

Etude de l'activité de l'enzyme de réparation NucS à l'échelle de la molécule unique

Rachid Rezgui

▶ **To cite this version:**

Rachid Rezgui. Etude de l'activité de l'enzyme de réparation NucS à l'échelle de la molécule unique. Biophysique [physics.bio-ph]. Ecole Polytechnique X, 2013. Français. NNT : . tel-00842766

HAL Id: tel-00842766

https://theses.hal.science/tel-00842766

Submitted on 9 Jul 2013

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.

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE POLYTECHNIQUE

par

Rachid Rezgui

Etude de l'activité de l'enzyme de réparation NucS à l'échelle de la molécule unique

Laboratoire d'Optique et Biosciences

Ecole Polytechnique

Soutenue le 11 Juin 2013

Président : M. Emmanuel MARGEAT
Rapporteur : M. Jean François ALLEMAND
Rapporteur : M. Christophe ESCUDÉ
Examinatrice : Mme Karen PERRONET
Examinateur : M. Hannu MYLLYKALLIO
Co-directrice de thèse : Mme Antigoni ALEXANDROU
Directeur de thèse : M. Cédric BOUZIGUES

Table des matières

Abstract 1

Résumé 2

Introduction 3

1. Intégrité du génome : dommages et mécanismes de réparation 5
1.1. Réplication, altération et réparation de l'ADN 6
1.1.1. Réplication de l'ADN 6
1.1.2. Altération de l'ADN 7
1.1.3. Mécanismes de réparation de l'ADN 8
1.2. REN : mécanisme et enzymes 11
1.2.1. Mécanisme 11
1.3. *Pyrococcus Abyssi* NucS : analyses structurales et biochimiques 15
1.3.1. Structure de NucS 15
1.3.2. Activité de NucS 16
1.3.3. Modèles d'interaction 18
1.4. Avantage de l'observation de molécules uniques 18

2. Étude de l'interaction des enzymes avec leurs substrats 21
2.1. Cinétique chimique et mesures d'ensemble 21
2.1.1. Rappel sur la cinétique réactionnelle et équation de Michaelis-Menten 21
2.1.2. Techniques de mesure de la cinétique réactionnelle et des constantes de dissociation 23
2.2. Cinétique chimique à l'échelle de la molécule unique 28
2.3. Mécanique de l'interaction 31
2.4. Manipulation et suivi de molécules individuelles 32
2.4.1. Pinces optiques et magnétiques 32
2.4.2. Accrochage à une surface 34

3. Microscopie à l'échelle de la molécule unique 41
3.1. Microscopie de fluorescence : Sondes et Techniques 42
3.1.1. Sondes fluorescentes 42
3.1.2. Couplage des fluorophores aux protéines 49
3.1.3. Techniques de microscopie de fluorescence 50
3.2. Microscopie à onde évanescente : TIRF 52
3.2.1. Principe et montages 52
3.2.2. Performances de la microscopie à onde évanescente 56

3.2.3. Mise en Place du système à onde évanescente et description du montage . . . 57
3.2.4. Réglage du TIRF . . . 59
3.3. Calibration du système optique . . . 64
3.3.1. Calcul de la réponse impulsionnelle PSF . . . 64
3.3.2. Étude du photoblanchiment des fluorophores Alexa 488 . . . 66
3.4. Détection de molécules uniques et superlocalisation . . . 74
3.4.1. Détection et suivi de particules uniques : Principe et méthodes 75
3.4.2. Rapport signal sur bruit . . . 78
3.4.3. Précision de localisation . . . 80
3.5. Applications . . . 83
3.5.1. Autres techniques . . . 86
3.6. Colocalisation à haute résolution en présence de nanocristaux fluorescents . . . 88
3.6.1. Colocalisation sans nanocristaux fluorescents . . . 88
3.6.2. Colocalisation avec des nanocristaux fluorescents . . . 90
3.6.3. Multilatération et correction de la dérive . . . 91
3.6.4. Avantages et inconvénients . . . 93
3.7. Traitement de surface . . . 94
3.7.1. Passivation et accrochage à la surface de l'ADN . . . 94

4. Étude de l'interaction NucS-ADN à l'échelle de la molécule unique 99
4.1. Colocalisation et spécificité de l'interaction ADN-protéine . . . 100
4.2. Étude de la cinétique de l'interaction NucS-ADN . . . 102
4.2.1. Cinétique d'association . . . 104
4.2.2. Cinétique de dissociation . . . 109
4.2.3. Estimation de la constante de dissociation K_d . . . 116
4.3. Discussion . . . 118
4.3.1. Caractérisation de l'interaction NucS-Flap . . . 118
4.3.2. Mécanisme de dissociation du complexe NucS-ADN . . . 119
4.4. Étude de l'activité de . . . 120

5. Étude de l'activité du complexe de réparation NucS-ADN-PCNA 123
5.1. Étude de l'effet de PCNA sur l'activité de NucS avec un flap 5' . . . 125
5.1.1. Effet sur l'association . . . 125
5.1.2. Effet sur la dissociation et le clivage . . . 127
5.1.3. Constante de dissociation K_D . . . 132
5.2. Étude de l'effet de PCNA sur l'activité de NucS avec un flap 3' . . . 133
5.2.1. Effet sur l'association . . . 133
5.2.2. Effet sur la dissociation et l'activité catalytique . . . 134
5.2.3. Constante de dissociation K_D . . . 136
5.3. Discussion . . . 137
5.3.1. Cas d'un flap 5' . . . 137
5.3.2. Cas d'un flap 3' . . . 140
5.3.3. Comparaison entre le flap 3' et 5' et modèle général d'interaction 143

Conclusion 149

A. Protocoles de biochimie **153**
A.1. Marquage fluorescent des protéines 153
A.2. Construction des fragments d'ADN 155
A.2.1. Séquences d'ADN (5'→ 3') 156

B. Protocole de traitement de surface **157**
B.1. Préparation des solutions 157
B.2. Préparation de la surface 157
B.3. Utilisation des Quantum dots 158

C. Profondeur du champ d'une onde évanescente **159**

D. Abréviations **161**

Table des figures

1.1. Cycle cellulaire d'une cellule eucaryote. Extrait de [1]. 5
1.2. Schéma de la fourche de réplication de l'ADN. Extrait de [2]. 6
1.3. Mécanismes de réparation de l'ADN 10
1.4. Modèle de la réparation par excision de nucléotides chez les eucaryotes 13
1.5. Modèle de la réparation par excision de nucléotides chez les archées . 14
1.6. Structure cristalline de *Pyrococcus Abyssi* 16
1.7. Strucutre en flap de l'ADN 16
1.8. Activité enzymatique de *Pyrococcus Abyssi* NucS. 17
1.9. Modèles d'interaction de la FEN1 avec les structures branchées d'ADN. A : modèle de localisation et B : modèle d'enfilement. D'après [Bam10]. 19

2.1. Vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat. 23
2.2. Détermination de la constante de dissociation à partir d'un test ELISA 24
2.3. Résonance des plasmons de surface 25
2.4. Titration calorimétrique isotherme 26
2.5. Spectroscopie de corrélation (croisée) de fluorescence 27
2.6. Suivi d'une cinétique d'association et de dissociation à l'échelle de la molécule unique. 29
2.7. Distribution des temps d'interaction en fonction du nombre d'étapes intermédiaires d'une réaction. 30
2.8. Pinces optique et magnétique 33
2.9. Techniques de traitement de surface pour l'imagerie de molécules uniques 36
2.10. Techniques d'immobilisation de molécules uniques 38
2.11. Zero-mode waveguides 39

3.1. Image de Fluorescence d'une cellule. 43
3.2. Diagramme de Jablonski du FITC 44
3.3. Structure de la GFP. 46
3.4. Couleur d'émission des Qdots. 47
3.5. Structure et spectre de l'Alexa 488 48
3.6. Structure et spectre des Qdots 49
3.7. Couplage des fluorophores aux molécules d'intérêt. 50
3.8. Types de montage TIRFM 52
3.9. Chemin du faisceau dans le montage 53
3.10. Profondeur de pénétration du TIRF 55
3.11. Comparaison des images TIRF et EPI 56
3.12. Montage TIRF 57
3.13. Mesure de la taille du faisceau laser 58

3.14. Rendement quantique de la caméra 59
3.15. Alignement du faisceau laser autour du microscope 60
3.16. Alignement du faisceau laser dans le microscope 60
3.17. Focalisation du faisceau sur le plan focal de l'objectif. 61
3.18. Réflexion totale à l'interface entre le verre et l'eau. 62
3.19. Profil d'intensité du laser à sortie de l'objectif 63
3.20. Réflexion totale à l'interface entre le verre et l'eau. 64
3.21. Profil d'intensité de QDs observés par microscopie à onde évanescente. 65
3.22. Photoblanchiment du fluorophore Alexa 488. Observation en microscopie à onde évanescente de molécules uniques d'Alexa 488 66
3.23. Photoblanchiment en étapes 68
3.24. Distribution des temps de photoblanchiment du fluorophore Alexa 488 69
3.25. Effet de l'intensité du laser et de la température sur le photoblanchiment 70
3.26. Réactions chimiques du GODCAT et du PCA/PCD avec le dioxygène 71
3.27. Désoxygénation d'une solution par le GODCAT et le PCD/PCA . . . 72
3.28. Comparaison des durées de vie des fluorophores Cy3, Cy5 et Alexa 488 73
3.29. Imagerie time-lapse avec le shutter 74
3.30. Image d'une molécule individuelle de NucS marquée avec Alexa 488. . 75
3.31. Ajustement gaussien de l'intensité de la particule fluorescente 77
3.32. Rapport signal à bruit entre TIRF et EPI 79
3.33. Suivi de la position d'un fragment d'ADN au cours du temps 82
3.34. Histogramme des nombres de photons collectés sur 100 fluorophores Alexa 488 83
3.35. Variation de la précision de localisation en fonction du nombre de photons détectés 83
3.36. Image d'un fluorophore individuel Cy3 avec une précision de 1.5 nm . 84
3.37. Déplacement de la Myosine V sur les filaments d'actine 85
3.38. FRET : efficacité du signal en fonction de la distance entre les fluorophores 88
3.39. Dérive mécanique par rapport à la position initiale 89
3.40. Histogramme des distances des protéines à l'ADN 90
3.41. Principe de fonctionnement d'un dédoubleur spectral. 91
3.42. Principe de colocalisation avec QDs 92
3.43. Distribution de la position des protéines relativement à l'ADN 93
3.44. Traitement de surface avec BSA pour l'imagerie de molécules uniques 94
3.45. Caractérisation de l'interaction non spécifique I. 95
3.46. Distribution des temps d'interaction non spécifique 96
3.47. Fixation de streptavidine FITC à la surface passivée 96
3.48. Caractérisation de l'interaction non spécifique II. 97

4.1. Suivi de la position d'un Qdot en fonction du temps 101
4.2. Histogramme des distances des protéines à l'ADN 102
4.3. Imagerie de l'interaction NucS-ADN 103
4.4. Evolution du nombre d'interactions en fonction du temps 104
4.5. Effet du sel sur la cinétique d'association 106
4.6. Effet du glycérol sur la cinétique d'association 107

4.7. Spécificité de l'interaction avec le flap 108
4.8. Dissociation du complexe NucS-Flap 3' 111
4.9. Probabilité de dissociation du complexe NucS-ADN 113
4.10. Modèle de diffusion 114
4.11. Comparaison entre le flap 3' et 5' 117
4.12. Cinétique d'association de Fen1 121

5.1. Constructions d'ADN avec une biotine et un flap 124
5.2. Effet de PCNA sur l'association à température ambiante 126
5.3. Effet de PCNA sur l'association à température élevée 126
5.4. Effet de la température sur l'association 127
5.5. Effet de PCNA sur la dissociation à température ambiante. 127
5.6. Effet de PCNA sur la dissociation à 45°C. 128
5.7. Temps d'interaction avec le flap 5' à 45°C en présence de $MnCl_2$. . . . 129
5.8. 4 modèles d'interaction NucS-ADN en présence de PCNA à 45°C . . 130
5.9. Probabilité de dissociation du flap 5'. 131
5.10. Effet de l'activation catalytique sur la cinétique de dissociation 132
5.11. Vitesses d'association de NucS avec le flap 3' 133
5.12. Vitesses de dissociation de NucS avec le flap 3' 134
5.13. Cinétique de dissociation du flap 3' en conditions de clivage 135
5.14. Mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN dans le cas d'un flap 3' 136
5.15. Chargement de PCNA sur l'ADN avec un flap 5' 138
5.16. Modèles d'interaction de NucS avec un flap 5' en présence de PCNA . 139
5.17. Chargement de PCNA sur le flap en présence de XPF 140
5.18. Mesure de FRET du complexe NucS-ADN-PCNA dans le cas d'un flap 3' 141
5.19. Mécanisme d'interaction de NucS avec le flap 3' 142
5.20. Mesures de FRET sur le complexe NucS-ADN-PCNA 144
5.21. Modèle de flexion de l'ADN par le complexe NucS-PCNA 145
5.22. Structure de NucS et du complexe NucS-PCNA 145
5.23. Mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN 147
5.24. Mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN 147

Liste des tableaux

2.1. Avantages et inconvénients des techniques de mesure d'affinité. 28

3.1. Avantages et inconvénients des différents marqueurs fluorescents. . . . 48
3.2. Spécifications sur la caméra *Hamamatsu EMCCD C9100-13*. 59
3.3. Caractérisation du couplage de la NucS avec le fluorophore Alexa 488. 67
3.4. Temps caractéristiques de photoblanchiment du fluorophore Alexa 488 couplé à NucS pour une irradiance de 400 W/cm^2. 73

4.1. Valeurs de p calculées à partir d'un KS-TEST pour la comparaison entre les temps de photoblanchiment, d'interaction spécifique et d'interaction non spécifique. 112
4.2. Temps moyens de l'interaction NucS-ADN et taux caractéristiques de dissociation déterminés par observation de molécules uniques. 113
4.3. Temps moyens de linteraction NucS-ADN 115
4.4. Constantes de dissociation K_d (nM). 116

5.1. Constantes de dissociation de NucS avec le substrat 5bf5. 132
5.2. Taux de dissociation et temps moyens d'interaction de NucS avec le flap 3'. 135
5.3. Constantes de dissociation de NucS du flap 3' à 45°C. 137

Abstract

As DNA reparation enzymes are essential to preserve genome integrity, understanding the regulation pathway dynamics is crucial. *Pyrococcus Abyssi* NucS is a recently discovered nuclease acting on branched DNA substrates with free ssDNA extremities, called flaps. The biochemical characterization of NucS has shown a nanomolar affinity for both 5' and 3' flaps with the existence of two DNA binding sites (site I and II) as well as a bidirectional activity characterized by the ability to cleave both 5 'and 3 ' flaps. The mechanisms that are responsible for this activity, particularly its association and dissociation modalities, however, remain poorly understood.

In order to probe the dynamics of NucS interactions with its substrate, we set up a total internal reflection fluorescence microscope that allows the detection and tracking of single interaction events between fluorescently labeled NucS and DNA substrates tethered to a glass surface. Using Quantum dots, we furthermore developed a new colocalization technique based on multilateration that allows for drift correction and colocalization with an accuracy of 50 nm. In our experiments, we investigated the association and dissociation kinetics of the protein-DNA complex and studied the mechanism that regulates the activity of the NucS at different conditions.
First, we report a bidirectional and oriented binding on 3' and 5' flaps and reveal that NucS/DNA dissociation follows a mechanism that is not dependent on NucS diffusion on ssDNA towards the junction but rather by the NucS/ssDNA energy landscape. We moreover demonstrated a central role of salt concentration in the modulation of NucS/DNA interactions. Second, we show that the dissociation mechanism follows single step process with one rate limiting dissociation constant and conclude that NucS can stochastically unbind its substrate in non cleavage conditions at 23°C.

Thereafter, we studied the association and dissociation kinetics of the NucS-DNA complex at 45°Cin the presence of the repair cofactor PCNA. We demonstrated that PCNA increases the NucS association rate for 3 'and 5' substrates. This indicates that PCNA acts as a platform that facilitates the recognition of the lesion and the specific loading of NucS at the junction. In addition, we showed that PCNA destabilizes the NucS-DNA complex, presumably by exerting a force to bend the DNA in order to load the flap extremity into the active site II. In the case of 5' flaps, we have shown that the dissociation follows a two-step mechanism, which is independent of the flap length. We thus proposed a model where NucS binds its substrate directly at the junction thanks to its site I and then threads the free extremity of the flap into site II for cleavage with the help of PCNA that enables substrate bending. In this model, the observed dissociation kinetics may be due to the dissociation of the two independent binding sites. We also showed that the dissociation of NucS on 3' flaps follows a first-order dissociation process which might be due to the speed of the second step in the proposed mechanism for 5' flaps.

Altogether, our results constitute a notable contribution to the characterization of the DNA-NucS interactionsand to thenucleotide excision repair mechanism more generally. The methods we developed furthermore constitute an original way to probe DNA/protein intramolecular kinetics.

Résumé

Les enzymes de réparation de l'ADN sont des facteurs essentiels pour assurer l'intégrité du génome. Ainsi, la compréhension de la dynamique de leurs mécanismes d'interaction est capitale. NucS est une nucléase récemment découverte chez l'archée *Pyrococcus abyssi*, qui interagit avec des structures branchées de l'ADN à simple brin libre, appelées flaps. Sa caractérisation biochimique a mis en évidence une affinité nanomolaire pour l'ADN simple brin, avec l'existence de deux sites de liaison (site I et II) ainsi qu'une activité bidirectionnelle caractérisée par la capacité à cliver les flaps 5' et 3'. Les mécanismes qui sont à l'origine de cette activité, notamment ses modalités de chargement, de localisation et de dissociation, restent toutefois peu connus.

Afin de sonder la dynamique des interactions de NucS avec son substrat, nous avons mis en place un microscope à illumination en onde évanescente permettant la détection et le suivi des événements d'interaction individuels entre la protéine marquée avec un fluorophore et un substrat d'ADN attaché à la surface. Nous avons ensuite développé une nouvelle technique de colocalisation qui permet de positionner une protéine individuelle par rapport à son substrat avec une précision de 50 nm pour des durées arbitraires. Nous avons alors étudié la cinétique d'association et de dissociation des complexes NucS-ADN individuels afin de résoudre les mécanismes qui régulent l'activité de l'enzyme dans différentes conditions.
Dans des conditions où le clivage est inhibé, nous avons montré que l'association était dépendante du site I, bidirectionnelle et symétrique pour les flaps 3' et 5' et que la dissociation était orientée avec une affinité supérieure pour les flap 5'. Nous avons également montré que la dissociation suivait une cinétique du premier ordre indépendante de la diffusion de NucS sur le flap. Ceci indique que, dans ces conditions non clivantes, NucS s'associe et/ou se dissocie à des positions arbitraires sur le flap.

Par la suite, nous avons étudié la cinétique d'association et de dissociation du complexe NucS-ADN à 45 °C en présence du cofacteur de la réparation PCNA. Nous avons démontré que PCNA augmente la vitesse d'association de NucS avec les substrats 3' et 5'. Ceci indique que PCNA agit comme une plateforme qui facilite la reconnaissance de la lésion, avec un chargement ciblé de NucS à la jonction. De plus, nous avons montré que PCNA déstabilise le complexe NucS-ADN, vraisemblablement en exerçant une force pour plier l'ADN afin d'amener l'extrémité du flap vers le site II. Dans le cas de flaps 5', nous avons montré que la dissociation suit un mécanisme en deux étapes, qui est indépendant de la longueur du flap. Ceci nous a permis de proposer un modèle où NucS se charge par son site I directement à la jonction, courbe le substrat pour capturer l'extrémité simple brin par le site II pour le cliver. Dans le cas d'un flap 3', nous avons montré que la dissociation suit un mécanisme du premier ordre ce qui est probablement dû à la rapidité de la seconde étape dans le mécanisme proposé pour les flaps 5'.

Nos résultats constituent ainsi une nouvelle contribution à la caractérisation intramoléculaire des interactions NucS-ADN. Les méthodes que nous avons développées constituent en outre un moyen original pour sonder la cinétique des interactions entre biomolécules et pourront être appliquées à de multiples systèmes.

Introduction

Ce projet de thèse a été réalisé au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB, Ecole polytechnique) sous la direction de Cédric Bouzigues et Antigoni Alexandrou en collaboration avec Hannu Myllykallio et Roxane Lestini dans le cadre d'une nouvelle thématique concernant l'étude de la dynamique des interactions ADN/protéines à l'échelle de la molécule unique. Ce projet a démarré suite à l'arrivée au laboratoire de l'équipe de Hannu Myllykallio, dont une des thématiques principales concerne les mécanismes de réparation de l'ADN. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au mécanisme de réparation par excision de nucléotides (REN) et plus particulièrement au rôle éventuel d'une endonucléase récemment découverte chez les archées, appelée NucS, dans ce processus [Ren09]. Cette endonucléase possède la particularité de pouvoir cliver les deux extrémités simple brin 5' et 3' et forme ainsi une nouvelle famille d'endonucléases interagissant avec l'ADN simple brin. Nous nous sommes appuyés sur les résultats des mesures d'ensemble obtenues par l'équipe de Hannu Myllikallio ainsi que sur les données structurales de la protéine NucS pour étudier son interaction avec les structures d'ADN branchées avec un simple brin libre, appelées flaps, à l'échelle de la molécule individuelle en utilisant un montage de microscopie à onde évanescente, que nous avons mis en place.

Le premier chapitre décrit le mécanisme de réparation par excision de nucléotides et introduit plus en détail notre système biologique et notre problématique.

Le deuxième chapitre présente les différentes méthodes utilisées pour quantifier l'interaction d'une enzyme avec son substrat. Nous y comparerons les techniques d'ensemble aux techniques de molécule unique et expliquerons le besoin de résoudre la dynamique réactionnelle pour accéder au mécanisme d'interaction.

Le troisième chapitre présente le système de microscopie à onde évanescente et décrit les différentes techniques utilisées pour la détection et le suivi de molécules uniques.

Les quatrième et cinquième chapitres décrivent nos résultats sur l'activité de NucS sur son substrat d'ADN. Nous étudierons d'abord la cinétique d'association et de dis-

sociation du complexe NucS-ADN dans des conditions non clivantes à température ambiante et nous analyserons ensuite l'effet d'un cofacteur de la réaction sur l'activité du complexe dans des conditions de clivage pour déduire un mécanisme d'interaction de NucS avec son substrat d'ADN.

1. Intégrité du génome : dommages et mécanismes de réparation

La vie d'une cellule est organisée suivant un processus appelé cycle cellulaire au cours duquel le génome est transmis aux cellules filles. Le cycle cellulaire comprend quatre phases (G_1,S, G_2 et M, figure 1.1) dont l'enchaînement est hautement régulé. Le passage d'une phase à la suivante est assuré par des complexes protéiques spécifiques à chaque étape [1]. Ainsi, avant la réplication de l'ADN dans la phase S, la présence de certaines protéines (Rb, E2F, Cdk2) synthétisées par la cellule durant la phase G est vérifiée. De même, avant de déclencher la mitose, la cellule vérifie l'intégrité génétique et structurale de son génome par l'intermédiaire du complexe Cdk1-CyclineB [1] [Vir10].

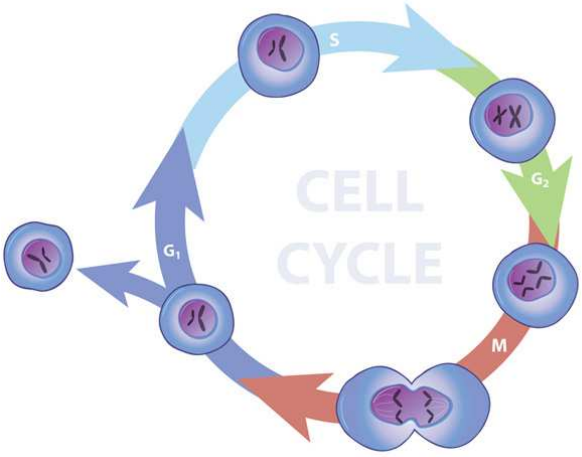


FIGURE 1.1.: Cycle cellulaire d'une cellule eucaryote. Extrait de [1].

Au cours de son cycle, la cellule est soumise à un ensemble de facteurs environnants de nature chimique tels que les radicaux libres ou physique tels que les rayons UV

1. Cyclin-dependent kinase

qui peuvent affecter son fonctionnement [Sin02]. Il existe également d'autres facteurs internes qui peuvent provoquer des lésions dans la molécule d'ADN et donc empêcher la cellule de poursuivre son cycle, créer des anomalies telles que les divisions non contrôlées (tumeurs) ou mener la cellule vers une mort programmée, l'apoptose, si ces dommages ne sont pas identifiés puis réparés [Gre11]. Afin de résister à ces facteurs, la cellule dispose de plusieurs mécanismes de réparation qui assurent l'intégrité de son génome, la continuité de son cycle et donc sa viabilité.

1.1. Réplication, altération et réparation de l'ADN

1.1.1. Réplication de l'ADN

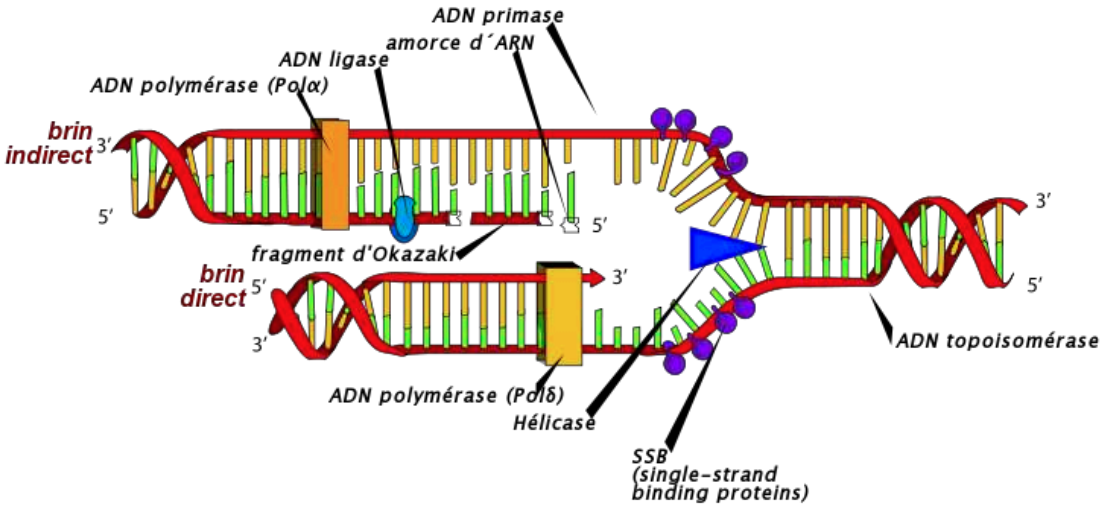


FIGURE 1.2.: Schéma de la fourche de réplication de l'ADN. Extrait de [2].

La réplication de l'ADN est l'ensemble des processus aboutissant à la formation de deux molécules filles d'ADN identiques à partir d'une molécule d'ADN mère. Elle se produit une seule fois pendant chaque cycle, la totalité du génome étant dupliquée en une étape. Parmi les protéines impliquées dans la réplication, nous pouvons citer l'ADN polymérase qui est chargée de la synthèse du nouveau brin, une hélicase qui brise les chaînes du double brin et les SSB [2] qui les empêchent de se reformer. La réplication est bidirectionnelle et peut commencer à des endroits différents en même temps [Wea11]. Pour dupliquer l'ADN, l'hélicase commence par rompre les liaisons entre les nucléotiodes qui forment le double brin. L'ADN polymérase se fixe alors à la

2. Single-Stranded Binding protein

jonction et synthétise le brin complémentaire dans le sens 3' → 5' de façon continue (figure 1.2). Le second brin est dupliqué de façon discontinue : une primase y ajoute à des endroits successifs des amorces d'ARN complémentaires qui vont servir de point de départ pour une autre polymérase qui synthétise alors dans le sens opposé à la première les fragments d'Okazaki entre les différents amorces d'ADN. Pour finaliser la réplication, la polymérase se fixe sur les lacunes dues à cette synthèse discontinue, rallonge le fragment d'Okazaki et retire les amorces d'ARN puis se détache. Enfin, une ligase suture les liaisons entre les fragments puis se retire également [Lod05].

1.1.2. Altération de l'ADN

Avant, pendant et après la réplication, la cellule et ses organites sont constamment soumis à des facteurs de stress qui peuvent altérer son ADN et toucher ainsi à son intégrité. Ces facteurs peuvent être rassemblés en deux groupes :

Facteurs externes

Ce sont les facteurs reliés à l'environnement de la cellule. On trouve par exemple les rayons ultraviolets qui provoquent la formation de dimères de thymine, rendent la molécule d'ADN plus rigide et empêchent alors l'ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire lors de la réplication de l'ADN [Kli66]. On compte également les rayons ionisants, tels que les rayons X, beta, gamma ou les faisceaux de neutrons ainsi que les agents alkylants qui engendrent des cassures de brins simples ou doubles [Tub90, Pea06].

Facteurs internes

Ce sont les propriétés intrinsèques de l'ADN qui peuvent entraîner son altération. Les séquences répétées de l'ADN peuvent par exemple glisser lors de sa réplication et créer ainsi une expansion ou une contraction sur le double brin [Tie10]. L'ADN peut aussi subir un enjambement où les séquences répétées se fixent sur le brin incorrect [Cha12]. Parmi les pathologies causées par ce type de mutations, on trouve l'épilepsie ou l'ataxie de Friedreich [Cha12]. Une autre source d'altération se trouve dans les recombinaisons illégitimes où deux brins homologues se regroupent suite à une cassure du double brin [Keg06]. Un autre type de mutation est causé par les radicaux libres d'oxygène qui produisent la 8-hydroxyguanine qui s'apparie à tort avec l'adénine induisant une transversion de G-C en T-A [Coo03]. Par ailleurs, la cytosine peut

se déaminer spontanément pour donner l'uracil, modifiant ainsi la séquence codante [Pea00].

La fréquence des lésions varie selon les espèces entre 10^{-9} et 10^{-4} mutations par gène [1]. Parmi les lésions les plus courantes, on note les cassures simple brin et les lésions de bases causées généralement par les radiations avec une fréquence entre 500 et 2000 lésions par Gray [3] [3]. Les autres lésions comme les cassures double brin, les pontages ADN-ADN ou les mésappariements sont moins fréquentes [3].

1.1.3. Mécanismes de réparation de l'ADN

Dans la cellule, l'ADN est l'unique macromolécule qui est réparée en cas d'altération. Les mécanismes de réparation sont classés en six mécanismes (figure 1.3) :

1. La réparation directe de la lésion : elle concerne seulement la photoréparation par la photolyase des dimères de thymine induite par un rayonnement UV [Ess06].
2. La réparation par excision de bases (REB) : Ici, la base affectée est éliminée par l'ADN glycosylase. Par la suite, une endonucléase clive le désoxyribose 5'-phosphate et l'ADN polymérase resynthétise la base en se servant du brin opposé comme matrice [Fro04]. Ce mécanisme prend en charge les cassures simple brin, les bases oxydées, les bases alkylées et l'uracil dans l'ADN.
3. La réparation par excision de nucléotides (REN) : ce mécanisme est similaire au REB hormis le fait que l'excision est appliquée sur un ensemble de nucléotides. La reconstruction est également faite par l'ADN polymérase. Elle nécessite cependant l'intervention de la ligase pour suturer le phosphodiester entre les nucléotides [Cle01]. Il est impliqué dans les lésions qui déforment l'ADN comme les pontages intra et inter-brin et les photoproduits.
4. La réparation des mésappariements (RM) : le mésappariement consiste en la présence de deux bases opposées non complémentaires. Cette erreur est produite par l'ADN polymérase lors de la duplication de l'ADN. Elle est reconnue par des enzymes nommés MutS et MutL chez Escherichia Coli. Après identification, MutH détecte le brin original grâce à la présence des méthylations et clive l'autre brin. Une exonucléase digère par la suite le brin clivé et la polymérase resynthétise de nouveau la base pour le double brin [Bue99].

3. 1 Gray= 1 J/kg

5. La réparation par recombinaison non homologue (RRNH) : ce mécanisme répare les cassures du double brin en ligant les deux extrémités. Il est appelé non-homologue puisqu'il ne nécessite pas de comparaison avec une séquence d'ADN matrice. Il vérifie la compatibilité du simple brin excédent du premier morceau avec le deuxième avant de réparer la cassure [Bud05].
6. La réparation par recombinaison homologue (RRH) : lorsqu'une cassure double brin se produit avec une perte d'un nombre important de bases, la cellule se sert d'une chromatide soeur pour recopier la séquence et reconstruire le brin endommagé [Tak98].

En cas de déficience des mécanismes de réparation de l'ADN, trois situations pathologiques peuvent se produire [Lom05, Wan01] : (i) une sénescence de la cellule et une mort dans les prochains cycles (ii) une apoptose où la cellule déclenche sa mort programmée et (iii) une division non contrôlée qui conduit à formation de tumeurs cancéreuses. Dans ce travail, nous nous intéressons au mécanisme de réparation par excision de nucléotides (REN) et plus particulièrement au rôle éventuel dans ce processus d'une endonucléase, récemment découverte et purifiée, appelée NucS [Ren09]. Il fait l'objet de la section suivante.

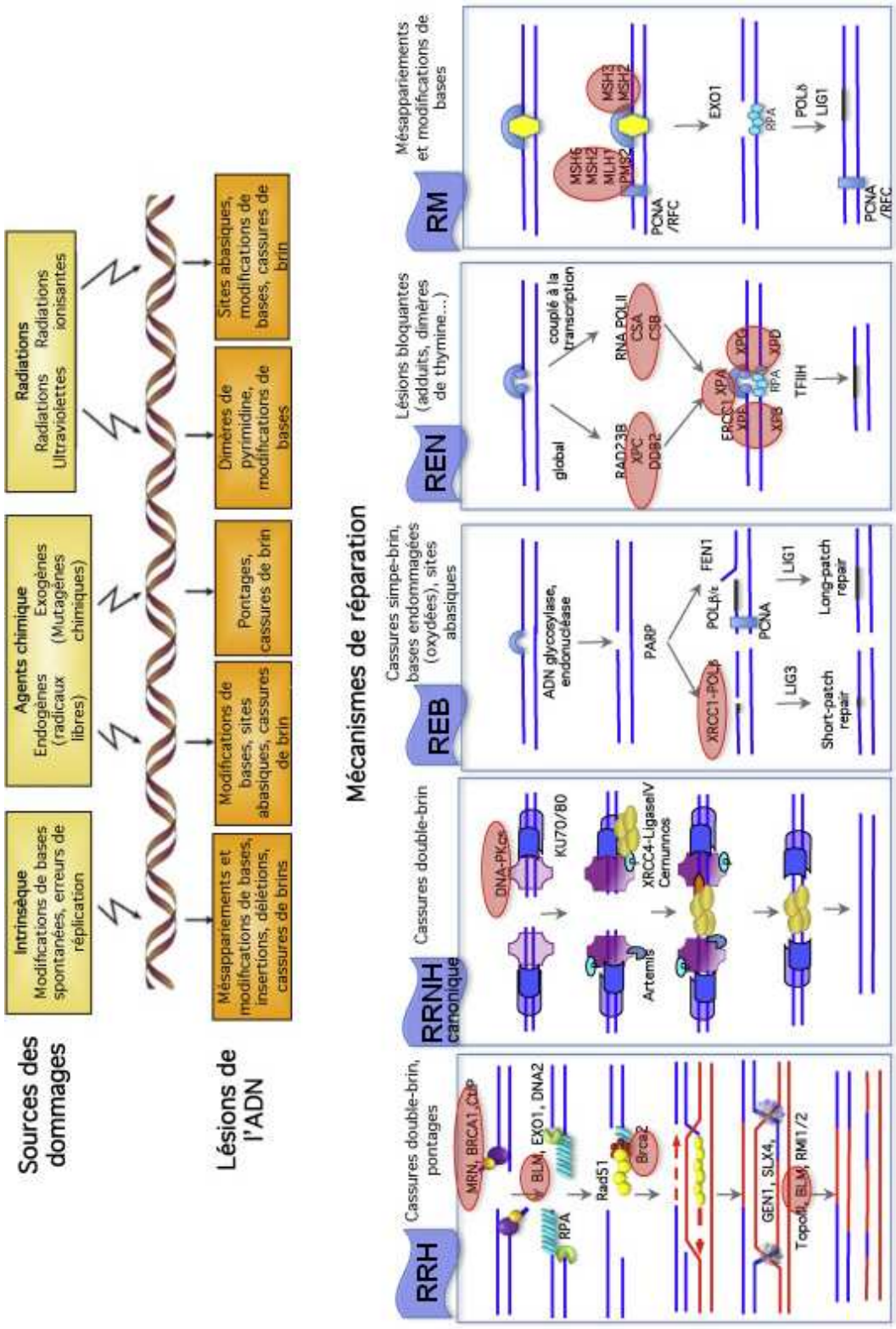


FIGURE 1.3.: Les mécanismes de réparation de l'ADN. Extrait de [Ras12]. Voir texte pour la description.

1.2. La réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision de nucléotides (REN) est un mécanisme fréquent dans la réparation de l'ADN. Elle concerne entre autres, les structures branchées qui peuvent apparaître pendant la réplication et la recombinaison de l'ADN ou en raison de facteurs extérieurs comme les rayonnements UV [Woo97,San08]. Chez l'homme, les dommages causés par les rayons UV, comme les dimères de pyrimidine, sont réparés par REN en absence d'enzymes photolyases [Rea05]. La REN est également impliquée dans les dommages causés par le stress oxydatif ou par l'alkylation des bases [Rea97]. Contrairement aux autres mécanismes de réparation, la REN chez les eucaryotes est différente de celle chez les bactéries et les gènes impliqués ne présentent pas d'homologie ce qui témoigne de voies évolutives distinctes. La procédure de réparation reste cependant identique dans ces principes et comprend trois étapes : (i) détection de la lésion, (ii) fixation et déroulement de l'ADN et (iii) incision puis excision du brin.

1.2.1. Mécanisme

Chez les eubactéries

Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides a été découvert chez la bactérie *E.Coli* et trois facteurs UvrA, UvrB et UvrC responsables de la réparation ont été identifiés [Boy64]. Les facteurs UvrA et UvrB s'associent et forment le complexe de détection, qui se fixe sur la lésion. Avec sa forte affinité pour le simple brin et sa fonction hélicase, UrvB déroule par la suite le brin à exciser et forme un complexe de réparation UrvB-ADN stable qui permet à UrvA de se détacher. UrvC, qui possède une forte affinité pour le complexe UrvB-ADN s'y fixe et clive le brin des deux côtés grâce à sa fonction nucléase. Une fois l'excision terminée, l'ensemble des facteurs se détache, laissant place à la polymérase pour synthétiser le brin manquant.

Chez les bactéries, la photolyase est aussi capable de réparer les lésions causées par les rayons UV. Mais, en absence de lumière, l'ensemble UrvABC est l'unique facteur chargé de la réparation. Il est intéressant de noter que ces trois gènes sont uniquement présents chez les bactéries et leurs séquences ne montrent pas d'homologie avec celles des facteurs XPA-F qui interviennent chez les eucaryotes, ce qui indique que les deux espèces ont subi une évolution distincte [Far11].

Chez les eucaryotes

Le mécanisme de la REN chez les eucaryotes est complexe, pas entièrement compris et implique la participation de nombreux facteurs. Chez l'homme, sept différents facteurs ont été identifiés et sont dénommés par ordre alphabétique XP A-G [Cle01]. Le préfixe XP signifie Xeroderma Pigmentosum, qui est une pathologie de la peau caractérisée par une très forte photosensibilité et une prédisposition au cancer de la peau, due à une déficience dans le système de réparation [Cle68].

La première étape du mécanisme de réparation est l'identification de la lésion où plusieurs protéines coopèrent pour détecter puis se fixer sur la lésion. Il a ainsi été montré l'existence d'un mécanisme de liaison coopératif où RPA (Replication protein A) et XPA fixent l'ADN endommagé. RPA (Replication protein A) maintient ensuite les deux brins de l'ADN séparés ce qui facilite l'accrochage de XPA grâce aux interactions protéine -protéine. Cette dernière positionne le complexe TFIIH pour garantir la spécificité du clivage [Laa99]. Une coopérativité a également été identifiée entre la XPC et le complexe TFIIH qui contient les deux facteurs XPB et XPD [Rea04].

Les trois protéines XPA, RPA et XPC peuvent être considérées comme des sondes pour les lésions, et leur ordre de fonctionnement respectif n'a toujours pas été clarifié [Laa99]. Leur coopérativité est cependant indispensable puisqu'elle garantie l'accrochage du complexe TFIIH à la lésion. Ce dernier possède des fonctions hélicase et ATPase. Ses deux sous-unités XPB et XPD, qui possèdent chacune un sens privilégié de déplacement hydrolysent l'ATP pour séparer et dérouler les brins de l'ADN de manière à former une bulle de 20 nucléotides. Le facteur XPC utilise cette hydrolyse d'ATP pour recruter XPG dans l'anneau puis se détache. XPG effectue alors une incision à la jonction 3' du brin altéré et XPF à l'extrémité 5' et l'oligomère excisé mesure entre 24 et 32 nucléotides. A la fin de ce processus, la polymérase resynthétise le double brin en se servant du brin opposé comme matrice. Ce modèle de réparation par excision de nucléotides (figure 1.4) a été proposé pour la première fois par **Sancar et al** en 1999 suite à une série de mutations génétiques et d'analyses structurales [Wak99].

Chez les archées

Chez les archées, le mécanisme de réparation n'a toujours pas été résolu dans son intégralité, principalement en raison du manque d'information au niveau biochimique

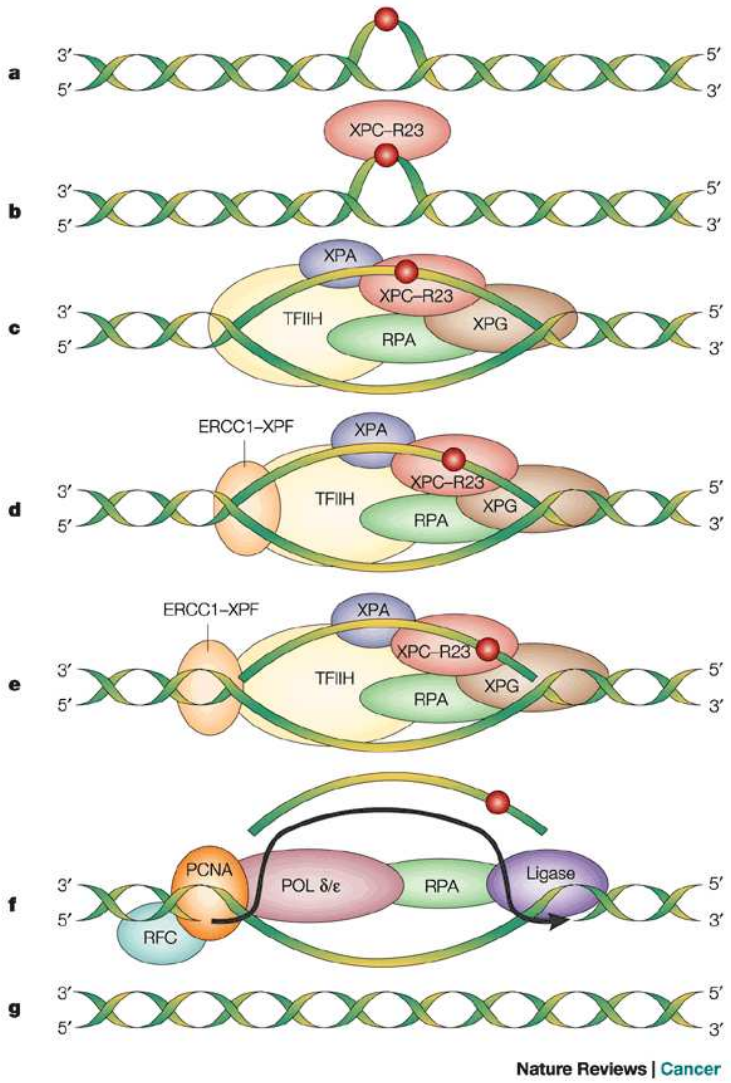


FIGURE 1.4.: Modèle de la réparation par excision de nucléotides : XPC identifie et se fixe sur l'ADN endommagé. Ensuite, les facteurs XPA, RPA et le complexe TFIIH se chargent sur la lésion et l'hydrolyse de l'ATP permet de dérouler l'ADN de manière à former un anneau dans lequel se situe l'ensemble de ses protéines. XPF et XPF sont alors recrutées par le complexe formé et permettent l'incision de chaque coté pour couper le brin endommagé. La polymérase resynthétise ensuite le brin manquant et la ligase suture le double brin nouvellement formé. Extrait de [Fri01].

[Rou10]. La REN chez les archées est aujourd'hui considérée comme étant similaire à celle des eucaryotes au regard des homologies entre les facteurs de réparation comme XPF et XPG, responsables de l'excision des nucléotides [Rob03]. Cette homologie a été observée chez la plupart des archées[4]. Il est cependant difficile de conclure sur l'analogie de la REN archéal avec la REN eucaryotique au niveau mécanistique pour

4. Certaines archées présentent un mécanisme de réparation identique à celui des bactéries, ce qui est probablement dû à un transfert de gènes récent entre les espèces [Whi03]

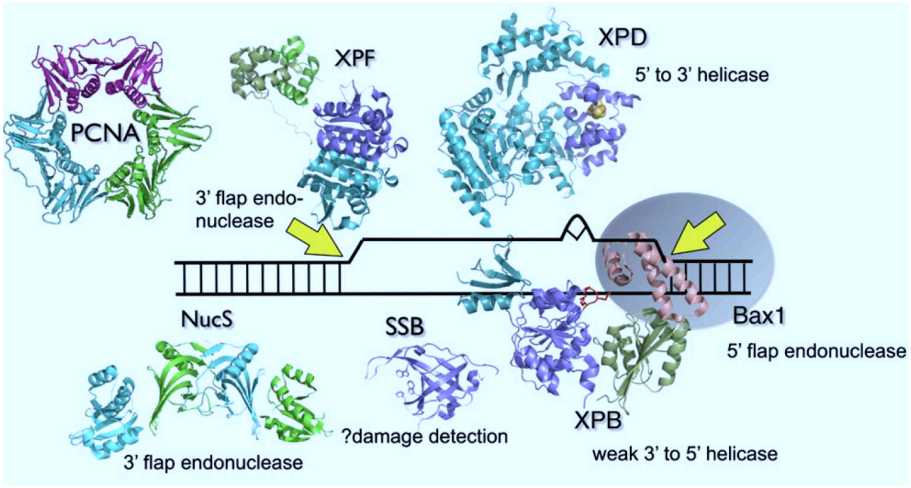


FIGURE 1.5.: Modèle de la réparation par excision de nucléotides chez les archées par analogie à la REN eucaryotique. XPB et XPD assurent la création d'un anneau de réparation et XPF clive le brin endommagé. D'autres protéines interviennent également dans la réparation telles que NucS récemment découverte qui agit ensemble avec PCNA. Extrait de [Rou10].

deux raisons [Rou10] :

- Aucun homologue aux protéines de détection des dommages comme XPA et XPC n'a été identifié chez les archées.
- Les protéines de la REN archéal peuvent avoir d'autres fonctions dans l'organisme comme le complexe TFIIH qui assure la transcription de l'ARN.

En considérant que la procédure de réparation est la même chez les différentes espèces et comprend les trois étapes précédemment décrites, **White et al.** ont essayé de reconstruire un schéma pour la REN comprenant les différents facteurs identifiés jusque là à partir de leurs fonctions (figure 1.5). Il ont ainsi inféré que XPB et XPD, qui possèdent une fonction hélicase, étaient responsables de l'ouverture de la double hélice et que XPF se chargeait du clivage à l'extrémité 3' grâce à sa fonction nucléase.

XPF et ses homologues (Mus81/Rad1/Hef)[5] ont fait l'objet de plusieurs études dans le but de reconstruire le mécanisme de réparation de l'ADN. C'est dans ce contexte qu'une nouvelle nucléase a été récemment caractérisée chez *Pyrococcus Abyssi* [Rob03, Nis02]. Elle est nommée **NucS** (pour **Nuc**léase **S**imple brin) et possède une forte affinité pour l'ADN simple brin et une structure différente de toutes les autres endonucléases impliquées dans la REN lui permettant la fixation et le clivage du simple brin dans les deux sens. NucS peut ainsi apporter de nouvelles données pour

5. Mus81 et Rad1 sont des homologues chez la levure et l'homme respectivement, et Hef chez les archées

la compréhension du mécanisme de réparation par excision de nucléotides chez les archées et permettrait d'interpréter l'absence des homologues de XPA qui est responsable de la détection des lésions chez les archées. Par ailleurs, les orthologues de NucS observés chez plusieurs bactéries dont *Mycobacterium tuberculosis* laissent entrevoir un nouveau rôle dans le mécanisme de réparation par excision de nucléotides [Ren09].

1.3. *Pyrococcus Abyssi* NucS : analyses structurales et biochimiques

NucS est une protéine capable du clivage des brins non appariés dans les structures branchées de l'ADN qui apparaissent par exemple dans l'anneau de réparation chez *Pyrococcus abyssi* (figure 1.5). Différentes archées comme *Pyrococcus* et *Sulfolobus* sont considérés comme des modèles pour étudier la REN puisqu'elles ne contiennent qu'un seul homologue à XPF, chargé du clivage des nucléotides. Des tests sur Hef (homologue chez *Pyrococcus furiosus*) ont cependant montré qu'elle était incapable de cliver les structures branchées de l'ADN. Ceci indique qu'un autre type de nucléases intervient dans la réparation et se charge de cette excision [Kom04]. C'est dans ce contexte que NucS a été identifiée. Etant donné que NucS appartient à la famille des RecB nucléases qui peuvent fixer et cliver l'ADN simple brin dans les structures branchées de l'ADN, elle se présente comme candidate pour cette fonction chez les archées.

1.3.1. Structure de NucS

Les analyses cristallographiques aux rayons X montrent que *Pyrococcus Abyssi* NucS possède deux sous-domaines reliés par une chaîne polypeptidique de longueur 2.8 nm (figure 1.6.A). Le domaine N-terminal a une structure en brin β formée par 8 feuillets et le domaine C-terminal une structure α/β comprenant 5 feuillets et 4 hélices. Ce dernier possède un site actif I avec une séquence conservée chez la famille des RecB-nucléases (figure 1.6.B & C). Ce site actif est responsable de la fixation sur l'ADN simple brin [Ren09]. Les deux sous-domaines de NucS sont assemblés de manière à former un dimère dont les 4 domaines sont arrangés dans l'ordre C1N2N1C2 (figure 1.6.D). La partie concave du dimère contient un deuxième site actif II de longueur 3.3 nm, de profondeur 0.9 nm et de largueur 1.3 nm susceptible de pouvoir accommoder de l'ADN simple brin puis le cliver. Des mesures de diffusion dynamique

de la lumière ont par ailleurs montré que NucS conservait sa structure dimérique en solution et prédisent un rayon hydrodynamique de 7.5 nm et une masse molaire de 60 kDa.

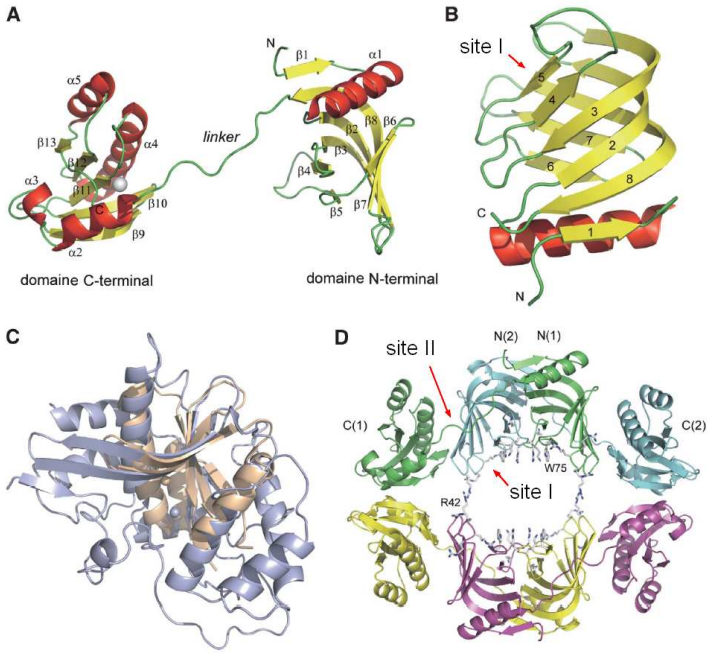


FIGURE 1.6.: Structure cristalline de *Pyrococcus Abyssi* NucS . A. Les deux domaines de chaque sous-unité ont la forme d'une haltère. B. Structure du domaine N-terminal avec le site actif I. C. Superposition de la structure de NucS avec celle de RecB (marron et bleu respectivement) montre une grande ressemblance. D. L'ensemble formé par le dimère et le tétramère de NucS dans le cristal. Extrait de [Ren09].

1.3.2. Activité de NucS

Des études d'activité de NucS sur les structures branchées appelées flaps (figure 1.7) ont été réalisées et ont permis de démontrer que cette protéine était une nouvelle endonucléase apte à cliver l'ADN simple brin du flap indépendamment de son orientation [Ren09]. Les principales caractéristiques identifiées peuvent être regroupées comme suit :



FIGURE 1.7.: Structure branchée de l'ADN avec un volet simple brin appelé flap.

- Le site actif I est nécessaire et suffisant pour une fixation spécifique sur l'ADN simple brin : des mesures de résonance des plasmons de surface ont montré que NucS interagit avec l'ADN simple brin fixé sur une surface par son extrémité 3' à des concentrations nanomolaires et ont abouti à un K_d=4 nM à 25 °C. Des expériences de retard sur gel à une température de 45°C ont confirmé ce résultat et ont indiqué la formation d'un complexe NucS/ADN avec une très forte affinité (K_d=150 nM) alors que des mutants dont le site actif a été invalidé n'ont montré aucune activité d'association [Ren09].
- Des profils de digestion ont montré une absence de clivage lorsque le flap est marqué avec une streptavidine à l'extrémité montrant que NucS avait besoin d'une extrémité libre pour être active (figure 1.8 A et B) et suggérant (i) qu'elle se charge à l'extrémité du simple brin dans les structures branchées ou (ii) qu'elle utilise l'extrémité libre pour son activité nucléase.
- NucS interagit avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), une protéine connue pour se lier à l'ADN double brin, améliorer la processivité des protéines sur l'ADN et pour stabiliser certains complexes ADN-protéine [Whi08, Cre12]. Cette dernière permet d'augmenter la spécificité du clivage du flap à la jonction entre l'ADN simple brin et double brin d'un facteur 5 (figure1.8.C).

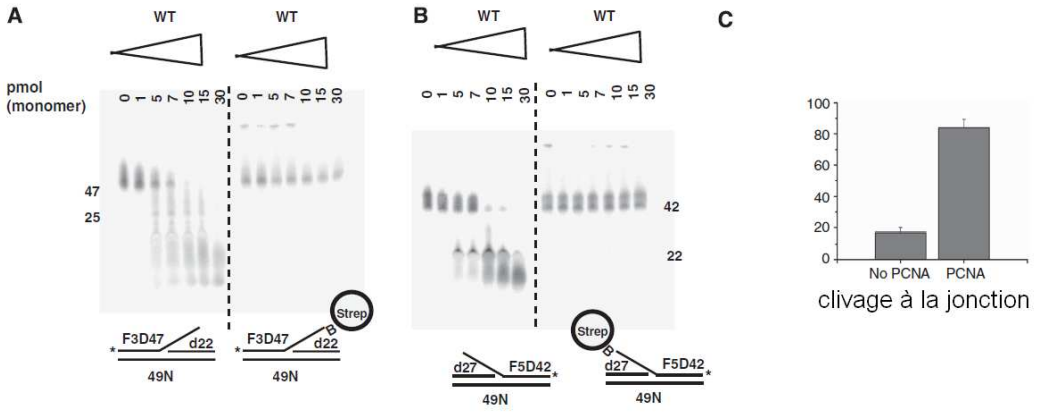


FIGURE 1.8.: Activité enzymatique de *Pyrococcus Abyssi* NucS. (A) et (B) Activité de NucS sur le flap 5' et 3' respectivement à 1 pmol dans 20 µl de solution. On trouve plusieurs fragments de différentes tailles ce qui indique un clivage. En revanche, lorsque le flap est attaché à une streptavidine, aucune activité de clivage n'est constatée (panneau de droite). (C) La PCNA augmente la spécificité du clivage d'un facteur 5.

1.3.3. Modèles d'interaction

A partir des mesures effectuées sur plusieurs endonucléases à flaps (Fen1, XPF), deux modèles d'interaction se sont établis dans la littérature (figure 1.9) : d'une part, certains auteurs émettent l'hypothèse que les endonucléases à flaps se chargent à l'extrémité, diffusent jusqu'à la jonction puis clivent le brin d'ADN à la jonction entre le simple brin et le double brin [Bam95, Liu04, Lya03]. Ce modèle est appelé modèle de localisation. D'autre part, des expériences récentes sur Fen1 ont permis de proposer à un autre modèle où la protéine se fixe directement à la jonction où elle courbe par la suite le simple brin pour l'enfiler par son extrémité libre et le cliver [Bam10]. Ce modèle est appelé modèle d'enfilement.

Indépendamment du chargement de la PCNA sur l'ADN, ces deux modèles sont compatibles avec les observations faites sur NucS :

- Selon le modèle de localisation, NucS se chargerait à l'extrémité du flap puis diffuserait et cliverait aléatoirement en absence de PCNA et spécifiquement à la jonction en sa présence.
- Selon le modèle d'enfilement, NucS se chargerait à la jonction par son site I et cliverait le flap en suite dans son site II en morceaux dans l'absence de PCNA et en entier en sa présence.

1.4. Avantage de l'observation de molécules uniques

Les mécanismes d'interaction des enzymes avec leurs substrats ont fait l'objet de nombreuses études et les différentes techniques biochimiques ont largement contribué à la compréhension des modes de fonctionnement de ces protéines [Sol88, Gow00, Lau98, Mic13]. Or, ces techniques comme la résonance des plasmons de surface ou le retard sur gel sont basées sur l'étude du comportement d'un ensemble de molécules qui ne peuvent pas être synchronisées, ce qui réduit considérablement l'accès à l'information dynamique [Min05]. Pour identifier le mécanisme d'interaction des protéines de façon directe, il est indispensable de mesurer quantitativement la dynamique d'interaction. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés aux techniques de molécules uniques pour résoudre le mode d'action de NucS avec son substrat d'ADN branché au regard de leurs nombreux avantages par rapport aux techniques classiques, et notamment (i) l'accès direct à la cinétique de l'interaction

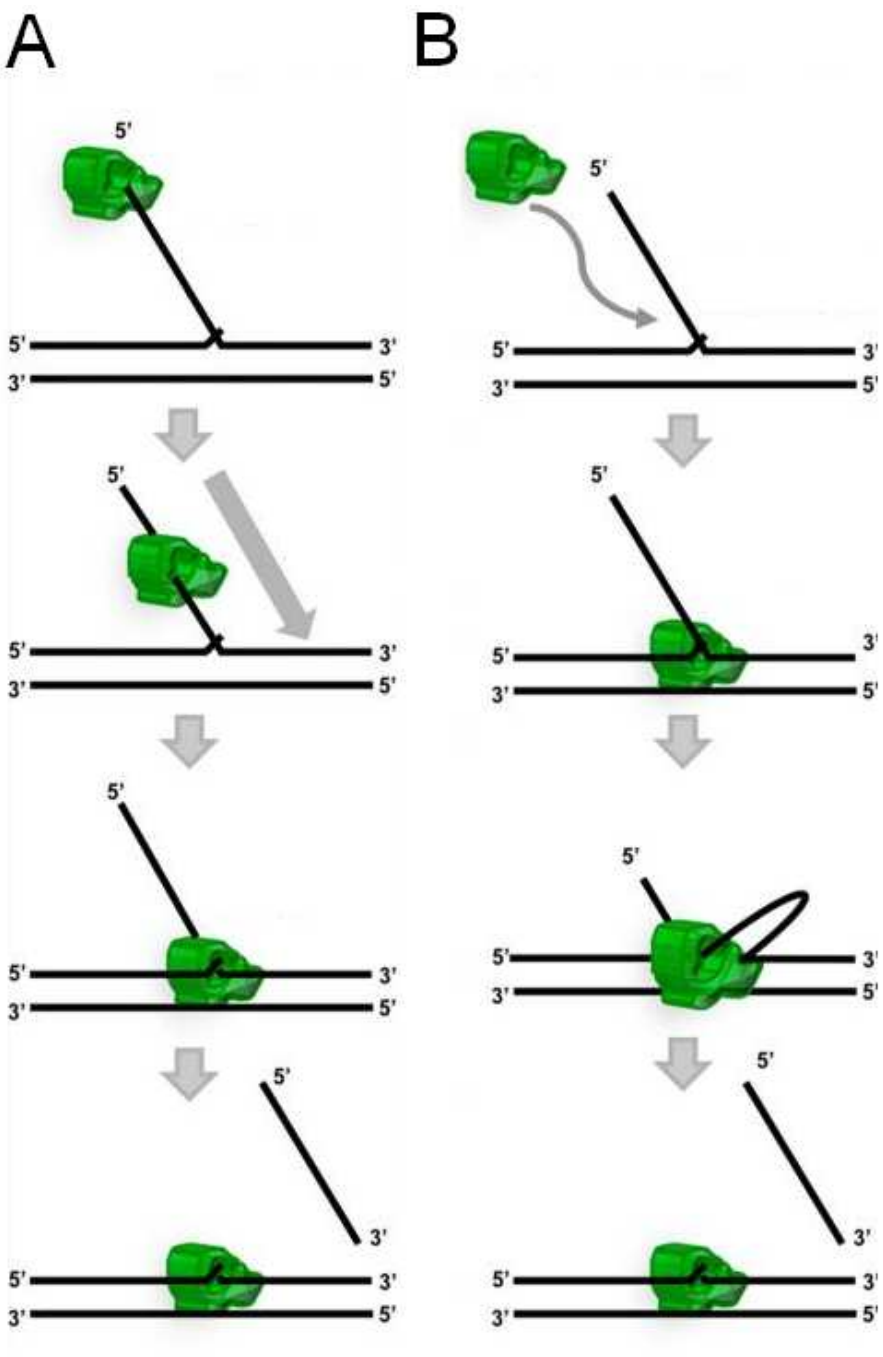


FIGURE 1.9.: Modèles d'interaction de la FEN1 avec les structures branchées d'ADN. A : modèle de localisation et B : modèle d'enfilement. D'après [Bam10].

par l'observation et (ii) la mesure directe des distributions des propriétés moléculaires plutôt que leur moyenne. Nous présenterons les différentes techniques et justifierons notre choix du suivi de molécules individuelles dans le chapitre suivant.

2. Étude de l'interaction des enzymes avec leurs substrats à l'échelle de la molécule unique

Alors que les méthodes biochimiques classiques fondées sur des mesures d'ensemble donnent des résultats moyennés sur la cinétique des réactions biochimiques, les expériences à l'échelle de la molécule unique offrent un moyen d'étudier le comportement individuel des molécules, les fluctuations stochastiques ainsi que l'éventuelle hétérogénéité des populations. Ces expériences permettent ainsi d'identifier les sous-populations et les étapes intermédiaires d'une réaction qui ne peuvent pas toujours être résolues dans les mesures d'ensemble. Il est également possible à travers les expériences de molécules uniques de déterminer avec précision les constantes d'association et de dissociation ainsi que les mouvements moléculaires (translationnel, rotationnel et vibrationnel) et les forces générées par ces molécules alors que les mesures biochimiques classiques se limitent le plus souvent à la mesure de constantes de dissociation K_d ou de vitesses des réactions macroscopiques [Hil10]. Parmi les molécules étudiées, on trouve une grande variété d'enzymes (endonucléases, hélicases, moteurs moléculaires...) ou d'acides nucléiques comme l'ADN ou l'ARN [Bie09,Har99,Kim07,Kus95, Wan06]. Par ailleurs, les techniques de molécules uniques permettent de pratiquer de l'imagerie ou de la nanomanipulation dans des conditions physiologiques *in vivo* ou *in vitro* et avec de grandes résolutions spatiales et temporelles [Bon08, Bla06, Ha99].

2.1. Cinétique chimique et mesures d'ensemble

2.1.1. Rappel sur la cinétique réactionnelle et équation de Michaelis-Menten

Le métabolisme cellulaire dépend de l'accomplissement des réactions biochimiques se produisant entre les différentes molécules à l'intérieur d'une cellule. Parmi ces réactions, on trouve celles qui sont catalysées par des protéines appelées enzymes. Ces

dernières interagissent spécifiquement avec leurs substrats pour donner efficacement un produit. Le modèle élémentaire de ce type de réaction a été proposé par Michaelis et Menten en 1913 et est décrit par le schéma suivant [Mur02, Mic13] :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{2.1}$$

où E, S et P représentent respectivement l'enzyme, le substrat et le produit. Les constantes k_1, k_{-1} et k_2 décrivent les taux des demi réactions associées à la réaction (2.1). Ici, l'interaction de l'enzyme avec le substrat conduit à la formation d'un complexe enzyme-substrat ES qui donne naissance au produit P avec un taux k_2. Pour étudier la cinétique de cette réaction, notons par $e = [E]$, $s = [S]$, $c = [ES]$ et $p = [P]$ les concentrations des réactants. En considérant que le taux d'une réaction est proportionnel au produit des concentrations des réactants, on obtient l'ensemble des équations différentielles suivantes :

$$\frac{ds}{dt} = -k_1 \cdot es + k_{-1} \cdot c\,, \quad \frac{de}{dt} = -k_1 \cdot es + (k_{-1} + k_2) \cdot c \tag{2.2}$$

$$\frac{dc}{dt} = k_1 \cdot es - (k_{-1} + k_2) \cdot c\,, \quad \frac{dp}{dt} = k_2 \cdot c \tag{2.3}$$

Avec les conditions initiales suivantes $s(0) = s_0$, $e(0) = e_0$, $p(0) = 0$ et $c(0) = 0$, on obtient :

$$\frac{dp}{dt} = v = \frac{V_{max} \cdot s}{K_m + s} \tag{2.4}$$

où $V_{max} = e_0 k_2$ et $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$. K_m est appelée constante de Michaelis. Elle est spécifique à chaque enzyme et représente la concentration (en mol/l) en substrat pour laquelle la vitesse de production de P est égale à la moitié de la vitesse maximale $V_{max}/2$ (figure 2.1). Elle donne une idée sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat et peut varier entre 10^{-2} et 10^{-9}. Dans des conditions non catalytiques (k_2=0), le complexe ES se dissocie sans modification du substrat. La réaction biochimique se réduit alors à une association puis dissociation des réactifs.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \tag{2.5}$$

La constante de Michaelis devient alors égale au rapport du taux de dissociation k_{-1} et d'association k_1. Elle est alors appelé constante de dissociation K_d.

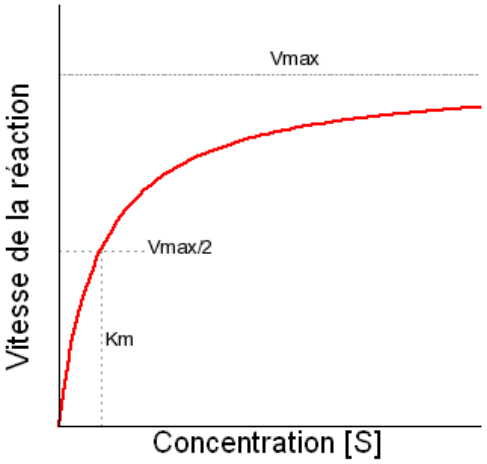


FIGURE 2.1.: Vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat.

2.1.2. Techniques de mesure de la cinétique réactionnelle et des constantes de dissociation

Méthode immuno-enzymatique ELISA

L'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est une technique de dosage qui permet la détermination des constantes de dissociation et est largement utilisée pour l'étude des interactions des anticorps avec leurs antigènes [Oro02]. Pour ce faire, l'antigène est immobilisé à la surface de plusieurs puits d'une plaque de microtitration. Les puits sont alors couverts avec une solution contenant les anticorps à doser avec une concentration différente pour chaque puits. Les puits sont ensuite rincés pour éliminer les anticorps non liés et des anticorps secondaires couplés à une enzyme sont introduits et vont se fixer sur les anticorps primaires. Après rinçage des puits une deuxième fois pour éliminer les anticorps secondaires non liés, un substrat est introduit dans la solution. Ce dernier va réagir avec l'enzyme provoquant un signal chromogène ou fluorescent qui peut être quantifié pour estimer la quantité des anticorps primaires accrochés à leurs antigènes et en déduire la constante de dissociation. Il est également possible de doser l'antigène en couplant l'enzyme directement à l'anticorps.

Parmi les méthodes de calcul du K_d on trouve la méthode de **Liliom et al.** qui consiste à doser l'antigène avec l'anticorps et de suivre la courbe de saturation en fonction de la concentration de l'anticorps (figure 2.2.A). Cette courbe est ensuite linéarisée [1] pour extraire la constante de dissociation (figure 2.2.A).

1. L'équation de linéarisation de **Liliom et al.** est définie comme suit $1/(1-i) = (Ab/i)/(K_d/p)-$

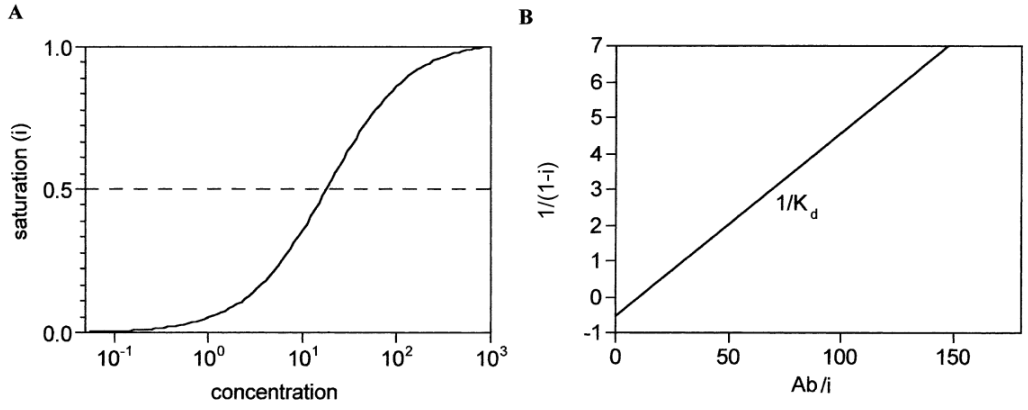


FIGURE 2.2.: Détermination de la constante de dissociation à partir d'un test ELISA. A. Saturation de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en anticorps. B. Linéarisation de A pour extraire la constante de dissociation.

Étant une technique de dosage, l'ELISA se fonde sur l'observation de l'état d'une réaction à l'équilibre. Elle est apte à déterminer la constante de dissociation mais elle ne permet pas de résoudre la cinétique d'association ou de dissociation d'un complexe pour lesquelles d'autres techniques sont nécessaires.

Résonance de plasmons de surface

La technique de résonance des plasmons de surface utilise le phénomène de résonance des plasmons de surface à l'interface entre un milieu diélectrique et un métal pour mesurer à partir de la variation de l'indice de réfraction la cinétique d'une réaction chimique [Sip10]. Les plasmons de surface sont des oscillations à l'interface entre deux milieux possédant des constantes diélectriques différentes et qui se propagent avec une amplitude exponentiellement décroissante le long de l'interface lorsqu'ils sont excités par des rayons totalement réfléchis (figure 2.3.A) [Hom99]. Lorsque les plasmons de surface sont excités, tout changement de l'indice de réfraction dans le milieu diélectrique provoque un changement dans la propagation des plasmons de surfaces ce qui se traduit par une variation des propriétés du rayon réfléchi (longueur d'onde, angle, intensité et phase) (figure 2.3.B) [Sip10]. Chacune de ses propriétés peut alors être caractérisée pour étudier la cinétique d'une réaction. Expérimentalement, la couche métallique est couverte d'un des réactants appelé également récepteur

fqS_{Ag}/K_d, avec i, le niveau de saturation, Ab la concentration de l'anticorps, S_{Ag} la concentration surfacique en antigène et f un coefficient qui permet de traduire des concentration surfaciques en concentrations volumiques. p et q représentent le nombre d'épitopes par antigène et le nombre d'épitopes bloqués par anticorps.

et l'indice de réfraction est mesuré à partir des propriétés du faisceau réfléchi. Par la suite, le deuxième réactant appelé ligand est introduit dans la solution et sa fixation sur le premier crée un changement de l'indice de réfraction (figure 2.3. C & D) qui dépend de l'affinité du ligand pour le récepteur et l'analyse de la courbe de saturation du signal (angle, intensité, longueur d'onde) permet de calculer la constante de dissociation.

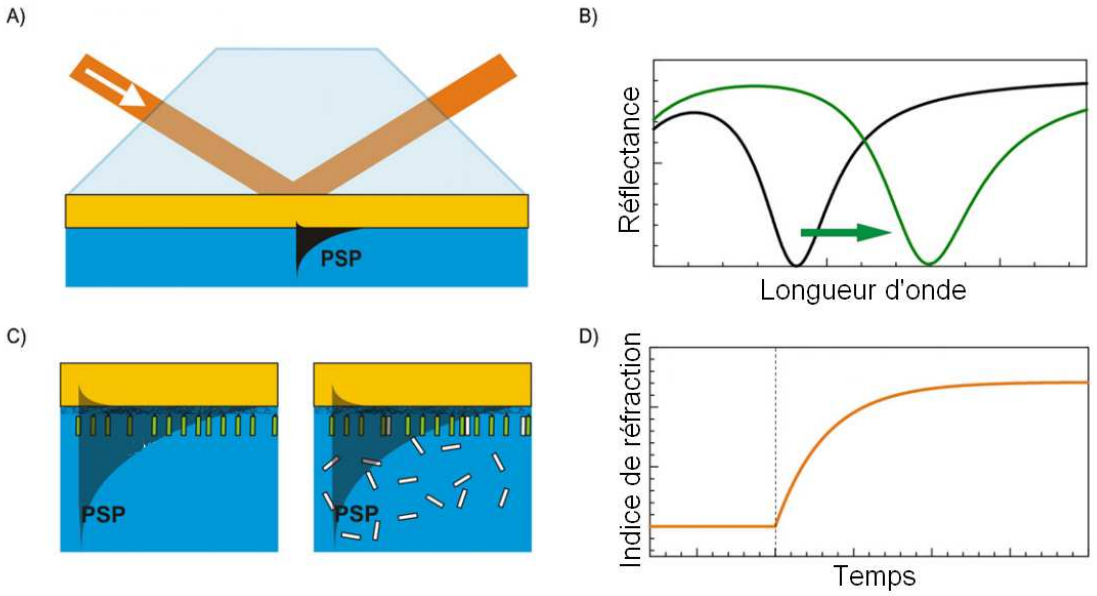


FIGURE 2.3.: Principe de la résonance des plasmons de surface. A. Excitation des plasmons de surface. B. Spectre de la lumière réfléchie avec un minimum dû à l'excitation des plasmons de surface. La variation du minimum (en vert) est alors suivie et permet de déterminer la variation de l'indice de réfraction. C. Fixation des récepteurs à la surface du senseur. D. Changement de l'indice de réfraction en fonction du temps causé par l'interaction du ligand avec son récepteur. PSP : Plasmon Surface Polariton.

La technique de résonance de plasmons de surface permet de suivre la cinétique de réaction des biomolécules en fonction du temps jusqu'à un K_d de 400 pM [Sip10]. Parmi ses avantages, nous citons la possibilité d'automatisation et l'utilisation de petits volumes dans les microcanaux. Son principal inconvénient réside en revanche dans la nécessité d'attendre la saturation de la réaction pour déterminer précisément les constantes de dissociation. Par ailleurs, la mesure des taux d'association et de dissociation est indirecte et nécessite l'application de modèles de cinétique réactionnelle.

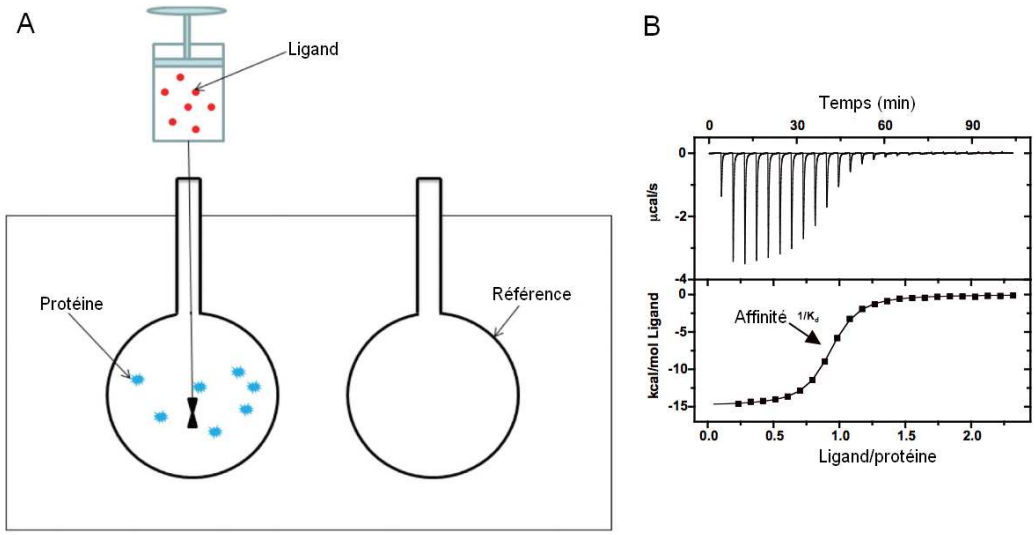


FIGURE 2.4.: Principe de l'ITC. A. Le ligand est pipeté dans une solution contenant son récepteur et la chaleur induite par leur réaction est mesurée. B. L'analyse des courbes de titration permet alors d'extraire la constante de dissociation. Extrait de [Zho11]

.

Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme est une méthode thermodynamique qui permet l'étude de la cinétique réactionnelle. En mesurant la quantité de chaleur produite par une réaction chimique, la titration calorimétrique permet de déterminer l'énergie libre, l'enthalpie et l'entropie d'une réaction biochimique. Son principe est présenté dans la figure 2.4. Lorsqu'on introduit une petite quantité de ligands dans une solution de récepteur, une réaction entre les deux a lieu. Celle-ci peut être exothermique ou endothermique. En mesurant la quantité de chaleur nécessaire pour conserver le système à température constante, on peut extraire plusieurs informations sur la nature de la réaction, la stoechiométrie ou la constante de dissociation.

Spectroscopie de corrélation (croisée) de fluorescence SCF et SCCF

Fondées sur l'analyse des fluctuations du signal de fluorescence, la SCF et la SCCF permettent également d'étudier la cinétique d'une réaction (figure 2.5). En calculant la fonction d'autocorrélation ou de corrélation croisée de fluorescence à faible concentration (typiquement nanomolaire), ces méthodes déterminent les coefficients de diffusion et la concentration des différents réactifs. Ceci permet d'estimer le ratio entre complexes formés et réactifs libres en fonction du temps et donc d'extraire K_d.

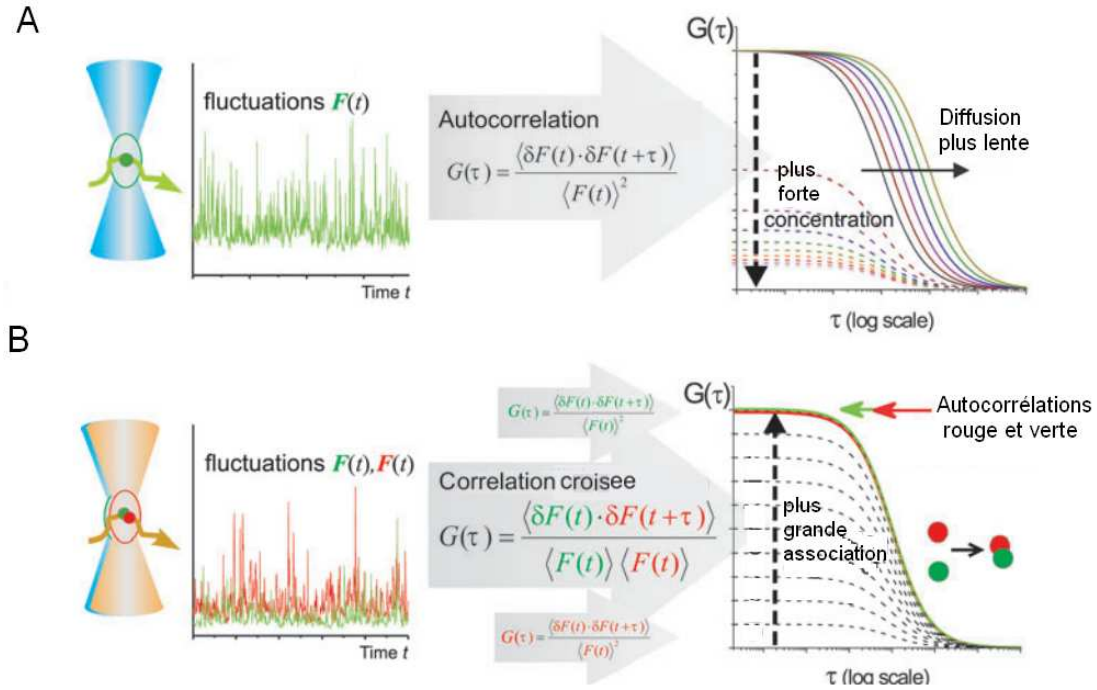


FIGURE 2.5.: A. Spectroscopie de corrélation de fluorescence. B. Spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence, d'après [Sch99].

.

L'inconvénient de la SCF réside dans l'utilisation d'une seule couleur ce qui limite l'étude de la cinétique aux cas où le changement induit par la réaction du coefficient de diffusion est significatif. La SCCF s'affranchit de cette limitation en marquant les deux réactants et permet donc d'étudier la cinétique d'une interaction quelle que soit la taille des réactifs en mesurant la diffusion du complexe. Ces deux techniques sont toutefois limitées à l'étude des systèmes biologiques à forte affinité (typiquement nanomolaire) puisqu'elles nécessitent des concentrations en réactifs de l'ordre du K_d [Sch99].

Il existe plusieurs autres méthodes d'usage moins fréquent qui permettent de mesurer l'affinité d'un ligand pour son récepteur parmi lesquelles l'ultracentrifugation, la résonance magnétique nucléaire ou le 'stopped flow' qui consiste à mélanger rapidement dans un système microfluidique les réactifs pour mesurer la cinétique des réactions rapides à l'aide de la spectroscopie ou de la résonance des plasmons de surface. Dans la plupart de ces techniques, la constante de dissociation est déterminée par une variation des concentrations des réactants et l'accès aux taux d'association et de dissociation se fait de manière indirecte à travers un modèle de réaction, ce qui peut fortement limiter leur précision surtout pour les cinétiques complexes qui

ne peuvent être résolues qu'avec une observation directe des actes élémentaires de l'interaction. Un tableau comparatif des différentes techniques avec leurs avantages et inconvénients est donné dans la suite (tableau 2.1).

Méthode	signal	Information	Avantages	Inconvénients
Spectroscopie Stopped flow	Absorption Emission	K_d k_1, k_{-1}	en solution rapide	calibration nécessaire
Calorimetrie	Chaleur	K_d $\Delta H, \Delta S$	Energie pas de marquage	grand volume[1]
Résonance des plasmon de surface	Indice de réfraction	K_d k_1, k_{-2}	petit volume[2] automatisé	couplé à la surface
Ultracentrifugeuse	Absorbance	K_d	interactions homomériques[3]	lent
Résonance magnétique nucléaire	Décalage de la fréquence	K_d	information structurale	lent, grand volume
Tests d'affinité	Électrophorèse Radioactivité	K_d	standardisé	précision
SCF, SCCF	Fluorescence	K_d D	en solution	forte affinité

[1] ($\sim 200\mu l$), [6]
[2] ($\sim 1\mathrm{n}l$), [Gas12]
[3] Ce sont des interactions entre une même protéine.

TABLE 2.1.: Avantages et inconvénients des techniques de mesure d'affinité.

2.2. Cinétique chimique à l'échelle de la molécule unique

Comparée aux techniques de mesures d'ensemble précédemment décrites, l'étude des interactions biochimiques à l'échelle de la molécule unique est susceptible d'apporter trois types d'informations supplémentaires qui ne peuvent pas être résolues par des mesures d'ensemble.

- La variabilité intermoléculaire. En traçant les distributions des propriétés des molécules (temps de résidence, coefficient de diffusion, etc...), on peut directement identifier les sous populations et caractériser ainsi le désordre statique. Il est également possible de distinguer des fluctuations dynamiques comme des fluctuations de vitesses de réaction d'une enzyme au cours du temps [Lu98].
- L'observation directe et le suivi en temps réel du déroulement d'une réaction biochimique. Cette information est importante car elle permet d'identifier et de

suivre les étapes intermédiaires, des changements conformationnels ainsi que des mouvements moléculaires rotationnels et translationnels en temps réel [Har99, Mac96, Wan06]. Par ailleurs, l'observation de molécules uniques permet de découpler les cinétiques d'association et de dissociation et de mesurer avec une grande précision chacune des constantes pour reconstruire le chemin réactionnel.

– La dynamique réactionnelle. Il est par exemple possible, en exploitant les aspects spatiaux, proposer des modèles physiques (diffusion, confinement, accélération) décrivant cette réaction et qui permettent de mieux comprendre la relation entre la structure et l'activité d'une protéine. **Yildiz et al.** ont par exemple pu identifier la nature du mouvement de la kinésine en pas à pas sur les microtubules à l'aide de l'analyse de sa trajectoire [Yil04].

Considérons une réaction simple d'association et de dissociation d'un complexe Enzyme-Substrat où nous pouvons détecter l'interaction grâce à un signal de fluorescence * :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES^* \tag{2.6}$$

Le suivi du signal de fluorescence permet alors d'identifier pour chaque molécule tous les événements d'association et de dissociation puis de déterminer leur durées respectives τ_1 et τ_{-1} (figure 2.6) et par conséquent de mettre en évidence l'aspect dynamique de l'équilibre de la réaction.

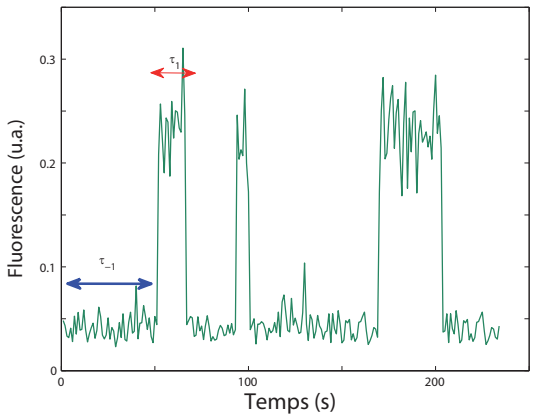


FIGURE 2.6.: Suivi d'une cinétique d'association et de dissociation à l'échelle de la molécule unique.

En traçant la distribution des temps τ_1 et τ_{-1}, il devient alors non seulement possible de calculer séparément la vitesse d'association et de dissociation pour en déduire la constante de réaction mais aussi d'identifier les étapes limitantes de chaque demi-

équation. Dans le cas d'un phénomène d'association ou de dissociation en une étape (équation 2.6), la distribution des temps τ_1 et τ_{-1} est exponentiellemet décroissante (figure 2.7). Ceci est par exemple le cas d'un système purement diffusif où l'association d'une enzyme sur son substrat est limitée uniquement par la diffusion ou bien le cas d'un système où l'enzyme est piégée dans un puits de potentiel avec une barrière constante qui lui permet de s'échapper avec un taux déterminé par la valeur de cette barrière [Hag10]. Considérons maintenant une réaction en deux étapes :

$$E + S \xrightarrow{k_1} I \xrightarrow{k_2} ES \tag{2.7}$$

où I représente un état intermédiaire et k_1 et k_2 les taux de la réaction. Ici, la distribution des temps entre l'état E et l'état ES suit une croissance puis une décroissance exponentielles et possède une probabilité maximale pour $\tau \neq 0$ (figure 2.7). Ceci est par exemple le cas d'une enzyme dont l'association est limitée par la diffusion et par l'activation du site de liaison. La densité de probabilité est alors donnée par [Lu98] :

$$F(\tau) = \frac{k_1 k_2}{k_1 - k_2}(e^{-k_2\tau} - e^{-k_1\tau}) \tag{2.8}$$

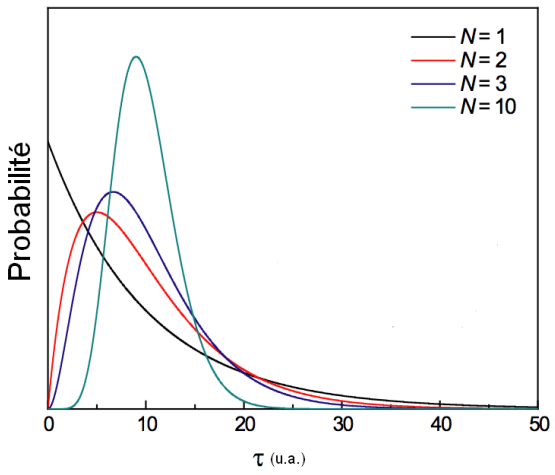


FIGURE 2.7.: La distribution des temps d'interaction en fonction du nombre d'étapes qui limitent l'interaction. [Flo10].

qui décrit le système classique à deux étapes avec deux taux différents et permet donc d'extraire les constantes cinétiques de chaque réaction [Flo10]. Dans le cas plus général d'une interaction à n étapes identiques, la distribution des temps d'interaction est donnée par :

$$F(\tau) = \frac{k^n \tau^{n-1}}{(n-1)!} e^{-k\tau} \tag{2.9}$$

et F suit alors une loi Gamma de paramètre k et n. Dans la figure (2.7), on remarque qu'il est très important de résoudre la cinétique réactionnelle aux temps courts pour pouvoir distinguer les différentes étapes intermédiaires. En utilisant des techniques de mesure d'ensemble, ceci n'est possible qu'avec des méthodes de synchronisation. En utilisant les techniques d'observation de molécules uniques en revanche, chaque événement est identifié séparément ce qui permet de s'affranchir de la synchronisation en découplant la cinétique d'association et de dissociation. Ce découplage permet ainsi d'étudier chaque cinétique indépendamment l'une de l'autre et d'identifier directement les étapes intermédiaires éventuelles.

La simple mesure du temps d'interaction permet ainsi d'extraire plusieurs informations sur la nature de celle-ci. D'une part, il est possible de déterminer, à partir des distributions des temps d'interaction, les taux des réactions avec une grande précision ainsi que le mécanisme de la réaction ce qui aide à identifier les facteurs extérieurs qui y participent (interaction protéine-protéine, hydrolyse d'ATP, changement conformationnel, etc...). D'autre part, l'analyse des distributions permet d'identifier le mécanisme de l'interaction entre l'enzyme et son substrat le cas échéant.

2.3. Mécanique de l'interaction

Outre la résolution de la cinétique réactionnelle, les techniques d'imagerie de molécules uniques ont la capacité de suivre le mouvement d'une enzyme sur son substrat en temps réel et avec une résolution spatiale de quelques nanomètres seulement. L'étude de la trajectoire rotationnelle et/ou translationnelle d'une enzyme unique peut alors donner accès aux aspects mécanistiques de l'interaction avec le substrat. On peut citer par exemple la rotation de l'enzyme F_1-ATPase de 90 ° due à la fixation de l'ATP suivie d'une rotation de 30 ° provoquée par son hydrolyse ou bien la rotation de l'ADN causée par l'ARN-polymerase pendant la transcription [Yas01, Har01]. On peut également citer la translocation de l'helicase RecBCD sur l'ADN ou bien le mouvement dirigé de la myosine sur l'actine [Doh01, Yil03]. La recherche d'une cible par une enzyme par diffusion a également été étudiée. La diffusion unidimensionnelle des protéines Mlh1Pms1 et Msh2Msh6 sur des brins l'ADN peignés révèle deux mécanismes [Gor10] : le glissement et le sautillement le long de l'ADN. La diffusion des

protéines dans la membrane de la cellule a aussi été étudiée et **Masson et al.** ont par exemple révélé un mouvement diffusif bidimensionnel et confiné dans des domaines précis [Sch97, Mas09].

2.4. Manipulation et suivi de molécules individuelles

L'observation *in vitro* de l'interaction de molécules uniques nécessite souvent leur préalable micromanipulation, contrairement aux mesures d'ensemble où le mélange des réactants dans une même solution suffit souvent pour mesurer une quantité macroscopique. Pour faciliter la détection et la localisation de molécules uniques, on trouve d'une part des méthodes de manipulation proprement dite telles que les pinces optiques ou magnétiques qui permettent de fixer ou de déplacer des objets individuels comme des microbilles auxquelles sont attachées les molécules d'intérêt. Elles sont également appropriées pour mesurer des forces générées par l'enzyme lors de son interaction avec son substrat. D'autre part, on trouve différents traitements de surface où l'un des réactants est fixé à la surface pour faciliter le suivi de l'interaction.

2.4.1. Pinces optiques et magnétiques

Les pinces optiques sont très répandues en biologie où elles constituent un outil puissant pour manipuler des objets diélectriques de taille micrométrique (cellules, organites, microbilles). Les pinces optiques permettent d'attraper des objets dans un écoulement, de les déplacer ou de mesurer les forces qu'exercent les molécules qui y sont attachées lorsqu'elles interagissent avec un substrat. Le piégeage nécessite l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique et se produit dans le gradient d'intensité qui pousse l'objet au centre du volume focal grâce à la force générée par la réfraction d'un faisceau fortement focalisé. **Wang et al.** ont par exemple déterminé l'élasticité de l'ADN grâce à une pince optique. Pour ce faire, ils ont accroché un bout de l'ADN à la surface de verre et piégé une microbille fixée à l'autre extrémité grâce à une pince optique [Wan97]. Ainsi, en variant la position du point focal les forces générées par l'étirement de l'ADN ont été calculées. **Husson et al.** ont déterminé la force générée par des microtubules durant leur croissance [Hus09]. Par ailleurs, **Neuman et al** ont mesuré les forces générées par l'ADN polymérase sur une molécules d'ADN fixée par son extrémité à la surface pendant la transcription [Neu08] (figure

2.8.a).

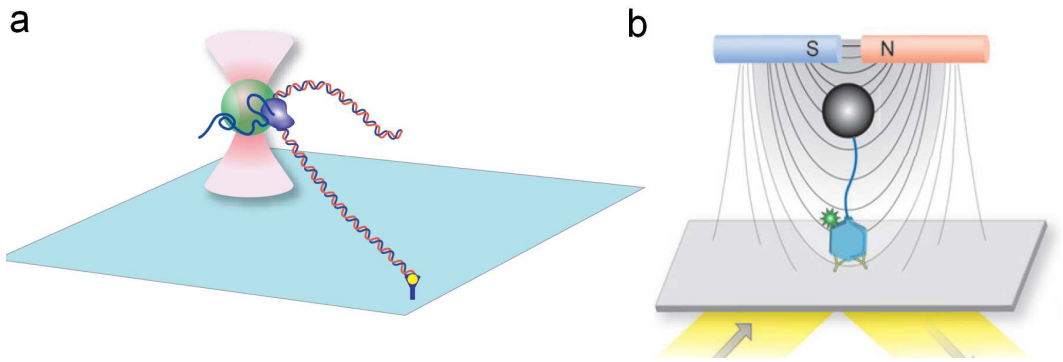


FIGURE 2.8.: (a) L' ARN polymérase est piégée dans une pince optique et l'extrémité de l'ADN fixée à la surface. Pendant la transcription, la polymérase avance sur l'ADN et ce dernier est alors tiré vers le point focal. En suivant cette force avec la table du microscope les longueurs de transcription et les forces générées peuvent être calculées [Neu08]. (b) Rotation du bactériophage $\phi 29$ autour de l'ADN déterminée à l'aide d'une pince magnétique [Hug07].

Pour étudier la cinétique d'une interaction entre biomolécules, il est également possible d'utiliser les pinces optiques. **Kleinmann et al.** ont par exemple étudié la variation de la cinétique d'associaiton de la triostine sur l'ADN double brin en fonction de la force appliquée pour l'étirer et ont pu déduire que le nombre de sites de liaison entre la protéine et l'ADN décroît exponentiellement avec la force exercée pour atteindre deux nucléotides [Kle09]. Le principal inconvénient de cette application se trouve dans le nombre limité de molécules individuelles observées simultanément, puisque les pinces optiques sont généralement utilisées pour maintenir une seule molécule d'ADN. Dans le cas d'une cinétique d'association ou de dissociation rapide, il est possible d'observer plusieurs événements d'interactions sur un seul ADN. Il est toutefois préférable d'observer plusieurs substrats à la fois pour avoir une statistique suffisante.

Les pinces magnétiques génèrent des forces du même ordre de grandeur que les pinces optiques (0.1-100 pN), et ont été utilisées pour détecter des mouvements rotationnels. L'échantillon à étudier est accroché à une microbille magnétique qui sert de sonde pour exercer et mesurer des forces générées par le mouvement d'une enzyme. A titre d'exemple, **Smith et al.** ont déterminé la raideur de l'ADN, afin mieux comprendre les mécanismes de réplication ou de transcription où la molécule d'ADN subit des déformations. L'expérience consistait à accrocher l'ADN d'un coté à la surface du verre et de l'autre coté à une bille magnétique qui est déplacée pour le tordre . **Smith et**

al. ont ainsi estimé la dépendance de la longueur de persistance de l'ADN avec le sel et ont déduit une longueur de persistance typique de 50 nm pour une concentration saline de 10 mM [Smi92]. **Hugel et al.** ont étudié la rotation d'un moteur moléculaire du bactériophage ϕ29 et ont déterminé une fréquence de rotation de 1-2 Hz autour de l'ADN [Hug07] (figure 2.8.b). En accrochant une microbille magnétique à l'extrémité de l'ADN pour le tordre, **Allemand et al.** ont mis en évidence l'existence d'une structure d'ADN (ADN-P) où les bases azotées sont exposées à l'extérieur de la double hélice lorsque celle ci est soumise à une torsion [Str96, All98]. **Bigot et al.** ont d'autre part mis en évidence un chargement orienté de la translocase FtsK [2] sur l'ADN en présence de séquences asymétriques appelées KOPS. En utilisant un montage de pince magnétique pour étirer l'ADN, les auteurs ont également montré que la translocase FtsK formait les boucles d'ADN préférentiellement en aval des séquences KOPS [Big06].

Comme les pinces optiques, les pinces magnétiques possèdent l'inconvénient de manipuler un petit nombre de molécules à la fois. Ces deux techniques sont très performantes pour caractériser des forces appliquées par une enzyme sur son substrat ou son mouvement intramoléculaire. L'étude de la cinétique réactionnelle est toutefois délicate en raison de la difficulté de paralléliser l'expérience pour observer une ou plusieurs centaines d'interactions en parallèle. Les techniques de microscopie plein champ avec un accrochage de nombreuses cibles sur une surface peuvent être avantageuses.

2.4.2. Accrochage à une surface

Les méthodes d'accrochage à une surface offrent deux avantages principaux. D'une part, elles sont techniquement simples à mettre en place, au sens qu'elles peuvent être implémentées sur tout type de microscope et d'autre part elles permettent l'observation de plusieurs interactions moléculaires non synchronisées à la fois et facilitent ainsi l'analyse statistique des données. Deux techniques principales utilisent les molécules accrochées à la surface : le suivi de molécules fluorescentes et le transfert d'énergie entre molécules individuelles fluorescentes smFRET (voir section 3.5.1). Le principal avantage du smFRET réside dans la résolution spatiale de quelques Å seulement [Cos04, Roy08]. Il est alors possible d'observer des changements conformationnels d'une enzyme au cours de son interaction avec son substrat, de mesurer pré-

2. Filamenting temperature-sensitive mutant K

cisément sa cinétique d'association ou de dissociation, ou même d'observer son déplacement sur son substrat avec une résolution temporelle de quelques dizaines de millisecondes [Roy08]. **Ditzler et al.** ont par exemple étudié l'activité des ribozymes en hairpin et ont pu caractériser les différents états intermédiaires de la réaction puis reconstruire leur mécanisme d'interaction [Die07]. L'observation de plusieurs interactions à la fois permet ici de quantifier les hétérogénéités dans le système et de mesurer précisément la cinétique de chaque étape de la réaction. Bien que la forte dépendance du signal de FRET avec la distance entre les fluorophores soit un atout qui permet une forte résolution spatiale, le transfert d'énergie est limité à une distance entre 2 et 8 nm en dehors de laquelle il devient difficile de détecter un signal dans un régime de détection de molécules individuelles [Roy08]. Le bon positionnement du fluorophore dans la molécule d'intérêt est donc essentiel pour garantir un accès à l'information du FRET. Ceci peut s'avérer délicat en pratique et nécessite généralement des données structurales détaillées. Par exemple, dans notre étude de l'interaction de NucS avec son substrat d'ADN branché, il aurait fallu marquer le flap d'ADN avec un fluorophore à la jonction entre le double brin et le simple brin pour garantir un signal de FRET optimal, ce qui est difficile et peut impliquer une modification de la cinétique réactionnelle. Nous avons par conséquent choisi d'utiliser la technique de suivi de particules individuelles fluorescentes pour caractériser l'interaction à l'échelle de la molécule unique. Nous détaillerons les méthodes utilisées dans le chapitre 3 et présentons les différentes techniques d'accrochage des molécules à une surface dans la suite.

Trois approches principales ont été utilisées jusqu'à présent pour fixer un substrat d'intérêt spécifiquement sur une surface de verre tout en minimisant le bruit de fond dû à l'adsorption de molécules sur celui-ci [Ras06] : les fonctionnalisations type BSA, PEG et la microencapsulation.

Fonctionnalisation type BSA

Cette fonctionnalisation consiste à accrocher sur la surface de verre de la BSA (*Bovine serum albumin*) qui inhibe les interactions non spécifiques entre les molécules biologiques et empêche leur adsorption à la surface de verre. Afin d'attacher les substrats à étudier spécifiquement, BSA peut être conjuguée avec une biotine grâce à une réticulation et la forte affinité de la biotine à la streptavidine ($K_a = 10^{14} M^{-1}$) assure l'accrochage des différentes biomolécules couplées à la biotine (figure 2.9.a). Cette

fonctionnalisation est particulièrement adaptée pour l'étude de l'ADN ou l'ARN car ces derniers sont chargés négativement à pH neutre, tout comme la BSA et le verre, ce qui assure ainsi une fixation spécifique [Rus02, Zhu02]. L'étude des protéines dont les sites actifs sont chargés positivement est alors plus difficile puisqu'elles ont tendance à s'accrocher électrostatiquement à la surface. Nous avons choisi de travailler avec ce type de fonctionnalisation particulièrement simple comme nous le détaillerons dans le chapitre suivant.

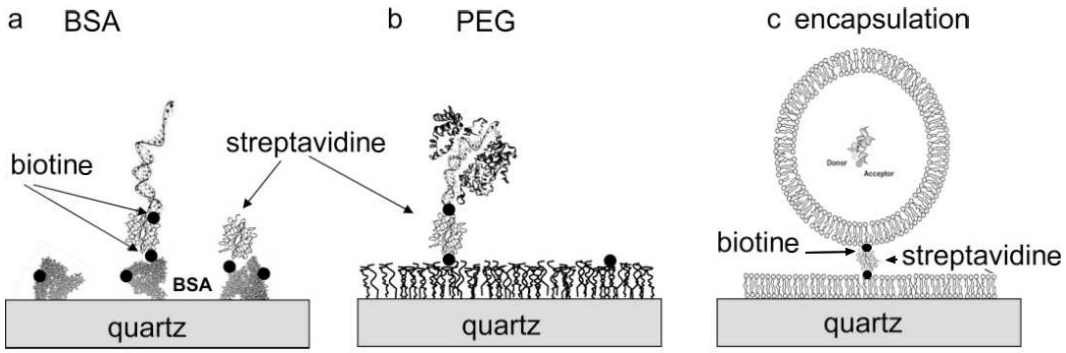


FIGURE 2.9.: Méthodes de traitement de surface. (a) Fonctionnalisation type BSA. (b) Fonctionnalisation type PEG. (c) Microencapsulation.

Fonctionnalisation type PEG

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère biocompatible neutre qui n'interagit pas avec les protéines. Son avantage par rapport à la BSA consiste en sa longueur et sa densité de greffage qui peuvent permettre d'éviter l'adsorption des biomolécules à la surface de verre [Har92]. Son immobilisation à la surface doit être précédée par une silanisation avec l'APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane) par exemple. L'accrochage des substrats se fait en utilisant un mélange de PEG et de PEG biotinylé. Ces derniers se fixent sur le groupe amine de l'APTES et on peut alors accrocher l'ADN ou tout autre type de substrat contenant une streptavidine (figure 2.9.b). La fonctionnalisation type PEG peut s'avérer mieux adaptée pour l'étude de certaines protéines et garantit un bruit de fond très faible ainsi qu'une surface sans adsorptions non désirables [Hey04, Mcn07].

Microencapsulation dans des vésicules

En 2001, **Boukobza et al.** ont présenté une méthode alternative d'accrochage à la surface qui permet d'éviter le contact direct des biomolécules avec la surface et empêche ainsi toute interaction non spécifique avec celle-ci [Bou01]. Cette approche consiste à encapsuler les molécules d'intérêt dans une vésicule lipidique d'une taille d'environ 100 nm fixée sur une couche lipidique sur la surface grâce à une liaison biotine-streptavidine-biotine. Les particules à l'intérieur se comportent comme dans un milieu ordinaire et leur mouvement est limité par la diffusion, reproduisant ainsi un système physiologique à l'intérieur de la vésicule. Cette approche est pertinente pour la détection de changements conformationnels ou pour l'étude du repliement des protéines et peut être combinée avec la spectroscopie comme avec la microscopie [Bou01]. Son inconvénient majeur réside cependant dans l'imperméabilité de la membrane à certaines molécules comme l'ATP, ce qui peut limiter l'étude de certaines réactions biochimiques. **Okumus et al** ont utilisé ce protocole pour encapsuler des ribozymes et mettre en évidence que leur cinétique de repliement était différente de la plupart des ARNs et se déroulait à des échelles de temps variant d'une centaine de milliseconces jusqu'à une dizaine de secondes [Oku04]. **Benitez et al.** ont également utilisé cette technique pour étudier des interactions protéine/protéine. Ils ont observé la cinétique d'interaction de la protéine Hah1 porteuse de cuivre avec son récepteur dans la protéine de Wilson ATP7B en utilisant le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes smFRET. Cette expérience était la première à l'échelle de la molécule unique à étudier les interactions faibles entre protéines et a mis en évidence le potentiel de la méthode d'encapsulation dans l'observation des molécules uniques [Ben08].

Méthodes alternatives

D'autres techniques permettant un confinement avec ou sans accrochage ont été proposées et sont présentées dans la figure (2.10). Parmi celles-ci, on trouve le peignage de l'ADN. Ce dernier est généralement effectué en insérant une lame de verre rendue hydrophobe dans une solution contenant de l'ADN qui va se coller à la surface par son extrémité également hydrophobe. En retirant doucement la lame de verre, l'ADN est étiré à la surface par le passage du ménisque et s'y adsorbe. Le peignage a été utilisé pour l'étude de la diffusion unidimensionnelle des protéines sur l'ADN. **Kim et al.** ont par exemple étudié le mouvement de la T7 ARN polymérase sur un frag-

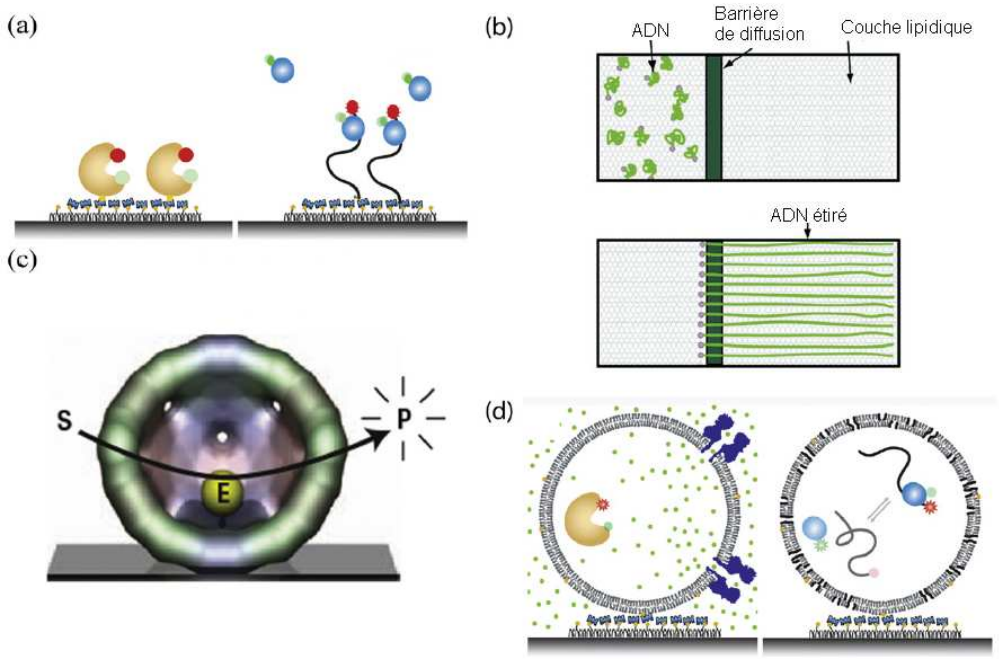


FIGURE 2.10.: Techniques d'immobilisation de molécules uniques sur une lamelle de verre [Ger09].

ment d'ADN double brin peigné pour en déduire son coefficient de diffusion [Kim07]. **Fazio et al.** ont peigné l'ADN sur une surface lipidique à l'aide d'un écoulement à travers une barrière en chrome. Celle-ci permet d'aligner les molécules d'ADN et possède donc l'avantage de pouvoir observer un très grand nombre de molécules à la fois [Faz08]. L'inconvénient de la technique de peignage réside cependant dans le fait que les brins d'ADN sont surétirés et collés à la surface, ce qui peut modifier leurs propriétés. Une autre approche a été proposée et utilise une fibre optique fixée sur une lame de verre contenant des microchambres pour étudier les cycles d'une enzyme. Les microchambres sont scellées mécaniquement dans une couche de silicone sur la lamelle de verre. La surface comprend environ 50.000 microchambres et permet ainsi d'observer de nombreuses réactions simultanément et d'avoir une très bonne statistique [Gor07]. Il est également possible de piéger des enzymes dans des capsides de virus poreuses au substrat. Les capsides sont fixées à la surface et le substrat peut alors diffuser dans ces pièges où il interagit avec l'enzyme.

Alternativement à ces méthodes, **Levene et al** ont introduit les guides d'ondes à zéro mode qui permettent également d'observer des molécules uniques dans de petits volumes. Le principe consiste à couvrir une lamelle par une couche d'aluminium de 100 nm d'épaisseur par enduction puis à percer des puits d'un diamètre inférieur à la

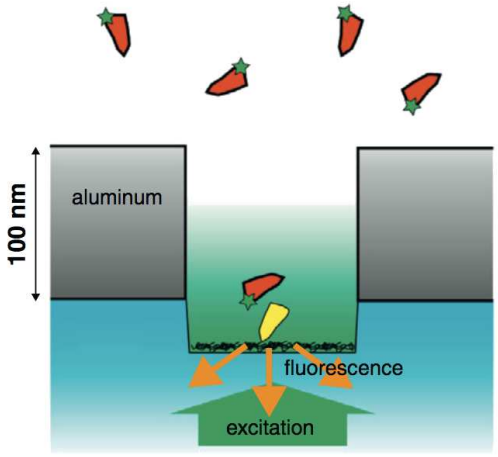


FIGURE 2.11.: Cavité à volume réduit pour l'observation de molécules uniques.

longueur d'onde (typiquement 50 nm). Ceci a pour but de créer des zones d'excitation avec un volume de l'ordre du zeptolitre ($10^{-21}l$). En effet, la lumière excitatrice ne peut pas se propager dans les trous et crée un champ évanescent [Lev03] (figure 2.11). Il est alors possible d'introduire puis d'observer des enzymes individuelles dans ces cavités en contrôlant leur concentration.

3. Microscopie à l'échelle de la molécule unique

It is very easy to answer many of these fundamental biological questions ; you just look at the thing !". C'est ce que affirmait Feynman en 1959 en faisant référence à la nécessité d'améliorer la résolution des microscopes dans le but de comprendre les phénomènes biologiques. La résolution spatiale du microscope optique est cependant limitée par la diffraction. Ceci a pour conséquence que tous les objets visibles au microscope ont une taille apparente d'environ 250 nm [1] correspondant à cette limite de diffraction. La structure d'une cellule et ses organites est ainsi observable mais pour étudier la dynamique des phénomènes biologiques aux échelles moléculaires tels que la réplication de l'ADN ou l'action d'une protéine sur son récepteur, il est indispensable de surpasser cette limite physique pour accéder à une échelle plus petite. L'observation de molécules uniques répond à ce besoin.

Un moyen direct pour visualiser des molécules biologiques *in vitro* consiste à détecter leur fluorescence (voir section 3.1). Cette fluorescence naturelle provient essentiellement des acides aminés tryptophane et tyrosine et est très faible vu leurs faibles coefficients d'extinction (5500 et 1490 $M^{-1}cm^{-1}$) et rendement quantique (0.14 et 0.13) [Che06, Pac95]. Elle offre ainsi un contraste modeste qui ne permet pas la visualisation d'objets individuels. D'autres marqueurs fluorescents plus lumineux sont alors couplés à ces molécules biochimiquement et permettent leur détection au microscope avec une précision allant jusqu'à 1 nm et leur suivi pendant plusieurs heures [Ele10, Yil03].

Dans les années 90, la microscopie de fluorescence a connu de grands progrès dans les techniques de marquage et a ainsi rendu possible la détection de molécules uniques [Nie97]. Dès lors, l'intérêt pour l'étude des phénomènes biologiques à cette échelle n'a cessé de croître et les résultats obtenus ont largement contribué à la compréhension

1. Pour une longueur d'onde de $\lambda = 500\ nm$.

des mécanismes moléculaires qui n'étaient pas accessibles à travers des mesures d'ensemble [Oij10]. Parmi ces résultats, on peut citer l'étude de la diffusion des lipides dans la membrane, de celle des protéines le long de l'ADN ou bien du mouvement décrit par certains moteurs moléculaires [Sch96, Hil10, Yil04]. Dans ce chapitre, nous allons commencer par décrire les différents types de marqueurs utilisés dans la microscopie de fluorescence ainsi que les techniques d'acquisition d'images. Nous justifierons ainsi notre choix de la microscopie à onde évanescente pour l'étude de l'interaction des enzymes avec leur substrat et détaillerons sa mise en oeuvre. Nous étudierons le phénomène de photoblanchiment dans le cas du fluorophore que nous avons utilisé (Alexa 488) pour enfin présenter différentes méthodes de localisation à l'échelle de la molécule unique, que nous avons utilisées.

3.1. Microscopie de fluorescence : Sondes et Techniques

Parmi les propriétés optiques utilisées pour l'imagerie, on trouve la transmission, la réflexion et la diffusion qui sont utilisées par exemple dans la microscopie en réflexion, en champ clair, en lumière polarisée ou à contraste de phase. Le contraste généré par ces propriétés optiques est cependant insuffisant pour visualiser des molécules uniques et il est nécessaire de recourir à la propriété de fluorescence de certaines molécules ou objets inorganiques appelés fluorophores qui sont fixés aux molécules d'intérêt pour créer un contraste ponctuel permettant de les détecter. La fluorescence consiste à absorber les photons d'une certaine longueur d'onde et émettre d'autres d'une longueur d'onde différente. Ce décalage entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission est appelé déplacement de Stokes. Le déplacement de Stokes permet de filtrer le signal d'excitation au moment de l'acquisition de l'image pour collecter spécifiquement les photons émis par le fluorophore (figure 3.1).

3.1.1. Sondes fluorescentes

Comme fluorophore ou fluorochrome, on définit tout objet possédant des propriétés de fluorescence. Dans la figure (3.2.a) on trouve le diagramme de Jablonski simplifié du fluorophore FITC ainsi que ses spectres d'émission et d'absorption. Ce diagramme illustre les états électroniques ainsi que les différentes transitions possibles entre ces états et le spectre correspondant. En simplifiant ce diagramme à un système à trois

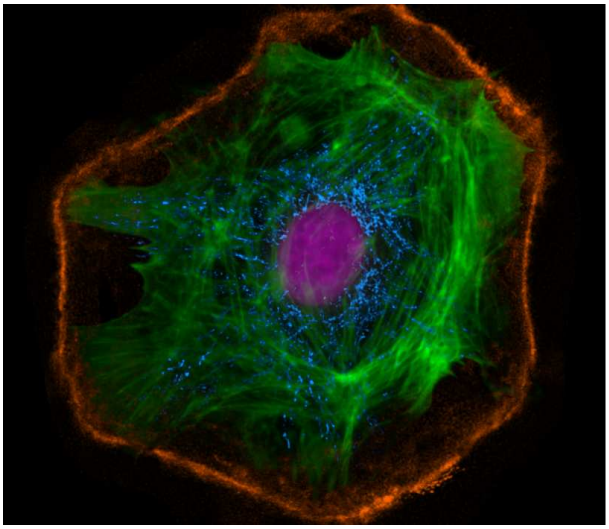


FIGURE 3.1.: Image de fluorescence d'une cellule. On trouve le noyau en violet, la membrane en oranger, l'actine en vert et les mitochondries en bleu. Extrait de [5].

niveaux (figure 3.2.b) , nous pouvons écrire les équations de taux suivantes :

$$\begin{aligned} \frac{dS_0}{dt} &= -k_e S_0 + k_{fl} S_1 + k_{ph} T_1 \\ \frac{dS_1}{dt} &= k_e S_0 - k_{fl} S_1 - k_{isc} S_1 - k_{pb} S_1 \\ &= k_e S_0 - (k_f + k_{nfl}) S_1 \\ \frac{dT_1}{dt} &= k_{isc} S_1 - k_{ph} T_1 \end{aligned} \tag{3.1}$$

où S_0, S_1 et T_0 représente le nombre d'électrons dans les états respectifs singulet fondamental, singulet excité et triplet fondamental, k_e le taux d'excitation, k_{fl} le taux de désexcitation radiative, k_{pb} le taux de photoblanchiment, k_{isc} le taux de conversion intersystème et k_{ph} le taux de transition de l'état triplet à l'état singulet de façon non radiative. Un fluorophore peut alors être caractérisé par cinq grandeurs essentielles :

1. Le déplacement de Stokes : il est égal à la distance spectrale entre les maxima d'excitation et d'émission (26 nm pour FITC). En général, plus cette valeur est grande plus elle permet la séparation spectrale des signaux et améliore la qualité de la détection.

2. Le temps de vie de la fluorescence : lorsqu'un fluorophore absorbe un photon, il passe de l'état fondamental à l'état excité et sa désexcitation a lieu après une durée appelée temps de vie. Il est égal à l'inverse de la somme des taux d'événements dépeuplant l'état excité : $\tau = (k_{fl} + k_{nfl})^{-1}$ (typiquement 1 -10 ns

pour les fluorophores organiques, figure 3.2.b). k_{fl} représente ici la désexcitation radiative (la fluorescence) et k_{nfl} la désexcitation non radiative.

3. Le rendement quantique : il est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés : $Q = k_{fl}/(k_{fl} + k_{nfl})$. Il est compris entre 0.05 et 1 (0.85 pour la FITC).

4. Le coefficient d'extinction : il reflète la probabilité d'absorption d'un photon par le fluorophore à une longueur d'onde donnée (ϵ=80.000 $cm^{-1}M^{-1}$ à 488 nm pour la FITC). Il peut être déterminé à partir de la loi de Beer-Lambert en mesurant la perte d'intensité d'un faisceau qui traverse un échantillon.

5. Le photoblanchiment : il correspond à la transition irréversible de l'état excité à un état noir qui ne permet plus l'émission radiative. Il est généralement quantifié par le nombre de photons qu'émet un fluorophore avant de photoblanchir et vaut entre 10^5 et 10^6 pour la plupart des fluorophores organiques.

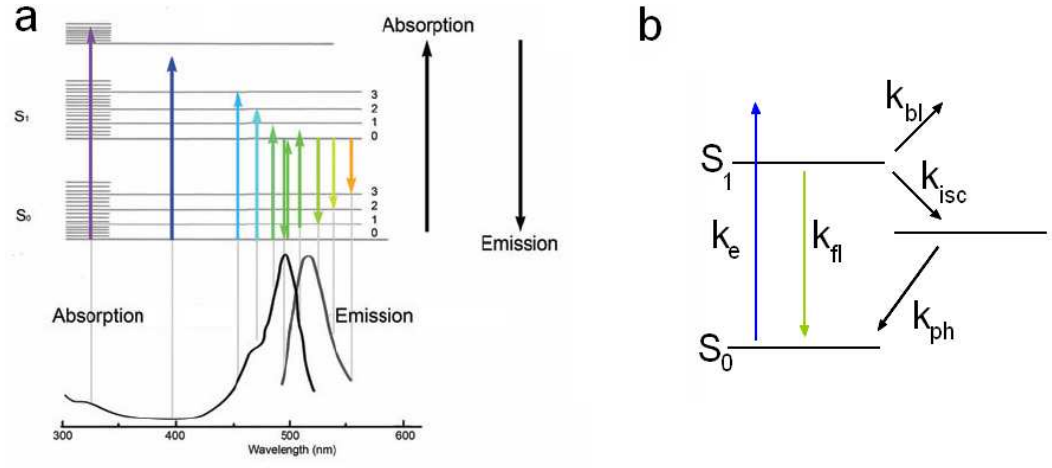


FIGURE 3.2.: a. Diagramme de Jablonski et spectre d'absorption et d'émission de la FITC. D'après **Lichtman et al.**, [Lic05]. b. Les principales transitions photophysiques d'une molécule fluorescente. k_e : Excitation, k_{fl} : Fluorescence, k_{pb} : photoblanchiment, k_{isc} : Conversion intersystème et k_{ph} : transition de l'état triplet à l'état singulet.

On distingue trois groupes de fluorophores : les fluorophores organiques, les protéines fluorescentes et les nanoparticules (nanocristaux, particules de terres rares, nano-diamants).

Les fluorophores organiques

Ce sont des molécules qui contiennent des systèmes d'électrons délocalisés qui sont à l'origine de la fluorescence. Les structures réactives comme le groupement sulfhydryle (thiol-SH) ou l'imidazole qu'elles contiennent permettent leur couplage à des structures biologiques (anticorps, protéines, ADN etc.). Les fluorophores organiques ont un coefficient d'extinction entre 5000 et 200000 $cm^{-1}M^{-1}$. Selon leur rendement quantique, les fluorophores peuvent être utilisés comme sondes fluorescentes pour imager les structures ou bien comme agents pour induire des réactions photochimiques. Le fluorophore peut ainsi être utilisé pour visualiser et micromanipuler des structures subcellulaires simultanément [Küt10]. Dans le cas d'une étude à l'échelle de la molécule unique, il est primordial de choisir un fluorophore ayant un rendement quantique élevé et collecter un nombre suffisant de photons sous faible illumination pour réduire le photoblanchiment et maximiser ainsi la durée d'observation (voir section 3.3.2).

Cette sensibilité au photoblanchiment constitue un véritable inconvénient et une limitation permanente dans le cas de l'étude d'une dynamique qui nécessite des temps d'observation longs. Un second facteur limitant l'utilisation des fluorophores organiques réside dans leur spectre d'émission relativement large qui oblige à utiliser des filtres larges ce qui peut réduire le rapport signal sur bruit. Toutefois, les fluorophores organiques se sont établis comme le principal marqueur dans la microscopie de fluorescence grâce à deux atouts majeurs notamment leur petite taille et la simplicité de leur couplage aux molécules d'intérêt (voir section 3.3).

Les protéines fluorescentes

Certaines protéines comme la DENDRA, l'EOS ou la GFP possèdent des propriétés de fluorescence [Luk05]. La protéine fluorescente verte GFP (*engl : Green Fluorescent Protein*) est la protéine la plus couramment utilisée. Elle a été découverte chez la méduse (*Aequoria victoria*) en 1962 et son gène codant a été cloné en 1994, ce qui permet son expression dans des systèmes cellulaires ou bactériens [Shi62, Ino94]. La GFP est excitée dans le bleu à une longueur d'onde maximale de 475 nm et émet dans le vert à une longueur d'onde maximale de 504 nm. Elle possède une forme cylindrique avec une longueur de 5nm et un diamètre de 4 nm (figure 3.3).

Des modifications génétiques ont permis de produire des variantes avec des spectres d'excitation et d'émission de différentes couleurs [Pat04]. Parmi celles-ci on cite les

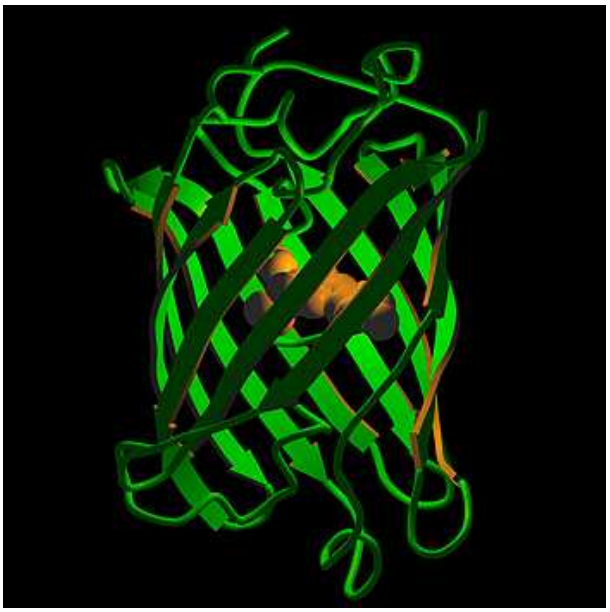


FIGURE 3.3.: Structure de la protéine fluorescente verte. Extrait de [9].

plus connues notamment la eYFP (*Yellow Fluorescent Protein*) et la eRFP (*Red Fluorecent Protein*) [Sha04]. D'autres mutations ont permis d'optimiser les caractéristiques spectrales de la GFP pour obtenir la eGFP avec un rendement quantique de 0.6 et un coefficient d'extinction de 55000 $cm^{-1}M^{-1}$. Le principal inconvénient réside dans leur faible photostabilité qui varie entre 10^4 et 10^5 photons émis [Sha05].

Les nanocristaux semiconducteurs

Les nanocristaux semiconducteurs sont des fluorophores de taille nanométrique dont la longueur d'onde d'émission est ajustable par le contrôle de leur diamètre. Les nanocristaux semi-conducteurs connus sous le nom de Quantum dots (Qd) sont fabriqués chimiquement et formés d'un coeur de sulfure de cadmium recouvert par une coquille en sulfure de zinc (figure 3.6.a) [Hin96]. La variation de leur taille entraîne une variation de la longueur d'onde de leur émission. En effet, le confinement spatial des électrons sur une échelle de quelques nanomètres conduit à une discrétisation des niveaux d'énergie dans le semi-conducteur. Plus la taille est petite, plus l'écart entre les niveaux augmente et plus la longueur d'onde d'émission diminue (figure 3.4). Par exemple, pour une taille du coeur d'environ 2 nm les Qds émettent dans le bleu. Une taille de 12 nm est nécessaire pour avoir une émission dans le rouge. Le spectre d'émission est étroit et correspond à la transition entre l'état excité et l'état fondamental, mais en pratique il apparaît plus large à cause de la dispersion de

taille des particules. De ce fait, le spectre d'émission est symétrique et peut atteindre quelques dizaines de nanomètres [Bru98]. Le spectre d'absorption est en revanche large (quelques centaines de nm) et l'absorption augmente dans l'ultraviolet (figure 3.6.b).

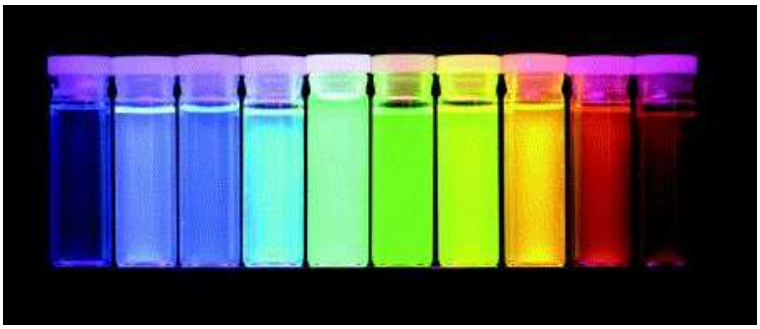


FIGURE 3.4.: Solutions de QDs de couleurs d'émission différentes. Extrait de [Cha02].

La première application biologique utilisant des Qds a été réalisée en 1998 dans le groupe de Alivisatos et a permis de mettre en évidence leurs nombreux avantages [Bru98] :

- La modulabilité de leur émission et leur spectre relativement étroit comparé à celui des fluorophores organiques présentent un avantage puisqu'ils permettent de marquer plusieurs récepteurs avec des couleurs différentes et de les visualiser en même temps avec une seule longueur d'onde d'excitation.
- Le coefficient d'extinction des Qds est supérieur d'un ordre de grandeur à celui des autres fluorophores pour un rendement quantique similaire ce qui les rend facilement détectables et plus précisément localisables [Cha98] (voir section 3.4). Par exemple, le coefficient d'extinction d'un Quantum dot 655 vaut 800.000 $cm^{-1}M^{-}1$ soit 10 fois plus que celui de la FITC [Bal04, 5].
- Bien que le rendement quantique des Qds est comparable à celui des fluorophores organiques, ces derniers subissent rapidement une photodégradation et ne sont plus visibles. Les Qds n'ont pas cette propriété et peuvent être observés pendant plusieurs heures et avec un signal de fluorescence stable [Cha98, Mic05].

Toutefois, les Qds présentent deux inconvénients essentiels qui peuvent limiter leur utilisation : d'une part leur grande taille (10-20 nm) par rapport aux fluorophores organiques (facteur 10-20) et d'autre part le clignotement. Ce dernier est attribué à l'ionisation temporaire du nanocristal par effet tunnel ou effet Auger suite à laquelle le coeur n'émet plus de photons [Nir96]. La durée de ces temps sombres suit une loi

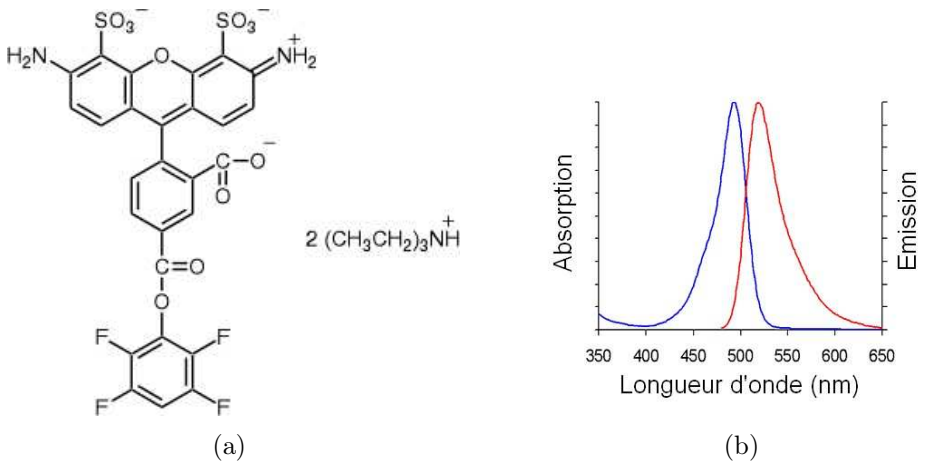
de Lévy, ce qui peut fortement limiter son utilisation même pour des détections à faible résolution temporelle.

Un tableau comparant les différents types de marqueurs est présenté ci dessous (tableau 3.1). Pour notre étude de la dynamique d'interaction des protéines avec leurs substrats d'ADN, nous avons choisi de travailler avec les fluorophores organiques pour trois raisons : premièrement, la simplicité du marquage (voir section 3.3), deuxièmement leur petite taille (1 nm) qui assure des propriétés proches de celles de l'espèce non marquée et troisièmement leur photostabilité 10 fois plus élevée que celle des protéines fluorescentes. Les Quantums dots 525 et 605 ont été utilisés pour l'étude de la dérive dans le cadre de notre procédure de colocalisation (voir section 3.6). Une brève description des fluorophores utilisés est donnée dans la suite.

Type	Avantages	Inconvénients
Fluorophores organiques Protéines fluorescentes	petite taille	photodestruction
Quantum-dots	photostabilité brillance modulabilité de la longeur d'onde	clignotement fonctionnalisation solubilité
Nanoparticules dopées par des ions terres-rares	pas de clignotement solubilité dans l'eau	moins brillantes que QDs

TABLE 3.1.: Avantages et inconvénients des différents marqueurs fluorescents.

Alexa 488 fluorophore

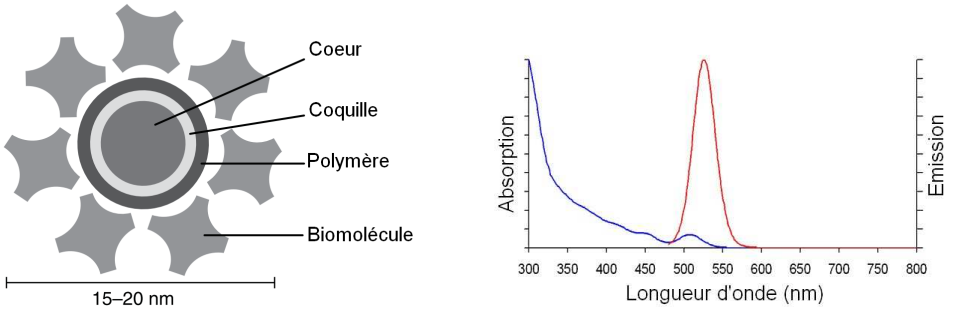


(a) (b)

FIGURE 3.5.: (a) Structure de la molécule de Alexa 488. (b) Spectres d'émission et d'absorption. Extrait de [5].

Le fluorophore Alexa est synthétisé à partir de substances organiques comme la rhodamine [Vol99]. Spectralement, il est proche de la fluorescéine avec un maximum d'absorption à 494 nm et un maximum d'émission à 519 nm. Il est peu sensible aux variations du pH entre 4 et 10 et son signal est plus photostable et brillant que celui de la fluorescéine [Vol99]. Son coefficient d'extinction est ainsi égal à 71.000 $cm^{-1}M^{-1}$ et son rendement quantique à 0.92. Le marquage des protéines s'effectue par une réaction entre le groupe fonctionnel ester dans le fluorophore et les amines des protéines pour former une liaison covalente.

Quantum dots 525



(a) (b)

FIGURE 3.6.: (a) Structure d'un Quantum-dot avec le noyau en sulfure de Cadmium et la coquille en sulfure de Zinc, le revêtement avec du polymère sur lequel est fixée la streptavidine. (b) Spectres d'émission et d'absorption. Extrait de [5].

Nous avons choisi les Qds 525 comme homologues à l'Alexa 488 avec une émission maximale à 525 nm afin de mieux calibrer le système mis en place vu leur fort coefficient d'extinction de 2.000.000 $cm^{-1}M^{-1}$ à 525 nm qui nous permet une localisation nanométrique.

3.1.2. Couplage des fluorophores aux protéines

Dans la figure 3.7 sont schématisées les différentes techniques de marquage selon la nature du fluorophores. Pour une protéine fluorescente, le gène codant la GFP est inséré dans le même cadre de lecture que le gène codant la protéine pour permettre l'expression d'une protéine de fusion. Les nanocristaux sont disponibles avec des fonctionnalisations streptavidine et le couplage à la protéine se fait par l'intermédiaire d'une liaison biotine-streptavidine. Le couplage des fluorophores organiques

aux protéines peut se faire chimiquement grâce aux structures réactives que contient le fluorophore comme les groupements sufhydryle (SH) ou l'imidazole. Dans notre cas, nous avons raccroché un Alexa 488 maleimide au groupement thiol de la cystéine de NucS selon le protocole standardisé (voir annexe A.1). Le ratio de couplage obtenu est alors égal à 1.33 et permet de vérifier que la plupart des protéines sont marquées avec un seul fluorophore. Ce taux de couplage a également été vérifié expérimentalement grâce à des mesures du nombre d'étapes de photoblanchiment (voir section 3.3.2).

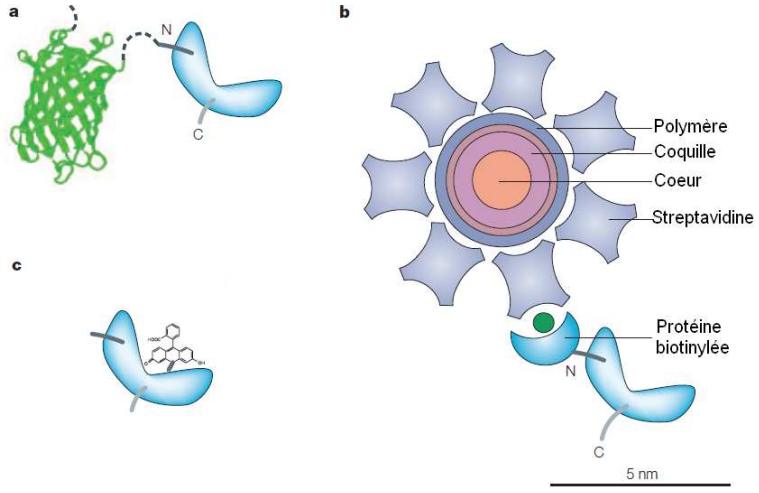


FIGURE 3.7.: Couplage des fluorophores au molécules d'intérêt : a. Protéine fluorescente. b. Nanocristal. c. Fluorophore organique. D'après **Miyawaki et al.**, [Mia03].

3.1.3. Techniques de microscopie de fluorescence

En microscopie de fluorescence, il existe deux façons pour acquérir des images de l'échantillon étudié : par balayage ou en champ large.

Microscopie par balayage

Elle est utilisée dans le cadre de la microscopie confocale ou biphotonique et consiste à balayer l'échantillon par le faisceau laser point par point et collecter la fluorescence émise par les fluorophores par un photomultiplicateur pour ensuite reconstruire l'image de l'échantillon. Les techniques de microscopie par balayage permettent généralement de réaliser une section optique en réduisant le volume d'excitation pour augmenter le rapport signal sur bruit et améliorer ainsi la qualité de l'image. La microscopie confocale utilise deux trous sténopéïques et la microscopie biphotonique

les effets non linéaires pour réduire le volume excité et éventuellement détecter des molécules uniques [Jun98, Seg02, Far99].

Microscopie en champ large

Dans la microscopie de fluorescence en champ large, tout le champ est éclairé à la fois et l'acquisition se fait par l'intermédiaire d'une caméra. Cette dernière doit posséder un rendement quantique élevé pour pouvoir détecter des signaux faibles ($\approx$ 100 photons) comme ceux des molécules uniques. Parmi les méthodes d'illumination dans la microscopie en champ large on trouve : l'illumination en épifluorescence où tout le champ est excité et l'illumination en onde évanescente où l'excitation est restreinte à une profondeur d'environ 100 nm [Axe08] (voir section 3.2).

Les techniques citées permettent d'observer des molécules individuelles et il existe d'autres modalités comme la spectroscopie de corrélation de fluorescence qui peuvent être utilisées pour détecter des molécules uniques [Sch99]. Toutefois, notre étude de l'interaction des enzymes avec leur substrat à l'échelle de la molécule unique nécessite des conditions supplémentaires auxquelles la microscopie à onde évanescente TIRF (total internal reflection fluorescence) répond le mieux, notamment :

1. le nombre d'objets uniques observés à la fois doit être le plus grand possible sans diminuer le rapport signal sur bruit pour pouvoir réaliser plusieurs mesures par expérience. En raison de leur volume d'excitation relativement grand, les techniques de balayage et la microscopie en épifluorescence ne permettent pas l'observation de plusieurs molécules individuelles à la fois. Les concentrations autorisées sont de l'ordre du picomolaire (pM) alors qu'en TIRF, elles sont de l'ordre du nanomolaire (nM) et peuvent atteindre 10 nM avant que le signal ne sature [Oij10, Oij08].

2. Afin d'observer parallèlement plusieurs (centaines de) molécules, il convient de fixer au moins l'un des réactants à la surface par l'intermédiaire d'un traitement spécifique. Grâce à sa profondeur de pénétration de 100 nm qui réduit considérablement les signaux parasites collectés en détectant uniquement les réactifs au voisinage de la surface, la microscopie à onde évanescente permet d'avoir un meilleur rapport signal sur bruit et offre ainsi une meilleure précision de localisation (voir section 3.4.2).

Nous avons par conséquent choisi d'utiliser la microscopie à onde évanescente dans notre étude de l'interaction des enzymes de réparation de l'ADN à l'échelle de la molécule unique et nous détaillerons cette technique dans la section suivante.

3.2. Microscopie à onde évanescente : TIRF

3.2.1. Principe et montages

L'application du principe de réflexion totale en biologie remonte au début des années 80. **Axelrod et al.** ont utilisé cette technique pour observer la surface de contact entre des cellules et leur substrat et étudier la structure de la membrane cellulaire des myoblastes et fibroblastes [Axe81]. Ces expériences ont montré le grand potentiel que porte cette technique pour l'étude d'objets fluorescents proches de la surface grâce à son contraste élevé mais l'observation de molécules uniques était encore impossible à ce stade et ne fut réalisée qu'au milieu des années 90 grâce à l'avancée technologique en électronique qui a permis d'améliorer la sensibilité et la résolution temporelle des caméras et au progrès en biotechnologies qui a permis de maîtriser la technique de couplage des sondes fluorescentes sur des échantillons biologiques. Dès lors, l'intérêt pour la microscopie à onde évanescente est devenu de plus en plus croissant puisqu'il était désormais possible de s'affranchir du moyennage résultant des mesures d'ensemble pour accéder à la dynamique des objets fluorescents uniques en temps réel [Fun95, Tok97].

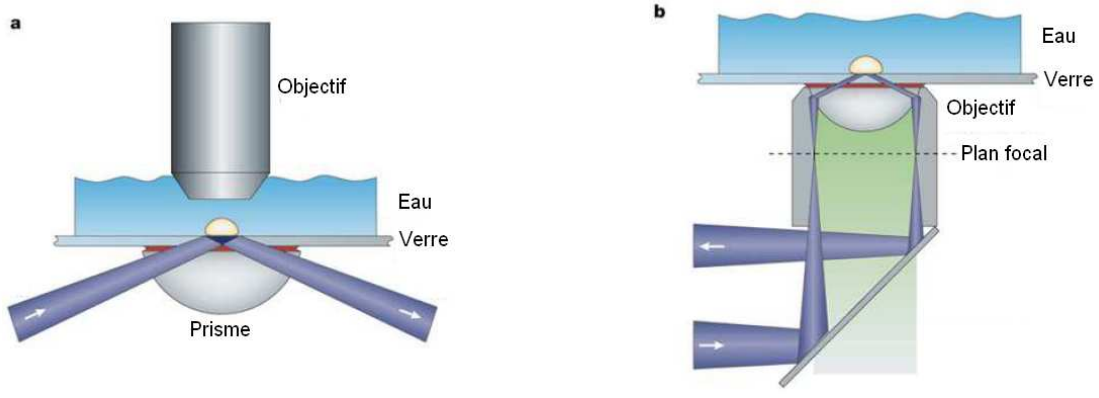


FIGURE 3.8.: Différents montages en microscopie TIRF : (a) à prisme (b) à excitation par objectif. D'après **Steyer et al.**, [Ste01].

Il existe deux types de montage TIRF : à prisme, et à excitation par objectif schématisés dans la figure 3.8. Dans le premier montage, un prisme (hémicylindrique,

cubique ou hémisphérique) est mis en contact avec la lamelle sur laquelle se trouve l'échantillon et la reflexion totale se produit à l'interface entre le verre et l'échantillon. La détection se fait du côté opposé par un objectif. Le principal avantage de ce montage se trouve dans sa précision d'ajustement de l'angle de réflexion totale à travers le prisme. Toutefois, ce montage limite l'accès à l'échantillon et c'est la raison pour laquelle nous avons choisi de travailler avec le second type où l'excitation et la detection se font à travers l'objectif sur un microscope inversé permettant ainsi de laisser l'accès à la surface libre (voir fig. 3.8). Un second avantage de ce montage est la meilleure collection de la fluorescence. En effet, la proximité de la surface de verre plus dense et non conductrice rend le profil d'émission de la fluorescence asymétrique et dirigé vers l'objectif. Typiquement, 70% de l'intensité de la fluorescence est émise en direction du verre et permet ainsi une meilleure collection du signal avec un microscope inversé [Luk77, End99, Mer00].

En considérant un faisceau collimaté, le phénomène de réflexion totale peut facilement être déduit de la loi de Snell-Descartes pour la réfraction : $n_1 sin(\theta_1) = n_2 sin(\theta_2)$, où $n_{1,2}$ désignent les indices de réfraction des milieux ($n_2 < n_1$) et $\theta_{1,2}$ l'angle des rayons incident et réfracté par rapport à l'axe optique. Lorsque θ_2 atteint 90°, le rayon incident ne peut plus se propager dans le second milieu et on parle de réflexion totale (voir fig. 3.9). L'angle d'incidence limite θ_c entre l'axe optique et le rayon incident est alors calculé comme suit : $\theta_c = sin^{-1}(n_2/n_1)$ (figure 3.9). En prenant l'exemple d'une réflexion entre le verre à $n_1 = 1.518$ et l'eau $n_2 = 1.33$, on obtient $\theta_c \approx 62°$.

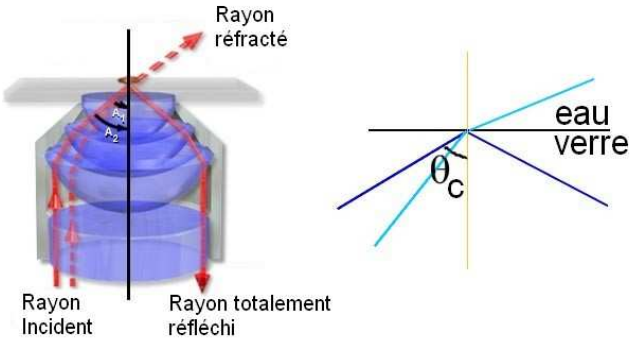


FIGURE 3.9.: Chemin optique du faisceau laser dans un montage TIRFM. Extrait de [8].

Dans un montage TIRF à excitation par objectif, l'angle d'incidence maximal est limité par l'ouverture numérique de l'objectif : $NA = n_1 sin\theta_{max}$ [Axe08]. Pour

avoir une réflexion totale à l'interface entre l'eau et le verre, il faut donc que l'angle d'incidence maximal soit supérieur à l'angle critique $\theta_{max} > \theta_c$. L'ouverture numérique de l'objectif doit donc être supérieure à l'indice de réfraction du second milieu ($NA > 1.33$ pour l'eau). Par conséquent, il est impératif d'utiliser des objectifs à grande ouverture numérique pour ce type de montage. Nous avons utilisé un objectif à grossissement 100x et ouverture numérique NA=1.45 (Olympus, Plan Apochromat) permettant d'atteindre un angle maximal $\theta_{max} = 71°$ à l'interface verre-eau et qui permet d'avoir une marge d'environ $\theta_{max} - \theta_c = 9°$ pour ajuster l'angle d'incidence tout en ayant une réflexion totale. Ici, il importe de faire deux remarques :

- Les objectifs à grande ouverture numérique sont des objectifs à immersion dans l'huile : comme l'indice de réfraction de celle-ci ($n_{huile} = 1.52$) est très proche de celui du verre ($n_{verre} = 1.518$) et que la couche d'huile séparant l'objectif de la lamelle est très fine (<0.05 mm), on peut considérer qu'il n'y a pas de réfraction des rayons entre l'objectif et la lamelle.
- Afin d'obtenir une illumination homogène sur le champ de vision, le faisceau laser doit être focalisé sur le plan focal arrière de l'objectif via une lentille. Ainsi, tous les rayons incidents dans l'échantillon possèdent le même angle par rapport à l'axe optique. Expérimentalement, à partir d'une configuration en épifluorescence, cet angle est augmenté jusqu'à ce que le rayon ne soit plus visible à la sortie de l'objectif. A ce moment, il est entièrement réfléchi et ressort de l'objectif parallèlement au premier faisceau (figure 3.9).

A l'interface entre les deux milieux où la réflexion totale a lieu, une onde est créée dans le milieu avec le plus petit indice de réfraction. Son intensité décroît exponentiellement en fonction de la profondeur [Sch05] (voir annexe C),

$$I(z) = I(0)e^{-z/d} \tag{3.2}$$

où d représente la profondeur caractéristique de pénétration de l'onde évanescente. Celle-ci dépend des indices de réfraction, de la longueur d'onde utilisée et de l'angle d'incidence comme suit [Axe08] :

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 sin^2(\theta) - n_2^2}} \tag{3.3}$$

La profondeur de l'illumination peut donc être ajustée en variant l'angle d'inci-

dence. Pour une interface eau/verre et à $\lambda = 488\ nm$ on obtient :

$$d = \frac{38.85}{\sqrt{2.3sin^2(\theta) - 1.76}} \tag{3.4}$$

La valeur minimale est égale à 75 nm pour un angle d'incidence maximal de $\theta_{max} = 71°$ (figure 3.10). Cette valeur est environ 10 fois plus petite que la profondeur atteinte en microscopie confocale ($d \approx 800nm$), ce qui entraîne une augmentation du rapport signal à bruit et permet de limiter les signaux parasites dus aux objets loin de la surface. Pour diminuer encore plus la profondeur et améliorer encore plus la qualité de l'acquisition, il est possible d'augmenter l'ouverture numérique de l'objectif. En effet, il existe des objectifs avec NA=1.65 qui permettent d'atteindre une profondeur minimale de 40 nm. Ces objectifs nécessitent toutefois l'utilisation de lamelles à indice de réfraction élevé ($n = 1.788$) qui sont relativement coûteuses. De plus, l'huile utilisée pour ces lamelles a l'inconvénient d'être à la fois toxique et volatile.

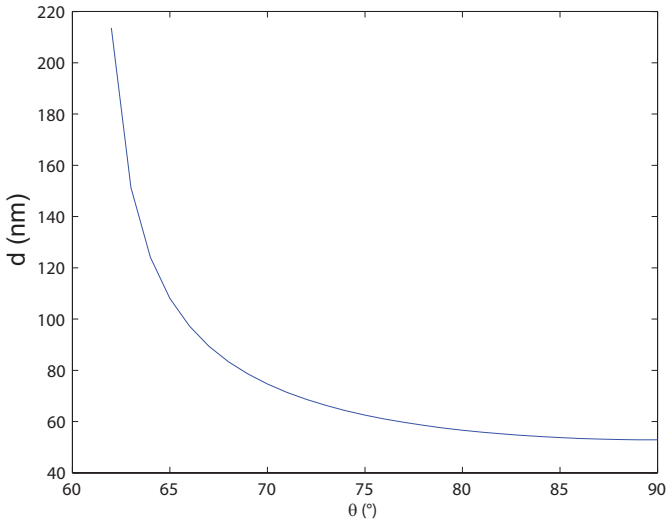
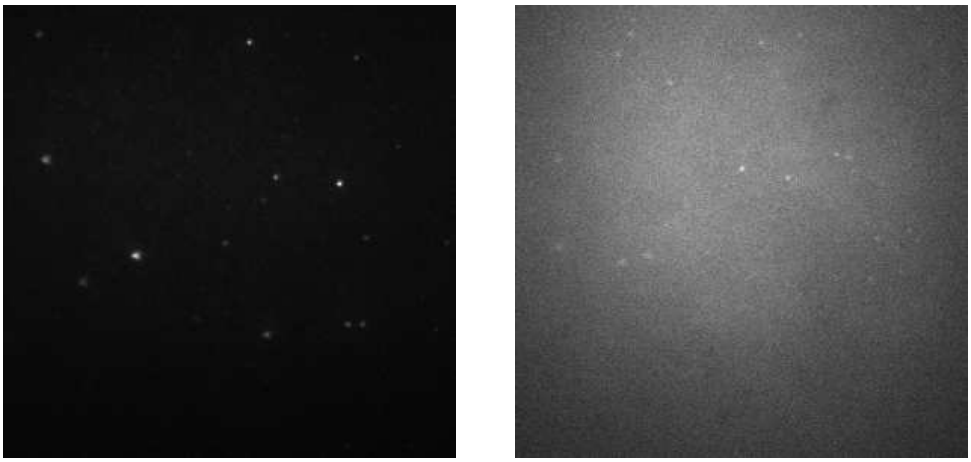


FIGURE 3.10.: Profondeur de pénétration dans l'échantillon en fonction de l'angle incident du faisceau laser ($\lambda = 488\ nm$). Pour un angle maximal de 71°, on obtient une profondeur de 75 nm.

Si la profondeur de pénétration dépend de l'angle d'incidence, la taille du champ illuminé dépend quant à elle de la largeur du faisceau à l'entrée arrière de l'objectif. Pour avoir une illumination homogène sur tout le champ de la caméra, il est indispensable de calculer la taille minimale nécessaire du faisceau focalisé sur l'entrée arrière du microscope. Avec 16 µm de largeur de pixel, et un objectif à grossissement G=100, le diamètre du champ illuminé est égal à $\omega_f \approx 80$ µm. En utilisant la loi

de conjugaison des faisceaux gaussiens $\omega_f = \lambda f/\pi\omega_0$ pour une focale équivalente de l'objectif de f_{obj}=1.8 mm [2], on trouve un diamètre du faisceau focalisé à l'entrée de l'objectif de $\omega_0 \approx$2 µm. D'autre part, la lentille de focalisation doit se situer à l'extérieur du microscope et sa longueur focale minimale est donc typiquement f=25 cm. Avec $\omega_i = \lambda f/\pi\omega_0$, nous obtenons finalement un diamètre $\omega_i = 2\ cm$. Il faut alors ajuster la taille du faisceau sortant du laser à l'aide d'un télescope de lentilles de façon à obtenir un diamètre de 2 cm sur la lentille de focalisation. Cette taille est en fait difficilement réalisable en pratique en raison de la taille finie de l'entrée du microscope. Dans notre cas précis, nous avons réalisé une taille de champ de $\omega_f \approx$40 µm permettant une illumination homogène sur la moitié du capteur (figure 3.11.b).

3.2.2. Performances de la microscopie à onde évanescente



(a) (b)

FIGURE 3.11.: Comparaison des images obtenues par microscopie : a) à onde évanescente TIRFM b) en épifluorescence EPI. Le rapport signal sur bruit est égal à 15 en TIFRM et à 3 en EPI pour des nanocristaux (Quantum dots 525, Invitrogen).

Grâce à sa faible profondeur de pénétration dans l'échantillon, la microscopie à onde évanescente minimise la détection de signaux non désirables et permet donc un rapport signal à bruit élevé et une résolution axiale supérieure à celle de la microscopie confocale. La résolution est essentiellement limitée par l'objectif et donnée par le critère de Rayleigh.

La résolution temporelle en microscopie TIRF est limitée par la vitesse d'acquisition de la caméra puisqu'il s'agit d'une microscopie plein champ. Cette vitesse dépend

2. $f_{obj} = L/G$, avec L la distance focale de la lentille de tube qui est égale à 180 mm pour notre microscope (Olympus IX71).

de la taille de l'image. Plus cette dernière est grande, plus la résolution temporelle diminue. Les caméras récentes de type EMCCD qui permettent la détection de molécules individuelles peuvent atteindre des vitesses de 50 images/s en plein champ (512x512) et jusqu'à 500 images/s sur 128x128 pixels. [Coa03, 4]. Il est possible de combiner cette microscopie avec d'autres techniques d'imagerie qui utiliseraient la surface libre au dessus de l'échantillon comme la microscopie à force atomique [Bin86] ou bien avec des techniques de micromanipulation (patch-clamp, micro-injection). Cependant, l'inconvénient de la microscopie à onde évanescente en comparaison aux techniques de section optique réside dans son incapacité à observer des phénomènes ayant lieu à une distance supérieure à 100 nm, ce qui limite son application à l'étude de phénomènes de surface.

3.2.3. Mise en Place du système à onde évanescente et description du montage

Dans cette section, nous exposerons la mise en oeuvre expérimentale du montage de microscopie à onde évanescente. Le montage est présenté sur la figure (3.12) et comporte un laser (*Coherent Innova 300*), un microscope (*Olympus IX71*) et une caméra (*EMCCD C9100-13*).

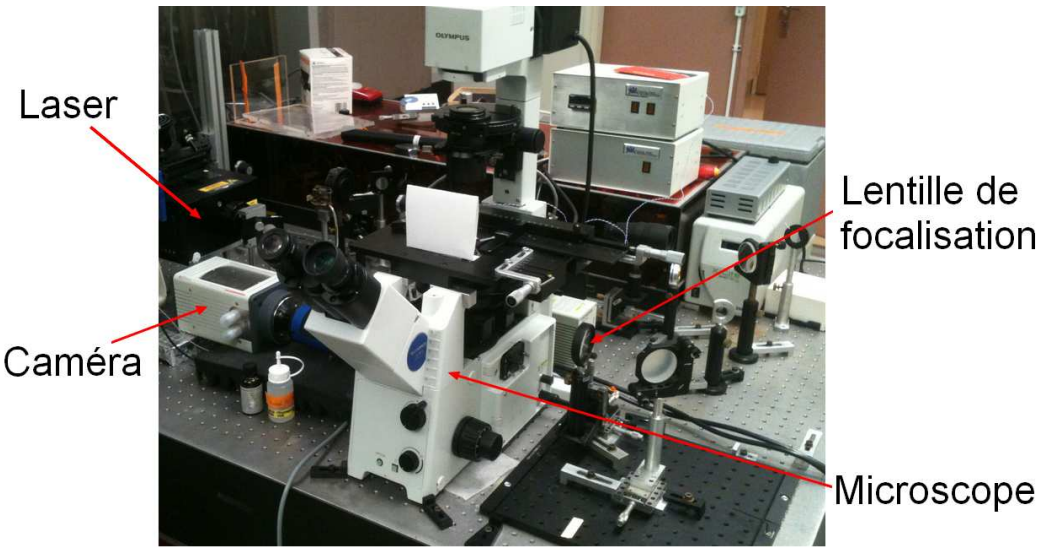


FIGURE 3.12.: Montage de microscopie à onde évanescente.

Le laser

Le laser (*Coherent Innova 300*) utilise les ions d'Argon comme milieu amplificateur. Ces ions possèdent plusieurs transitions qui peuvent être amplifiées par émission stimulée. Le laser Argon dispose ainsi de plusieurs raies dans l'ultraviolet, le visible et l'infrarouge. Les raies les plus intenses se trouvent à une longueur d'onde de 488 nm (bleu) et 514 nm (vert). Nous l'avons utilisé à faible intensité (1-10mW) pour la microscopie de fluorescence et nous avons travaillé avec la longueur d'onde de 488 nm pour exciter les molécules du fluorophore *Alexa Fluor 488*. Dans la figure 3.13 est représenté le profil du faisceau laser qui possède un diamètre de 3.12 mm. Il a été élargi avec un télescope pour atteindre un diamètre de 18 mm environ ce qui abouti à une taille de champ de 40 µm.

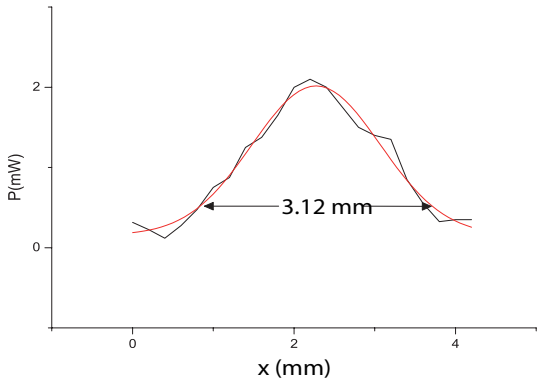


FIGURE 3.13.: Profil d'intensité du laser et ajustement gaussien : $\omega = 3.1 \pm 0.1\ mm$.

La caméra

L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'une caméra de type EMCCD (*engl : Electron Multiplying Charge-Coupled Device*). Ces caméras sont utilisées dans la microscopie, l'astronomie et la spectroscopie depuis une dizaine d'années [Rob03]. Contrairement aux caméras CCD, les caméras EMCCD amplifient le signal détecté avant de le convertir en courant électrique ce qui permet de minimiser le bruit de lecture et par conséquent de détecter de faibles signaux avec une grande résolution temporelle (voir section 3.4). Dans une EMCCD, les électrons libérés par effet photo-électrique passent par une série de dynodes pour amplifier le signal. A chaque passage, le nombre d'électrons libérés par émission secondaire augmente pour atteindre un facteur final maximal de G=1200 pour la caméra que nous avons utilisée.

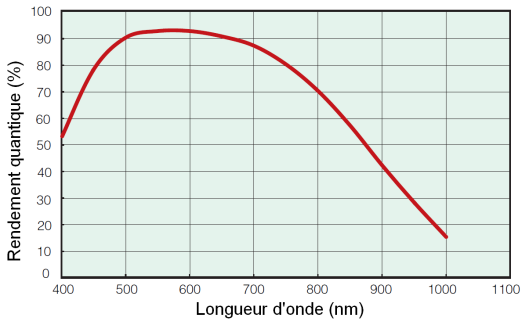


FIGURE 3.14.: Rendement quantique de la caméra *Hamamatsu EMCCD C9100-13* en fonction de la longueur d'onde. Le rendement est constant et supérieur à 90% dans le vert ce qui permet une très bonne détection des fluorophores comme l'Alexa 488. Extrait de [7].

Nous avons travaillé avec une caméra refroidie *Hamamatsu EMCCD C9100-13* dont les principales propriétés sont regroupées dans le tableau 3.2. Les images ont été acquises en pleine résolution (512x512 pixels) avec un temps d'exposition de 100 ms. Ce temps est assez grand pour collecter un nombre suffisant de photons et avoir un rapport signal sur bruit supérieur à 10 [3].

Type	C9100-13
Nombre de pixels	512x512
Taille du pixel	16x16µm
Gain EM	1-1200
Vitesse de lecture	31.9-404 images/s
Temps d'exposition (plein champ)	30.5 ms
Erreur de lecture (EMCCD)	1 électron à G=1200
Température	-65°C
Courant d'obscurité	0.01 électron/pixel/s

TABLE 3.2.: Spécifications sur la caméra *Hamamatsu EMCCD C9100-13*.

3.2.4. Réglage du TIRF

Dans cette section nous allons décrire les étapes de la mise en place du montage pour aligner le faisceau laser dans le microscope afin d'obtenir une illumination en onde évanescente.

1. **Aligner le faisceau de manière à entrer dans le microscope :** quatre

3. Pour l'imagerie de molécules uniques, un rapport signal sur bruit > 4 est indispensable pour avoir une précision nanométrique. (voir section 3.4)

miroirs M_{1-4} sont placés sous forme d'un rectangle de manière à faire tourner le faisceau autour du microscope (figure 3.15). Nous avons choisi cette configuration pour avoir deux miroirs $M3$ et $M4$ permettant l'ajustement du faisceau à l'intérieur du microscope et faciliter ainsi l'alignement. Le miroir $M4$ est monté sur une table coulissante et sert à régler l'angle incident.

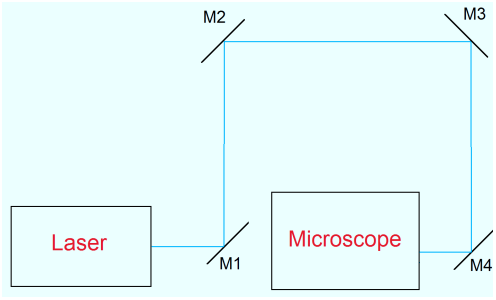


FIGURE 3.15.: Alignement du faisceau laser autour du microscope. M :mirroir.

2. **Alignement du faisceau à la sortie du microscope :** à la place de l'objectif est monté un cylindre portant 2 trous sténopéïques à ses extrémités. La lame dichroïque étant fixe, le faisceau laser est ajusté à l'aide des miroirs $M3$ et $M4$ de façon à l'aligner avec l'axe du cylindre (figure 3.16). Ainsi, le faisceau est vertical et centré à la sortie du microscope et permet d'avoir une troisième référence au plafond de la salle.

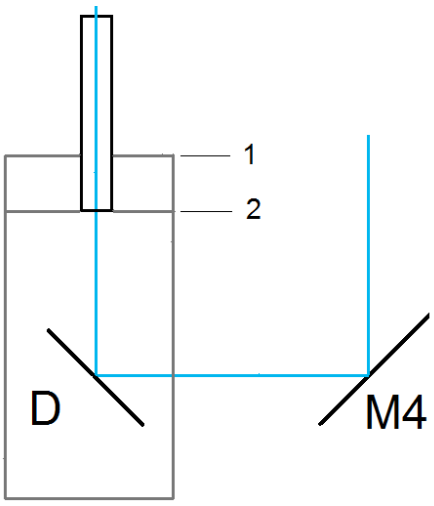


FIGURE 3.16.: Alignement du faisceau laser dans le microscope. M : miroir, D : lame dichroique, 1 : plan de l'échantillon, 2 : plan focal arrière de l'objectif.

3. **Focalisation du faisceau sur le plan focal arrière de l'objectif :**pour ce faire, l'objectif (*Olympus 100x, NA=1.45*) est mis en place et une lentille est

montée à l'entrée du microscope. Sa position est ajustée jusqu'à l'obtention d'un faisceau collimaté à la sortie de l'objectif (figure 3.17). Ainsi tous les rayons incidents sont parallèles et la réflexion totale à la surface du verre peut être obtenue.

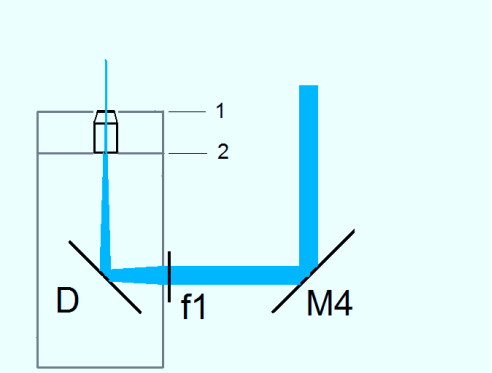


FIGURE 3.17.: Focalisation du faisceau sur le plan focal de l'objectif. M : miroir, D : lame dichroïque, f1 : lentille, 1 : plan de l'échantillon, 2 : plan focal arrière de l'objectif.

4. **Translation du miroir et passage en mode d'onde évanescente :** avant de passer en mode TIRF, on place sur une lamelle de microscope une goutte d'une solution qui contient des nanocristaux (NCs) pendant 5 minutes ce qui va permettre l'adsorption non spécifique des NCs sur la surface du verre. Par la suite, la lamelle est rincée et une seconde goutte d'eau pure est déposée. La lamelle est ensuite montée sur le microscope puis observée sur la caméra. La position de l'objectif est réglée pour l'observation des NCs. Ici, il est important de vérifier que le faisceau est toujours collimaté, sinon il faut ajuster la position de la lentille f1 (étape précédente). A ce stade, on peut déplacer la table coulissante pour changer la position du faisceau à l'entrée de l'objectif. A l'interface entre l'eau et le verre, une réfraction a lieu et l'angle du faisceau collimaté varie en fonction du déplacement du miroir M4. A un angle égal à θ_c, il disparaît de la sortie de l'objectif ce qui indique une réflexion totale et le faisceau réfléchi ressort du microscope (figure 3.18).

   Pour vérifier qu'il s'agit bien d'une réflexion totale, il faut comparer les deux images de la caméra (épifluorescence et onde évanescente, figure 3.11). On remarquera un rapport signal/bruit nettement meilleur en mode d'onde évanescente. En choisissant une concentration faible en NCs au départ (0.1 nM), plusieurs spots individuels très brillants sont détectés. Leur clignotement est une

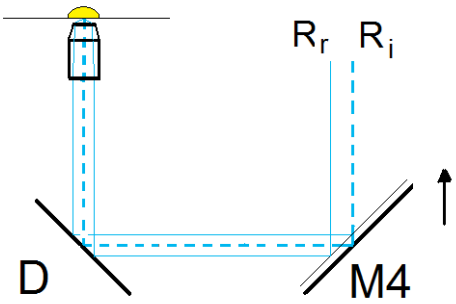


FIGURE 3.18.: Réflexion totale à l'interface entre le verre et l'eau. M : miroir, D : lame dichroïque, R_i : rayon incident, R_r : rayon réfléchi.

autre preuve de leur unicité. Pour vérifier la qualité de l'illumination obtenue, on pose une autre goutte de la solution initiale en NCs (typiquement c=5 nM) sur la lame de verre. Le rapport signal/bruit ne doit pas changer en mettant la solution de NCs puisque le volume excité est limité à une profondeur d'environ 100 nm. Dans le cas où le rapport signal/bruit diminue, il faut ajuster l'angle par la translation du miroir jusqu'à obtenir la meilleure image possible.

Homogénéité de l'illumination en onde évanescente

Cette étape expérimentale permet d'améliorer la qualité de l'illumination de l'échantillon (homogénéité, centralité, ellipticité) et s'avère nécessaire dans le cas de l'utilisation de fluorophores organiques puisque les propriétés de l'éclairage influencent la durée de vie de ces derniers et pourraient donc limiter fortement leur usage [4]. La taille du champ éclairé par onde évanescente dépend de plusieurs paramètres dont la taille du faisceau laser et la distance focale de la lentille de focalisation. Afin d'obtenir une illumination homogène sur tout le champ éclairé et donc d'exploiter au maximum la surface de la caméra, il est important de régler la taille du faisceau laser de manière à ce qu'elle soit égale à la longueur/largeur du capteur par l'intermédiaire du télescope de lentilles.

Pour une surface active du capteur de 512×512 pixels et une taille de pixel de 16×16 μm, on trouve une surface de 82x82 µm sur l'échantillon avec un objectif 100x. Par ailleurs, la lentille de focalisation doit se situer à l'extérieur du microscope et doit donc posséder une longueur focale minimale de 25cm. En tenant compte de la taille finie de l'entrée de l'objectif et de la largeur de la lame dichroïque, nous avons

4. Ces modifications n'apportent toutefois pas d'amélioration sur le rapport signal/bruit, celui-ci étant dépendant uniquement de l'angle d'incidence.

abouti à un facteur de grossissement optimal de 4 et nous avons donc opté pour 2 lentilles[5] f_2=15 cm et f_3=60 cm pour obtenir un faisceau de largeur à mi-hauteur égale à 37.2 µm à la sortie de l'objectif (figure 3.19.a).

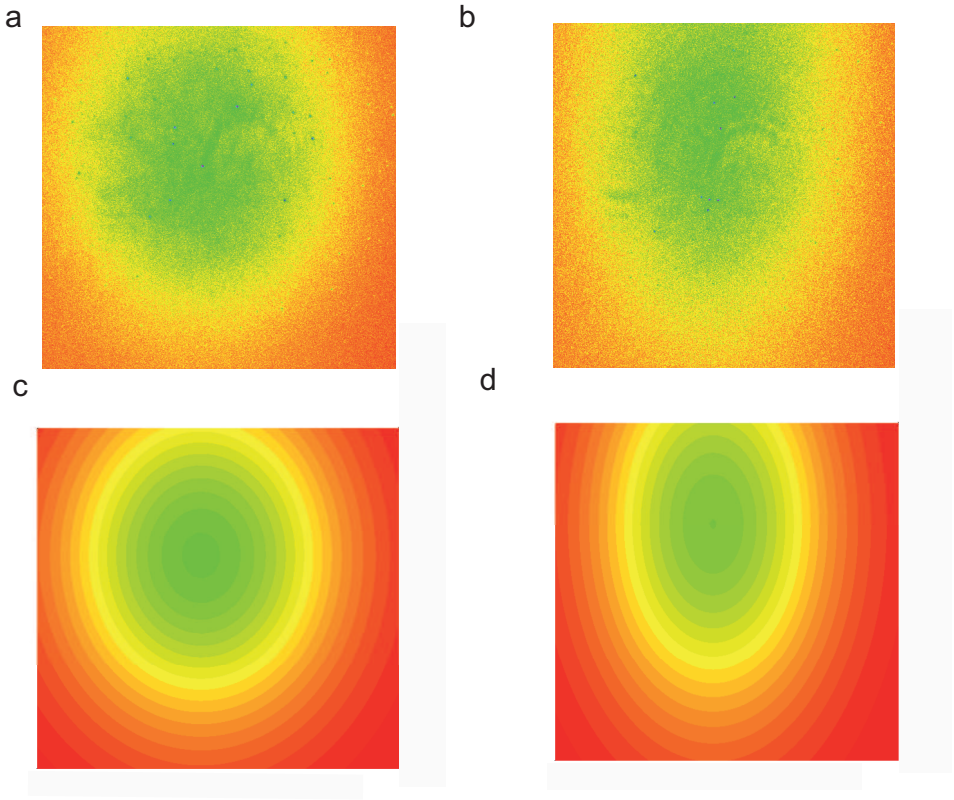


FIGURE 3.19.: Profil d'intensité du laser. a) en épifluorescence. b) en onde évanescente. c) l'ajustement 2D aboutit à un diamètre de 37.2 ± 0.4 µm et une ellipticité de 0.09. d) l'ajustement 2D aboutit à un diamètre à mi-hauteur de 78.4 ± 0.7µm pour une ellipticité de 0.38.

Pour mesurer la taille du faisceau, on se place en épifluorescence puis on prend une image d'une lame de verre nue sur laquelle a été déposée une goutte d'eau. Sur la caméra, on obtient une distribution gaussienne de l'intensité du fond dont le profil révèle celui du faisceau. Ainsi en réalisant un ajustement bidimentionnel sur cette image, les propriétés (largeur à mi-hauteur, ellipticité) du faisceau peuvent être mesurées. La figure 3.19 nous montre un exemple du profil du laser. En mode d'onde évanescente, il devient possible de calculer l'angle d'incidence du faisceau. En effet, sa largeur augmente dans la direction de l'inclinaison ce qui nous permet de remonter à l'angle en mesurant l'ellipticité du spot suivant la formule $\alpha = arccos(\frac{d}{D})$ (figure

5. Dans un second temps, nous avons utilisé un téléscope commercial qui permet de moduler la taille du faisceau de façon plus simple.

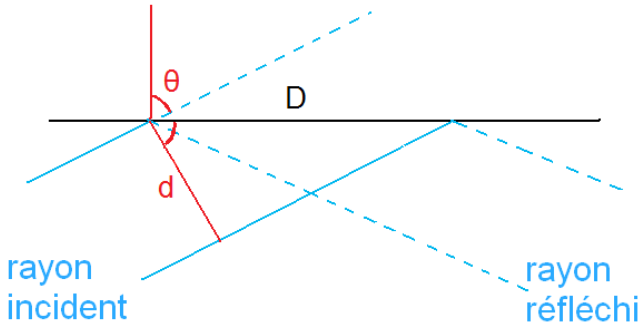


FIGURE 3.20.: Réflexion totale à l'interface entre le verre et l'eau.

3.20). Dans l'exemple présenté, nous obtenons un angle de 62° correspondant à l'angle critique pour la réflexion totale.

3.3. Calibration du système optique

Dans la section précédente, nous avons décrit les différentes étapes pour réaliser un montage de microscopie à onde évanescente. Dans cette section, nous présentons les différentes expériences effectuées pour calibrer le système afin d'étudier l'interaction des enzymes avec leur substrat. Nous commençons par des mesures de la réponse impulsionelle du microscope (PSF) puis étudions le photoblanchiment des fluorophores utilisés.

3.3.1. Calcul de la réponse impulsionnelle PSF

La réponse impulsionnelle d'un microscope, appelée également fonction de l'étalement du point ou PSF, correspond à la sortie d'un système optique soumis à une implusion d'entrée. Elle est donnée par la fonction de Bessel et sa largeur vaut environ 250 nm [Sax97]. Pour déterminer expérimentalement la PSF d'un système optique, une source lumineuse d'une taille nanométrique est observée. Sa largeur à mi-hauteur est ensuite calculée à l'aide d'un ajustement bidimentionnel du profil d'intensité obtenu. Grâce à leur forte émission et leur taille inférieure à la limite de diffraction, les nanocristaux sont bien adaptés pour déterminer la PSF du système. Une solution de Quantum-dots 525 (Qds, Invitrogen) est donc déposée sur une lamelle nettoyée au plasma pendant quelques minutes puis rincée avec de l'eau pure pour éliminer les QDs en solution et ne garder que ceux adsorbés sur la surface. Une goutte d'eau est ensuite déposée sur la lamelle et celle-ci est observée au microscope. Il est important

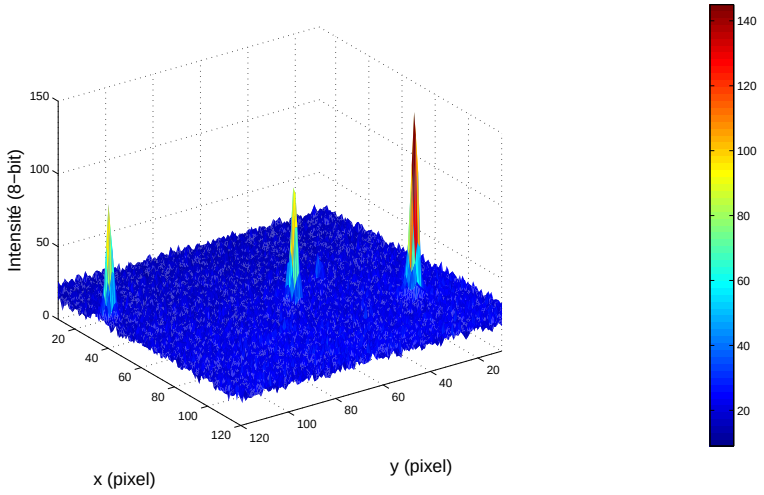
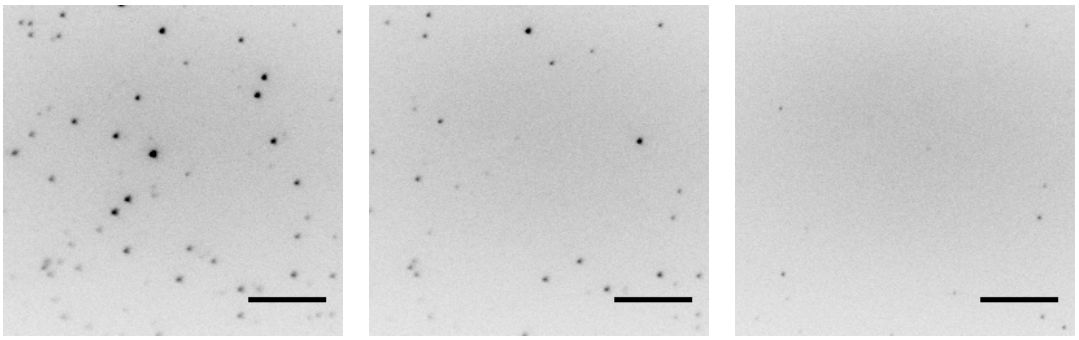


FIGURE 3.21.: Profil d'intensité de QDs observés par microscopie à onde évanescente. Temps d'acquisition : 100ms. Le rapport signal sur bruit très élevé permet une précision de localisation de quelques nanomètres seulement. La largeur à mi-hauteur obtenue pour la PSF en x et y est : 380 nm.

de ne pas saturer la caméra pour avoir une bonne mesure de la taille de la PSF. Le gain de la caméra est donc ajusté de façon à avoir un bon rapport signal sur bruit sans saturer le signal. Dans la figure (3.21) est présenté le profil d'intensité de trois Qds sélectionnés sur une zone de 100×100 pixels. Le clignotement de ces derniers permet de vérifier qu'il s'agit bien d'un signal émis par un objet unique. Une image est alors prise avec un temps d'acquisition de 100 ms. Cette image est ensuite traitée pour extraire le nombre de spots détectés et la forme de la PSF par un ajustement gaussien. La moyenne sur un total de 100 spots permet de mesurer une PSF de largeur caractéristique 380 nm. Cette valeur est plus grande que la valeur théorique ($\approx$ 250 nm) ce qui est probablement dû aux aberrations du système optique. Après avoir mesuré la PSF du microscope, nous avons observé des fluorophores organiques au microscope de taille plus petite (quelques nm contre quelques dizaines de nm) et vérifié que la PSF mesurée était identique à celle obtenue pour les QDs. Ces fluorophores organiques ont toutefois l'inconvénient de se dégrader rapidement en présence d'oxygène ($t \approx 3\ s$ sous $\ I = 500\ W/cm^2$). Ce phénomène est appelé photoblanchiment et représente le principal facteur qui limite notre étude de phénomènes biologiques à l'échelle de la molécule unique en microscopie de fluorescence. Sa caractérisation fait l'objet de la section suivante.

3.3.2. Étude du photoblanchiment des fluorophores Alexa 488



(a) t=0 s. (b) t=2 s. (c) t=4 s.

FIGURE 3.22.: Photoblanchiment du Fluorophore Alexa 488. Observation en microscopie à onde évanescente de molécules uniques d'Alexa 488. P=400 W/cm^2, échelle=10 µm.

Le photoblanchiment désigne le déclin soudain et irréversible de la fluorescence d'un fluorochrome, qui est dû à une photodégradation par des dérivés oxygénés/azotés réactifs. En effet, lorsqu'un fluorochrome est excité, il peut passer de l'état singulet à l'état triplet et devient susceptible d'interagir chimiquement avec les radicaux libres (généralement d'oxygène ou d'azote) dans une réaction qui empêche son retour à l'état singulet et donc son excitation ultérieure. Le photoblanchiment d'un fluorophore unique est stochastique avec une probabilité de photoblanchiment p_b par unité de temps constante, qui dépend uniquement des conditions expérimentales et de la structure de la molécule. La distribution des temps de vie des fluorophores suit alors une loi exponentielle de paramètre t_c. Ce temps est appelé le temps caractéristique de photoblanchiment et doit être déterminé dans toutes nos conditions expérimentales pour pouvoir extraire la distribution des temps d'interaction et séparer les évènements d'interaction des événements de photoblanchiment (voir section 4.2.2). La probabilité de photoblanchiment p_b est directement proportionnelle à l'intensité d'excitation.Le temps caractéristique de photoblanchiment (t_c=1/p_b) est alors inversement proportionnel à l'intensité d'excitation P_0.

$$p_b \propto P_0 \Rightarrow t_c \propto \frac{1}{P_0} \tag{3.5}$$

Cette relation est valable jusqu'à un seuil, qui vaut 10^3 W/cm^2 pour la rhodamine par exemple où des effets de saturation commencent à entrer en jeu [Egg98].

Pour déterminer le temps caractéristique de photoblanchiment ainsi que le taux de couplage expérimentalement, nous avons incubé une solution contenant 1 nM de la protéine NucS marquée avec le fluorophore Alexa 488 sur une lamelle de verre préalablement rincée avec l'éthanol et l'acétone puis nettoyée au plasma pendant 10 min. Nous avons ensuite rincé la lame de verre avec un tampon HEPES [6] à pH=8 contenant 50 mM de NaCl pour garder uniquement les particules adsorbées sur la surface que nous avons observées au microscope. L'acquisition des images se fait comme suit : (i) le plan focal est déterminé à l'aide du laser en changeant la position axiale de l'objectif jusqu'à l'obtention d'une image contenant un nombre suffisant de particules uniques visibles, (ii) le laser est éteint, une seconde zone est choisie par translation de la table du microscope et (iii) une vidéo est prise avec une cadence de 10 images par seconde et le laser est allumé. Lorsque tous les points initialement visibles ont photoblanchi, la vidéo est arrêtée puis analysée pour détecter chaque spot détecté et mesurer sa durée d'émission.

La figure (3.22) montre un exemple d'une disparition stochastique des fluorophores en fonction du temps due au photoblanchiment. Certains spots s'éteignent en suivant plusieurs étapes : l'intensité diminue par sauts de même amplitude. Il s'agit ici d'un multiple marquage de la protéine avec le fluorophore [7]. L'extinction du signal se fait alors en plusieurs marches et le nombre de marches indique le nombre de fluorophores par protéine. Dans la figure (3.23) est tracé le signal émis par quelques fluorophores en fonction du temps.

Nombre de marches	1	2	plus que 2	Total
Total des spots	147	16	3	166
Pourcentage	89%	9%	2%	100%

TABLE 3.3.: Caractérisation du couplage de la NucS avec le fluorophore Alexa 488.

Le tableau (3.3) présente le nombre d'événements observés en fonction du nombre de marches sur un total de 166 spots. Nous constatons que 89% des protéines sont

6. Acide 4(-2-hydroxyléthyl9-1-)pipérazine éthane sulfonique

7. Il peut également s'agir d'un multimère de protéines, mais avec les faibles concentrations utilisées, ceci est peu probable.

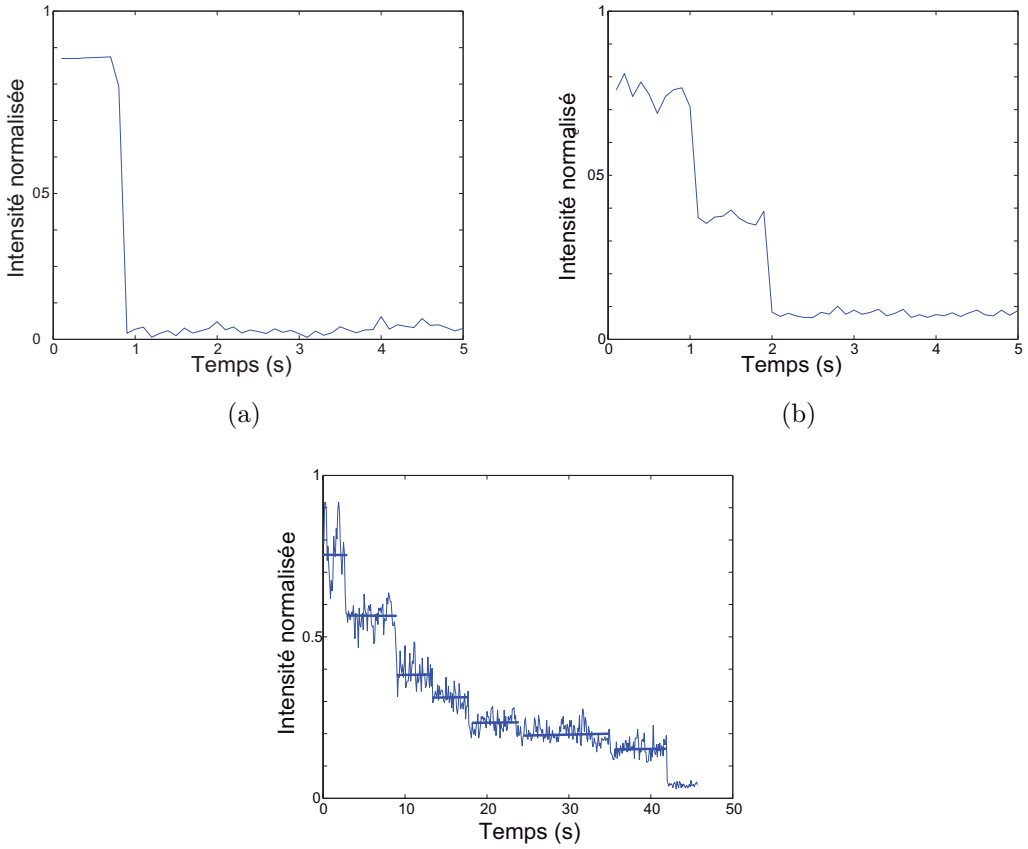
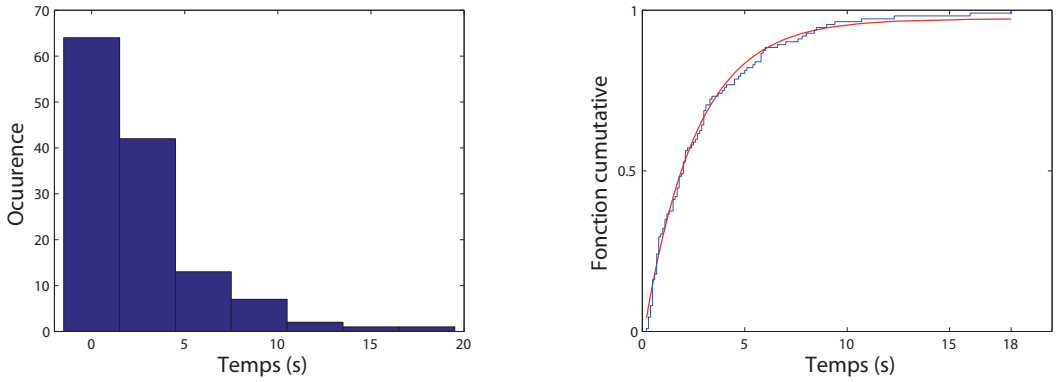


FIGURE 3.23.: Exemples de photoblanchiment par marche. (a) Evénement unique. (b) Événement à 2 marches : l'intensité est divisée par deux suite à l'extinction du premier fluorophore ce qui prouve qu'il s'agit de 2 fluorophores couplés à la même protéine. (c)Événement à 7 marches ce qui correspond au photoblanchiment de 7 fluorophores.

marquées avec un seul fluorophore ce qui atteste d'un ratio de marquage d'un fluorophore par protéine. Pour notre étude du photoblanchiment, nous avons uniquement sélectionnés les spots à évènement unique et nous avons reconstitué la distribution des temps de vie des NucS marquées A488 puis tracé la fonction de distribution cumulative que nous avons ajusté avec la fonction (figure 3.24) :

$$f(t) = 1 - e^{-t/t_c} \tag{3.6}$$

A partir de l'ajustement, nous estimons le temps caractéristique de photoblanchiment à $t_c = 2.1s \pm 0.06s$ pour une irradiance de 400 W/cm^2. La distribution des temps de vie est exponentielle, ce qui atteste de la présence d'une seule population dans l'échantillon.



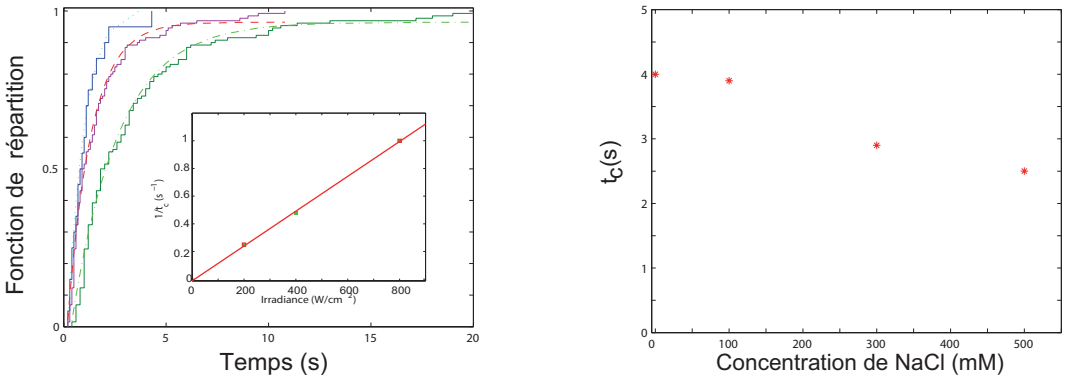
(a) (b)

FIGURE 3.24.: Distribution des temps de photoblanchiment du fluorophore Alexa 488 couplé à NucS. a. Histogramme et b. Fonction cumulative (bleu) et ajustement (rouge) avec l'équation 3.6 pour $t_c = 2.1\ s$.

Effet de l'intensité, de la concentration en sel et de la température

Dans le cadre de la calibration du système et dans le but de trouver les meilleures conditions expérimentales, nous avons étudié l'effet de l'irradiance sur le photoblanchiment. Nous avons ainsi varié la puissance du laser et mesuré le temps caractéristique de photoblanchiment t_c pour chaque puissance. Nous avons alors obtenu pour les irradiances 200, 400 et 800 W/cm^2 les temps caractéristiques respectifs suivants : 4.0 $\pm 0.1s$, 2.1 $\pm$ 0.1 s et 1 $\pm 0.03s$ (figure 3.25.a) . Nous observons que t_c est inversement proportionnel à la puissance du laser, comme attendu. Afin de maximiser la durée de vie des fluorophores, il est avantageux de travailler avec de faibles puissances laser. Toutefois, la détection de molécules uniques et leur localisation nanométrique nécessitent un nombre minimal de photons ($\approx$1000) détectés par fluorophore pour une précision de localisation de 15 nm. Il est par conséquent indispensable de trouver un compromis entre l'intensité d'illumination et la limite de détection. Nous avons choisi de travailler avec une irradiance de 400 W/cm^2 qui permet d'avoir une précision de localisation de 12 nm (voir section 3.4.2). Le temps caractéristique associé à cette puissance est de 2.1 s et les interactions observées sont alors limitées par ce temps.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la salinité sur le photoblanchiment des fluorophores Alexa 488 couplés à NucS. Nous avons alors répété les expériences précédentes tout en variant la concentration en sel du tampon et nous avons déterminé le temps caractéristique correspondant à chaque concentration (figure 3.25.b). Nous avons observé que le temps caractéristique de photoblanchiment



(a) (b)

FIGURE 3.25.: a. Effet de la puissance du laser sur le photoblanchiment : Fonction de distribution cumulative des temps de photoblanchiment du fluorophore Alexa 488 en fonction de la puissance du laser : Le taux de photoblanchiment croît avec la puissance d'où la décroissance des temps caractéristiques en fonction de la puissance. b. Influence de la concentration de NaCl sur le photoblanchiment

diminue en fonction de la concentration en sel et qu'il est donc préférable de travailler dans des conditions de faible salinité pour augmenter la durée de vie du fluorophore. En tenant compte des conditions physiologiques des protéines, nous avons choisi pour nos premières mesures, une solution de HEPES à 20 mM et de NaCl à 50 mM puisqu'elle permet d'observer une activité enzymatique dans les tests de mesure d'ensemble [Ren09, Cre12]. Les résultats seront discutés par la suite. Par ailleurs, nous avons vérifié que le temps caractéristique de photoblanchiment était égal à 2.1 s pour les températures auxquelles nous avons travaillé (23 °C et 45 °C).

Solution antiphotoblanchiment GODCAT

Le photoblanchiment est une conséquence de l'interaction des fluorophores dans l'état excité avec le dioxygène (O_2) en solution qui provoque la dégradation du fluorophore. Une observation plus longue des fluorophores pourrait être possible par une réduction de l'oxygène dans la solution, par exemple par des réactions chimiques. Il existe plusieurs réactifs susceptibles d'interagir avec le O_2 tels que l'acide ascorbique ou l'actylcystéine. Pour l'imagerie de molécules uniques, des enzymes comme la glucose-oxidase (GOD) et la catalase (CAT) ont été proposées pour faire réagir l'oxygène avec le glucose et le réduire en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier va ensuite être décomposé en oxygène et eau. L'ensemble des équations de la réaction s'écrit comme suit :

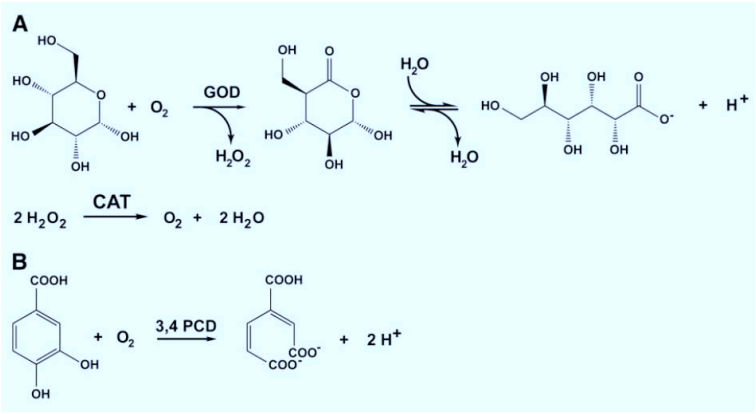


FIGURE 3.26.: Schéma des réactions chimiques du GODCAt et du PCA/PCD avec le dioxygène. (A) Sous l'influence de la glucose oxidase le glucose interagit avec le O_2 pour donner l'acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est réduit par la catalase. (B) Le PCA est réduit en 3-carboxy-cis,cis-muconate sous l'effet de la PCD. Cette réaction consomme le O_2. D'après **Aitken et al.**, [Ait08].

$$\beta - D - Glucose + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} acide\ \ gluconique + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{catalase} H_2O + 1/2O_2$$

Après chaque cycle, le nombre de molécules de O_2 libres est réduit à la moitié ce qui augmente la stabilité des fluorophores. D'autres désactivateurs des états triplets comme le mercaptoéthanol ou le trolox[8] peuvent aussi être utilisés pour favoriser encore plus la photostabilité et garantir une émission constante de la fluorescence [Ait08].

Solution antiphotoblanchiment PCA et PCD

Une autre méthode qui permet de rallonger le temps caractéristique de photoblanchiment se trouve dans l'utilisation du couple PCA et PCD [Ait08]. Le PCD est l'abréviation de protocatechuate 3,4-dioxygenase qui est une enzyme appartenant à la famille des oxidoréductases et qui catalyse la réaction de l'acide protocatéchique PCA avec le dioxygène (figure 3.26). Une étude comparative entre les deux solutions a été proposée par **Aitken et al.**. Les tests ont été faits à une concentration finale inférieure à 20 µM de O_2 dissout pour les deux systèmes. Une mesure de l'absorption à 290 nm permet d'observer la cinétique de consommation de l'oxygène en solution (fi-

8. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

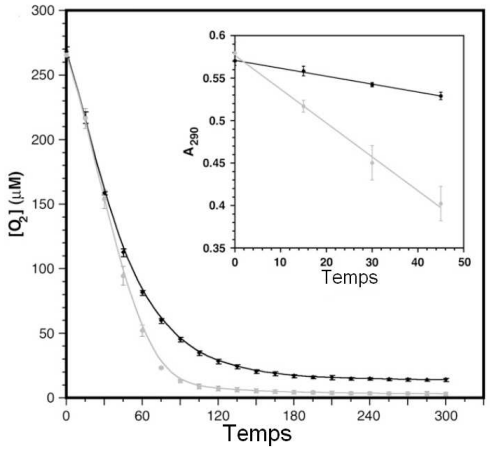


FIGURE 3.27.: Désoxygénation d'une solution par le GODCAT (noir) et le PCD/PCA (gris). L'absorption à 290 nm permet de mesurer la cinétique de cette réduction de l'oxygène. D'après **Aitken et al.**, [Ait08].

gure 3.27). La concentration minimale est atteinte après quelques minutes seulement et le système reste stable. En comparant les résultats des tests de photoblanchiment effectués avec les deux solutions, **Aitken et al.** ont relevé une augmentation plus importante de la durée de vie moyenne des fluorophores Cy3, Cy5 et Alexa 488 avec la solution PDA/PCD (figure 3.28).

Le système PCD/PCA possède nombreux avantages par rapport au système GODCAT. D'une part, le contrôle de la réduction de l'oxygène est plus facile puisqu'il s'agit d'une seule réaction. D'autre part, il permet d'éviter la production du peroxyde d'hydrogène potentiellement réactif. De plus, le GODCAT peut limiter la détection des molécules uniques à cause de la fluorescence de la flavine qu'il contient. PCD/PCA permet donc de contourner toutes ces limitations et constitue une alternative au GODCAT. Il permet de conserver une faible concentration de O_2 dans la solution pendant plusieurs heures. Par ailleurs, il est commercialement disponible et reste stable pendant plusieurs mois [Pat00].

Nous avons effectué des tests avec les deux solutions antiphotoblanchiment. Dans le cas de l'utilisation du GODCAT, nous n'avons pas obtenu d'augmentation remarquable du temps caractéristique de photoblanchiment t_c= 2.3±0.1 s. En utilisant le système PCD/PCA en revanche, nous avons obtenu t_c=3.8±0.1 s. Nous attribuons ces améliorations relativement faibles par rapport aux mesures de **Aitken et al.** au fait que les chambres que nous utilisons ne sont pas imperméables au gaz ce qui réduit considérablement l'efficacité des solutions antiphotoblanchiment et rend l'améliora-

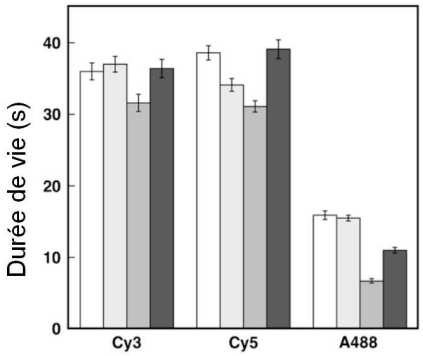


FIGURE 3.28.: Comparaison des durées de vie des fluorophores Cy3, Cy5 et Alexa 488 dans les conditions suivantes : PCD 50 nM (blanc), PCD 10 nM (gris clair), GODCAT (gris) et GODCAT+PCA (gris foncé). Une amélioration des durées de vie moyennes est observée. D'après **Aitken et al.**, [Ait08].

tion obtenue insuffisante pour négliger le temps de photoblanchiment. Il est important de noter qu'en raison de la nature chimique de la méthode de réduction d'oxygène, le temps caractéristique de photoblanchiment diminue en fonction du temps puisqu'il dépend de la concentration en enzymes réductrices d'oxygène ce qui influencerait la détermination précise d'une durée d'interaction (voir section 4.2.2). Nous avons par conséquent choisi de ne pas utiliser de méthodes chimiques pour rallonger le temps d'observation.

Solution	sans AP	GODCAT	PCD/PCA
t_c	2.1	2.3	3.8

TABLE 3.4.: Temps caractéristiques de photoblanchiment du fluorophore Alexa 488 couplé à NucS pour une irradiance de 400 W/cm^2.

Illumination stroboscopique

Une autre façon d'étendre la gamme des temps accessibles se trouve dans l'imagerie stroboscopique. Ici, le temps d'observation possible est partagé sur une durée plus longue grâce à un obturateur. Dans notre système expérimental, nous avons estimé le temps de photoblanchiment à environ 2 s pour une puissance de 2 mW, ce qui correspond à 20 images avec un temps d'exposition de 100 ms. L'illumination stroboscopique permet d'enregistrer ces images à des temps différents pour rallonger la durée d'observation au détriment de la résolution temporelle. Par exemple, nous avons utilisé trois différents paramètres : 10 images/s, 2.5 images/s et 1 image/s ce

qui nous permet de rallonger le temps caractéristique d'observation à 7.8 s, 19.6 s et 36.6 s respectivement (figure 3.29). L'inconvénient de cette méthode est la perte de la résolution temporelle. Avec une acquisition discontinue, il est impossible d'observer les événements se déroulant entre chaque image. Une variation progressive de la fréquence des images est alors indispensable pour suivre la dynamique d'interaction qui nous intéresse. Comparée aux solutions chimiques, cette méthode ne modifie pas le temps de photoblanchiment et permet donc d'extraire la distribution des temps d'interaction absolus (voir section 4.2.2).

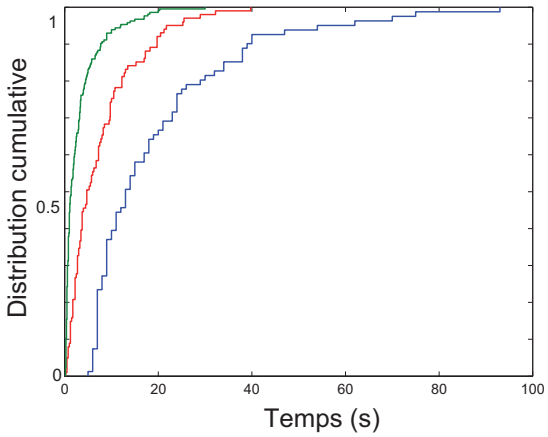


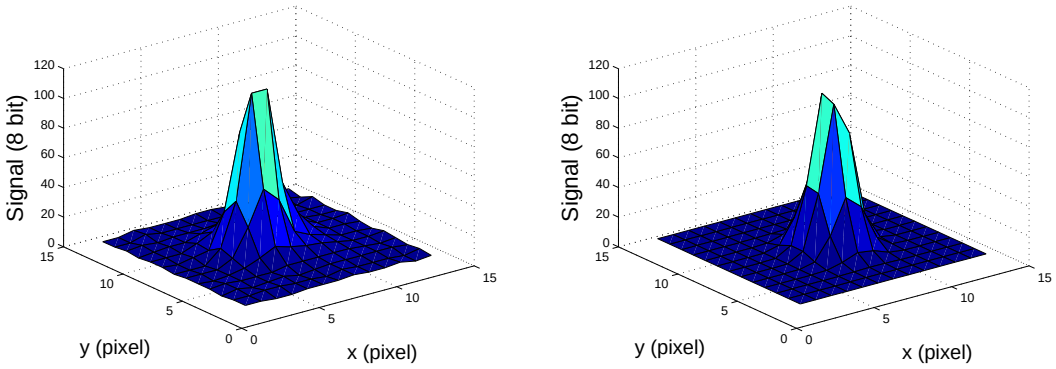
FIGURE 3.29.: Rallongement du temps de photoblanchiment par illumination stroboscopique. Fonctions cumulatives des temps de photoblanchiment aux cadences 10 images/s (vert), 2.5 images/s (rouge) et 1 image/s (bleu).

3.4. Détection de molécules uniques et superlocalisation

Dans cette section, nous nous intéressons aux différentes approches de localisation des molécules individuelles qui permettent de s'affranchir de la limite de diffraction et d'atteindre des précisions nanométriques. Ceci rend possible la mesure de grandeurs physiques associées à des processus biologiques telles que la diffusion des protéines sur leur substrat, le déplacement des moteurs moléculaires ou bien le changement conformationnel au cours d'une interaction [Wei99, Gor04, Yil03].

3.4.1. Détection et suivi de particules uniques : Principe et méthodes

Afin de détecter et suivre des particules individuelles, on les classe généralement selon leur taille et on distingue deux types de particules : (i) les particules de taille supérieure à la limite de diffraction dont la taille observée correspond à la taille réelle et dont le suivi se fait en calculant la position du barycentre et (ii) les particules de taille inférieure à la limite de diffraction dont le profil observé est donné par la réponse impulsionnelle du microscope. Dans la suite, nous allons nous limiter à l'étude de ces particules de taille nanométrique.



(a) (b)

FIGURE 3.30.: (a) Image d'une molécule individuelle NucS marquée avec le fluorophore Alexa 488. Les couleurs représentent le nombre de coups sur chaque pixel. (b) Le profil gaussien de l'intensité correspondant à celui d'un spot limité par diffraction.

La figure (3.30) représente l'image d'une particule individuelle fluorescente enregistrée sur notre caméra EMCCD en mode d'onde évanescente. En raison de la taille finie des pixels et des différentes sources de bruits dans le système (voir section 3.4.2), la tache d'Airy ne peut pas être résolue entièrement et les maximas secondaires ne sont plus visibles. Expérimentalement, le profil d'intensité détecté peut alors être approximé avec une gaussienne de la forme suivante :

$$G(x,y) = A\exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{B} - \frac{(y-y_0)^2}{C}\right) \tag{3.7}$$

où A, B et C sont des constantes qui déterminent respectivement l'amplitude et les largeurs à mi-hauteur, et x_0 et y_0 les coordonnées du centre. En effet, les différences avec la fonction de Bessel sont faibles compte tenu de la précision du système expérimental ce qui justifie l'usage efficace de la fonction gaussienne, numériquement plus

simple, pour décrire la tache de diffraction d'un objet ponctuel [Che01]. L'image de la particule fluorescente (appelée spot par la suite) est donc toujours plus grande que sa taille réelle et possède une largeur à mi-hauteur d'environ 400 nm. Pour connaître la taille finale imagée, il faut tenir compte du facteur de grossissement de l'objectif. Dans l'exemple de la figure (3.30), l'objectif utilisé est un objectif 100x d'où la taille finale de 40 µm. Avec des dimensions de 16x16 µm pour chaque pixel, la particule fluorescente s'étend sur 5 pixels. Pour localiser la particule nanométrique, on peut alors supposer qu'elle se trouve dans le pixel le plus brillant et la précision de mesure sera ainsi limitée par la taille du pixel ($\pm$ 80 nm dans notre cas). Or, étant donné que la taille du pixel est deux fois plus petite que la réponse impulsionnelle du microscope et satisfait ainsi le critère de Nyquist-Shannon, il devient possible d'exploiter toute l'information numériquement afin d'améliorer la précision de localisation. Plusieurs approches ont été développées sur le plan du traitement de signal afin d'améliorer cette précision de détection, jusqu'à une valeur de l'odre de 1 nm [Yil03, Par10].

Quatre algorithmes principaux se sont établis pour traiter les données et localiser les particules avec une précision subpixelique : la corrélation croisée, la somme des différences absolues, le barycentre et l'ajustement gaussien. Les deux premières méthodes se basent sur la comparaison de deux images consécutives pour en déduire un déplacement et les secondes estiment la position exacte dans le plan. Toutes ces méthodes présentent deux types d'erreurs : une erreur statique due à la nature même de l'algorithme introduisant systématiquement une inexactitude dans l'estimation de la position ou du déplacement. Ce type d'erreur est appelé **biais**. La deuxième erreur est une erreur dynamique qui résulte des fluctuations du signal et dépend essentiellement du rapport signal sur bruit. Elle est appelée **précision**. Étant donné que nous sommes principalement intéressés par la localisation, nous allons brièvement comparer les méthodes du fit gaussien et du calcul de barycentre pour justifier notre choix de l'ajustement gaussien comme méthode d'analyse de nos données expérimentales. Une analyse plus détaillée de ces algorithmes a été proposée par **Guilford et al.** [Che01].

Algorithme du barycentre

Cet algorithme détermine directement la position du centre du spot lumineux en calculant dans une image I le barycentre des points définis par les pixels pondérés

avec l'intensité détectée :

$$C_x = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{m}(x_i I_{ij}) / \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{m} I_{ij} \tag{3.8}$$

où x_i représente les coordonnées d'un pixel sur l'axe des abscisses et I_{ij} l'intensité associée. Cet algorithme est très sensible au seuillage appliqué pour réduire le bruit de fond et séparer le signal de la particule. En effet, comme il moyenne sur les intensités de chaque pixel, cet algorithme a tendance à biaiser le résultat vers le centre géométrique du spot lumineux pour les faibles signaux [Che01]. Sa précision dépend essentiellement de la géometrie des pixels et du seuillage. L'avantage de cet algorithme consiste en son calcul rapide et direct de la position du centre. Il est ainsi bien adapté pour estimer rapidement des grands déplacements ou des vitesses de diffusion comme celle des protéines dans une membrane [Lee91].

L'ajustement gaussien

Cet algorithme s'appuie sur un ajustement de l'image de la particule fluorescente par une fonction gaussienne bidimentionnelle (equation 3.7). La position du centre du spot est determinée à partir d'un ajustement avec une précision de localisation dépendant du nombre de photons détectés [Kub00]. L'algorithme de l'ajustement gaussien a l'avantage d'avoir un biais très faible (0.1 pixel) qui ne dépend pas du changement de la position de la particule. De même, il s'avère un algorithme très robuste pour les faibles rapports signal sur bruit jusqu'à une valeur d'environ 4 [Che01]. Il ne fonctionne par contre que pour les particules fluorescentes de taille inférieure à la limite de diffraction puisque l'ajustement se fait avec la réponse impulsionnelle.

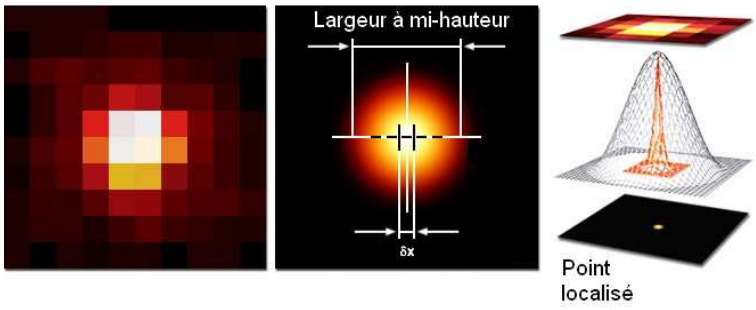


FIGURE 3.31.: Ajustement gaussien des intensités de chaque pixel : La largeur à mi-hauteur correspond à la limite de diffraction et le centre de la gaussienne peut être déterminé avec une précision allant jusqu'à 0.01 pixel [Lee91]. Extrait de [Zeiss].

Pour un rapport signal sur bruit SNR élevé, ces deux algorithmes sont très performants. L'erreur est par contre de plus en plus grande pour un SNR décroissant. Par exemple, le biais devient plus grand que 0.1 pixel pour une valeur du SNR de 4.2 pour le fit gaussien et 7.8 pour le barycentre et la précision de localisation devient supérieure à 1 pixel pour une valeur du SNR inférieure à 4 pour le fit gaussien, et 6.6 pour le barycentre [Che01]. En comparaison directe, nous voyons que l'ajustement gaussien est plus performant puisqu'il permet de descendre jusqu'aux très faibles SNR. De plus, il est insensible au seuillage de l'intensité ce qui justifie notre choix de ce dernier comme algorithme de détection des particules individuelles fluorescentes [9].

3.4.2. Rapport signal sur bruit

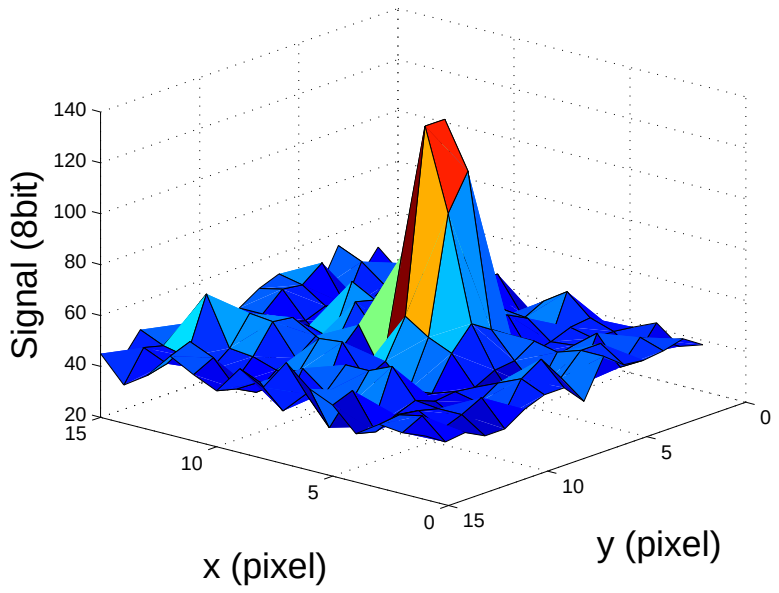
Pour connaître les limites de détection du système expérimental, il est nécessaire de caractériser le rapport signal sur bruit des images. Ce dernier est une mesure de la qualité du signal et détermine la résolution spatiale de localisation. Il est aussi nommé rapport signal à bruit ou SNR et s'écrit sous la forme suivante [10] [Yil03] :

$$SNR = \frac{I_0}{\sqrt{I_0 + b^2}} \tag{3.9}$$

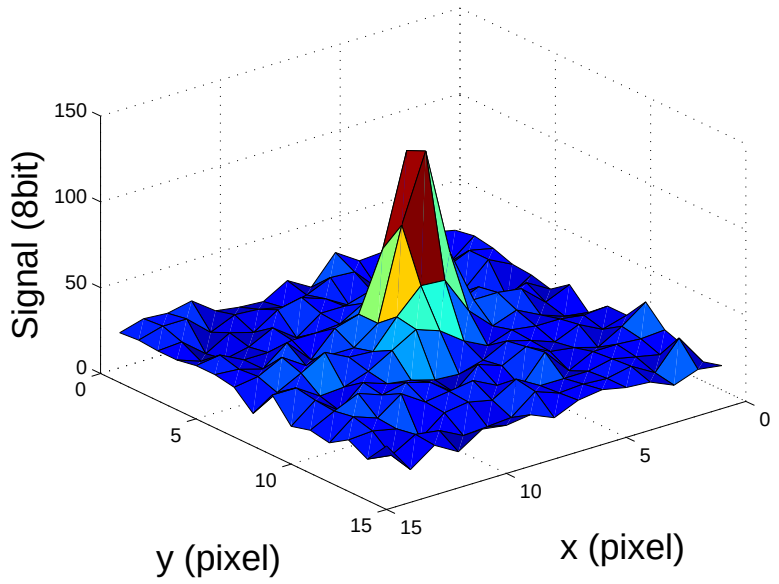
où I_0 désigne l'intensité maximale du spot lumineux au dessus du fond et b l'écart-type du bruit. Il existe quatre sources de bruit différentes : (i) le bruit thermique qui augmente avec le temps d'exposition et qui est négligeable dans nos expériences puisque la caméra est refroidie à -65°C et le temps d'exposition est court, (ii) le bruit de pixelisation qui provient du fait que chaque pixel possède une taille finie, (iii) le bruit de lecture et (iv) le bruit quantique qui est dû à la nature quantique du signal. Nous verrons dans la suite que nous nous trouvons dans un régime où le bruit quantique est dominant. Dans la section précédente, nous avons vu que le SNR est le facteur qui limite l'utilisation des différents algorithmes ayant pour but de minimiser l'incertitude sur la localisation et qu'un SNR supérieur à 4 est indispensable pour une localisation subpixelique. En utilisant la caméra EMCCD à amplification maximale (G=1200) sous une irradiance incidente de 400 W/cm^2 et pour un temps d'exposition de 100 ms, nous avons obtenu un SNR $\approx$ 25 en épifluorescence et $\approx$30 en onde évanescente pour la protéine NucS marquée avec le fluorophore Alexa 488

9. Dans notre analyse, nous détectons d'abord les maxima locaux puis effectuons un ajustement gaussien pour en déduire la position exacte.

10. D'autres auteurs définissent le rapport signal sur bruit comme suit [Che01] : $SNR = (I_0 - I_b)/\sqrt{N}$. Nous avons préféré l'approche de **Kubitscheck et al.** qui est plus générale.



(a)



(b)

FIGURE 3.32.: Comparaison du SNR pour les deux modes d'illumination dans les conditions expérimentales suivantes : puissance laser : 2mW à la sortie de l'objectif, temps d'exposition : 100ms, gain de la caméra : maximum (8 bit). (a) Illumination en épifluorescence : Le signal maximum détecté de la particule vaut 134 coups. Celui du fond est égal à 47 avec un écart type b= 14. Le SNR vaut alors 24. (b) Illumination en onde évanescente : I_{max}=134 et b=11. Le SNR calculé est égal à 30. En comparaison, cette amélioration de 20% confirme la supériorité de la microscopie à onde évanescente, même si les 2 signaux sont très forts en raison de la qualité de surface.

(figure 3.32). Ceci correspond à une amélioration de 20 % entre les deux illuminations et confirme la supériorité de l'illumination en onde évanescente pour l'observation des molécules uniques même si les deux signaux sont proches en raison de la qualité de la surface nettoyée au plasma et de l'absence de fluorophores en solution.

Le bruit de fond est plus important dans le cas de l'épifluorescence (47 coups en moyenne) que dans le cas de l'onde evanescente (30 coups en moyenne, figure 3.32). Étant donné que nous avons travaillé sur une surface très propre et dans une milieu qui ne contient pas de molécules en solution, cette différence est due au signal parasite collecté dans le volume excité qui s'étend sur tout l'échantillon en épifluorescence. Ce dernier reste toutefois petit devant le signal total collecté du fluorophore (environ 1000 coups par fluorophore Alexa 488), ce qui indique que nous nous trouvons bien dans un régime dominé par le bruit quantique. En ajoutant des NucS marquées avec le fluorophore Alexa 488 dans la solution, nous remarquons que le SNR décroît en fonction de la concentration de NucS et que cette décroissance est beaucoup plus importante en épifluorescence qu'en TIRF. On obtient typiquement un $SNR_{epi} \approx 15$ et un $SNR_{TIRF} \approx 30$ pour une concentration de 50 pM de NucS. Cette insensibilité de l'illumination en onde évanescente à la concentration constitue un avantage crucial. Au delà de 200 pM, la détection des molécules uniques en épifluorescence est impossible alors que le SNR_{TIRF} reste supérieur à 20.

3.4.3. Précision de localisation

Approche théorique

Théoriquement, une étude approfondie a été proposée par **Thompson et al.** pour caractériser l'incertitude sur la localisation. En prenant en considération les différentes sources d'incertitude, cette étude a établi la formule suivante pour l'écart type sur la position d'un objet individuel fluorescent mesuré par un système optique donné [Tho02] :

$$\sigma_{\mu,i} = \sqrt{\frac{s_i^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}} \tag{3.10}$$

où N représente le nombre de photons détectés, a la taille d'un pixel, b l'écart type du fond et s_i la largeur à mi-hauteur de la PSF du spot centré à $\mu = (x_0, y_0)$ dans la direction i. Les trois termes de l'équation correspondent respectivement au bruit de photons, au bruit de pixelisation et au bruit de fond (signal parasite, bruit de lecture, bruit thermique).

Le premier terme peut être interprété comme suit : chaque fluorophore émet N photons répartis sur le capteur avec une densité de probabilité donnée par la largeur de la PSF du microscope. Chaque photon émis par la particule donne alors une mesure de l'emplacement de celle-ci avec une erreur égale à la largeur à mi-hauteur de la PSF s. Avec N photons, sa position peut alors être déterminée avec une incertitude égale à, $< \Delta x^2 >= \frac{s^2}{N}$. A cette incertitude, s'ajoute le bruit dû à la taille finie des pixels et que l'on peut estimer à partir de la variance d'une fonction rectangulaire de largeur égale à la taille du pixel a. L'écart type sur la position vaut alors $< \Delta x^2 >= \frac{a^2/12}{N}$. Le troisième terme $\frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}$ correspond au bruit de fond qui comprend le bruit thermique, le bruit de lecture et le bruit des photons parasites qui proviennent d'autres plans que le plan focal. Dans l'équation (3.10), on remarque que les bruits de photon et de pixellisation varient comme $1/\sqrt{N}$ alors que le bruit de fond est une fonction de $1/N$. Ceci indique l'existence de deux régimes : un régime où un grand nombre de photons est détecté et où le bruit des photons est dominant et un régime à faible nombre de photons où le bruit de fond est dominant. Il est essentiel alors de réduire au maximum les sources de bruit extérieures afin d'obtenir une précision de localisation raisonnable. La transition entre les deux régimes se fait à partir d'un nombre de photons égal à :

$$N_t = \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2(s^2 + a^2/12)} \tag{3.11}$$

D'après l'équation (3.11), le nombre de photons minimal (a=160 nm et b=3) pour passer entre les deux régimes est N_t=34 photons. Comme le nombre de photons détectés en général est supérieur à 100, nous pouvons conclure que nous nous trouvons toujours dans un régime où le bruit photonique est dominant. Par souci de simplicité, nous allons par conséquent simplifier l'équation (3.10) et utiliser par la suite la formule suivante pour le calcul de la précision de localisation :

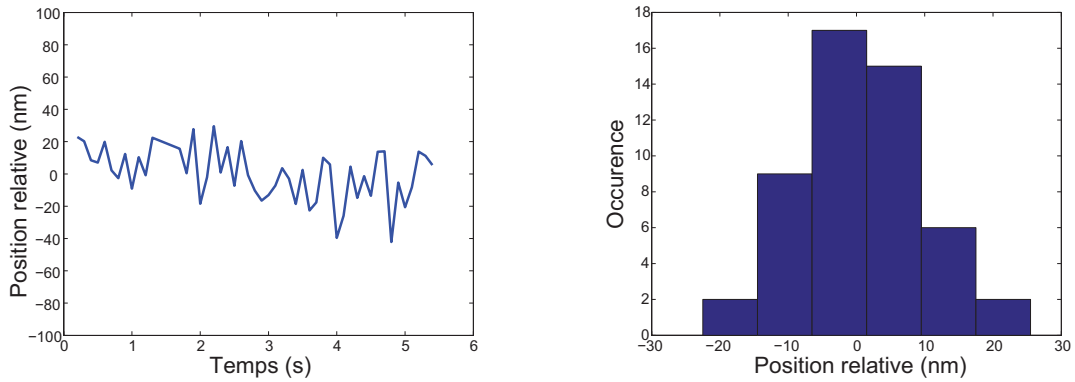
$$\sigma_{\mu,i} = \frac{s_i}{\sqrt{N}} \tag{3.12}$$

Dans l'exemple de la figure (3.34), nous avons tracé la distribution du nombre de photons collectés pour 100 fluorophores Alexa. Le nombre moyen de photons détectés est égal à 1000. En appliquant la formule (3.12), on obtient :

$$\sigma_x = \frac{380nm}{\sqrt{1000}} = 12\ nm.$$

Approche expérimentale

Pour mesurer la précision de localisation expérimentalement, une particule fluorescente immobilisée à la surface est d'abord suivie sur un nombre assez grand d'images. Un ajustement gaussien est ensuite appliqué sur cette image pour déterminer la position du centre à l'aide de l'équation (3.7) sur chaque image. On obtient alors une distribution des valeurs de la position du centre avec un écart type qui correspond à la précision de localisation. A titre d'exemple, nous avons calculé la position d'une particule fluorescente à l'aide de l'ajustement gaussien sur 55 images (figure 3.33) et déterminé l'écart type sur ces positions. Celui ci était d'une valeur de 0.08 pixel ce qui correspond à σ_x=12 nm. Nous avons également calculé l'intervalle de confiance de l'ajustement qui varie selon le nombre de photons détectés (figure 3.35) et qui vaut en moyenne 12 nm [11], ce qui confirme le résultat précédent. Nous avons ainsi retenu ce critère pour estimer notre précision.



(a) (b)

FIGURE 3.33.: a. Positions successives d'un fragment d'ADN marqué avec Alexa 488 immobilisé à la surface sur un total de 5.5 secondes avec une cadence de 10 images par secondes. b. La distribution gaussienne des positions aboutit à une précision de localisation de 12 nm.

La résolution moyenne de notre système pour un temps d'exposition de 100 ms, une irradiance de 400 W/cm^2 et un gain EM de 1200 est alors **12 nm**. Pour atteindre de meilleures précisions, il serait possible d'enregistrer un plus grand nombre de photons (figure 3.35). Ceci est possible en augmentant le temps d'exposition par exemple mais possède l'inconvénient de diminuer la résolution temporelle du système. Selon les besoins expérimentaux, il est donc possible d'ajuster le temps d'exposition afin

11. La précision de la position r est donc égale à $\sigma = \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2} = \sqrt{2}\sigma_x$=17 nm.

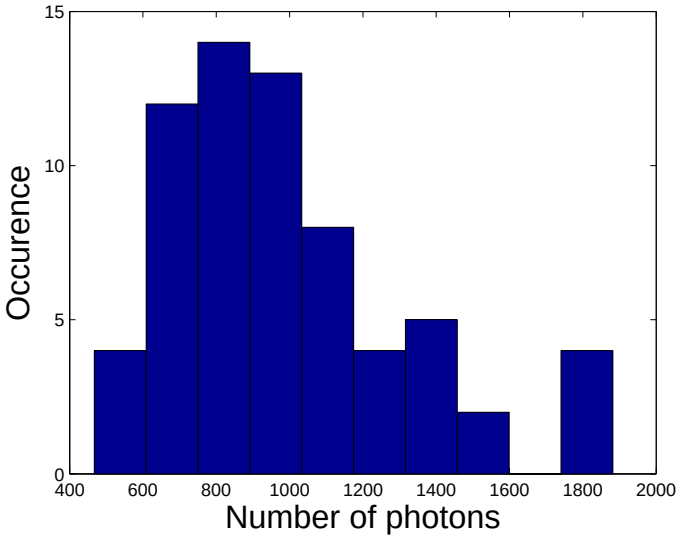


FIGURE 3.34.: Histogramme des nombre de photons collectés sur 100 fluorophores Alexa 488 sur un temps d'exposition de 100 ms. Le nombre de photons moyen est égal à 986 ± 330.

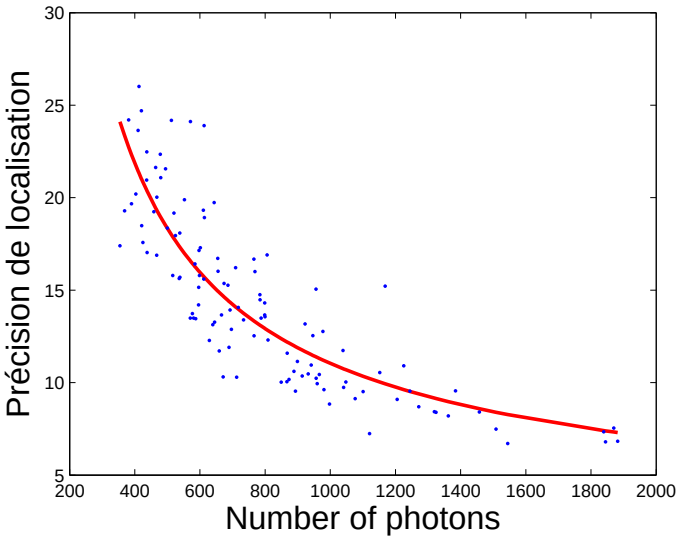


FIGURE 3.35.: Variation de la précision de localisation déterminée à partir de l'intervalle de confiance du fit en fonction du nombre de photons détectés. La relation vérifie l'équation 3.10 avec σ_x=360 nm et b=3 photons.

d'améliorer la résolution spatiale.

3.5. Applications

A partir de ces algorithmes de localisation, plusieurs approches ont été utilisées pour l'étude des phénomènes biologiques à l'échelle de la molécule unique. Parmi

ces approches, nous pouvons citer l'exemple de l'imagerie de fluorescence avec un nanomètre de précision (FIONA).

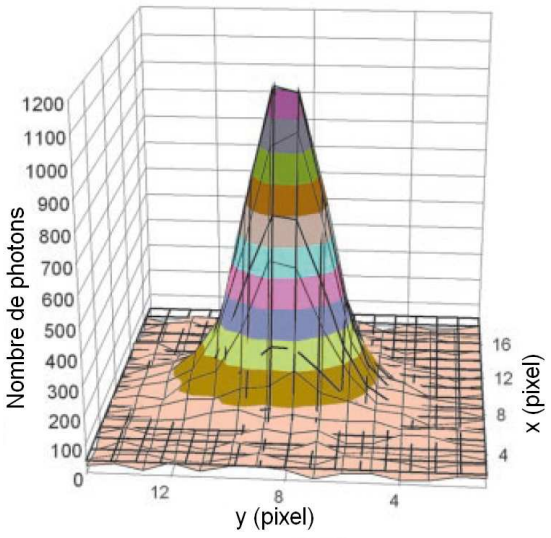


FIGURE 3.36.: Image d'un fluorophore Cy3 : la position du centre peut être déterminée avec une précision de 1.5 nm. D'après **Yildiz et al.**, [Yil05].

Cette technique est une application directe de l'algorithme de l'ajustement gaussien. En considérant l'equation (3.10) qui définit la limite de résolution, la technique FIONA vise à minimiser les sources de bruit pendant l'acquisition, collecter un maximum de photons pendant un intervalle de temps et assurer une durée d'observation suffisante. Pour ce faire, **Yildiz et al.** ont choisi un temps d'exposition de 0.5 s avec une solution réductrice d'oxygène dans le tampon d'imagerie qui permet d'observer la plupart des fluorophores pendant une durée supérieure à 30 s avec une précision nanométrique [Yil05]. Cette technique a été appliquée pour étudier le mouvement des moteurs moléculaires sur les filaments d'actine. **Yildiz et al.** ont marqué de façon non symétrique une des chaines de l'enzyme Myosine V pour observer une alternance entre les pas effectués par celle ci pendant sa progression. Ils ont alors conclu que le mouvement de l'enzyme suivait une progression de "main en main" c'est-à-dire qu'une extrémité de l'enzyme restait fixe sur l'actine alors que l'autre avançait et vice versa. En raison de son temps d'exposition relativement long, cette technique limite le suivi de la dynamique des interactions rapides ($<$1 s) et réduit notre résolution temporelle. Ceci explique notre choix d'un temps d'exposition de 100 ms qui est suffisant pour mesurer les temps d'interaction NucS-ADN avec une grande résolution temporelle (voir section 4).

Par ailleurs, l'étude d'une interaction entre deux molécules à l'échelle de la molécule unique nécessite une localisation nanométrique des deux réactants. On parle alors de colocalisation et deux façons pour colocaliser deux molécules individuelles peuvent être proposées : en parallèle en marquant chaque molécule avec une couleur qui est détectée séparément grâce un dédoubleur spectral ou séquentiellement dans un même canal en se servant du photoblanchiment pour éliminer le signal de la première molécule.

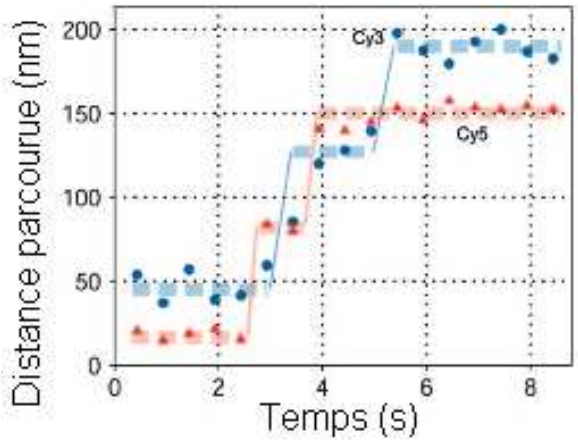


FIGURE 3.37.: Déplacement de la Myosine V sur les filaments d'actine : Les deux extrémités du moteur moléculaire ont été marquées avec les fluorophores Cy3 et Cy5. Elles se déplacent en alternance avec la même distance entre les pas. Ce mouvement confirme l'hypothèse de la progression de proche en proche (*hand-over-hand*). D'après **Yildiz et al.**, [Yil05].

Dans le cas d'une détection simultanée, on trouve la technique appelée SHREC [12], qui permet de mesurer des distances inter- et intramoléculaire avec une précision meilleure que 10 nm. Fondée sur une détection en champ large, SHREC combine la technique de superlocalisation avec une imagerie de deux couleurs pour calculer la distance séparant les deux fluorophores. Elle permet ainsi de suivre la variation de la distance au cours du temps. Le montage comprend alors en plus un dédoubleur spectral qui divise le champ d'observation en deux parties, chacune ne collectant que l'émission d'un fluorophore. Chaque fluorophore peut alors être localisé sur son canal avec une précision identique à cellle obtenue en imagerie à une couleur. Pour connaître la distance entre les deux fluorophores, il faut alors déterminer une fonction de transformation qui donne la position de chaque point du canal 1 sur le canal 2.

12. Single-molecule high resolution colocalization

Cette fonction est calculée en observant des billes fluorescentes immobiles et visibles sur les deux canaux. Leur position est alors déterminée sur un ensemble d'images dans chaque canal et le décalage entre les positions définit la fonction de transformation. La détermination du décalage comprend alors une incertitude qui s'ajoute aux incertitudes de localisation des spots lumineux pour donner une précision de 10 nm pour la distance mesurée.

Churchman et al. ont utilisé cette technique pour confirmer l'hypothèse qui prédisait que le moteur moléculaire Myosine V suivait une progression de proche en proche sur les filaments d'actine en observant directement le mouvement des deux têtes du moteur pendant leur mouvement sur les monomères d'actine [Chu05].

Le principal avantage d'un système à deux couleurs réside dans la détection simultanée des molécules d'intérêt. Cependant, notre objectif expérimental consiste à fixer l'ADN sur une surface puis à observer les temps d'arrivée et de départ de NucS pendant plusieurs minutes. De ce fait, l'utilisation de deux couleurs limite le temps d'observation à la durée de vie avant photoblanchiment du premier fluorophore ce qui réduit considérablement la gamme des temps accessibles. Nous avons alors opté pour l'utilisation d'une détection séquentielle où nous localisons l'ADN puis NucS dans un même canal comme expliqué dans la section 3.6.

3.5.1. Autres techniques

Transfert d'énergie par résonance de type Förster FRET

Décrit en 1946, le FRET représente le transfert d'energie non radiatif entre deux entités complémentaires nommées donneur et accepteur. Le FRET est utilisé en microscopie de fluorescence pour étudier différentes réactions biochimiques. En effet, cette technique permet de détecter le signal de fluorescence de deux fluorophores en excitant uniquement un seul d'entre eux, appelé le donneur. Ce dernier est capable de donner son énergie absorbée sous une forme non radiative à l'accepteur qui va être excité et revenir par la suite à son état fondamental en émettant des photons. Pour que ce transfert d'énergie ait lieu, il faut que les deux fluorophores possèdent un recouvrement spectral, c'est-à-dire que le spectre d'absorption de l'accepteur doit correspondre au spectre d'émission du donneur. Ce recouvrement s'écrit sous la forme

suivante [Sel07] :

$$J = \frac{\int \epsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda} \tag{3.13}$$

avec ϵ_A le coefficient d'extinction de l'accepteur et f_D le spectre d'émission de l'accepteur. J décrit la capacité de deux molécules à échanger l'énergie dans un transfert non radiatif de l'accepteur vers le donneur. L'efficacité FRET E dépend non seulement du recouvrement spectral mais aussi de la distance R séparant les deux entités. Elle s'ecrit comme suit :

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \tag{3.14}$$

avec R_0 le rayon de Förster qui réflète le rayon auquel le donneur excité a 50 % de probabilité de se désexciter via un transfert d'énergie vers l'accepteur. Il est égal à 6 nm pour le couple Cy3 et Cy5 par exemple [Mur04]. L'équation (3.14) indique donc la possibilité de mesurer des distances de cet ordre avec une très grande précision vu la dépendance de E avec la puissance sixième de la distance entre les fluorophores (voir figure 3.38). Le FRET permet donc la mesure d'une distance nanométrique entre fluorophores, ce qui permet de s'affranchir des méthodes de colocalisation pour mettre en évidence une interaction. Le FRET est ainsi une méthode performante pour quantifier l'interaction entre différentes molécules et mesurer leur affinité. **Huanmian et al.** l'ont par exemple utilisé pour déterminer la constante de dissociation des protéines SUMO1 et et UBC9 en solution. L'accès à la cinétique d'association et de dissociation est toutefois indirect en mesure d'ensemble et limité par le modèle de réaction car il est important de bien mesurer la saturation du signal pour en déduire l'affinité entre les réactifs. Pour s'affranchir de cette limite, il est possible de réaliser du spFRET (*single particle FRET*) et d'observer des molécules uniques en interaction. Ceci permet non seulement de mesurer les cinétiques d'association et de dissociation mais également d'identifier les différents états intermédiaires d'une réaction ainsi que les inhomogénéités dans une population [Myo05]. Le FRET est toutefois limité par sa sensibilité aux états inactifs de l'accepteur et par le photoblanchiment des fluorophores. Comme technique complémentaire au FRET, on trouve l'Alex FRET (*Alternating excitation FRET*) qui consiste à exciter successivement l'accepteur et le donneur pour mesurer d'une part le signal de FRET et d'autre part un ratio de fluorescence entre le donneur et l'accepteur ce qui permet d'extraire plus d'informations sur la stoechiométrie et la cinétique de la réaction [Kap04]. Comme décrit précédemment (voir section 2.4.2), nous avons préféré utiliser l'approche de colocalisation pour éviter tout changement

de la cinétique réactionnelle induit par le marquage spécifique de la jonction avec un fluorophore.

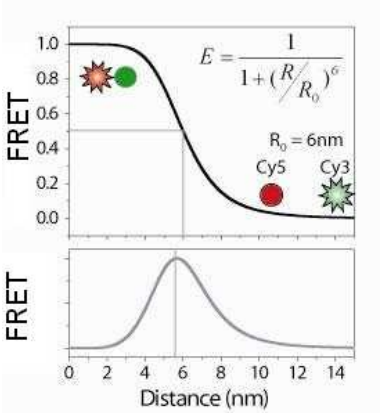


FIGURE 3.38.: Efficacité du FRET pour le couple Cy3 et Cy5 en fonction de la distance entre les fluorophores. Extrait de [Sel07].

3.6. Colocalisation à haute résolution en présence de nanocristaux fluorescents

3.6.1. Colocalisation sans nanocristaux fluorescents

La colocalisation des molécules biologiques se fonde sur le calcul de leurs positions respectives pour déterminer leur distance relative. La précision de colocalisation est alors donnée par l'incertitude sur la localisation de chaque molécule (0.1 pixel) lorsque elles sont détectées de façon subséquente. Dans notre étude, nous avons fixé l'ADN à la surface, localisé sa position jusqu'à ce qu'il photoblanchisse puis injecté la protéine en solution et observé leur interaction en détectant les événements de colocalisation [13] pendant plusieurs minutes. De ce fait, notre précision de colocalisation devient dépendante de la dérive mécanique due aux fluctuations thermiques. A température ambiante, cette dérive reste toujours inférieure à 1 pixel pour un temps d'acquisition de 5 à 10 min et vaut en moyenne 0.6 pixel (96 nm) (figure 3.39). Nous avons alors fixé un seuil de colocalisation en ajoutant cette valeur à l'incertitude sur la position des molécules pour trouver une valeur de 0.8 pixel (128 nm). Dans notre analyse, nous avons par conséquent considéré que chaque protéine détectée à une distance inférieure à cette limite était en interaction avec l'ADN. Etant donné que la valeur

13. Ici, nous supposons que chaque événement de colocalisation correspond à une interaction. Nous allons discuter cette affirmation en détail dans la section 4.1.

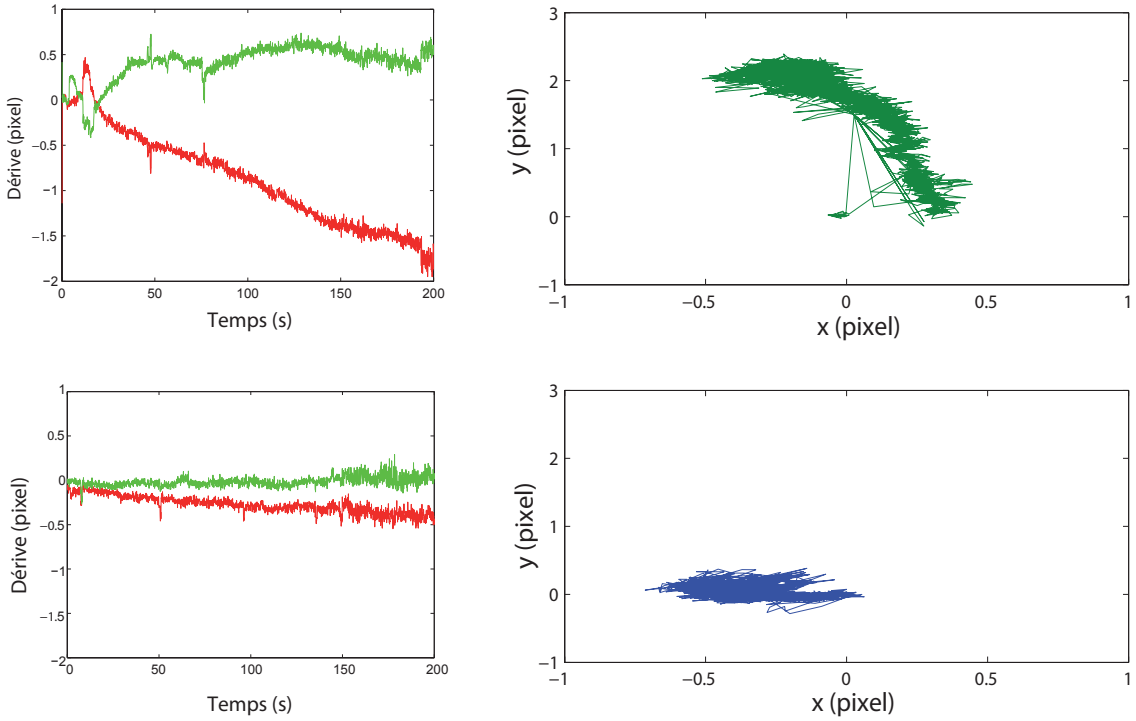


FIGURE 3.39.: Dérive mécanique de l'image par rapport à la position initiale à température ambiante (en bas) et à 45°C (en haut). Suivi des positions x (rouge) et y (vert) en fonction du temps et trajectoire de la dérive.

du seuil est supérieure de deux ordres de grandeur à la distance d'interaction typique entre l'ADN et la protéine (1 nm), nous avons réalisé plusieurs tests de spécificité qui vérifient que cette limite de colocalisation est nécessaire et suffisante pour attester d'une interaction (voir section 4.1). Un exemple est donné dans la figure (3.40) où nous avons représenté la distribution des distances des protéines détectées au voisinage de l'ADN. Cette distribution possède un maximum à distance nulle et un écart type équivalant au seuil de colocalisation ce qui indique que chaque événement détecté correspond à une interaction. Ce point sera complété dans le chapitre 4.

A une température de 45°C, nous avons en revanche remarqué que la dérive était plus importante et pouvait atteindre quelques dizaines de pixels. Sur la figure (3.39), une comparaison entre les dérives typiques du système à températures ambiante et élevée est présentée. Alors qu'à température ambiante le système décrit une trajectoire de faible amplitude, son déplacement à 45°C est significativement plus important et impose un contrôle de la dérive.

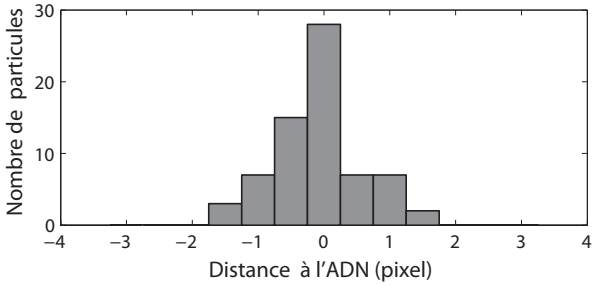


FIGURE 3.40.: Histogramme des distances de 64 protéines à l'ADN (F5D42). Le pic autour de zéro montre qu'il s'agit bien d'une interaction spécifique avec l'ADN. Autrement, la distribution serait uniforme étant donné que la probabilité qu'une protéine soit détectée autour de l'ADN dans un processus stochastique est identique pour toutes les distances.

3.6.2. Colocalisation avec des nanocristaux fluorescents

Notre approche consiste à rajouter au système mis en place des marqueurs fluorescents qui permettent un suivi continu de la dérive, en conservant un montage expérimental simple. Ces marqueurs doivent alors répondre aux critères suivants :

1. Emission distincte de la NucS et de l'ADN.
2. Photostabilité.
3. Excitation avec la même source laser que le fluorophore Alexa 488.
4. Fixation possible à la surface.

Nous avons ainsi utilisé des nanocristaux semi-conducteurs, qui possèdent un large spectre d'absorption, une grande photostabilité et qui sont commercialement fonctionnalisés avec de la streptavidine ou des anticorps qui permettent leur attachement à la surface [Bou11]. Leur forte émission par rapport aux fluorophores organiques sature cependant la caméra et empêche alors une précision de localisation nanométrique lorsqu'on excite les deux types de fluorophores avec la même source laser (figure 3.41). Pour résoudre ce problème nous avons séparé l'émission des nanocristaux de celle des fluorophores spectralement et implémenté un séparateur spectral SS (Dual Viewer, Photometrics) muni d'une densité neutre dans le canal 2 pour réduire le signal des nanocristaux dans le montage. Le SS permet de dédoubler une partie de l'image tout en appliquant à chaque partie un filtre spectral différent (figure 3.41.a). Dans notre cas, nous avons travaillé avec des nanocristaux émettant à 605 nm (QD 605, Invitrogen) et séparé l'émission des fluorophores Alexa 488 de celle des nanocristaux. Nous avons

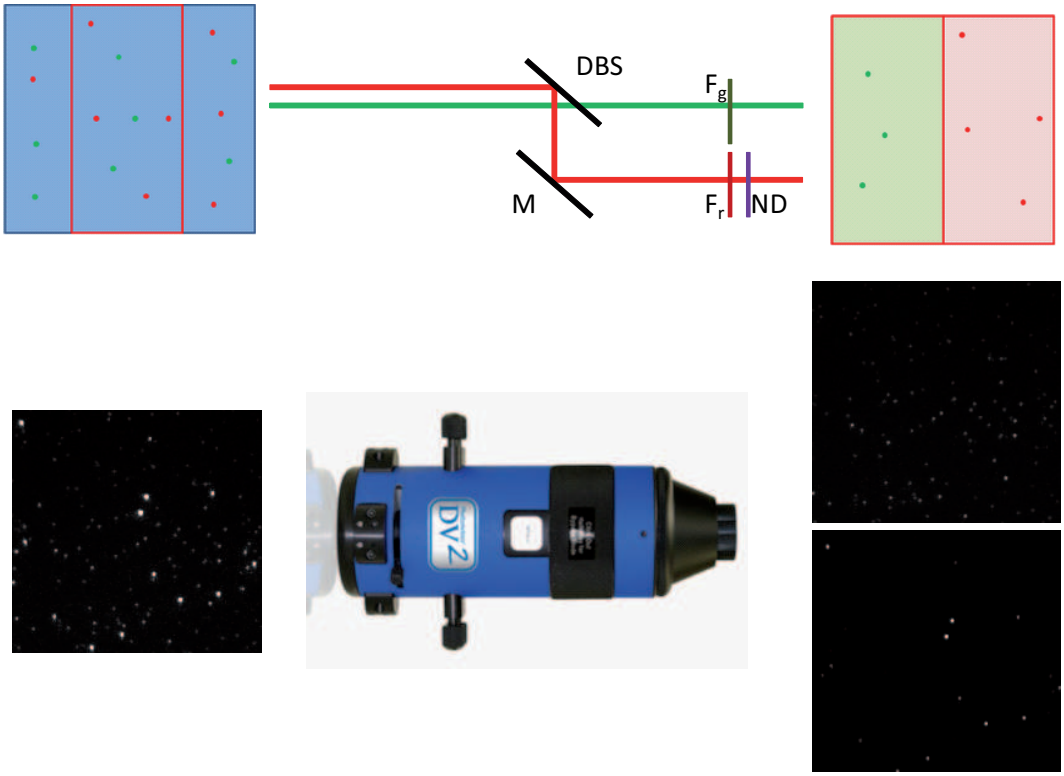


FIGURE 3.41.: Principe de fonctionnement d'un *Dual Viewer (DV)* . Partie supérieure : Le DV dédouble la partie centrale de l'image initiale et sépare à l'aide d'une lame dichroïque et d'un jeu de filtres les différentes émissions ce qui permet de distinguer les QDs des fluorophores organiques. DBS : lame dichroïque, M : miroir, F_g : filtre vert, F_r : filtre rouge et ND : densité neutre. Partie inférieure : Une partie de l'image dédoublée permet de distinguer les QDs des fluorophores uniquement par leur brillance. L'utilisation du DV permet de séparer les spectres d'émission et la densité neutre ND appliquée uniquement sur le faisceau rouge réduit son intensité de façon à ne pas saturer la caméra en excitant avec un même laser.

ainsi obtenu une précision de localisation moyenne de 22 nm pour les fluorophores et 5 nm (0.03 pixel) pour les QDs.

3.6.3. Multilatération et correction de la dérive

Pour colocaliser l'ADN avec la protéine, leurs distances respectives à un nanocristal NC fixe sur l'image sont calculées. Lorsque la distance ADN-NC est égale à la distance protéine-NC, la protéine est colocalisée avec son substrat d'ADN. En tenant compte du clignotement des NCs, un algorithme a été développé sur ce principe pour déterminer pour chaque molécule d'ADN la distance à tous les NCs présents sur l'image initiale, ce qui permet de suivre sa dérive quand un ou quelques NCs s'éteignent ou clignotent. Lorsqu'une protéine est détectée, on calcule sa distance par rapport à tous

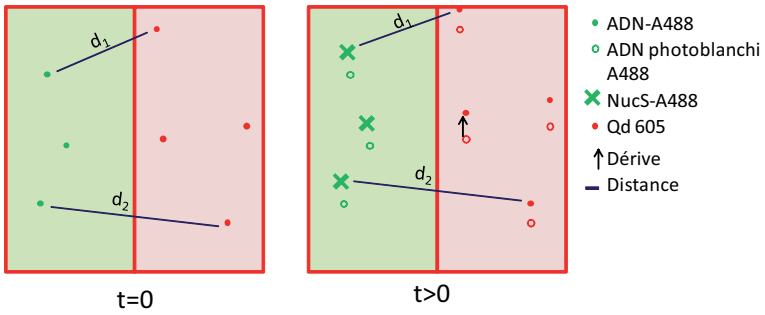


FIGURE 3.42.: La colocalisation se base sur le calcul de la distance initiale d_1 qui sépare l'ADN d'un QD. En connaissant la dérive du QD, il est alors très facile de suivre la position de l'ADN en fonction du temps et de pister les protéines à proximité. Une protéine est colocalisée avec l'ADN lorsqu'elle est détectée à une distance d_1 au QD.

les NCs présents sur l'image et on compare ces distances aux distances initiales. Si la différence moyenne des distances initiales au distances finales ne dépasse pas le seuil de colocalisation, alors nous considérons que la protéine est colocalisée avec l'ADN [14]. Ce dernier est égal à la somme des incertitudes sur la localisation de l'ADN, de la protéine, et des QDs et vaut 50 nm, ce qui représente une réduction d'un facteur 2.5 par rapport à la méthode de colocalisation sans NCs. Notons ici que la précision de colocalisation n'est limitée que par le nombre total de photons enregistrés et que notre système est calibré de façon à minimiser la puissance laser pour garantir un temps de vie maximum pour les fluorophores. Il aurait été possible d'augmenter la puissance laser pour obtenir une meilleure précision mais nos expériences montrent qu'elle est suffisante pour conclure sur une interaction entre l'ADN et la protéine. En effet, la distribution des distances protéines-ADN de toutes les protéines détectées possède toujours un maximum proche de zéro (position initiale de l'ADN) et sa largeur à mi hauteur est environ égale à la précision de colocalisation (figure 3.43). Ceci indique que les protéines qui sont détectés à proximité de l'ADN sont en interaction car si la détection était purement stochastique, la distribution des distances serait homogène et n'aurait pas de maximum [15]. Cette partie sera traitée plus en détail dans le chapitre 4.

14. Alternativement, on pourrait utiliser un algorithme qui calculerait la dérive moyenne sur chaque image par corrélation croisée et en déduirait le déplacement à corriger à chaque instant.
15. Ceci est possible grâce à une minimisation des interactions non spécifiques.

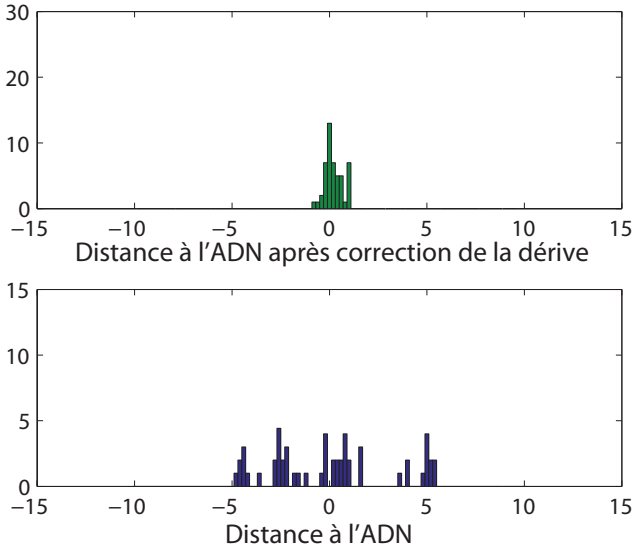


FIGURE 3.43.: Distribution de la position des protéines relativement à l'ADN avant (en bas) et après (en haut) correction de la dérive. On remarque qu'après correction la distribution est bien centrée à zéro alors qu'avant correction elle est très large en raison de la dérive du système. La largeur de la distribution est environ égale à 0.3 pixel (50 nm) et on remarque l'absence de protéines à une distance supérieure à 1 pixel.

3.6.4. Avantages et inconvénients

Le principal avantage de cette technique réside dans l'affranchissement de la dérive mécanique du système, qui rend la précision de colocalisation limitée uniquement par la précision de localisation des fluorophores, et donc par le nombre de photons détectés. En ajoutant une référence locale dont la position est déterminée avec une précision de quelques nanomètres seulement, on arrive à colocaliser une protéine avec son substrat marqué par des fluorophores organiques avec une précision de 50 nm. Un autre avantage de cette nouvelle technique repose dans sa facilité d'implémentation et de calibration. En effet, en comparaison avec la méthode SHREC où une cartographie subpixelique complexe est indispensable, notre méthode autorise une erreur de translation entre les canaux puisque nous calculons seulement des distances relatives. Notre méthode implique cependant une réduction de la taille de l'image d'un facteur 2 ce qui réduit le nombre de molécules suivies en parallèle. Par ailleurs, l'efficacité de cette technique dépend de la qualité du traitement de surface afin de minimiser les interactions non spécifiques avec celle-ci.

3.7. Traitement de surface

Le traitement de surface est indispensable pour l'étude des interactions biochimiques à l'échelle de la molécule unique puisqu'il permet : (i) d'accrocher l'un des réactants à la surface (l'ADN dans notre cas) et d'observer le second en cas d'interaction et (ii) de réduire les événements indésirables comme les interactions non spécifiques avec la surface. Dans la suite du texte, nous appelerons les interactions entre une protéine et une molécule d'ADN une **interaction spécifique** et toute autre interaction avec la surface une **interaction non spécifique**. Nous avons choisi le traitement de surface type BSA (voir section 2.4.2) pour sa simplicité et sa capacité à réduire les événements indésirables. La surface de verre préalablement nettoyée au plasma est recouverte d'une couche d'un mélange de BSA et de BSA biotinylée, qui va inhiber les interactions non spécifiques. A cette couche, on ajoute de la streptavidine qui possède quatre sites de liaison avec une forte affinité pour la biotine et permettra l'ancrage des biomolécules possédant une biotine grâce à une liaison biotine-streptavidine-biotine (figue 3.44).

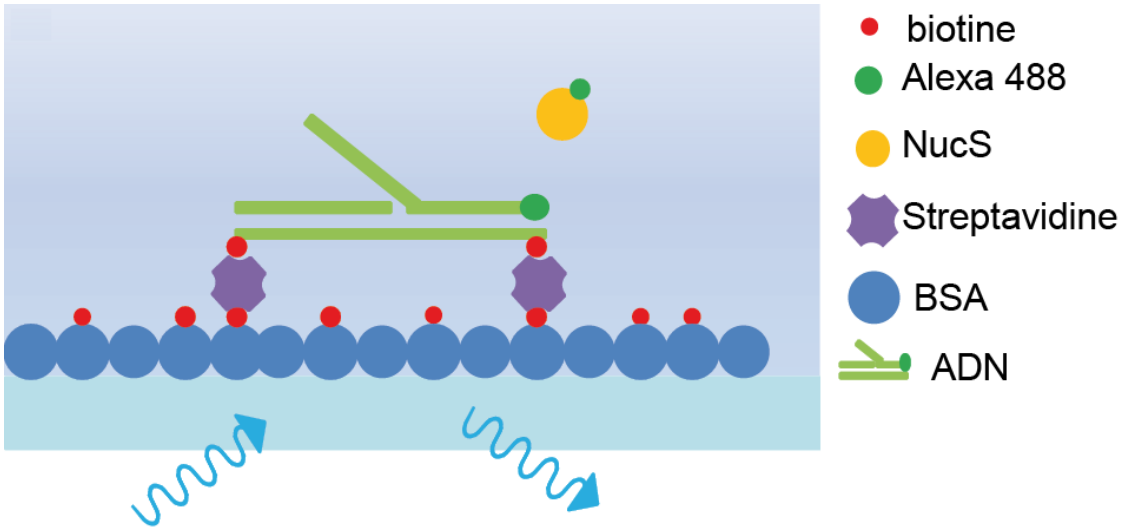


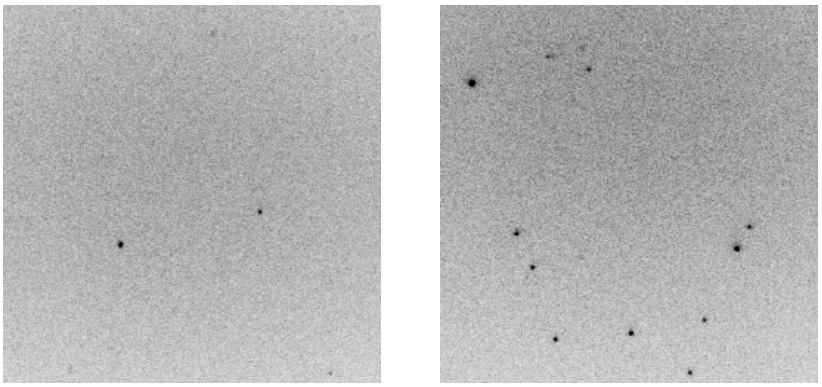
FIGURE 3.44.: Traitement de surface avec BSA pour l'imagerie de molécules uniques.

3.7.1. Passivation et accrochage à la surface de l'ADN

Passivation

Pour quantifier l'interaction non spécifique, nous avons d'abord traité la surface avec de la BSA puis introduit une solution contenant 100 pM de notre protéine.

Nous avons ensuite observé le nombre d'interactions non spécifiques avec la surface et comparé le résultat à une surface de verre sans traitement. Environ 100 événements par seconde sont enregistrés pour une surface avec BSA contre 500 évènements par seconde sur du verre nu ce qui indique une amélioration notable. Après 5 min d'incubation avec la protéine, nous avons rincé les deux surfaces et observé le nombre de molécules adsorbés à la surface (figure 3.45). Sur 10 échantillons, nous obtenons une moyenne de 2 protéines par surface (80 µm x 80 µm) en présence de BSA et 10 sans BSA.



(a) (b)

FIGURE 3.45.: Caractérisation de l'interaction non spécifique : (a) sur une surface passivée. (b) sur du verre nu.

Ces tests montrent que NucS interagit faiblement avec la surface et que l'utilisation de la BSA réduit encore plus cette interaction non spécifique. Par la suite nous avons mesuré le temps caractéristique des interactions non spécifiques. Nous avons alors estimé le temps de résidence de 100 protéines et ajusté la distribution de ces temps avec une exponentielle décroissante pour obtenir un temps égal à 0.25±0.05 s (figure 3.46). Ce temps caractéristique représente la limite inférieure de notre mesure des temps d'interaction spécifique. En effet, si le temps d'interaction de la protéine avec l'ADN était plus faible que ce temps, il serait impossible de distinguer les interactions spécifiques des interactions non spécifiques.

Pour vérifier l'homogénéité de la passivation, nous avons incubé la surface couverte de BSA et BSA biotinylée avec de la streptavidine conjuguée à FITC [16]. Après rinçage, nous observons une couche homogène de streptavidine fluorescente qui permet de conclure que les sites de liaison avec la biotine qui permettent l'accrochage de l'ADN

16. L'isothiocyanate de fluorescéine FITC est un dérivé de la fluorescéine dont le spectre d'émission et d'absorption est proche de celui de l'Alexa 488.

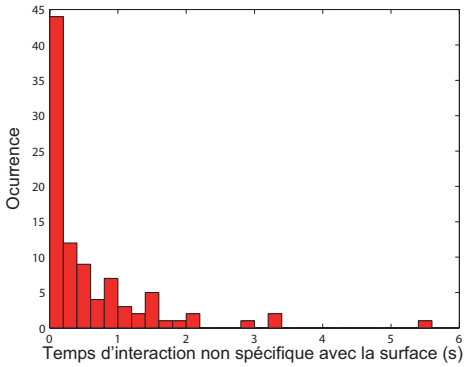


FIGURE 3.46.: Distribution des temps d'interaction non spécifique de NucS avec une surface passivée type BSA.

de façon spécifique sont distribués de façon homogène sur la surface (3.47). Après avoir photoblanchi tous les fluorophores FITC, nous avons vérifié que l'interaction non spécifique de la NucS avec la surface possédait toujours la même distribution avec un temps caractéristique de 0.25 s et que par conséquent la présence de la streptavidine n'altèrait pas la qualité de la passivation.

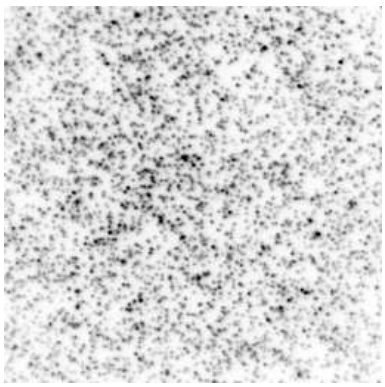
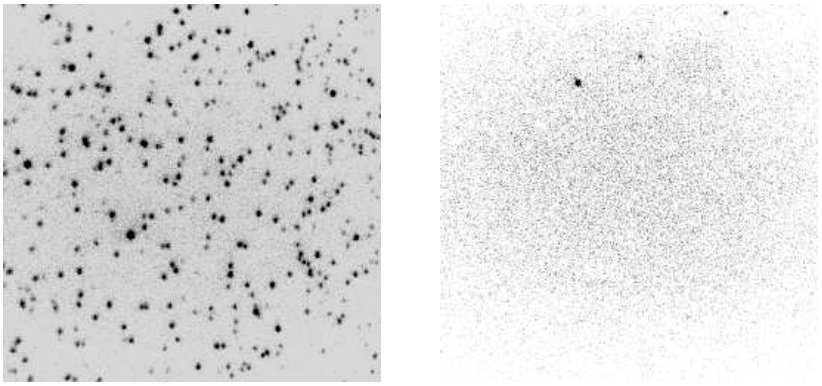


FIGURE 3.47.: Fixation de streptavidine FITC à la surface passivée pour vérifier l'homogénéité de la passivation.

Accrochage de l'ADN

Après avoir passivé la surface avec la BSA (*Bovine Serum Albumin*), l'échantillon est incubé avec une solution de streptavidine. Cette dernière permettra la fixation de l'ADN grâce à une liaison biotine-streptavidine-biotine. La lamelle est rincée après 5 min puis observée au microscope. On dépose alors une goutte d'ADN biotinylé à son extrémité et on observe au microscope l'accrochage des molécules d'ADN à la surface. Après avoir atteint une densité de 100-200 molécules environ la lamelle est

rincée de nouveau. Tous les ADNs observés restent accrochés à la surface. La spécificité de l'accrochage est vérifiée en ajoutant l'ADN sur la surface sans streptavidine. Un faible nombre (N=2 après 5 min) de molécules d'ADN accrochées à la surface non spécifiquement est alors observé (figure 3.48). Ce contrôle permet de vérifier la spécificité de l'accrochage de l'ADN à la surface par l'intermédiaire de la liaison Biotine-Streptavidine-Biotine.



(a) (b)

FIGURE 3.48.: Accrochage de l'ADN sur la surface. (a) En présence de streptavidine, l'ADN se fixe très rapidement (image prise après 20 s d'incubation) et de façon spécifique à la surface. Densité d'ADN : 0.03 μm^{-2}. (b) Sur une surface passivée avec BSA uniquement, l'ADN ne se fixe que d'une façon non spécifique et après un temps très grand (image prise après 5 min d'incubation) .

4. Étude de l'interaction NucS-ADN à l'échelle de la molécule unique

Dans ce travail, nous avons étudié l'activité de NucS à l'échelle de la molécule unique à l'aide de la microscopie à onde évanescente. Nous nous sommes principalement intéressés aux taux d'association et de dissociation pour déchiffrer le mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN simple brin qui a été mise en évidence par les mesures d'ensemble précédemment décrites [Ren09]. Comme il est très difficile d'observer cette interaction en volume à l'échelle de la molécule unique, il est indispensable de fixer l'un des réactants et d'observer le second. Nous avons alors opté pour l'accrochage des molécules d'ADN à la surface du verre grâce à un traitement spécifique. Nous avons également choisi de marquer les deux réactants avec le même fluorophore pour garder un montage simple et éviter toute contrainte due aux aberrations dans le chemin optique. Dans ce chapitre nous allons commencer par décrire les tests de contrôle que nous avons effectués pour garantir la spécificité de l'interaction. Nous allons par la suite présenter les résultats obtenus sur l'étude de la cinétique d'association de NucS sur l'ADN simple brin. Ensuite, nous allons proposer une étude détaillée du mécanisme de dissociation et des temps d'interaction. Enfin, nous allons grâce à une étude comparative aux résultats de mesures d'ensemble, conclure sur le mécanisme d'interaction et sur l'importance de ces analyses à l'échelle de la molécule unique et sur les horizons qu'elles nous ouvrent pour élucider l'interaction entre molécules biologiques et pour comprendre ce mécanisme de réparation de l'ADN de façon plus générale.

4.1. Colocalisation et spécificité de l'interaction ADN-protéine

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit les différentes étapes du traitement de surface qui permettent un accrochage spécifique de l'ADN à la surface et une minimisation de l'adsorption non spécifique de la protéine d'intérêt à la surface. L'expérience se déroule de la façon suivante : Après avoir effectué le traitement de surface, une image qui contient une centaine de molécules d'ADN est enregistrée. Cette image permet de localiser la position des molécules d'ADN sur la lamelle. Après avoir photoblanchi tous les ADNs sur la surface, une solution concentrée de protéines est injectée dans la chambre et l'acquisition des images commence. Cette dernière dure entre 5 et 10 min avec une cadence variant de 0.5 à 10 images/s selon l'expérience. Des points lumineux correspondant à la protéine marquée sont alors observés à différents endroits et le traitement de données permet de vérifier leur colocalisation avec l'ADN (figure 4.3). En effet, en raison de l'absence de preuves directes de l'interaction NucS-ADN, nous avons défini un seuil de colocalisation en dessous duquel nous pouvons supposer qu'une interaction a lieu. Pour fixer sa valeur, nous avons alors considéré les deux facteurs suivants [1] :

1. L'imprécision sur la localisation de l'ADN et de la protéine qui dépend uniquement du nombre de photons détectés. Dans nos conditions expérimentales, celle-ci est de l'ordre de 16 nm (0.1 pixel) pour l'ADN et la protéine (voir section 3.4.2).
2. La dérive mécanique due aux fluctuations thermiques qui implique que la position initiale enregistrée de l'ADN change en fonction du temps suivant un mouvement brownien. Cette dérive est estimée à partir du suivi de plusieurs Qdots spincoatés à la surface en calculant l'écart type de la longueur des déplacements. Ce dernier vaut 96 nm (0.6 pixel) sur chaque axe pour une durée de 5 min (figure 4.1) et est en accord avec celle mesurée par **van Oijen et al.** [Oij10].

Une valeur raisonnable pour le seuil de colocalisation peut alors être donnée par la somme des erreurs ci dessus et vaut $\sigma_{coloc} = 16 + 16 + 96 = 128\ nm$ (0.8 pixel). Par conséquent, toutes les protéines dont la distance avec l'ADN est inférieure à ce seuil

1. Les résultats de ce chapitre ont été obtenus avant la mise en oeuvre de la correction de la dérive

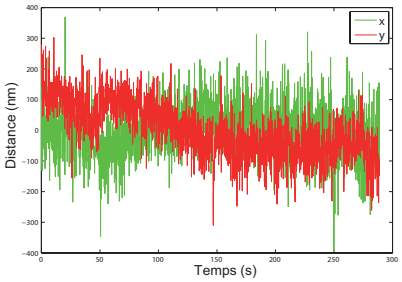


FIGURE 4.1.: Suivi de la position d'un Qdot en fonction du temps. L'écart type des déplacements calculés est égal à 96 nm sur chaque axe. L'erreur sur la position du QDot est égale à 2 nm.

sont considérées en interaction avec ce dernier. Compte tenu du fait que la taille des molécules que nous étudions est 10-20 fois plus petite que la limite de colocalisation trouvée, il convient de vérifier a posteriori la validité de ce critère de colocalisation. Nous avons par conséquent regroupé les différents arguments qui montrent que ce critère est nécessaire et suffisant :

1. Le traitement de surface avec BSA réduit considérablement les interactions non spécifiques.

2. La fréquence d'événements par pixel^2 dans la zone de colocalisation est supérieure à celle à l'extérieur de cette zone. En effet, avec un seuil de 0.8 pixel, la zone de colocalisation s'étend sur une surface d'environ 2 pixel^2 par ADN. Avec 100 ADN par surface, la zone totale de colocalisation devient égale à 200 pixel^2. Pour une acquisition de 5 min, nous détectons environ 20 protéines dans cette zone donc avec une probabilité de 0.1 par pixel^2. Pendant la même période de temps, nous détectons environ 1200 protéines sur une superficie de 262000 pixel^2 (plein champ) c'est à dire avec une probabilité de 0.005 par pixel^2. Cette différence de plus d'un ordre de grandeur permet de conclure que la détection d'une protéine dans la zone de colocalisation n'est pas stochastique mais qu'il s'agit bien d'une interaction spécifique.

3. La distribution des distances des protéines par rapport à l'ADN présente toujours un maximum pour les petites distances. Dans la figure 4.2, nous avons représenté la distribution des distances de 64 protéines détectées dans une zone de 4x4 pixels^2 autour d'un total de 300 ADNs. Cette distribution n'est pas uniforme et possède un maximum aux distances inférieures à 0.5 pixel (28 protéines) et est nulle aux distances entre 2 et 4 pixels. Avec une moyenne de 4

protéines par pixel^2 la probabilité de trouver 28 protéines sur un pixel^2 peut être calculée à partir de la loi de Poisson. Elle vaut : P=$\frac{e^{-4}4^{28}}{28!}$ = 4.3 10^{-15}. On peut alors dire que les protéines détectées à l'intérieur de la zone de colocalisation sont en interaction avec l'ADN.

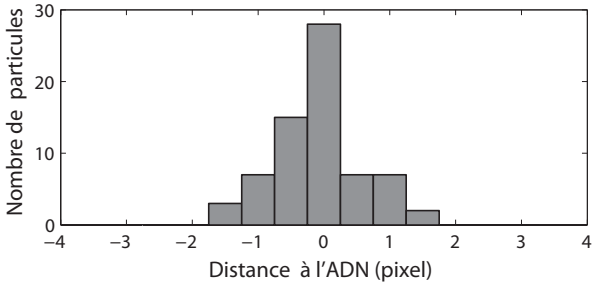


FIGURE 4.2.: Histogramme des distances de 64 protéines à l'ADN (F5D42). Le pic autour de zéro montre qu'il s'agit bien d'une interaction spécifique avec l'ADN. Dans le cas contraire, la distribution serait uniforme étant donné que la probabilité qu'une protéine soit détectée autour de l'ADN dans un processus stochastique est identique pour toutes les distances.

4. La distribution des temps d'interactions que nous qualifions de spécifiques est différente de celle des interactions non spécifiques et du photoblanchiment (voir section 4.2).
5. Des tests avec un mutant qui ne se lie pas à l'ADN confirment la spécificité de l'interaction (voir section 4.2).

4.2. Étude de la cinétique de l'interaction NucS-ADN

Dans cette étude de la cinétique d'interaction de la protéine NucS avec le Flap d'ADN, nous avons considéré la cinétique d'association et de dissociation dans les conditions non clivantes. Après avoir sélectionné les événements d'interaction spécifique suivant le critère défini dans la section précédente, nous avons mesuré pour chaque événement le temps séparant le début de l'incubation avec NucS du début de l'interaction appelé **temps d'association** ainsi que le temps séparant le début de l'interaction de sa fin appelé **temps de résidence** (figure 4.3.c). Ce dernier ne correspond pas forcément au temps d'interaction car la disparition du spot lumineux peut également être due au photoblanchiment du fluorophore utilisé. Pour séparer les temps d'interaction spécifique des temps de photoblanchiment nous avons utilisé la

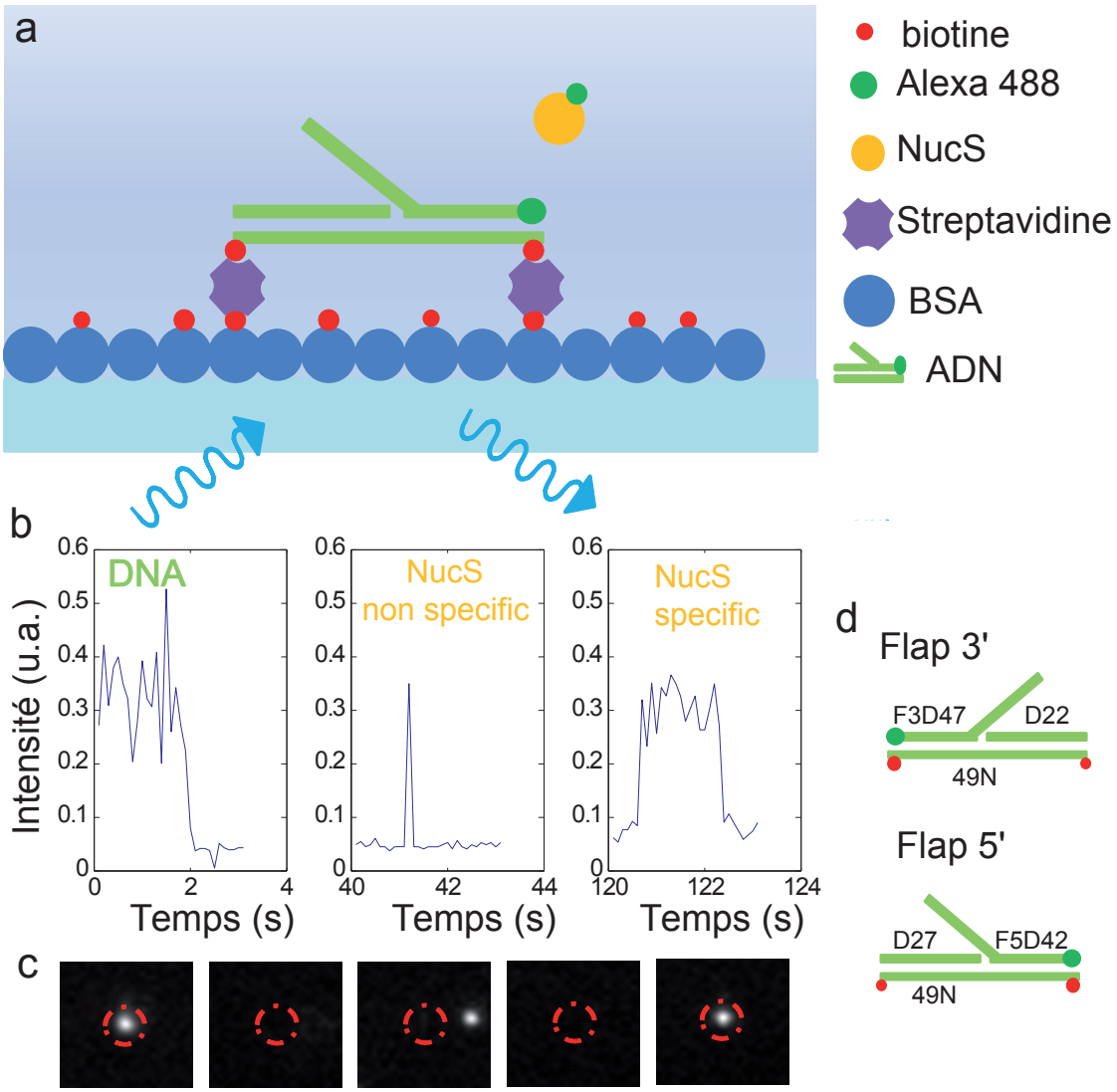


FIGURE 4.3.: Imagerie de l'interaction de l'enzyme NucS avec l'ADN fixé à la surface. (a) Schématisation de la surface traitée sous un éclairage TIRF, ici avec un mélange de caséine (Blocking reagent) et de BSA-biotinylée. (b) Signaux typiques de l'ADN qui photoblanchit (panneau de gauche), des interactions non spécifiques avec la surface (panneau central) et des interactions spécifiques (panneau de droite). (C) Images du suivi d'une molécule d'ADN (i) L'ADN est détecté grâce à la fluorescence de son marqueur Alexa 488 (1ère image) puis suivi jusqu'au photoblanchiment (2ème image). (ii) La protéine NucS est alors ajoutée et peut interagir non spécifiquement avec la surface (troisième image) ou spécifiquement avec l'ADN (cinquième image). La colocalisation de l'ADN-NucS est limitée à une zone de diamètre 0,8 pixels (128 nm). (D) Les substrats d'ADN utilisés : F3D47 avec 47 paires de base et un flap 3' et F5D42 avec 42 paires de bases et un flap 5'. La séquence exacte des fragments est donnée dans l'annexe.

technique d'illumination stroboscopique qui permet de distribuer les périodes d'excitation sur une plus longue durée. Cette partie sera traitée en détail dans la section 4.2.2.

4.2.1. Cinétique d'association

Pour estimer la vitesse d'association des protéines avec leur substrat d'ADN, nous avons tracé la distribution des temps d'association (figure 4.4) pour une densité donnée de molécules d'ADN à la surface donnée. Celle-ci montre une croissance linéaire avec le temps et permet alors d'extraire une vitesse d'association qui détermine le nombre d'interactions par unité de temps. Bien que le taux de marquage de la protéine soit proche de 1, cette valeur ne correspond pas directement au taux d'association k_{on} de la protéine avec l'ADN en raison de la géométrie de notre montage où l'ADN est fixé à la surface. Ainsi, cette valeur représente une mesure effective de la vitesse d'association v_a, comme cela est le cas dans la plupart des techniques de mesure des cinétiques réactionnelles telles que l'ELISA et la SPR où un des réactants est fixé à la surface. Ce sont alors les variations de la vitesse d'association qui permettent d'étudier l'influence des paramètres biochimiques.

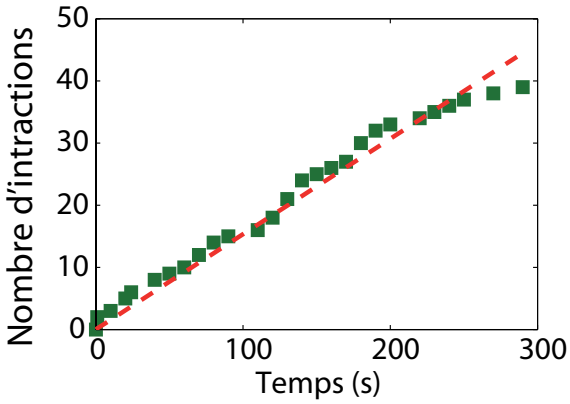


FIGURE 4.4.: Evolution du nombre d'interactions en fonction du temps pour le flap 3' pour une concentration de 20 pM de NucS.

Considérons la réaction d'association suivante :

$$NucS + ADN \xrightarrow{k_{on}} NucS - ADN \tag{4.1}$$

La vitesse de formation du complexe [NucS-ADN] est alors égale à :

$$\frac{d[NucS-ADN]}{dt} = k_{on} \cdot [NucS][ADN] \tag{4.2}$$

En divisant de chaque coté par le volume de la solution on obtient :

$$\frac{dN_{NucS-ADN}}{dt} = k_{on} \cdot [NucS] \cdot N_{ADN} \tag{4.3}$$

où $N_{NucS-ADN}$ et N_{ADN} représentent le nombre de complexes formés et d'ADN, respectivement. Étant donné que le nombre de protéines présentes en solution et le nombre d'ADN sont beaucoup plus grands que le nombre de complexes formés, nous pouvons simplifier l'équation 4.3 pour obtenir :

$$\frac{dN_{NucS-ADN}}{dt} = v_{asso} \tag{4.4}$$

v_{asso} représente alors la vitesse de formation des complexes. Pour pouvoir comparer les différentes vitesses d'association en fonction des paramètres biochimiques, nous avons défini le taux d'association v_a comme la vitesse de formation divisée par le nombre de molécule d'ADN observés : $v_a = v_{asso}/n_{ADN}$. Le taux d'association est alors l'équivalent de la probabilité d'interaction d'une protéine avec un ADN pour une concentration de protéines donnée ce qui donne enfin :

$$v_a = k_{on}[NucS] \tag{4.5}$$

Effet du sel

Nous avons commencé par étudier l'effet du sel sur l'association et nous avons travaillé avec deux concentrations différentes 50 et 150 mM de NaCl dans un tampon qui contient toujours 20 mM de HEPES (pH=8). Ces tampons sont appelés respectivement dans la suite du texte **B1** et **B2**. Les expériences ont été faites sur deux constructions d'ADN (figure 4.3d) chacune avec une extrémité 3' ou 5' libre. Dans le cas du flap 3', nous avons observé 66 interactions sur un total de 50 minutes d'observation (10 échantillons à 5 min) pour une concentration de 50 mM de NaCl et 47 interactions pour une concentration de 150 mM de NaCl ce qui correspond à un taux d'association par molécule d'ADN de $v_a = 99 \pm 4\ 10^{-5}s^{-1}$ et $v_a = 17 \pm 3\ \ 10^{-5}s^{-1}$, respectivement. Dans le cas du Flap 5', nous avons obtenu des résultats similaires avec 54 et 63 interactions pour 50 et 150 mM de NaCl ce qui correspond à un taux

d'association respectif de v_a =74 ± 2 $10^{-5}s^{-1}$ et v_a = 20 ± 2 $10^{-5}s^{-1}$. Ces résultats sont illustrés dans la figure (4.5). On remarque que le taux d'association est similaire pour les deux flaps et pour une même concentration en sel. Ceci implique que le chargement de NucS sur le Flap est bidirectionnel et que la nature du flap n'influence pas l'association.

On observe également que le taux d'association diminue en fonction de la concentration saline. L'association diminue d'environ un ordre de grandeur pour une différence de 100 mM en NaCl et indique une composante électrostatique.

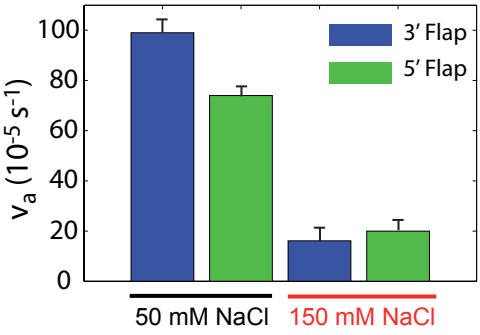


FIGURE 4.5.: Effet du sel sur la cinétique d'association pour [NucS]=20 pM.

Effet du glycérol

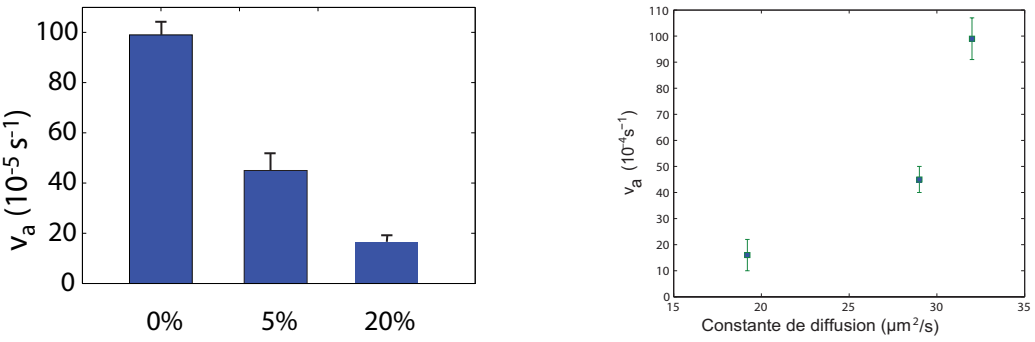
En ajoutant du glycérol dans le tampon, nous avons testé l'influence de la diffusion sur l'association de la protéine. Nous avons alors calculé la vitesse d'association pour une concentration de 5% et 20 % en glycérol dans le tampon **B1** et comparé les valeurs trouvées à celle sans glycérol. Nous avons observé une décroissance d'un facteur 5 du taux d'association entre 0% et 20% de glycérol et d'un facteur 2 entre 0% et 5% de glycérol (figure 4.6.a). En employant la formule empirique de **Chen et al.**, nous avons par la suite estimé la viscosité du tampon puis calculé le coefficient de diffusion de NucS à l'aide de la formule de Stokes Einstein $D = k_BT/6\pi\eta R_h$ avec un diamètre de 7.5 nm [Che08, Ren09].

$$\frac{\eta}{\eta_{eau}} = 1 + 0.125 \cdot C_{mol} exp\left(\frac{C_{mol}^{0.219}}{2.29[(T+273.1)/273.1]^3 - 1}\right) \tag{4.6}$$

avec

$$\eta_{eau} = 0.096 \cdot 10^{-6} exp\left(\frac{2.9}{[(T+273.1)/273.1]^3}\right) \tag{4.7}$$

où T représente la température et C_{mol} le pourcentage molaire de glycérol. Dans la figure (4.6.b), on remarque que le taux d'association diminue avec le coefficient de diffusion qui diminue avec la viscosité. Ceci indique que l'interaction NucS-ADN est limitée par le mouvement brownien des protéines en solution. Lorsque la viscosité du tampon augmente, le coefficient de diffusion libre diminue ainsi que le parcours moyen par unité de temps. La protéine prend alors plus de temps pour retrouver son substrat ce qui explique la diminution du taux d'association.



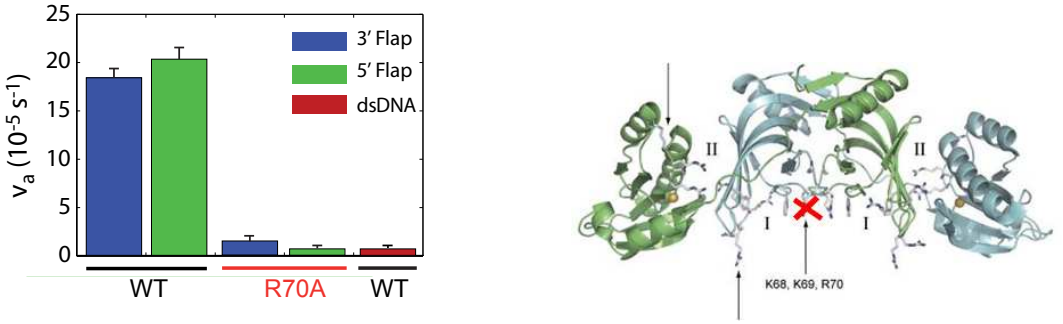
(a) (b)

FIGURE 4.6.: (a) Variation du taux d'association en fonction du glycérol pour [NucS]=20 pM. $v_a^{0\%} = 99\ 10^{-4}s^{-1}$ $v_a^{5\%} = 45\ 10^{-4}s^{-1}$ et $v_a^{20\%} = 16\ 10^{-4}s^{-1}$. (b) Le taux d'association en fonction du coefficient de diffusion 3D.

Dans un système purement diffusif, la vitesse d'association est directement proportionnelle au coefficient de diffusion D_{NucS} libre. Dans nos expériences, nous n'avons pas retrouvé cette linéarité ce qui signifie que d'autres facteurs qui dépendent également de la viscosité influencent l'activité de la protéine. Il est possible par exemple que la viscosité ralentisse un changement conformationnel lors du chargement de NucS sur l'ADN ou son activité en général. Ceci a déjà été observé par **Uribe et al.** et pourrait être interprété comme un changement de l'énergie d'activation de la protéine en fonction de la viscosité [Uri03,Hag10]. Il est également possible que des effets de surface apparaissent et entraînent une diminution du taux d'association. Pour mieux comprendre ce phénomène, il serait indispensable de faire des expériences sur une gamme de concentration en glycérol plus grande ce qui est expérimentalement difficilement réalisable.

Spécificité de l'interaction avec le flap

Pour vérifier, dans un contrôle supplémentaire, que l'interaction observée est une interaction entre la protéine NucS et le flap de l'ADN et non entre la protéine et le double brin d'ADN, nous avons effectué un test avec un mutant R70A où le résidu 70 de la protéine a été modifié pour induire une faible activité de fixation. On observe alors une association significativement plus faible du mutant à l'ADN par rapport à la protéine naturelle. En effet, le taux d'association passe de v_a =17 $\pm$ 2 $10^{-5}s^{-1}$ à v_a =1.4 $\pm$ 0.5 $10^{-5}s^{-1}$ pour le flap 3' et de v_a = 20 $\pm$ 2 $10^{-5}s^{-1}$ à v_a = 0.3 $\pm$ 0.1 $10^{-5}s^{-1}$ pour le flap 5'. D'un autre côté, nous avons effectué un test de contrôle pour vérifier que la protéine naturelle se lie spécifiquement à l'ADN simple brin. Nous avons alors mesuré le taux d'association avec un ADN double brin et obtenu une valeur de $v_a = 0.2 \pm$ 0.1 $10^{-5}s^{-1}$ qui est 10 fois plus petite que la valeur trouvée pour le flap (figure 4.7). Ce résultat met en évidence la spécificité de l'interaction observée avec le flap, confirme que le site actif I est indispensable pour la liaison comme suggéré par **Ren et al.** et justifie notre méthode de colocalisation [Ren09].



(a) (b)

FIGURE 4.7.: (a) Variation du taux d'association de la protéine et son mutant. Les taux d'association avec le flap 3' et 5' sont proches et NucS interagit très faiblement avec l'ADN double brin. Par ailleurs, le mutant est incapable de se lier au flaps 3' et 5'. Ces tests permettent de conclure sur la spécificité de l'interaction de NucS avec les structures d'ADN en flap. (b) Structure de la protéine NucS avec marquage de la mutation.

En résumé, nous avons montré que NucS pouvait se lier aux deux flaps de l'ADN 3' et 5' de façon symétrique et constituait ainsi une nouvelle famille d'endonucléases qui interagissent avec les structures d'ADN branchées. Nous avons également montré que le chargement de NucS sur le flap variait en fonction de la viscosité et qu'il dépendait fortement de la concentration saline suggérant ainsi une composante électrostatique

qui participe à l'association. Le chargement de NucS sur le flap d'ADN serait donc limité par la diffusion libre de la protéine en solution et par une force électrostatique agissant à courte portée [2].

4.2.2. Cinétique de dissociation

Mesure du temps d'interaction

Après avoir étudié la fréquence des événements d'interaction pour déterminer le taux d'association de la protéine NucS sur le flap de l'ADN, nous nous sommes intéressés à la durée de cette interaction. Nous avons alors commencé par déterminer le temps de résidence, c'est à dire le temps qui sépare l'arrivée d'un spot lumineux sur une image et qui correspond à la formation du complexe NucS-ADN du temps de l'extinction du spot lumineux. Ce temps ne correspond pas forcément à la durée de l'interaction puisque l'extinction du spot lumineux peut avoir deux raisons : (i) la dissociation du complexe et le départ de la protéine ou bien (ii) le photoblanchiment du fluorophore. Ainsi, la probabilité d'extinction d'un spot dépend de la probabilité de dissociation du complexe P_{diss} et la probabilité de photoblanchiment P_{pbl}. En connaissant le temps caractéristique de photoblanchiment, nous pouvons alors mesurer très précisément la distribution des durées d'interaction à partir de la distribution des temps de résidence P_{res}. En définissant P_{res} comme la probabilité qu'un complexe NucS-ADN soit visible à un instant t, P_{diss} la probabilité que NucS se soit dissociée à l'instant t et P_{pbl} la probabilité que le fluorophore ait photoblanchi à l'instant t, nous pouvons dire que la probabilité de résidence est donnée par l'expression suivante :

$$P_{res}(t) = \overline{P}_{diss}(t)\overline{P}_{pbl}(t) \tag{4.8}$$

$$= (1 - P_{diss}(t))(1 - P_{pbl}(t)) \tag{4.9}$$

qui vérifie que le complexe NucS-ADN est visible si et seulement si le fluorophore n'a pas photoblanchi et la protéine ne s'est pas dissociée. Sachant que le photoblanchiment suit une loi exponentielle avec un temps caractéristique t_c (voir section3.3.2), nous pouvons écrire $P_{pbl}(t) = 1 - e^{-t/t_c}$ ce qui donne

$$1 - P_{diss}(t) = \frac{P_{res}(t)}{1 - (1 - e^{-t/t_c})} \tag{4.10}$$

2. La longueur de Debye qui décrit la portée des forces électrostatiques dans un électrolyte est égale à 0.3 nm à 1 M de NaCl [But03]. Elle dépend de l'inverse de la racine carrée de la concentration et vaut dans nos conditions expérimentales 1.4 nm.

et finalement :

$$P_{diss}(t) = 1 - \frac{P_{res}(t)}{e^{-t/t_c}} \tag{4.11}$$

En mesurant la distribution des temps de résidence P_{res} expérimentalement, nous pouvons déterminer la distribution de la probabilité de dissociation. Notons qu'il est important de se mettre dans un régime où le temps caractéristique de photoblanchiment est supérieur au temps moyen d'interaction car lorsque la durée moyenne d'interaction est supérieure au temps caractéristique de photoblanchiment, il devient très probable que le fluorophore photoblanchisse avant que la protéine ne se dissocie de l'ADN. Dans ce cas, la distribution des temps de résidence est identique à celle du photoblanchiment. Pour pouvoir mesurer la durée d'interaction sur plusieurs gammes de temps, il devient alors indispensable d'ajuster le temps de photoblanchiment. Nous avons utilisé la technique d'illumination stroboscopique sur des temps différents à l'aide d'un obturateur pour rallonger le temps d'observation d'un facteur variant entre 10 et 20 (figure 3.29). En comparaison aux techniques qui utilisent des réducteurs d'oxygène (voir section 3.3.2) pour rallonger le temps de vie des fluorophores, l'illumination stroboscopique garantit un temps caractéristique de photoblanchiment constant au cours du temps [3]. Les méthodes chimiques d'oxydoréduction sont ici moins précises puisqu'elles dépendent d'une réaction chimique dont l'efficacité décroît au cours du temps [Ait08].

Nous avons commencé par étudier l'interaction de NucS avec le flap 3' dans un tampon B1 contenant 150 mM de NaCl et 20 mM de HEPES (pH=8). Sur une durée totale de 50 min (10 x 5 min), nous avons enregistré 53 interactions spécifiques entre NucS et ADN dont la distribution des temps de résidence est illustrée dans la figure 4.8. Afin de comparer les temps de résidence aux temps d'interaction non spécifique et de photoblanchiment, nous avons calculé leurs fonctions cumulatives et démontré grâce à un test de Kolmogorov-Smirnov (KS-test) qu'elles étaient toutes distinctes (voir tableau 4.1). Ceci montre que l'interaction détectée est bien une interaction spécifique entre NucS et l'ADN. Le temps moyen de résidence est égal à 7.8 s ± 0.1 s, celui du photoblanchiment 20.2 s ± 0.1 s [4] et celui de l'interaction non spécifique 0.2 s ± 0.1 s. Pour extraire la distribution des temps d'interaction absolus, nous avons utilisé l'équation 4.11 et avons trouvé que la distribution des temps d'inter-

3. t_c dépend uniquement de la puissance d'excitation du laser.
4. Mode d'acquisition : 1 image par seconde.

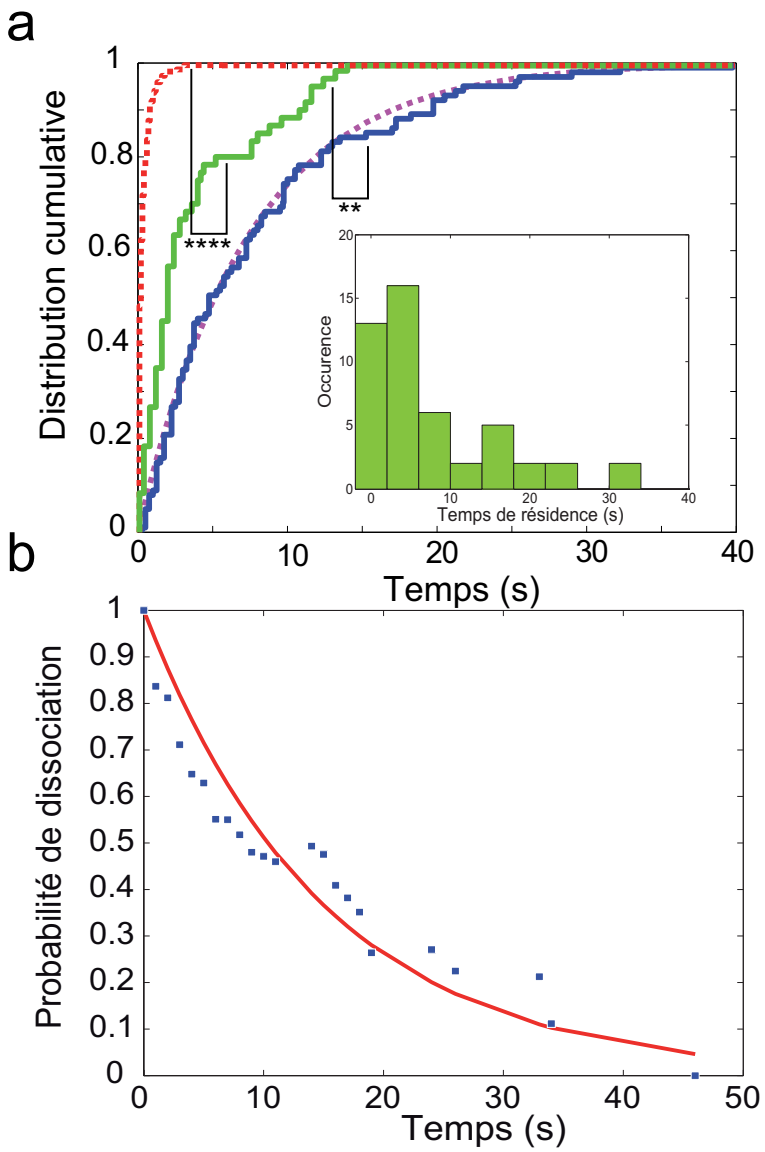


FIGURE 4.8.: a. Fonctions cumulatives des temps de photoblanchiment (bleu), interaction spécifique (vert) et interaction non spécifique (rouge). La ligne mauve correspond à un ajustement des temps de photoblanchiment à la fonction $P_{pbl}(t)$=1-exp(t/t_c) avec $t_c = 20.1\ s$. L'histogramme des temps de résidence bruts est illustré dans l'encart. b. Distribution des temps d'interaction spécifique avec le flap 3' dans 150 mM de NaCl. Carrés bleus : valeurs calculées à partir des données dans a. L'ajustement avec une exponentielle simple (ligne rouge) montre que la dissociation suit un modèle en une étape : NucS · ADN→ NucS+ADN.

action suivait une loi exponentielle comme ce serait le cas lors d'une dissociation en une étape : NucS · ADN$\xrightarrow{k_{off}}$ NucS+ADN (figure 4.8.b) avec un temps caractéristique d'interaction qui est égal à 0.067 ± 0.005 s^{-1}.

Valeur p (KS-TEST)	Photoblanchiment	Interaction non spécifique
Interaction spécifique avec Flap 3'	0.05	10^{-4}
Interaction spécifique avec Flap 5'	0.01	10^{-6}

TABLE 4.1.: Valeurs de p calculées à partir d'un KS-TEST pour la comparaison entre les temps de photoblanchiment, d'interaction spécifique et d'interaction non spécifique.

Comparaison entre les Flap 3' et 5' et effet du sel

Nous avons répété l'expérience avec un flap 5' et obtenu 48 interactions dans les mêmes conditions expérimentales. Le temps moyen d'interaction mesuré (18.2 ± 0.4 s) est significativement supérieur à celui avec le flap 3' (7.2 ± 0.1 s) et la distribution des temps d'interaction suit le même comportement exponentiel décroissant (KS-test : p=10^{-3} entre 3' et 5'). Cette observation indique que l'interaction NucS-ADN est plus stable avec le flap 5' qu'avec le flap 3' mais qu'elle suit le même mécanisme de dissociation.

Dans un second temps, nous avons modifié la concentration en sel et refait les expériences dans le tampon B2. Nous avons alors obtenu des temps moyen d'interaction de 1.2 ± 0.1 s et 1.8 ± 0.1 s pour les flaps 3' et 5', respectivement. Ici également, la durée d'interaction moyenne avec le flap 5' est significativement supérieure à celle avec le flap 3' et le KS-test permet de vérifier que les distributions sont distinctes (p=0.02). Nous pouvons en déduire que NucS possède une préférence pour les flaps 5' qui n'avait pas été observée préalablement et qui est due à une stabilisation du complexe (figure 4.9). Les temps moyens d'interaction et les temps caractéristiques de dissociation calculés à partir de l'équation 4.11 sont rassemblés dans le tableau 4.2. Contrairement aux taux d'association symétriques pour les deux flaps, nous remarquons que les taux de dissociation dépendent de la nature du flap et que la dissociation du complexe NucS-ADN est orientée avec une stabilité plus grande entre NucS et le flap 5'.

Par ailleurs, nous observons que la durée moyenne d'interaction dépend fortement de la concentration saline et le temps moyen d'interaction diminue d'un facteur 6.5 pour le flap 3' et 10.1 pour le flap 5' entre une concentration de 150 mM et 50 mM en NaCl. Nous en déduisons que l'inhibition des interactions électrostatiques renforce la stabilité du complexe. **Creze et al.** ont par ailleurs observé que la constante de

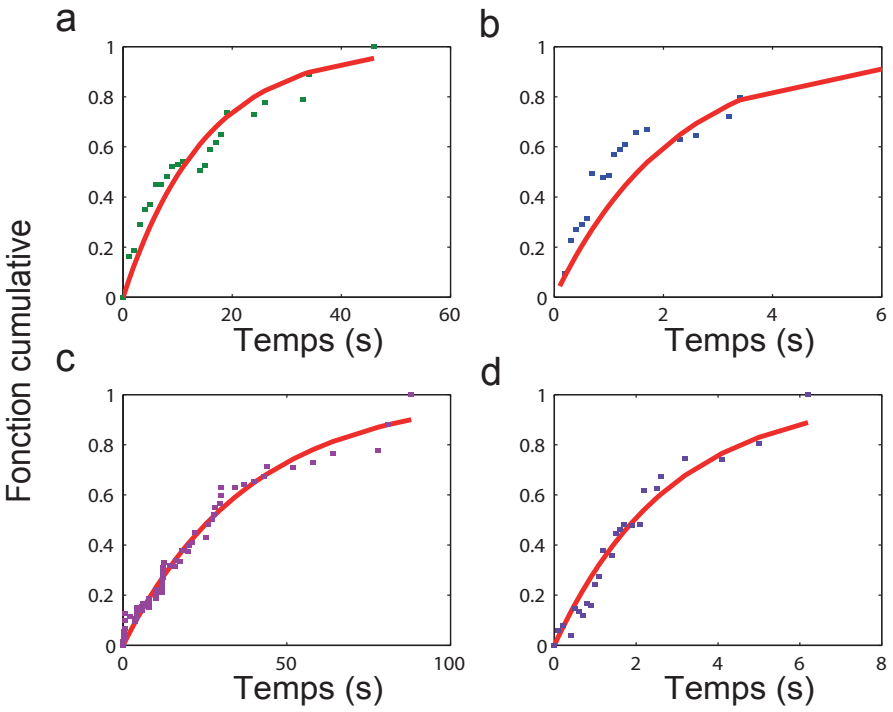


FIGURE 4.9.: Distribution des probabilités de dissociation du complexe NucS-ADN. a. et b. Flap 3' à 150 mM et 50 mM de NaCl, respectivement. c. et d. Flap 5' à 150 mM et 50 mM de NaCl, respectivement.

[NaCl]	50 mM	150mM
Flap 3'	1.2 s (k_{off}=0.52 s^{-1})	7.8 s (k_{off}=0.067 s^{-1})
Flap 5'	1.7 s (k_{off}=0.35 s^{-1})	18.2 s (k_{off}=0.026 s^{-1})

TABLE 4.2.: Temps moyens de l'interaction NucS-ADN et taux caractéristiques de dissociation déterminés par observation de molécules uniques.

dissociation K_d était stable entre 150 mM et 250 mM de sel et augmentait de 250 mM à 400 mM de NaCl de façon linéaire ce qui signifie que le complexe NucS-ADN est instable à forte concentration saline [Cre12]. En combinant ces résulats nous pouvons conclure qu'il existe une concentration saline entre 150 et 250 mM optimale. L'affinité NucS/ADN est ainsi assurée par un équilibre entre les interactions électrostatiques et les interactions non électrostatiques qui dépendent de l'orientation de l'ADN (voir section 4.3).

Effet du glycérol et rôle de la diffusion

Ren et al. reportent que l'activité de NucS ne nécessite pas d'ATP. Par ailleurs, leurs mesures d'ensemble ont montré la nécessité d'une extrémité de brin libre pour

pouvoir cliver son substrat et qu'elle pouvait cliver le flap d'ADN en fragments ou à la jonction en présence de PCNA [Ren09]. A partir de ces observations, trois mécanismes d'interaction peuvent être envisagés : Dans le premier cas, la protéine se lie à l'extrémité du flap, diffuse tout le long du brin d'ADN par glissement (*sliding*) ou en petits sauts (*hopping*) jusqu'à la jonction entre le double brin et le simple brin où elle se dissocie. Ce modèle a été proposé par **Bambara et al.** pour la protéine Calf exo/endonucléase qui est l'homologue de la humaine [Bam95]. Dans le second cas, la protéine se lie à l'extrémité mais peut se dissocier aléatoirement sur le flap et dans le troisième cas, NucS se fixe directement à la jonction et enroule le flap par la suite pour le digérer en entier ou en morceau [5] (figure 4.10.a).

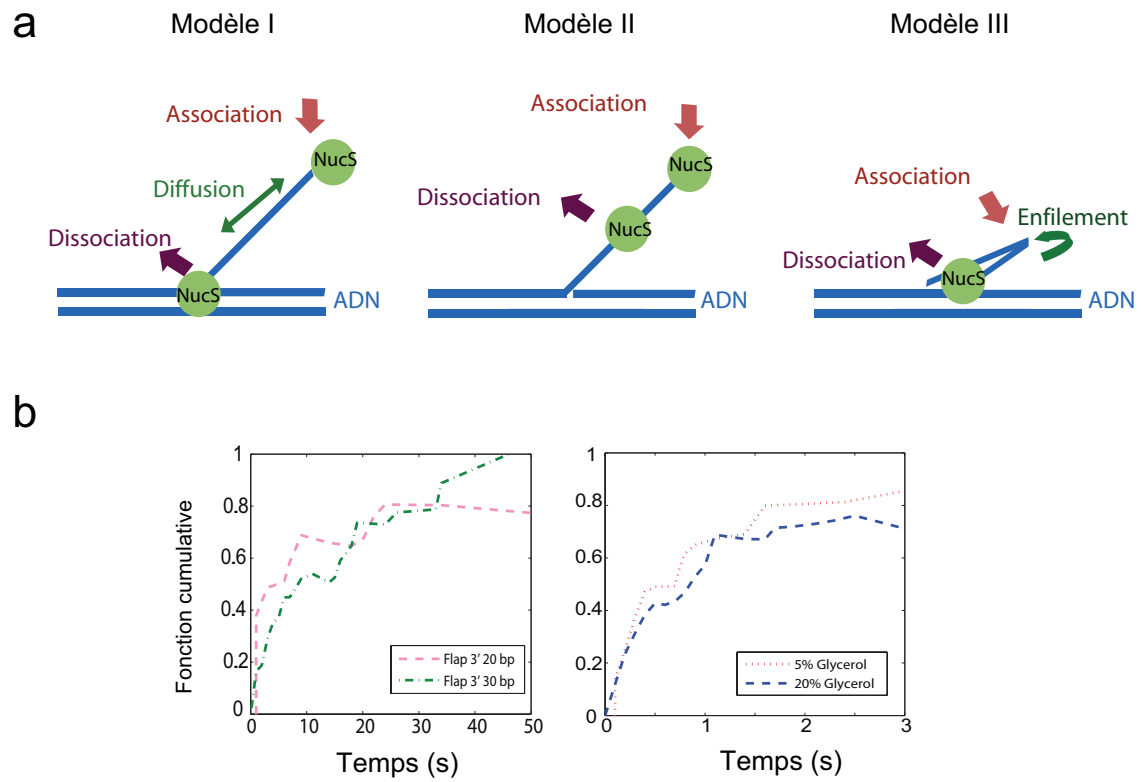


FIGURE 4.10.: a. Modèles d'interaction NucS-ADN. Dans le modèle I, la protéine se lie à l'extrémité libre, diffuse jusqu'à la jonction puis se dissocie. Dans le modèle II, la protéine se lie et se dissocie aléatoirement. Dans le modèle III, elle se lie à la jonction, recrute l'extrémité qu'elle enfile puis se dissocie. b. Les expériences effectuées en ajoutant du glycérol (droite) ou avec des flaps plus longs (gauche) permettent de conclure que la diffusion ne limite pas l'interaction NucS-ADN.

5. Les modèles proposés sont valables pour les conditions de clivage. Dans ce chapitre, nous avons travaillé dans des conditions non clivantes et nous avons supposé que ces modèles restent valables puisque NucS possède deux sites actifs distincts dont le premier est responsable de la liaison et le second du clivage (voir section 1.3).

Longueur du flap	20 bp	30 bp
Flap 3'	7.8±0.1 s	7.6 ± 0.3 s
Flap 5'	18.2 ± 0.4 s	17.4 ± 0.6 s

TABLE 4.3.: Temps moyens de linteraction NucS-ADN

Afin de tester le rôle que peut jouer la diffusion éventuelle de NucS sur le flap dans la cinétique d'interaction (modèle I), nous avons mesuré la dépendance des temps d'interaction avec la longueur du flap et de la concentration de glycérol en solution. En ajoutant du glycérol à la solution tampon, sa viscosité augmente ce qui entraîne un ralentissement de la protéine en interaction avec l'ADN pendant sa diffusion sur le flap. Le temps moyen d'interaction attendu serait alors plus grand. Cependant, nos expériences réalisées avec 5% puis avec 20 % de glycérol, donnent des temps moyens d'interaction très proches de ceux mesurés sans glycérol. Sur un total de 57 interactions à 0%, nous avons obtenu un temps moyen de 1.2 s± 0.1 s pour le flap 3' à 50 mM de NaCl. A 5 % et à 20 % de glycérol, les temps moyens d'interaction sont égaux à 1.3 s± 0.1 s sur un total de 37 interactions et 1.2 ± 0.1 s sur un total de 42 interactions, respectivement. De plus, nous avons remarqué que la distribution des temps d'interaction était la même (figure 4.10). Ces observations nous permettent par conséquent de déduire que la diffusion sur le flap ne limite pas l'interaction de la protéine NucS avec son substrat d'ADN.

Dans un second contrôle, nous avons étudié l'influence de la longueur du flap sur la durée de l'interaction. Nous avons mesuré les temps d'interaction avec un flap de longueur 30 bp et comparé les résultats obtenus à ceux réalisés avec un flap de longueur 20 bp. Dans un modèle purement diffusif où NucS s'associe à l'extrémité et diffuse jusqu'à la jonction, le temps est proportionnel au carré de la distance $t \propto L^2$. Multiplier la longueur du flap par un facteur 1.5 aboutirait ici à un temps d'interaction moyen 2.25 fois supérieur. Or, les résultats obtenus indiquent des temps moyens indépendants de la longueur des flaps (tableau 4.3). Ici également, la forme des distributions des temps d'interaction est identique pour un flap de longueur 20 et 30 bp (figure 4.10.b) et montre que l'interaction n'est pas limitée par diffusion.

Par conséquent, si NucS suit le modèle I, sa diffusion devrait être plus rapide que notre résolution temporelle de 0.1 s. Pour une longueur de flap de 30 bp, le coefficient de diffusion doit alors être supérieur à 4500 bp^2/s. A titre de comparaison, **Zhou**

et al rapportent un coefficient de diffusion de 300 bp^2/s pour la protéine SSB sur l'ADN simple brin [Zhu11]. En comparant les deux valeurs, nous pouvons conclure que la diffusion est non seulement non limitante pour la cinétique de l'interaction de NucS avec l'ADN mais aussi que le modèle I est peu probable. D'un point de vue mécanistique, nous pouvons ainsi dire que dans des conditions non clivantes, NucS peut se charger à l'extrémité libre ou à la jonction et se dissocier à une position quelconque suivant les modèles II ou III.

4.2.3. Estimation de la constante de dissociation K_d

Après avoir étudié la cinétique d'association et de dissociation, nous avons estimé la constante de dissociation en appliquant le modèle de réaction suivant à notre système :

$$NucS \cdot ADN \underset{k_{on}}{\overset{k_{off}}{\rightleftharpoons}} NucS + ADN \tag{4.12}$$

Dans cette approche, nous réduisons le système à une réaction avec deux taux effectifs : (i) un taux effectif d'association k_{on} qui, comme décrit précédemment, est une sous-estimation de la valeur absolue en raison de la géométrie de notre système avec l'ADN accroché à la surface et la protéine libre en solution. (ii) un taux de dissociation k_{off} qui caractérise la dissociation du complexe NucS-ADN. En appliquant la loi d'action de masse, nous pouvons écrire :

$$\frac{d[NucS \cdot ADN]}{dt} = k_{on}[NucS][ADN] - k_{off}[NucS \cdot ADN] \tag{4.13}$$

ce qui donne à l'équilibre :

$$K_d = \frac{[NucS][ADN]}{[NucS \cdot ADN]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \tag{4.14}$$

Or, d'après l'équation(4.5), nous avons $v_a = k_{on}[NucS]$ ce qui donne au final :

$$K_d = [NucS]\frac{k_{off}}{v_a} \tag{4.15}$$

Concentration of NaCl	50 mM	150mM
3' Flap	17.7	7.8
5' Flap	9.4	2.6

TABLE 4.4.: Constantes de dissociation K_d (nM).

Contrairement aux méthodes classiques qui déterminent K_d à partir des concentrations des réactants à l'équilibre, nous avons calculé la constante de dissociation à partir de k_{on} et k_{off}. Toutes nos expériences ayant été effectuées avec une concentration de NucS égale à 20 pM. Nous obtenons alors $K_d^{3'}$=7.8 ± 0.3 nM et $K_d^{5'}$=2.6 ±0.3 nM pour une concentration de 150 mM de NaCl. Ces valeurs sont en accord avec les mesures de résonance des plasmons de surface sur un simple brin d'ADN 3' ($K_d = 4\ nM$) [Ren09]. A 50 mM de NaCl, les constantes de dissociation trouvées sont égales à $K_d^{3'}$=17.7 ± 0.2 nM et $K_d^{5'}$=9.4 ±0.4 nM pour les flaps 3' et 5', respectivement. Ces résultats montrent que NucS est une enzyme bipolaire même si nous constatons une meilleure affinité pour le flap 5'. De plus, le ratio $K_d^{3'}/K_d^{5'}$ est égal à 1.8 pour une concentration de 50 mM de NaCl et à 3.0 pour une concentration de 150 mM et montre que cette préférence pour le flap 5' est d'autant plus élevée que la concentration en sel augmente (voir tableau 4.4) ce qui est dû à une différence de stabilité relative du complexe (figure 4.11).

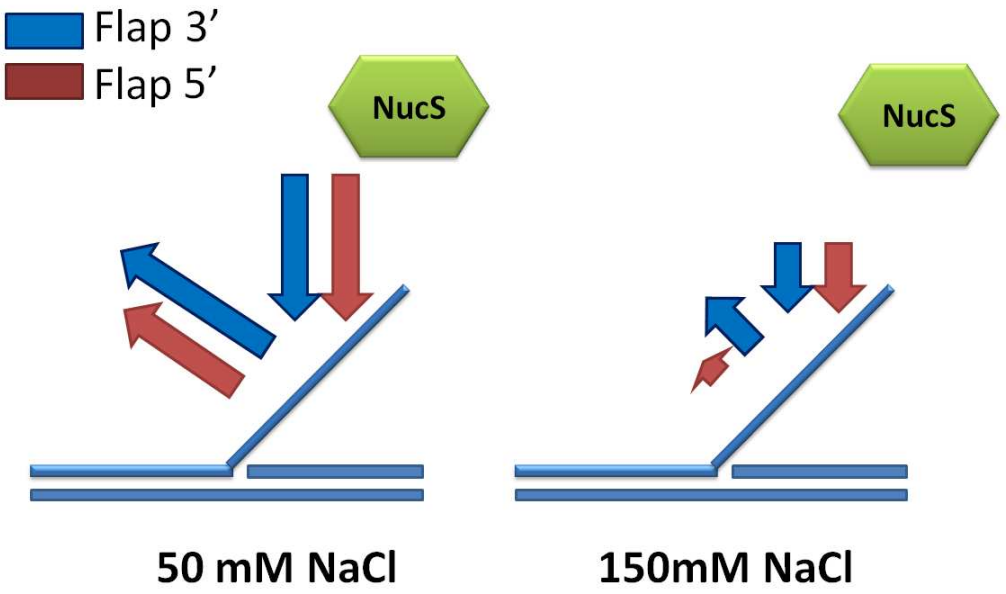


FIGURE 4.11.: Cinétique d'association et de dissociation de NucS avec le flap 3' et 5'. La longueur de la flèche est indicative de la valeur du taux d'association et de dissociation.

4.3. Discussion

4.3.1. Caractérisation de l'interaction NucS-Flap

Dans cette étude, nous avons observé l'interaction de l'endonucléase NucS et mis en évidence sa bipolarité avec son substrat d'ADN à l'échelle de la molécule unique. Ces résultats confirment que NucS constitue une nouvelle famille de nucléases qui interagissent avec les structures branchées de l'ADN [Ren09]. Des tests effectués avec le mutant R70A dont le site de liaison est inactif ont confirmé que le site I était indispensable pour la liaison avec l'ADN simple brin. Par ailleurs, nos mesures de la constante de dissociation K_d sont en bon accord avec les résultats des mesures d'ensemble (K_d=4 nM en mesure d'ensemble pour un simple brin 3' et K_d=10 nM en molécule unique pour un flap). En outre, nous avons repéré une affinité plus grande de NucS pour le flap 5' qui est due uniquement à la stabilité du complexe.

Nous avons, d'autre part, démontré un rôle central de la force ionique du tampon dans la modulation de l'interaction NucS-ADN. Alors que les taux d'association symétriques pour les flaps 3' et 5' sont réduits à forte concentration saline ce qui entraîne une diminution du nombre d'interactions par unité de temps, le complexe NucS-ADN s'avère plus stable dans ces conditions où les interactions électrostatiques sont atténuées. Du point de vue énergétique, ceci indique que le complexe NucS-ADN possède deux composantes : (i) une composante électrostatique indépendante de l'orientation du flap qui est attractive lorsque le complexe n'est pas encore formé et facilite alors le chargement de NucS et répulsive une fois que le complexe s'est formé et (ii) une composante non électrostatique stable ou renforcée par le sel qui agit à courte distance en assurant la stabilité du complexe et qui dépend de l'orientation du flap. Cette dépendance est moins visible aux faibles concentrations salines pour lesquelles les forces électrostatiques sont dominantes et les temps d'interaction relativement courts ($t^{3'}_{moyen} = 1.2\ s$ et $t^{5'}_{moyen} = 1.7\ s$). En atténuant les interactions électrostatiques en revanche, l'effet de la composante non électrostatique devient plus significatif ainsi que sa dépendance de l'orientation du flap ($t^{3'}_{moyen} = 7.8s$ et $t^{5'}_{moyen} = 18.2\ s$). Cette composante peut avoir plusieurs origines :

– D'une part, nous avons les forces hydrophobes qui sont sensibles à la structure et dont la valeur est proportionnelle à la surface effective entre la protéine et l'ADN. Cette interface est composée de l'ADN simple brin où les bases hydrophobes

sont en contact avec le coeur du site actif qui a la forme d'un sillon hydrophobe [Ren09]. Les parties hydrophobes vont alors se rassembler en chassant l'eau à l'extérieur du site actif ce qui contribue à la stabilité du complexe. Ici, ces forces générées dépendent de la surface de contact [6] et donc de l'orientation du brin d'ADN à l'intérieur du sillon et, d'après nos observations, la complémentarité entre les brins d'ADN et le site actif devrait être plus grande pour un flap 5'.

– D'autre part, nous avons les forces de dispersion de London créées par les dipôles induits qui accompagnent les forces hydrophobes. Ces forces naissent lorsque la densité d'électrons des deux molécules en interaction n'est pas homogène ce qui génère des forces attractives ou répulsives entre les deux molécules et peut moduler le temps d'interaction [Sto96]. Elles sont d'autant plus grandes que les chaînes latérales de la protéine s'intercalent entre les bases de l'ADN simple brin. **Ren et al.** ont d'ailleurs soulevé le fait que les résidus aromatiques dans les chaines latérales sont parfaitement orientés pour interagir avec les bases de l'ADN [Ren09].

Sur le plan physiologique, ces observations nous permettent de conclure que le sel module le temps d'interaction de NucS avec son substrat en réduisant les taux d'association et de dissociation ce qui a pour effet de maintenir une activité effective de NucS dans des environnements de salinité différente. Nous pouvons ainsi identifier deux régimes d'interaction : (i) un régime dynamique où le complexe NucS-ADN est instable mais où le taux d'association élevé rend l'activité efficace et (ii) un régime statique où l'activité est réduite mais le complexe plus stable. **Creze et al** rapportent par ailleurs un affaiblissement de l'interaction NucS-ADN pour les concentrations salines entre 250 et 400 mM en présence de PCNA [Cre12]. Nous pouvons conclure en combinant ces résultats qu'il existe un équilibre entre ces deux régimes à une concentration d'environ 200 mM.

4.3.2. Mécanisme de dissociation du complexe NucS-ADN

Grâce à notre analyse de la cinétique de dissociation, nous proposons dans ce travail un aperçu de l'interaction NucS-ADN à l'échelle intramoléculaire. Dans notre étude du mécanisme de dissociation, nous nous sommes basés sur les résultats publiés par **Ren et al.** qui ont montré (i) qu'il est indispensable pour NucS d'avoir une extrémité

6. Elle peuvent également dépendre de la concentration en sel. Les interactions hydrophobes peuvent être amplifiées ou réduites en présence de sel [Zan07].

d'ADN libre pour pouvoir cliver le flap et (ii) que la réaction donne naissance à des produits dont la taille pouvait varier entre quelques bases et la totalité du flap. Ces résultats suggèrent que NucS suit trois mécanismes différents : un mécanisme diffusif où elle se charge à l'extrémité libre du flap, diffuse jusqu'à la jonction grâce à son site de liaison très bien adapté pour accommoder l'ADN simple brin puis se dissocie à la jonction après avoir clivé, un mécanisme où elle se charge à l'extrémité et clive de façon stochastique dans le flap et un mécanisme où elle se charge directement à la jonction pour enfiler l'ADN simple brin par l'extrémité libre et le cliver ensuite (figure 4.10.a).

Dans le but d'observer en temps réel l'interaction de NucS avec son substrat et en l'absence d'une résolution spatiale permettant le suivi de la trajectoire de la protéine, nous nous sommes intéressés à la cinétique de dissociation dans des conditions non clivantes pour déterminer à partir de la distribution des temps d'interaction le mécanisme qui permet à NucS de se lier puis de se dissocier de l'ADN. Nous avons remarqué que la distribution des temps d'interaction suivait toujours une loi exponentielle qui conduit à un même mécanisme de détachement en une étape avec un taux de dissociation k_{off} qui limite l'interaction. Nous avons par ailleurs montré que la diffusion sur le flap ne limitait pas la cinétique de dissociation et que, par conséquent, le taux de dissociation dépendait uniquement des propriétés intramoléculaires du complexe NucS-ADN. Il était régi par l'équilibre entre les forces électrostatiques et hydrophobes à l'intérieur du complexe. Du point de vue du mécanisme d'interaction, nous pouvons conclure que dans les conditions non clivantes, NucS est capable de se lier et de se dissocier à différents endroits sur le flap grâce à son site actif I qui a une affinité nanomolaire pour l'ADN simple brin. Nous discuterons dans le chapitre suivant la validité de ce mécanisme dans des conditions clivantes où un clivage spécifique à la jonction en présence de PCNA a lieu.

4.4. Étude de l'activité de

A titre de contrôle de nos mesures sur NucS, nous nous sommes intéressés à une autre flap-endonucléase nommée Fen1 de la même espèce *Pyroccocus abyssi* qui est connue pour interagir avec les flaps 5' uniquement [Mat98]. Fen1 est une endonucléase qui reconnait les structures branchées d'ADN où elle se fixe sur le simple brin

libre qu'elle clive par la suite[7]. En dépit de nombreuses études effectuées sur cette protéine, le mécanisme d'interaction complet reste toujours inconnu et il existe deux hypothèses : Dans le premier cas, des études suggèrent que Fen1 se fixe à l'extrémité simple brin libre, diffuse à la jonction et clive ensuite puisque son site de liaison ne peut accommoder que l'ADN simple brin [Bam99]. Les mêmes auteurs proposent un autre modèle plus récent où Fen1 se fixe à la jonction et enfile le simple brin d'ADN avant de le cliver [Bam10].

Dans nos expériences, nous avons étudié sa cinétique d'association et de dissociation avec les flap 3' et 5' et nous avons expérimentalement vérifié grâce à un suivi de molécules uniques la spécificité de l'interaction avec le flap 5'. Nous avons en effet comparé les taux d'association de la protéine avec différents substrats de façon similaire à notre étude de NucS (figure 4.12.a).

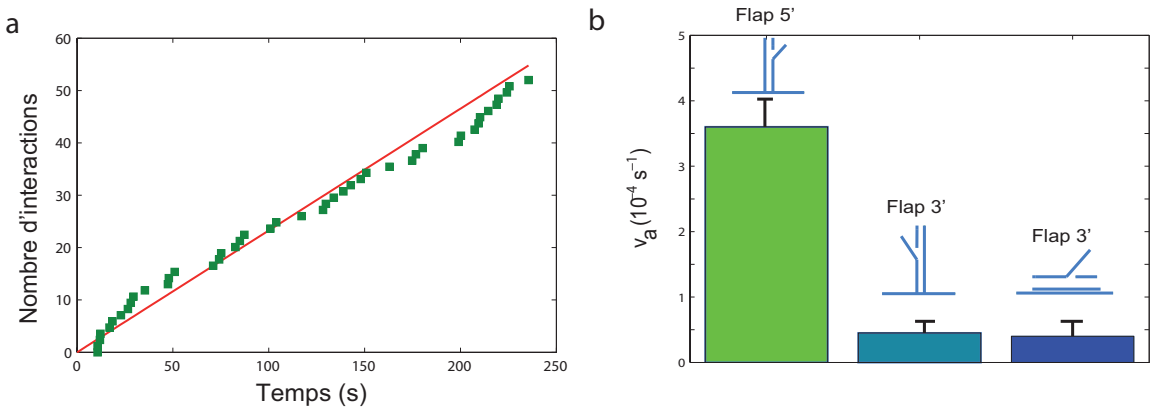


FIGURE 4.12.: Cinétique d'association de Fen1. a. Croissance linéaire avec le temps du nombre d'interactions mesurées. Le calcul de la pente aboutit à un taux d'association de $3.6 \pm 0.4\ 10^{-4}\ s^{-1}$ par molécule d'ADN pour une concentration de 50 pM de Fen1. b. Histogramme des taux d'association de Fen1 avec le flap 5' (à gauche), le flap 3' avec 1 biotine (centre) et le flap 3' avec 2 biotines (à droite). La très faible activité de liaison de la protéine avec le flap 3' permet de conclure sur une spécificité pour le flap 5'.

Le taux d'association trouvé pour un flap 5' est égal à $3.6 \pm 0.4\ 10^{-4}\ s^{-1}$. Celui pour un flap 3' accroché à la surface par les deux bouts $0.37 \pm 0.08\ 10^{-4}\ s^{-1}$ et $0.4 \pm 0.1\ 10^{-4}\ s^{-1}$ pour un flap 3' où le substrat est accroché à la surface par une seule extrémité (figure 4.12.b). Ces observations nous permettent de conclure sur la spécificité de Fen1 pour les flaps 5'.

7. Les conditions de clivage sont similaires pour NucS et Fen1 qui nécessitent toutes les deux la présence de Manganèse ou Magnésium pour cliver le simple brin.

Après avoir mesuré le taux d'association, nous avons déterminé le taux de dissociation du complexe Fen1-ADN en mesurant le temps d'interaction de la protéine avec l'ADN. Nous avons enregistré 17 événements d'interaction spécifique d'une durée moyenne de 35 s ce qui correspond à un taux de dissociation de 0.028 s^{-1}. Ces observations indiquent une forte liaison entre Fen1 et l'ADN et sont en accord avec les observations de **Gloor et al** qui montrent que Fen1 a tendance à rester accrochée longtemps sur un flap de longueur supérieure à 5 bp [Bam10]. En comparant le temps moyen d'interaction avec celui de NucS (environ 18 s) pour le même flap et dans les mêmes conditions expérimentales, nous pouvons dire que le complexe Fen1-ADN est au moins 2 fois plus stable que le complexe NucS-ADN (K_d=1.5 ± 0.3 nM).

En conclusion, nos mesures d'activité de Fen1 nous ont permis de vérifier à l'échelle de la molécule unique la spécificité de cette protéine pour les flaps 5' et au demeurant de valider notre méthode de mesure de l'activité de ces protéines en interaction avec leur substrats. Cela montre l'universalité de notre système et ouvre ainsi les horizons à des mesures plus avancées où notamment des cofacteurs du complexe de réparation interviennent et modulent l'interaction. L'exemple du complexe NucS-ADN-PCNA fera l'objet du chapitre suivant.

5. Étude de l'activité du complexe de réparation NucS-ADN-PCNA

A la lumière des résultats obtenus sur l'activité de liaison de NucS avec l'ADN présentés dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'étude de l'activité catalytique de NucS et du rôle du cofacteur PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). PCNA est une protéine constituée de 3 sous-unités formant un anneau qui permet de coulisser le long de l'ADN [Fre10]. Elle est connue pour son rôle de recrutement des protéines comme les hélicases ou les nucléases sur l'ADN et joue un rôle important dans la régulation de leur activité [War00, Spo05]. Elle intervient aussi bien dans la réplication, la recombinaison ou la réparation de l'ADN notamment en augmentant la processivité des protéines sur l'ADN [Ess05]. L'affinité de PCNA est connue pour quelques protéines, mais aucune donnée structurale du complexe PCNA-ADN-protéine n'est aujourd'hui disponible et son mode d'action reste toujours inconnu.

Plusieurs études du rôle de PCNA dans la réparation des structures d'ADN branchées ont été réalisées et ont permis d'émettre des hypothèses concernant sa coopération avec les endonucléases pour cliver le simple brin d'ADN [Gom00, Rob03, Tsu11]. **Hutton et al.** ont récemment démontré qu'elle agissait suivant un mécanisme dépendant de la nature du flap [Hutt10]. Dans le cas d'un flap 5', ils ont constaté que PCNA diminue la constante de dissociation de l'endonucléase Fen1 avec son substrat tout en préservant une activité catalytique constante et ont pu conclure que PCNA régulait l'activité de Fen1 uniquement en favorisant sa liaison avec son substrat d'ADN [Whi08]. Par ailleurs, **Bambara et al.** ont émis l'hypothèse que les flaps endonucléases doivent se charger à l'extrémité du flap et glisser le long du brin jusqu'à la jonction où elles clivent le flap [Bam95]. Les auteurs ont également rapporté que PCNA se chargerait sur le double brin en aval du flap (*downstream*) et servirait de plate-forme de chargement qui facilite la liaison de l'endonucléase avec son substrat et le clivage spécifique localisé à la jonction sans influer sur le mécanisme de clivage

per se. Dans le cas d'un flap 3', **Hutton et al.** ont rapporté que PCNA augmente l'activité catalytique de XPF de 4 ordres de grandeur [Whi08]. Les auteurs ont également démontré grâce à une étude de déactivation de fluorescence que PCNA se charge sur le double brin en amont du flap (*upstream*) en présence de l'endonucléase XPF conformément au modèle établi par **Mc Donald et al.** alors qu'en absence de cette dernière PCNA peut se charger dans les deux sens sur l'ADN [Hutt10, New05]. Leurs mesures de FRET révèlent par ailleurs que XPF coopère avec PCNA pour courber l'ADN avant de cliver le flap. PCNA joue ici le rôle d'un support qui permet à l'endonucléase d'exercer la courbure nécessaire à la jonction pour garantir un clivage du flap entier.

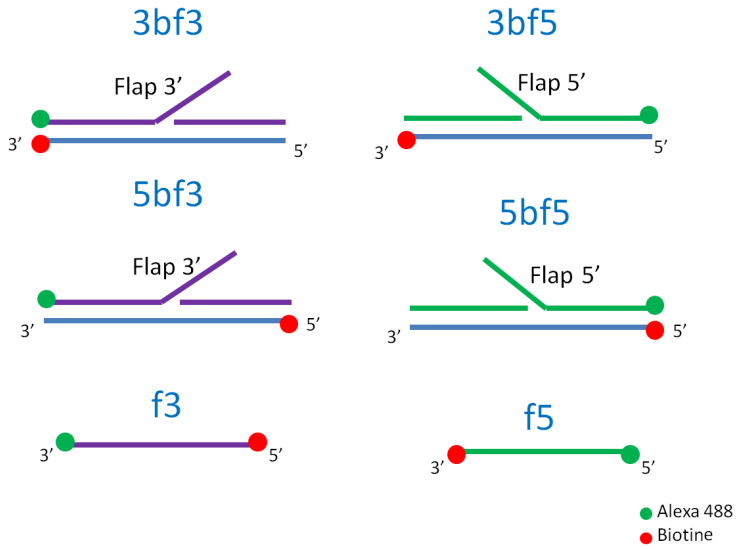


FIGURE 5.1.: Différentes constructions testées pour l'étude de l'influence de PCNA sur l'activité de NucS. Tous les flaps ont une longueur de 20 bp.

Dans la suite, nous allons décrire les résultats des expériences à l'échelle de la molécule unique que nous avons effectués dans le but de mesurer l'effet de PCNA sur l'activité de la protéine NucS et de déchiffrer son mode d'action dans le complexe PCNA-ADN-NucS. En raison de la difficulté [1] de marquer PCNA avec un fluorophore, nous avons travaillé en très grand excès pour assurer sa présence sur chaque brin d'ADN et nous avons varié les paramètres expérimentaux afin d'étudier son effet sur l'association de NucS avec l'ADN en conditions non clivantes et sur l'activité catalytique dans des conditions de clivage (45°C+ 5 mM de Manganèse). Dans ces

1. Les tests de l'équipe de Hannu Myllykallio ont montré que le marquage de PCNA inhibe son activité.

expériences, nous avons utilisé notre nouvelle technique de colocalisation avec les nanocristaux pour conserver une précision de colocalisation d'environ 50 nm suffisante pour mettre en évidence une interaction (voir section 3.6). Etant donné que PCNA possède une forme d'anneau, qui glisse le long de l'ADN double brin, nous avons modifié les substrats d'ADN utilisés lors des expériences précédentes pour obtenir des structures branchées avec un flap 3' ou 5' et une seule biotine au bout 3' ou 5' pour permettre à PCNA de se lier à l'ADN. Les différentes structures sont présentées avec leurs appellations sur la figure (5.1) et les séquences exactes dans l'annexe.

5.1. Étude de l'effet de PCNA sur l'activité de NucS avec un flap 5'

5.1.1. Effet sur l'association

Nous avons commencé par étudier l'effet de PCNA à température ambiante en conditions non clivantes et nous avons alors comparé les vitesses d'association de NucS pour différentes constructions d'ADN. Dans le cas de la construction 5bf5, nous avons mesuré un taux d'association de $k_{on} = 8 \pm 0.8\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ (N=62). En ajoutant un excès de PCNA (50 nM), ce taux augmente d'un facteur 1.5 et vaut alors $k_{on} = 12 \pm 1\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ (N=48). En comparaison, le taux d'association pour le simple brin f5 ne dépend pas de la présence de PCNA et vaut $k_{on} = 8.1 \pm 0.8\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ (N=67) sans PCNA et $k_{on} = 7.8 \pm 1\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ (N=35) avec PCNA. Ces résultats montrent que PCNA se charge effectivement sur le double brin de l'ADN et qu'elle possède un effet significatif sur le chargement de NucS à température ambiante et dans des conditions non clivantes (figure 5.2).

En réalisant les mêmes expériences à 45°C, nous constatons une diminution d'un ordre de grandeur du taux d'association en absence de PCNA qui vaut alors $k_{on} = 0.8 \pm 0.6\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ (N=23). L'ajout de PCNA a pour effet d'augmenter le taux pour atteindre $k_{on} = 4.6 \pm 0.4\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ (N=92). Cette valeur est environ 5 fois plus grande que le taux d'association sans PCNA et indique un rôle physiologiquement déterminant de PCNA pour le mécanisme de chargement de NucS à 45 °C. Afin de déterminer s'il existe un sens privilégié de chargement pour PCNA, nous avons effectué des tests avec la construction 3bf5 dont le double brin du côté opposé au flap est libre. En absence de PCNA, on trouve un taux d'association de $k_{on} = 0.8 \pm 0.6\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ qui est très proche de celui de la construction 5bf5. En ajoutant

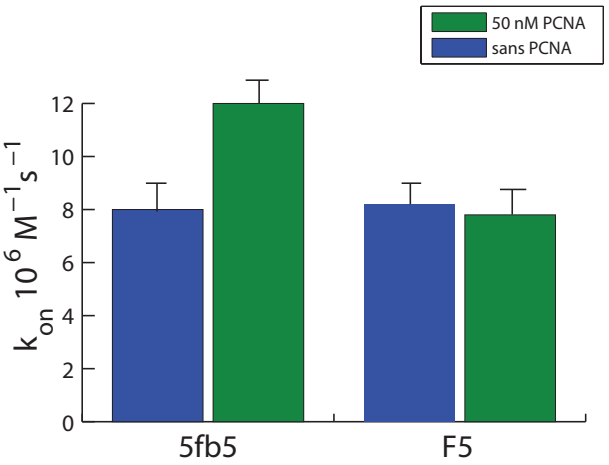


FIGURE 5.2.: Taux d'association de NucS avec son substrat à 23°C.

PCNA, nous n'observons pas de variation significative du taux d'association (figure 5.3) qui est désormais égal à $k_{on} = 0.4 \pm 0.6\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$. Ce test permet de conclure que PCNA se charge uniquement sur l'ADN (double brin) en aval du flap de façon similaire aux observations de **Bambara et al.** sur Fen1.

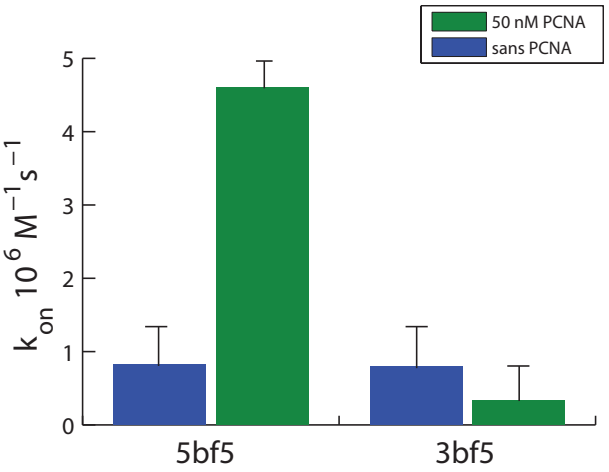


FIGURE 5.3.: Taux d'association de NucS avec son substrat à 45°C.

Dans une troisième expérience, nous avons mesuré le taux d'association dans des conditions de clivage en ajoutant 5 mM de $MnCl_2$. Les taux d'association trouvés sont proches de ceux sans l'ajout de Manganèse ce qui indique que PCNA favorise l'association de NucS avec son substrat d'ADN indépendamment de l'activité catalytique éventuelle de l'endonucléase (figure 5.4).

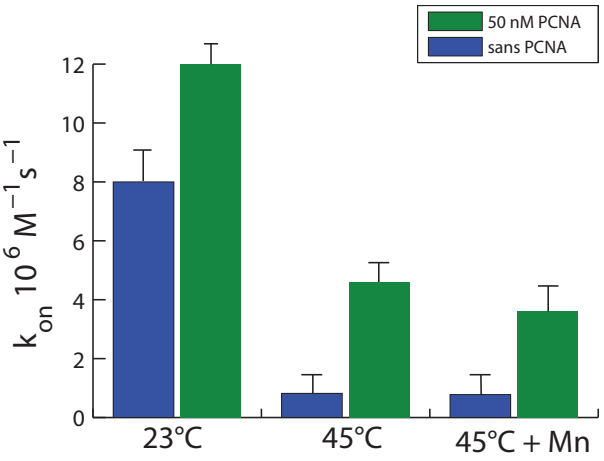


FIGURE 5.4.: Taux d'association de NucS avec le substrat 5bf5 en fonction de la température et de la concentration en Mn^{2+}.

5.1.2. Effet sur la dissociation et le clivage

Dissociation du complexe NucS-ADN en conditions non clivantes

Nous avons commencé par étudier la cinétique de dissociation du complexe NucS-ADN en présence de PCNA à température ambiante et nous avons détecté un total de 64 interactions avec le substrat 5bf5 en absence de PCNA et de 74 interactions en présence de celle-ci. Le temps moyen d'interaction de ses deux populations est de 18 s et 18.3 s ($k_{off} = 0.045 \pm 0.005\ s^{-1}$ et $k_{off} = 0.043 \pm 0.005\ s^{-1}$) respectivement et leur distribution est semblable (figure 5.5). Nous pouvons alors dire qu'à température ambiante, PCNA possède uniquement un effet sur l'association et que la stabilité du complexe NucS-ADN 5' ne dépend pas de la présence de PCNA.

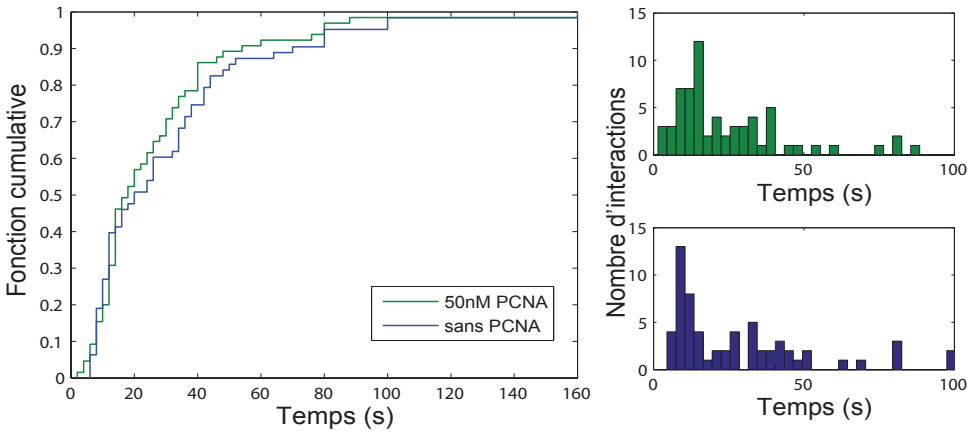


FIGURE 5.5.: Effet de PCNA sur la dissociation à température ambiante.

En réalisant des expériences à 45°C avec le substrat 5bf5, nous avons remarqué un changement dans les temps d'interaction. Nous avons enregistré 94 interactions spécifiques en présence de PCNA dans le même tampon avec un temps moyen d'interaction de 0.85 s ($k_{off} = 1.2 \pm 0.1\ s^{-1}$). Ceci correspond à une accélération de l'activité de NucS de plus d'un ordre de grandeur. Cet effet peut être expliqué dans la mesure où l'espèce *Pyroccocus abyssi* est une espèce hyperthermophile et donc plus adaptée pour les hautes températures. Par ailleurs, nous avons détecté 25 interactions en absence de PCNA avec une durée moyenne de 2 s ($k_{off} = 0.5 \pm 0.06\ s^{-1}$) et les deux distributions sont significativement distinctes (p= 2.5 10^{-4}, figure 5.6).

Nous pouvons en déduire que le cofacteur PCNA joue un rôle double à 45°C : (i) Faciliter le recrutement de la NucS ce qui est indicatif d'un chargement à la jonction et (ii) Favoriser la dissociation du complexe NucS-ADN-PCNA ce qui est probablement dû à l'exercice d'une flexion du substrat.

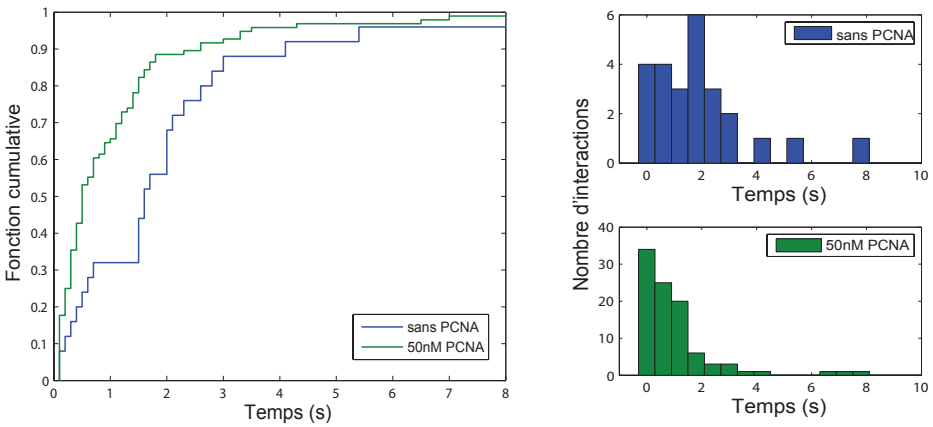


FIGURE 5.6.: Effet de PCNA sur la dissociation à 45°C. La durée moyenne d'interaction est deux fois plus petite en présence de PCNA.

Dissociation du complexe NucS-ADN en conditions de clivage

En ajoutant 5 mM de chlorure de manganèse dans le tampon, nous pouvons nous placer dans des conditions de clivage et étudier l'effet de PCNA sur l'activité catalytique de NucS [Ren09]. Nous avons ainsi mesuré les temps de dissociation du complexe NucS-ADN en présence de PCNA en excès et nous avons observé 39 interactions spécifiques d'une durée moyenne de 1.5 s (figure 5.7). Cette durée est supérieure à la durée moyenne en absence de Manganèse et les deux distributions sont significativement distinctes (p< 5 10^{-4}). Notons également que la forme des distributions des temps est

différente. Alors qu'en absence de Manganèse la distribution des temps d'interaction suit une décroissance exponentielle, elle présente un maximum à un temps non nul en présence de Manganèse ce qui est caractéristique d'un mécanisme de dissociation en plusieurs étapes (voir section 2.2). Ces observations indiquent que l'activation du site de clivage de NucS, influence la cinétique de dissociation en introduisant une étape supplémentaire dans l'interaction.

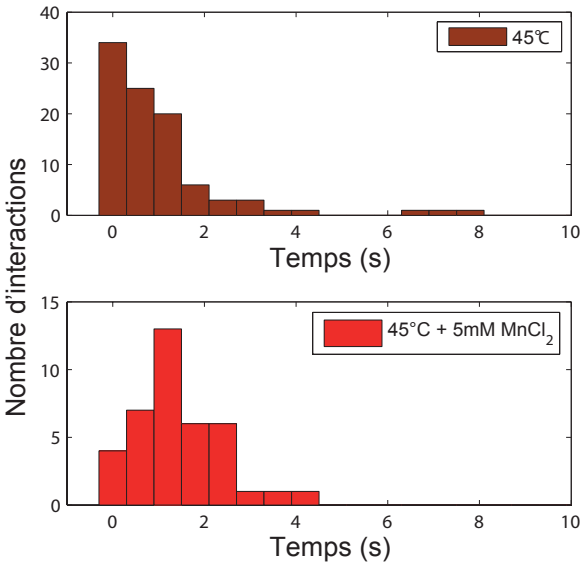


FIGURE 5.7.: Temps d'interaction de NucS avec le flap 5' à 45°C.

Sachant que ces observations ont été faites en présence de PCNA, connue pour augmenter la spécificité du clivage à la jonction, nous pouvons expliquer l'apparition d'une étape supplémentaire de dissociation par différents modèles (figure 5.8) :

1. un modèle I où NucS se lie à l'extrémité libre du flap, diffuse jusqu'à la jonction où est chargée PCNA et clive ensuite. La deuxième étape limitante serait ici due à la diffusion sur le flap.
2. un modèle II où NucS se lie à l'extrémité libre du flap, diffuse très rapidement jusqu'à la jonction où est chargée PCNA et clive ensuite. La deuxième étape limitante serait ici due à la cinétique de clivage.
3. un modèle III où NucS se charge directement à la jonction où se trouve PCNA et enfile le flap par la suite avant de le cliver. Ce modèle est analogue à celui proposé par **Gloor et al.** pour Fen1 (voir section 1.3.3) [Bam10]. La deuxième étape limitante ici serait due à l'enfilement du flap dans le site actif II.

4. un modèle IV similaire au modèle III où l'étape supplémentaire est due à la cinétique de dissociation ou d'accessibilité du site actif II (voir section 1.3).

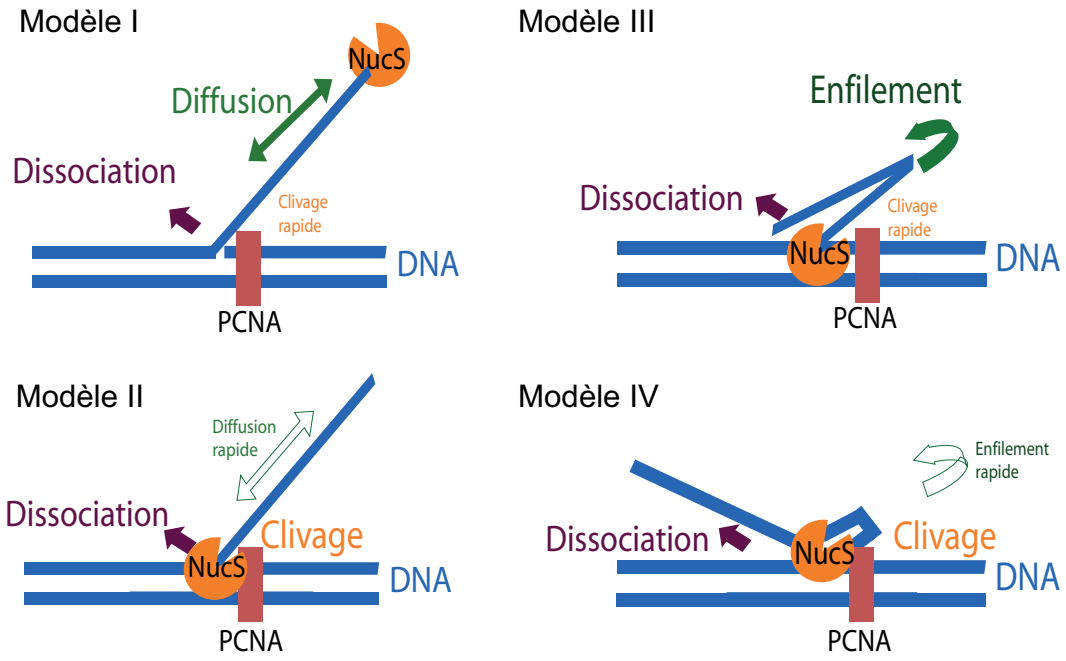


FIGURE 5.8.: 4 modèles d'interaction NucS-ADN en présence de PCNA à 45°C avec les étapes limitantes dans chaque cas.

Afin de résoudre le mécanisme d'interaction, nous avons réalisé des expériences dans les mêmes conditions avec la même construction d'ADN en flap 5' avec un flap allongé à 30 bp. Nous avons alors détecté 43 interactions spécifiques avec un temps moyen de 1.4 s. La cinétique de dissociation est semblable à celle observée pour un flap de longueur 20 bp et les distributions des probabilités de dissociation (figure 5.9) ne montrent pas de différence significative. Cette observation montre que le mécanisme de dissociation ne dépend pas de la diffusion mais plutôt des propriétés intramoléculaires du complexe NucS-ADN-PCNA et permet d'exclure le modèle I[2]. Nous discuterons les autres modèles dans la section 5.3.

Afin de vérifier quantitativement notre hypothèse d'une cinétique limitée par deux étapes, nous proposons ici un modèle d'une réaction de dissociation en 2 étapes indépendantes avec deux taux k_1 et k_2 selon le schéma suivant :

2. Nous avons déjà démontré que la diffusion ne limite pas la cinétique de dissociation à température ambiante.

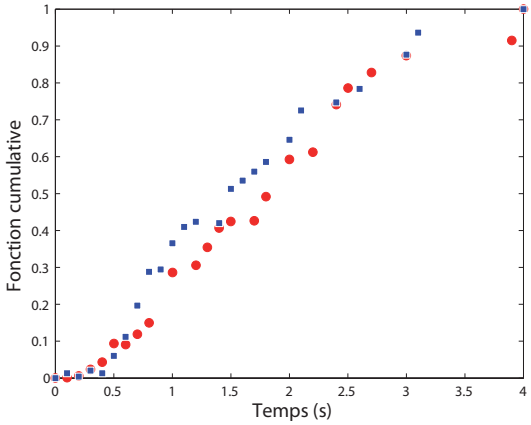


FIGURE 5.9.: Fonction cumulative de la probabilité de la durée d'interaction avec le flap 5' à 45°C avec 5 mM Mn^{2+}. Flaps de longueurs 30 bp (en rouge) et 20 bp (en bleu).

$$\begin{array}{ccc} NucS \cdot DNA & \xrightarrow{k_1} & X_1 \\ k_2 \downarrow & & k_2 \downarrow \\ X_2 & \xrightarrow{k_1} & NucS + DNA \end{array} \tag{5.1}$$

où $X_{1,2}$ représentent deux états intermédiaires. La distribution des temps d'interaction est alors donnée par :

$$f(t) = k_1 e^{(-k_1 t)} + k_2 e^{(-k_2 t)} - (k_1 + k_2) e^{(-(k_1+k_2)t)} \tag{5.2}$$

et la fonction cumulative qui répond à la condition initiale F(0)=0 :

$$F(t) = e^{-(k_1+k_2)t} - e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} + 1 \tag{5.3}$$

En ajustant nos valeurs expérimentales à ce modèle, nous obtenons des taux de dissociation $k_1 = 0.99 \pm 0.30\ s^{-1}$ et $k_2 = 0.54 \pm 0.15\ s^{-1}$ pour le substrat 5bf5 avec un flap de longueur 20 bp (voir figure 5.10) et $k_1 = 1.27 \pm 0.25\ s^{-1}$ et $k_2 = 0.46 \pm 0.08\ s^{-1}$ pour le même substrat avec une longueur de flap de 30 bp. Cette analyse permet alors d'extraire un taux caractéristique pour chaque étape. Étant donné que le taux de dissociation dans des conditions non clivantes vaut $k_{off} = 1.2 \pm 01\ s^{-1}$, nous suggérons que la constante rapide représente le taux de dissociation et la constante lente le taux de la seconde étape qui peut être due à la cinétique de clivage ou d'enfilement du flap dans le site II.

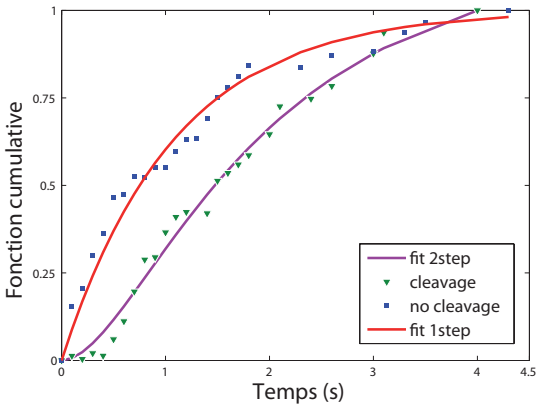


FIGURE 5.10.: Effet de l'activation catalytique sur la cinétique de dissociation. En condition non clivantes, la dissociation se fait en une seule étape alors que dans des conditions de clivage, deux étapes ont lieu.

5.1.3. Constante de dissociation K_D

5bf5	23°C	23°C	45°C	45°C	45°C (Mn^{2+})	45°C (Mn^{2+})
[PCNA] (nM)	0	50	0	50	0	50
$k_{on}(10^6 M^{-1}s^{-1})$	8	12	0.82	4.6	0.78	3.6
$k_{off}(s^{-1})$	0.043	0.045	0.5	1.2	n.a.	0.5 (2 étapes)
K_D (nM)	5.4	3.8	610	260	n.a.	139

TABLE 5.1.: Constantes de dissociation de NucS avec le substrat 5bf5.

Dans le tableau (5.1), nous avons regroupé les différentes valeurs des taux d'association et de dissociation ainsi que les valeurs des constantes de dissociation associées pour la concentration de NucS de 50 pM que nous avons utilisée pendant les expériences. Nous constatons, d'une part, que PCNA augmente l'affinité de NucS avec son substrat à température ambiante et plus significativement à 45 °C[3]. Cette température est plus proche des conditions physiologiques de l'espèce hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* et c'est là que PCNA joue un rôle très efficace dans le recrutement de NucS sur son site de liaison. D'autre part, nous remarquons que le complexe NucS-ADN est environ deux fois plus stable dans les conditions de clivage. Alors que les taux d'association varient faiblement en présence de PCNA à 45 °C entre les conditions non clivantes et les conditions de clivage, nous observons un ralentissement

3. Bien que l'espèce étudiée vive à des températures supérieures à 80°C, nous nous sommes contentés d'étudier l'activité de la protéine à 45°C puisque les substrats d'ADN deviennent instables à partir de 55°C.

significatif de la cinétique de dissociation de NucS en ajoutant le Manganèse ce qui est cohérent avec notre modèle mobilisant les sites actifs I et II.

5.2. Étude de l'effet de PCNA sur l'activité de NucS avec un flap 3'

5.2.1. Effet sur l'association

Nous avons utilisé les constructions 3bf3 et 5bf3 pour déterminer les taux d'association de NucS avec son substrat dans des conditions de clivage (figure 5.1). Pour la construction 3bf3, nous avons obtenu un taux d'association de $k_{on} = 2.2 \pm 0.6\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ sans PCNA et $k_{on} = 6 \pm 0.7\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ avec PCNA ce qui correspond à une amélioration d'un facteur 3 environ. Dans le cas de la construction 5bf3, le taux d'association trouvé est égal à $k_{on} = 2.2 \pm 0.6\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ sans PCNA et $k_{on} = 3.4 \pm 0.6\ 10^6 M^{-1}s^{-1}$ ce qui équivaut à une augmentation d'un facteur 1.5 environ. Un contrôle a été effectué dans des conditions non clivantes avec l'ADN 5bf3 et a permis de vérifier que l'accélération de l'association n'est pas due à l'activité catalytique de NucS (voir figure 5.11).

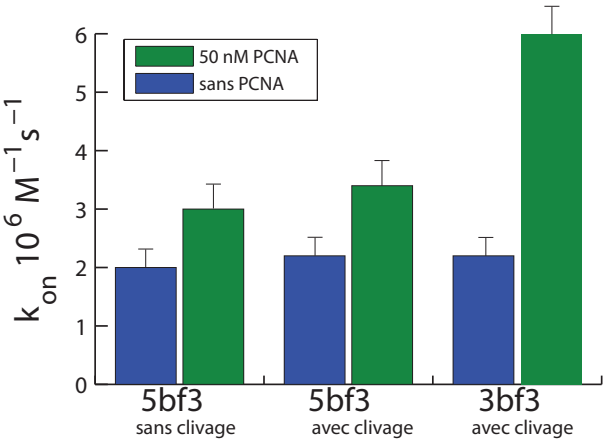


FIGURE 5.11.: Taux d'association de NucS avec le flap 3' avec et sans PCNA à 45 °C.

Ces expériences nous permettent de conclure que PCNA favorise l'interaction de NucS avec son substrat 3' quelle que soit l'orientation de l'ADN contrairement au substrat 5' où elle n'agit que si elle est chargée en aval du flap. Le chargement de PCNA sur le double brin peut par conséquent se faire dans les deux sens par rapport au flap mais l'association est plus efficace lorsque PCNA se charge en aval du flap.

Par ailleurs, nous relevons que les taux d'association de NucS sont identiques pour les flaps 3' et 5' en absence de PCNA. La cinétique d'association est donc indépendante de l'orientation du flap conformément à ce que nous avons observé à température ambiante.

5.2.2. Effet sur la dissociation et l'activité catalytique

Dans la figure (5.12), nous avons représenté les différentes valeurs des taux de dissociation calculées à partir des distributions des temps d'interaction de NucS avec le substrat 3bf3 et 5bf3 dans des conditions de clivage. Pour ce dernier, nous avons enregistré 92 événements d'interaction spécifique avec un temps moyen de 0.9 s en présence de PCNA et 51 événements avec un temps moyen de 1 s sans PCNA. Dans le cas du substrat 3bf3, nous avons détecté 40 et 66 événements respectivement sans et avec PCNA. Les temps moyens d'interaction trouvés sont de 1.9 s sans PCNA et de 1 s avec PCNA. Afin d'étudier l'effet de l'activation catalytique de NucS, nous avons effectué des expériences sur le substrat 5bf3 dans des conditions non clivantes [4] à la même température de 45°C. Étant donné que toutes les distributions des temps d'interaction montrent une décroissance exponentielle (figure 5.13), nous avons utilisé le modèle de dissociation en une étape pour calculer les taux de dissociation k_{off} que nous avons regroupés dans le tableau (5.2).

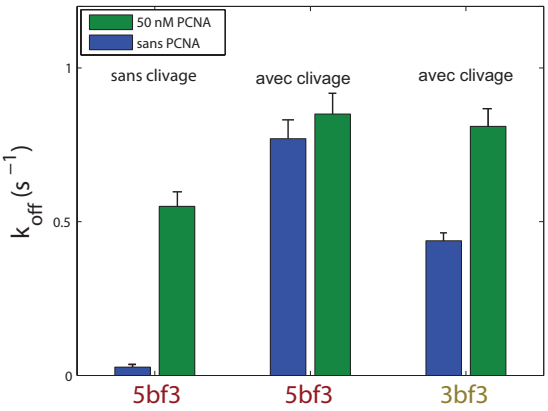


FIGURE 5.12.: Vitesses de dissociation de NucS avec le flap 3' avec et sans PCNA à 45 °C.

A partir de ces résultats, nous pouvons remarquer que :

4. Le même tampon B2 a été utilisé mais sans ajout de $MnCl_2$.

Substrat	5bf3				3bf3	
Condition	sans clivage		clivage		clivage	
[PCNA] (nM)	0	50	0	50	0	50
Temps moyen (s)	18.6	1.9	1	0.9	1.9	1
$k_{off}(s^{-1})$	0.027	0.55	0.77	0.85	0.42	0.87

TABLE 5.2.: Taux de dissociation et temps moyens d'interaction de NucS avec le flap 3'.

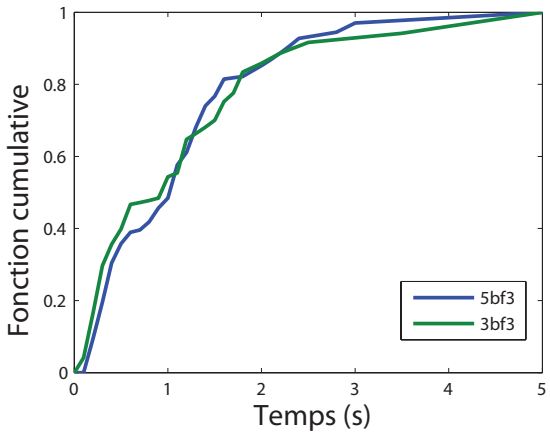


FIGURE 5.13.: Cinétique de dissociation du flap 3' en conditions de clivage en présence de PCNA.

- Dans les conditions non clivantes, l'ajout de PCNA a pour effet de raccourcir d'un ordre de grandeur le temps d'interaction de NucS avec le substrat 5bf3 alors que dans les conditions de clivage les temps d'interaction avec et sans PCNA sont très proches (0.9 s et 1 s). PCNA ne régule donc pas l'activité mais garantit seulement la spécificité du clivage à la jonction.
- Les taux de dissociation entre les conditions non clivantes et les conditions de clivage augmentent d'environ un facteur 30 pour le substrat 5bf3 en absence de PCNA et d'un facteur 1.5 avec PCNA. Nous en déduisons que la stabilité du complexe NucS-ADN dépend aussi de l'activation du site II de la protéine. Ceci indique que le clivage est relativement rapide et qu'il facilite la détachement de NucS.
- En présence de PCNA, nous remarquons que les taux de dissociation sont égaux pour les deux substrats 3bf3 et 5bf3, alors qu'en l'absence de celle-ci, le taux de dissociation est 2 fois plus long dans le cas du substrat 3bf3 comparé au substrat 5bf3. Sachant que **Creze et al.** ont montré que le substrat d'ADN est

courbé par le complexe NucS-PCNA dans un sens précis, nous pouvons dire que ces observations indiquent que NucS a besoin de courber son substrat pendant l'interaction et que cette courbure est plus facile dans le cas du substrat 5bf3 en raison de la géométrie du système [Cre12] (figure 5.14). Le fait que les taux de dissociation soient identiques pour les deux substrats dans des conditions de clivage confirme cette hypothèse et suggère que c'est la manipulation du substrat qui limite la cinétique de dissociation.

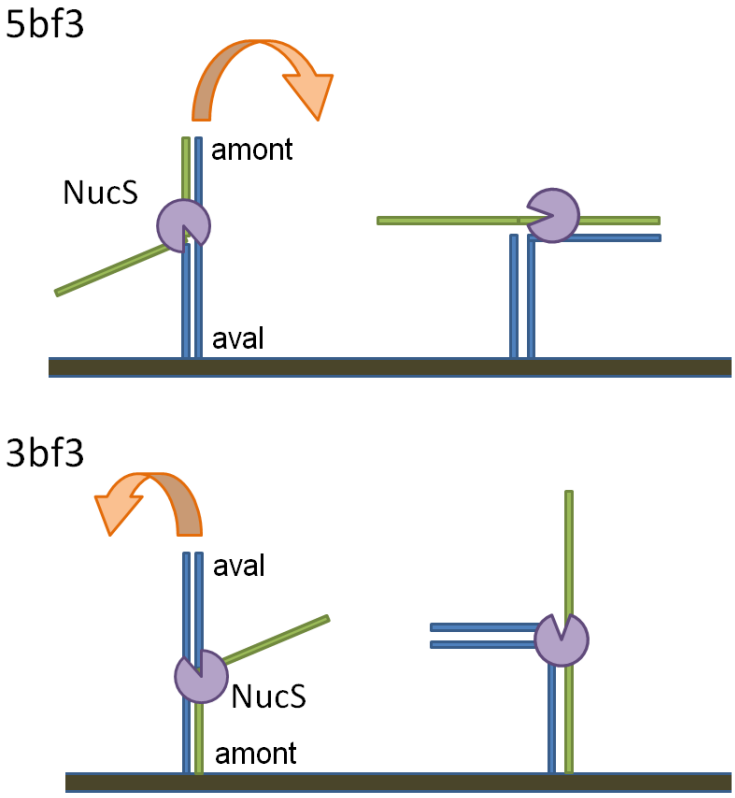


FIGURE 5.14.: Mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN dans le cas d'un flap 3. Le substrat est courbé dans des sens opposés. Les mesures de FRET de **Creze et al.** montrent que le sens naturel de la courbure est anti-trigonométrique [Cre12].

5.2.3. Constante de dissociation K_D

Dans le tableau 5.3, nous avons regroupé les différentes constantes de dissociation calculées à partir de l'équation 4.15. Les valeurs trouvées sont supérieures d'environ deux ordres de grandeur par rapport aux K_d mesurées à température ambiante ce qui est dû aux changements simultanés des vitesses d'association et de dissociation. Les taux d'association varient par exemple d'un facteur 4 pour le flap 3' entre 23°C et 45 °C. Parallèlement, les taux de dissociation, diminuent d'un ordre de grandeur ce

qui vérifie que le complexe NucS-ADN est moins stable à température élevée. Nous constatons également que K_d varie différemment selon la nature du substrat. Alors qu'il diminue de 33% en ajoutant PCNA dans le cas du substrat 5bf3, il augmente de 20 % dans le cas du substrat 3bf3. Ceci indique que PCNA agit selon deux mécanismes différents en fonction de sa position relative au flap (voir section 5.3).

Substrat	5bf3				3bf3	
Condition	sans clivage		clivage		clivage	
[PCNA] (nM)	0	50	0	50	0	50
$k_{on}(10^6 M^{-1}s^{-1})$	2	3	2.2	3.4	2.2	6
$k_{off}(s^{-1})$	0.027	0.55	0.77	0.85	0.25	0.81
$K_d(nM)$	13.5	183	350	250	113	135

TABLE 5.3.: Constantes de dissociation de NucS du flap 3' à 45°C.

5.3. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'activité du complexe de réparation NucS-ADN-PCNA à l'échelle de la molécule unique. Nous nous sommes principalement intéressés à l'effet du cofacteur PCNA sur l'activité de NucS vu son rôle prédominant dans la réparation de l'ADN et sa forte affinité avec NucS (K_d=15 nM) [Bru04,Dor06, Hos98]. Nous avons alors étudié la variation des taux d'association et de dissociation de NucS en fonction de la nature du substrat et de PCNA pour en déduire son rôle dans le complexe NucS-ADN-PCNA.

5.3.1. Cas d'un flap 5'

Rôle de PCNA dans l'association

Nous avons tout d'abord vérifié que PCNA se chargeait uniquement sur le double brin et nous avons remarqué qu'elle contribuait à une augmentation du taux d'association de NucS avec son substrat d'un facteur 1.5 à température ambiante (figure 5.2). Cet effet était amplifié en se rapprochant des conditions physiologiques à 45°C où nous avons calculé un facteur 6 d'augmentation du taux d'association en présence de PCNA pour le même substrat 5bf5 où le double brin libre se situe du même coté que le flap. Nous en déduisons que cette augmentation est due à l'affinité de NucS pour PCNA qui se combine à son affinité pour le simple brin et facilite ainsi

la reconnaissance de la lésion et la fixation directement à la jonction. Par ailleurs, aucune expérience directe n'a jusqu'à aujourd'hui réussi à montrer dans quel sens se charge PCNA par rapport au flap, mais il existe des mesures d'ensemble de FRET qui suggèrent à partir d'un modèle de flexion de l'ADN que PCNA devrait se charger en aval du flap [Cre12] (figure 5.20). Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré le taux d'association de NucS avec un substrat 3bf5 où le double brin *downstream* est accroché à la surface en présence et en absence de PCNA et nous n'avons remarqué aucune différence entre les vitesses d'association qui étaient voisines de celles avec le substrat 5bf5 en absence de PCNA (figure 5.3). Ces expériences mettent en évidence que PCNA ne participe à l'interaction NucS-ADN que lorsqu'elle est chargée en aval du flap et suggère fortement qu'en présence de NucS, elle ne se charge pas en amont du flap (figure 5.15).

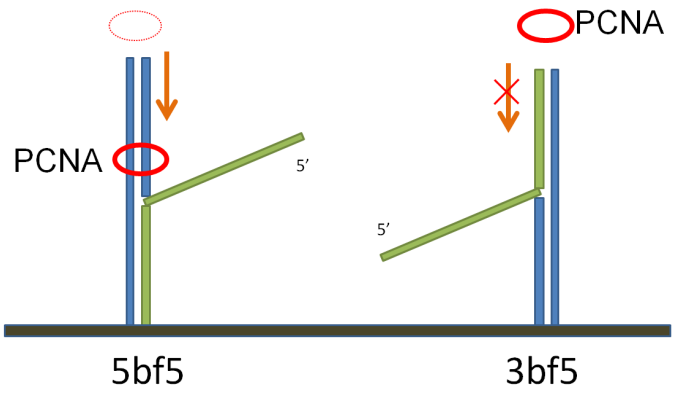


FIGURE 5.15.: Chargement de PCNA sur l'ADN avec un flap 5' en présence de NucS.

Rôle de PCNA dans la dissociation

Dans un premier temps, nous avons observé que l'ajout de PCNA permet à NucS de se dissocier 2 fois plus rapidement du complexe dans des conditions non clivantes et une fois et demi dans des conditions de clivage (tableau 5.1). D'autre part, nous avons remarqué que la forme des distributions des temps d'interaction était différente dans des conditions de clivage (figure 5.7) et suggérait un mécanisme de dissociation en plusieurs étapes. Nous avons alors proposé 4 mécanismes différents qui pourraient répondre à ces observations (figure 5.8). Afin de tester le modèle I où NucS se charge à l'extrémité, diffuse jusqu'à la jonction puis clive, nous avons refait l'expérience avec

un brin plus long et observé la même distribution des temps d'interaction (figure 5.9) ce qui montre que la diffusion sur le flap ne limite pas l'interaction conformément à nos mesures à température ambiante. Nous pouvons ainsi conclure que le modèle I n'est vraisemblablement pas applicable sur notre système. Dans le modèle II, nous avons supposé que NucS se charge également à l'extrémité mais que la diffusion était plus rapide que notre résolution temporelle et que la cinétique de dissociation était par conséquent uniquement déterminée par la cinétique des deux sites actifs. Ce modèle peut également être exclu puisque nous avons montré que k_{on} varie fortement en fonction de la présence de PCNA sur le substrat indiquant une association directe à la jonction (figure 5.16). Dans le modèle III, nous avons supposé que l'enfilement du flap limitait l'interaction. Ce modèle peut aussi être éliminé pour deux raisons : (i) nous n'avons pas observé de variation de la cinétique de dissociation en fonction de la longueur du flap et (ii) la longueur de persistance de l'ADN simple brin est de l'ordre de 3 paires de base [Tin97]. Avec un flap de longueur de 20 paires de bases, l'enfilement du flap par le site II devrait se faire plus rapidement. Nous pouvons par conséquent dire que la cinétique de dissociation est limitée par la cinétique des deux sites actifs, comme dans le modèle IV. Notre analyse quantitative de la cinétique de dissociation nous a d'ailleurs permis d'extraire les taux caractéristiques k_1 et k_2 pour chaque étape dans les conditions de clivages. En comparaison à la cinétique de dissociation dans les conditions non clivantes où le site I seulement est actif, nous remarquons que k_{off} est voisin de la constante rapide k_1 ce qui indique que la constante lente k_2 décrit la cinétique du site II. Il pourrait s'agir par exemple d'un changement conformationnel ou d'une rotation qui facilite l'accès au site de clivage.

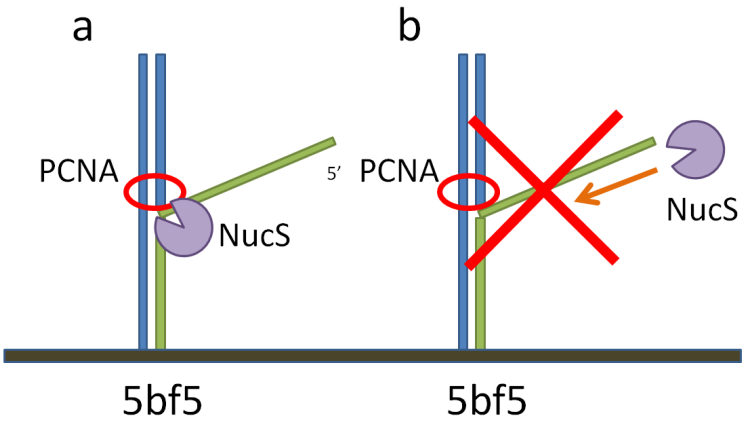


FIGURE 5.16.: Modèle d'interaction de NucS avec un flap 5' en présence de PCNA : a. Modèle d'enfilement. b. Modèle diffusif.

5.3.2. Cas d'un flap 3'

Rôle de PCNA dans l'association

Dans le cas de l'interaction de NucS avec un flap 3' à 45 °C, nous avons observé une augmentation significative de la vitesse d'association induite par PCNA pour le substrat 3bf3 où cette dernière se charge en aval du flap. Cette cinétique d'association est comparable à celle du flap 5'. PCNA facilite donc le chargement de NucS de façon analogue. Dans le cas du substrat 5bf3, en revanche, nous observons une augmentation plus faible du taux d'association en présence de PCNA, alors que les taux d'association sont très proches pour les deux substrats en absence de PCNA. Ces résultats montrent que PCNA agit de manière différente sur la cinétique d'association selon sa position sur le double brin et indique que la position en aval du flap lui est plus favorable pour le recrutement de NucS bien que le chargement soit possible dans les deux sens. Ces résultats diffèrent de ceux observés par **Hutton et al.** qui rapportent qu'en présence de XPF, PCNA se charge uniquement en amont du flap [5] (figure 5.17).

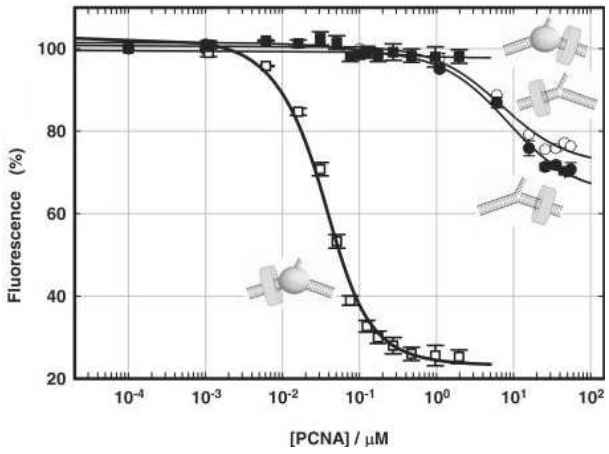


FIGURE 5.17.: Chargement de PCNA sur l'ADN double brin déterminé par quenching de fluorescence. Ici, un fluorophore est fixé en amont ou en aval du flap et le chargement de PCNA sur l'ADN provoque une diminution du signal ce qui permet de déterminer sa position. En amont du flap, la fluorescence décroît de 80% en présence de XPF alors qu'en aval aucune décroissance n'est mesurée. En absence de XPF, en revanche, le signal décroit de 30 % indiquant que le chargement se fait dans les deux sens. Extrait de [Hutt10].

5. Dans leurs expériences, **Hutton et al.** ont travaillé avec un excès de XPF.

Rôle de PCNA dans la dissociation

Dans des conditions non clivantes, nous avons noté que l'ajout de PCNA diminue le temps d'interaction de NucS avec le substrat 5bf3 de plus d'un ordre de grandeur (figure 5.12). Cette diminution révèle une déstabilisation du complexe NucS-ADN en présence de PCNA. **Creze et al.** suggèrent à partir des mesures du transfert d'energie FRET, que NucS est capable de tordre le substrat d'ADN en présence de PCNA [Cre12] (figure 5.18). **Hutton et al.** rapportent aussi que PCNA chargée en amont du flap joue le rôle d'une plate-forme qui permet à la XPF d'exercer une force sur l'ADN pour le courber [Hutt10]. Nous suggérons ici que les forces exercées par NucS grâce à PCNA déstabilisent le complexe en courbant le substrat et permettent à NucS de se dissocier plus rapidement.

En conditions de clivage, la cinétique de dissociation est similaire pour les substrats 5bf3 et 3bf3 en présence de PCNA. En absence de celle-ci, le temps d'interaction diminue d'un facteur 2 uniquement pour le substrat 3bf3 (figure 5.12) ce que nous expliquons par la difficulté de courber l'ADN en absence de PCNA (figure 5.14). Nous en déduisons que la dissociation est probablement limitée par la cinétique du site I et que le clivage a lieu assez rapidement. Cette déduction est appuyée par le fait que nous observons une cinétique de dissociation en une étape dont le temps caractéristique est voisin de celui dans les conditions non clivantes. Le rôle de PCNA serait alors de garantir la spécificité du clivage à la jonction en facilitant à NucS la manipulation du flap.

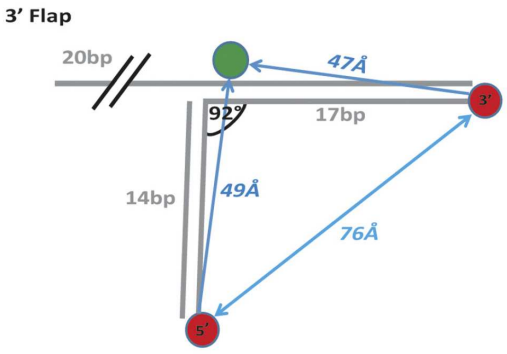


FIGURE 5.18.: Mesure de FRET du complexe NucS-ADN-PCNA dans le cas d'un flap 3'. NucS est montrée en vert et les deux extrémités du substrat en rouge. Le modèle de pliement à la jonction implique la présence de NucS en amont du flap. Extrait de [Cre12].

Mécanisme de dissociation du complexe NucS-ADN

Les mesures de FRET effectuées par **Creze et al** sur NucS suggèrent que NucS courbe l'ADN à la jonction du coté aval du flap (figure 5.18) en présence de PCNA. Par ailleurs, nos mesures des temps d'interaction de NucS avec son substrat sans PCNA montrent que la dissociation est plus rapide lorsque le coté amont du flap est en solution (5bf3) que lorsqu'il est accroché à la surface (3bf3). En combinant ces résultats, nous pouvons suggérer un modèle pour le mécanisme d'action de NucS dans le cas du flap 3' (figure 5.14).

Dans ce modèle, NucS se fixe directement à la jonction et plie l'ADN par la suite pour pouvoir enfiler le flap et le cliver (figure 5.19). Dans le cas du substrat 5bf3, cette courbure est facile puisque le coté aval est fixé à la surface qui agit alors comme un support. D'autre part, le sens d'enfilement du flap est le même que celui de la courbure ce qui facilite le recrutement du flap puis sa digestion. Dans le cas du substrat 3bf3, en revanche, NucS est contrainte à courber l'ADN dans un sens opposé pour ensuite recruter le flap et le digérer. Cette différence expliquerait pourquoi l'interaction dure 2 fois plus de temps avec le substrat 3bf3. En présence de PCNA à la jonction, cette manipulation de l'ADN se fait beaucoup plus facilement puisque NucS se sert du cofacteur PCNA pour appliquer la force nécessaire pour plier l'ADN et capturer ensuite le flap pour le digérer. Ce type de coopération entre PCNA et NucS a été également observé par **Hutton et al.** pour XPF [Hutt10].

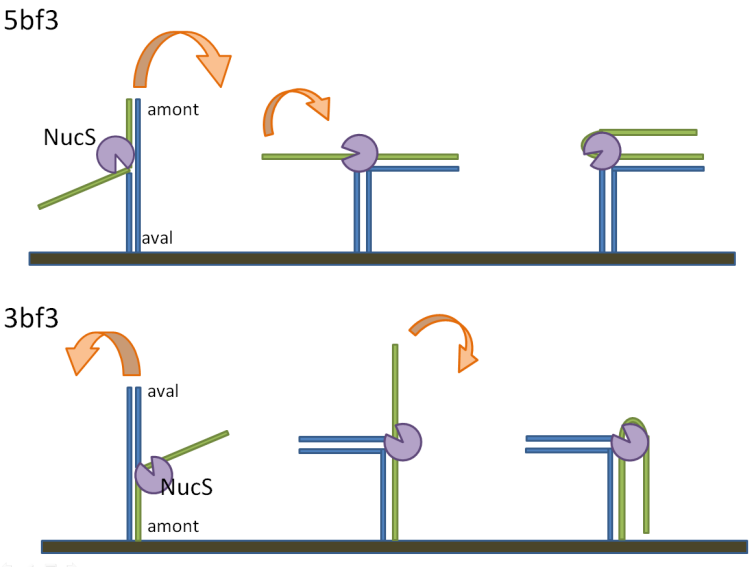


FIGURE 5.19.: Mécanisme d'interaction de NucS avec le flap 3'.

PCNA possède ainsi un rôle clé dans le mécanisme d'interaction de NucS avec les flaps 3' puisque, d'une part, elle accélère le chargement de NucS à la jonction et, d'autre part, elle facilite la flexion de l'ADN pour permettre une activité augmentée.

5.3.3. Comparaison entre le flap 3' et 5' et modèle général d'interaction

Cinétique d'association

Notre étude de l'activité du complexe de NucS-ADN-PCNA montre que PCNA est un cofacteur essentiel dans la régulation de l'activité de NucS. Nous avons mis en évidence que PCNA se charge uniquement en aval du flap pour un substrat avec un flap 5'. Nous avons également montré que PCNA peut se charger sur les deux cotés de l'ADN dans le cas du flap 3' et qu'elle facilite dans tous les cas le chargement de NucS. En tenant compte des observations de **Creze et al.** qui ont montré la formation d'un complexe NucS-PCNA en solution, nous pouvons dire à partir de nos observations que PCNA facilite à NucS la reconnaissance et le chargement sur l'ADN et nous en déduisons que NucS se fixe très probablement directement à la jonction grâce à son affinité pour le simple brin et pour PCNA.

En tenant compte du modèle de flexion d'ADN proposé par **Creze et al.**, nous pouvons suggérer que NucS se fixe sur des endroits différents à la jonction en fonction de la position de PCNA. Le modèle de flexion du substrat avec un flap 5' montre un angle de 109° entre les deux segments de l'ADN (figure 5.20) et suggère que NucS se fixe à l'intérieur de la jonction où se trouve PCNA, alors que dans le cas du substrat avec un flap 3', un angle de 90° est observé et suggère que NucS se fixe à l'extérieur de la jonction où se trouve PCNA (figure 5.18) . Cette fixation à des endroits différents en fonction de la position relative de PCNA par rapport à la jonction expliquerait la différence que nous avons observée dans l'augmentation de la vitesse d'association. En effet, l'intérieur de la jonction est moins accessible que son extérieur ce qui expliquerait la nécessité d'avoir une PCNA en aval du flap pour faciliter le chargement et justifie l'augmentation d'un facteur 5 et 3 du taux d'association dans le cas d'un flap 5' et 3' respectivement. L'extérieur de la jonction est, en revanche, plus facilement accessible d'où la contribution au taux d'association relativement faible d'un facteur 1 et 1.5 pour les flaps 5' et 3', respectivement.

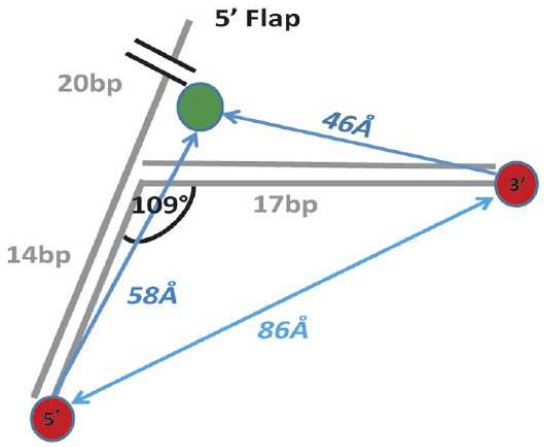


FIGURE 5.20.: Mesures de FRET sur le complexe NucS-ADN-PCNA dans le cas d'un flap 5', [Cre12]. NucS est montrée en vert et les deux extrémité du substrat en rouge. Le modèle de flexion à la jonction implique la présence de NucS sur le coté *downstream* du flap. Extrait de [Cre12].

Cinétique de dissociation et modèle d'interaction

Dans des conditions non clivantes, les taux de dissociation augmentent en présence de PCNA ce qui montre que celle-ci déstabilise le complexe NucS-ADN et facilite par conséquent la dissociation de NucS. Ces observations sont en accord avec les différentes expériences réalisées sur des endonucléases à flaps comme XPF qui montrent qu'en présence de PCNA, les endonucléases exercent une force pour courber leur substrat [Cre12, Hutt10]. Cette déstabilisation du complexe NucS-ADN due à l'ajout de PCNA est plus importante dans le cas du flap 3' (facteur 20) que dans le cas du flap 5' (facteur 2.5) ce que nous pouvons expliquer par la vraisemblable position relative de NucS à la jonction. En effet, dans le cas du flap 3', le complexe NucS-PCNA courbe le substrat dans un sens qui favorise le détachement de NucS, alors que dans le cas du flap 5', ce dernier pousse NucS contre la jonction pour déformer le substrat (figure 5.21).

Dans les conditions de clivage, nous avons remarqué pour le flap 5' une diminution du taux de dissociation d'un facteur 2 en ajoutant PCNA, qui se fixe uniquement en aval du flap. De plus, la cinétique de dissociation suit un mécanisme en deux étapes ce qui montre que l'activation du site II de NucS provoque une étape supplémentaire dans le mécanisme d'interaction qui ralentit sa cinétique. Notre analyse avec un modèle de dissociation en deux étapes a par ailleurs permis de déduire que les deux étapes correspondent à la cinétique du premier et du second site actif. Pour le flap 3',

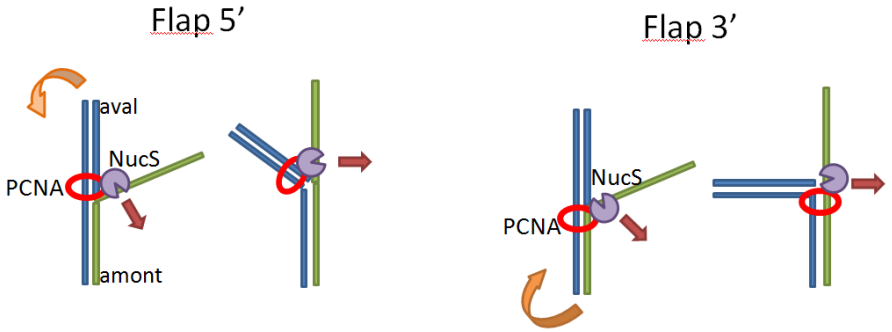


FIGURE 5.21.: Modèle de flexion de l'ADN par le complexe NucS-PCNA. La flèche orange indique le sens de courbure et la flèche rouge la direction de la force sur NucS.

nous n'avons pas observé de différence significative entre les taux de dissociation et la cinétique de dissociation suit toujours un mécanisme avec une seule étape limitante dont le temps caractéristique est proche de celui dans les conditions non clivantes indiquant que la cinétique est régie par le détachement du site I seulement et que la deuxième étape de d'enfilement et de clivage est très rapide.

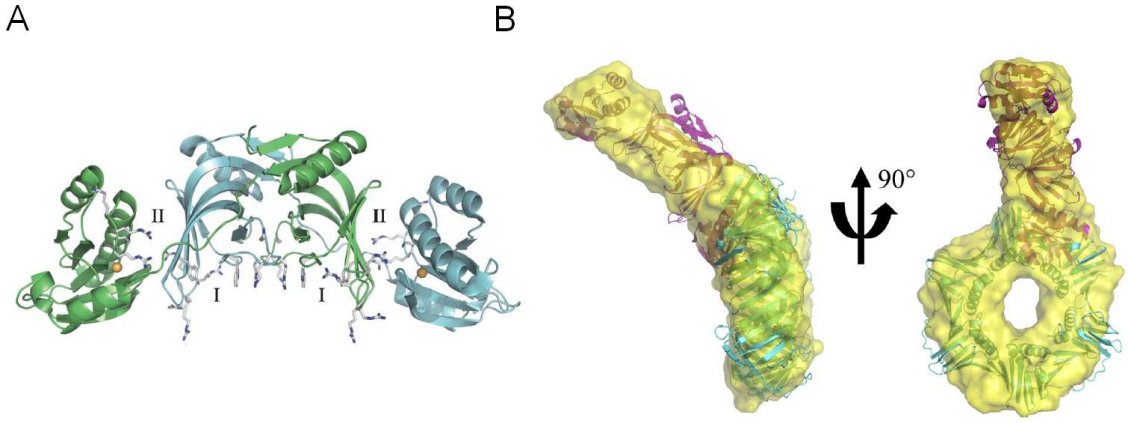


FIGURE 5.22.: A. Structure cristallographique de NucS. Extrait de [Ren09]. Les deux sites actifs I et II se trouvent sur les cotés opposés de la structure. Le site I se trouve dans la partie concave du dimère et le site II sur la partie convexe. B. Structure en solution du complexe NucS-PCNA déterminée par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Extrait de [Cre12].

A partir de ces données, nous proposons ici un modèle pour le mécanisme d'interaction qui prend en compte les données structurales de NucS et du complexe NucS-PCNA (figure 5.22) et notamment le fait que :

– Les deux sites actifs de NucS sont situés sur les cotés opposés de la structure et plaident ainsi pour un modèle d'enfilement où le simple brin est d'abord fixé par

le site I puis enfilé dans le site II où il est clivé.

– L'existence d'un complexe stable PCNA-NucS ($K_d = 15\,nM$) en solution favorise également l'hypothèse de fixation de NucS à la jonction et non à l'extrémité du flap. Par ailleurs, nos mesures de la cinétique de dissociation en variant la longueur du flap ont permis de rejeter l'hypothèse d'une fixation à l'extrémité du flap.

Dans ce modèle (figure 5.23), NucS fixe le flap 3' à l'extérieur de la jonction et se sert de PCNA pour courber son substrat et recruter l'extrémité libre du flap grâce à son site actif II accessible pour l'enfiler puis le cliver. Dans le cas du flap 5', en revanche, NucS se fixe à l'intérieur de la jonction et son deuxième site reste difficilement accessible. Il est alors possible que NucS induise un changement conformationnel, entraînant par exemple une double flexion à deux endroits distincts et une ouverture dans le double brin en amont du flap pour libérer l'accès à son site catalytique qui pourra ainsi enfiler le simple brin puis le cliver. Ce dernier mécanisme d'action expliquerait alors les deux étapes, indépendantes de la longueur du flap, que nous avons observées expérimentalement dans la cinétique de dissociation. Un mécanisme analogue a récemment été proposé pour Fen1 à partir des données cristallographiques du complexe FEN1-ADN [Tsu11].

En absence de PCNA, les mesures d'ensemble révèlent que le clivage se se fait pas spécifiquement à la jonction et les brins clivées sont de différentes longueurs [Ren09]. Nos mesures à l'échelle de la molécule unique montrent par ailleurs (i) que NucS peut s'associer et se dissocier aléatoirement sur le flap (voir section 4.3) et (ii) que la cinétique de dissociation est caractérisée par une seule étape (voir section 5.3.2). Nous proposons alors le même modèle d'action avec la différence qu'en absence de PCNA, le chargement est aléatoire sur le brin (figure 5.24).

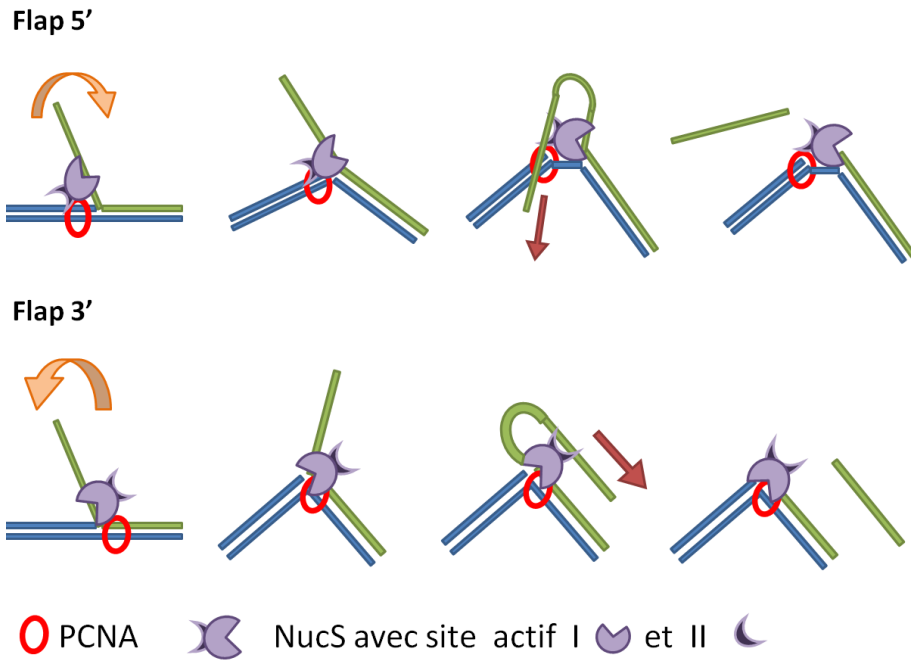


FIGURE 5.23.: Mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN en présence de PCNA. Le flap est clivé spécifiquement à la jonction.

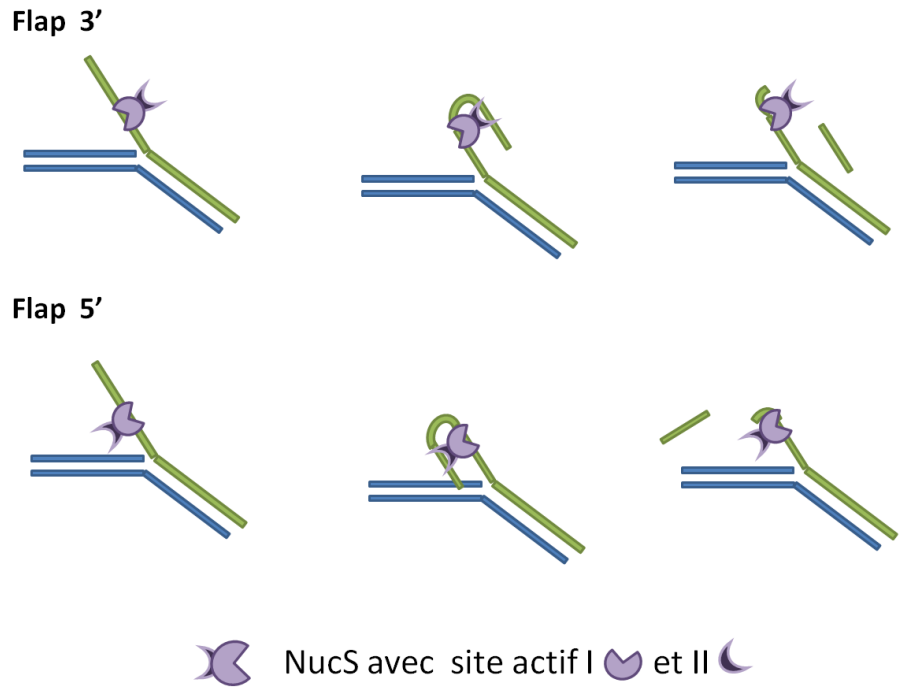


FIGURE 5.24.: Mécanisme d'interaction de NucS avec l'ADN en absence de PCNA. La longueur clivée du flap est arbitraire.

Conclusion

Approche de molécule unique pour le suivi de l'activité enzymatique

Dans ce travail, nous avons mis en place un montage de microscopie à onde évanescente pour l'observation de l'interaction de l'enzyme de réparation NucS avec son substrat d'ADN. Ce montage nous a permis de nous affranchir des limites des techniques conventionnelles et d'étudier la cinétique enzymatique à l'échelle de la molécule unique où la dynamique de l'interaction peut être résolue.

La démarche expérimentale que nous avons utilisée consiste à fixer un des réactants à la surface et à observer les étapes élémentaires d'association et de dissociation du deuxième réactant en solution pendant plusieurs minutes en détectant les interactions par une méthode de colocalisation de précision subpixelique. Dans cette approche de colocalisation, les deux réactants sont marqués avec le même fluorophore, ce qui permet de les détecter dans un même canal de façon séquentielle et leur colocalisation est fondée sur le principe de multilatération à partir de marqueurs fluorescents immobiles et photostables.

L'activité de l'enzyme de réparation NucS

Dans le but de caractériser le mécanisme d'interaction de l'enzyme de réparation NucS avec son substrat d'ADN, nous avons étudié la cinétique d'interaction du complexe NucS-ADN et déterminé le rôle du cofacteur PCNA dans la régulation de l'activité de NucS dans différentes conditions physiologiques. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une association bidirectionnelle de NucS avec une préférence pour les flaps 5' où nous avons observé une meilleure stabilité du complexe NucS-ADN. Nous avons également identifié le rôle de la force ionique dans la régulation de l'activité de l'enzyme et nous en avons déduit le paysage énergétique avec une composante électrostatique essentielle pour l'association et une composante non

électrostatique qui assure la stabilité du complexe NucS-ADN. Nos mesures ont par ailleurs permis d'exclure le modèle de diffusion sur le flap et ainsi de déduire que NucS, qui joue le rôle d'un détecteur de simples brins, pouvait se dissocier de façon stochastique du flap dans les conditions non clivantes.

Nous avons également étudié l'influence du cofacteur de réparation PCNA, connu pour améliorer la spécificité du clivage à la jonction, sur la cinétique d'interaction du complexe NucS-ADN. Nous avons alors montré que PCNA facilite le chargement de NucS sur son substrat puis déstabilise le complexe formé probablement en favorisant la courbure du substrat. D'autre part, l'analyse des temps de dissociation du complexe NucS-ADN dans les conditions de clivage a révélé une cinétique similaire pour les deux flaps avec une seule étape limitante pour l'interaction avec un flap 3' et deux étapes limitantes pour l'interaction avec un flap 5'. Nos observations expérimentales nous ont ainsi amenés à proposer un modèle pour l'activité de NucS dans lequel elle se fixe directement à la jonction en présence de PCNA grâce à son site actif I, puis capture l'extrémité libre qu'elle enfile dans le site actif II pour le cliver. Dans ce modèle, le détachement de NucS est limité par la cinétique du site I pour le flap 3' et par la cinétique des deux sites actifs I et II pour le flap 5'. PCNA joue alors le rôle du garant de la fixation à la jonction et par conséquent du clivage spécifique de la totalité du flap.

Perspectives et conclusion générale

A l'issue de ce travail, plusieurs questions sur le mécanisme d'interaction de NucS avec son substrat restent ouvertes et une mise en oeuvre de techniques d'observation plus directes pourrait apporter des informations complémentaires. De nouvelles données structurales du complexe NucS-ADN pourraient par exemple aider à identifier les différentes conformations de la protéine pendant l'interaction. D'autre part, des expériences de FRET en molécule unique pourraient permettre de résoudre les aspects spatiaux et caractériser ainsi la processivité de NucS sur son substrat.

D'un point de vue général, ce travail de thèse a permis d'étudier un système élémentaire de réparation de l'ADN et a mis en évidence les avantages de l'observation de molécules individuelles pour l'étude des interactions ADN/protéine, notamment la possibilité de suivre séparément la cinétique d'association ou de dissociation pour déterminer les étapes limitantes et identifier les mécanismes d'interaction. Il ouvre ainsi

les horizons à l'étude d'un système plus physiologique avec des cofacteurs supplémentaires ou in vivo afin de caractériser le rôle éventuel de NucS dans le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

A. Protocoles de biochimie

A.1. Marquage fluorescent des protéines

Les protéines doivent se trouver dans un tampon qui ne contient ni des ions d'ammonium ni des amines. Le Tampon idéal est PBS.

1. Préparer une solution de Bicarbonate de sodium en dissolvant 84 mg de $NaHCO_3$ dans 1 ml d'eau MilliQ. Vortexer et mélanger par pipettage pour dissoudre. Cette solution peut être conservée à 4°C pendant 2 semaines.
2. Préparer une solution 2 mg/ml de la protéine à marquer dans du PBS ou $NaHCO_3$.
3. Ajouter 50 µl de la solution de bicarbonate de sodium à 0.5 ml de la solution contenant les protéines.
4. Ajouter la solution au tube contenant le marqueur (Sigma-Aldrich Protein labeling kit).
5. Incuber pendant 1h à température ambiante à l'abri de la lumière en mélangeant à l'aide d'un agitateur magnétique.
6. Pendant l'incubation, préparer 1 colonne de purification.
7. Arrêter la réaction de marquage en ajoutant le tampon D dilué 10x (30 min).
8. Purifier la réaction en transférant la réaction dans la colonne de purification.
9. Centrifuger à 750 g pendant 2 minutes puis collecter la protéine marquée.

Afin de déterminer le ratio de marquage, il est nécessaire de calculer la concentration en protéines par la mesure de l'absorption à 280 et 494 nm. Ces deux longueurs d'onde correspondent à l'absorption maximale de la protéine et du fluorophore respectivement.

$$Concentration\ en\ M = \frac{(A_{280} - 0.11 \cdot A_{494}) \cdot Facteur\ de\ dilution}{203.000} \tag{A.1}$$

Le ratio de marquage en moles de fluorophores par moles de protéines est alors égal à :

$$R = \frac{A_{494} \cdot Facteur\ de\ dilution}{71.000 \cdot Concentration\ des\ protines} \tag{A.2}$$

Nous avons obtenu un ratio égal à 1.33 fluorophore par NucS. Les mesures en molécule unique ont montré que 89 % des protéines étaient marquées par un seul fluorophore, 9% par deux fluorophores et 2% par 3 fluorophores et plus.

A.2. Construction des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN branchés sont construits par un recuit (*engl : Annealing*) d'oligonucleotides achetés chez Genecust Europe.

1. Suspendre les oligonuotides complémentaires à la même concentration dans un buffer contenant 10 mM Tris,pH=7.5-8, 50 mM NaCl et 1 mM EDTA. Le volume des solutions doit être inférieur à 500 µl pour une bonne hybridation de l'ADN.
2. Mixer deux volumes identiques des solutions équimolaires dans un tube de 1.5 ml.
3. Placer le tube dans une plaque chauffante à une température de 90-95°C pendant 3-5 min.
4. Enlever le tube et laisser refroidir jusqu'à température ambiante (40-50 min).
5. Conserver à 4°C jusqu'à l'utilisation.

Les concentrations utilisées pour l'observation de molécules uniques sont de l'ordre du picomolaire.

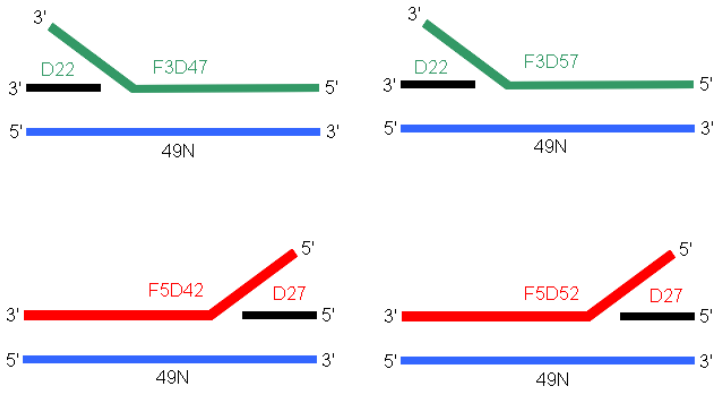


FIGURE A.1.: Structure de l'ADN branché utilisé pour l'étude de l'interaction de NucS avec l'ADN simple brin.

A.2.1. Séquences d'ADN (5'→ 3')

49N : AGC TAC CAT GCC TGC ACG AAT TAA GCA ATT CGT AAT CAT GGT CAT AGC T

F3D47 : AGC TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTG CTT GGA ATC CTG ACG AAC TGT AG

D22 : AAT TCG TGC AGG CAT GGT AGC T

F5D42 : GAT GTC AAG CAG TCC TAA GGA ATT CGT GCA GGC ATG GTA GCT

D27 : AGC TAT GAT CAT GAT TAC GAA TTG CTT

B. Protocole de traitement de surface

B.1. Préparation des solutions

1. Une solution stock S_1 de BSA biotinylée est préparée en dissolvant la BSA-Biotin (Sigma-Aldrich) dans un tampon TRIS (50 mM) à une concentration de 10 mg/ml. Cette solution peut être conservée à 4 °C ou à -20 °C. Il est important tout de même d'éviter la décongélation multiple.
2. Une solution stock S_2 de BSA est préparée en dissolvant la BSA en poudre dans le même tampon TRIS (50 mM) à une concentration de 1 mg/ml. Elle est conservée à 4 °C.
3. Une solution stock S_3 de Steptavidine (Sigma-Aldrich) est préparée en dissolvant la protéine dans un tampon TRIS (50mM) à une concentration de 1 mg/ml. Cette soltion peut être conservée à 4 °C ou aliquotée puis congelée à -20 °C.

B.2. Préparation de la surface

1. 10 µl de S_1 sont mélangés dans 90 µl de S_2. Cette solution est ensuite déposée sur une lamelle de verre préalablement nettoyée au plasma pendant 5 min. Elle est ensuite rincée avec 400 µl d'un tampon (TRIS, HEPES, etc.) T_1 contenant 0.1 mg/ml de BSA.
2. 1 µl de S_3 sont mélangés dans 99 µl de T_1. La solution est ensuite déposée sur la lamelle pendant 5 min puis rincée avec 400 µl de T_1. La streptavidine va se fixer sur la biotine et permettre d'accrocher les substrats grâce à une liaison avec la biotine.
3. 20 µl d'une solution d'ADN à 0.1 nM sont introduits dans la chambre pendant une minute. La chambre est ensuite rincée avec T_1. N.B : Il est préférable

d'effectuer cette étape sur le microscope, en observant directement la fixation de l'ADN sur la surface afin de garantir la meilleure densité possible.

B.3. Utilisation des Quantum dots

1. Préparer une solution Q_1de Quantums dots en diluant 1 µl de Qdots à 1nM (Invitrogen) dans 10 µl de tampon T_1. Cette solution peut être gardée à 4°C pendant 3 jours environ.
2. Préparer une deuxième solution en diluant 1 µl de Q_1 dans 100 µl de tampon. 20 µl de cette solution sont introduits dans la chambre pendant 30 s. NB : Il est préférable d'effectuer cette étape sur le microscope afin de bien doser la densité des Qdots sur la surface. Une dizaine de Qdots est suffisante pour une observation de 5-10 min.

C. Profondeur du champ d'une onde évanescente

Lorsque un rayon passe d'un milieu transparent à un autre, une partie du rayon est réfléchie et l'autre partie est réfractée. L'angle d'incidence θ_i est relié à l'angle de réfraction θ_t par la loi de Snell :

$$n_i sin(\theta_i) = n_t sin(\theta_t) \tag{C.1}$$

où n_i et n_t représentent les indices de réfraction des deux milieux. Nous pouvons déterminer l'intensité du faisceau transmis (réfracté) et l'intensité du faisceau réfléchi à partir des équations de Fresnel où la réflectivité dépend de la polarisation de la limière :

$$r_\perp = \frac{n_i cos(\theta_i) - n_t cos(\theta_t)}{n_i cos(\theta_i) + n_t cos(\theta_t)} \tag{C.2}$$

et

$$r_\parallel = \frac{n_t cos(\theta_i) - n_i cos(\theta_t)}{n_i cos(\theta_t) + n_t cos(\theta_i)} \tag{C.3}$$

$r_\perp$ et $r_\parallel$ représentent, respectivement, la reflectivité de la lumière polarisée perpendiculairement et parallèlement au plan d'incidence. En utilisant l'équation C.1, nous pouvons alors écrire :

$$r_\perp = \frac{cos(\theta_i) - \sqrt{\frac{n_t}{n_i}^2 - sin^2(\theta_i)}}{cos(\theta_i) + \sqrt{\frac{n_t}{n_i}^2 - sin^2(\theta_i)}} \tag{C.4}$$

et

$$r_\perp = \frac{\frac{n_t}{n_i}^2 cos(\theta_i) - \sqrt{\frac{n_t}{n_i}^2 - sin^2(\theta_i)}}{\frac{n_t}{n_i}^2 cos(\theta_i) + \sqrt{\frac{n_t}{n_i}^2 - sin^2(\theta_i)}} \tag{C.5}$$

et nous remarquons ici que, lorsque θ_i devient supérieur à l'angle critique de réflexion totale θ_c qui vérifie $n_i sin(\theta_c) = n_t$, la grandeur r devient complexe. Il est également important de noter que pour un angle supérieur à θ_c, nous pouvons toujours vérifier que $r_\perp r_\perp* = r_\parallel r_\parallel* = 1$ ce qui indique que toute la lumière est réflechie et que même s'il

existe une lumière transmise, aucune energie n'est transportée dans le second milieu.

Considérons alors une onde plane polarisée qui traverse les deux milieux. L'équation du champ électrique transmis peut alors s'écrire comme suit :

$$E_t(t) = E_{ot}e^{-i(\omega t - \vec{k}\vec{r})} \tag{C.6}$$

avec E_{ot} l'amplitude, ω la pulsation et k le vecteur d'onde. Ce dernier est égal à :

$$\vec{k} = (ksin(\theta_t), kcos(\theta_t)) \tag{C.7}$$

et nous obtenons ainsi :

$$E_t(t) = E_{ot}e^{-i(\omega t - kxsin(\theta_t) - kzcos(\theta_t))} \tag{C.8}$$

En utilisant l'équation C.1 ainsi que l'identité trigonométrique, nous trouvons :

$$E_t(t) = E_{ot}exp\{i(-\omega t + kx\frac{n_i sin(\theta_i)}{n_t} \pm kz\sqrt{1 - \frac{n_i sin(\theta_i)}{n_t}^2})\} \tag{C.9}$$

Etant donné que le champ électrique ne peut pas croître en fonction de la distance, nous pouvons éliminer la partie positive et, en remplaçant le vecteur d'onde par la longueur d'onde correspondante $k = \lambda_0 n_i/2\pi$, nous obtenons :

$$E_t(t) = E_{ot}exp\{i(-\omega t + \frac{2\pi}{\lambda_0 n_i}x\frac{n_i sin(\theta_i)}{n_t} + \frac{2\pi}{\lambda_0 n_i}z\sqrt{1 - \frac{n_i sin(\theta_i)}{n_t}^2})\} \tag{C.10}$$

Sachant que l'intensité de la lumière transmise est égale à l'énergie moyenne transmise par unité de temps $I = c\epsilon_0\langle E^2\rangle$, avec c la vitesse de la lumière et ϵ_0 la permittivité diélectrique, nous trouvons finalement :

$$I = I_0 e^{-z/\delta} \tag{C.11}$$

avec

$$I_0 = \epsilon_0 c E_{ot}^2 exp\{2i(\frac{2\pi}{\lambda_0 n_i}x\frac{n_i sin(\theta_i)}{n_t} - \omega t)\}$$

et

$$\delta = \frac{\lambda_0}{4\pi\sqrt{(\frac{sin(\theta_i)}{n_t})^2 - n_i^2}}$$

D. Abréviations

- A488 : Fluorophore organique Alexa qui est excité à 488 nm
- ALEX FRET : Alternating Laser Excitation Förster Resonance Energy Transfer
- BSA : Bovine Serum Albumin
- FRET : Förster Resonance Energy Transfer
- PCNA : Proliferation Cell Nuclear Antigen
- REN : Réparation par Excision de Nucléotides
- spFRET : single particle Förster Resonance Energy Transfer
- TIRFM : Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy

Bibliographie

[Ait08] C. E. Aitken, R. A. Marshall, J. D. Puglisi
An Oxygen Scavenging System for Improvement of Dye Stability in Single-Molecule Fluorescence Experiments
Biophys. J., 94 :1826-1835, 2008

[All98] J.F. Allemand, D. Bensmon, R. Lavery, V. Croquette
Stretched and overwound DNA form a Pauling-like structure with exposed bases
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 95 : 14152-14157, 1998

[Alm95] P.F.F. Almeida, W.L.C. Vaz
Lateral diffusion in membranes
Handbook of biological physics, (1) : 305-357, 1995

[Axe08] D. Axelrod
Total internal reflection fluorescence microscopy
Meth. Cell. Biol., 89 : 169-221, 2008

[Axe81] D. Axelrod
Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence
J Cell Biol., 89(1) :141-5, 1981

[Bac06] K. Bacia, A. Kim, P. Schwille
Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells
Nat. Methods, 3(2) :83-89, 2006

[Bal04] B. Ballou, B.C. Lagerholm, L.A. Ernst, M.P. Bruchez, A.S. Waggoner
Noninvasive imaging of Quantum dots in mice
Bioconjugate Chem., 15 : 79-86, 2004

[Bam95] R.S. Murante, L. Rust, R.A. Bambara
Calf 5' to 3' Exo/Endonuclease Must Slide from a 5' End of the Substrate to Perform Structure-specific Cleavage
J. Biol. Chem., 270(51) : 30377-30383, 1995

[Bam99] C.J. Bornarth, T.A. Ranalli, L.A Henricksen, A.F. Wahl, R. A. Bambara
Effect of flap modifications on human FEN1 cleavage
Biochemistry, 38(40) :13347-54, 1999

[Bam00] S. Tom, L. A. Henricksen, R. A. Bambara
Mechanism Whereby Proliferating Cell Nuclear Antigen Stimulates Flap Endonuclease 1
J. Biol. Chem., 275(14) :10498 10505, 2000

[Bam10] J.W. Gloor, L. Balakrishnan, R.A. Bambara
Flap Endonuclease 1 Mechanism Analysis Indicates Flap Base Binding

Prior to Threading
J Biol Chem., 285(45) : 349223493, 2010

[Bar02] A. P. Bartko, K. Xu, R. M Dickson
Three-dimensional single molecule rotational diffusion in glassy state polymer films.
Phys. Rev. Lett., 89(2) : 026101, 2002

[Ben08] J.J Benitez, A.M. Keller, P. Ochieng, L.A. Yatsunyk, D.L. Huffman, A.C. Rosenzweig, P. Chen
Probing transient copper chaperone-Wilson disease protein interactions at the single-molecule level with nanovesicle trapping
J. Am. Chem. Soc., 130 : 2446-2447, 2008

[Ber93] H.C. Berg
Random walks in biology
Princeton University Press, p 164, 1993
ISBN : 9780691000640

[Bet06] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Oleynch, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess
Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution
Science, 313 : 1642.1645, 2006

[Bie09] A. Biebricher, W. Wende, C. Escudé, A. Pingoud, P. Desbiolles
Tracking of Single Quantum Dot Labeled EcoRV Sliding along DNA Manipulated by Double Optical Tweezers
Biophys. J., 96(8) : 50-52, 2009

[Big06] S. Bigot, O. A. Saleh, F. Cornet, J. F. Allemand, F. X. Barre
Oriented loading of FtsK on KOPS
Nat. Struct. Mol. Biol., 13(11) : 1026-1028, 2006

[Bin86] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber
Atomic Force Microscope
Phys. Rev. Lett., 56 : 930-933, 1986

[Bla06] P.C. Blainey, M. Van Oijen, A. Banerjee, G.L. Verdine, S. Xie
A base excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 103 : 5752-5757, 2006

[Boh93] L.N. Bohs, B.H. Friemel, B.A. McDermott, G.E. Trahey
A real time system for quantifying and displaying two-dimensional velocities using ultrasound
Ultrasound Med. Biol. 19 :751-761, 1993

[Bon08] I. Bonnet, A. Biebricher, P.L. Porte, C. Loverdo, O. Bénichou, R. Voituriez, C. Escude, W. Wende, A. Pingoud, P. Desbiolles
Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA
Nucleic Acids Res., 36 :4118-4127, 2008

[Bou01] E. Boukobza, A. Sonnenfeld,G. Haran
Immobilization in Surface-Tethered Lipid Vesicles as a New Tool for Single Biomolecule Spectroscopy
J. Phys. Chem., 105 : 12165-12170, 2001

[Bou11] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou
Biological applications of rare-earth based nanoparticles
ACS Nano, 5(11) :8488-8505, 2011

[Boy64] R.P. Boyce, P. Howard-Flanders
Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E. coli K-12
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 51 : 293300,1964

[Bru98] M. Bruchez, J.M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, P. Alivisatos
Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels
Science, 281 : 2013-2016, 1998

[Bru04] J. B. Bruning, Y. Shamoo
Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-σ p66 subunit and flap endonuclease-1
Structure, 12(12) :2209-2219, 2004

[Bud05] J. Budman, G. Chu
Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract
EMBO J., 24(4) : 849-60, 2005

[Bue99] A. B. Buermeyer, S. M. Deschenes, S.M. Baker, R.M. Liskay
MAMMALIAN DNA MISMATCH REPAIR
Annu. Rev. Genet., 33 : 53364, 1999

[But03] H.J. Butt, K. Graf, M. Kappl
Physics and Chemistry of interfaces
Wiley-VCH, ISBN : 3-525-40413-9

[Cha98] W.C.W. Chan, S.M. Nie
Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection
Science, 281 : 2016-2018, 1998

[Cha02] W.C.W Chan, X. Maxwell, X. Gao, R.E. Bailey, M. Han, S. Nie
Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging
Current opinion in Biotechnol., 13 : 40-46, 2002

[Cha12] G. S. Chandok, M. P. Patel,S. M. Mirkin, M. M. Krasilnikova
Effects of Friedreich's ataxia GAA repeats on DNA replication in mammalian cells
Nucleic Acids Res., 1-11, 2012

[Che06] R.F. Chen
Fluorescence quantum yield of Tryptophan and Tyrosine
Anal. Lett., 1 : 35-42, 2006

[Che01] M.K. Cheezum, W.F. Walker, W.H. Guilford
Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent par-

ticles
Biophys. J., 81 : 2378-2388, 2001

[Che08] N.S. Chen
Formula for the viscosity of a Glycerol-Water Mixture
Ind. Eng. Chem. Res. 47 :3285-3288, 2008

[Chu05] L.S. Churchman, Z. Ökten, R.S. Rock, J.F. Dawson, J.A. Spudich
Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 102 : 1419-1423, 2005

[Cle68] J.E. Clever
Defective repair replication in xeroderma pigmentosum
Nature, 218 :652-656, 1968

[Cle01] J.E. Cleaver, K. Karplus, M. Kashani-Sabet, C.L. Limoli
Nucleotide excision repair "a legacy of creativity"
Mutation Research, 485 : 2336, 2001

[Coa03] C. Coates, D. Denvir, N. McHale, K. Thornbury, M. Hollywood
Ultrasensivity, speed and resolution : optimizing low-light microscopy with the back-illiminated electron-multiplying CCD
In confocal, Multiphoton, and nonlinear microscopic imaging, vol 4, Proc. Of SPIE-OSA.
Biomed. Opt., SPIE vol 5139 : 56-66, 2003

[Coo03] M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec
Oxidative DNA damage : mechanisms, mutation, and disease
Faseb J., 17(10) :1195-1214, 2003

[Cos04] G. Cosa, E.J. Harbron, Y. Zeng, H.W. Liu, D.B. O'Connor, C. Eta-Hosokawa, K. Musier-Forsyth , P.F. Barbara
Secondary structure and secondary structure dynamics of DNA hairpins complexed with HIV-1 NC protein
Biophys. J., 87(4) :2759-2767, 2004

[Cre12] C. Creze, A. Ligabue, S. Laurent, R. Lestini, S.P. Laptenok, J. Kühn, M.H. Vos, M. Czjzek, H. Myllykallio, D Flament
Modulation of the Pyroccocus abyssi NucS endonuclease activity by the replication clamp PCNA at functional and structural levels
J. Biol. Chem., 287(19) :15648-15660, 2012

[Cru99] E.M. De la Cruz, A.L. Wells, S.S : Rosenfeld, E.M. Ostap, H.L. Sweeney
The kinetic mechanism of myosin V
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 96 : 13726-13731, 1999

[Die07] M. A. Ditzler, E. A. Aleman, D. Rueda, N. G. Walter
Focus on Function : Single Molecule RNA Enzymology
Biopolymers, 87 (56) :302-316, 2007

[Doh01] K. M. Dohoney, J. Gelles
Chi-sequence Recognition and DNA Translocation by Single RecBCD Heli-

case/Nuclease Molecules.
Nature,409 : 370-374, 2001

[Dor06] R. Dorazi, J. L. Parker, M. F. White
PCNA activates the hollyday junction endonuclease Hjc
J. Mol. Biol., 364(3) :243-247, 2006

[Egg98] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C.A.M. Seidel
Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single molecule detection : evidence of two-step photolysis
Anal. Chem., 70 : 2651-2657, 1998

[Ele10] M.P. Elenko, J.W. Szostak, A.M. Oijen
Single-molecule binding experiments on long time scales
Rev. Sci. Instr., 81 : 083705, 2010

[End99] J. Enderlein, T. Ruckstuhl, S. Seeger
Highly effcient optical detection of surface-generated fluorescence
Appl. Opt., 38 : 724-732, 1999

[Ess06] L. Essen, T. Klar
Light-driven DNA repair by photolyases
Cell. Mol. Life. Sci., 63(11) :1266-1277, 2006

[Ess05] J. Essers, A.F. Theil, C. Baldeyron, W. A. van Cappellen, A. B. Houtsmuller, R. Kanaar, W. Vermeulen
Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair
Mol. Cell. Biol. 25(21) :9350-9359, 2005

[Far99] R.A. Farrer, M.R. Previte, C.E. Olson, L.A. Peyser, J.T. Fourkas
Single-molecule detection with a two-photon fluorescence microscope with fast-scanning capabilities and polarization sensitivity
Opt. Lett., 24 :1832-1834, 1999

[Far11] D.A. Farnell
Nucleotide Excision Repair in the Three Domains of Life
WURJ Health and Natural Sciences, 2 :1-6, 2011

[Faz08] T. Fazio, M.L. Visnapuu, S. Wind, E.C. Greene
DNA Curtains and Nanoscale Curtain Rods : High-Throughput Tools for Single Molecule Imaging
Langmuir, 24 : 10524-1053, 2008

[Fel68] W. Feller
An introduction to Probability Theory and its Apllications
Wiley, New York, NY, 1968

[Flo10] D.L. Floyd, S.C. Harrison, A.M Van Oijen
Analysis of kinetic Intermediates in single particle dwell time distributions
Biophys. J., 99 :360-366, 2010

[Fre10] B. D. Freudenthal, L. Gakhar, S. Ramaswamy, M. T. Washington
Structure of monoubiquinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange
Nat. Struct. Mol. Biol., 17(4) : 479-484, 2010

[Fri01] E.C. Friedberg
How nucleotide excision repair protects against cancer
Nat. Rev. Cancer, 1 :22-23, 2001

[Fro04] J. C. Fromme, G. L. Verdine
Base Excision Repair
Advances in Protein Chemistry, 69 :1-41, 2004

[Fun95] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunga, K. Saito, T. Yanagida
Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution
Nature, 374 : 555-559, 1995

[Gas12] A. Gaspar, F. A. Gomez
Development of an ultra-low volume flow cell for surface plasmon resonance detection in a miniaturized capillary electrophoresis system
Electrophoresis., 33(12) :1723-1731, 2012

[Gel88] J. Gelles, B.J. Schnapp, M.P. Sheetz
Tracking kinesin -driven movements with nanometer-scale precision
Nature, 331 : 450-453, 1988

[Ger09] A. Gershenson
Single molecule enzymology : watching the reaction
Current Opinion in Chemical Biology, 13 : 436442, 2009

[Gom00] X. V. Gomes, P. M. J. Burgers
Two modes of Fen1 binding to PCNA regulated by DNA
EMBO J., 19, 3811-3821, 2000

[Gor04] M.P. Gordon, T. Ha, P.R. Selvin
Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 101 :6462-6465, 2004

[Gor07] H. H. Gorris, D. M. Rissin, D. R. Walt
Stochastic inhibitor release and binding from single-enzyme molecules
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 104(65) :17680 17685, 2007

[Gor10] J. Gorman, A. J. Plys, M.L.Visnapuu, E. Alani, E. C. Greene
Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice
Nat. Struct. Mol. Biol. 17(8) : 932938, 2010

[Gow00] H. Gowher, A. Jeltsch
Molecular enzymology of the Eco RV DNA-(adenine N6)-methyltransferase : kinetics of DNA binding and bending, kinetic mechanism and linear diffusion of the enzyme on DNA
J. Mol. Bioc., 303 : 93-110, 2000

[Gre11] D. R. Green
Means to an end : Apoptosis and other cell death mechanisms
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011

[Ha98] T. Ha, J. Glass, Th. Enderle, D. S. Chemla, S. Weiss
Hindered Rotational Diffusion and Rotational Jumps of Single Molecule
Phys. Rew. Lett.,80(10) :2093-2096, 1998

[Ha99] T. Ha, A.Y. Ting, J. Liang, W.B. Caldwell, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz, S. Weiss
Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 :893-898, 1999

[Hag10] S. J. Hagen
Solvent viscosity and friction in protein folding dynamics
Current Protein and Peptide Science., 11, 2010

[Har92] J.M. Harrris
Poly(Ethylene Glycol) Chemistry : biotechnical and biomedical applications
New York : Plenum Press, 1992

[Har99] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama
Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time
Biophys. J., 76 :709-715, 1999

[Har01] Y. Harada, O. Ohara, A. Takatsuki, H. Itoh, N Shimamoto, J. Kinosita
Direct observation of DNA rotation during transcription by Escherichia coli RNA polymerase
Nature, 409 :113-115, 2001

[Hey04] C.D. Heyes, A.Y. Kobitski , E.V. Amirgoulova, G.U. Nienhaus
Biocompatible surfaces for specific tethering of individual protein molecules
J. Phys. Chem. B, 108(35) : 13387-13394, 2004

[Hil10] J. Hilario, S.C. Kowalczykowski
Visualizing protein-DNA interactions at the single-molecule level
Cur. Opin. Chem. Biol., 14 : 15-22, 2010

[Hin96] M.A. Hines, P. Guyot-Sionnest
Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe Nanocrystals
J. Phys. Chem, 100, 468-471, 1996

[Hom99] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz
Surface plasmon resonace sensors : review
Sensors and Actuators B., 54 :3-15, 1999

[Hos98] D. J. Hosfield, C. D. Moi, B. Shen, J. A. Tainer
Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN1 : coupling and PCNA binding to FEN1 activity
Cell, 95(1)135-146, 1998

[Hua02] W. Hua, J. CHung, J. Gelles
Distinguishing Inchworm and Hand-Over-Hand Processive Kinesin Movement by Neck Rotation Measurements
Science, 295 : 844-848, 2002

[Hua07] C. Huanmian, H. L. Puhl, S. R. Ikeda
Estimating protein-protein interaction affinity in living cells using quantitative Forster resonance energy transfer measurements
J. Biomed. Optics, 12 : 054011, 2007

[Hug07] T. Hugel, J. Michaelis, C. L. Hetherington, P. J. Jardine, S. Grimes, J. M. Walter, W. Falk, D. L. Anderson, C. Bustamante
Experimental Test of Connector Rotation during DNA Packaging into Bacteriophage ϕ29 Capsids
PLoS BIOL., 5(3), 558-567, 2007

[Hus09] J. Husson, L. Laan, M. Dogterom
Force Generation By Microtubule Bundles
Biophys Rev. & Lett. 4(1) :33-43, 2009

[Hutt10] R.D. Hutton, T.D. Craggs, M.F. White. J.C. Penedo
PCNA and XPF cooperate to distort DNA substrates
Nucleic Acids Res., 38(5) : 1664-1675, 2010

[Ino94] S. Inouye und F.I. Tsuji
Aequorea Green Fluorescent Protein. Expression of the Gene and Fluorescence Characteristics of the Recombinant Protein
FEBS Letters 341 : 277-280, 1994

[Jun98] G. Jung, J. Wiehler, W. Göhde, J. Tittel, Th. Basché, B. Steipe, C. Bräuchle
Confocal microscopy of single molecules of the green fluorescent protein
Bioimaging, 6 : 54-61, 1998

[Kap04] A. N. Kapanidis, T. A. Laurence, N. K. Lee, E. Margeat, X. Kong, S. Weiss
Alternating-laser Excitation of single molecules Acc. Chem. Res., 38(7) : 523-533, 2004

[Keg06] A. Kegel, P. Martinez, S. D. Carter, S. U. Aström *Genome wide distribution of illegitimate recombination events in Kluyveromyces lactis*
Nucleic Acids Res., 34(5) : 16331645, 2006

[Kim07] J.H. Kim, R.G. Larson
Single-molecule analysis of 1D diffusion and transcription elongation of T7 RNA polymerase along individual stretched DNA molecules
Nucleic Acids Res., 35(11) :3848-38-58, 2007

[Kle09] C. Kleinmann, A. Sischka, A. Spiering, K. Tönsing, N. Sewald, U. Diederischen, D. Anselmetti
Binding Kinetics of Bisintercalator Triostin A with Optical Tweezers Force Mechanics
Biophys. J., 97(10) :2780-2784, 2009

[Kli66] M. Klimek
Thymine dimerization in L-strain mammalian cells after irradiation with ultraviolet light and the search for repair mechanisms
Photochemistry and Photobiology, 5(8) : 603-607, 1966

[Kom04] K. Komori, M. Hidaka, T. Horiuchi, R. Fujikane, H. Shinagawa, Y. Ishino
Cooperation of the N-terminal helicase and C-terminal endonuclease activities of archaeal Hef protein in processing stalled replication forks
J. Biol. Chem., 279 : 53175-53185, 2004

[Kou05] S.C. Kou, B.J. Cherayil, W.Min, B.P. English, X.S. Xie
Single-molecule Michaelis-Menten Equations
J. Phys. Chem B, 109 :19068-19081, 2005

[Kub00] U. Kubitscheck, O. Kückmann, T. Kues, R. Peters
Imaging and tracking of single GFP molecules in solution
Biophys. J., 78 : 2170-2179, 2000

[Küt10] K. Kütemeyer, R. Rezgui, Lubatschowski, A. Heisterkamp
Influence of laser parameters and staining on femtosecond laser-based intracellular nanosurgery
Biomed. Opt. Express., 1(2) : 587-597, 2010

[Kus95] A. Kusumi, Y. Sako, M. Yamamoto
Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (Nanovid Microscopy). Effects of Calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells
Biophys. J.,65 :2021-2040, 1995

[Laa99] W. L. de Laat, G.J. Jaspers, H.J. Hoeijmakers
Molecular mechanism of nucleotide excision repair
Genes Dev., 13 : 768-785, 1999

[Lau98] A.Y. Lau, O.D. Schärer, L. Samson, G. L. Verdine, T. Ellenberger
Crystal structure of a human Alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA : Mechanisms for nucleotide flipping and base excision
Cell, 95(2) : 249-258, 1998

[Lee91] G.M. Lee, A. Ishihara, K.A. Jacobson
Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 88 : 6274-6278, 1991s

[Lev03] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb
Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations
Science, 299 : 682-686, 2003

[Lic05] J. Lichtman, J. Conchello,
Fluorescence Microscopy
Nat. Methods., 2 : 910-919, 2005

[Lil91] K. Liliom, F. Orosz, L. Hovath, J. Ovadi
Quantitative evaluation of indirect ELISA. Effect of calmodulin antagonists on antibody binding to calmodulin
J. Immunol. Methods, 143 :119, 1991

[Liu04] H. Liu, H. I. Kao, R. A. Bambara
Flap endonuclease 1 : a central component of DNA metabolism Annu. Rev. Biochem. 73 : 589-615, 2004

[Lod05] Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell
Biologie moléculaire de la cellule
De Boeck, 2005
ISBN : 2-8041-4802-5

[Lom05] D. B. Lombard, K. F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa, F. W. Alt
DNA Repair, Genome Stability, and Aging
Cell., 120(4) : 497-512, 205

[Luk05] K. A. Lukyanov, D. M.Chudakov, S.Lukyanov. V.V. Verkhusha
photoactivable fluorescent proteins
Nature Rev. Molecular Cell Biology, 6 : 885-890

[Lya03] V. Lyamichev, M.A. Brow, J. E. Dahlberg
Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases
Science, 260 :778-783

[Lu98] H.P. Lu, L. Xun, X.S. Xie
Single-Molecule Enzymatic Dynamics
Science, 282 :1877-1882, 1998

[Luk77] W. Lukos, R.E. Kunz
Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface. I. Total radiated power
J. Opt. Soc. Am., 67 : 1607-1614, 1977

[Mac96] J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris, L.E. Brusk
Imaging and time-resolved spectroscopy of single molecules at an interface
Science, 272 :255-258, 1996

[Mag72] D. Magde, E. Elson,W. W. Webb
Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy
Phys. Rev. Lett., 29 : 705708, 1972

[Mas09] J.-B. Masson, D. Casanova, S. Türkcan, G. Voisinne, M. R. Popoff, M. Vergassola, A. Alexandrou
Inferring maps of forces inside cell membrane microdomains
Phys. Rev. Lett., 102 :048103, 2009

[Mat98] K. Kim, S. Biade, Y. Matsumoto
Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair
J. Biol. Chem., 273(15) :8842-8, 1998

[Mcn07] E.C. McNamee, S. Yamamoto, K. Higashitani
Preparation and characterization of pure and mixed monolayers of poly(ethylene glycol) brushes chemically adsorbed to silica surfaces
Langmuir, 23(8) : 4389-4399, 2007

[Mer00] J. Mertz
Radiative absorption, fluorescence and scattering of a classical dipole near

a lossless interface : a unified description
J. Opt. Soc. Am. B, 17 : 1906-1913, 2000

[Mia03] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure
Lighting up cells : labelling proteins with fluorophores
Imaging in Cell Biology Reviews, 2003

[Mic05] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M Tsay, S. Doose, J.J. Li, G, Sunderesan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss
Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics
Science, 307 : 538-544, 2005

[Mic13] L. Michaelis, M. L. Menten
Die Kinetik der Invertinwirkung
Biochem. Z. 49 :333-369, 1913

[Min05] W. Min, B. P. English, G. Luo, B. J. Cherayil, S.C. Khou, X. S. Lie
Fluctuating Enzymes : Lessons from Single-Molecule Studies
Acc. Chem. Res., 38 : 923-931, 2005

[Mur02] J.D. Murray
Mathematical Biology
ISBN 0-387-95223-3, Springer, 2002

[Mur04] M.C. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T.M. Lohman, T. HA
Probing single stranded DNA conformational flexibility using fluorescence spectroscopy
Biophys. J., 86 : 2530-2537, 2004

[Myo05] S. Myong, B.C Stevens, T. Ha
Repetitive shuttling of a motor protein on DNA
Nature, 437 : 1321-1325, 2005

[Neu08] K.C. Neuman, A. Nagy
Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy
Nat. Methods, 5 :491-505, 2008

[New05] M. Newman, J. Murray-Rust, J. Lally, J. Rudolf, A. Fadden, P.P. Knowles, M.F. White, N.Q. McDonald
Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition
EMBO J., 24 :895-905, 2005

[Nie97] S. Nie, R.N. Zare
Optical detection of single molecules
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 26 : 567-596, 1997

[Nir96] M. Nirmal, B.O. Dabbousi, M.G. Bawendi, J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris, L.E. Brus
Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals
Nature, 383 : 802-804, 1996

[Nis02] T. Nishino, K. Komori, Y. Ishino, K. Morikawa
Structural and Functional Analyses of an Archaeal XPF/Rad1/Mus81 Nuclease : Asymmetric DNA Binding and Cleavage Mechanisms
Structure, 13 : 1193-1192, 2005

[Oij08] A.M. van Oijen
Cutting the forest to see a single tree ?
Nat. Chem. Biol., 4(8) : 440-443, 2008

[Oij10] A.M. van Oijen
Single-molecule approches to characterising kinetics of biomolecular interactions
Curr. Opin. Biotech. 22 :1-6, 2010

[Oku04] B. Okumus, T.J. Wilson, D.M.J. Liley, T. Ha
Vesicle encapsulation studies reveal that single molecule ribozome heterogeneities are intrinsic
Biophys. J. 87 :2798-2806, 2004

[Oro02] F. Orosz, J. Ovadi
A simple method for the determination of dissociation constants by displacement ELISA
J. Immuno. Meth., 270 :155-162, 2002

[Pac95] C.N. Pace, F Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray
How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein
Protein science 4 : 2411-2423, 1995

[Pat04] G.H. Patterson
A new harvest of fluorescent proteins
Nat. Biotechnol. 22 : 1524-1525, 2004

[Par10] A. Pertsinidis, Y. Zhang, S. Chu
Subnanometer single-molecule localization, registration and distance measurements
Nature Lett., 466 :647-651, 2010

[Pat00] P.V. Patil, D.P. Ballou
The use of protocatechuate dioxygenase for maintaining anaerobic conditions in biochemical experiments
Anal. Biochem.286 :187-192, 2000

[Pea06] S.J. Pearson, S. Wharton, A.J. Watson, G. Begum, N. Glynn, D.M. Williams, T. Shibata, M.F. Santibanez-Koref, G.P. Margison
A novel DNA damage recognition protein in Schizoaccharomyces pombe
Nucleic Acids Res., 34(8) :2347-2354, 2006

[Pea00] L. H. Pearl
Structure and function in the Uracil-DNA glycosylase superfamily
Mutation Res., 460(3-4) : 165-181, 2000

[Pie97] D.W. Pierce, N. Hom-Booher, R.D. Vale
Imaging individual green fluorescent proteins
Nature, 388 : 338-338, 1997

[Ras06] I. Rasnik, S.A. Mc Kinney, T. Ha
Surfaces and orientations : Much to FRET about ?
Acc. Chem. Res., 38 : 542-548, 2006

[Ras12] E. Rass, A. Grabarz, P. Bertrand, B. S. Lopez
Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative
Cancer., 16(1) : 1-10, 2012

[Rea97] J. T Reardon, T. Bessho, H. C. Kung, P.H. Bolton, A. Sancar
In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system : Possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 94639468, 1997

[Rea04] J. T. Reardon, A. Sancar
Thermodynamic cooperativity and kinetic proofreading in DNA damage recognition and repair
Cell Cycle, 3 : 141144, 2004

[Rea05] J. T. Reardon, A. Sancar
Nucleotide excision repair
Progress in Nucleic Acid Research and molecular biology, 5 :183-235, 2005

[Ren09] B. Ren, J. Kühn, L.Meslet-Cladiere, J. Briffotaux, C. Norais, R. Lavigne, D. Flament, R. Ladenstein, H. Myllykallio
Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates
EMBO J., 28 :24792489, 2009

[Rob03] J. A. Roberts, S. D. Bell, M. F. White
An archaeal XPF repair endonuclease dependent on a heterotrimeric PCNA
Molecular Microbiology, 48(2) : 361371, 2003

[Rob03] M.S. Robbins, B.J. Hadwen
The Noise Performance of Electron Multiplying Charge-Coupled Devices
IEEE Transactions on electron devices, 50 : 1227-1232, 2003

[Rou10] C. Rouillon, M. F. White
The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins
Research in Microbiology, 162(1) : 19-26, 2010

[Roy08] R. Roy, S. Huong, T. Ha
A practical guide to single-molecule FRET
Nat. Methods, 5 :507-516, 2008

[Rus02] R. Russell, X, Zhuang, H.P. Babcock, I. Millett, S. Doniach, S. Chu,D. Herschlag
Exploring the folding landscape of a structured RNA
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 : 155-160, 2002

[San08] A. Sancar, M. Tang
NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR
Photochemistry and Photobiology, 57(5) : 905-921, 2008

[Sax97] M.J. Saxton, K. Jacobson
SINGLE-PARTICLE TRACKING : Applications to Membrane Dynamics
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 26 : 37399, 1997

[Sha04] N.C : Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. E. Giepmans, A. E. Palmer, R. E. Tsien
Improved monomeric red, orange, and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein
Nature Biotechnology, 22 :1567-1572, 2004

[Sha05] N. C. Sjaner, P.A. Steinbach, R.Y. Tsien
A guide to choosing fluorescent proteins
Nature Methods., 2(12) : 905-909, 2005

[Sch99] P. Schwille, J. Korlach, W.W. Webb
Fluorescence coorelation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes
Cytometry, 36(3) :176-182, 1999

[Sch95] G.J. Schütz, H. Schindler, T. Schmidt
Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion
Biophys. J., 73 : 1073-1080, 1995

[Sch95] T. Schmidt, G.J Schütz, W. Baumgartner, H.J Gruber, H. Schindler
Characterization of photophysics and mobility of single molecules in a fluid lipid membrane
J. Phys. Chem., 99 :17662-17668, 1995

[Sch96] T. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, H. Schindler
Imaging of Single Molecule Diffusion
Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93 : 29262929, 1996

[Sch97] G. J. Schuitz, H. Schindler, Th. Schmid
Single-Molecule Microscopy on Model Membranes Reveals Anomalous Diffusion
Biophys. J., 73 :1073-108, 1997

[Sch05] H. Schneckenburger
Total internal reflection fluorescence microscopy : technical innovations and novel applications
Curr. Opin. Biot. 16 : 13-18, 2005

[Sch08] H. Shroff, H. White, E. Betzig
Photoactivated Localization Microscopy (PALM) of Adhesion Complexes
Current Protocols in Cell Biology, 4.21, 2008

[Seg02] G.M.J. Segers-Nolten, C. Wyman, N. Wijigers, W. Vermeulen, A.T.M. Lenferink, J.H.J. Hoeijmakers, J. Greve, C. Otto
Scanning confocal fluorescence microscpoy for single molecule analysis of nucleotide excision repair complexes
Nucleic Acids Res., 30 : 4720-4727, 2002

[Sel07] P.R. Selvin, T. Ha
Single-molecule techniques
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007
ISBN : 978-087969776-1

[Shi62] O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga
Extraction Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea
Journal of Cellular and Comparative Physiology, 59 : 223-239, 1962

[Smi92] S.B. Smith, L. Finzi, C. Bustamente
Direct mechanical measurement of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads
Science, 258 : 1122-1125, 1992

[Sim11] P.D. Simonson, E. Rothenberg, P.R. Selvin
Single-molecule-based super-resolution images in the presence of multiple fluorophores
Nano. Lett. 11 : 5090-5096, 2011

[Sin02] R. P. Sinha, D. P. Häder
UV-induced damage and repair
Photochemical and photobiological Sciences, 2002

[Sip10] H. Sipova, J. Homola
Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids : A review
ACA-232305-15, 2013

[Sol88] F. Solano, R. Penafiel, J.A. Lozano
Kinetic study of the inhibition of rat liver ornithine decarboxylase by diamines ; considerations on the mechanism of interaction between enzyme and inhibitor
Int. J. Bioc., 20-463-470, 1988

[Spo05] A. Sporbert, P. Domaing, H. Leonhardt, M.C. Cardoso
PCNA acts as a stationary loading platform for transiently interacting Okazaki fragment maturation proteins
Nucl. Acid. Res., 33 : 3521-3528

[Ste01] J.A. Steyer, W. Almers
A real-time view of life within 100nm of the plasma membrabe
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2(4) : 268-275, 2001

[Sto96] A. J. Stone
The theory of intermolecular forces
Clarendon Press., 1996

[Str96] T.R : Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, V. Croquette
The elasticity of a single supercoiled DNA molecule
Science, 271 : 1835-1837, 1996

[Tak98] M. Takata, M. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, S. Takeda

Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells
EMBO J., 17(18) :5497-5508, 1998

[Tie10] R. Thierbach, G. Drewes, M. Fusser, A. Voigt, D. Kuhlow, U. Blume, T.J. Schulz, C. Reiche, H. Glatt, B. Epe, P. Steinberg, M. Ristow
The Friedreich's ataxia protein frataxin modulates DNA base excision repair in prokaryotes and mammals
Biochem. J., 432(1) :165-72, 2010

[Tin97] B. Tinland, A. Pluen, J. Strum, G. Weill
Persistence Length of Single-Stranded DNA
Macromolecules, 30 :5763-5765, 1997

[Tho02] E.R. Thompson, D.R Larson, W.W. Webb
Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes
Biophys. J., 82 : 2775-2783, 2002

[Tok97] M. Tokunga, K. Kitamura, K. Saito, A.H. Iwane, T. Yanagida
Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy
Biochem. Biophys. Res. Commun., 235 : 47-53, 1997

[Tsu11] S. E. Tsutakawa, S. Classen, B.R. Chapados, A. S. Arvai, L. D. Finger, G. Guenther, C. G. Tomlinson, A. H. Sarker, B. Shen, P.K Cooper, J. A. Grasby, J. A. Tainer
Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily
Cell., 154(2) : 198-211, 2011

[Tub90] M. Tubiana, J. Dutreix, A. Wambersie
Introduction to Radiology
Taylor & Francis, 1990

[Uri03] S. Uribe, J.G. Sampedro
Measuring solution viscosity and its effect of enzyme activity
Biol. Proceed. Online, 5 :108-115, 2003

[Vir10] D. M. Virshup, P. Kaldis
Enforcing the Greatwall in Mitosis
Science, 330 : 1638-1639, 2010

[Vol99] N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, J.Bishop-Stewart, M.K. Bhalgat, P.J. Millard, F. Mao, W.Y. Leung, R.P. Haugland
Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates
Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 47(9) :1179-1188, 1999

[Wak99] M. Wakasugi, A. Sancar
Order of assembly of human DNA repair excision nuclease
J. Biol. Chem., 274 : 1875918768, 1999

[Wan01] J.Y.J. Wang
DNA damage and apoptosis
Cell Death and Differentiation, 8 : 1047-1048, 2001

[Wan06] Y.M. Wang, R.H Austin, E.C. Cox
Single molecule measurements of repressor protein 1D diffusion on DNA
Phys. Rew. Lett., 97 :048302, 2006

[Wan97] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. M. Block
Stretching DNA with Optical Tweezers
Biophys. J., 72 :1335-1346, 1997

[War00] E. Warbrick
The puzzle of PCNA's many partners
Bioessays, 22 :997-1006, 2000

[Wea11] R. Weaver
Molecular Biology
McGraw-Hill Education, 2001

[Wei99] S. Weiss
Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules
Science, 283 : 1676-1683, 1999

[Wei10] A.V. Weigel, M.M. Tamkun, D. Krapf,
Anomalous diffusion of kv2.1 channels observed by single molecule tracking in live cells
EMBC :3005 - 3008, 2010

[Whi03] M.F. White
Archaeal DNA repair : paradigms and puzzles
Biochemical Society Transactions, 31(3) : 690-693, 2003

[Whi08] R.D. Hutton, J.A : Roberts, J.C : Penedo, M.F. White
PCNA stimulates catalysis by structure-specific nucleases using two distinct mechanisms : substrate targeting and catalytic step
Nucl. Acids Res., 36(21) :6720-6727, 2008

[Woo97] R. D. Wood
Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells
J. Biol. Chem. 272(38), 23465-23468, 1997

[Xie01] S. Xie
single-molecule approach to enzymology
Single Mol., 2(4) : 229-236, 2001

[Yas01] R. Yasuda, H, Noji, M. Yoshida, H. Itoh
Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F_1-ATPase
Nature, 410 :898-904, 2001

[Yil03] A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. Mckinney, T. Ha, Y.E. Goldman, P.R. Selvin
Myosin V walks hand over hand : single fluorophore imaging with 1.5 nm localisation
Science, 300 : 2061-2065, 2003

[Yil04] A. Yildiz,M. Tomishihe, R.D. Vale, P.R. Selvin
Kinesin walks hand-over-hand
Science, 303 : 676-678, 2004

[Yil05] A. Yildiz, P.R. Selvin
Fluorescence imaging with one nanometer accuracy : Application to molecular motors
Acc. Chem. Res, 38 : 574-582, 2005

[Yok] H. Yokota
Direct visualization of single molcule DNA-binding proteins along DNA to understand DNA-protein interactions
Protein Interactions : 195-214, InTech, 2012
ISBN : 978-953-51-0244-1

[Zan07] R. Zangi, M. Hagen, B. J. Berne
Effect of Ions on the hydrophobic interaction between two plates
J. Am. Chem. Soc., 129 :4678-4686, 2007

[Zeiss] http ://zeiss-campus.magnet.fsu.edu
/articles/superresolution/palm/practicalaspects.html

[Zhu02] X.W. Zhuang, H. Kim, M.J. B. Pereira, H. Babcock, N. G. Walter, S. Chu
Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules
Science, 296 : 1473-1476, 2002

[Zhu11] R. Zhou, A. G. Kozlov, R. Roy, J. Zhang, S. Korolev,T. M. Lohman, T. Ha
SSB Functions as a Sliding Platform that Migrates on DNA via Reptation
Cell, 146 : 222-232, 2011

[Zho11] X. Zhou, R.M. Kini, J. Sivaraman
Application of isothermal titration calorimetry and column chromatography for identification of biomolecular targets
Nature Protocols, 6 :158-165, 2011

[1] http ://www.nature.com/scitable/topicpage/eukaryotes-and-cell-cycle-14046014

[2] Mariana Ruiz Villareal, http ://www.commons.wikimedias.org/wiki/user :LadyofHats

[3] http ://www-dsv.cea.fr/dsv/instituts/

[4] http ://www.andor.com

[5] www.invitrogen.com

[6] http ://www.microcal.com/products/itc/itc200.asp

[7] www.hamamatsu.com

[8] www.microscopyu.com

[9] www.nobelprize.org/

[10] http ://www.mpip-mainz.mpg.de/ koynov/koynov/research/fcs.html

Remerciements

Je remercie tout d'abord Jean Louis Martin, le directeur du Laboratoire, pour m'avoir accordé la chance de travailler sur une thématique passionnante à l'interface entre la biologie et la physique.
Je souhaite également remercier les membres du jury et tout particulièrement les rapporteurs, pour avoir accepté d'examiner ma thèse et pour l'intérêt qu'ils ont apporté à ce projet. Merci pour leurs commentaires et propositions très intéressantes.
Je souhaite ensuite adresser mes plus profonds remerciements à mes deux directeurs de thèse Antigoni Alexandrou et Cédric Bouzigues. J'aimerais bien commencer par les remercier de m'avoir accueilli dans leur équipe et pour m'avoir proposé un sujet de thèse nouveau et stimulant. Je souhaite également leur exprimer toute ma gratitude pour avoir dirigé cette thèse d'une façon admirable, scientifiquement et humainement. A l'issue de ces trois ans de thèse, je pense avoir appris beaucoup à leurs cotés professionnellement aussi bien que personnellement et je leur en suis reconnaissant. Si j'avais à mettre en valeur un aspect qui m'a particulièrement marqué, ce serait sans doute l'enthousiasme d'Antigoni et la compétence scientifique (surtout l'aisance en mathématiques) de Cédric. Je souhaite ainsi remercier Antigoni pour sa constante motivation et ses commentaires toujours valorisants. J'aimerais également remercier Cédric, pour avoir toujours été disponible, pour avoir toujours proposé des solutions, pour avoir toujours répondu à mes questions et pour m'avoir toujours motivé et poussé jusqu'au bout.
Je souhaite également remercier nos collaborateurs au sein du LOB, Roxane Lestini, Joëlle Kühn et Hannu Myllykallio pour leur soutien et leurs nombreux conseils et remarques. Merci à Joelle pour m'avoir énormément aidé dans la préparations des échantillons et le marquage des protéines.
Un grand merci est adressé à mes camarades doctorants, mes collègues de bureau et toute l'équipe nanoémetteurs pour avoir fait de ces trois ans de thèse ce qu'elles furent. J'aimerais ainsi remercier Markus, Silvan, Gaël, Paul, Julien qui sont déjà partis. Merci également à Mariane, Floriane, Mouna, Kamel, mes collègues de bureau, pour m'avoir encouragé pendant la phase de rédaction. Merci également à Rivo, Laura et à Max pour les agréables et intéressantes discussions et un très bon courage à tous les doctorants qui vont bientôt finir leur thèse, notamment, Thibault, Stéphane et Lucille.

A ce stade, je souhaite remercier mes deux stagiaires, Xenia et Lauren, pour avoir contribué à l'avancement de la thèse et pour m'avoir aidé dans les expériences.
Merci également à tous ceux avec qui j'ai enseigné pendant ces trois ans de thèse. Merci à Jean-Marc Allain, Julien Husson et Abdul Barakat et à tous les élèves que j'ai encadrés.

Merci à tous les membres du LOB.

A l'heure où cette thèse s'achève, un nouveau chapitre de ma vie commence, je souhaite ainsi remercier Dalinda, ma fiancée et bientôt future épouse, d'avoir toujours été là et de m'avoir toujours poussé à donner le maximum. J'aimerais bien remercier également mes amis, Ghazi, Anouar, Mohammed-Ali et tous mes amis qui sont restés en Allemagne. Un très grand merci est également adressé à Reza, Dima et Mazyar qui vont finir leur thèse dans un an. Au plaisir de se retrouver bientôt.

Meiner Familie sei an dieser Stelle ganz herzlich für ihre Unterstützung sowie ihr Verständnis während der gesamten Promotion gedankt. Meine Mutter möchte ich hervorheben und noch einmal für alles danken.

Pour finir, je souhaite remercier mon Père sans qui je ne serai jamais arrivé à ce stade et je lui dédie ce manuscrit.