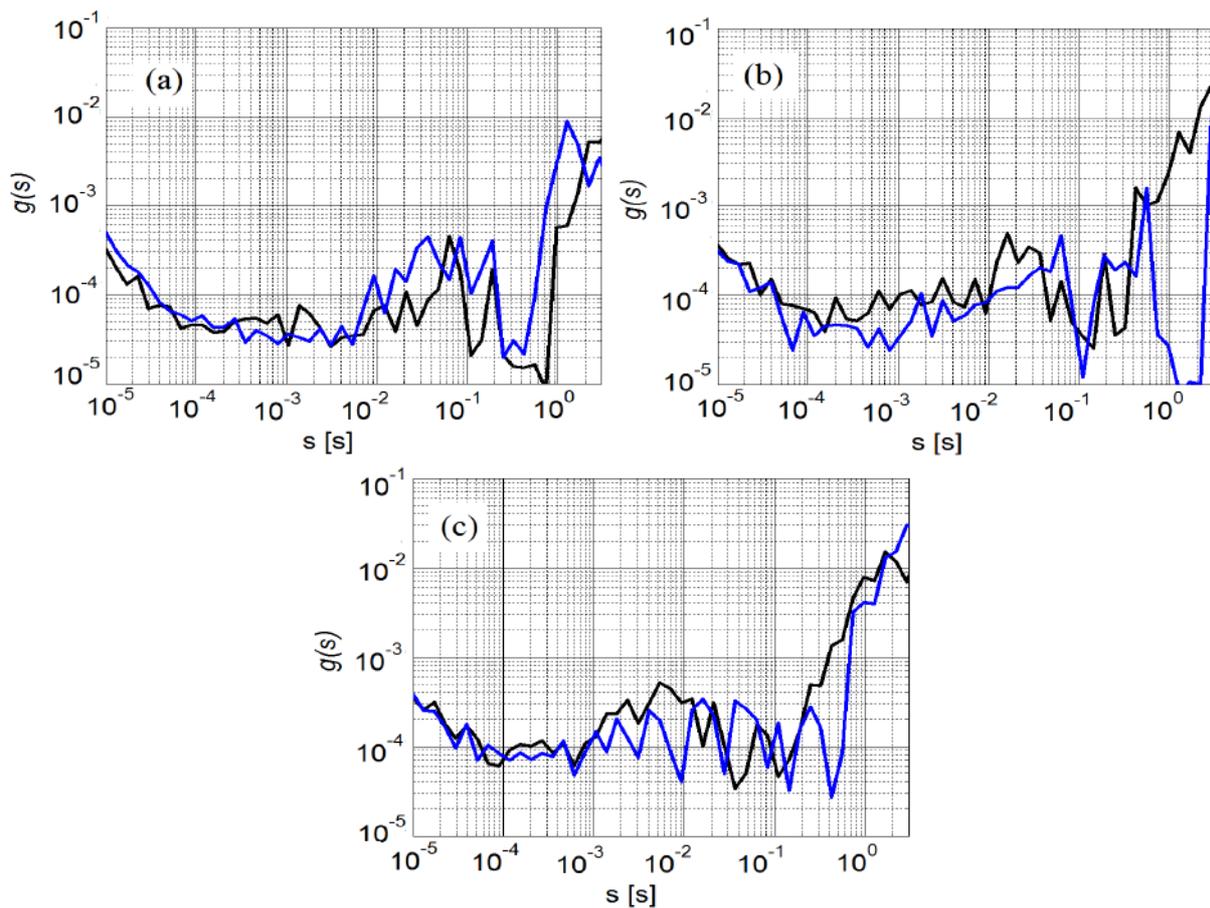
(soit 1 – 1.5 heures à 23° C ; les courbes noires). Il est à noter que cette figure montre les spectres pour les noyaux des cellules SHEP. Sur cette figure, nous pouvons observer :

- À 16°, on observe une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, typiquement dans la gamme  $10^{-5} - 10^{-3}$  s. Puis une bosse centrale entre  $10^{-3}$  s et quelques  $10^{-1}$  s, sur laquelle se superposent plusieurs pics. Cette bosse est suivie par une remontée de  $g(s)$  vers 1 s. On remarque que l'amplitude de la bosse, ainsi que celle des pics qui s'y superposent, diminuent continument entre le noyau 1 et le noyau 3 (avec diminution plus forte entre le noyau 2 et le 3).
- À 27°, on observe toujours une décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, toujours dans la gamme  $10^{-5} - 10^{-3}$  s. Ensuite, une bosse centrale entre  $10^{-3}$  s et  $10^{-1}$  s, sur laquelle se superposent plusieurs pics, puis une remontée de  $g(s)$  un peu avant 1 s. Là encore, on observe que l'amplitude  $g(s)$  de la zone du spectre entre  $10^{-3}$  à 1 s diminue fortement entre le noyau 1 et le noyau 3 (en particulier entre le 2 et le 3).
- À 38°, on observe encore la décroissance lente de  $g(s)$  aux temps courts, mais sur une gamme plus réduite :  $10^{-5}$  s à  $3 \cdot 10^{-4}$  s. Ensuite, une bosse très peu marquée qui s'étend jusqu'à  $10^{-1}$  s et, sur laquelle, se superposent plusieurs petits pics. Finalement, on voit une remontée de  $g(s)$  à partir de 0,1 s. Là encore, on peut observer que l'amplitude  $g(s)$  dans la zone du spectre comprise entre  $10^{-3}$  et 0,1 s diminue entre le noyau 1 et le noyau 3 (diminution toujours plus marquée entre le noyau 2 et le noyau 3).



**Figure 5.68.** Pour les trois angles de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), courbes rouges : spectres  $g(s)$  du noyau 1 (0 – 0,5 heure à 23° C) ; courbes bleues : noyau 2 (0,5 – 1 heure à 23° C) ; courbes noires : noyau 3 (1 – 1,5 heures à 23° C).

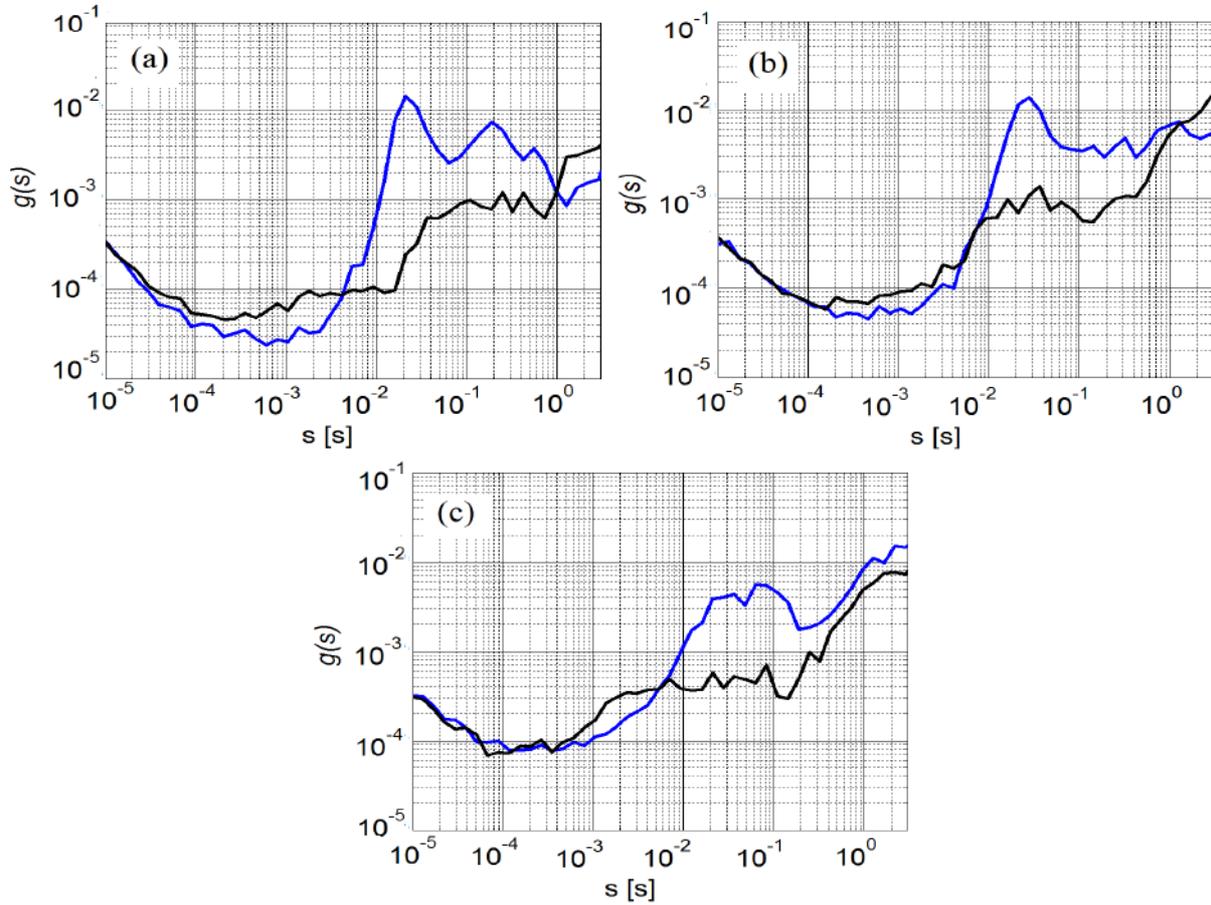
Cette diminution de l'amplitude de  $g(s)$  semble s'arrêter à partir du noyau 3. Figure 5.69, nous présentons pour chacun des angles de détection, les spectres  $g(s)$  obtenus pour le troisième et le sixième noyau mesurés à 23° C (courbes noires : noyau 3 –entre 1 heure et 1,5 heures à 23° C, et courbes bleues : noyau 6 –entre 2,5 heures et 3 heures à 23° C). Là encore nous montrons les résultats obtenus sur les noyaux des cellules SHEP. Sur cette figure, on remarque que les spectres de ces deux noyaux se ressemblent fortement. La dynamique interne « rapide » semble s'être arrêtée d'évoluer avec le temps et avoir atteint un « état stationnaire ».



**Figure 5.69.** Pour chaque angle de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), courbes noires : spectres  $g(s)$  du noyau 3 (i.e. : 1 – 1,5 heures à 23° C) ; courbes bleues : spectres  $g(s)$  du noyau 6 (i.e. : 2,5 – 3 heures à 23° C).

Figure 5.70, nous comparons, pour les trois angles de détection, les spectres moyens des temps « rapides » obtenus pour les noyaux de cellules SHEP en fin de phase G1 à 37° C (cf. § 5.2.1.2.) avec les spectres moyens des temps « rapides » obtenus sur les six noyaux de cellules SHEP dans le milieu de culture à 23° C (i.e. les noyaux du tableau 5.3). Les courbes bleues représentent les spectres moyens des temps « rapides » pour les noyaux de cellules SHEP en fin de phase G1 dans des conditions « normales », les courbes noires sont les moyennes faites sur les six spectres des temps « rapides » mesurés sur les noyaux 1 à 6 du tableau 5.3. On remarque que dans la gamme  $10^{-5}$  s –  $10^{-4}$  s, les deux séries de spectres se superposent exactement. Mais, dans la gamme  $10^{-4}$  s à 1 s, ces deux séries de spectres sont très différentes. D'abord, dans la gamme de temps qui s'étend de  $10^{-4}$  s à quelques  $10^{-3}$  s, l'amplitude des spectres faits à 23° C est légèrement supérieure à celle des spectres réalisés à 37° C. Par contre pour les temps entre quelques  $10^{-3}$  s et 1 s, l'amplitude des

spectres faits à 23° C est très nettement inférieure (au moins un facteur 10) à celle des spectres mesurés à 37° C. On en conclut que la température affecte fortement la dynamique interne « rapide » des noyaux des cellules SHEP.

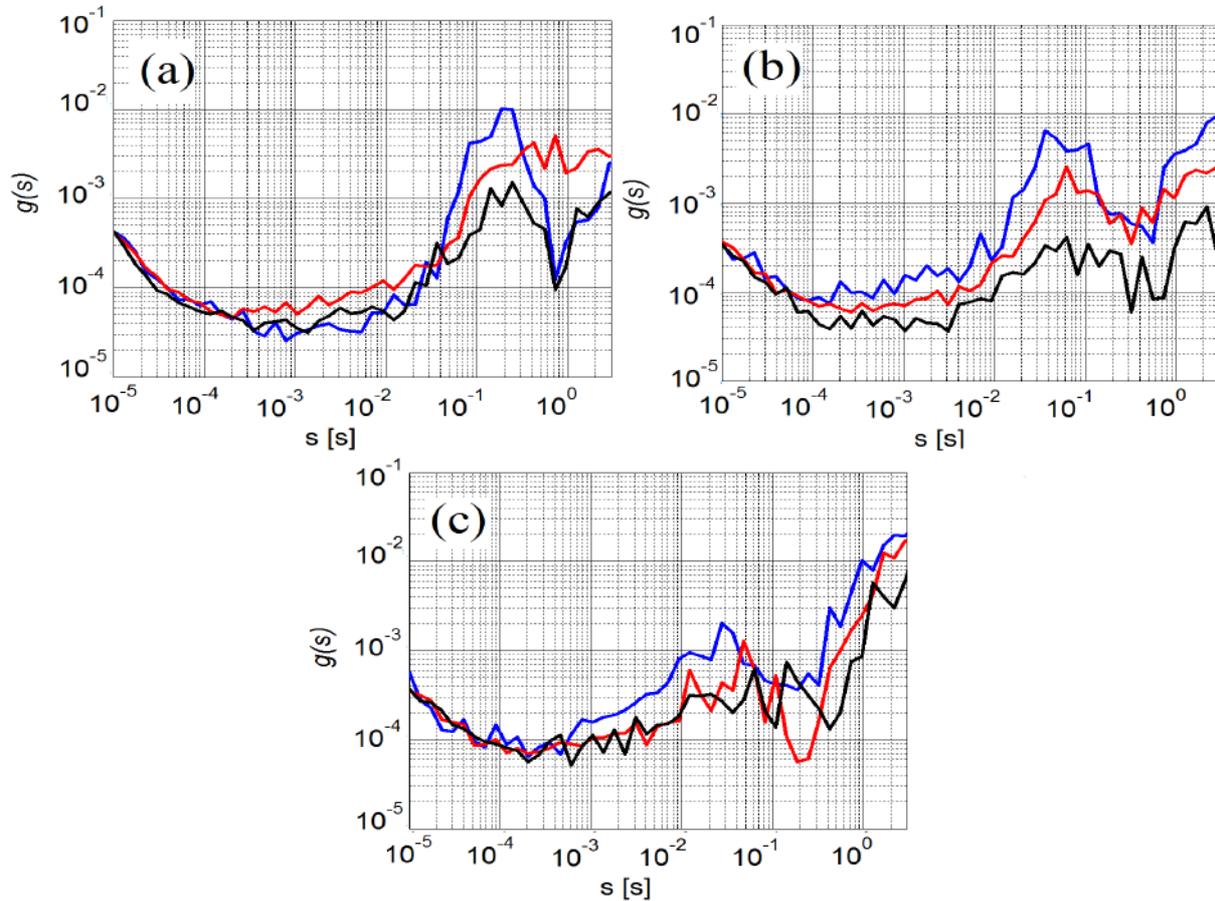


**Figure 5.70.** Pour les trois angles de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), courbes bleues : spectres moyens pour les noyaux des cellules SHEP en fin de G1 à 37°C (idem Fig. 5.24) ; courbes noires : spectres moyennés sur les noyaux 1 à 6 du tableau 5.3 (des cellules SHEP en fin de G1 à 23° C).

Pour confirmer l'effet de la température sur la dynamique interne « rapide » du noyau d'une cellule, Figure 5.71, nous comparons, pour les trois angles de détection, les spectres moyens des temps « rapides » obtenus pour les noyaux de cellules HeLa en fin de phase G1 à 37° C (cf. § 5.3.1.1.) avec les spectres moyens des temps « rapides » obtenus sur les 3 premiers noyaux de cellules HeLa dans le milieu de culture à 23° C (i.e. les noyaux 1 à 3 du tableau 5.3) et les spectres moyens des temps « rapides » obtenus sur les 3 « derniers » noyaux de cellules HeLa dans le milieu de culture à 23° C (i.e. les noyaux 4 à 6 du tableau 5.3). Les courbes bleues représentent les spectres moyens des temps « rapides » pour les noyaux de cellules HeLa en fin de phase G1 dans des conditions « normales », les courbes rouges sont les moyennes faites sur les 3 spectres des temps « rapides » mesurés sur les noyaux 1 à 3 du tableau 5.3, les courbes noires sont les moyennes calculées sur les 3 spectres des temps « rapides » réalisés sur les noyaux 4 à 6 du tableau 5.3.

Exactement comme pour les cellules SHEP, on observe que la température a un effet important sur la dynamique interne « rapide » du noyau des cellules HeLa. En particulier, on remarque que l'amplitude de  $g(s)$  s'effondre dans la gamme de temps, qui (suivant l'angle de

détection) va d'environ  $4-5 \cdot 10^{-4}$  s à  $4-5 \cdot 10^{-1}$  s ; on voit une diminution des maxima de  $g(s)$  d'au moins un facteur 10 quand la température est baissée à  $23^\circ$  C. Comme pour les cellules SHEP, la transformation de la dynamique « rapide » après la chute brutale de la température de  $37^\circ$  C à  $23^\circ$  C se fait progressivement sur environ 1,5 heures.



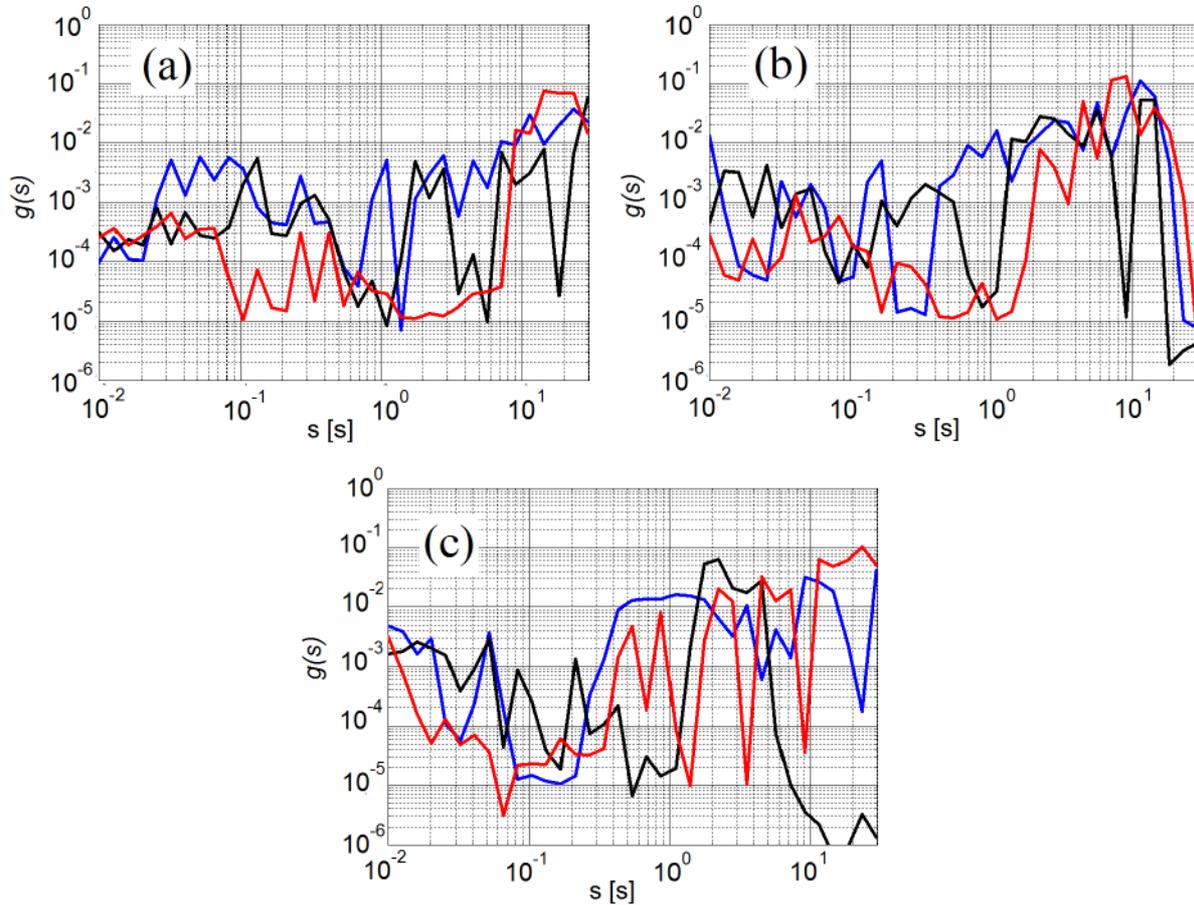
**Figure 5.71.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), courbes bleues : spectres moyens pour les noyaux des cellules HeLa en fin de G1 à  $37^\circ$  C (idem Fig. 5.46) ; courbes rouges : spectres moyennés sur les noyaux 1 à 3 du tableau 5.3 (des cellules HeLa en fin de G1 à  $23^\circ$  C) ; courbes noires : spectres moyennés sur les noyaux 4 à 6 du tableau 5.3 (des cellules HeLa en fin de G1 à  $23^\circ$  C).

#### 5.4.3.3. Résultats : dynamique « lente » de noyaux de cellules en phase G1 à $23^\circ$ C.

Figure 5.72, nous montrons, pour les 3 angles de détection, les spectres moyens,  $g(s)$ , pour les temps « lents » obtenus pour les noyaux 1, 3 et 6 du tableau 5.3 (*i.e.* cellules en fin de phase G1 mises à  $23^\circ$  C ; ici des cellules SHEP).

Comme toujours pour cette gamme de temps, nous avons du mal à voir sortir des comportements caractéristiques bien nets qui nous permettraient de distinguer clairement ces spectres des autres spectres obtenus dans des conditions différentes. Nous ne voyons aucune évolution de ces spectres avec le temps comme nous pouvons le voir pour la dynamique « rapide ». Néanmoins, là encore, cette dynamique « lente » semble être due à des processus diffusifs (ou légèrement sous-diffusifs). Un peu comme dans le cas des cellules sous HU (§ 5.4.2), il semble que

l'amplitude de  $g(s)$  dans la partie la plus « rapide » de ces spectres, typiquement jusqu'à quelques secondes soit moins importante dans ces conditions (cellules à 23° C) que dans des conditions de culture normales (cellules à 37° C), ce qui suggère un effet de la température aussi sur cette partie de la dynamique interne du noyau.



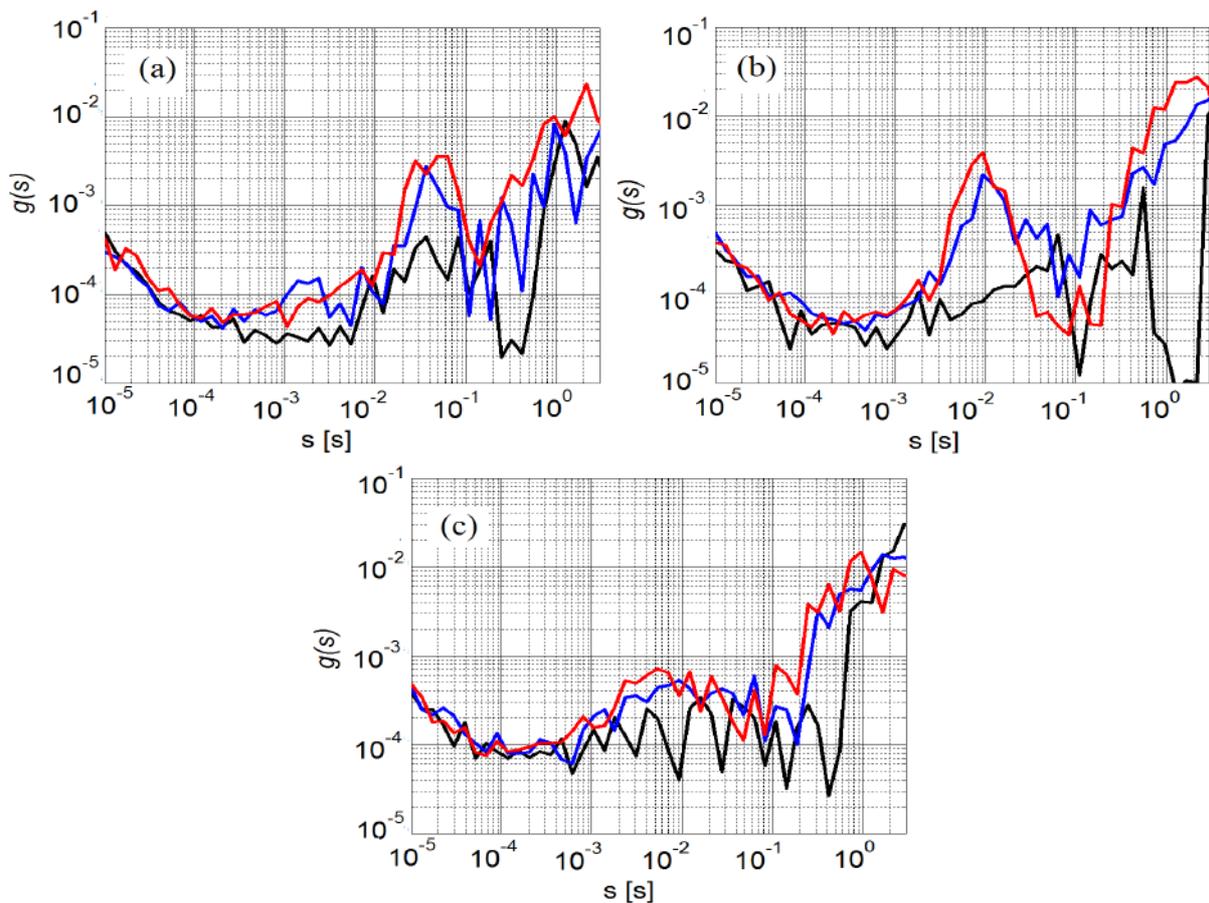
**Figure 5.72.** Pour les trois angles de détection (a : 16° ; b : 27° ; c : 38°), courbes noires : spectres  $g(s)$  du noyau 1 (0–0,5 heure à 23° C) ; courbes bleues : noyau 3 (1–1,5 heures à 23° C) ; courbes rouges : noyau 6 (2,5–3 heure à 23° C).

#### 5.4.3.4. Remise des cultures cellulaires à 37° C.

Comme nous l'avons indiqué au début du § 5.4, après avoir fait des mesures à 23° C pendant 3 heures, nous avons remis les cultures cellulaires (SHEP comme HeLa) sur lesquelles on faisait ces expériences à 37° C. Nos tests préalables avaient montré que le milieu de culture dans les chambres de culture remontée à 37° C en un peu moins de 20 minutes après la remise en route du chauffage. Nous avons attendu 30 minutes après avoir rallumé le chauffage pour recommencer des mesures. Pour les deux cultures cellulaires étudiées (SHEP et HeLa) nous avons fait des mesures de 30 minutes chaque fois sur deux noyaux (que l'on appelle noyau 7 et noyau 8) ; donc, approximativement entre 0 et 30 minutes après que les cellules soient de nouveau à 37° C et, entre 30 minutes et 1 heure après.

Figure 5.73, nous montrons les spectres pour les temps rapides pour les noyaux 6 (depuis 2,5 heures à 23° C ; courbes noires), 7 (juste de retour à 37° C ; courbes bleues) et 8 (à 37° C depuis 30 minutes ; courbes rouges). (Notons qu'ici nous ne montrons que les spectres pour les cellules SHEP,

nous avons exactement le même comportement pour les cellules HeLa.) Sur cette figure, on remarque immédiatement une augmentation de l'amplitude des spectres  $g(s)$  après le retour des cellules à  $37^\circ\text{C}$ . Pour chaque angle de détection, on observe que les amplitudes de  $g(s)$  pour les noyaux 7 et 8 (i.e. à  $37^\circ$ ) sont plus élevées que celles pour le noyau 6 et que les courbes sont plus « lisses ». En particulier, on voit réapparaître la bosse centrale (très nettement à  $16^\circ$  et  $27^\circ$ ). On remarque aussi une évolution entre le spectre du noyau 7 et celui du noyau 8, ce dernier, sans être encore exactement identique, est plus proche du spectre « rapide » attendu pour le noyau d'une cellule SHEP en fin de phase G1. Comme pour le refroidissement, après la remise à  $37^\circ\text{C}$ , il faut probablement un certain temps pour que la dynamique du noyau retrouve un comportement « normal ».



**Figure 5.73.** Pour les trois angles de détection (a :  $16^\circ$  ; b :  $27^\circ$  ; c :  $38^\circ$ ), courbes noires : spectres  $g(s)$  du noyau 6 (2,5 – 3 heures à  $23^\circ\text{C}$ ) ; courbes bleues : noyau 7 (0 – 0,5 heure après retour à  $37^\circ\text{C}$ ) ; courbes rouges : noyau 8 (0,5 – 1 heure après retour à  $37^\circ\text{C}$ ).

## 5.5. DISCUSSION.

Dans les paragraphes précédents de ce chapitre, nous avons présenté la dynamique interne du noyau de cellules vivantes sur une gamme de temps allant de  $10^{-5}\text{ s}$  à  $30\text{ s}$  (donc sur quasiment 7 décades en temps), ceci pour différents états de la cellule : les différentes phases du cycle cellulaire et différentes conditions de culture. Dans tous les cas (à part pour les cellules fixées, mais là, les

cellules sont mortes), à l'intérieur de la gamme de temps sondée, nous pouvons toujours identifier 3 zones, ou intervalles de temps différents, avec des caractéristiques bien distinctes.

- La première zone correspond aux temps très courts, c'est à dire à l'intervalle de temps qui s'étend sur un peu plus d'une décade, de  $10^{-5}$  s à quelques  $10^{-4}$  s (typiquement entre  $2-3 \cdot 10^{-4}$  s et  $7-8 \cdot 10^{-4}$  s, suivant l'angle de détection). Sur cette gamme de temps, on observe toujours une décroissance assez douce de  $g(s)$ . Cette partie de la dynamique des noyaux semble assez peu affectée par l'état de la cellule ; les phases du cycle cellulaire ou les conditions de culture. Généralement, dans cet intervalle, l'amplitude de  $g(s)$  est plus grande à  $38^\circ$  qu'à  $27^\circ$  ou  $16^\circ$ .
- La seconde zone est un intervalle qui couvre quasiment 3 décades en temps, de quelques  $10^{-4}$  s (donc juste après la fin de la première zone) à environ  $10^{-1}$  s. Dans cet intervalle de temps, on observe toujours une bosse assez large (ce que l'on a souvent appelé la bosse centrale), dont l'allure, la hauteur, la largeur, la position du maximum, ainsi que l'asymétrie, varie fortement en fonction de la phase du cycle cellulaire ou des conditions de culture ; c'est la partie de la dynamique du noyau qui est le plus sensible à l'état de la cellule.
- Une dernière zone couvre tous les temps longs, environ 2 décades en temps, typiquement de quelques  $10^{-1}$  s à 30 s. Dans cette gamme, on voit sortir un grand nombre de temps caractéristiques différents (4 à 5 temps par spectre et, environ 10-12 sur l'ensemble des spectres mesurés sur des cellules dans le même état) et, on observe une grande variabilité des spectres d'une mesure à l'autre. Pour cet intervalle, il est difficile de voir un changement de comportement en fonction de l'état de la cellule. Par contre, il nous semble que l'ensemble de la dynamique du noyau sur cette gamme de temps est due à des processus diffusifs ou légèrement sous-diffusifs, avec une distribution de coefficients de diffusion ( $D = 1/\tau q^2$ ) qui va de  $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à  $10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (i.e. entre  $10^{-3}$  et  $0,1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

En dehors des premiers travaux menés par Michaël Suissa lors de sa thèse, cette étude est certainement l'une des rares études menée sur la dynamique interne globale du noyau d'une cellule vivante et, probablement la seule (avec celle de Michaël Suissa) par diffusion dynamique de la lumière. Il est donc difficile, à partir de ce travail, d'aller très loin dans la discussion et d'arriver à une interprétation satisfaisante des résultats obtenus, en particulier en termes de lien avec des processus biologiques. Néanmoins, un certain nombre de choses peuvent être dites et nous pouvons mettre en avant un certain nombre d'hypothèses.

- Pour les temps très courts, on pourrait imaginer que cette dynamique très rapide est due à la diffusion de petites protéines à l'intérieur du noyau. En effet, nous savons que les petites protéines, qui ont des diamètres inférieurs à 50 nm (typiquement dans la gamme de tailles 1 – 50 nm), diffusent rapidement dans le noyau avec des coefficients de diffusion qui sont de l'ordre de  $10^{-12} - 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (i.e.  $1 - 100 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) [7-11]. (i.e. comparables à ceux de colloïdes dans de l'eau.) Avec les vecteurs d'onde que nous sondons, ceci donne des temps caractéristiques qui sont dans l'intervalle quelques  $10^{-5} - 10^{-3}$  s. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à démontrer que ces temps étaient diffusifs. Mais, plusieurs caractéristiques de la dynamique dans cet intervalle supportent cette hypothèse de la diffusion brownienne de petits objets. En particulier, c'est la seule partie de la dynamique du noyau qui persiste quand on a fixé les cellules. Dans ce cas là, la structure du noyau est celle d'un gel chimique fortement réticulé et, l'activité biologique est complètement inexistante. En conséquence, la seule dynamique que l'on peut observer par diffusion dynamique de la lumière dans ces conditions, a pour origine la diffusion brownienne de particules dont les tailles sont plus petites que la

« mesh size » du gel formé. Il est à noter que cette dynamique très rapide n'a pas été examinée par Michaël Suissa lors de sa thèse, car elle est trop rapide.

- La dynamique dans le second intervalle est, elle, très fortement affectée par les différents changements d'état des cellules. En particulier, elle évolue au cours du cycle cellulaire, avec des différences notables entre les différentes phases du cycle, mais aussi en montrant l'existence de sous-phases, avec des dynamiques distinctes, dans la phase G1. Elle est aussi sensible aux conditions de culture, puisque l'on peut observer des modifications importantes de cette dynamique quand les cellules sont mises en présence d'hydroxyurée. Mais surtout, nous avons pu observer que cette dynamique était profondément modifiée quand on diminuait la température des cellules de 37° C à 23° C. On sait que quand on baisse la température des cellules humaines bien en dessous de 37 C, les cellules rentrent en quiescence ; on change dramatiquement l'activité enzymatique. Ces réactions enzymatiques sont des réactions activées dont les probabilités de réaction suivent des lois d'Arrhenius. À 23° C au lieu de 37° C, la hauteur de barrière énergétique à franchir pour que les réactions aient lieu est plus élevée et donc, les probabilités de réaction sont plus petites. De plus, à 23° C, les mitochondries produisent beaucoup moins d'ATP, alors que cette molécule est nécessaire pour ces réactions. En conséquence, en baissant la température à 23° C, on commence par ralentir l'activité enzymatique du noyau puisque les probabilités de réaction sont plus faibles et, avec le temps on arrive à une déplétion en ATP dans le noyau, puisque celui-ci est toujours consommé par les réactions qui continuent à avoir lieu tout en étant moins remplacé, ce qui va encore ralentir un peu plus l'activité enzymatique à l'intérieur du noyau. C'est exactement le scénario que l'on observe quand on a baisse la température des cellules à 23° C ; la dynamique dans cette gamme de temps s'atténue doucement à partir du moment où la température est arrivée à 23° C, de même, elle augmente lentement à partir du moment où la température est revenue à 37° C.

En conséquence, la dynamique dans cet intervalle est très vraisemblablement liée à l'activité enzymatique du noyau. Par contre, la dynamique que l'on observe n'est certainement pas celle de ces réactions chimiques (il est peu probable que celles-ci modifient suffisamment l'indice de réfraction du noyau localement pour diffuser la lumière), mais, plus probablement, les effets de ces réactions sur la dynamique de la chromatine ; la chromatine est le composant principal du noyau, donc du volume diffusant. Ceci est cohérent avec ce que l'on observe et aussi avec les observations faites par Michaël Suissa lors de sa thèse. On sait [12] que la compaction de la chromatine évolue au cours du cycle cellulaire. Elle est fortement condensée au début de G1, ensuite elle se décompacte tout au long du cycle, pour se recondenser en fin de G2, juste avant la mitose. On peut donc imaginer que la dynamique du remodelage de la fibre de chromatine, qui a lieu continuellement dans le noyau pendant l'interphase, va évoluer tout au long du cycle cellulaire. De plus, le remodelage de la fibre de chromatine se fait via un ensemble de processus biologiques collectifs hiérarchisés [13–14]. En conséquence, la dynamique du remodelage va se faire par une succession ordonnée de processus différents, chaque processus ayant son propre temps caractéristique. C'est typiquement ce que l'on observe quand on descend au niveau des tranches de 1 minute où, au lieu de voir une bosse large, on observe une succession des temps distincts (*cf.* § 5.1.). On sait aussi que la structure de la chromatine présente des hétérogénéités spatio-temporelles à l'intérieur du noyau qui sont liées à l'activité dans les différents territoires [15]. Des expériences de molécules uniques [16–18] ont montré que les temps caractéristiques de remodelage de la chromatine par certaines enzymes (Topoisomérase, Polymérase) étaient de l'ordre de quelques millisecondes, ce qui correspond aux temps que l'on observe dans nos expériences.

- Nos résultats montrent que la dynamique dans cette troisième gamme de temps est très probablement d'origine diffusive (ou plus exactement sous-diffusive), avec une distribution de coefficients de diffusion assez large qui s'étend de  $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à  $10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (i.e. entre  $10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $0,1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ces temps caractéristiques sont très probablement dus à la diffusion brownienne de gros objets dans le noyau. Par exemple, il a été observé la diffusion de sous-unités des ribosomes, des nucléoles, vers l'enveloppe nucléaire [19]. Cette diffusion est assez proche d'une diffusion brownienne et l'on peut estimer un coefficient de diffusion pour ces objets qui est de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $0,3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Sur notre montage, ceci donne des temps caractéristiques qui sont de l'ordre de  $0,1 \text{ s} - 0,7 \text{ s}$ . On sait aussi [20–21] que pour la diffusion brownienne de complexes mRNP–protéines (i.e. messenger RiboNucleoProtein) dans le noyau pendant l'interphase les coefficients de diffusion sont compris entre  $9 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $10^{-14} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (i.e.  $0,09 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $0,01 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Dans notre cas, ceci donne des temps caractéristiques qui sont typiquement compris entre  $0,5 \text{ s} - 12 \text{ s}$ . Levi *et al.* [22] ont mis en évidence la diffusion brownienne de la fibre chromatinienne avec deux processus diffusifs différents. Le plus rapide de ces deux processus a un coefficient de diffusion de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$  ( $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Ce qui nous donne des temps caractéristiques de l'ordre de quelques dizaines de secondes. Le coefficient de diffusion le plus lent est de l'ordre de  $2,5 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$  ( $2,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), ce qui est comparable au coefficient de diffusion qui avait été donné par Davis et Bardeen [23–25] (ces temps là sont trop lents pour que l'on puisse les observer). Quoi qu'il en soit, la diffusion de ces objets, qui sont relativement gros à l'échelle du noyau (typiquement un rayon de quelques dizaines à quelques centaines de nm), est très lente ; les coefficients de diffusion mesurés sont environ 3 à 5 ordres de grandeur en dessous de ceux observés pour les petites protéines.

Ces coefficients de diffusion semblent susceptibles de changer en fonction du cycle cellulaire. Très probablement à cause d'une augmentation de la viscosité du noyau due à l'augmentation de la concentration en ADN (en considérant que la taille des objets diffusants ne change pas en fonction de la phase du cycle cellulaire). Mais, nous n'avons pas observé ces changements. Par contre, il semble que l'on ait une diminution de la dynamique autour de la seconde quand on baisse la température à  $23^\circ \text{ C}$ , ce que l'on peut traduire par un ralentissement. Ce résultat peut signifier que les coefficients de diffusion des objets qui sont à l'origine de cette dynamique sont légèrement plus petits à  $23^\circ \text{ C}$ , ce qui suggère une augmentation de la viscosité effective du noyau. Ceci est cohérent avec une baisse de la température. Pour les complexes mRNP–protéines (qui pour nos vecteurs d'onde doivent donner des temps de relaxation autour de la seconde), la diffusion est ralentie par une déplétion de l'ATP [20–21], mais, les auteurs attribuent plutôt cette diminution aux obstacles alors formés par une fibre chromatinienne beaucoup plus rigide. Il n'est pas impossible qu'à  $23^\circ \text{ C}$ , la fibre de chromatine soit plus rigide qu'à  $37^\circ \text{ C}$ . En présence de HU dans le milieu de culture, il semble aussi qu'il y ait un ralentissement de la dynamique autour de la seconde. Ce résultat peut signifier que les coefficients de diffusion des objets qui sont à l'origine de cette dynamique sont plus petit en présence de HU dans le milieu de culture. Ceci pourrait indiquer que la présence de HU dans le milieu de culture induit une augmentation de la viscosité effective du noyau par rapport à sa viscosité dans des conditions normales de culture. Mais, peut-être que la présence de HU dans le milieu de culture induit aussi une augmentation de la rigidité de la fibre de chromatine.

Dans ces conditions, il est plausible que la variabilité des spectres que l'on observe ait pour origine des variations temporelles de la distribution en taille des objets diffusants à l'intérieur du volume diffusant ; le nombre d'objets de taille  $R$  dans le volume diffusant varie au cours du temps. Cependant, cette dispersion des mesures pourrait aussi venir de variations

temporelles de la viscosité locale induisant des variations du coefficient de diffusion (par exemple, on peut imaginer le rapprochement de deux territoires chromosomiques empêchant la diffusion de ces complexes dans une direction donnée). Cette dernière hypothèse nous semble néanmoins beaucoup moins crédible que la précédente. Même si les coefficients de diffusion mesurés sont petits, pour des complexes protéiques qui font la centaine de nanomètres, à l'aide de la relation de Stokes-Einstein, on peut estimer que la viscosité effective du milieu nucléaire est de quelques dizaines, voire la centaine de fois celle de l'eau. En donnant la concentration en ADN dans le noyau, ça semble faible. Cette remarque suggère que la diffusion de ces complexes protéiques dans le noyau serait de la diffusion à travers un volume encombré d'obstacles fixes à contourner (une sorte de labyrinthe à 3 dimensions), plutôt que de la diffusion à travers un enchevêtrement de type solution de polymères concentrées. Ce type de structure du milieu nucléaire pourrait expliquer pourquoi les processus de diffusion à travers le noyau apparaissent souvent comme sous-diffusifs [26], comme nous pouvons le voir.

En conclusion, nos expériences ont montré que la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante pouvait se décomposer en trois dynamiques différentes. Aux temps très courts et aux temps longs, deux dynamiques qui correspondent très certainement à la diffusion brownienne d'objets (petites protéines, complexes protéiques, corps nucléaires, fibre de chromatine) dans le milieu nucléaire. Dans la gamme de temps qui s'étend environ de  $10^{-4}$  s à 0,1 s on trouve une dynamique qui dépend de l'activité enzymatique du noyau et qui semble due aux remodelages de la fibre de la chromatine par cette activité.

## BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 5

1. Suissa Michaël, Thèse de doctorat de l'École Normale Supérieure de Lyon : Dynamique Interne du noyau d'une cellule vivante : Etude par diffusion dynamique de la lumière. N° 06ENSL0363 (2006)
2. Suissa M., Place C., Goillot É., Berge B. et Freyssingéas É., Dynamic Light Scattering as an Investigating Tool to Study the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus. *Europhysics Letters*, **78** : 38005 (2007).
3. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingéas É., Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus Investigated by Dynamic Light Scattering. *European Physical Journal E*, **26** : 435–448 (2008).
4. Suissa M., Place C., Goillot É. et Freyssingéas É., Evolution of the Global Internal Dynamics of a Living Cell Nucleus during Interphase. *Biophysical Journal*, **97** : 453–461 (2009).
5. Dignam J.D., Lebovitz R.M., Roeder R.G., Accurate transcription initiation by RNA polymerase-II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research*, **11**, 1475–1489 (1983).
6. De Robertis E. D. P., et De Robertis E. M. F. Jr, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Éditeur : P. U. Laval, ISBN : 9782763769547 ; 7<sup>e</sup> édition (1<sup>ère</sup> édition 1983).
7. Houtsmuller A. B., Rademakers S., Nigg A. L., Hoogstraten D., Hoeijmakers J. H. J. et Vermeulen W., Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, **284**, 958 (1999).
8. Phair R. D. et Misteli T., High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404**, 604–609 (2000).
9. Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M. and Brown D. T., Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408**, 877 (2000).
10. Hager G. L., Elbi C. and Becker M., Protein dynamics in the nuclear compartment. *Current Opinion in Genetic Development*, **12**, 137 (2002).
11. Beaudouin J., Moro-Bermudez F., Klee T., Daigle N. et Ellenberg N., Dissecting the Contribution of Diffusion and Interactions to the Mobility of Nuclear Proteins. *Biophysical Journal*, **90**, 1878–1894 (2006).
12. Banerjee B., Bhattacharya D. et Shivashankar G.V., Chromatin Structure Exhibits Spatio-Temporal Heterogeneity within the Cell Nucleus., *Biophysical Journal*, **91**, 2297–2303 (2006).
13. Belmont A.S. et Bruce K., Visualization of G1 chromosome: a Folded, Twisted, Supercoiled Chromonema Model of Interphase Chromatid Structure. *Journal of Cell Biology*, **127**, 287–302 (1994).
14. Kireeva N., Lakonishok M., Kireev I., Tatsuya H. et Belmont A.S., Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *Journal of Cell Biology*, **166**, 775–785 (2004).

15. Kleckner N., Zickler D., Jones G.H., Dekker J., Padmore R., Henle J. et Hutchinson J., A mechanical basis for chromosome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **101**, 12592–12597 (2004).
16. Charvin G., Bensimon D., Croquette V., Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **100**, 9820–9825 (2003).
17. Shaevitz J. W., Abbondanzieri E. A., Landick R., Block S. M., Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution, *Nature*, **426**, 684–687 (2003).
18. Neuman K. C., Charvin G., Bensimon D., Croquette V., Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase IV, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **106**, 6986–6991 (2009).
19. Politz J. C. R., Tuft R. A., Pederson T., Diffusion-based transport of nascent ribosomes in the nucleus. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 4805–4812 (2003).
20. Shav-Tal Y., Darzacq X., Shenoy S. M., Fusco D., Janicki S. M., Spector D. L., Singer S. H., Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, **304**, 1797–1800 (2004).
21. Shav-Tal, Y., Darzacq X., Singer R. H., Gene expression within a dynamic nuclear landscape. *EMBO Journal*, **25**, 3469–3479 (2006).
22. Levi V., Ruan Q., Plutz M., Belmont A. S. et Gratton E., Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope. *Biophysical Journal*, **89**, 4275–4285 (2005).
23. Davis S. K. et Bardeen C. J., Cross-linking of histone proteins to DNA by UV illumination of chromatin stained with Hoechst 33342. *Photochemistry and Photobiology*, **77**, 675–679 (2003).
24. Davis S. K. et Bardeen C. J., The connection between chromatin motion on the 100 nm length scale and core histone dynamics in live XTC-2 cells and isolated nuclei. *Biophysical Journal*, **86**, 555–564 (2004).
25. Davis S. K. et Bardeen C. J., Time-resolved Microscopy of Chromatin In Vitro and In Vivo. *Photochemistry and Photobiology*, **81**, 548–555 (2005).
26. Banks D. S. et Fradin C., Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophysical Journal*, **89**, 2960–2971 (2005).



## CHAPITRE 6

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

#### 6.1. RAPPELS SUR LA MOTIVATION ET LE CONTEXTE DU PROJET.

La motivation de ce travail de thèse tenait au fait que la compréhension de la dynamique interne du noyau d'une cellule eucaryote vivante semble nécessaire à la compréhension de son fonctionnement. La dynamique interne du noyau d'une cellule eucaryote vivante est très complexe, impliquant une multitude de phénomènes différents qui doivent remplir des fonctions bien précises et qui se produisent sur des échelles de temps et d'espace très différentes. Si grâce aux nombreux travaux qui ont été menés pour étudier cette dynamique en utilisant des techniques sophistiquées de microscopie de fluorescence (la microscopie de fluorescence en temps réel, la FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching, ou la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence), de nombreux résultats très précis et très intéressants ont été découverts, les limites intrinsèques de ces mesures (marquage fluorescent, résolutions spatiale et temporelle) ne permettent pas d'analyser l'ensemble de la dynamique interne du noyau. En particulier, ces résultats ne donnent aucune information sur la dynamique interne du noyau dans sa globalité. Ainsi, malgré les résultats intéressants produits par toutes ces études en fluorescence, la dynamique interne globale du noyau d'une cellule eucaryote vivante, qui reflète les corrélations à la fois en temps et en espace, est encore très mal connue, alors que sa connaissance s'avérerait probablement d'une grande utilité pour améliorer la compréhension que nous avons actuellement du noyau et de son activité. En conséquence, pour pouvoir obtenir, en même temps, l'ensemble de la dynamique interne du noyau, nous avons pensé qu'il fallait changer de « paradigme » et développer des techniques expérimentales qui ne soient pas basées sur la fluorescence (l'idée étant « d'écouter le bruit » de la cellule).

Le projet que nous avons conduit et que nous avons décrit dans ce manuscrit de thèse s'est inscrit dans cette problématique. Il avait eu pour but d'étudier, d'un point de vue expérimental, l'évolution de la dynamique interne globale du noyau de différentes lignées cellulaires (essentiellement SHEP : lignée de neuroblastome humain et HeLa : lignée de cancer du col de l'utérus) au cours du cycle cellulaire et dans des conditions de culture anormales. Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière qui est une technique sensible aux fluctuations de l'indice de réfraction du milieu traversé par un faisceau lumineux, en montant un dispositif expérimental original. Pour avoir accès à la dynamique interne globale du noyau, sur des échelles de temps assez large, seule la diffusion dynamique de la lumière et la microscopie par contraste interférentiel semblent être les techniques appropriées ; la diffusion dynamique de la lumière nous semblait plus facile à monter. Notre étude faisait suite à la thèse de Michaël Suissa, qui est le premier à avoir mené des études de ce type, au Laboratoire de Physique de l'ENS de Lyon, sous la direction E. Freyssingeas.

Malgré tout, il faut noter que la diffusion dynamique de la lumière présente quelques inconvénients. Comme elle donne des informations « globales », cela pose des problèmes d'interprétation des résultats obtenus. En effet, contrairement aux techniques basées sur la

fluorescence qui suivent des processus bien identifiés (et souvent choisis), il n'est pas évident d'identifier les processus à l'origine des variations d'indice observées et donc de savoir de quels phénomènes on est en train de mesurer la dynamique. On ne peut donc pas dire que la diffusion dynamique de la lumière soit une technique supérieure aux techniques de fluorescence pour étudier la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante, c'est une technique complémentaire qui apporte des informations différentes de celles que l'on obtient par les autres méthodes.

Les résultats de Suissa ont montré que la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante est à la fois riche et complexe : hétérogène en temps et en espace, avec plusieurs échelles de temps allant de quelques millisecondes à quelques dizaines de secondes. Ces premiers résultats indiquaient que cette technique semblait tout à fait prometteuse pour ce genre d'études, à condition que ces travaux « pionniers » soient complétés et approfondis. En particulier en développant des outils d'analyse fiables du signal brut pour pouvoir sonder cette dynamique dans toute sa richesse, des temps courts aux temps très longs.

Donc, notre but en commençant cette thèse était d'aller plus loin que les premiers travaux de Michaël Suissa et, nous nous étions fixés quatre objectifs majeurs.

1. Dans un premier temps, celui de remonter un dispositif expérimental plus performant. Avec, en particulier, 4 angles de détection différents, nous permettant ainsi de faire une mesure simultanée de la dynamique interne du noyau à différents vecteurs d'onde, afin d'étudier la nature des différents temps observés, pour savoir s'ils sont diffusifs, balistiques ....
2. Dans un second temps, trouver une manière d'analyser le signal brut qui nous permette d'appréhender l'ensemble de la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante et d'extraire l'ensemble des temps caractéristiques contenus dans ce signal.
3. Une fois le « verrou technique » que constitue l'analyse des données débloqué, reprendre, tout d'abord, l'étude déjà effectuée par Michaël Suissa lors de sa thèse (*i.e.* suivre l'évolution de la dynamique au cours du cycle cellulaire dans les cellules SHEP) pour confirmer notre nouvelle approche et approfondir ces premiers travaux. Puis, ensuite étudier l'évolution de la dynamique au cours du cycle cellulaire pour d'autres types cellulaires.
4. La quatrième étape de notre projet était de trouver des liens entre le signal diffusé et des processus biologiques. Pour cela, en utilisant notre technique, nous souhaitions obtenir des mesures quantitatives sur la dynamique interne de noyaux de cellules vivantes dans des conditions de cultures différentes des conditions normales. En comparant la dynamique obtenue après de telles modifications à celle obtenue sur des noyaux dans des conditions de culture normale, nous devrions obtenir des informations sur les liens entre la dynamique interne du noyau et l'état du noyau. Parmi les modifications possibles, nous avons pensé utiliser l'effet de la température, la déplétion en ATP, le stress osmotique.

## 6.2. RESUME DES TRAVAUX.

- *1<sup>ère</sup> étape des travaux.* La première étape de notre travail a été de reconstruire un nouveau dispositif expérimental de diffusion dynamique de la lumière. Nous nous sommes inspirés du montage qui avait été construit par Michaël Suissa, mais, en y apportant trois modifications. Tout d'abord, une détection simultanée à quatre angles de détection (11°, 16°, 27° et 38°), au lieu de la mesure à un seul angle ; une mesure, en fonction du temps, du signal brut de l'intensité lumineuse diffusée, au lieu de l'acquisition de fonctions d'autocorrélation de l'intensité diffusée ; l'utilisation d'un objectif de microscope de grossissement 20× couplé à un oculaire « maison », au lieu d'un objectif 50×, pour pouvoir voir un plus grand champ, et donc, plus de cellules. Malheureusement, à

cause de la forte diffusion vers l'avant (probablement due à l'existence de structures de grande tailles dans le noyau), le détecteur placé à  $11^\circ$  était souvent saturé, ce qui nous a empêché d'analyser proprement le signal qu'il recevait et donc d'utiliser ces mesures. Par contre, sur les trois autres angles de détection, nous avons pu analyser le signal reçu et ainsi, sur chacun de ces angles, nous avons pu sonder la dynamique interne du noyau sur presque sept décades en temps.

Ensuite, une fois le dispositif monté, nous avons développé plusieurs protocoles biologiques afin de synchroniser et de garder en vie sur notre montage, le temps de l'expérience, les lignées cellulaires que nous avons étudiées (SHEP et HeLa).

Les descriptions détaillées du montage expérimental et des protocoles font l'objet du chapitre 3 de ce manuscrit de thèse.

- *2<sup>ème</sup> étape des travaux.* La seconde étape de cette thèse a été de mettre au point une technique fiable, et pas trop lourde, de traitement des signaux mesurés. Pour cette partie nous avons bénéficié de l'aide précieuse de Pierre Borgnat (chercheur au Laboratoire de Physique, dans le groupe SInaux, SYstèmes et PHysique -SISYPHE), sans qui peu de progrès dans ce domaine aurait été possibles. L'analyse des signaux mesurés a été un des gros problèmes de cette thèse. Trouver un moyen fiable d'analyser les variations temporelles de l'intensité diffusée par le noyau a constitué une grosse partie de ce travail de thèse (pour ne pas dire la plus grosse partie) et surtout, cela a vraiment été le point clef de cette étude. Sans analyse correcte des signaux obtenus, il nous aurait été quasiment impossible d'aller beaucoup plus loin que les premières études faites par Michaël Suissa lors de sa thèse. Même quand les bases de la méthode avaient déjà été établies et que nous avons déjà commencé les expériences sur les noyaux, nous avons continué à travailler à l'amélioration de cette technique. Nous avons essayé de l'améliorer quasiment jusqu'au début de la rédaction, ce qui nous a amené à refaire des analyses que nous avons déjà faites (mais, celles-ci ont amélioré les résultats).

Le principe de la technique que nous avons mis au point est d'abord basé sur la décomposition du signal brut en tranches de durée variable, puis, le calcul d'une fonction d'autocorrélation pour chacune de ces tranches et l'ajustement non paramétrique de ces fonction d'autocorrélation grâce une approche de type problème inverse régularisé qui s'appuie sur la méthode dite « CONTIN », qui a été proposé et développée par Provencher en 1982. Suivant que l'on veuille étudier la dynamique « rapide » (typiquement les temps inférieurs à 0,1 s) ou la dynamique « lente » (donc les temps plus grands que 0,1 s), la durée des tranches, le nombre de points ..., ne sont pas identiques, mais, le principe de l'analyse reste le même. Grâce à cette méthode en deux étapes, nous sommes capable d'avoir les spectres des temps caractéristiques du noyau sur quasiment 7 décades en temps (entre  $10^{-5}$  s et 30 s).

La description détaillée de cette méthode ainsi que sa validation font l'objet du chapitre 4 de ce manuscrit de thèse.

- *3<sup>ème</sup> étape des travaux.* Une fois le dispositif expérimental construit, les protocoles développés et, les bases de la méthode de traitement du signal établies, nous avons commencé nos mesures pour sonder la dynamique interne des noyaux des cellules vivantes. Nous avons successivement étudié la dynamique interne des noyaux de deux lignées cellulaires (SHEP et HeLa) dans les différentes phases du cycle cellulaire et, les effets de conditions de culture « anormales ».

- *Résultats obtenus.* Nos résultats montrent que la dynamique interne du noyau varie en fonction de l'état de la cellule. Nous avons fixé les cellules avec du formaldéhyde et nous avons pu observer que la fixation des cellules SHEP, et HeLa, arrête tous processus de la dynamique au-dessus de  $10^{-4}$  s. Ceci signifie que les signaux diffusés enregistrés sur notre montage proviennent

bien du noyau et que la dynamique sondée est bien la dynamique à l'intérieur du noyau et qu'elle est la trace de l'activité nucléaire qui s'arrête complètement lors de la fixation des cellules.

Nos résultats confirment la plupart des résultats de Mickael Suissa, mais surtout ils nous permettent d'aller plus loin en validant une bonne partie des hypothèses faites alors sur cette dynamique. L'analyse de la dynamique du noyau des cellules SHEP et HeLa, montre clairement l'existence de trois échelles de temps très différentes, et ceci quel que soit l'état de cellule :

- i) Une dynamique lente, avec une distribution de temps caractéristiques s'étalant entre 0,1 s et 30 s.
- ii) Une dynamique rapide, avec une distribution de temps caractéristiques qui se trouve dans la gamme de temps allant de quelques  $10^{-4}$  s à 0,1 s.
- iii) Enfin, une dynamique très rapide, avec des temps caractéristiques qui couvre la gamme de temps qui va de  $10^{-5}$  s à quelques  $10^{-4}$  s.

En dehors des premiers travaux menés par Michaël Suissa lors de sa thèse, cette étude est certainement la seule étude menée sur la dynamique interne globale du noyau d'une cellule vivante par diffusion dynamique de la lumière. En conséquence, il est difficile d'aller très loin dans l'analyse de ces résultats et d'arriver à des interprétations satisfaisantes, en particulier en termes de lien avec des processus biologiques. Néanmoins, un certain nombre de choses peuvent être dites et nous pouvons mettre en avant un certain nombre d'hypothèses.

**Dynamique lente.** Nos résultats montrent que cette dynamique lente est très probablement d'origine diffusive, ou plus exactement sous diffusive, avec une distribution de coefficients de diffusion assez large qui s'étend de  $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à  $10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (*i.e.* entre  $10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $0,1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ces temps caractéristiques sont très probablement dus à la diffusion brownienne de gros objets (complexes protéiques, corps nucléaires, fibre de chromatine) dans le milieu nucléaire.

Ces coefficients de diffusion sont supposés changer en fonction du cycle cellulaire, mais, nous n'avons pas observé ces changements. Par contre, il semble que l'on ait une diminution de la dynamique autour de la seconde quand on baisse la température à  $23^\circ \text{ C}$ , ce que l'on peut traduire par un ralentissement, ou en présence de HU dans le milieu de culture. Ceci pourrait indiquer une augmentation de la viscosité effective du noyau dans ces conditions par rapport à sa viscosité dans des conditions de culture normales. Mais, ceci pourrait aussi être la conséquence d'une augmentation de la rigidité de la fibre de chromatine dans ces conditions.

**Dynamique rapide.** La dynamique dans le second intervalle est, elle, très fortement affectée par les différents changements d'état des cellules. En particulier, elle évolue fortement au cours du cycle cellulaire, avec des différences notables entre les différentes phases du cycle, mais aussi en montrant l'existence de sous-phases, avec des dynamiques distinctes, dans la phase G1. Elle est aussi sensible aux conditions de culture, puisque l'on peut observer des modifications importantes de cette dynamique quand les cellules sont mises en présence d'hydroxyurée. Mais surtout, nous avons pu observer que cette dynamique est profondément modifiée quand on diminue la température des cellules de  $37^\circ \text{ C}$  à  $23^\circ \text{ C}$ . En conséquence, la dynamique dans cet intervalle est très vraisemblablement liée à l'activité enzymatique du noyau. Par contre, la dynamique que l'on observe n'est certainement pas celle de ces réactions chimiques (il est peu probable que celles-ci modifient suffisamment l'indice de réfraction du noyau localement pour diffuser la lumière). Plus probablement, ce que l'on voit, c'est leurs effets sur la dynamique de la chromatine ; cette dynamique rapide a très certainement pour origine les remodelages de la fibre de la chromatine par l'activité enzymatique du noyau.

*Dynamique très rapide.* Pour les temps très courts, on imagine que cette dynamique très rapide est due à la diffusion de petites protéines à l'intérieur du noyau. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à démontrer que ces temps étaient diffusifs. Mais, plusieurs caractéristiques de la dynamique dans cet intervalle supportent cette hypothèse de la diffusion brownienne de petits objets. En particulier, c'est la seule partie de la dynamique du noyau qui persiste quand on a fixé les cellules. Dans ce cas là, la structure du noyau est celle d'un gel chimique fortement réticulé et, l'activité biologique est complètement inexistante. En conséquence, la seule dynamique que l'on peut observer par diffusion dynamique de la lumière dans ces conditions, a pour origine la diffusion brownienne de particules dont les tailles sont plus petites que la « mesh size » du gel formé.

En conclusion, nos expériences montre que la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante peut se décomposer en trois dynamiques différentes. Aux temps très courts et aux temps longs, deux dynamiques qui correspondent, très vraisemblablement, à la diffusion brownienne d'objets dans le milieu nucléaire (petites protéines pour la dynamique très rapide ; complexes protéiques, corps nucléaires, fibres de chromatine pour la dynamique lente). Dans la gamme de temps qui s'étend environ de  $10^{-4}$  s à 0,1 s nous trouvons une dynamique qui dépend de l'activité enzymatique du noyau et qui semble due aux remodelages de la fibre de la chromatine par cette activité.

Nous nous étions fixé quatre objectifs au début de la thèse. Même si nous n'avons pas réussi à mener à bien tous les points du quatrième objectif, nous avons monté un nouveau dispositif expérimental, développé une technique spécifique de traitement du signal pour analyser nos données et mené à bien un certain nombre d'expérience qui améliore notre connaissance de la dynamique interne du noyau. Ce travail de thèse apporte des avancées notables par rapport aux premiers travaux réalisés par Michaël Suissa.

### 6.3. PERSPECTIVES.

Il nous semble ici important de parler des perspectives ouvertes pour ce travail. En effet, les résultats apportés par nos expériences sont très importants et peuvent ouvrir la voie à de nombreuses études.

Néanmoins, avant de proposer de nouvelles expériences, il faut faire quelques améliorations sur l'aspect expérimental.

- Les principales améliorations expérimentales portent sur l'aspect « traitement du signal ». La méthode de traitement de signal que nous avons développée s'avère très efficace pour l'analyse des signaux bruts diffusés par le noyau, mais ensuite, à part faire des moyennes sur un grand nombre de tranches, nous ne savons pas comment analyser nos résultats. Ils nous semble important de pouvoir arriver à sortir de l'information des spectres  $g(s)$  des différentes tranches, ceci pour voir les « fluctuations » de l'activités, les évolutions rapides, et là, il y a un gros travail à faire. De même, il faudrait essayer de trouver une méthode pour voir des évolutions dans des spectres composés de nombreux de « pics » avec une grande variabilité (ceci en particulier pour mieux analyser les temps longs). Il faut aussi chercher s'il existe d'éventuelles corrélations entre différents temps.

Maintenant, que nous avons une idée assez précise de la dynamique du noyau d'une cellule, on pourrait essayer avec notre technique d'étudier la dynamique interne du noyau lors d'autres processus biologiques fondamentaux. En particulier :

- L'apoptose<sup>1</sup> (ou la mort cellulaire programmée) : c'est le processus par lequel les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée et, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Ce processus peut facilement être induit dans une culture cellulaire par des agents extérieurs activant les récepteurs de mort de la membrane, comme les récepteurs Fas, ou l'endommagement de l'ADN (par exemple par irradiation). Il a été montré qu'entre l'activation des récepteurs et le déclenchement de l'apoptose, il s'écoule plusieurs heures pendant lesquelles l'activité du noyau est fortement modifiée, mais, sans que cela soit observable par microscopie. Notre technique pourrait permettre d'étudier cette période « pré-apoptotique » simplement en apportant des informations sur l'évolution de noyau entre le moment où l'apoptose est induite et le temps où le noyau se fragmente.
- Le rôle de l'actine dans le noyau : ces dernières années, plusieurs études ont clairement démontré<sup>2,3</sup> que l'actine jouait un rôle important dans la régulation des gènes, les processus de réplication et de transcription ainsi que dans le remodelage de la chromatine (les modifications de polymérisation de l'actine affectent le remodelage de la chromatine). En couplant notre dispositif expérimental avec de la microscopie à fluorescence nous espérons à la fois mesurer la dynamique interne du noyau, et observer les moments où a lieu une polymérisation importante de l'actine. Ceci pourrait conduire à des informations sur le couplage entre l'activité de l'actine dans le noyau et la dynamique de la chromatine. Ce couplage semble avoir un rôle dans certaines myopathies et donc notre technique pourrait aider à mieux comprendre les processus biologiques impliqués dans ces maladies.

#### 6.4. CONCLUSION.

Ces expériences sont, à notre connaissance, avec celles de Michaël Suissa, les premières tentatives d'étudier la dynamique interne du noyau d'une cellule vivante à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière. Cette technique est particulièrement puissante pour examiner les processus qui sont corrélés à la fois en temps et dans l'espace et elle permet d'avoir accès à la dynamique globale du noyau. De ce fait, elle nous apparaît donc comme le parfait complément des expériences de microscopie de fluorescence qui sont normalement utilisées pour étudier la dynamique interne du noyau. Nous pensons que ces deux techniques sont complémentaires et nécessaires pour obtenir et comprendre la dynamique interne du noyau des cellules vivantes.

---

<sup>1</sup> Goillot E., Raingeaud J., Ranger A., Tepper R. I., Davis R. J., Harlow E., Sanchez I., Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA*, **94** : 3302–3307 (1997).*Proc. Natl. Acad. Scie. USA*, **94**: 3302–3307.

<sup>2</sup> Harata M., Zhang, Y., Stillman D.J., Matsui D., Oma Y., Nishimori K., Mochizuki R., Correlation between chromatin association and transcriptional regulation for the Act3p/Arp4 nuclear actin-related protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, **30** : 1743-1750 (2002).

<sup>3</sup> Rando, O.J., Zhao K.J., Janmey P., Crabtree G.R., Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA*, **99** : 2824-2829 (2002).