

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole doctorale de Chimie Physique et Analytique de Paris Centre

Spécialité :

Matière Condensée : Chimie et Organisation

présentée par

**Anne KOENIG**

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI

**Etude de la dynamique d'un polymère semiflexible à l'aide de  
colloïdes magnétiques : Exemple de l'ADN**

soutenue publiquement le 10 Décembre 2004

devant le jury composé de :

Mme.	Françoise BROCHARD-WYART,	Présidente
M.	Didier CHATENAY,	Rapporteur
M.	Fernando LEAL CALDERON,	Rapporteur
M.	Jérôme BIBETTE,	Directeur
M.	Carlos MARQUES,	
M.	David WEITZ	



*Je remercie Pierre Turq de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Liquides Ioniques et Interfaces Chargées (LI2C) pour y effectuer cette thèse.*

*Je tiens à remercier Françoise Brochard-Wyart de m'avoir fait l'honneur de présider le jury ; Didier Chatenay et Fernando Leal Calderon pour avoir accepté la tâche de rapporteur, et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma thèse, ainsi que Carlos Maques, d'avoir accepté de juger ce travail.*

*J'aimerais également remercier David Weitz. You kindly accepted to judge this work and have patiently put up with a long oral presentation in French.*

*Jérôme Bibette a dirigé cette thèse avec enthousiasme. Je te remercie Jérôme, de la liberté et de la confiance, que tu m'as accordées depuis le début de la thèse. J'ai beaucoup apprécié ton optimisme sans faille et le foisonnement d'idées qui suit chaque nouveau résultat.*

*Je remercie tout particulièrement Charlie Gosse pour sa disponibilité et sa patience. Tu as guidé mes premiers pas dans la bio, notamment pour la PCR, les centaines d'opérations de pipetage que cela nécessite et les milles précautions qu'il faut prendre (avant ça je pensais savoir manipuler). Tu as aussi su être présent à chaque fois que j'avais besoin de ton aide, pour la fabrication de bobines de cuivre ou les discussions bio.*

*Un grand merci à Carlos Marques pour sa collaboration au dernier chapitre de cette thèse. J'ai pris beaucoup de plaisir à nos discussions scientifiques et surtout, tu as su m'expliquer très simplement les modèles mathématiques complexes que tu avais imaginé.*

*Pascal Hébraud m'a aidée à finaliser l'interprétation des expériences de mesure de force. Pour cela et pour tes nombreux conseils pendant ces trois années, merci beaucoup !*

*Je remercie également Jean Baudry et Emanuel Bertrand, les deux nouveaux permanents du labo, Jean pour ses conseils avisés, notamment à la relecture de ce manuscrit et pour les dernières mises au point d'avant soutenance ; Emanuel pour son soutien, notamment lors de ma première communication orale à l'ECIS (non non je n'étais pas stressée du tout !) et pour la semaine sympathique que nous avons passée à Florence à cette occasion (pas mal, ta tactique d'approche de buffets !).*

*C'est avec grand plaisir que j'ai partagé mon bureau avec Isabelle Génois et Catherine Rouzeau.*

*Isabelle, je tiens à te remercier chaleureusement pour nos discussions de bureau et aussi pour les trois semaines de manip pendant lesquelles tu m'as aidée à terminer ma thèse.*

*Merci Catherine, pour ta bonne humeur permanente, la centaine de cuves que tu m'as préparée avec le sourire, les rires et les bons moments que nous avons passés ensemble au laboratoire et en*

dehors.

*Caroline Gauchotte, Inès Khalfallah et Hélène Bertrand se sont succédées à la paillasse lors de leurs stages plus ou moins longs. Elles m'ont toutes les trois bien aidée, qu'elles en soient ici remerciées.*

*Un labo c'est aussi beaucoup de personnes qui passent et sur lesquels on peut compter : Merci à Lydie pour les agréables moments passés ensemble et les sorties ciné, Julie pour ta bonne humeur et pour m'avoir régulièrement décrochée de mon ordinateur lors de nos pauses clopes, Rémi pour ton aide précieuse au bricolage des machines de force, Jacques pour les repas « anti-cafards » (au premier sens du terme) et les conseils informatiques, Yvette pour ton aide au fluorimètre, Olivier, Caroline, Cécile et Laetitia pour les grands débats cinématique, Nicolas, Sébastien, Jérôme, Alexandre, Florence, Manon, Geneviève, Lise et bien sûr Martine pour la vie que tu mets dans le labo.*

*Pour finir, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur soutien quotidien : ma mère a bien voulu passer un dimanche à relire ce manuscrit sans rien y comprendre pour corriger les fautes d'orthographe, mon père, ma soeur Florence et mon frère Vincent, ainsi que Mamie qui a fait le déplacement jusqu'à Paris pour venir m'écouter, cela m'a fait très plaisir. Merci aussi à Isabelle, François et Timothée qui éclairent mes retours au pays, la famille Sietses chez qui j'ai fait régulièrement le plein de réglisses salées et de harengs crus et Franck et Claire, qui sont un peu loin en ce moment mais que je n'oublie pas. Enfin et surtout, merci à toi Pascal, pour ton soutien de chaque instant, et bien plus...*

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Optimisation des matériaux</b>	<b>7</b>
1.1 Auto-organisation des particules magnétiques sous champ . . . . .	8
1.1.1 Propriétés des billes superparamagnétiques . . . . .	8
1.1.2 Mesure de la distance entre les billes et du profil de force . . . . .	9
1.2 Préparation des billes magnétiques . . . . .	13
1.2.1 Description des billes magnétiques . . . . .	13
1.2.2 Susceptibilité magnétique . . . . .	13
1.2.3 Tri magnétique . . . . .	15
1.2.4 Mesure des fractions massiques de billes dans les suspensions de particules .	16
1.2.5 Taille des billes magnétiques après tri . . . . .	16
1.3 Greffage de la streptavidine . . . . .	20
1.3.1 Produits . . . . .	20
1.3.2 Schéma réactionnel . . . . .	21
1.3.3 Protocole de départ . . . . .	22
1.3.4 Méthode de caractérisation des billes greffées . . . . .	22
1.3.5 Optimisation du greffage . . . . .	24
1.3.6 Stabilité à long terme . . . . .	28
1.3.7 Conclusion . . . . .	28
1.4 Préparation des ADN . . . . .	29
1.5 Adsorption de l'ADN sur les billes . . . . .	30
1.5.1 Cinétique d'adsorption de l'ADN sur les billes . . . . .	30
1.6 Formation de chaînes permanentes . . . . .	31
1.6.1 Influence de la force ionique . . . . .	32
1.6.2 Influence de la longueur de l'ADN . . . . .	33
1.7 Conclusion . . . . .	33
<b>2 Mesure de la flexibilité de l'ADN</b>	<b>37</b>
2.1 Structure de l'ADN . . . . .	37
2.2 Physique des polymères semi-flexibles . . . . .	39
2.2.1 La chaîne à articulations libres (Freely Jointed Chain, FJC) . . . . .	39

2.2.2	Longueur de persistance comme représentation de la rigidité de la chaîne . . .	39
2.2.3	Flexibilité et élasticité . . . . .	41
2.2.4	En présence d'une force extérieure . . . . .	42
2.3	Méthodes de mesure de l'élasticité de l'ADN . . . . .	43
2.3.1	Mesure de la longueur de persistance de l'ADN . . . . .	43
2.3.2	Réponse de l'ADN à une force extérieure : méthodes de micromanipulation	44
2.3.3	Molécule unique et physique de l'ADN . . . . .	46
2.4	Du profil de force à la flexibilité des liens . . . . .	50
2.4.1	Principe de la méthode . . . . .	51
2.4.2	Profil de force des billes seules . . . . .	52
2.4.3	Profil de force en présence de l'ADN . . . . .	53
2.5	Mesure de l'élasticité de molécules d'ADN courtes . . . . .	62
2.5.1	ADN de 151 paires de bases . . . . .	62
2.5.2	Variation de la longueur de l'ADN . . . . .	67
2.6	Conclusion . . . . .	69
<b>3</b>	<b>Cinétique de formation des liens</b>	<b>75</b>
3.1	Cinétiques streptavidine-biotine : État de l'art . . . . .	76
3.1.1	Cinétique des réactions spécifiques ligand-récepteur . . . . .	76
3.1.2	Application au couple streptavidine-biotine . . . . .	77
3.1.3	Rôle de l'espaceur . . . . .	81
3.2	Techniques de Mesures . . . . .	83
3.2.1	Protocole expérimental . . . . .	83
3.2.2	Principe de la détection des doublets . . . . .	83
3.2.3	Quantité d'ADN . . . . .	85
3.2.4	Reproductibilité . . . . .	85
3.3	Résultats expérimentaux . . . . .	86
3.3.1	Mesure des distances de réaction, profil force-distance . . . . .	86
3.3.2	Mesure des cinétiques de réaction . . . . .	87
3.4	Description du système . . . . .	90
3.4.1	Diffusion des billes magnétiques . . . . .	91
3.4.2	Dynamique du lien d'ADN . . . . .	95
3.4.3	Constante intrinsèque de formation de la liaison streptavidine-biotine . . .	95
3.4.4	Comparaison . . . . .	96
3.5	Discussion . . . . .	96
3.5.1	Description du modèle de réaction-diffusion : . . . . .	97
3.5.2	Validité du modèle : . . . . .	100
3.6	Conclusion . . . . .	102
	<b>Conclusion</b>	<b>107</b>

<b>A</b>	<b>Calcul de Van der Waals</b>	<b>109</b>
<b>B</b>	<b>La centrifugeuse à disque de CPS instrument</b>	<b>113</b>
<b>C</b>	<b>Dosage de la streptavidine</b>	<b>117</b>
<b>D</b>	<b>Protocole de greffage de la streptavidine</b>	<b>121</b>
<b>E</b>	<b>Synthèse de l'ADN par PCR</b>	<b>123</b>
<b>F</b>	<b>Longs ADN</b>	<b>129</b>
<b>G</b>	<b>Couples ligand-récepteur avec un espaceur rigide</b>	<b>131</b>



# Introduction

La mesure des propriétés macroscopiques d'un système est un moyen d'accéder à ses propriétés microscopiques : équation d'état, compressibilité, diffusion de la lumière...

Cependant, depuis une dizaine d'années, grâce aux progrès des techniques de visualisation et de micromanipulation, les scientifiques ont commencé à étudier des molécules ou macromolécules uniques. L'objectif est de manipuler et d'observer une seule molécule à la fois afin de comprendre la réponse d'une molécule à une sollicitation extérieure ou le mécanisme de réaction entre deux molécules (ligand-récepteurs greffés à des surfaces [1, 2] ou interaction protéine-ADN par exemple [3]).

De nombreuses méthodes, permettant de mesurer le comportement de molécules entre deux surfaces, ont été mises au point. Ainsi l'AFM (Atomic Force Microscope) permet de mesurer l'élasticité de quelques molécules d'ADN greffées entre deux surfaces [4]. Il est aussi possible d'exercer une force sur une molécule par l'intermédiaire d'un colloïde sur lequel elle aura été préalablement greffée. C'est le principe des pinces optiques [5], des pinces magnétiques [6] et de la fibre optique [7]. Enfin, la cinétique de réaction entre deux molécules accrochées à des surfaces peut être mesurée à l'aide de micropipettes [8, 9] ainsi que la force des liaisons de type ligand-récepteur [10].

Toutes ces techniques impliquent un contrôle délicat de la position d'objets macroscopiques ou colloïdaux à des distances très faibles (quelques nanomètres) et le contrôle de forces de l'ordre du piconewton. Les énergies qui entrent en jeu dans ces expériences sont de l'ordre de  $kT$ . Dans le cas de la mesure de l'élasticité d'une molécule, un temps d'acquisition des données suffisant permet de faire une moyenne sur toutes les configurations possibles que prend la molécule sous l'effet des fluctuations thermiques. Par contre dans le cas d'une mesure de cinétique, la moyenne ne peut se faire dans le temps, et l'expérience doit être répétée un grand nombre de fois pour avoir la distribution des temps de réaction et la moyenne sur un grand nombre de molécules.

Nous avons réalisé en parallèle un ensemble de "milieux confinés", définis par l'espace entre deux colloïdes à l'intérieur duquel se trouve un faible nombre de molécules. Pour cela, nous utilisons des colloïdes magnétiques qui s'alignent sous l'effet d'un champ magnétique uniforme. La distance entre des particules voisines est le résultat de l'équilibre entre les interactions dipolaires attractives engendrées par le champ magnétique, les forces de répulsions naturelles entre colloïdes et la force exercée par les molécules confinées. L'espace entre deux billes le long de la chaîne est le lieu d'observation d'un faible nombre de molécules et se répète un grand nombre de fois au

sein d'une même chaîne et sur plusieurs chaînes en parallèles (fig. 1). Cela nous permet l'étude du comportement d'un faible nombre de macromolécules, tout en réalisant directement une moyenne.

Nous avons appliqué cette méthode à l'étude de deux problèmes différents :

- l'étude de la force exercée par une macromolécule greffée entre deux surfaces.
- la cinétique de la réaction spécifique entre deux molécules de type ligand-récepteur accrochées à des surfaces.

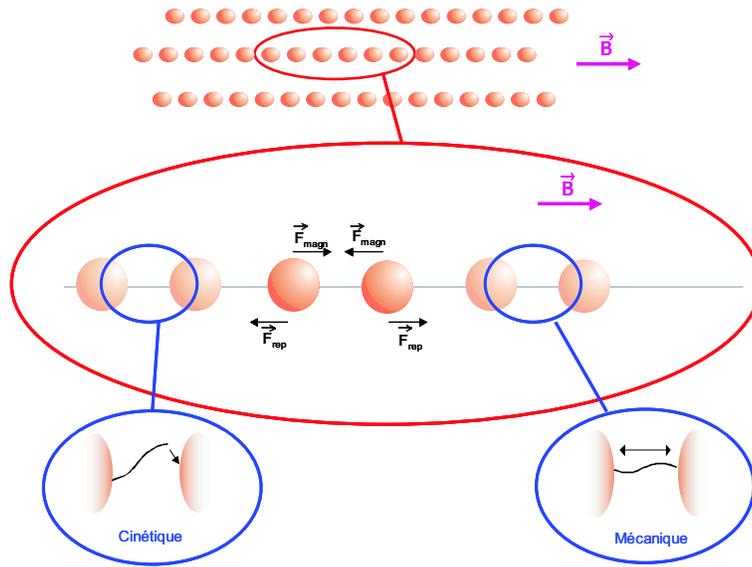


FIG. 1 – Principe des expériences réalisées : Les billes magnétiques sont alignées en chaînes. La distance entre deux billes voisines est déterminée par l'équilibre des forces colloïdales répulsives et des forces magnétiques attractives. Dans chaque intervalle entre deux billes se trouve un faible nombre de molécules. La cinétique de formation de lien et les propriétés mécaniques de ce lien sont étudiés pour une molécule, et cela un grand nombre de fois en parallèle, on obtient donc directement une mesure moyenne.

fin d'aborder ces deux problèmes et de valider l'utilisation de cette nouvelle technique, nous avons utilisé des systèmes modèles bien connus. Plus précisément, nous nous sommes intéressés aux propriétés mécaniques d'une molécule d'ADN (biotinylée aux deux extrémités) comme lien entre les deux surfaces (recouvertes de streptavidine) et à la dynamique de cette molécule jouant le rôle d'espaceur dans la réaction de reconnaissance streptavidine-biotine.

La figure 2 décrit la préparation des assemblages linéaires de billes magnétiques et d'ADN que nous utiliserons pour ces deux études.

Nous présenterons, dans un premier chapitre, la préparation et la caractérisation des matériaux, étape difficile et nécessaire pour contrôler ensuite les paramètres clés du système (interactions et distance entre les billes, réactivité de surface...). Puis nous montrerons qu'il est possible de former des assemblages linéaires colloïdaux avec ces matériaux et présenterons brièvement les paramètres importants permettant de contrôler la formation de ces chaînes.

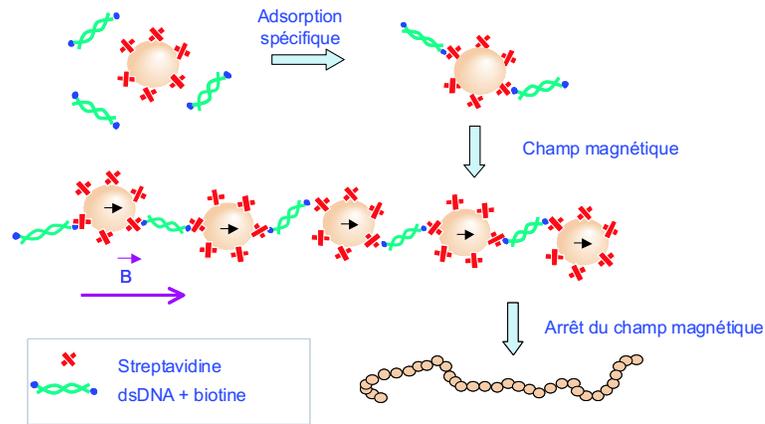


FIG. 2 – Schéma de fabrication des assemblages magnétiques linéaires.

Dans le deuxième chapitre, nous utiliserons les forces dipolaires magnétiques pour étirer ou compresser ces chaînes et montrerons qu'il est ainsi possible de mesurer les propriétés mécaniques du lien entre les particules.

Enfin, nous nous intéresserons dans le dernier chapitre au problème de la cinétique de formation de ces liens en fonction de la longueur de l'ADN et de la distance entre les particules.



# Bibliographie

- [1] P. Bongrand. Ligand-receptor interactions. *Rep. Prog. Phys.*, 62 :921–968, 1999.
- [2] M. L. Dustin, S. K. Bromley, M. M. Davis, and C. Zhu. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 17 :133–157, 2001.
- [3] J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Stretching DNA and RNA to probe their interactions with proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 13 :266–274, 2003.
- [4] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophysical Journal*, 78 :1997–2007, 2000.
- [5] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.*, 72 :1335–1346, 1997.
- [6] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Behaviour of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74 :2016–2028, 1998.
- [7] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA : an extensible molecule. *Science*, 271 :792–794, 1996.
- [8] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.*, 72 :1541–1555, 1997.
- [9] S. E. Chesla, P. Selvaraj, and C. Zhu. Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys. J.*, 75 :1553–1572, 1998.
- [10] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397 :50–53, 1999.



# Chapitre 1

## Principes généraux et optimisation des matériaux de départ

Nous présentons ici le système organisé permettant d'étudier la cinétique de reconnaissance moléculaire d'un ligand et d'un récepteur fixés à des parois et la mécanique d'une macromolécule liée entre deux surfaces. Ce système organisé est un assemblage des "briques de bases" que sont les colloïdes magnétiques et les ADN biotinylés.

Nous décrivons, dans un premier temps, l'origine de l'organisation en lignes des particules magnétiques lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique et la technique de diffraction de la lumière permettant de mesurer la distance entre les billes dans ces lignes ainsi que les interactions entre les particules.

Puis, nous nous intéressons à la préparation et à l'optimisation des matériaux de départ :

- Les billes magnétiques doivent être suffisamment monodisperses pour que tous les intervalles entre les billes soient identiques. Elles sont donc triées et caractérisées de manière à connaître le plus précisément possible leur structure et leur taille. La principale difficulté réside ensuite dans le greffage de la streptavidine à la surface des billes. En effet, la modification chimique de la surface peut induire dans certains cas, une destabilisation des billes qui s'agrègent de façon non spécifique. Il est donc nécessaire de bien contrôler le greffage de la streptavidine. Nous mesurons ensuite précisément le nombre de sites réactifs à la surface des billes par fluorescence.
- Les ADN biotinylés aux deux extrémités seront synthétisés par PCR (Polymerisation Chain Reaction). Cette technique permet de contrôler la taille des ADN synthétisés.

Enfin, nous montrons que l'assemblage de ces deux matériaux en chaînes magnétiques permanentes est possible. Ces assemblages seront étudiés dans les chapitres suivants.

## 1.1 Auto-organisation des particules magnétiques sous champ

### 1.1.1 Propriétés des billes superparamagnétiques

Les billes magnétiques utilisées, d'environ 200 nm de diamètre, contiennent des petits grains d'oxyde de fer (maghémite) d'environ 10 nm. Chaque petit grain d'oxyde de fer possède un moment magnétique permanent.

En l'absence de champ magnétique, ces moments fluctuent avec l'agitation thermique et s'orientent aléatoirement. La bille n'a pas de moment magnétique global. Il n'y a pas d'interaction magnétique entre les billes et elles sont agitées par un mouvement brownien.

En présence d'un champ magnétique extérieur, tous les dipôles s'orientent dans la direction du champ extérieur et un moment magnétique global apparaît à l'échelle de la bille. L'interaction dipôle-dipôle entre les billes est attractive dans la direction parallèle au champ et répulsive dans la direction perpendiculaire au champ (fig. 1.1).

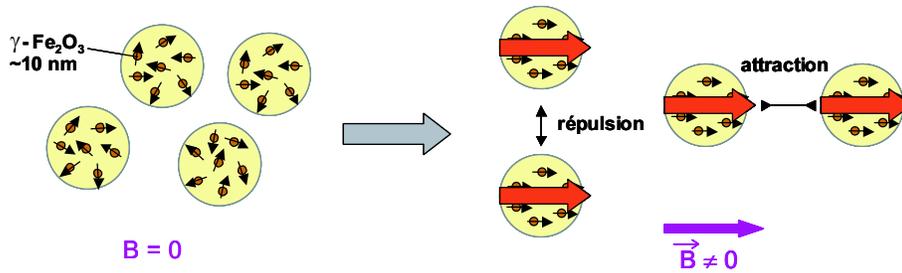


FIG. 1.1 – Polarisation des particules en présence ou en l'absence de champ magnétique.

Les particules magnétiques s'organisent alors en chaînes que l'on peut observer au microscope optique (fig. 1.2). Après interruption du champ magnétique, les billes perdent leur moment dipolaire global et se séparent instantanément pour revenir à leur mouvement brownien d'origine.

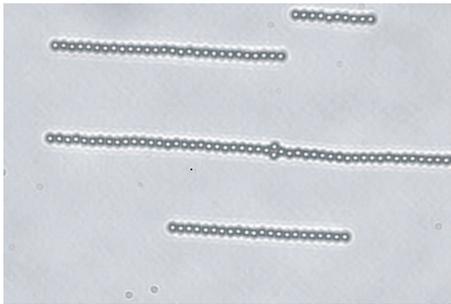


FIG. 1.2 – Organisation en chaîne des particules en présence d'un champ magnétique. Photo microscope optique C. Goubault.

Les particules sont dites superparamagnétiques car elles ont un comportement paramagnétique avec une susceptibilité magnétique  $\chi$  de l'ordre de 1, très supérieure aux matériaux paramagnétiques habituels ( $\chi \approx 10^{-3}$ ).

### 1.1.2 Mesure de la distance entre les billes et du profil de force

Sous champ magnétique, la formation des chaînes de billes entraîne l'apparition de nouvelles propriétés optiques. Les suspensions de billes se colorent différemment en fonction de l'intensité du champ appliqué [1]. Ces couleurs sont la conséquence de la diffraction de Bragg par le cristal unidimensionnel que forment les billes placées à intervalles réguliers dans les chaînes (fig. 1.3).

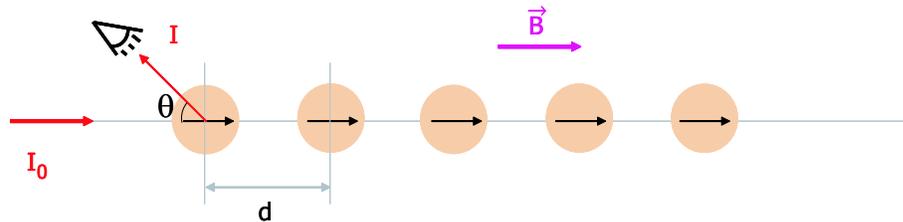


FIG. 1.3 – Organisation des billes sous champ et diffraction de Bragg.

Il est ainsi possible de déterminer la distance centre à centre  $d$  entre deux billes en appliquant la condition de Bragg :

$$d = \frac{k\lambda}{n(1 + \cos \theta)} \quad (1.1)$$

où  $k$  est un nombre entier,  $\lambda$  est la longueur d'onde diffractée,  $n$  est l'indice de réfraction du milieu ( $n=1,33$  pour l'eau) et  $\theta$  est l'angle compris entre le rayon incident et le rayon diffracté (fig. 1.3). Dans notre cas, le signal, mesuré à l'aide d'un spectromètre, est obtenu par rétrodiffusion dans l'axe des chaînes, donc  $\theta = 0^\circ$ . Au premier ordre ( $k=1$ ) on obtient :

$$d = \frac{\lambda}{2n} \quad (1.2)$$

La distance d'équilibre mesurée,  $d$ , dépend des interactions attractives et répulsives entre les particules qui se compensent :

- Les forces répulsives peuvent être électrostatiques si la surface des billes est chargée et/ou stériques s'il y a un polymère à la surface des billes.
- Les forces attractives sont de deux types. Les forces de Van der Waals, de courte portée sont dues à la différence de polarisabilité électronique entre les particules et l'eau. La force magnétique attractive dépend quant à elle de la distance entre les billes et de l'intensité du champ magnétique appliqué.

Ainsi pour une valeur de champ donnée, la distance d'équilibre entre les particules est atteinte lorsque les forces répulsives sont exactement compensées par les forces attractives. Lorsque la force magnétique augmente, les billes se rapprochent, et, en conséquence, la longueur d'onde diffractée diminue. En utilisant un spectromètre, on peut ainsi observer la longueur d'onde diffractée (pic de Bragg) en fonction du champ magnétique appliqué [2] (fig. 1.4 A). Si l'on calcule la force magnétique et la force de Van der Waals entre les billes, on peut en déduire la force répulsive en

fonction de la distance et tracer un profil de force (fig. 1.4 B) :

$$F_{rep} = F_m(d) + F_{VdW}(d) \quad (1.3)$$

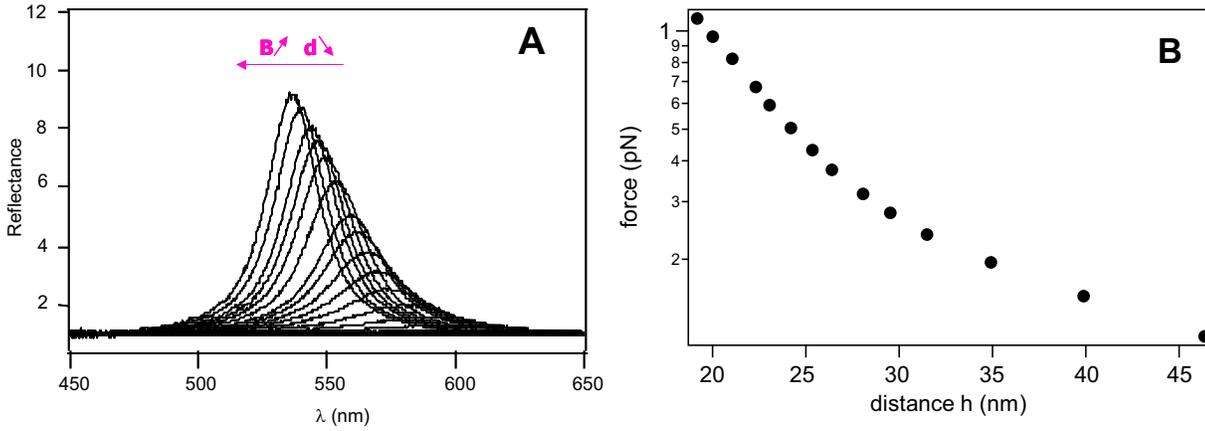


FIG. 1.4 – Mesure de la distance entre les billes et du profil de force. A : Evolution du pic de Bragg en fonction du champ magnétique. B : Profil de force obtenu.

### Calcul de la force de Van der Waals

Les billes sont constituées d'un cœur dur composé d'oxyde de fer et de polymère, et d'une couronne dense de polymère réticulé d'environ 15 nm. Les forces de Van der Waals s'appliquant aux billes tiennent compte de ces différentes couches. On considère que l'on a 5 couches disposées comme le montre la figure 1.5.

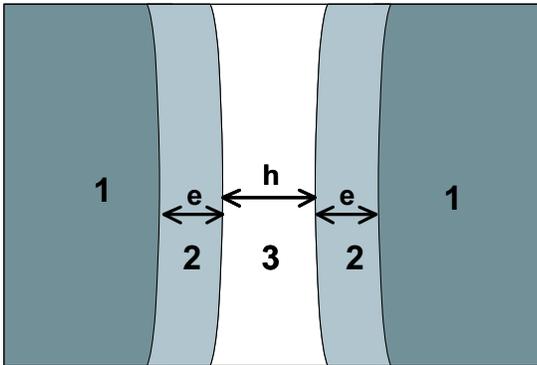


FIG. 1.5 – Schéma des couches intervenant dans la force de Van der Waals. Milieu 1 : cœur dur. Milieu 2 : polymère réticulé. Milieu 3 : eau.

La force de Van der Waals qui s'exerce à travers un tel système est de la forme [3] :

$$F_{VdW}(h) = -\frac{r}{12} \left( \frac{A_{232}}{h^2} - \frac{2A_{123}}{(h+e)^2} + \frac{A_{121}}{(h+2e)^2} \right) \quad (1.4)$$

où  $r$  est le rayon des billes (cœur dur + couche de polymère dense),  $A_{ijk}$  est la constante de Hamaker qui dépend de la nature des milieux considérés. Les milieux 1, 2 et 3 sont respectivement le cœur dur, la couche de polymère réticulé et la solution aqueuse. Les constantes de Hamaker sont calculées en annexe (annexe A).  $h$  représente la distance entre les couches de polymère denses et  $e$  l'épaisseur de cette couche (fig. 1.5).

### Calcul de la force magnétique attractive

Sous champ magnétique, le moment dipolaire induit au niveau de la bille s'écrit [4] :

$$m = \frac{4}{3}\pi r^3 \chi_s H_T \quad (1.5)$$

$\chi_s$  est la susceptibilité magnétique d'une sphère, dont l'expression est

$$\chi_s = \frac{1}{1 + \frac{\chi}{3}} \quad (1.6)$$

en raison des effets de démagnétisation dans une sphère homogène.  $\chi$  est la susceptibilité intrinsèque du cœur magnétique de la bille. Elle est mesurée à l'aide d'un SQUID (chap. 1.2.2) et dépend du taux d'oxyde de fer dans les billes.

$H_T$  est le champ magnétique total agissant sur chaque bille, il peut s'écrire comme la somme du champ magnétique extérieur et du champ magnétique local induit par la présence des billes voisines :

$$H_T = H_{ext} + 2 \left( 1,202 \cdot \frac{2m}{4\pi d^3} \right) \quad (1.7)$$

Le facteur 1,202 provient de la somme des influences de toutes les billes voisines, plus ou moins lointaines dans la chaîne, de la bille considérée. Il vient donc, en remplaçant  $H_T$  dans l'équation (1.5) :

$$m = \frac{4/3\pi r^3 \chi_s}{1 - \frac{1,202 \cdot 4/3\pi r^3 \chi_s}{d^3}} H_{ext} \quad (1.8)$$

Enfin, la force magnétique attractive dépend de la distance  $d$  entre les billes et du moment magnétique induit dans une bille par le champ magnétique total :

$$F_m(d) = -1,202\mu_0 \cdot \frac{3m^2}{2\pi d^4} \quad (1.9)$$

Connaissant les forces attractives en fonction de la distance et du champ magnétique, il suffit de mesurer expérimentalement la distance par diffraction de la lumière pour en déduire à l'équilibre le profil force-distance.

## Montage expérimental

La suspension de particules magnétiques est placée dans une cellule en verre carrée d'environ  $10 \mu\text{m}$  d'épaisseur et d'environ 1 cm de côtés. Celle-ci est scellée à l'aide d'une huile siliconée visqueuse afin d'éviter toute évaporation pendant l'expérience. La fraction volumique en particules est faible (de l'ordre de 0,05 % en volume) afin de minimiser les interactions entre les chaînes et la diffusion multiple de la lumière.

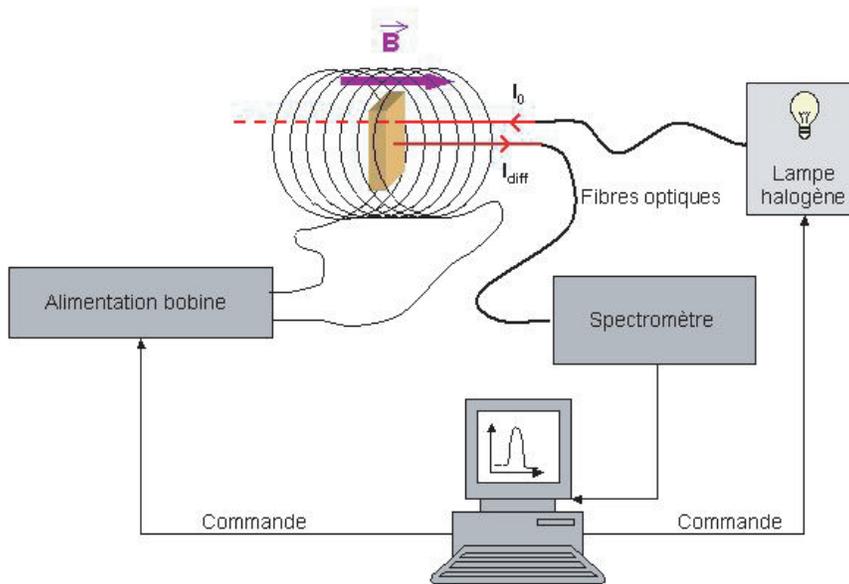


FIG. 1.6 – Schéma du montage expérimental de mesure des profils de force.

La cellule de verre est ensuite placée à l'intérieur d'une bobine de cuivre dans laquelle passe un courant variable (fig. 1.6). La bobine produit des champs magnétiques pouvant aller jusqu'à 80 mT. Une lampe halogène illumine la cuve avec un rayon incident parallèle au champ magnétique. La lumière rétro-diffusée ( $\theta = 180^\circ$ ) est acheminée par l'intermédiaire d'une fibre optique vers le spectromètre. Le montage expérimental est interfacé par un ordinateur permettant de contrôler l'intensité du champ magnétique et l'allumage de la lampe. Il permet également de visualiser l'intensité lumineuse détectée par le spectromètre en fonction de la longueur d'onde (entre 400 et 900 nm), pour chaque champ magnétique appliqué. Afin de s'affranchir des variations d'intensité de la lampe sur le spectre, du bruit extérieur et de la diffusion de la suspension

de billes en l'absence de champ, on trace la reflectance qui est donnée par l'expression :

$$reflectance = \frac{I_m - I_{bg}}{I_{ref} - I_{bg}} \quad (1.10)$$

où  $I_m$  est l'intensité mesurée sous champ,  $I_{bg}$  est l'intensité mesurée lumière éteinte et  $I_{ref}$  est l'intensité diffusée par la suspension de billes et réfléchi par le système en l'absence de champ magnétique.

La relation de Bragg (1.2) nous permet de connaître le pas du réseau c'est à dire la distance centre à centre  $d$  entre les billes avec une précision d'environ 2 nm.  $h = d - 2r$  est la distance interparticule. Il est très important d'avoir des particules aussi monodisperses en taille que possible afin qu'elles aient toutes le même moment magnétique et le même rayon. Enfin il est également indispensable de connaître ce rayon afin de pouvoir en déduire la distance interparticule  $h$ . Il sera mesuré par diffraction de la lumière par les chaînes de billes au contact, par diffusion de la lumière, et par TEM (chap. 1.2.5). Pour des billes de l'ordre de 200 nm, on peut donc mesurer un profil de force sur des distances interparticules  $h$  allant de 1 à 100 nm (d'après la relation de Bragg pour  $n = 1,33$ ).

La quantité de particules utilisée est faible (environ 5  $\mu\text{L}$  à 0,05 %) et le temps d'une expérience varie entre 5 et 15 minutes en fonction du profil de champ magnétique appliqué et du nombre de mesures effectuées. Les forces répulsives mesurées sont typiquement comprises entre 0,1 et 10 pN.

## 1.2 Préparation des billes magnétiques

### 1.2.1 Description des billes magnétiques

Les billes magnétiques sont achetées à la société Ademtech S.A. (Pessac, France). Elles sont constituées principalement d'un coeur dur d'environ 150 nm de diamètre contenant des particules d'oxyde de fer (maghémite) d'environ 10 nm de diamètre et d'une couronne de polymère d'environ 15 nm d'épaisseur, portant des fonctions COOH (fig. 1.7).

### 1.2.2 Susceptibilité magnétique

Afin de pouvoir calculer la force magnétique, il faut connaître la susceptibilité magnétique des billes, c'est à dire le rapport entre l'aimantation des billes ( $M$ ) et l'excitation magnétique ( $H$ ). Pour cela, on réalise des expériences d'aimantation du ferrofluide utilisé dans la fabrication des billes à l'aide d'un SQUID (Superconducting QUantum Interference Device, expérience réalisée par L. Cohen-Tannoudji et E. Bertrand). L'expérience consiste à mesurer le flux de courant induit par le mouvement de l'échantillon à travers une bobine supraconductrice alimentée en courant continu et produisant donc une excitation continue. On obtient l'aimantation  $M$  par volume d'oxyde de fer en fonction de l'excitation  $H$  (fig. 1.8 A).

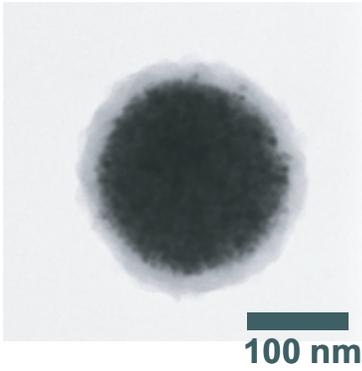


FIG. 1.7 – Cliché de microscopie électronique à transmission d'une bille magnétique Ademtech.

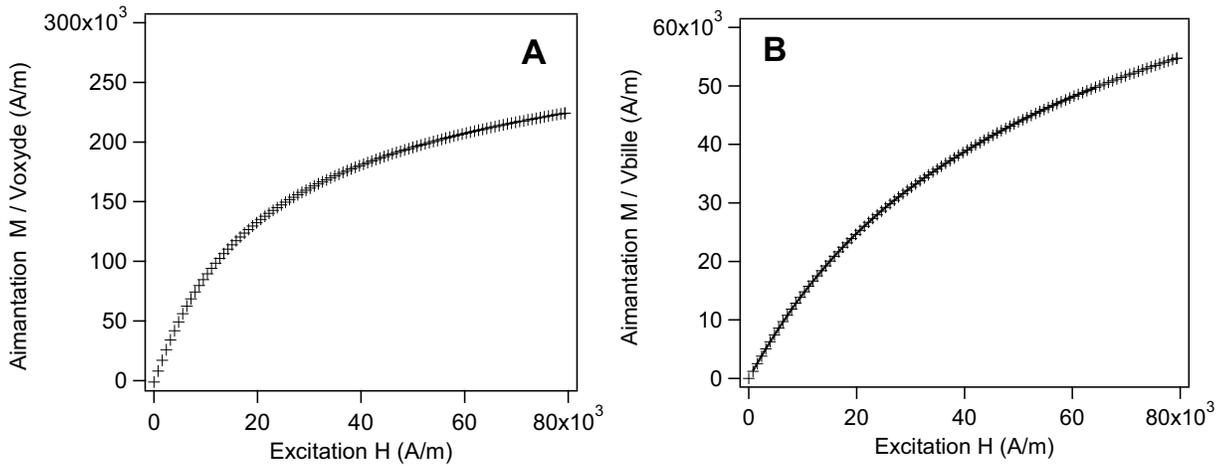


FIG. 1.8 – Aimantation  $M$  en fonction de l'excitation  $H$ , calculée à partir d'expérience de SQUID sur le ferrofluide entrant dans la composition des billes. A : Aimantation par volume d'oxyde de fer. B : Aimantation par volume de bille. La ligne pleine correspond à la modélisation des données par un polynôme d'ordre 5. Remarque :  $80000 \text{ A/m} \equiv 100 \text{ mT}$ .

Dans une bille, toutes les particules d'oxyde de fer sont concentrées dans le cœur dur. La densité du cœur dur des billes, donnée par le fournisseur, est d'environ 2,3. Si l'on suppose qu'il est composé d'oxyde de fer ( $d \simeq 5,1$ ) et de polymère ( $d \simeq 1$ ), on obtient une fraction volumique en oxyde de fer dans le cœur dur de 32 %. On a donc :

$$M_{\text{coeurdur}} = M_{\text{Fe}_2\text{O}_3} * 0,32 \quad (1.11)$$

D'autre part, on a vu que la susceptibilité magnétique d'une sphère est de la forme :

$$\chi_s = \frac{\chi}{1 + \frac{\chi}{3}} \quad (1.12)$$

avec  $\chi = \frac{M}{H}$  d'où :

$$M_{bille} = \frac{M_{coeurdur}}{1 + \frac{M_{coeurdur}}{3H}} \quad (1.13)$$

L'aimantation par volume de bille est représentée en fonction de l'excitation (fig. 1.8 B). Elle est modélisée par un polynôme d'ordre 5, qui sera utilisé pour les calculs de force magnétique, les champs magnétiques se situant toujours dans l'intervalle correspondant aux mesures d'aimantation.

La suspension de billes magnétiques reçue (billes brutes) est ensuite triée par sédimentation magnétique, afin de la rendre plus monodisperse. Cette étape est indispensable à la précision des profils de force.

### 1.2.3 Tri magnétique

Le tri magnétique s'effectue en plusieurs étapes.

Dans une première étape, un champ magnétique vertical (20 mT environ) est appliqué à la suspension de billes pendant 60 min. Les plus grosses billes, contenant plus d'oxyde de fer et donc plus magnétisables forment des chaînes de billes qui s'agrègent dans le temps et sédimentent alors que les plus petites billes restent en solution et ne sont pas suffisamment aimantées pour subir l'action du champ. Après 60 min, on observe une interface nette au fond du flacon entre une phase "solide" concentrée dense (contenant les plus grosses billes) et une phase "liquide" plus diluée (contenant les plus petites billes). Les deux phases sont alors séparées. La phase supérieure (appelée L1) est utilisée pour la deuxième étape.

Dans une deuxième étape, le champ magnétique est plus élevé (35 mT pendant 60 min) afin de séparer à nouveau l'échantillon en deux phases. Cette fois-ci, c'est la phase inférieure qui est conservée (L1S1).

Enfin dans la troisième étape, le champ est à nouveau plus faible (30 mT pendant 40 min); la phase conservée est la phase supérieure (LSL).

La distribution de tailles des différentes fractions est obtenue par centrifugation sur gradient de glucose (centrifugeuse CGS, annexe B). On vérifie que la distribution de la fraction finale est plus étroite que la distribution de la suspension brute (fig.1.9). L'indice de polydispersité  $IP = D_w/D_n$  (où  $D_w$  est le diamètre moyen en poids et  $D_n$  le diamètre moyen en nombre) passe de 1,18 pour les billes brutes à 1,05 pour les billes triées (LSL).

Enfin, la densité de la suspension finale est mesurée à l'aide d'un densitomètre (DMA 4500 de Anton Paar) afin de déterminer sa fraction massique en billes (connaissant la densité des billes, qui est de 1,76).

A partir de 20 mL de suspension à 3 % (en poids), on obtient environ 10 mL de suspension à seulement 0,12 % (en poids); on a donc sélectionné seulement 2 % de la quantité initiale de billes.

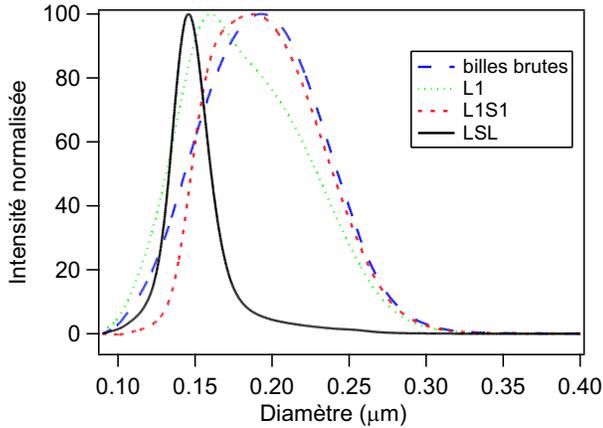


FIG. 1.9 – Distribution de tailles des différentes étapes de tri, obtenue par centrifugation sur gradient de glucose.

### 1.2.4 Mesure des fractions massiques de billes dans les suspensions de particules

Pour des suspensions très diluées, l'absorbance à 350 nm est proportionnelle à la fraction massique en billes. Afin de connaître les fractions massiques exactes des suspensions de billes à tout moment, on réalise une droite d'étalonnage avec les billes triées (fig. 1.10). L'absorbance de suspensions de billes à différentes fractions massiques, allant de 0,0005 % à 0,005 %, est mesurée à 350 nm.

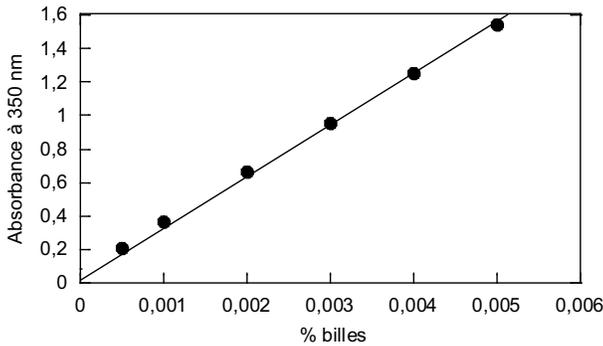


FIG. 1.10 – Calibration pour la mesure de la fraction massique des suspensions de billes en absorbance à 350 nm. L'équation de la droite de calibration est :  $y = 315,14 x$ .

Cette droite d'étalonnage sera utilisée par la suite pour mesurer la quantité exacte de billes à chaque expérience, en utilisant très peu de billes.

### 1.2.5 Taille des billes magnétiques après tri

Pour la suite de l'étude, il est important de connaître la taille des billes magnétiques utilisées. Différentes expériences sont nécessaires afin de connaître la structure des billes et le diamètre des différentes couches. En effet, les billes sont constituées d'un cœur dur, d'une couche de polymère dense réticulé et de cheveux de polymère qui s'étendent dans la solution (fig. 1.11).

L'observation en microscopie électronique à transmission (TEM) permet de déterminer la

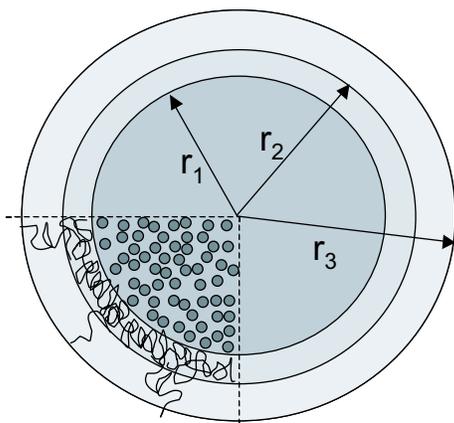


FIG. 1.11 – Schéma des billes Ademtech.

taille du cœur dur ( $r_1$ ). L'application d'un champ magnétique important pour amener les billes au contact permet d'estimer l'épaisseur de la couche de polymère réticulé ( $r_2$ ). Enfin le rayon hydrodynamique total ( $r_3$ ) est mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Ces mesures ont été effectuées sur les billes brutes et les billes triées. D'autre part on vérifie que pour des billes non polymérisées fournies par Ademtech (cœur dur seul)  $r_1 = r_2 = r_3$ .

### Traitement d'images de TEM

Les suspensions de particules sont déposées sur des grilles de carbone et observées au microscope électronique à transmission. Le polymère se condense à la surface des billes lors de la déposition et de l'observation sous vide et ne se trouve plus dans le même état que dans la solution. On ne peut donc pas déterminer son épaisseur par cette méthode. C'est pourquoi l'analyse d'image effectuée sur les photos ne tiendra compte que de la partie centrale sombre correspondant au cœur dur de la bille (fig. 1.12).

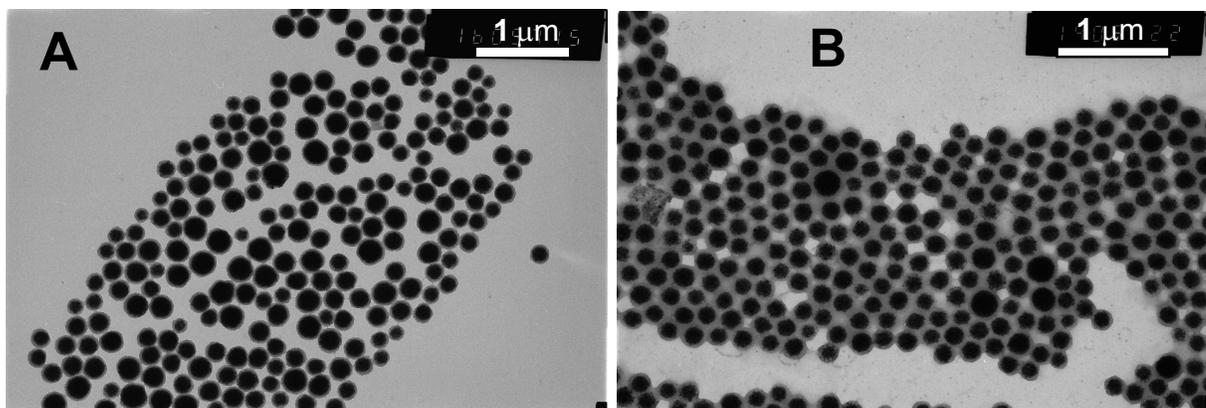


FIG. 1.12 – Clichés de microscopie électronique à transmission utilisés pour l'analyse d'image. A : Suspension de billes brutes. B : Suspension de billes triées.

La statistique est effectuée sur un millier de particules environ, avant et après tri. Les distri-

butions de taille de cœur dur sont représentées sur la figure 1.13.

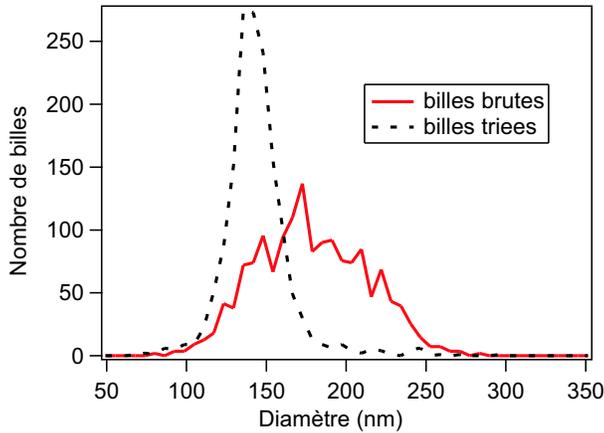


FIG. 1.13 – Distribution de taille des billes brutes et des billes triées effectuée par analyse d’image à partir de clichés de TEM. Seul le cœur dur est mesuré.

Le rayon moyen calculé pour le cœur dur est de 91 nm pour les billes brutes et de 74 nm pour les billes triées.

### Application du champ magnétique, billes au contact

Le but de cette expérience est d’appliquer un champ magnétique suffisamment fort pour rapprocher les billes au contact. Les particules présentent des fonctions COOH à leur surface, elles sont donc stabilisées stériquement et électrostatiquement. Afin de pouvoir rapprocher les billes au contact, on doit diminuer ces répulsions. Les particules sont donc dispersées dans une solution à pH 2 contenant 10 mM d’acide chlorhydrique afin de diminuer leur charge.

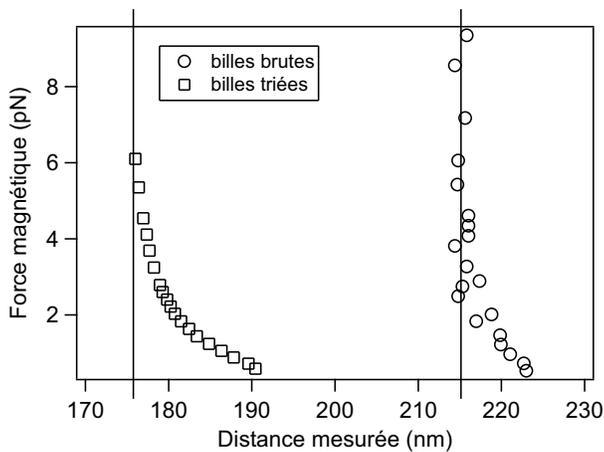


FIG. 1.14 – Profils force-distance pour les suspensions de billes brutes et de billes triées à 0,1 % dans HCl 10 mM. Les lignes verticales correspondent à la distance de contact.

Dans le cas des billes brutes (fig. 1.14) on observe un profil de force de type ”sphères dures”, les billes sont au contact dès que le champ magnétique appliqué est suffisant ( $\sim 23$  mT). Pour les billes triées, par contre, le champ magnétique appliqué n’est pas suffisant ( $\leq 80$  mT) pour pouvoir

pousser les billes au contact. Celles-ci étant plus petites, elles sont moins magnétisables. On voit cependant que l'on est proche de ce contact puisque la pente augmente rapidement lorsque la distance diminue. On prendra donc, comme distance de contact, la valeur de 176 nm. On obtient alors des rayons de contact de 108 nm pour les billes brutes et de 88 nm pour les billes triées. Les deux mesures effectuées ici sur les billes brutes et les billes triées sont en accord, puisque dans les deux cas, la couche de polymère réticulé est d'environ 15 nm d'épaisseur.

### Diffusion dynamique de la lumière

Une mesure de diffusion dynamique de la lumière a été effectuée sur les billes avant et après tri, afin de déterminer leur rayon hydrodynamique moyen (spectromètre multi-angle Malvern CGS-3). Une suspension de particules à  $10^{-4}$  % en masse dans l'eau est éclairée par un laser. La lumière diffusée par les particules est mesurée à différents angles  $\theta$  par rapport au rayon incident. Pour chaque angle, on calcule la fonction de corrélation

$$g_2(t') = \frac{\langle I(t)I(t+t') \rangle_t}{\langle I(t) \rangle_t^2} \quad (1.14)$$

Elle décroît de façon monoexponentielle :

$$g_2(t) \propto e^{-Dq^2t} \quad (1.15)$$

où  $q$  est le vecteur d'onde du faisceau diffusé et dépend de l'angle  $\theta$ .

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (1.16)$$

$n = 1,33$  est l'indice de réfraction du milieu et  $\lambda = 632,8$  nm est la longueur d'onde du laser. Nous en déduisons alors le coefficient de diffusion  $D$  des particules.

D'après Stokes-Einstein, le rayon hydrodynamique des particules peut s'écrire :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1.17)$$

avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température en Kelvin et  $\eta$  la viscosité du milieu.

On trouve un rayon hydrodynamique moyen de 125 nm pour les billes non triées et de 110 nm pour les particules après le tri. Ce rayon hydrodynamique tient compte de la couche réticulée de polymère et des cheveux de polymère qui s'étendent plus loin dans la solution.

### Récapitulation

On peut à présent récapituler les différents rayons mesurés et décrire les billes plus précisément :

Rayon	Billes brutes	Billes triées
$r_1$	91 nm	74 nm
$r_2$	108 nm	88 nm
$r_3$	125 nm	110 nm

## 1.3 Greffage de la streptavidine

Le greffage de la streptavidine est réalisé sur des billes magnétiques par couplage peptidique entre les fonctions COOH des billes et les fonctions NH<sub>2</sub> de la streptavidine. La principale contrainte est que les billes doivent rester stables au cours du greffage afin d'obtenir une couche de protéines uniforme à la surface des billes. De plus, après le greffage, elles doivent pouvoir être stockées plusieurs mois au réfrigérateur sans perdre leur activité biologique, ni se déstabiliser.

### 1.3.1 Produits

#### Billes magnétiques

Les billes magnétiques utilisées pour toute l'étude du greffage et son optimisation sont les billes non triées. Leur rayon est de 108 nm (c'est le rayon comprenant la couche dense de polymère, à la surface de laquelle sont greffées les streptavidines). Le nombre de fonction COOH de ces billes est donné par le fournisseur, il est de 515 nmol/mg de billes. Leur densité est de 1,76 g/cm<sup>3</sup>.

#### Streptavidine

La streptavidine est fournie par Sigma sous forme lyophilisée (streptavidin from *Streptomyces avidinii*, S4762). La streptavidine a une masse moléculaire de 60000 Da[5, 6]. C'est une protéine formée de quatre sous-unités pouvant chacune se lier à une biotine par des interactions non covalentes fortes, la constante de dissociation étant de 10<sup>-15</sup> M. D'autre part, son point isoélectrique se situe entre 5 et 6.

La streptavidine est solubilisée à la concentration de 4 g/L dans un tampon phosphate 10 mM à pH 7,2 contenant du tween à 0,2 % ou du Symperonic F127 à 0,5 %. La solution ainsi préparée est ensuite aliquotée par quantités de 105 µl et conservée au congélateur.

#### Agents de couplage

Les agents de couplage utilisés pour la réaction sont l'EDC (N'-*(3-diméthylaminopropyl)*-N-éthylcarbodiimide hydrochloride, Aldrich) et la NHSS (sel de sodium de la N-hydroxysulfosuccinimide, Fluka). Les agents de couplage sont nécessaires pour activer la réaction[7, 8].

#### Tampons

Les tampons suivants sont préparés :

- Tampon 1 : Tampon MES 20 mM, pH 5,5 + NaN<sub>3</sub> 0,02 % + Symperonic F127 0,5 %
- Tampon 2 : Tampon phosphate 10 mM, pH 7,2 + NaN<sub>3</sub> 0,02 % + Symperonic F127 0,5 %
- Tampon 3 : Tampon phosphate 10 mM, pH 7,2 + NaN<sub>3</sub> 0,02 % + Symperonic F127 0,5 % + glycine (15 g/L)

## 1.3.2 Schéma réactionnel

La réaction se fait en deux étapes (fig. 1.15) : d'abord l'activation des fonctions COOH par les agents de couplage puis l'attaque sur l'ester intermédiaire des fonctions NH<sub>2</sub> de la streptavidine. Entre ces deux étapes, les billes sont lavées afin d'enlever l'excès d'EDC et ainsi éviter des réactions intra- ou inter-moléculaires de la streptavidine, celle-ci possédant aussi des fonctions COOH pouvant réagir avec ses propres fonctions NH<sub>2</sub>.

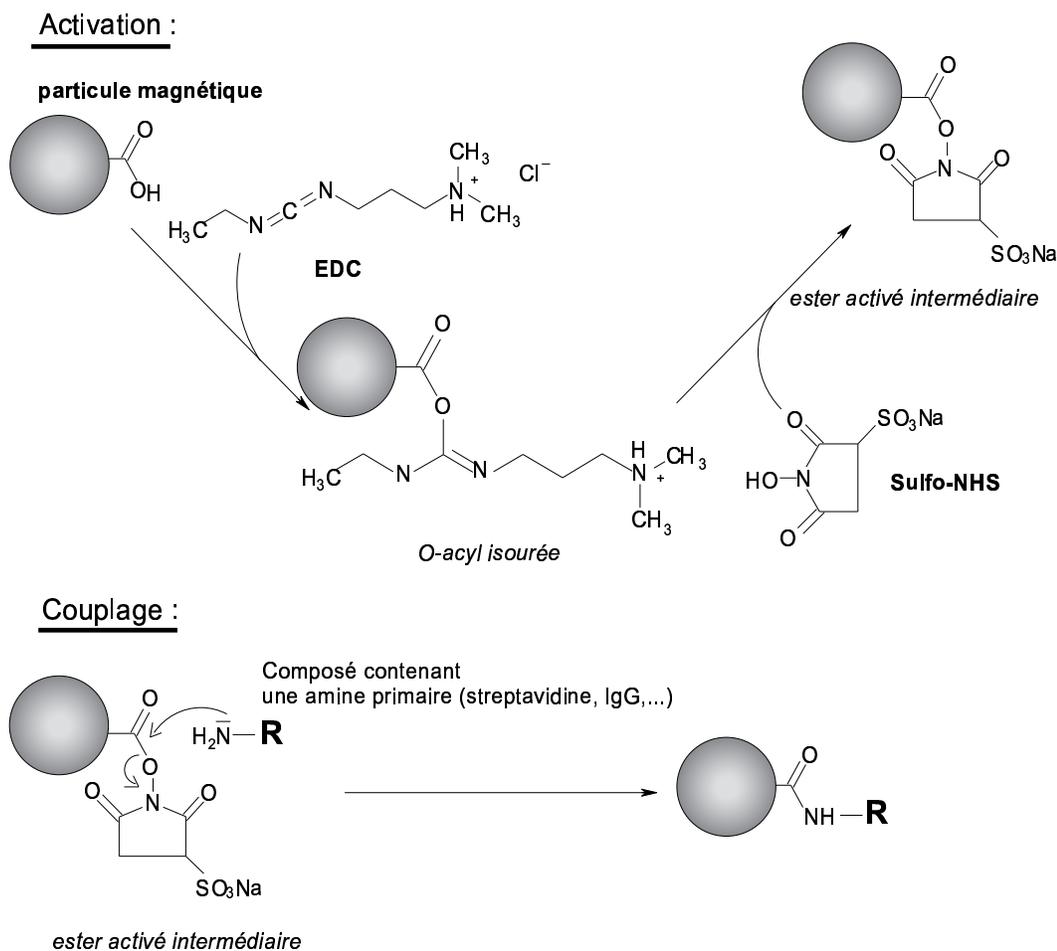


FIG. 1.15 – Schéma réactionnel du greffage de la streptavidine à la surface des billes

Le rôle de l'EDC est d'activer le groupement acide vis-à-vis de l'attaque nucléophile de l'amine, formant ainsi une *O*-acyl isourée qui a une réactivité analogue à celle des anhydrides. Elle peut donc aussi être attaquée facilement par l'eau. C'est pourquoi on fait réagir ensuite la NHSS, qui forme un intermédiaire réactionnel plus stable, permettant ainsi le lavage des billes (pour enlever l'excès de réactifs) avant l'ajout de la streptavidine.

L'amine primaire réagit plus facilement sur l'intermédiaire réactionnel à pH basique, alors qu'elle possède un doublet d'électrons libres, mais un tel pH augmente aussi la vitesse d'hydrolyse de l'ester activé. D'autre part, il faut également veiller à ne pas dénaturer la streptavidine et à se rapprocher le plus possible de son point isoélectrique afin de favoriser son adsorption sur des billes qui sont déjà chargées. Il faut donc trouver un compromis. Nous avons choisi de faire la première partie de la réaction (activation) à pH 5,5 dans un tampon MES et la deuxième partie de la réaction (couplage) à pH 7,2 dans un tampon phosphate. De plus pour garder les billes stables, la force ionique ne doit pas être trop élevée (stabilisation électrostatique des billes) et un tensioactif non ionique est ajouté (stabilisation stérique).

### 1.3.3 Protocole de départ

1. 50  $\mu\text{l}$  de suspension de billes à 2 % de solide dans le tampon 1 sont préparés. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec la même quantité de tampon 1.
2. Une solution contenant 0,060 g d'EDC et 0,010 g de NHSS dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon 1 est préparée au dernier moment pour éviter l'hydrolyse des réactifs.
3. 50  $\mu\text{l}$  de la solution d'EDC (300 mol / mol COOH) et de NHSS sont ensuite ajoutés aux 50  $\mu\text{l}$  de suspension de billes. La réaction d'activation a lieu à 44°C (bain thermostaté) pendant 20 min.
4. Les billes sont lavées deux fois dans le tampon 2 puis redispersées dans 50  $\mu\text{l}$  de tampon 2.
5. Un aliquot de solution de streptavidine à 4 g/L dans le tampon 2 est décongelé et 50  $\mu\text{l}$  de la solution sont ajoutés aux 50  $\mu\text{l}$  de suspension de billes (6,5 mol / mol COOH). La réaction de couplage a lieu à 44°C pendant 30 min.
6. Les billes sont lavées trois fois avec 100  $\mu\text{l}$  de tampon 3. La glycine permet de saturer les esters activés qui n'auraient pas réagi et de terminer la réaction.

### 1.3.4 Méthode de caractérisation des billes greffées

Pour chaque expérience, un témoin est réalisé en parallèle pour lequel on remplacera la solution des agents de couplage par le même volume de tampon 1. Cela nous permet de vérifier que la streptavidine n'est pas seulement adsorbée physiquement à la surface des billes mais effectivement liée de façon covalente.

Entre les différentes étapes de greffage, les billes sont observées au microscope pour vérifier qu'il n'y a pas trop d'agrégation. Ensuite des tests de stabilité et de réactivité sont effectués ainsi qu'une estimation de la quantité de streptavidine greffée par formation de chaînes avec une protéine biotinylée, l'albumine de sérum bovin (BSA, 7 biotines/BSA). Enfin, la quantité de sites actifs pouvant lier la biotine sera mesurée par fluorimétrie.

### Etudes de stabilité et de réactivité des billes greffés

1. Les billes sont diluées à 0,04 %v/v dans le tampon 2

2. Afin de tester la stabilité des billes sous champ, 1  $\mu\text{l}$  de suspension de billes est mélangé à 1  $\mu\text{l}$  de tampon 2 sur une plaque de verre. Un capillaire à section carrée (50  $\mu\text{m}$ ) est ensuite rempli et scellé aux deux extrémités à la cire. On laisse incuber pendant dix minutes puis le capillaire est placé dix minutes sous un champ magnétique perpendiculaire de 20 mT. Le capillaire est alors observé au microscope. Les billes sont considérées comme stables si elles se sont entièrement redispersées sans qu'il ne reste de chaînes permanentes (fig. 1.16)

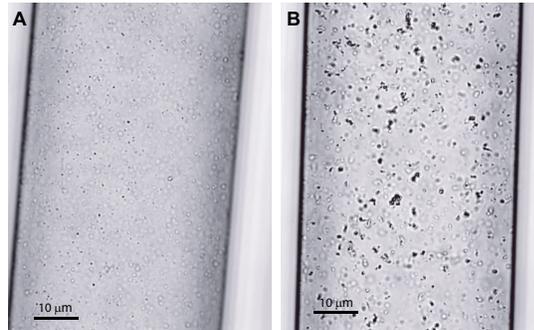


FIG. 1.16 – Clichés de microscopie optique des billes après greffage. A : Suspension de billes stables. B : Suspension de billes instables. Clichés C. Rouzeau.

3. La réactivité des billes est testée en mélangeant 1  $\mu\text{l}$  de suspension de billes avec des solutions de concentrations de BSA biotinylée comprises entre  $5 \cdot 10^{-7}$  et  $5 \cdot 10^{-10}$  M. Un capillaire est rempli, scellé et après 10 min d'incubation, placé sous champ pendant 10 min à 20 mT. Puis l'observation au microscope permet de voir si des chaînes permanentes se sont formées. On peut alors estimer la quantité de streptavidine greffée sur les billes. Les chaînes permanentes ne se forment que dans une fenêtre de concentration en antigène restreinte proche de la moitié de la concentration en sites actifs (fig. 1.17). Ce test permet également de vérifier que la streptavidine est liée de façon covalente. Dans ce cas, le témoin ne contient pas de chaînes permanentes alors que l'échantillon greffé en contient.

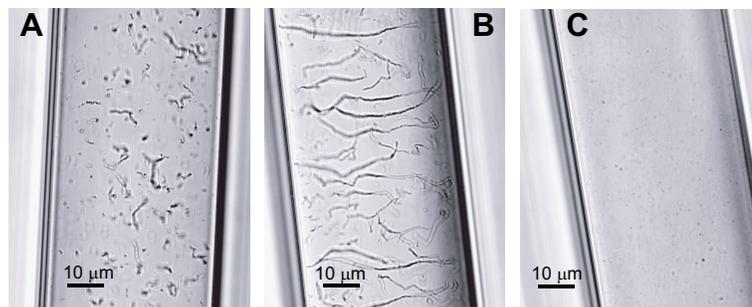


FIG. 1.17 – Tests de la réactivité des billes greffées à la BSA biotinylée. A :  $[\text{BSAb}] = 5 \cdot 10^{-8}$  M, B :  $[\text{BSAb}] = 5 \cdot 10^{-9}$  M, C :  $[\text{BSAb}] = 5 \cdot 10^{-10}$  M.

4. Enfin, on vérifie que ce n'est pas simplement la présence de BSA qui suffit à déstabiliser les billes et à former des chaînes permanentes de façon non spécifique, en réalisant le même test avec de la BSA non biotinylée.

### Dosage fluorimétrique

Un dosage du nombre de sites réactifs vis-à-vis de la biotine est effectué en utilisant de la biotine-FITC (BF). Il s'agit d'un dosage en retour puisque l'on ne peut mesurer la fluorescence pour une suspension de billes, celles-ci diffusant trop la lumière. On mesure donc la fluorescence du surnageant après couplage de la BF et on calcule la différence avec la solution initiale. La concentration de la solution de BF que l'on met au contact des billes doit être suffisamment importante pour saturer tous les sites mais pas trop pour que l'on ne soit pas dans le bruit lorsque l'on calcule la différence, l'idéal étant que la suspension de billes absorbe entre 10 et 60 % de la BF initiale. Le protocole exact est en annexe (annexe C).

Une molécule de streptavidine contient quatre sites actifs mais lorsque celle-ci est liée à une bille, certains sites peuvent être inaccessibles. Ce que l'on mesure lors du dosage est le nombre de biotines pouvant se lier à ces sites restés libres. On mesure donc un nombre de sites actifs par mg de billes.

#### 1.3.5 Optimisation du greffage

Nous avons fait varier les conditions expérimentales afin d'optimiser la réaction de greffage pour obtenir des billes stables avec une quantité de streptavidine connue.

Le protocole de départ, appliqué tel qu'il est donné plus haut, permet d'obtenir des billes ayant une quantité de sites actifs d'environ 60 pmol/mg (180 sites/bille). Des expériences préliminaires ont montré que la quantité de streptavidine greffée ne doit pas être trop importante pour ne pas déstabiliser les billes. Des billes ayant 89 pmol sites actifs/mg de billes étaient stables alors que des billes ayant 430 pmol sites actifs/mg (1290 sites/bille soit 75 nm<sup>2</sup>/site) de billes étaient particulièrement instables.

D'autre part, on peut calculer la quantité de streptavidine qu'il faut pour avoir une monocouche de protéines à la surface des billes. On utilise la formule suivante :

$$S = \frac{6}{\rho * D} * C$$

où  $\rho$  est la masse volumique des billes, pour les billes utilisées, elle est donnée par le fournisseur à 1,76 g/cm<sup>3</sup>,  $D$  leur diamètre, ici 216 nm, et  $C$ , la capacité d'absorption d'une protéine donnée sur une surface. Celle-ci a été estimée à 3 mg/m<sup>2</sup> pour la BSA de masse 65000 Da sur une surface de polystyrène par Cantarero *et al.*[9]. La streptavidine ayant une masse de 60000 Da, proche de la BSA, on utilisera cette valeur pour calculer approximativement la quantité de streptavidine nécessaire pour former une monocouche à la surface des billes. On obtient ainsi une monocouche contenant environ 790 pmol de streptavidine par mg de billes soit 2390 sites/bille. Puisque l'on

peut avoir plusieurs sites actifs par molécule de streptavidine, on est assez loin de remplir toute la surface des billes même avec 430 pmol sites actifs/mg de billes (1290 sites/bille).

### **Influence du tensioactif**

Afin de tester l'influence du tensioactif, on réalise trois expériences, l'une avec du Tween 20 à 0,2 % dans tous les tampons, la deuxième avec du Symperonic F127 à 0,5 % et la dernière sans tensioactifs. Il n'y a pas de différences de stabilité entre les billes greffées en présence de Symperonic et celles greffées en présence de Tween 20. Par contre la suspension des billes greffées sans tensioactif est un peu moins stable. Lors de la première étape à pH 5,5, les billes ont tendance à coller aux parois des microtubes utilisés. De plus, la différence en quantité de streptavidine greffée n'est pas significative :

- Symperonic : 63 pmol/mg
- Tween : 60 pmol/mg
- sans tensioactif : 67 pmol/mg

On note néanmoins que la quantité de streptavidine adsorbée de manière non spécifique sur les billes sans tensioactif est légèrement plus importante (témoin).

Pour la suite des expériences, nous avons ajouté du Symperonic F127 à tous les tampons de greffage.

### **Influence de la quantité de streptavidine et d'agents de couplage**

Nous avons étudié l'influence des quantités de streptavidine et d'agents de couplage utilisées dans le protocole de départ. Lorsque l'on fait varier les quantités d'agents de couplage, on conserve le même rapport EDC/NHSS. Les expériences effectuées (fig. 1.18) montrent que la quantité de streptavidine greffée varie de façon linéaire avec la quantité de streptavidine ajoutée. On remarque cependant que, pour une quantité de streptavidine utilisée de l'ordre de 3300 nmol/mg billes (6,5 molécules de streptavidine par fonction COOH), la quantité finalement greffée n'est que de 63 pmol sites actifs/mg billes. Le rendement de la réaction n'est donc pas très bon. Cependant tous les groupements COOH ne sont sans doute pas accessibles à la streptavidine, un certain nombre étant situé à l'intérieur de la couche dense de polymère.

De même dans le protocole de départ on utilise 157  $\mu$ mol d'EDC par mg de billes donc un large excès ( $\sim 300$  fois pour l'EDC et 50 fois pour la NHSS). Dès que l'on divise ces quantités par dix ou par cent, la quantité de streptavidine greffée diminue fortement.

On remarque dans tous les cas que la quantité de streptavidine greffée est bien inférieure à une monocouche alors qu'il y a une quantité largement supérieure de protéine en solution. Peut-être est-ce l'adsorption qui limite le greffage. En effet, la protéine, chargée négativement (pH > pI), doit d'abord s'adsorber à la surface des billes pour pouvoir ensuite réagir chimiquement avec les fonctions COOH de la surface, elle aussi chargée négativement. Il faudrait alors augmenter la

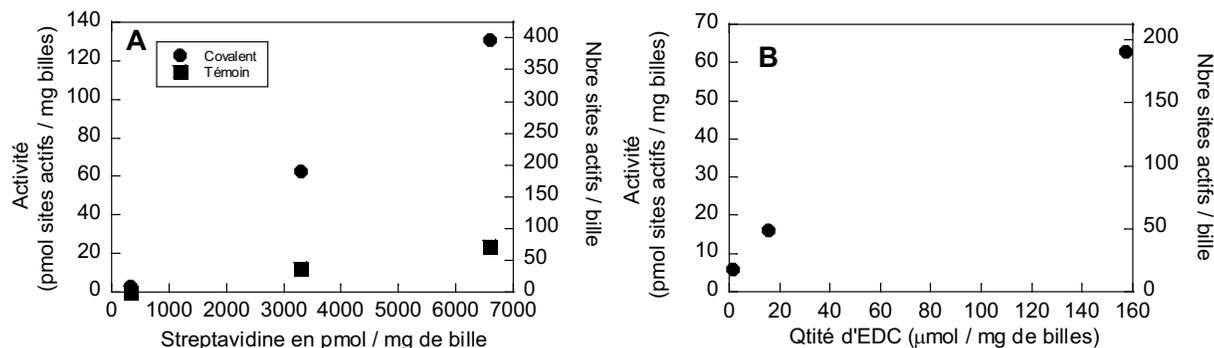


FIG. 1.18 – Variation de l'activité des billes en fonction de la quantité de streptavidine (avec EDC=157  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  billes) et en fonction de la quantité d'agents de couplages (avec streptavidine=3330 nmol/mg billes)

force ionique afin d'écranter les interactions électrostatiques, ce qui est délicat puisque cela risque également de déstabiliser les billes.

Enfin pour ces expériences nous remarquons que les échantillons de billes greffées sont stables mais lorsque la quantité de streptavidine est plus importante (6660 nmol/mg), on observe quelques agrégats dans la suspension de billes après greffage. D'autre part, on note également que la quantité de streptavidine adsorbée de façon non spécifique (témoins) dépend de la quantité de streptavidine en solution et suit la même variation que la quantité de streptavidine greffée.

### Influence de la force ionique

Afin d'augmenter au maximum la quantité de streptavidine qui s'adsorbe sur les billes et donc les possibilités de réaction entre les COOH à la surface des billes et la streptavidine, on augmente la force ionique de la solution en ajoutant du chlorure de sodium aux tampons de greffage.

Force ionique (mM)	Nombre de sites actifs (pmol / mg de billes)
20	63 (T=12)
70	94 (T=12)
120	79 (T=14)
520	64 (T=12)

TAB. 1.1 – Evolution du nombre de sites actifs en fonction de la force ionique du milieu réactionnel

Les résultats (tableau 1.1) montrent qu'augmenter la force ionique semble aider la réaction mais pour une force ionique trop importante, l'effet s'annule.

Cependant l'effet de la force ionique reste faible et la quantité de streptavidine greffée reste

toujours très inférieure à une monocouche de protéine à la surface des billes. De plus pour une force ionique de 520 mM, les billes sont fortement déstabilisées.

### Influence de la température et du temps de réaction

Dans un premier temps, nous avons appliqué le protocole de départ, avec les mêmes quantités de réactifs. La réaction d'activation a été faite à 44°C pendant 20 minutes dans tous les cas. Nous avons fait varier les conditions de la réaction de couplage à 44°C et à température ambiante pour des temps allant de 30 minutes à 24 heures.

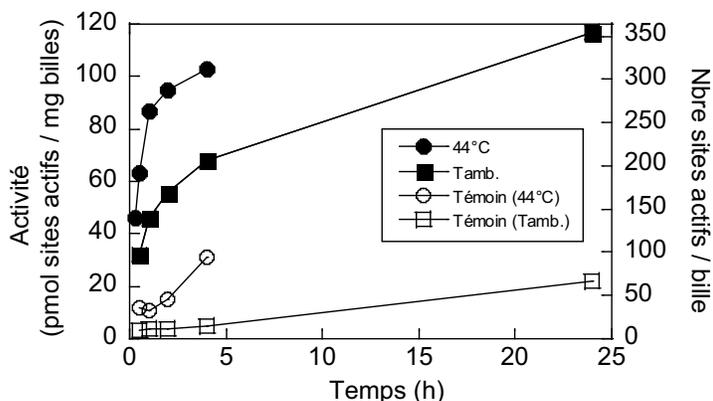


FIG. 1.19 – Activité des billes (en pmol sites actifs / mg billes) en fonction de la température et du temps de couplage

Les expériences (fig. 1.19) montrent que l'on peut augmenter la quantité de streptavidine greffée en augmentant le temps de la réaction de couplage, que ce soit à 44°C ou à température ambiante. Cependant, on remarquera qu'une température plus élevée augmente également l'adsorption non spécifique de la streptavidine (témoins).

Dans un deuxième temps, nous avons fait varier le temps de la réaction d'activation de 30 minutes à 2 heures à température ambiante, tout en gardant un temps de réaction de couplage de 4 heures à température ambiante afin de pouvoir faire tout le greffage à température ambiante (tableau 1.2). En effet, diminuer la température de la réaction d'activation pourrait permettre de ralentir l'hydrolyse de l'ester activé intermédiaire.

Le temps de la réaction d'activation à température ambiante n'a pas beaucoup d'effets sur la quantité de streptavidine greffée, ce qui peut faire penser que la formation de l'ester activé intermédiaire est plutôt rapide et que celui-ci est assez stable à température ambiante pour ne pas être attaqué trop rapidement par les molécules d'eau présentes dans le milieu réactionnel. Ce taux de greffage n'est pas très différent de celui obtenu à 44°C pour un temps d'activation de 30 minutes.

Temps de la réaction d'activation (heures)	Température	Nombre de sites actifs (pmol / mg de billes)
0,5	$T_{amb.}$	52 (T=15)
1	$T_{amb.}$	56 (T=17)
2	$T_{amb.}$	63 (T=16)
0,5	44 °C	68 (T=6)

TAB. 1.2 – Evolution du nombre de sites actifs en fonction de la durée et de la température de la réaction d'activation

### 1.3.6 Stabilité à long terme

Après une vingtaine de jours, les échantillons restent stables. Des tests de stabilité ont également été réalisés environ 5 mois après le greffage. Ces tests ont montré la présence de quelques agrégats dans la suspension. De plus, après application d'un champ magnétique de 20 mT pendant 10 min, de petits bouts de chaînes non réversibles apparaissent dans la solution. Par contre, une mesure de leur activité montre que celle-ci n'a pratiquement pas diminué puisque l'on passe de 63 à 57 pmol sites actifs / mg billes. Les billes ont donc vieilli et sont moins stables après 5 mois puisque l'on observe du collage non spécifique dans le tampon mais leur activité reste constante.

### 1.3.7 Conclusion

Les billes obtenues sont stables dans tous les cas pendant plusieurs jours, mais elles semblent vieillir et ne sont plus aussi stables après 5 mois.

La quantité de streptavidine que l'on peut greffer à la surface varie entre 3 et 130 pmol sites actifs / mg billes. Les conditions étudiées ne permettent pas d'augmenter la quantité de streptavidine greffée et on est loin d'avoir une monocouche de streptavidine à la surface des billes. Cependant cette quantité est suffisante pour nos applications et des études préliminaires avaient montré que la quantité de streptavidine ne devait pas être trop importante si l'on ne voulait pas déstabiliser les billes. D'ailleurs pour les billes les plus greffées, quelques agrégats se sont formés pendant le greffage. Un calcul rapide pour 70 pmol sites actifs / mg billes nous donne une surface de 460 nm<sup>2</sup>/sites actifs soit environ 211 sites actifs par bille.

Une fois la technique de greffage contrôlée, on réalise un greffage sur les billes triées suivant le protocole en annexe (annexe D). L'activité des billes (mesurée en fluorescence) est de 61 pmol/mg billes, ce qui correspond à 185 sites actifs par billes (526 nm<sup>2</sup>/site soit 23 nm entre chaque streptavidine environ). On a choisi une activité intermédiaire afin d'avoir des billes très stables. Ces billes seront utilisées pour la suite de l'étude.

## 1.4 Préparation des ADN

Les ADN dibiotinylés sont préparés par amplification d'un ADN du bactériophage  $\lambda$  dont la séquence est connue (Réaction de Polymérisation en Chaîne, PCR). Cette technique permet d'amplifier sélectivement n'importe quelle séquence d'ADN dont les extrémités sont connues grâce à des cycles de réplication répétés (Annexe E). Des amorces, petits oligonucléotides d'une vingtaine de bases, sont choisies complémentaires à chaque extrémité de la séquence que l'on veut copier, l'une sur chaque brin. La réplication de l'ADN est réalisée à l'aide d'une enzyme, la *Taq*-polymérase. Elle se fait sur chacun des brins dans le sens 5' vers 3' à partir de l'amorce. Chaque cycle comprend trois étapes à des températures différentes : la séparation des deux brins de l'ADN à copier, l'hybridation des amorces sur les brins et la synthèse de l'ADN à partir des amorces. Nous avons choisi les amorces sur l'ADN  $\lambda$ , en fonction de la taille désirée (les séquences des amorces se situent en annexe, Annexe E). Les longueurs des différents ADN préparés sont présentées dans le tableau 1.3.

Nombre de paire de base	Longueur (en nm)	Longueur / longueur de persistance
76	26	0,5
109	37	0,75
151	51	1
315	107	2
438	149	3
757	257	5
944	321	6,4
1257	427	8,5
2347	798	16
4721	1605	32

TAB. 1.3 – Longueur des ADN préparés en fonction du nombre de paire de bases

De plus on utilise des amorces portant une biotine à l'extrémité 5'. Les ADN synthétisés par PCR ont donc une biotine à chaque extrémité 5' (fig. 1.20).

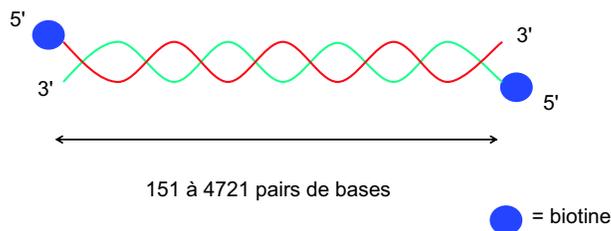


FIG. 1.20 – Schéma de l'ADN dibiotine utilisé comme lien dans la formation des chaînes permanentes.

Les ADN obtenus sont ensuite purifiés (afin d'éliminer les amorces, l'enzyme et les nucléotides

n'ayant pas réagi). Une électrophorèse sur gel permet de vérifier que l'échantillon est suffisamment pur et que l'on obtient les ADN attendus. La PCR se fait sur de petites quantités d'ADN. On obtient environ  $50 \mu\text{L}$  à  $10^{-6}$  M pour deux tubes de PCR. La solution d'ADN est ensuite dosée par fluorescence en utilisant du picogreen (Molecular Probes). Le protocole complet est en annexe (Annexe E).

## 1.5 Adsorption de l'ADN sur les billes

### 1.5.1 Cinétique d'adsorption de l'ADN sur les billes

Afin de déterminer la quantité d'ADN réellement présente sur les billes, en fonction de la concentration en ADN dans la solution ainsi que le temps d'incubation à attendre pour permettre l'adsorption de l'ADN sur les billes on mesure la cinétique d'adsorption de l'ADN biotinylé sur les billes. Pour cela, on procède de la façon suivante :

- $5 \mu\text{L}$  de billes streptavidine à 0,15 % dans un tampon phosphate à pH 7,1 sont mélangés à  $5 \mu\text{L}$  de solution d'ADN de concentration connue.
- Au bout d'un temps d'incubation variable, les billes sont séparées de la solution à l'aide d'un aimant et le surnageant est conservé.
- Les surnageants sont dosés par fluorescence avec le picogreen afin de déterminer la quantité d'ADN restant en solution (Annexe E).

Ces mesures sont effectuées avec de l'ADN 151 pb à différentes concentrations dans un tampon phosphate 10 mM puis à différentes forces ioniques pour de l'ADN à  $5 \cdot 10^{-9}$  M (fig. 1.21).

Ces expériences nous donnent plusieurs indications. Tout d'abord, le nombre de sites accessibles aux ADN 151 pb est de 135 ADN par bille, alors qu'il y avait 185 sites accessibles aux biotines libres par bille. La présence de l'ADN, beaucoup plus gros que la biotine, induit de la gêne stérique. Certains sites actifs sont alors inaccessibles.

Ensuite, pour des concentrations en ADN faibles, l'adsorption sur les billes est totale et rapide. Dans un tampon phosphate de 10 mM, un temps d'incubation de 10 minutes sera suffisant pour adsorber toutes les molécules d'ADN sur les billes. Enfin, lorsque la force ionique diminue, l'adsorption de l'ADN est ralentie. L'ADN et les billes sont tous deux chargés négativement, ils ont donc tendance à se repousser lorsque les charges ne sont pas suffisamment écrantées. Il faudra adapter le temps d'incubation en conséquence.

La quantité d'ADN présente sur les billes peut donc être connue exactement. La concentration d'ADN sera mesurée pour chaque nouvelle solution préparée. D'autre part, une mesure d'absorbance est effectuée à 350 nm à l'aide d'un spectromètre pour connaître la quantité exacte de billes à chaque fois que l'on prépare un nouvel échantillon dans toutes les expériences réalisées par la suite (chap. 1.2.4). Ceci nous permet donc de connaître très précisément les quantités d'ADN adsorbés sur les billes pour chaque expérience.

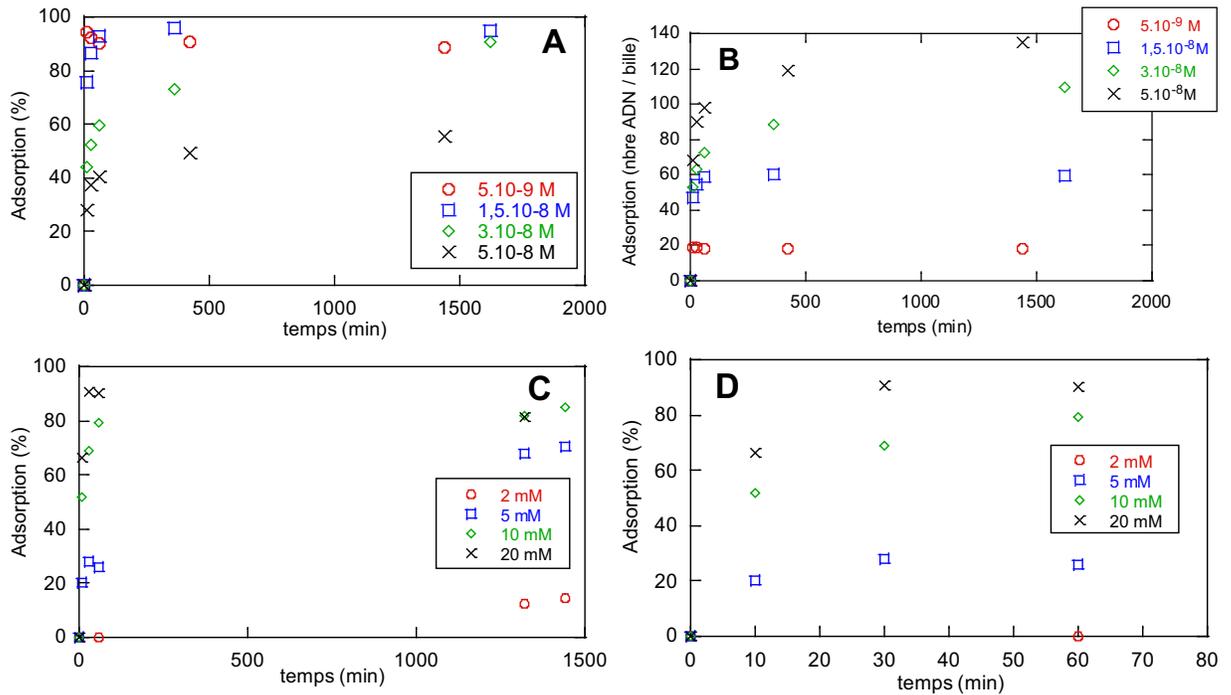


FIG. 1.21 – Cinétique d'adsorption de l'ADN de 151 pb biotinylé sur les billes à 0,08 % en poids. Les expériences sont toutes effectuées dans un tampon phosphate pH 7,1 dont la concentration varie en fonction de la force ionique, en présence de F127 à 0,5 %. A : Pourcentage d'ADN adsorbé sur les billes pour différentes concentrations en ADN (force ionique 20 mM) ; B : Nombre de molécules d'ADN adsorbées sur les billes pour différentes concentrations en ADN (force ionique 20 mM) ; C : Pourcentage d'ADN adsorbé pour différentes forces ioniques et pour une concentration en ADN de 5.10<sup>-9</sup> M ; D : Graphe C aux temps courts.

## 1.6 Formation de chaînes permanentes

Nous montrons ici, qu'il est possible d'assembler les billes et les ADN pour former des chaînes magnétiques permanentes par réaction spécifique biotine-streptavidine. On étudiera par la suite plus en détail la cinétique de formation de ce lien spécifique et les propriétés mécaniques des chaînes ainsi formées.

Nous avons tout d'abord vérifié que le pontage des billes était bien dû à la liaison spécifique streptavidine-biotine.

Pour cela, nous avons répété les expériences de formation de chaînes permanentes en l'absence d'ADN. On s'aperçoit que dans certains cas, les billes ne se redispersent pas complètement à l'arrêt du champ magnétique. Mais le problème est résolu par l'addition d'un tensioactif non-ionique à la suspension de bille. Nous avons utilisé le Symperonic F127 à 0,5 % et il sera toujours présent pour la suite des études.

Puis, nous avons également vérifié qu'un ADN non biotinylé ne pouvait pas accrocher les billes entre elles. En effet, il a été montré que des polymères [10, 11] ou des protéines pouvaient également

ponter les billes de façon non spécifique.

Le protocole de formation de chaînes permanentes en présence de l'ADN est simple. Il suffit de mélanger une solution de billes et une solution d'ADN, d'attendre suffisamment longtemps pour permettre l'adsorption de l'ADN sur les billes (chap. 1.5) et de placer l'échantillon sous champ magnétique pendant 5 ou 10 min. Le pontage s'effectue uniquement lorsque les billes sont alignées car le champ magnétique permet de les rapprocher suffisamment. Par contre, en l'absence de champ magnétique, la répulsion entre les billes est trop importante.

La formation des chaînes permanentes dépend de la force ionique, de la concentration en ADN, de la taille de l'ADN et du champ appliqué.

La concentration en ADN doit être suffisamment importante pour qu'il y ait au moins une molécule entre chaque bille (sachant que certaines molécules adsorbées sur les billes ne sont pas actives car elles ne sont pas en regard avec la bille voisine). D'autre part, elle ne doit pas être trop importante, pour ne pas saturer toutes les surfaces, ne laissant ainsi aucun site libre pour une liaison sous champ.

Le champ appliqué doit être suffisant pour former de longues lignes de billes. Il dépend de la taille des billes et de leur aimantation. Pour les billes utilisés, il devra être supérieur à 20 mT.

L'influence de la force ionique et celle de la longueur de l'ADN sont discutées ici plus en détails.

### 1.6.1 Influence de la force ionique

Nous avons vu qu'une faible force ionique diminuait l'adsorption de l'ADN sur les billes. En effet, l'ADN et les billes sont tous deux chargés négativement, ils ont donc tendance à se repousser. Des essais de formation de chaînes magnétiques ont été effectués à différentes forces ioniques. La force ionique est fixée par la concentration du tampon. Les essais sont effectués à 30 mT pendant 10 min pour une concentration en billes de 0,1 % avec une concentration d'ADN 151 pb de  $2,5 \cdot 10^{-8}$  M ce qui équivaut à 75 ADN/billes environ.

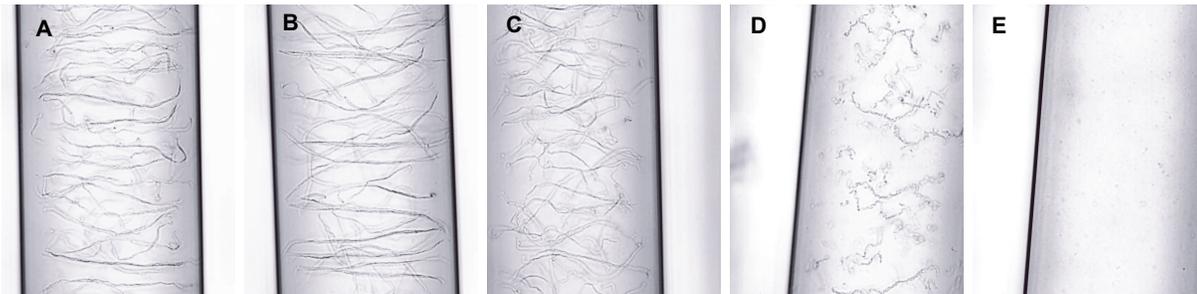


FIG. 1.22 – Chaînes de billes 0,1 % + ADN  $5 \cdot 10^{-8}$  M dans tampon phosphate + F127 en fonction de la force ionique après 10 min à 30 mT. A : Force ionique 20 mM, B : Force ionique 10 mM, C : Force ionique 5 mM, D : Force ionique 2 mM, E : Force ionique 1 mM

De longues chaînes sont observées pour des forces ioniques supérieures à 5 mM puis de plus

courtes à 2 mM et pratiquement rien à 1 mM (fig. 1.22). Il faut donc se placer à une force ionique égale ou supérieure à 2 mM pour former de longues chaînes permanentes.

### 1.6.2 Influence de la longueur de l'ADN

L'influence de la longueur de l'ADN sur la formation des chaînes permanentes a été étudiée. Les expériences sont effectuées dans les conditions suivantes :

- Concentration en billes : 0,1 % en masse.
- Concentration en ADN :  $3 \cdot 10^{-8}$  M.
- Tampon : phosphate 10 mM + Symperonic 0,5 %.
- Temps d'incubation : 10 min.
- Champ magnétique : 30 mT pendant 10 min.

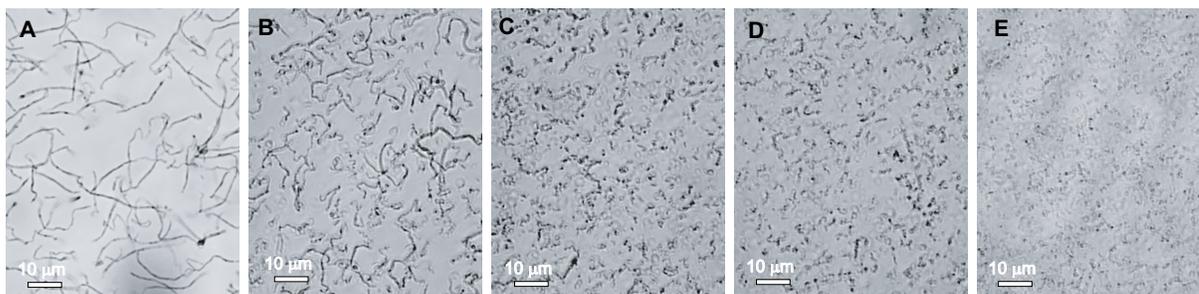


FIG. 1.23 – Chaînes de billes 0,1% + ADN  $3 \cdot 10^{-8}$ M dans tampon phosphate + F127 en fonction de la force ionique après 10 min à 30 mT. A : ADN 151 pb, B : ADN 315 pb, C : ADN 438 pb, D : ADN 757 pb, E : ADN 2347 pb.

On voit que plus les ADN utilisés sont longs et plus les chaînes permanentes sont courtes et flexibles (fig. F.1). Les ADN les plus longs sont très flexibles car ils ont une longueur égale à plusieurs fois la longueur de persistance. Ils peuvent donc certainement réagir aux deux extrémités sur la même bille en formant une boucle à la surface des billes, et cela pendant le temps d'incubation, avant même que l'on ait aligné les billes sous champ. Différents essais ont été réalisés pour tenter de contourner ce problème (Annexe F) mais c'est une étude qu'il faudrait poursuivre.

## 1.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons préparé et caractérisé les matériaux de départ. Un tableau (table 1.4) résume les caractéristiques des matériaux utilisés pour la suite de l'étude.

De plus, nous avons montré qu'il était possible de former des assemblages linéaires de ces matériaux grâce au lien spécifique biotine-streptavidine. Ce travail préliminaire était nécessaire et important afin de bien contrôler la formation de ces assemblages.

Billes magnétiques streptavidine	Densité	1,76
	Taille	$r_1 = 74$ nm $r_2 = 88$ nm $r_3 = 110$ nm
	Activité (Biotine fluorescente)	61 pmol/mg $\Rightarrow 185$ sites/bille $\Rightarrow 1,9 \cdot 10^{-3}$ sites/nm <sup>2</sup>
	Adsorption spécifique d'ADN 151pb	135 ADN/bille $\Rightarrow 1,4 \cdot 10^{-3}$ sites/nm <sup>2</sup>
ADN-dibiotine	Longueur	76 pb $\Rightarrow$ 26 nm 109 pb $\Rightarrow$ 37 nm 151 pb $\Rightarrow$ 51 nm 315 pb $\Rightarrow$ 107 nm

TAB. 1.4 – Tableau récapitulatif : Caractéristiques des matériaux utilisés pour la suite de l'étude

Lorsque nous organisons les billes magnétiques en lignes, nous réalisons une série d'espaces identiques confinés entre les billes. Nous pouvons également fixer un faible nombre de molécules entre ces parois dont nous allons pouvoir étudier le comportement à l'échelle moléculaire.

Dans un premier temps, nous utiliserons le champ magnétique pour compresser ou étirer ces molécules liées entre les deux parois et ainsi étudier leurs propriétés mécaniques. Puis nous nous intéresserons plus en détail à la cinétique de formation de ce lien.

# Bibliographie

- [1] J. Bibette. Monodisperse ferrofluid emulsions. *J. Magn. Magn. Mat.*, 122(1-3) :37–41, 1993.
- [2] F. Leal-Calderon, T. Stora, O. Mondain-Monval, P. Poulin, and J. Bibette. Direct measurement of colloidal forces. *Physical Review Letters*, 72(18) :2959–2962, 1994.
- [3] J. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, San Diego, second edition, 1991.
- [4] H. Zhang and M. Widom. Field-induced forces in colloidal particle chains. *Physical Review E*, 51(3) :2099–2103, 1995.
- [5] N. M. Green and M. D. Melamed. Optical rotatory dispersion, circular dichroism and far-ultraviolet spectra of avidin and streptavidin. *Biochemistry Journal*, 100 :614, 1966.
- [6] E. Bayer, H. Ben-Hur, G. Gitlin, and M. Wilchek. An improved method for the single step purification of streptavidin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 13 :103–112, 1986.
- [7] A. Williams and I. T. Ibrahim. A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC). *Journal of American Chemical Society*, 103 :7090–7095, 1981.
- [8] J. V. Staros, R. W. Wright, and D. M. Swingle. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated reactions. *Analytical Biochemistry*, 156 :220–222, 1986.
- [9] L. A. Cantarero, J. E. Butler, and J. W. Osborne. The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Analytical Biochemistry*, 105 :375–382, 1980.
- [10] J. Philip, O. Mondain-Monval, F. Leal-Calderon, and J. Bibette. Colloidal force measurements in the presence of a polyelectrolyte. *Journal of Physic D : Applied Physic*, 30 :2798–2803, 1997.
- [11] C. Goubault. *Colloïdes magnétiques : auto-organisation et applications biologiques*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2004.
- [12] S. L. Biswal and A. P. Gast. Mechanics of semiflexible chains formed by poly(ethylene glycol)-linked paramagnetic particles. *Physical Review E*, 68 :021402, 2003.



## Chapitre 2

# Mesure de la flexibilité d'un petit objet : application à un ADN court

Nous avons vu (chap. 1.1) que les billes magnétiques s'alignaient en présence d'un champ magnétique et qu'il était possible de former des chaînes magnétiques permanentes en les liant entre elles grâce à des ADN biotinylés. De plus, nous savons contrôler la distance entre ces billes grâce au champ magnétique. On peut en effet appliquer une force magnétique attractive plus ou moins forte, qui s'équilibre, à une distance donnée, avec les forces répulsives colloïdales des billes. Augmenter le champ magnétique revient donc à diminuer la distance entre les billes. Lorsque les billes sont liées entre elles par de l'ADN, on peut donc comprimer ce lien (grâce à la force magnétique attractive) ou étirer celui-ci (grâce aux répulsions entre les billes à champ magnétique faible). Dans ce chapitre, nous nous servirons de cette propriété pour sonder les propriétés mécaniques de ce lien.

Dans une première partie, nous décrirons plus en détails la molécule d'ADN, la théorie de la flexibilité des polymères et les différentes expériences déjà réalisées pour mesurer la flexibilité de l'ADN. Puis nous montrerons comment, à partir des profils force-distance des billes magnétiques seules ou liées par l'ADN, nous pouvons déduire les propriétés mécaniques de la molécule d'ADN choisie comme modèle. Enfin, nous présenterons les avantages et les inconvénients de cette méthode et la comparerons aux expériences de molécule unique existantes.

### 2.1 Structure de l'ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique), présent dans chaque cellule, contient l'information génétique permettant à chaque constituant cellulaire d'être synthétisé, assemblé et régulé. Sa structure exacte a été proposée pour la première fois par Watson et Crick [1] en 1953.

L'ADN est une macromolécule biologique formée de deux chaînes complémentaires qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une double hélice droite (forme B de l'ADN) (Fig. 2.1).

Chaque chaîne est constituée d'un squelette formé de phosphodiesteres et de sucres (le désoxyribose) en alternance. Elle a une polarité, donnée par l'asymétrie du sucre : l'extrémité 5' présente un phosphate terminal alors que l'extrémité 3' possède un sucre terminal. Les deux chaînes s'as-

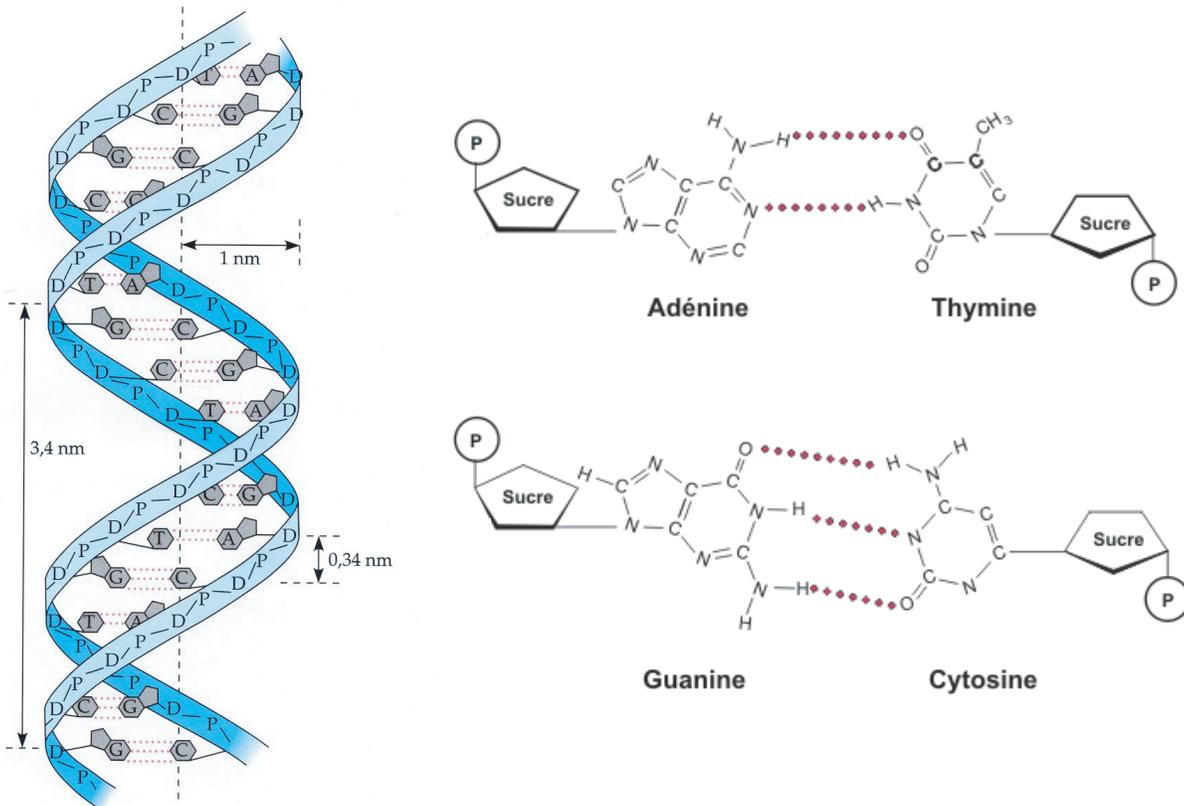


FIG. 2.1 – Structure de l'ADN

semblent en sens inverse l'une par rapport à l'autre. Chaque sucre porte une base qui est soit une purine : l'adénine (A) ou la guanine (G), soit une pyrimidine : la thymine (T) ou la cytosine (C). Les bases s'assemblent par paires complémentaires, A-T et C-G, en formant des liaisons hydrogènes entre elles, permettant ainsi le maintien des deux chaînes. On parle de paires de bases. Lorsque l'enchaînement des bases sur l'un des brins de l'ADN est défini, l'autre brin est automatiquement déterminé par complémentarité. C'est cette complémentarité qui est à la base du codage des gènes, permettant ainsi la réplication de l'ADN, la transcription en ARN et la traduction en protéines nécessaires au fonctionnement des cellules grâce à des enzymes qui "reconnaissent" le code.

La structure de l'ADN en double-hélice confère à la molécule une certaine rigidité<sup>1</sup> à laquelle s'ajoute l'existence de répulsions coulombiennes entre les charges portées par les phosphates. C'est donc un polymère semi-flexible et peut être décrit comme tel.

<sup>1</sup>La rigidité de l'hélice provient en partie du "π-stacking" entre bases successives.

## 2.2 Physique des polymères semi-flexibles

Deux modèles sont couramment utilisés pour décrire les polymères semi-flexibles et leur réponse à une contrainte extérieure : le modèle de la chaîne à articulations libres (FJC) et celui de la chaîne à courbure continue (WLC).

### 2.2.1 La chaîne à articulations libres (Freely Jointed Chain, FJC)

Le modèle de la chaîne à articulations libres décrit le polymère comme une succession de  $N$  segments indépendants de longueur  $b_k$  (segments de Kuhn) dont les orientations ne sont pas corrélées en l'absence de force. L'écart quadratique moyen entre ses extrémités en l'absence de force est alors de la forme suivante :

$$\langle r^2 \rangle = b_k^2 N \quad (2.1)$$

Une force  $F$  agissant à une extrémité du polymère alors que l'autre extrémité est attachée à une surface, étend le polymère de telle sorte que tous les segments tendent à s'aligner avec elle. La force de rappel du polymère est due à l'agitation thermique qui tend à désordonner les segments. Dans ce modèle, la réponse élastique de la molécule est purement entropique et l'extension du polymère en présence de la force est :

$$L = \langle r^2 \rangle^{1/2} = L_0 \left( \coth \frac{Fb_k}{k_B T} - \frac{k_B T}{Fb_k} \right) = L_0 \cdot \mathcal{L} \left( \frac{Fb_k}{k_B T} \right) \quad (2.2)$$

où  $\mathcal{L}$  est la fonction de Langevin. L'extension relative de la chaîne  $L/L_0$  varie donc comme  $Fb_k/k_B T$  à force faible et comme  $1 - k_B T/Fb_k$  à force élevée.

Ce modèle prend en compte la rigidité de la molécule dans le paramètre  $b_k$  uniquement. Plus la molécule est rigide, plus  $b_k$  est grand. Il ne tient donc pas compte des corrélations d'orientation à petite échelle. C'est pourquoi, on utilise plutôt le modèle WLC (Worm Like Chain) dans lequel le polymère est considéré comme un fil ayant une courbure continue. Il introduit la notion de rigidité de courbure.

### 2.2.2 Longueur de persistance comme représentation de la rigidité de la chaîne

Kratky et Porod [2] ont proposé un modèle décrivant la conformation de la chaîne à courbure continue ou WLC (Worm Like Chain).

Considérons un polymère composé de  $N$  segments de longueur  $b$  faisant entre eux un angle fixe  $\theta$  (chacun décrit un cône de demi-angle au sommet  $\theta$  autour du précédent, fig. 2.2). En faisant varier  $\theta$  et  $N$ , on peut décrire toutes les situations intermédiaires entre la chaîne infiniment souple à rotation libre et la chaîne infiniment rigide à allure de bâtonnet.

La valeur exacte  $h$  de la projection sur le premier segment de la distance entre les deux

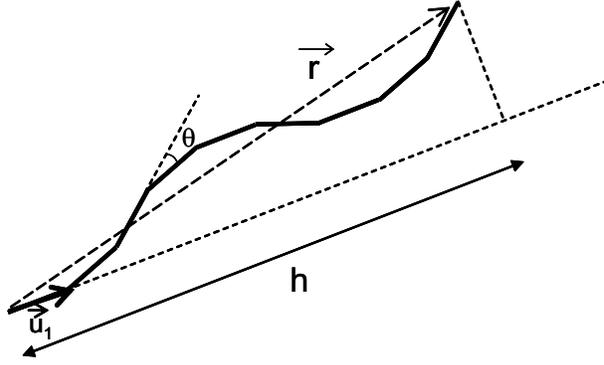


FIG. 2.2 – Modèle dans le plan de la chaîne de Porod et Kratky formée de  $N$  segments de longueur  $b$  (vecteurs  $\vec{u}_i$ ) faisant un angle  $\theta$  entre eux.

extrémités a pour expression [3] :

$$h = b \sum_{i=1}^N \cos^i \theta = b \cdot \frac{1 - \cos^N \theta}{1 - \cos \theta} \quad (2.3)$$

Lorsque le nombre  $N$  de segments tend vers l'infini,  $h$  approche une valeur constante que l'on appellera longueur de persistance  $L_p$ . On a alors :

$$L_p = \frac{b}{1 - \cos \theta} \quad (2.4)$$

$L_p$  représente la longueur de la chaîne sur laquelle la direction des segments est corrélée. La longueur de persistance ne dépend pas de la longueur totale du polymère. C'est une propriété intrinsèque du polymère dans un milieu donné.

Lorsque  $\theta$  est suffisamment petit, dans le cas d'un polymère semi-flexible, on peut écrire  $\cos \theta \approx 1 - \theta^2/2$  et

$$L_p = 2 \frac{b}{\theta^2} \quad (2.5)$$

Dans l'expression (2.3) on peut remplacer  $\cos^N \theta = (1 - \theta^2/2)^N$  par  $\exp(-N\theta^2/2)$ . En appelant  $L_c = Nb$  la longueur contour de la chaîne et en utilisant (2.5) on obtient

$$\cos^N \theta = e^{-\frac{L_c}{L_p}} \quad (2.6)$$

D'autre part, en appelant  $\vec{r}$  le vecteur joignant les deux extrémités, on peut calculer l'écart quadratique moyen entre les extrémités de la chaîne  $\langle r^2 \rangle = \langle \vec{r} \cdot \vec{r} \rangle$  [4]. Il vient :

$$\langle \vec{r} \rangle = b \sum_{i=1}^N \vec{u}_i \quad (2.7)$$

et

$$\langle r^2 \rangle = b^2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \vec{u}_i \cdot \vec{u}_j \quad (2.8)$$

où  $\vec{u}_i$  représente le vecteur directeur unitaire de chaque segment. Or

$$\vec{u}_i \cdot \vec{u}_{i+1} = \cos \theta \quad (2.9)$$

et

$$\vec{u}_i \cdot \vec{u}_{i+n} = \cos^n \theta \quad (2.10)$$

il reste donc à calculer :

$$\langle r^2 \rangle = b^2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \cos^{j-i} \theta \quad (2.11)$$

ce qui donne :

$$\langle r^2 \rangle = b^2 \left[ N \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} - \frac{2 \cos \theta (1 - \cos^N \theta)}{(1 - \cos \theta)^2} \right] \quad (2.12)$$

Pour  $\theta$  petit, on a  $\cos \theta \approx 1 - \theta^2/2$ . En utilisant (2.5) et (2.6), on obtient à partir de l'équation (2.12)

$$\langle r^2 \rangle = 2L_p \left\{ L_c - L_p \left( 1 - e^{-\frac{L_c}{L_p}} \right) \right\} \quad (2.13)$$

Lorsque  $L_c \rightarrow \infty$ , l'expression (2.13) devient

$$\langle r^2 \rangle \approx 2L_c L_p \quad (2.14)$$

On retrouve la description d'une chaîne de Gauss correspondant à une chaîne à articulations libres dans laquelle  $\langle r^2 \rangle = b_k^2 N_k$ ,  $b_k$  étant la longueur des segments et  $N$  le nombre total de segments. On a  $L_c = b_k N_k$  d'où  $b_k = 2L_p$ . Pour un polymère suffisamment long, la longueur de Kuhn est le double de la longueur de persistance.

lorsque  $L_c \rightarrow 0$ , la chaîne a le comportement d'un bâtonnet rigide :

$$\langle r^2 \rangle \rightarrow L_c^2 \quad (2.15)$$

Par contre une chaîne de longueur  $L_c = L_p$  n'est pas totalement rigide puisque dans ce cas,  $\langle r^2 \rangle^{1/2} = 2L_c/e$ . La distance entre les deux extrémités de la chaîne est donc seulement de 86 % de sa longueur contour. Une telle chaîne ne se comporte donc pas comme un bâtonnet rigide.

### 2.2.3 Flexibilité et élasticité

Après avoir décrit la chaîne par sa longueur contour  $L_c$  et sa longueur de persistance  $L_p$ , on affine le modèle en donnant une distribution statistique de Boltzmann à  $\theta$ . La description de l'élasticité de Landau-Lifschitz[5] suppose que la force de rappel est linéaire par rapport au déplacement pour une flexion de la chaîne suffisamment petite sur un segment de longueur  $b$ . Alors l'énergie libre  $\Delta G$  est de la forme :

$$\Delta G = \kappa \frac{\theta^2}{b} \quad (2.16)$$

où  $\theta$  représente le déplacement angulaire et  $\kappa$  le coefficient de flexion.

En présence de l'agitation thermique, la probabilité d'une flexion caractérisée par une énergie  $\Delta G$ , est donnée par le facteur de Boltzmann  $\exp(-\Delta G/k_B T)$  où  $k_B$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température en kelvins. La variance de  $\theta$  devient alors :

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{b \cdot k_B T}{\kappa} \quad (2.17)$$

En combinant cette dernière expression avec l'expression (2.5), on obtient

$$L_p = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (2.18)$$

La longueur de persistance est donc directement liée à la constante d'élasticité de courbure de la chaîne.

#### 2.2.4 En présence d'une force extérieure

L'application d'une force extérieure sur l'une des extrémités d'un polymère semi-flexible alors que l'autre est attachée à un point fixe, induit une extension du polymère. Le calcul analytique de la force appliquée en fonction de l'extension a été effectué pour les deux cas limites  $L_c \gg L_p$  et  $L_c \ll L_p$ .

##### $L_c \gg L_p$

Marko *et al.* [6] ont calculé une formule analytique approchée de la force en fonction de l'extension relative  $L/L_c$  pour un polymère flexible tel que  $L_c \gg L_p$  :

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left( \frac{L}{L_c} + \frac{1}{4(1 - L/L_c)} - \frac{1}{4} \right) \quad (2.19)$$

On retrouve à basse force, le modèle de la chaîne à articulations libres mais à force élevée,  $L_c - L$  varie en  $1/\sqrt{F}$  cette fois-ci et non plus en  $1/F$  comme pour le modèle FJC.

##### $L_c \ll L_p$

D'autre part, la réponse élastique d'un segment de longueur inférieure à la longueur de persistance a été calculée par MacKintosh *et al.* [7]. Dans ce cas, l'extension moyenne de la chaîne est de la forme :

$$L \simeq L_c - \frac{k_B T \cdot L^2}{6\kappa} + \frac{k_B T \cdot L^4}{(90\kappa^2)} F \quad (2.20)$$

Le deuxième terme de l'équation (2.20) représente la contraction à l'équilibre de la chaîne, due à l'agitation thermique en l'absence de force. Le dernier terme donne la relation linéaire entre la

force appliquée et l'extension  $\delta L$  de la chaîne par rapport à sa longueur au repos. Pour de petites déformations, la force de rappel est approximée par la relation suivante :

$$F \simeq \frac{90\kappa^2}{k_B T \cdot L^4} \delta L \quad (2.21)$$

Cette expression est valable pour un travail en compression ou en extension.

## 2.3 Méthodes de mesure de l'élasticité de l'ADN

### 2.3.1 Mesure de la longueur de persistance de l'ADN

Les premières mesures de la flexibilité de l'ADN ont été réalisées sur des solutions d'ADN par diffusion dynamique et statique de la lumière [8], analyse de la vitesse de sédimentation [9] ou viscosimétrie. Mais le traitement théorique de ces méthodes induit des approximations dans les modèles hydrodynamiques qui impliquent des erreurs d'interprétation. Les autres méthodes de mesure de la longueur de l'ADN sont les méthodes d'électrooptiques, la microscopie électronique et la cyclisation de l'ADN catalysée par des ligases.

#### Les méthodes électro-optiques [10]

Elles sont basées sur la mesure de la vitesse de diffusion rotationnelle des molécules d'ADN en solution. Sous l'influence d'une impulsion courte de champ électrique, les chaînes d'ADN s'orientent partiellement, ce qui rend la solution optiquement anisotrope. La relaxation de l'anisotropie optique est mesurée après coupure du champ électrique. Celle-ci est fonction de la longueur de l'ADN. En pratique, on mesure les différences d'indice de réfraction dues à la polarisation dans le cas de la TEB (Transient Electric Birefringence) ou la différence d'absorption de la solution dans le cas de la TED (Transient Electric Dichroism).

Ces méthodes sont surtout valables pour des ADN courts (de 50 à 500 pb) mais leur principal inconvénient est qu'il faut opérer à faible force ionique pour que l'impulsion du champ électrique appliqué reste suffisamment intense.

#### La microscopie électronique [11]

Cette méthode consiste à mesurer directement  $L$  et  $L_p$  pour une molécule déposée sur une grille de microscopie électronique. Elle peut être utilisée à n'importe quelle force ionique et n'est tributaire ni de la polydispersité ni de l'agrégation des molécules puisque chaque molécule est traitée individuellement. Mais elle implique deux hypothèses fortes :

- Le contour en deux dimensions sur la grille est obtenu après rééquilibration conformationnelle lors du dépôt de l'ADN, et non par projection de la structure en trois dimensions de l'ADN sur la grille.
- Les interactions entre l'ADN et les autres matériaux (cytochrome) n'influencent pas la flexibilité intrinsèque de l'ADN, ni ne modifient le procédé de déposition.

## Cyclisation de l'ADN

La cyclisation est la possibilité pour une molécule d'ADN de former une boucle en joignant ses deux extrémités. En présence d'une ligase (une enzyme permettant de faire un lien covalent entre ces deux extrémités) on forme une molécule cyclique dès que les deux extrémités s'approchent suffisamment. La probabilité pour que les deux extrémités s'approchent est d'autant plus grande que la molécule est flexible. En mesurant la vitesse de cyclisation de l'ADN en présence d'une ligase pour des molécules d'ADN de différentes tailles, Shore *et al.*[12] ont mis en évidence la flexibilité de brins courts d'ADN. Cette méthode a l'avantage de ne pas utiliser de modèle hydrodynamique mais doit être utilisée à très faible concentration pour éviter la formation d'agrégats.

Ces différentes méthodes ont montré que la longueur de persistance de l'ADN dépend de la force ionique du milieu :

- En dessous de 10 mM, la longueur de persistance augmente quand la force ionique diminue, les charges portées par le squelette sucre-phosphate étant de plus en plus écrantées par les ions.
- Au-dessus de 10 mM, la longueur de persistance varie peu avec la force ionique et reste à peu près égale à 45-50 nm.

### 2.3.2 Réponse de l'ADN à une force extérieure : méthodes de micromanipulation

Les progrès récents en vidéomicroscopie de fluorescence et l'arrivée sur le marché de nouveaux marqueurs fluorescents[13, 14] ont permis la visualisation directe de molécules individuelles d'ADN. De plus, une grande variété de méthodes a fait son apparition pour manipuler (déplacer, étirer et tordre) des biomolécules avec des forces contrôlées et mesurables de l'ordre du piconewton.

#### Les pinces optiques [15, 16]

Les pinces optiques sont formées d'un laser focalisé par un objectif de microscope de grande ouverture. Un gradient électromagnétique important est ainsi créé au point de focalisation du laser. Ce gradient peut être utilisé pour piéger une bille de latex d'un micron de diamètre avec une force allant de 0,1 à 100 pN. La force peut être calculée en mesurant la « rigidité » du piège et la position de la bille dans ce piège. Un interféromètre ou un détecteur de position par photodiode à cadrans est utilisé pour connaître la position de la bille piégée (fig. 2.3A).

#### Les fibres optiques [17]

Elles ont été utilisées pour tirer sur une molécule d'ADN liée par l'autre extrémité à une surface solide. La déflexion de la fibre optique permet de calculer directement la force appliquée qui peut varier de 0,1 pN à environ 1 nN (fig. 2.3B).

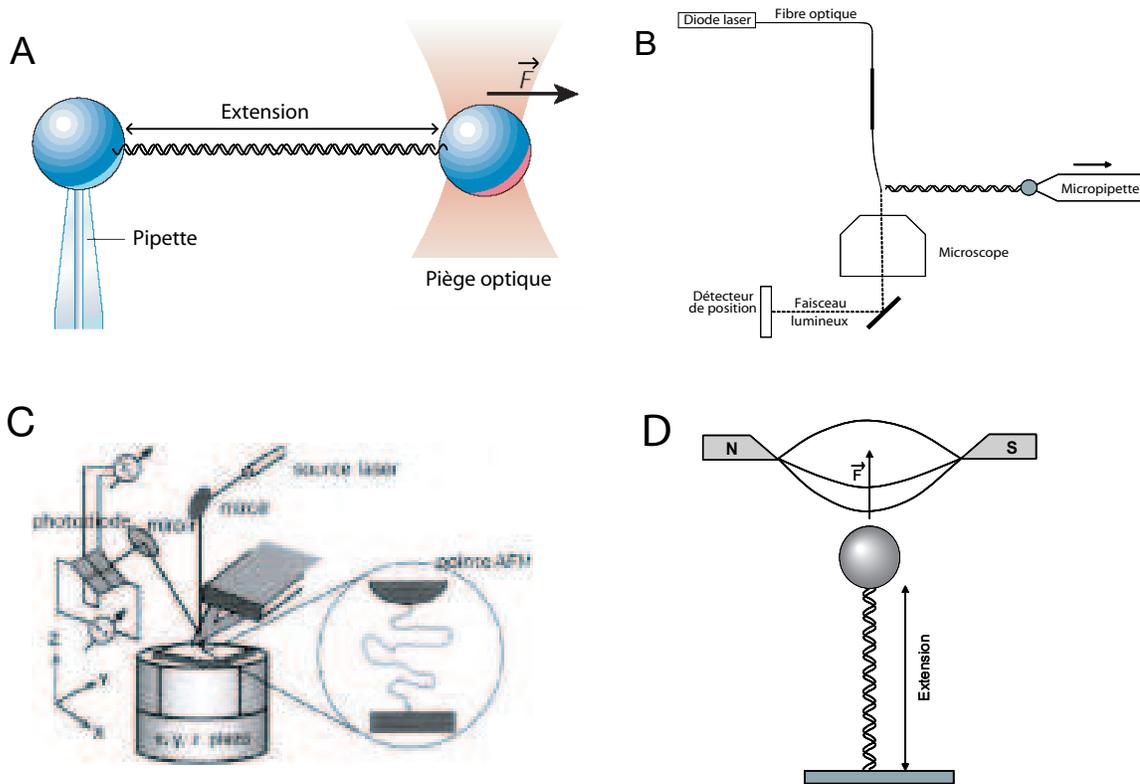


FIG. 2.3 – Principes des méthodes de micromanipulation de l'ADN. A : Les pinces optiques. B : Les fibres optiques. C : Le microscope à force atomique (extrait de [www.ulb.ac.be](http://www.ulb.ac.be)). D : Les pinces magnétiques.

### La microscopie à force atomique (AFM) [18, 19]

Tirer sur des molécules uniques est une application bien particulière de la technique de l'AFM habituellement utilisée pour mesurer la rugosité de surfaces à très petite échelle. Le schéma de l'appareil est représenté sur la figure 2.3C. L'élément central est un micro-levier en forme de « V » qui se termine, sur sa face inférieure, par une pointe dont l'extrémité possède un rayon de courbure de quelques dizaines de nm. Les interactions entre cette pointe et les molécules tapissant la surface libre de l'échantillon vont créer une déflexion du micro-levier vers le bas (en cas d'attraction) ou vers le haut (en cas de répulsion). Cette déflexion est mesurée grâce à des photodiodes qui reçoivent une fraction du rayon laser réfléchi par le dos du micro-levier. La raideur du micro-levier (de l'ordre de 0,1 N/m) est obtenue grâce à un calibrage préliminaire. On peut donc calculer la force appliquée qui est comprise entre 5 pN et quelques nanonewtons.

### Les pinces magnétiques [20, 21]

La molécule d'ADN est attachée par une extrémité à une surface solide et par l'autre extrémité à une bille magnétique. Cette bille magnétique est tirée verticalement dans un gradient de champ horizontal généré par de petits aimants (fig. 2.3D). Ici, la force est calculée à partir du mouvement

brownien de la bille, l'avantage est qu'il n'y a pas besoin de calibration préalable comme c'est le cas pour les pinces optiques. Le régime de force que l'on peut appliquer va de 0,01 pN à plusieurs dizaines de piconewtons. D'autre part, en plaçant les billes magnétiques dans un champ magnétique tournant, on peut également tordre les molécules d'ADN [20, 22].

### 2.3.3 Molécule unique et physique de l'ADN

Les méthodes de micromanipulation décrites précédemment ont permis d'étudier la réponse de l'ADN à une contrainte (extension, torsion) sur des gammes de force importantes : de quelques fractions de piconewton à plus de 100 pN. Enfin, elles permettent aussi d'étudier les interactions de l'ADN avec les protéines ou les enzymes présentes dans la cellule et ainsi de comprendre, d'un point de vue physico-chimique, les différentes réactions cellulaires dans lesquelles l'ADN entre en jeu.

#### Extension de l'ADN : le régime entropique

Smith *et al.* [23] sont les premiers à avoir manipulé des molécules uniques d'ADN. En combinant les pinces magnétiques avec un flux hydrodynamique, ils ont pu mesurer l'extension d'une molécule d'ADN de 32  $\mu\text{m}$  en fonction d'une force appliquée restant toutefois inférieure à 15 pN. Ils ont ainsi montré que les résultats expérimentaux ne s'accordaient pas sur tout le domaine de mesure au modèle de la chaîne à articulations libres. La chaîne d'ADN étant très rigide, sa longueur de Kuhn est très importante et le modèle FJC ne tient pas compte des corrélations d'orientation à petite échelle, il n'est donc pas réaliste. L'analyse théorique des résultats, effectuée par Bustamante *et al.* [24] et par Marko *et al.* [6], a montré plus tard que le modèle WLC était mieux adapté pour décrire le dépliement de la molécule d'ADN, car il la représente comme un fil élastique de courbure continue présentant une énergie de flexion en plus de son entropie (fig. 2.4). Dans ce domaine de mesure, appelé "régime entropique", la force appliquée n'est pas suffisamment importante pour étirer la molécule au dessus de sa longueur contour, la molécule est simplement dépliée et fluctue avec l'agitation thermique [24, 6, 25].

La longueur de persistance de l'ADN a ainsi été mesurée dans différents tampons. Pour une force ionique supérieure à 10 mM, elle est d'environ 50 nm, ce qui correspond à 150 pb [26].

#### Sur-extension de l'ADN

Lorsque l'on tire sur l'ADN avec une force plus importante, on peut l'étirer jusqu'à 2,14 fois la longueur contour  $L_c$  de la forme B de l'ADN au repos [27, 28]. Lorsque l'ADN est étiré avec une force de 2-3 pN, la molécule se déplie jusqu'à atteindre la longueur  $L_c$ . Puis la force augmente brusquement jusqu'à atteindre un plateau aux alentours de 60-80 pN pendant lequel une transition fortement coopérative a lieu jusqu'à une extension de l'ADN environ deux fois supérieure à  $L_c$  [17, 29] (fig 2.5). Cette extension a été attribuée à une nouvelle conformation S de l'ADN où les bases s'inclinent et le rayon de l'hélice diminue [17, 30].

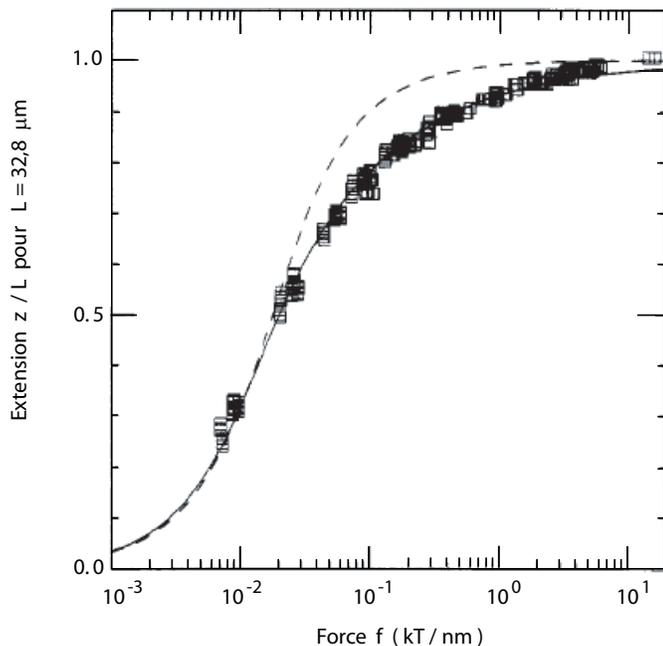


FIG. 2.4 – Extension relative de l'ADN en fonction de la force appliquée (données [23]). Le ligne en pointillée représente le modèle FJC pour  $b_k = 100$  nm et n'est plus en accord avec les données pour  $f > 10^{-2}$  kT/nm. La ligne pleine représente le modèle WLC (pour  $L=32.8$   $\mu\text{m}$ ). Les points s'écartent du modèle au dessus de  $z=31$   $\mu\text{m}$ . (Graphe adapté de [6])

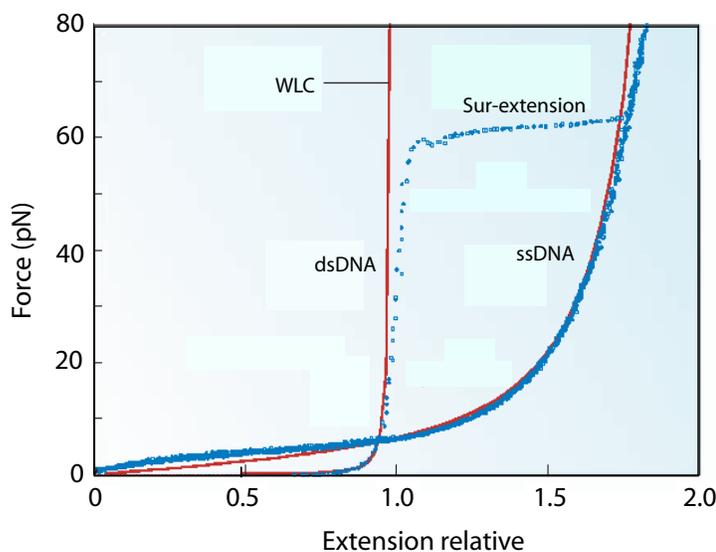


FIG. 2.5 – Force appliquée en fonction de l'extension relative pour l'ADN simple-brin (ssDNA) et pour l'ADN double-brin (dsDNA) (adapté de [31]).

Cet hypothèse a ensuite été appuyée par des expériences d'AFM [32, 18] qui ont montré que l'on observe d'abord un plateau correspondant à une transition B-S, puis une dissociation des deux brins pour une force appliquée de l'ordre de 150-300 pN. Le profil de force rejoint alors celui de l'ADN simple brin.

Plus récemment, des expériences ont été effectuées par Williams *et al.* [33, 34, 35], dans lesquelles ils étudient l'influence de la température, du pH et de la force ionique sur la sur-extension de l'ADN. Elles tendent à montrer qu'il n'y a pas de transition B-S et que les brins d'ADN se séparent

directement en deux brins indépendants sous l'effet de la force extérieure [36, 37] contrairement aux expériences précédentes.

### Torsion et enroulement de l'ADN

Grâce aux pinces magnétiques, il est également possible d'appliquer une contrainte de torsion à l'ADN en utilisant un champ tournant, à condition que l'ADN soit bien attaché par plusieurs points aux deux extrémités [38]. Pour diminuer son énergie de torsion, l'ADN crée de la courbure, et, comme le fait un cordon téléphonique, s'entortille et forme des vrilles appelées plectonèmes qui raccourcissent l'extension de la molécule (fig. 2.6A). L'ADN est alors sur- ou sous-enroulé.

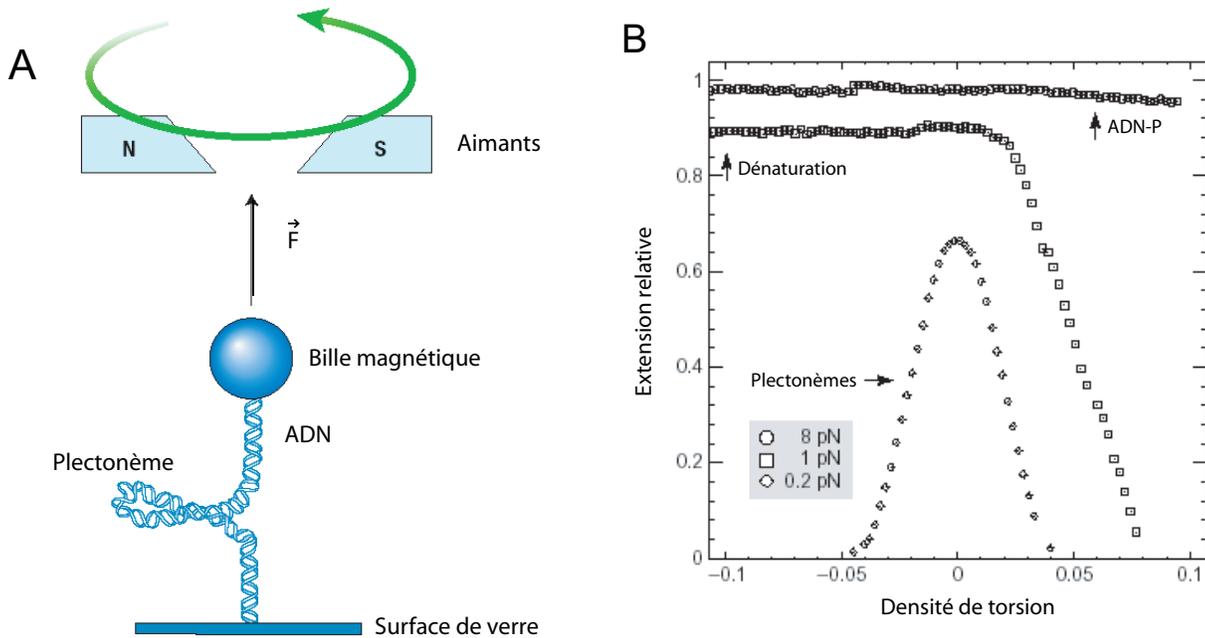


FIG. 2.6 – A : Torsion de l'ADN : lorsque l'on sur-enroule l'ADN on forme des vrilles appelées plectonèmes et l'extension mesurée diminue (adapté de [31]). B : Extension mesurée en fonction du degré de sur-enroulement  $\sigma = (N - N_0)/N_0$  où  $N$  est le nombre de tours d'hélice de la molécule et  $N_0$  le nombre de tours d'hélice au repos.  $N_0 = 4800$  pour l'ADN  $\lambda$  de 48 kpb (adapté de [39]).

On peut faire varier indépendamment la force de traction et la force d'enroulement. Si l'on fixe la force de traction et que l'on enroule ou déroule l'ADN, on obtient trois comportements différents en fonction de la force de traction [20] (fig. 2.6B) :

- $F < 0,5$  pN : l'extension est symétrique et diminue avec le nombre de tours positifs ou négatifs à cause de la formation de plectonèmes.
- $0,5$  pN  $< F < 3$  pN : l'extension diminue lorsque l'on sur-enroule l'ADN, mais reste constante lorsque l'on sous-enroule l'ADN. Dans ce cas, il se produit des dénaturations locales de l'ADN avec séparation des brins d'ADN.
- $F > 3$  pN : l'extension dépend peu du degré d'enroulement négatif ou positif de la molécule.

Lorsqu'il est sur-enroulé, il subit une transition de sa forme B vers une forme P. La forme P de l'ADN est une double-hélice ayant 2,6 bases par tour (contre 10 bases par tour pour la forme B), où le squelette phosphodiester est tourné vers l'intérieur avec les bases exposées vers l'extérieur [21, 40, 41].

### Interactions ADN-protéines

Les expériences décrites précédemment permettent de mesurer ou d'imposer trois paramètres principaux : la force, l'extension de la molécule et l'enroulement de l'ADN. Toute protéine ou enzyme qui modifie directement ou indirectement l'un de ces trois paramètres pourra donc être étudiée par les techniques de micromanipulation.

De nombreuses protéines ou enzymes interagissant avec l'ADN ont ainsi été étudiées [42, 41, 43], nous en donnerons ici deux exemples.

L'ARN polymérase est l'enzyme responsable de la transcription de l'ADN en ARN. Elle se déplace le long de la molécule d'ADN à une vitesse supérieure à 10 nucléotides par seconde en marquant des pauses ou des arrêts durant la transcription. Si l'ARN polymérase est attachée à une surface fixe, elle provoque le déplacement de l'ADN le long de la surface. On peut alors attacher à l'autre extrémité de l'ADN, une bille de polystyrène contrôlée par un flux hydrodynamique ou par des pinces optiques [44, 45, 46] (fig. 2.7A). La distance entre la bille et la surface fixe est une mesure directe de l'action de l'enzyme. La vitesse de l'enzyme reste inchangée pour des forces inférieures à 20 pN. Pour des forces plus importantes, si la force appliquée par la bille sur l'extrémité de l'ADN assiste la transcription, on observe une diminution de la probabilité de pause ou d'arrêt. Si par contre la force appliquée est contraire au sens de la transcription, celle-ci sera ralentie et même arrêtée pour une force de l'ordre de 25 pN [47].

L'action d'une ADN-topoisomérase de type II, une enzyme capable de couper et de recoller deux brins d'ADN a, d'autre part, été étudiée sur les molécules sur-enroulées [22]. Cette enzyme permet de relâcher la tension due au sur-enroulement de l'ADN en coupant puis en recollant les deux brins au niveau des plectonèmes (fig. 2.7B). A chaque cycle enzymatique, la topoisomérase II consomme de l'énergie sous la forme d'ATP et fait disparaître deux plectonèmes. L'extension de la molécule d'ADN augmente alors par pas discrets d'environ 100 nm.

Les propriétés mécaniques de l'ADN sont maintenant bien connues. On connaît notamment sa longueur de persistance et son élasticité en fonction de la force ionique. Les méthodes de micro-manipulation ont permis de faire des avancées importantes dans la connaissance de l'ADN, de ses interactions avec les protéines et des mécanismes enzymatiques associés. Elles permettent d'effectuer des mesures précises sur une large gamme de force, mais la plupart d'entre elles ne s'adaptent pas aux petites molécules. En effet, seul l'AFM a permis, à ce jour, de mesurer des brins d'ADN courts [32].

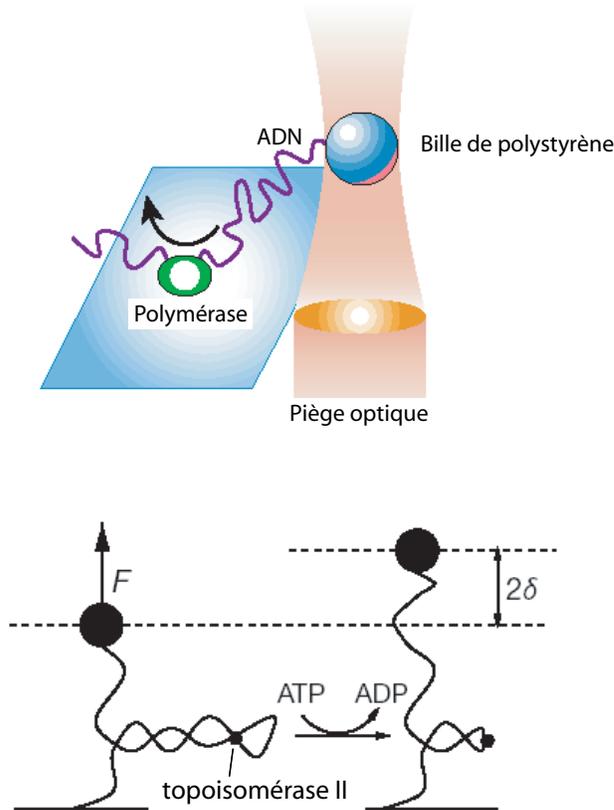


FIG. 2.7 – A : Mesure de l'action d'une ARN polymérase grâce aux pinces optiques (adapté de [31]). B : Action de la topoisomérase II sur l'ADN sur-enroulé : diminution de la contrainte de torsion par relaxation des plectonèmes. L'extension augmente alors de  $2\delta$ ,  $\delta$  étant la longueur d'ADN comprise dans une boucle (adapté de [22]).

## 2.4 Du profil de force à la flexibilité des liens

Nous utilisons les chaînes magnétiques permanentes, dans lesquelles l'ADN joue le rôle de lien entre les particules. Grâce au champ magnétique, on peut contrôler la distance entre ces billes. On pourra donc compresser ou étirer ces liens. L'avantage de cette méthode est que, le nombre de billes étant important, chaque expérience est une moyenne sur un grand nombre de "molécules uniques".

La distance entre les billes est mesurée par diffraction de Bragg, en utilisant le montage expérimental décrit au chapitre 1.1.2. Connaissant la force magnétique exercée, nous obtenons le profil de force  $F(d)$  des billes modifié par la présence du lien.

Cette technique de mesure, appelée MCT (Magnetic Chaining Technique) et mise au point par Leal Calderon *et al.* [48], a été utilisée pour mesurer les interactions entre particules colloïdales :

dépletion [49], répulsion électrostatique ou stérique due à des tensioactifs [50], à des polymères [51, 52, 53] ou à des protéines [54] adsorbés à la surface des billes. Cependant, elle n'avait encore jamais été utilisée pour sonder l'élasticité de molécules fixées entre les billes, ce que nous montrerons dans cette partie.

### 2.4.1 Principe de la méthode

Nous avons mesuré le profil de force des billes magnétiques non liées, puis celui des billes magnétiques liées par l'ADN dibiotine.

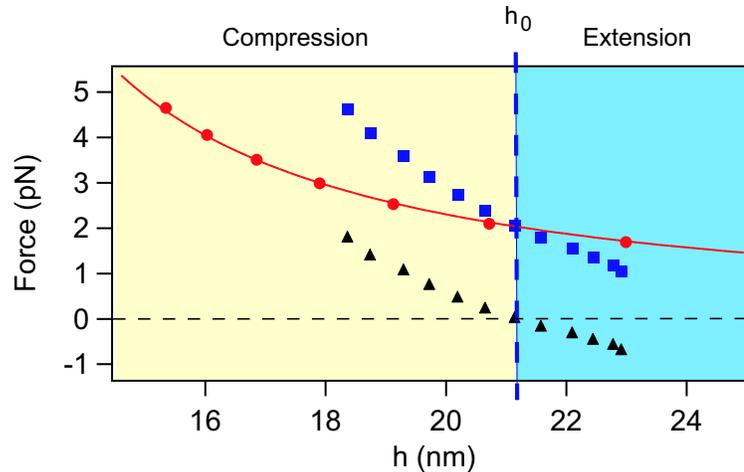


FIG. 2.8 – Profils force-distance :  $h$  est la distance inter-particules donnée par  $h = d - 2 * r_2$ .  $\bullet$  :  $F_{billes}$  ;  $\blacksquare$  :  $F_{billes+ADN151 pb}$  ;  $\blacktriangle$  :  $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$ .

Nous observons que les deux profils de forces sont différents (fig. 2.8). En effet, les deux courbes de force se croisent à une distance appelée  $h_0$ , qui sépare deux régimes distincts :

- Pour  $h < h_0$ , on comprime le lien entre les billes. En effet pour approcher les billes à une même distance, il faut exercer une force magnétique plus importante en présence de l'ADN. C'est la force magnétique attractive importante aux champs forts qui permet de compresser l'ADN.
- Pour  $h > h_0$ , on observe une extension de l'ADN. Lorsque le champ magnétique est faible, ce sont les forces de répulsion électrostatiques et stériques qui l'emportent. La distance entre les billes est inférieure en présence de l'ADN qu'en son absence pour une même force appliquée.

En présence des liens d'ADN, le bilan des forces devient :

$$F_{billes+ADN} = F_{billes} + F_{ADN} \quad (2.22)$$

Si l'on soustrait le profil de force des billes seules à celui des billes en présence de l'ADN, on obtient donc directement la contribution du lien. Celle-ci est positive lorsque l'on comprime l'ADN

et négative lorsque l'ADN est étirée.

En  $h_0$  la contribution de l'ADN est en moyenne nulle. Si l'on tient compte de la géométrie de l'expérience, on pourra en déduire  $L_0$ , la longueur d'un ADN "libre" qui fluctue thermiquement et n'est soumis à aucune force extérieure (chap. 2.2).

Dans ces expériences, on joue constamment sur l'équilibre entre les forces magnétiques attractives et les forces répulsives. Or, faire varier la force ionique permet d'augmenter ou de diminuer les répulsions entre les billes (chap. 2.4.2), c'est donc un paramètre important qui permet de choisir un travail en compression ou en extension.

La méthode de mesure que nous présentons ici, repose sur une mesure moyenne de la distance entre les billes. Elle correspond donc à un nombre important de mesures effectuées en parallèles (sur plusieurs billes dans la même chaîne et sur plusieurs chaînes à la fois,  $10^9$  billes environ dans l'échantillon). Cela permet donc d'avoir un résultat statistique représentant une population d'ADN importante mais implique également une condition : il faut que toutes les billes soient liées par de l'ADN, sinon, la distance mesurée est une moyenne entre des événements différents (billes liées et billes non liées) et n'a plus de sens.

Les études qui suivent ont permis de mettre au point un protocole de préparation de l'échantillon, de fabrication des chaînes et de mesure des profils fiable et reproductible.

Puis nous avons testé les deux principaux facteurs influençant la mesure : la force ionique et la longueur de l'ADN utilisé.

De plus, il est important de connaître le nombre de liens entre deux billes pour chaque mesure afin de pouvoir relier les forces mesurées aux propriétés mécaniques d'une seule molécule.

Enfin, nous avons modélisé les profils de forces obtenus en tenant compte de la géométrie de l'expérience.

### 2.4.2 Profil de force des billes seules

Le profil de force des billes seules est mesuré à différentes forces ioniques dans le tampon phosphate à pH 7,2 en présence de Synperonic F127 à 0,5 % (m/v). La concentration du tampon permet d'ajuster la force ionique.

Plus la force ionique est élevée, plus les billes se rapprochent dans les chaînes et plus la pente de la courbe de force est importante aux faibles distances (fig. 2.9). Ceci est caractéristique d'une interaction électrostatique. Les billes sont en partie stabilisées par des charges, qui sont écrantées lorsque la force ionique augmente. Ces charges proviennent des groupements carboxyliques de la couronne de polymère, sous la forme  $\text{COO}^-$  à pH 7,2<sup>2</sup>. Cependant, si le profil de répulsion était

---

<sup>2</sup>Le pKa d'un acide poly(acrylique) est de l'ordre de 4.

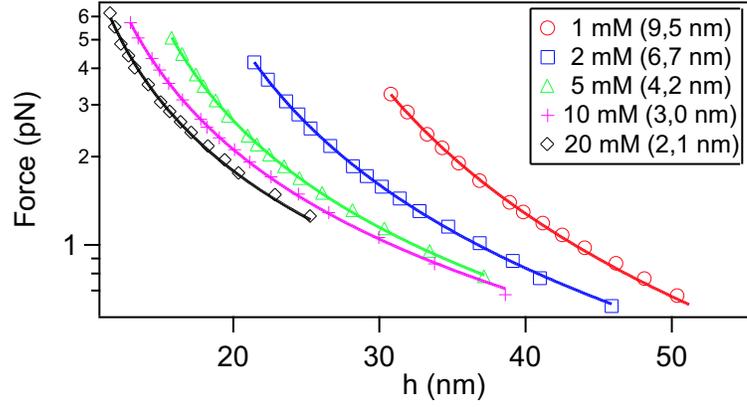


FIG. 2.9 – Profil de force mesuré pour les billes greffées streptavidine, à 0,05 % en volume dans le tampon phosphate à pH 7,2 en présence de Synperonic F127 à 0,3 % en fonction de la force ionique, ajustée en adaptant la concentration du tampon. La longueur de Debye correspondant à la force ionique est indiquée entre parenthèse pour chaque expérience.  $h$  est la distance bord à bord des billes. Elle est calculée à partir de la distance mesurée selon  $h = d - 2r_2$  où  $r_2$  est le rayon mesuré lorsque les billes sont forcées au contact (c'est le rayon cœur dur + couche de polymère réticulé, voir chap. 1.2.5). Les lignes pleines correspondent à l'interpolation des résultats par une expression analytique de la forme  $F = F_0(h - h_{min})^{-\alpha}$ .

purement électrostatique, il devrait varier de façon exponentielle selon une loi de type [55] :

$$F = F_0 \cdot e^{-\kappa h} \quad (2.23)$$

où  $\kappa^{-1}$  est la longueur de Debye déterminée par  $\kappa^{-1} \approx 0,3/\sqrt{I}$  et  $I$ , la force ionique de la solution. Cependant, nous observons que même lorsque les charges sont écrantées ( $\kappa^{-1} \approx 2 \text{ nm}$  pour  $I = 20 \text{ mM}$ ), il y a toujours une force de répulsion importante d'origine stérique. Elle est due aux "cheveux" de polymères présents à la surface des billes (chap. 1.2.5).

Le profil de force suit donc une loi complexe, que nous ne savons pas modéliser. Pour déduire la contribution de l'ADN des profils de force, nous avons néanmoins besoin d'interpoler ce profil et pour cela, nous utiliserons l'expression analytique suivante :

$$F = F_0 (h - h_{min})^{-\alpha} \quad (2.24)$$

Cette loi est choisie de façon empirique, et elle permet d'interpoler correctement nos courbes. Elle n'a cependant aucune justification physique et elle n'est donc pas valable en dehors de la gamme de distances mesurée.

Le profil de force des billes seules sera retranché aux profils de force mesurés en présence des liens d'ADN pour obtenir la contribution du lien.

### 2.4.3 Profil de force en présence de l'ADN

Lorsque l'on veut mesurer le profil de force en présence de l'ADN, il faut mettre au point un protocole permettant de former les chaînes, puis d'effectuer les mesures de forces dans la même

cellule, sans jamais interrompre le champ, de manière à ce que les chaînes permanentes restent alignées dans la direction du champ pendant toute la manipulation. En effet, si le champ est interrompu à un moment de l'expérience, les chaînes perdent leur orientation et s'entremêlent progressivement. Le signal devient alors très bruité.

### Protocole de préparation de l'échantillon

1. Une suspension de billes est préparée à environ 0,08 % en volume et lavée<sup>3</sup> trois fois dans un tampon phosphate à la force ionique fixée pour la mesure, contenant du F127 à 0,3 %.
2. 5  $\mu\text{L}$  de la suspension sont prélevés afin de déterminer sa fraction volumique exacte par absorption à 350 nm (chap. 1.2.4).
3. Une solution d'ADN diluée est préparée dans le même tampon. Sa concentration exacte est déterminée par fluorescence en utilisant le Picogreen selon la méthode décrite en annexe (Annexe E).
4. 5  $\mu\text{L}$  de solution d'ADN sont mélangés à 5  $\mu\text{L}$  de suspension de billes. Le mélange est laissé à température ambiante pendant un temps d'incubation suffisant pour permettre l'adsorption spécifique de l'ADN sur les billes. Celui-ci dépend de la quantité d'ADN ajoutée et de la force ionique de la solution (voir chap. 1.5).
5. Une cellule en verre carrée (1,5 cm  $\times$  1,5 cm) d'environ 13  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est ensuite remplie et scellée à l'aide d'huile de silicone afin d'éviter toute évaporation de l'échantillon. La cellule est enfin placée sur le porte-échantillon à l'intérieur de la bobine.

La cellule de mesure est très petite et les concentrations en ADN et en billes magnétiques sont également faibles, ceci permet de réaliser les mesures avec une très faible quantité d'échantillon.

### Champ magnétique appliqué

Dans un premier temps, il faut former les chaînes permanentes sous champ magnétique. Pour cela, on applique un champ magnétique de 80 mT pendant 240 s. Ce temps est suffisant pour permettre aux liens de se former entre les billes (dans le cas contraire, on observerait une évolution sur les différentes courbes de mesures effectuées à la suite).

La distance de formation des chaînes  $h_f$ , qui est imposée par l'intensité du champ (80 mT), est mesurée à ce moment pour chaque expérience. Elle nous servira par la suite pour les calculs géométriques.

Puis 5 rampes croissantes et décroissantes de champs magnétiques compris entre 10 mT et 80 mT sont effectuées, comprenant 15 points de mesure chacune (fig. 2.10A).

Finalement, l'échantillon est observé au microscope pour vérifier la présence ou non de chaînes permanentes.

On vérifie tout d'abord qu'il n'y a pas de dérive, ni d'hysteresis dans les courbes force-distance pendant les 5 rampes de mesure (fig. 2.10B). Cela montre qu'il n'y pas de formation de liens

---

<sup>3</sup>Le lavage consiste à séparer les billes à l'aide d'un aimant, à retirer tout le surnageant puis à redisperser les billes dans un nouveau volume de tampon. Il permet d'éliminer les éventuelles impuretés.

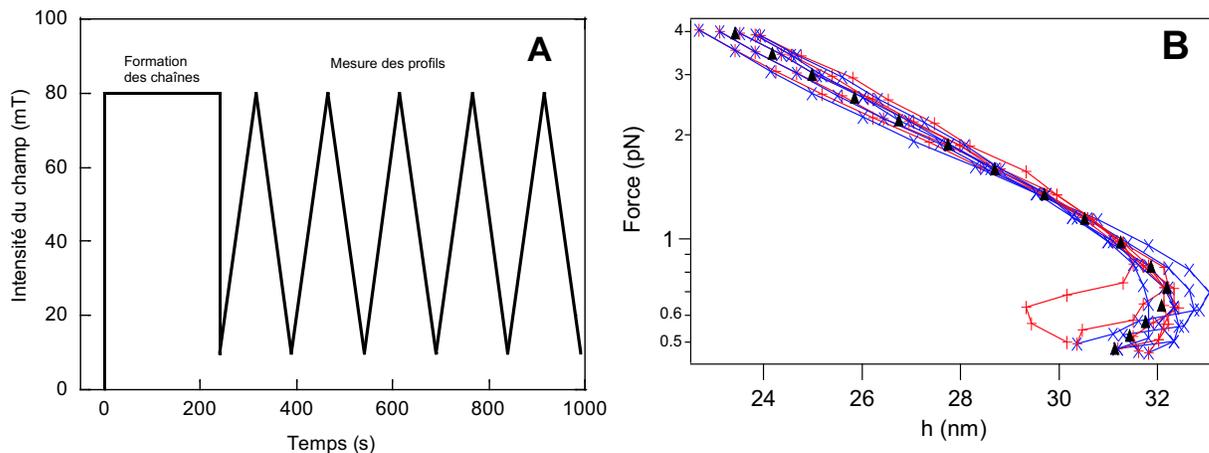


FIG. 2.10 – A : Variation du champ magnétique au cours de l'expérience; B : Profil de force obtenu pour des billes en présence d'ADN. + : rampes croissantes, X : rampes décroissantes, ▲ : moyenne de toutes les rampes.

supplémentaires ni de destruction de liens existants pendant toute la durée des mesures. Le temps attendu pour la formation des chaînes permanentes est donc suffisant. Au cours de l'expérience, on observe cependant que le pic de Bragg a tendance à diminuer en intensité et à s'élargir après plusieurs rampes. La durée de l'expérience étant assez importante, il peut certainement se former quelques colonnes multi-chaînes.

Les profils présentés par la suite seront calculés en faisant simplement la moyenne de toutes les rampes croissantes et décroissantes. L'erreur absolue sur chaque point de mesure est calculée à partir de l'écart type sur les 10 courbes obtenues. Elle est en général d'environ 1 nm, et varie légèrement en fonction des échantillons <sup>4</sup>.

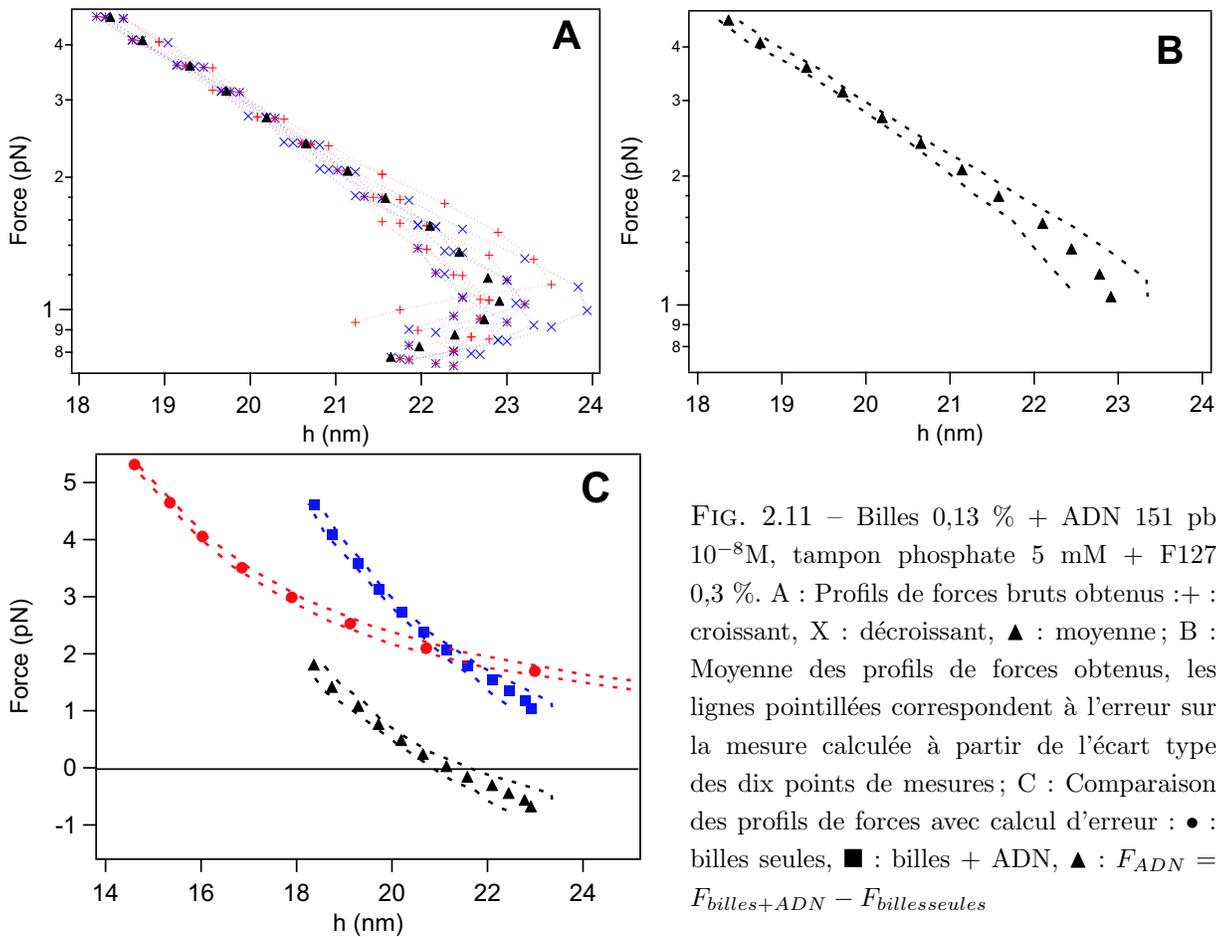
Nous observons sur la figure 2.10B, que lorsqu'on augmente le champ magnétique, et donc la force appliquée, on augmente les interactions dipolaires et la distance entre les billes diminue. Cependant, nous remarquons également un "profil rentrant" : pour les forces les plus faibles, la distance entre les billes diminue lorsque le champ diminue. En réalité, à ces champs là, les fluctuations thermiques sont du même ordre de grandeur que l'énergie magnétique d'interaction et la chaîne fluctue. On observe alors une diminution et un élargissement du pic de Bragg. Pour ces valeurs de champ magnétique, en l'absence de liaison, les billes ne forment pas de chaînes et aucun pic de Bragg n'est observé. Le "profil rentrant" n'a pas de sens physique mais montre néanmoins que les billes sont liées de façon irréversible.

<sup>4</sup>Plus le pic de Bragg est haut et fin, plus la mesure de la distance est précise, c'est le cas pour de faibles forces ioniques par exemple car les forces de répulsions sont plus importantes et les profils d'énergies sont plus marqués, les billes fluctuent donc moins autour de leur position moyenne pour un même champ magnétique.

### Calcul de l'erreur de mesure

Pour chaque profil de force, 5 rampes de champ croissantes et décroissantes sont effectuées, donnant dix points de mesure pour chaque champ magnétique appliqué. La distance moyenne (mesurée à partir du pic de Bragg) sur tous les points de mesure, est utilisée pour calculer le profil de force.

Pour calculer l'erreur de mesure sur un profil de force, on considère pour chaque champ magnétique, l'écart type obtenu à partir des dix distances mesurées. On utilise ces distances pour recalculer la force que l'on aurait dans les deux cas (erreur négative ou positive). On obtient alors un faisceau de courbes pour chacun des profils de force. Lorsque l'on calcule la contribution de l'ADN, on calcule également l'erreur sur la mesure à partir des courbes minimales et maximales des différents profils obtenus en présence et en l'absence d'ADN. On obtient des erreurs raisonnables représentées par les faisceaux de courbe sur la figure 2.11.



Pour la suite de l'étude, on appliquera toujours le même protocole qui inclut la formation des chaînes, la mesure de  $h_f$  et les 5 rampes de mesures ascendantes et descendantes. On représentera alors toujours la moyenne sur les rampes de mesures. De plus, les erreurs sur les mesures de distance sont toujours du même ordre de grandeur. Par souci de clarté, elle ne seront pas toujours

indiquées sur les graphiques suivants.

### Comparaison ADN dibiotine/ADN monobiotine

Afin de vérifier que les observations correspondent bien au pontage des billes par l'ADN, nous avons réalisé des expériences similaires avec des ADN n'ayant qu'une extrémité biotinylée. Ces molécules d'ADN vont pouvoir s'adsorber de façon spécifique sur les billes, mais il n'y aura jamais de pontage possible.

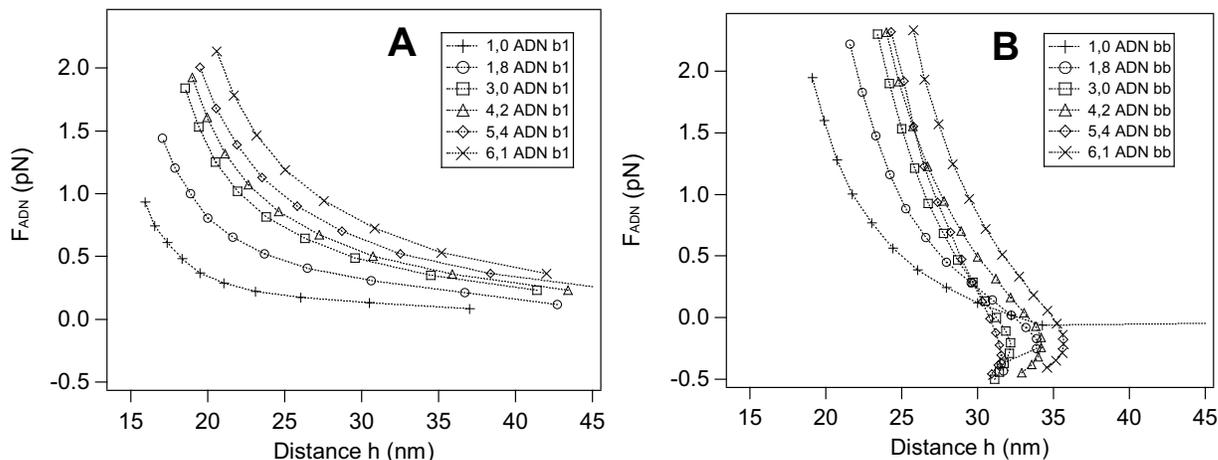


FIG. 2.12 – ADN 315 pb, tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3%; Contribution de l'ADN  $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$ . A : l'ADN n'est attaché qu'à une des billes par son extrémité biotine, l'autre extrémité reste libre (b1), B : l'ADN pontage deux billes voisines par ses deux extrémités biotine (bb). Les lignes sont des guides pour l'œil.

On observe alors que la contribution de l'ADN mono-biotine est différente de celle de l'ADN di-biotine (fig. 2.12). L'ADN n'étant lié qu'à une seule bille, il est expulsé du volume inter-particule et la force de répulsion qu'il exerce est donc moins importante que la force de répulsion qu'exerce un ADN lié par ses deux extrémités et "coincé" dans le volume inter-billes.

Ces expériences nous permettent aussi de nous rendre compte de la répulsion électrostatique et stérique, due à un ADN entre les deux billes.

La distance à laquelle les chaînes sont formées,  $h_f$ , dépend de la quantité d'ADN sur les billes et de sa longueur, l'ADN exerçant aussi une répulsion lorsqu'il n'est pas encore attaché. Il est donc important de mesurer pour chaque expérience la distance réelle d'accrochage  $h_f$ .

### Variation de la force ionique

Les profils de force des billes en présence de l'ADN 151 pb sont mesurés à différentes forces ioniques, comprises entre 2 mM et 20 mM. On peut difficilement descendre en dessous de 2 mM car l'ADN ne s'adsorbe plus sur les billes et les chaînes deviennent très difficiles à former (répulsion électrostatique, chap. 1.6). C'est la concentration du tampon phosphate à pH 7,2 qui permet de

fixer la force ionique<sup>5</sup>.

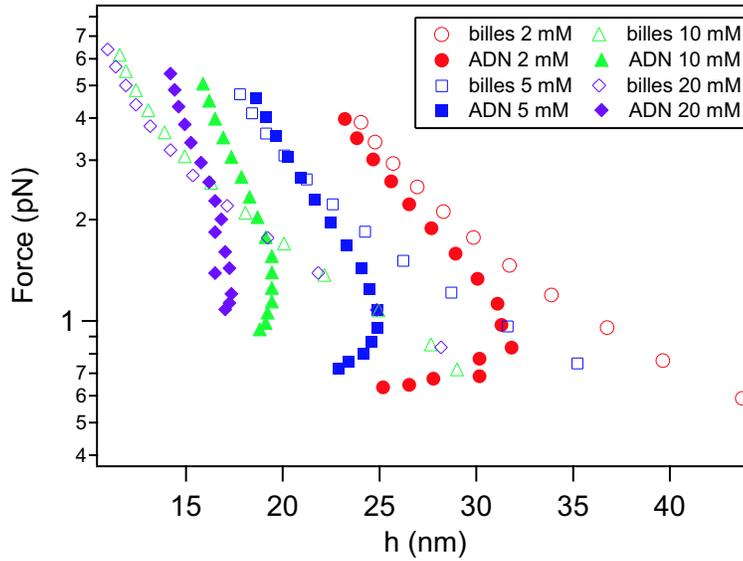


FIG. 2.13 – Profils force-distance pour les billes seules et pour les billes en présence de l'ADN, en fonction de la force ionique. Billes à 0,04 % en volume et ADN à  $5 \cdot 10^{-8}$  M dans le tampon phosphate à pH 7,2 + Synperonic F127 à 0,3 %

Lorsque la force ionique diminue, les billes s'éloignent les unes des autres parce que la force de répulsion électrostatique augmente (fig. 2.13). A 2 mM de force ionique, le profil force-distance en présence d'ADN se situe sous le profil force-distance des billes seules, on travaille donc en élongation. Par contre à 20 mM de force ionique, le profil force-distance en présence d'ADN se situe majoritairement au dessus du profil force-distance pour des billes seules, donc on travaille presque toujours en compression.

On remarque également que la distance au repos  $h_0$  (au croisement des deux profils de force) augmente lorsque la force ionique diminue. C'est une conséquence de notre protocole de préparation des chaînes. La taille de l'ADN est ici toujours supérieure à la distance interparticule de formation des chaînes. Elles sont toutes formées par l'application d'un champ de 80 mT pendant 4 min, donc, pour des forces ioniques différentes, les billes le long d'une chaîne, se trouvent à des distances différentes. En conséquence, les distributions spatiales des points d'accroche de l'ADN sur les parois des billes en regard seront différentes (fig. 2.14).

La force ionique est un paramètre permettant de contrôler l'extension ou la compression de la molécule. Cependant, il faut également noter que pour des polyélectrolytes comme l'ADN, elle va aussi agir sur la flexibilité du lien [23].

<sup>5</sup>Pour les tampons à faible concentration, on vérifie que le pH ne varie pas trop lorsque l'on y ajoute les billes.

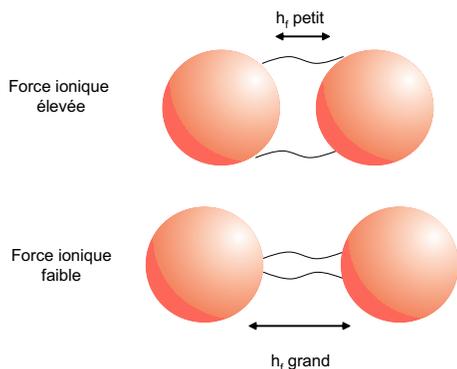


FIG. 2.14 – Distance de formation  $h_f$  des chaînes en fonction de la force ionique. La distance de formation influe sur la distribution spatiale des ADN à la surface des billes et donc, par la suite, sur la distance au repos  $h_0$ .

### Variation de la longueur de l'ADN

Les profils de forces en présence d'ADN de longueurs comprises entre 76 pb (26 nm) et 315 pb (107 nm) sont mesurés à une force ionique de 10 mM.

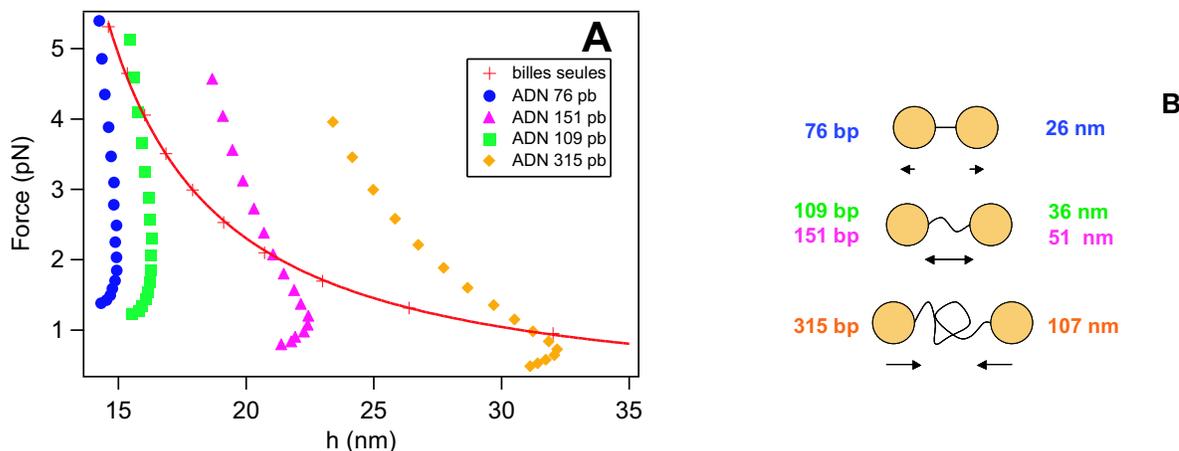


FIG. 2.15 – A : Profil de force des billes en présence de l'ADN : Variation de la longueur de l'ADN. B : Schéma de l'expérience.

Pour l'ADN le plus court (76 pb, 26 nm), le profil mesuré est vertical. En fait, la force répulsive des billes n'est pas suffisamment importante pour étirer un ADN au dessus de sa longueur contour. La force magnétique attractive n'est pas non plus suffisante pour pousser sur le lien. Dans ce cas, nous sommes limités par l'alimentation de la bobine et par le moment magnétique des billes qui est proche de sa valeur à la saturation. Pour pousser sur l'ADN, il faudrait donc des billes plus grosses.

Pour l'ADN le plus long (315 pb, 107 nm), l'expérience permet uniquement de travailler en compression, les forces répulsives des billes n'ont pas une portée suffisante pour permettre l'extension de longs ADN.

Enfin, on observe une taille intermédiaire, pour laquelle il est possible de travailler en extension et en compression (entre 36 nm et 51 nm) et que l'on pourra exploiter plus en détails.

Ces expériences préliminaires nous ont permis de mettre au point un protocole de préparation des chaînes et de mesure des forces et des distances, et de décrire la variation des profils force-distance en présence de l'ADN. Cependant, si l'on veut remonter à la flexibilité d'une seule molécule d'ADN, il faut estimer le nombre de molécules qui relie chaque bille à sa voisine.

### Molécule unique ?

Le nombre d'ADN présents sur les billes avant réaction peut être connu grâce aux mesures de cinétique d'adsorption (voir chap. 1.5) mais tous les ADN à la surface des billes ne peuvent pas participer à la liaison. Il faut pour cela qu'ils se situent sur la calotte de sphère correspondant à l'ensemble des points distants de moins de  $L_c$  (la longueur totale en extension) de la sphère en regard (fig. 2.16). On peut calculer, en fonction de la distance d'approche  $h_f$  des billes lors de la formation des chaînes et de la longueur contour de l'ADN  $L_c$ , l'aire de cette calotte de sphère (fig. 2.16). On trouve ainsi le nombre maximum d'ADN qu'il faut par bille pour pouvoir considérer que l'on a un lien unique (en supposant que les ADN sont répartis uniformément à la surface des billes). A une distance de formation des chaînes fixée, plus l'ADN est petit, plus la calotte de sphère sera petite et plus il faudra de molécules d'ADN par billes pour former un lien entre deux billes.

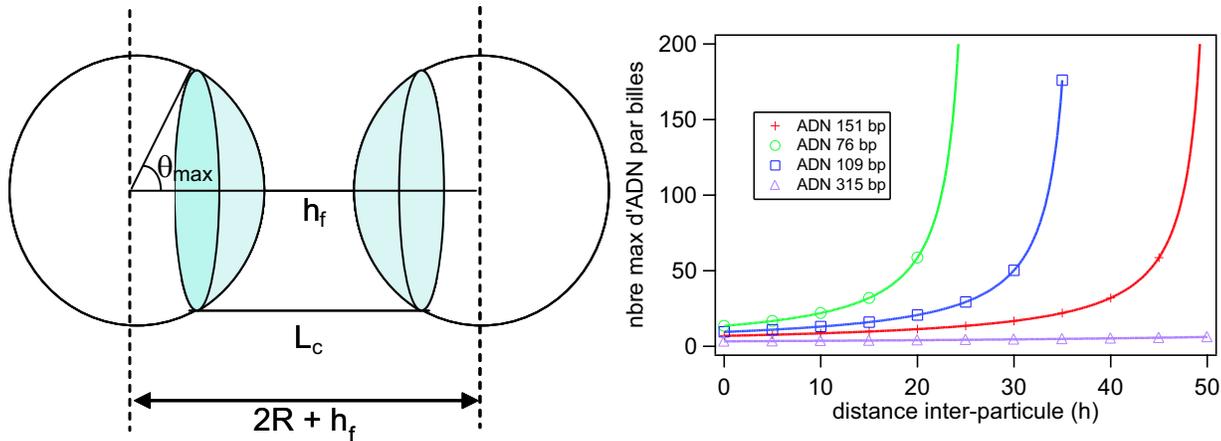


FIG. 2.16 – Calcul du nombre maximum d'ADN de longueur contour  $L_c$  (0,33 nm par paire de base) par billes en fonction de la distance  $h_f$  de formation des chaînes pour avoir un lien unique :  $N = 4R/(L_c - h_f)$ ,  $R$  étant le rayon des billes égal à 88 nm.

Grâce à ces calculs on va pouvoir estimer le nombre moyen d'ADN reliant les billes. Plus la quantité d'ADN est faible plus la variation du nombre de liens entre deux billes voisines sera importante ( $\sigma \propto \frac{1}{\sqrt{N}}$ ).

### Variation de la concentration en ADN

Dans les expériences suivantes, nous avons mesuré le profil force-distance en fonction du nombre d'ADN entre deux billes, pour un ADN de 151 pb de longueur contour 51 nm (fig. 2.17). D'après le calcul géométrique effectué précédemment, la calotte sphérique accessible aux liens correspond à 1/11 de la surface de la bille, la distance de formation des chaînes  $h_f$  étant de 20 nm. La concentration de la suspension de billes est de 0,13 %, ce qui veut dire qu'il faut donc une concentration initiale en ADN de  $5.10^{-9}M$  pour avoir 11 molécules d'ADN par bille, soit en moyenne 1 lien entre deux billes.

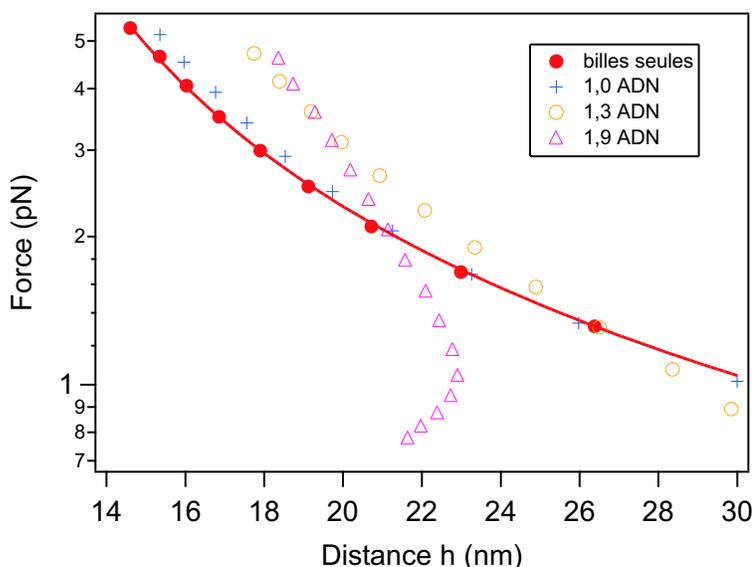


FIG. 2.17 – Profils force-distance pour des ADN 151 pb dans le tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3% en fonction du nombre de liens entre les billes.

Il faut au moins 1,9 liens entre deux billes pour que le profil ait une allure caractéristique de billes liées : lorsque le champ magnétique diminue, la distance inter-billes reste constante ou diminue légèrement. Une observation au microscope optique après la fin de l'expérience montre que de longues chaînes se sont formées dans l'échantillon (fig. 2.18B). Par contre lorsque l'on veut se rapprocher du lien unique, les profils de force n'ont plus l'allure caractéristique attendue ("profil rentrant"). On remarque dans ce cas que l'on ne forme plus de longues chaînes (fig. 2.18A) mais de petits agrégats. En fait, on a en moyenne un lien entre deux billes, ce qui veut dire qu'il y a des endroits dans la chaîne formée sous champ où il n'y en a pas et des endroits où il doit y en avoir deux. La distance mesurée sous champ est donc une moyenne entre des billes liées (distance plus faible) et des billes non liées (distance plus grande) et cela est d'autant plus vrai pour les faibles champs lorsque l'on est en régime d'extension puisque la différence de distance peut alors être grande entre des billes liées ou non. Ces profils de force ne sont donc pas exploitables. Il faudra utiliser les profils de forces avec un nombre plus important d'ADN entre deux billes et tenir compte de ce nombre de liens dans les calculs.

Pour chaque ADN de taille différente, nous avons donc mesuré les profils de forces à différentes

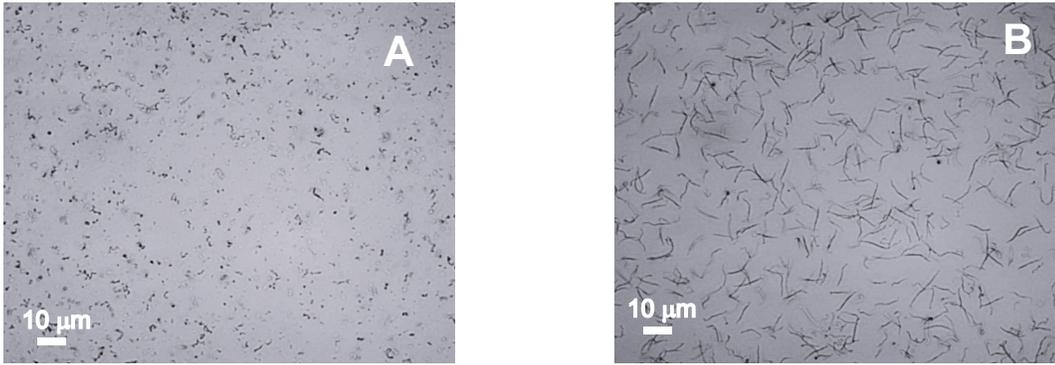


FIG. 2.18 – A : Cliché de microscopie optique pris à la fin de l'expérience de mesure de force pour 1 lien entre chaque bille (objectif x40) ; B : Cliché de microscopie optique pris à la fin de l'expérience de mesure de force pour 1,9 liens entre chaque bille (objectif x40).

concentrations en ADN en vérifiant toujours que l'on formait de longues chaînes et qu'il n'y avait pas de billes isolées dans l'échantillon. Nous avons ensuite utilisé ces expériences pour remonter aux propriétés mécaniques de l'ADN en tenant compte du nombre de liens moyens entre les billes.

## 2.5 Mesure de l'élasticité de molécules d'ADN courtes

L'élasticité de l'ADN a déjà été mesurée par de nombreuses expériences (chap. 2.3), c'est pourquoi nous la mesurons également pour valider notre nouvelle méthode et tester ses limites. Cela permettra ensuite de l'utiliser pour d'autres petits objets (biomolécules courtes, polymères semiflexibles...).

### 2.5.1 ADN de 151 paires de bases

#### Expériences et résultats

Les profils de forces sont mesurés pour un nombre de liens entre les billes supérieur ou égal à 1,9. Puis la contribution de l'ADN est calculée en soustrayant le profil de force des billes seules au profil de force des billes en présence de l'ADN selon l'équation (2.22) (fig. 2.19).

On remarque tout d'abord, que la distance au repos  $h_0$ , à laquelle la force s'annule, varie légèrement de façon non monotone. Cela est dû à l'erreur inter-expérience qui est d'environ 1 nm. Cette erreur pourrait être gênante puisque l'on soustrait les résultats de deux expériences différentes mais nous avons vérifié que le modèle était assez robuste pour pouvoir translater la courbe de mesure de 1 nm dans un sens ou dans l'autre. C'est plutôt la pente de cette courbe qui est importante et non sa position.

La distance au repos est en moyenne de  $22 \pm 1$  nm. Celle-ci dépend de la façon dont sont accrochés les ADN entre deux billes, c'est à dire de leur orientation par rapport à l'axe des billes. Lorsque la force s'annule, cela veut dire que la somme des forces exercées par les ADN entre les deux billes est nulle.

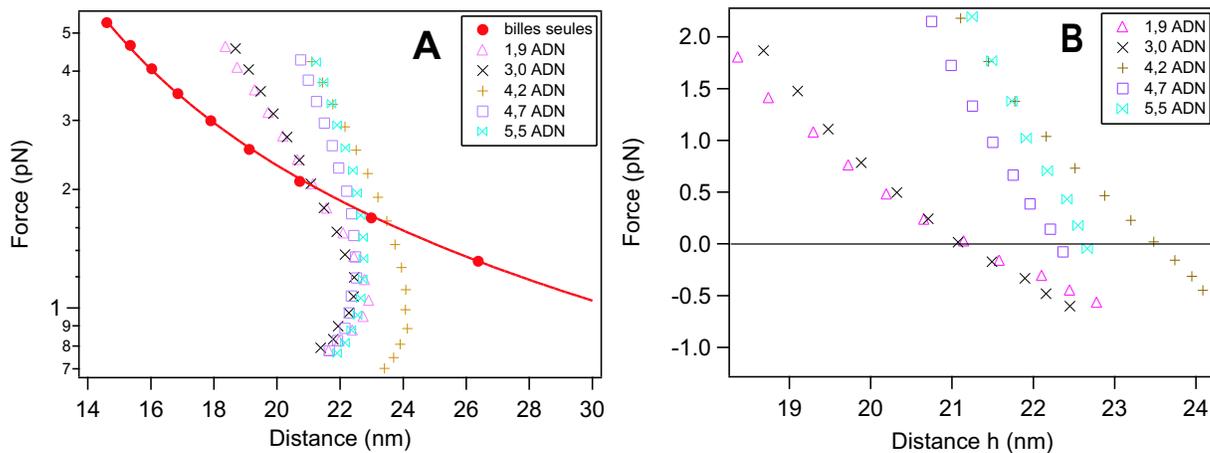


FIG. 2.19 – A : Profils force-distance pour des ADN 151 pb dans le tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3% en fonction du nombre de liens entre les billes. B : Contribution de l'ADN en fonction du nombre de liens entre les billes :  $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$ .

Pour pouvoir exploiter ces résultats il va falloir tenir compte de toutes les orientations possibles de l'ADN entre les deux billes et du nombre de liens entre les billes.

### Modélisation des résultats

A notre connaissance, il n'existe pas de modèle prédisant l'extension d'un polymère semi-flexible en fonction d'une force extérieure pour des longueurs proches de sa longueur de persistance. Cependant, un tel ADN ayant un comportement proche d'un bâtonnet, on va utiliser le modèle de MacKintosh [7], valable pour des polymères de longueur inférieure à leur longueur de persistance.

Pour pouvoir modéliser nos résultats, il faut garder à l'esprit que l'on réalise plusieurs expériences en parallèle et donc que l'on mesure directement une contribution moyenne sur un grand nombre de configurations possibles.

Il faut tout d'abord tenir compte des différentes façons dont un ADN peut être attaché entre deux billes et établir une relation entre sa longueur  $L$  et la distance interparticule mesurée  $h$ . On pourra ainsi calculer la force moyenne  $\langle F \rangle$  qu'exerce un lien entre deux billes, pondérée par toutes les orientations possibles. Puis, il faut tenir compte du nombre de liens entre deux billes. La force exercée par  $n$  liens entre deux billes sera donc :

$$F_{tot} = n \langle F \rangle \quad (2.25)$$

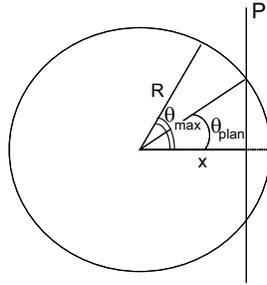
**Orientations possibles du lien :** Pour simplifier le calcul, on utilise les approximations suivantes décrites sur la figure (2.20) :

1. Les surfaces des billes sont assimilées à des plans que l'on place de façon à séparer la calotte de sphère sur laquelle l'ADN peut coller, en deux surfaces égales, situées à l'avant et à

l'arrière de ces plans. La symétrie du problème est alors changée et grandement simplifiée. Le système est invariant par rotation autour de n'importe quel axe normal aux surfaces. L'orientation d'un lien est donc entièrement définie par l'angle  $\varphi$  qu'il réalise avec cette normale.

2. Nous négligeons de plus les effets de bord sur la surface en regard ( $P_2$ ) : nous supposons que tout lien dont l'extrémité appartient au disque, défini par l'intersection de la sphère  $S_1$  avec le plan ( $P_1$ ), peut coller sur la surface en regard, s'il fait un angle  $\varphi$  inférieur à  $\varphi_{max}$  avec la normale aux plans, où  $\cos\varphi_{max} = \delta/L_c$ .

Calcul de la distance  $\delta$ , position du plan :



La position du plan d'approximation est définie de telle sorte qu'il sépare la calotte de sphère réelle en deux surfaces d'aires égales. Le plan d'approximation et la calotte de sphère réelle sont définis par les angles  $\theta_{plan}$  et  $\theta_{max}$  respectivement, il vient :

$$A(\theta_{max}) = 2 * A(\theta_{plan}) \quad (2.26)$$

$$2\pi R^2(1 - \cos\theta_{max}) = 2 * 2\pi R^2(1 - \cos\theta_{plan}) \quad (2.27)$$

d'où

$$\cos\theta_{plan} = \frac{1 + \cos\theta_{max}}{2} = \frac{x}{R} \quad (2.28)$$

Il vient donc :

$$\delta = h + R(1 - \cos\theta_{max}) \quad (2.29)$$

avec  $\cos\theta_{max} = (h_f + 2R - L_C)/2R$ .

**Calcul de la force moyenne sur toutes les orientations possibles  $\langle F \rangle_\varphi$  :**

La formule de MacKintosh [7] relie la force  $F$  appliquée, à l'extension de la molécule :

$$F = -90k_B T \cdot L_p^2 \frac{L - L_0}{L^4} \quad (2.30)$$

où  $L_p$  est la longueur de persistance,  $L_0$  est la longueur naturelle de l'ADN (en présence des fluctuations thermiques) et  $L$  est la longueur réelle de l'ADN sous tension.

Lorsque l'ADN fait un angle  $\varphi$  avec l'axe de la chaîne, sa longueur est  $L = \delta/\cos\varphi$ . De plus, on

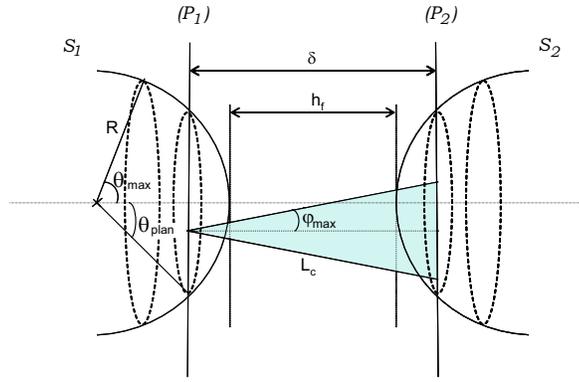


FIG. 2.20 – Schéma de collage de l'ADN entre les billes. L'angle  $\theta_{max}$  définit la limite de la calotte de sphère sur laquelle les ADN peuvent se coller et dépend de la distance  $h_f$  entre les particules au moment de la formation des chaînes :  $\cos\theta_{max} = (h_f + 2R - L_C)/2R$ .  $\delta$  représente la distance entre les plans de l'approximation.  $\varphi_{max}$  définit l'angle maximal de collage d'un ADN lorsque celui-ci est étendu à sa longueur contour  $L_C$ .

s'intéresse à la réponse dans la direction parallèle à l'axe des billes :

$$F_{//}(\varphi) = -90k_B T \cdot L_p^2 \frac{\frac{\delta}{\cos\varphi} - L_0}{\left(\frac{\delta}{\cos\varphi}\right)^4} \quad (2.31)$$

La moyenne sur toute les orientations possibles, entre  $\varphi_{max}$  et  $-\varphi_{max}$ , avec  $\varphi_{max} = \arccos(\delta/L_C)$  s'écrit :

$$\langle F \rangle_\varphi = -\frac{90k_B T \cdot L_p^2}{2\varphi_{max}} \int_{-\varphi_{max}}^{\varphi_{max}} \left( \frac{1}{\delta^3} \cos^4 \varphi - \frac{L_0}{\delta^4} \cos^5 \varphi \right) d\varphi \quad (2.32)$$

Finalement :

$$\boxed{\begin{aligned} F_{tot} &= n \langle F \rangle_\varphi \\ \langle F \rangle_\varphi &= -\frac{90k_B T \cdot L_p^2}{\varphi_{max}} \left[ \frac{1}{\delta^3} \left( \frac{3}{8} \varphi_{max} + \frac{1}{4} \sin 2\varphi_{max} + \frac{1}{32} \sin 4\varphi_{max} \right) \right. \\ &\quad \left. - \frac{L_0}{\delta^4} \left( \frac{5}{8} \sin \varphi_{max} + \frac{5}{48} \sin 3\varphi_{max} + \frac{1}{80} \sin 5\varphi_{max} \right) \right] \end{aligned}} \quad (2.33)$$

L'expression (2.33) représente la force pour un lien d'ADN entre deux billes. Lorsque plusieurs molécules travaillent en parallèle, la force moyenne est multipliée par le nombre de liens  $n$ . On a alors  $F_{tot} = n \langle F \rangle_\varphi$ . On remarque cependant que les courbes ne sont pas tout a fait homothétiques, cela est dû à l'erreur de 1 nm environ sur la distance entre deux expériences. Mais les courbes peuvent toutes être modélisées avec des valeurs de longueur de persistance proches, ce qui montre que le modèle est suffisamment robuste.

Les courbes de la figure 2.21 sont modélisées par  $F_{tot}$  en tenant compte du nombre de liens  $n$  moyen entre deux billes. On obtient alors pour chaque courbe une longueur de persistance et une

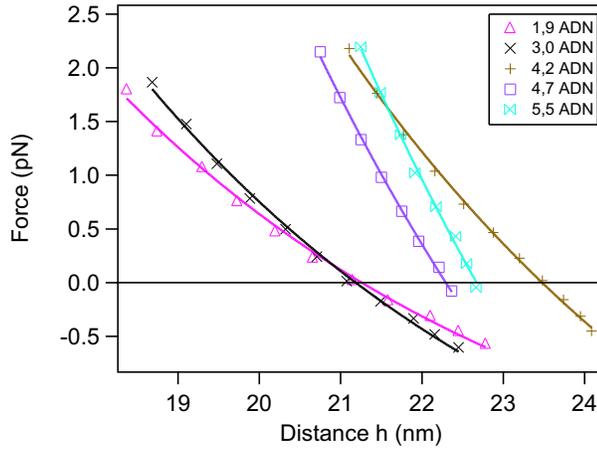


FIG. 2.21 – B : Contribution de l'ADN en fonction du nombre de liens entre les billes :  $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$ . Les lignes pleines correspondent à la modélisation des expériences en utilisant l'expression de Mackintosh prenant en compte la géométrie de l'expérience (equation 2.33).

longueur au repos correspondant à la longueur naturelle d'un ADN (en présence des fluctuations thermiques, table 2.1).

Nombre de liens	$L_p$	$L_0$
1,9	45,6 nm	39,7 nm
3,0	40,0 nm	39,7 nm
4,2	42,8 nm	41,8 nm
4,7	48,6 nm	40,6 nm
5,5	48,6 nm	41,0 nm

TAB. 2.1 – ADN 151 pb : Résultats obtenus après modélisation des forces dues à l'ADN de la figure (2.19). Les seuls paramètres libres sont  $L_p$  et  $L_0$ .

Si l'on fait la moyenne sur toutes les expériences réalisées, on obtient une longueur de persistance de  $45 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  et une longueur naturelle de l'ADN de  $41 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ .

Les différentes expériences de mesure de force en molécules uniques (chap. 2.3) déjà réalisées ont donné une longueur de persistance de  $50 \text{ nm}$ , ce qui est proche du résultat que l'on obtient. Mais toutes ces expériences ont utilisé des ADN longs et ont donc été modélisées par des lois de types WLC. De plus, nous avons vu (chap. 2.2, eq. (2.13)) que la longueur naturelle d'un ADN de  $150 \text{ pb}$  agité par des fluctuations thermiques est de  $86 \%$  de sa longueur contour, soit  $44 \text{ nm}$ , ce qui est proche de la longueur au repos déduite de nos expériences.

Nous avons donc montré que nous pouvons utiliser les chaînes magnétiques permanentes pour mesurer la flexibilité de petits objets. Nous allons maintenant faire varier la longueur de notre ADN afin de définir les limites de cette technique.

### 2.5.2 Variation de la longueur de l'ADN

Des expériences similaires sont effectuées pour les autres longueurs d'ADN de 76 pb, 109 pb et 315 pb.

#### ADN de 76 paires de bases

Pour l'ADN le plus court (76 pb, 26 nm), la surface de liaison possible entre deux billes est très petite, il faudra donc au moins 60 ADN par billes pour avoir 1 lien entre 2 billes. On obtient un profil de force caractéristique des chaînes permanentes pour 1 et 2 liens en moyenne entre les billes (fig. 2.22A). Par contre, la distance ne varie pratiquement pas avec la force appliquée et l'erreur sur la distance est donc trop importante pour calculer une contribution raisonnable de l'ADN (fig. 2.22B).

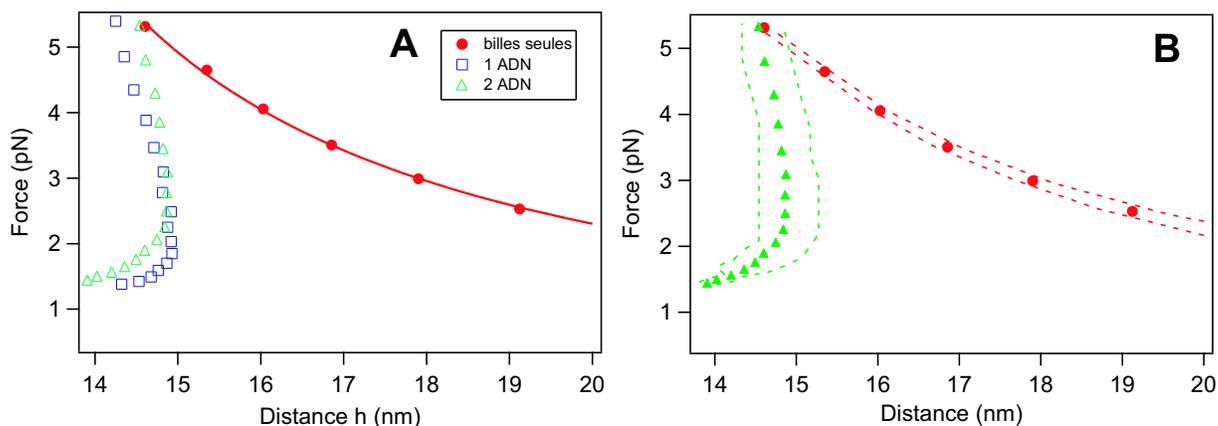


FIG. 2.22 – ADN 76 pb, tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3%. A : Profils force-distance en fonction du nombre de liens entre les billes ; B : Calcul de l'erreur pour le profil correspondant à 2 liens.)

En fait, la distance de formation des chaînes est pratiquement égale à la longueur contour de l'ADN ; donc lorsque celui-ci réagit avec la deuxième bille, il est déjà à son extension maximale. Les forces de répulsion des billes ne sont pas assez fortes pour tirer les liens au delà de leur longueur contour. Il faudrait des forces supérieures à 60 pN (chap.2.3). Ces expériences montrent également que les points d'accroche de l'ADN (streptavidine) sont proches de la couche réticulée du polymère et ne sont pas situés sur les "cheveux" de polymère à la surface des billes car si c'était le cas, on observerait la flexibilité de ces liens en tirant dessus.

De plus, il n'est pas non plus possible de travailler en compression car les billes sont trop petites et donc pas assez magnétisables pour appliquer une force attractive plus importante.

L'ADN de 76 pb est donc trop court pour mesurer sa flexibilité par cette méthode.

#### ADN de 109 paires de bases

Pour l'ADN de 109 pb, il faut environ 18 ADN par bille pour avoir en moyenne 1 lien entre deux billes si  $h_f=19$  nm. Les profils de forces sont mesurés pour 1,1 à 3,8 ADN / bille. Lorsque le

nombre d'ADN entre deux billes est inférieur à 2,2, on ne forme que de petites chaînes, les profils ne sont donc pas exploitables (fig. 2.23A). Le nombre d'ADN minimum qu'il faut est légèrement supérieur à celui de l'ADN 151 bp. En effet pour 1,9 ADN/billes on est à la limite alors que pour l'ADN de 151 pb, on avait déjà de longues chaînes. Cette différence est certainement due à l'erreur sur la concentration.

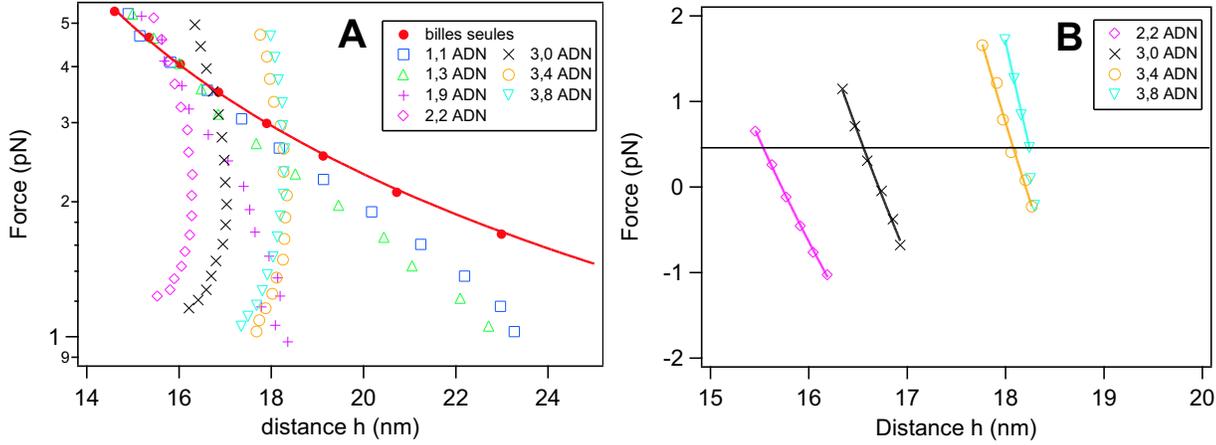


FIG. 2.23 – ADN 109 pb, tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3%. A : Profils force-distance en fonction du nombre de liens entre les billes ; B : Contribution de l'ADN en fonction du nombre de liens entre les billes :  $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$ . Les lignes pleines correspondent à la modélisation des expériences en utilisant l'expression de Mackintosh et en faisant quelques considérations géométriques (équation (2.33)).

La contribution de l'ADN est calculée en soustrayant le profil de force des billes seules au profil de force en présence d'ADN et les courbes obtenues (fig. 2.23B) sont modélisées par  $F_{tot} = n \langle F \rangle_{\varphi}$  où  $\langle F \rangle_{\varphi}$  est donnée par l'équation (2.33). Les résultats sont présentés dans le tableau 2.2. La moyenne des expériences correspond à une longueur de persistance de  $51 \pm 8$  nm et une longueur au repos de  $29 \pm 2$  nm. La longueur théorique d'un ADN de cette longueur, agité par des fluctuations thermiques, est de 32 nm, légèrement supérieure à  $L_0$  mesuré.

Nombre de liens	$L_p$	$L_0$
2,2	46,5 nm	27,2 nm
3,0	46,0 nm	28,2 nm
3,4	52,9 nm	29,6 nm
3,8	58,4 nm	29,7 nm

TAB. 2.2 – ADN 109 pb : Résultats obtenus après modélisation des forces dues à l'ADN de la figure (2.23B). Les seuls paramètres libres sont  $L_p$  et  $L_0$ .

L'erreur sur la longueur de persistance est plus importante dans le cas d'un ADN de 109 pb que dans le cas de l'ADN de 151 pb car les profils mesurés ne font que 1 ou 2 nm d'amplitude, ce qui est très peu, si l'on considère l'erreur sur la distance qui est de  $\pm 0.5$  nm pour ces expériences (fig. 2.24). De plus, la variation du nombre d'ADN entre les différentes expériences est plus faible

car la calotte de sphère concernée est plus petite.

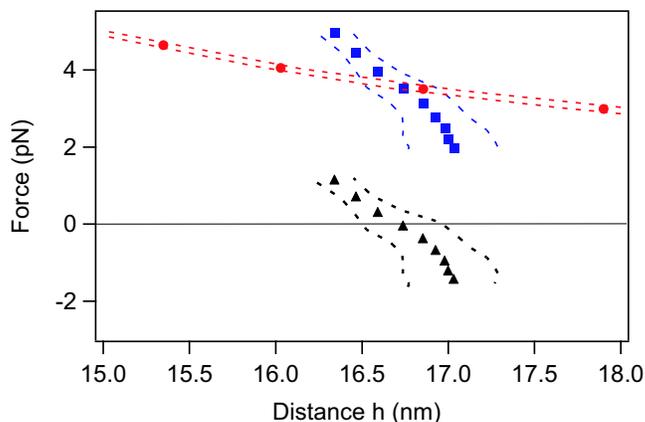


FIG. 2.24 – ADN 109 pb 3 liens, tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3%; Profils de forces avec calcul d'erreur :  
 ● : billes seules, ■ : billes + ADN, ▲ :  
 $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$

L'ADN de 109 pb est donc également un peu court pour la mesure de l'élasticité car l'erreur sur la mesure est importante.

### ADN de 315 paires de bases

La taille de l'ADN de 315 pb (107 nm) est assez importante comparée à la taille de la bille (176 nm de diamètre), la surface de la bille accessible au pontage pour cet ADN long est donc très importante ( $h_f \sim 24$  nm). En effet, il suffit de 4 ADN/bille environ pour considérer que l'on a en moyenne une liaison entre deux billes. Cela correspond à une concentration en ADN de  $1,8 \cdot 10^{-9}$  M pour une suspension de billes à 0,13 %. Pour les expériences réalisées, le nombre de liens varie cette fois-ci entre 1 et 6,1 liens par bille en moyenne.

Plus précisément, on forme de longues chaînes de particules à partir du moment où l'on a 3 liens entre deux billes voisines (fig. 2.25A). Pour 1 et 1,8 ADN entre deux billes, le profil n'est pas caractéristique de chaînes liées.

La contribution de l'ADN est calculée pour les expériences comprenant plus de 3 liens. Cette fois-ci, la longueur de l'ADN correspond à plus de deux fois la longueur de persistance de l'ADN, et l'on ne peut plus modéliser les courbes avec l'équation de MacKintosh car on s'éloigne maintenant beaucoup des conditions d'application de cette loi. De plus, les modèles de type WLC ou FJC utilisés pour les expériences de molécules uniques (chap. 2.3) supposent que la molécule est grande devant sa longueur de persistance et nous ne pouvons pas faire cette approximation ici. Expérimentalement, la mesure de la flexibilité d'un ADN de 315 pb est possible mais il n'y a pas de modèle théorique permettant d'exploiter les résultats pour cette longueur d'ADN.

## 2.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'à partir de la mesure des propriétés mécaniques des chaînes magnétiques, il était possible d'obtenir celles d'un lien d'ADN.

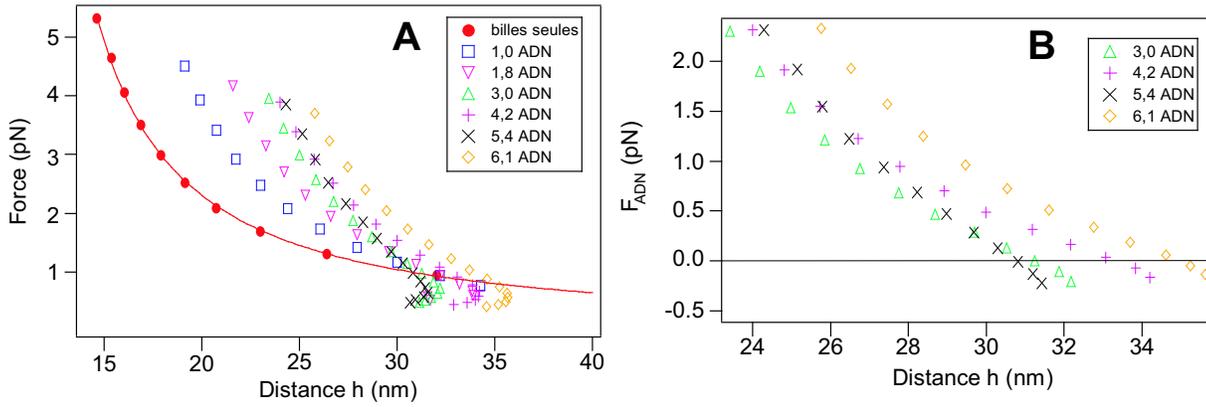


FIG. 2.25 – ADN 315 pb, tampon phosphate 5 mM + F 127 0,3%. A : Profils force-distance en fonction du nombre de liens entre les billes ; B : Contribution de l'ADN en fonction du nombre de liens entre les billes :  $F_{ADN} = F_{billes+ADN} - F_{billesseules}$ .

Bien que nous n'ayons pas mesuré la flexibilité de l'ADN pour un seul lien entre deux billes, nous avons mesuré les propriétés mécaniques de cet ADN pour un faible nombre de molécules à la fois et ceci en mesurant directement une moyenne sur un grand nombre d'événements en parallèle. Nous avons ainsi mesuré la longueur de persistance d'une molécule d'ADN de 109 et de 151 pb, c'est-à-dire dans un régime pour lequel la longueur contour est du même ordre de grandeur que la longueur de persistance. Ce régime n'avait pas été étudié par les méthodes de molécule unique, probablement car les distances en jeu sont trop faibles. Cette méthode nous permettra donc de mesurer la flexibilité de biomolécules de petites tailles (complexes ligand-récepteur par exemple) ou de polymères semi-flexibles, ce qui n'est actuellement pas possible avec les techniques classiques de molécules uniques.

Les gammes de mesure accessibles par notre technique dépendent notamment de la taille des particules utilisées et de leur interactions répulsives. Ainsi, des ADN de taille inférieure à 30 nm sont trop courts, car les forces magnétiques ne sont pas suffisamment importantes pour pouvoir les comprimer ; pour cela il faudrait augmenter la taille de la bille. Par contre, on pourra certainement comprimer des objets assez gros (il a été possible de comprimer une molécule d'ADN de 107 nm).

# Bibliographie

- [1] J.D. Watson and F.H.C. Crick. Molecular structure of Nucleic acids. A structure for Deoxy-ribose Nucleic Acid. *Nature*, 171 :737–738, 1953.
- [2] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.*, 68 :1106, 1949.
- [3] P. J. Flory. Moments of the End-to-End Vector of a Chain Molecule, Its Persistence and Distribution. *PNAS USA*, 70(6) :1819–1823, 1973.
- [4] G. Champetier and L. Monnerie. *Introduction à la chimie macromoléculaire*. Masson et Cie., 1969.
- [5] L. D. Landau and E. M. Lifshitz. *Théorie de l'élasticité*. Editions Mir, Moscou, 1990.
- [6] J. F. Marko and E. D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26) :8759–8770, 1995.
- [7] F.C. MacKintosh, J. Käs, and P. A. Janmey. Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Phys. Rev. Lett.*, 75(24) :4425–4428, 1995.
- [8] H. Eisenberg. DNA flexing, folding and function. *Acc. Chem. Res.*, 20(8) :276–282, 1987.
- [9] R. T. Kovacic and K. E. Van Holde. Sedimentation of homogeneous double-stranded DNA-molecules. *Biochemistry*, 16(7) :1490–1498, 1977.
- [10] E. Fredericq and C. Houssier. *Electric Dichroism and Electric Birefringence*. Clarendon, Oxford, 1973.
- [11] C. Frontali, E. Dore, A. Ferrauto, E. Gratton, A. Bettini, M. R. Pozzan, and E. Valdevit. An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs. *Biopolymers*, 18(6) :1353–1373, 1979.
- [12] D. Shore, J. Langowski, and R. L. Baldwin. DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *PNAS USA*, 78 :4833, 1981.
- [13] A. N. Glazer and H. S. Rye. Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection. *Nature*, 359 :859–861, 1992.
- [14] T.W. Houseal, C. Bustamante, R. F. Stump, and M.F. Maestre. Real-time imaging of single DNA molecules with fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 56 :507–516, 1989.
- [15] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.*, 72 :1335–1346, 1997.
- [16] G. J. L. Wuite, S. B. Smith, M. Young, D. Keller, and C. Bustamante. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature*, 404 :103–106, 2000.

- [17] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA : an extensible molecule. *Science*, 271 :792–794, 1996.
- [18] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophysical Journal*, 78 :1997–2007, 2000.
- [19] G. U. Lee, L. A. Chrisley, and R. J. Colton. Direct measurements of the forces between complementary strands of DNA. *Science*, 266 :771–773, 1994.
- [20] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74 :2016–2028, 1998.
- [21] J. F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and D. Chatenay. Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *PNAS USA*, 95 :14152–14157, 1998.
- [22] T. R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404 :901–904, 2000.
- [23] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258 :1122–1126, 1992.
- [24] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. Entropic Elasticity of Lambda-Phage DNA. *Science*, 265(5178) :1599–1600, 1994.
- [25] F. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, and et al. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys. J.*, 76 :409–413, 1999.
- [26] C. Baumann, S. Smith, V. Bloomfield, and C. Bustamante. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *PNAS USA*, 94 :6185–6190, 1997.
- [27] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 265 :2096–2098, 1994.
- [28] D. Bensimon, A. J. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon. Stretching DNA with a receding meniscus : Experiments and models. *Phys. Rev. Lett.*, 74(23) :4754–4757, 1995.
- [29] S. B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA : the elastic reponse of individual double-stranded DNA molecules. *Science*, 271 :795–799, 1996.
- [30] A. Lebrun and R. Lavery. Modelling extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 24(12) :2260–2267, 1996.
- [31] C. Bustamante, Z. Bryant, and S. B. Smith. Ten years of tension : single-molecule DNA mechanics. *Nature*, 421 :423–427, 2003.
- [32] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA-molecules. *Nature Struct. Biol.*, 6 :346–349, 1999.
- [33] M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA : Evidence of force-induced DNA melting. *Biophys. J.*, 80 :874–881, 2001.

- [34] M. C. Williams, J. R. Wenner, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophys. J.*, 80 :1932–1939, 2001.
- [35] J. R. Wenner, M. C. Williams, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophys. J.*, 82 :3160–3169, 2002.
- [36] I. Rouzina and V. A. Bloomfield. Force-induced melting of the DNA double helix. 1. Thermodynamic analysis. *Biophys. J.*, 80 :882–893, 2001.
- [37] I. Rouzina and V. A. Bloomfield. Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions. *Biophys. J.*, 80 :894–900, 2001.
- [38] T.R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, and et al. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271 :1835–1837, 1996.
- [39] J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. Stretching DNA and RNA to probe their interactions with proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(3) :266–274, 2003.
- [40] J. F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J. F. Marko. Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 83(5) :1066–1069, 1999.
- [41] A. Sarkar, J. F. Leger, D. Chatenay, and J. F. Marko. Structural transitions in DNA driven by external force and torque. *Physical Review E*, 6305(5), 2001. Part 1.
- [42] B. Maier, T. R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Study of DNA motors by single molecule micromanipulation. *Single Mol.*, 1(2) :145–151, 2000.
- [43] R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald, and D. Anselmetti. Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes. *Biophysical Journal*, 85(3) :1968–1973, 2003.
- [44] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, and J. Gelles. Transcription against an Applied Force. *Science*, 270(5242) :1653–1657, 1995.
- [45] R. J. Davenport, G. J. L. Wuite, R. Landick, and C. Bustamante. Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. coli RNA polymerase. *Science*, 287 :2497–2500, 2000.
- [46] N. R. Forde, D. Izhaky, G. R. Woodcock, G. J. L. Wuite, and C. Bustamante. Using mechanical force to probe the mechanism of pausing and arrest during continuous elongation by Escherichia coli RNA polymerase. *PNAS USA*, 99(18) :11682–11687, 2002.
- [47] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, 282 :902–907, 1998.
- [48] F. Leal Calderon, T. Stora, O. Mondain Monval, P. Poulin, and J. Bibette. Direct measurement of colloidal forces. *Phys. Rev. Lett.*, 72(18) :2959–2962, 1994.
- [49] O. Mondain Monval, F. Leal Calderon, J. Philip, and J. Bibette. Depletion forces in the presence of electrostatic double layer repulsion. *Phys. Rev. Lett.*, 75(18) :3364–3367, 1995.

- [50] O. Mondain Monval, F. Leal Calderon, and J. Bibette. Forces between emulsion droplets : role of surface charges and excess surfactant. *J. de Phys. II*, 6(9) :1313–1329, 1996.
- [51] O. Mondain Monval, A. Espert, P. Omarjee, J. Bibette, F. Leal Calderon, J. Philip, and J.-F. Joanny. Polymer-induced repulsive forces : exponential scaling. *Phys. Rev. Lett.*, 80(8) :1778–1781, 1998.
- [52] J. Philip, O. Mondain Monval, F. Leal Calderon, and J. Bibette. Colloidal force measurements in the presence of a polyelectrolyte. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 30 :2798–2803, 1997.
- [53] J. Philip, G. Gnana Prakash, T. Jaykumar, P. Kalyanasundaram, O. Mondain Monval, and B. Raj. Interaction between Emulsion Droplets in the presence of polymer-surfactant complexes. *Langmuir*, 18(12) :4625–4631, 2002.
- [54] T. D. Dimitrova and F. Leal Calderon. Forces between emulsion droplets stabilized with tween 20 and proteins. *Langmuir*, 15 :8813–8821, 1999.
- [55] J. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, San Diego, second edition, 1991.

## Chapitre 3

# Cinétique de formation des liens

La formation et la dissociation d'interactions spécifiques non covalentes entre des récepteurs et des ligands, joue un rôle important dans le fonctionnement des cellules. Les complexes ainsi formés permettent notamment l'adhésion de ces cellules à des surfaces (autres cellules, biomatériaux...). Il est donc important de comprendre les mécanismes de reconnaissance moléculaire entre des surfaces.

Depuis quelques années, des expériences basées sur la micromanipulation (par des micropipettes, [1, 2]), les flux hydrodynamiques [3] ou l'AFM [4], ont permis la visualisation directe du détachement des surfaces (liées par quelques molécules seulement) sous l'effet de forces extérieures, permettant ainsi d'estimer le temps de vie des complexes en fonction de la force appliquée.

Cependant, il est plus difficile de mesurer la formation de liaisons car il faut contrôler précisément l'approche des surfaces (distances de réaction, forces appliquées, et temps de contact). De plus les constantes mesurées à deux dimensions ne sont pas comparables à des constantes tridimensionnelles de formation de liens car la présence des surfaces joue un rôle important et le mécanisme de réaction n'est pas encore bien compris.

Chesla *et al.* [5] ont mesuré des cinétiques de formation de liaison par la méthode des micropipettes pour un faible nombre de molécules. Cependant cette technique ne permet pas de contrôler la distance entre les surfaces. D'autres études à l'aide d'un flux hydrodynamique [6] ont montré que ces cinétiques de formation à deux dimensions dépendent des propriétés moléculaires comme la longueur et la flexibilité. Enfin, en comparant l'adhésion de vésicules sur des surfaces, Cuvelier *et al.* [7] ont montré que l'état de la surface et l'accessibilité du ligand sont également très importants.

Nous nous proposons d'utiliser nos assemblages colloïdaux pour mesurer la cinétique de formation du complexe biotine-streptavidine à deux dimensions, dans le cas où la biotine est attachée à la surface par l'intermédiaire de l'espaceur qu'est la molécule d'ADN.

Plus précisément, nous nous placerons à faible concentration d'ADN pour s'assurer qu'il y a au maximum un ligand entre deux billes et nous mesurerons uniquement la formation de doublets permanents. Comme nous l'avons déjà vu au chapitre précédent, cette technique nous permet de contrôler la distance entre les billes. Nous pourrions donc mesurer l'influence de la distance et de la taille de l'espaceur en fonction de la distance entre les billes.

### 3.1 Etudes cinétiques du couple streptavidine-biotine : État de l'art

Dans un premier temps, nous décrirons la cinétique des réactions réversibles en solution (à trois dimensions) et sur des surfaces (à deux dimensions) puis nous nous intéresserons plus particulièrement à la cinétique et à la thermodynamique du couple streptavidine-biotine et présenterons les expériences déjà effectuées avec ce complexe.

#### 3.1.1 Cinétique des réactions spécifiques ligand-récepteur

Les interactions ligands-récepteurs sont des interactions spécifiques dues à plusieurs liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes entre le site de reconnaissance du récepteur et le ligand. L'énergie de formation de ce type de liaison est inférieure à celle d'une liaison covalente et elles sont réversibles.

La réaction qui lie les récepteurs et les ligands peut être décomposée en deux étapes, la première correspond à la rencontre de ces deux molécules, et la deuxième correspond à la liaison proprement dite. En solution, on peut donc la décrire de la façon suivante :



où  $d_+$  et  $d_-$  sont les constantes de vitesse associées à la rencontre et à la séparation des deux molécules et  $r_+$  et  $r_-$  sont les constantes de vitesse associées à la formation et à la dissociation du lien.  $AB$  est le complexe de rencontre et  $C$  est l'état lié. Les constantes  $r_+$  et  $r_-$  sont les constantes intrinsèques de la réaction et ne dépendent que des propriétés moléculaires du ligand et du récepteur alors que les constantes  $d_-$  et  $d_+$  dépendent de la diffusion et des contraintes géométriques de l'expérience. En solution, ces constantes sont liées à la diffusion des deux molécules l'une par rapport à l'autre selon une loi décrite par Smoluchowski pour l'agrégation de particules colloïdales [8] :

$$d_+ = 4\pi(D_A + D_B)R_{AB} \quad (3.2)$$

$$d_- = 3\frac{D_A + D_B}{R_{AB}^2} \quad (3.3)$$

où  $D_A$  et  $D_B$  sont les coefficients de diffusion des molécules A et B et  $R_{AB}$  est la distance de réaction, il vient :

$$K_d = \frac{d_+}{d_-} = \frac{4\pi}{3}R_{AB}^3 \quad (3.4)$$

Dans la plupart des cas, le complexe de rencontre est présent en faible quantité et on peut considérer sa concentration comme constante (approximation de l'état quasi-stationnaire), on peut donc écrire  $d[AB]/dt = 0$ . D'où

$$k_+ = \frac{d_+r_+}{d_- + r_+} \quad (3.5)$$

et

$$k_- = \frac{d_- r_-}{d_- + r_+} \quad (3.6)$$

La constante d'association de la réaction  $K_a = k_+/k_- = K_d \cdot r_+/r_-$  est indépendante des coefficients de diffusion des molécules. Par contre les constantes de vitesses dépendent toutes deux de ces coefficients. Ainsi, si  $r_+ \gg d_-$ , alors les molécules qui se rencontrent ont beaucoup plus de chance de réagir que de se séparer et  $k_+ \simeq d_+$ , la réaction est limitée par la diffusion et la constante de dissociation est, elle aussi, proportionnelle aux coefficients de diffusion :  $k_- = d_- r_- / r_+$ . En solution, le mouvement des molécules se fait en volume et les constantes d'affinités sont dites 3D.

Le problème est différent lorsque les récepteurs et les ligands sont accrochés à des surfaces. Le mouvement des molécules est alors limité à deux dimensions et les constantes d'affinités mesurées sont dites 2D. Les "concentrations" deviennent des densités de surface et les unités des constantes de vitesses sont différentes ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour le 2<sup>ème</sup> ordre). Le rapport entre une constante de formation 3D et une constante de formation 2D, est donc un rapport de volume sur une surface et a la dimension d'une longueur. Cette longueur, appelée longueur de confinement [9, 10], était au départ considérée comme caractéristique de la taille des molécules ou de la distance entre les deux surfaces [11] mais le rapport entre les constantes mesurées à 3D et à 2D est souvent de plusieurs ordres de grandeur supérieur à cette distance caractéristique [10]. Ce rapport contient en fait également les contraintes dues à la géométrie de l'expérience, la rugosité des surfaces, l'accessibilité des molécules [7]...

De plus, une force  $F$ , due à la présence des parois, est exercée en permanence sur les molécules liées, qui tend à augmenter leur vitesse de dissociation, tel que [8] :

$$k_- = k_-^\circ \cdot e^{\frac{\gamma F}{kT}} \quad (3.7)$$

où  $k_-^\circ$  est la constante de dissociation en l'absence de force.  $\gamma$  a la dimension d'une longueur et tient compte de la structure de la liaison, elle correspond à peu près à la position du minimum d'énergie de la liaison.

De nombreuses études ont été réalisées pour décrire ces phénomènes pour des couples ligand-récepteur variés. Nous nous intéressons ici uniquement au couple streptavidine-biotine.

### 3.1.2 Application au couple streptavidine-biotine

#### Cinétique en solution et thermodynamique

La streptavidine est une protéine de 64000 Da qui est composée de 4 unités identiques. L'association de la streptavidine avec la biotine est l'une des plus fortes interactions non covalentes connues de type protéine-ligand ( $K_a \approx 10^{13} \text{ M}^{-1}$ )[12, 13]. Des études cristallographiques par rayons X du complexe streptavidine-biotine ont montré que la liaison entre la streptavidine et la biotine est due à plusieurs liaisons hydrogène et interactions hydrophobes. De plus, lorsque la biotine entre dans le site de reconnaissance de la streptavidine, la structure de celle-ci se modifie et une boucle vient refermer le site, emprisonnant ainsi la biotine à l'intérieur de la cavité. Toutes

ces interactions rendent la liaison forte et spécifique. En effet, Chilkoti *et al.* [14] ont utilisé la radioactivité pour mesurer la dissociation lente du complexe streptavidine-biotine. La constante de dissociation est estimée à  $5,6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . Enfin, des mesures de calorimétrie [15] ont permis de déterminer l'énergie libre du complexe biotine-streptavidine, telle que  $\Delta G^\circ = -76,5 \text{ kJ/mol}$ , ce qui correspond à environ 32 kT par liaison (contre 180 kT pour une liaison covalente).

### Etudes expérimentales de l'interaction biotine-streptavidine à l'échelle de la molécule unique

Les études présentées ici, s'intéressent à la streptavidine et à la biotine fixées à des surfaces. Elles permettent donc de mesurer des constantes de cinétique 2D. Les différentes expériences réalisées ne sont pas toujours directement comparables car les constantes mesurées dépendent de la géométrie de l'expérience dans laquelle plusieurs facteurs varient : les degrés de liberté de mouvement des deux molécules, leur diffusion, la gêne stérique due à la présence des surfaces, la présence ou non d'un espaceur...

Distance d'interaction et force de la liaison : La SFA (Surface Force Apparatus) permet de mesurer des forces d'interaction entre des surfaces à l'échelle moléculaire. Deux surfaces de mica sont recouvertes d'une bicouche phospholipidique biotinylée. L'une des deux couches est ensuite recouverte par des molécules de streptavidine (adsorbées de façon spécifique, fig. 3.1). La distance entre les deux surfaces peut être contrôlée avec une résolution de 1 Å et est mesurée au moyen d'un interféromètre. De plus, la force qu'il faut pour rapprocher ou éloigner les deux surfaces est mesurée par l'intermédiaire d'un ressort de raideur variable. L'interaction entre les deux couches est tracée en fonction de la distance (fig. 3.1). Une interaction répulsive faible est observée aux grandes distances, due à la répulsion électrostatique entre les deux surfaces. Pour une distance d'approche d'environ 5 Å, l'attraction entre les surfaces devient plus importante que la raideur du ressort et les deux surfaces "sautent" au contact. Cette distance correspond à la distance à laquelle les deux molécules doivent se trouver pour pouvoir former une liaison. Pour séparer à nouveau les deux surfaces, il faut appliquer une force d'au moins deux ordres de grandeur supérieure à la force qui correspondrait à une interaction de Van der Waals entre les deux surfaces.

La méthode SFA permet de mesurer des forces entre deux surfaces, recouvertes d'un grand nombre de molécules. Un autre montage expérimental a été utilisé pour mesurer la force de la liaison biotine-streptavidine en molécule unique : l'AFM.

L'AFM (Microscope à Force Atomique) permet de mesurer les interactions entre une surface et une pointe très fine. Cela permet donc de mesurer un nombre plus faible de molécules à la fois (moins de 100). Plusieurs équipes [17, 18] ont montré que l'on pouvait ainsi en extraire la force de rupture d'une seule liaison streptavidine-biotine. Ils l'ont estimé à 250 pN. Plus récemment, Wong *et al.* [19] ont mesuré une force de rupture d'environ 200 pN entre une biotine unique liée de façon covalente à l'extrémité d'un nanotube de carbone (lui même accroché à la pointe de l'AFM) et une surface recouverte de streptavidine.

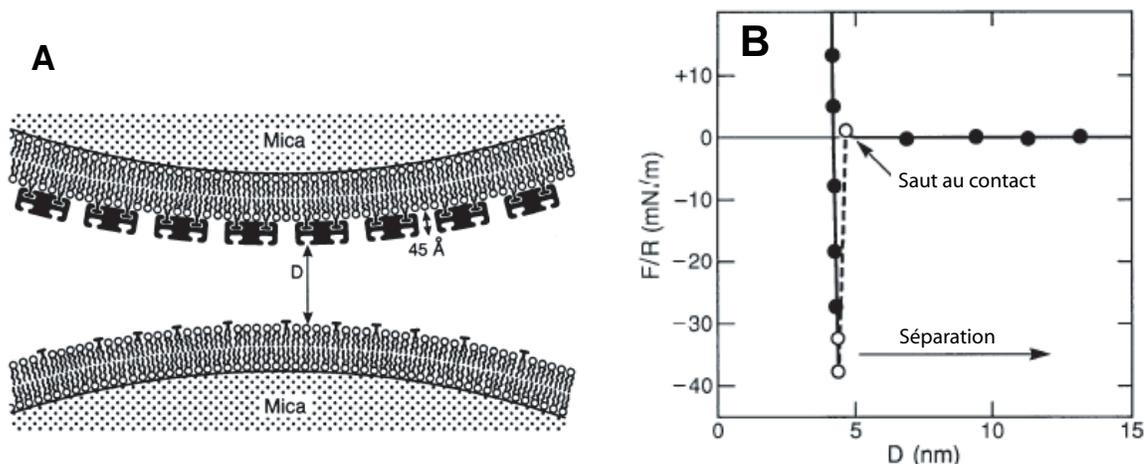


FIG. 3.1 – A : Représentation schématique des surfaces greffées streptavidine et biotine. La streptavidine est adsorbée sur une double couche phospholipidique biotinylée, qui elle-même est adsorbée sur la surface de mica. La streptavidine étant tétravalente, lorsqu'elle est adsorbée à une surface, il reste des sites libres pour l'interaction avec la surface biotinylée opposée. B : Potentiel d'interaction entre les surfaces streptavidine et biotine. Les feuilles de mica sont collées sur des surfaces de silice en forme de cylindres croisés et pour deux cylindres croisés de 1 cm de rayon, la surface de contact est d'environ  $100 \mu\text{m}^2$ . La taille de la surface de contact est proportionnelle au rayon des cylindres, c'est pourquoi la force est toujours normalisée par ce rayon (Extrait de ref. [16]).

Enfin, Merkel *et al.* [2] ont montré que la force d'une liaison de type ligand-récepteur ne dépendait pas uniquement de la force que l'on appliquait mais également de la vitesse à laquelle on applique cette force. Ainsi, la force de rupture est effectivement très importante lorsque l'on tire brutalement dessus (expériences d'AFM) mais la rupture a lieu également à des forces plus faibles si l'on augmente plus lentement la force appliquée. On parle alors de force dynamique de la liaison. En utilisant la méthode des micropipettes (décrite au chap. 2.3), Merkel *et al.* montrent ainsi que la force de liaison varie de 5 pN à 170 pN lorsque la vitesse d'application de la force varie de 0,01 à  $10000 \text{ pN}\cdot\text{s}^{-1}$  (fig. 3.2A).

Merkel *et al.* considèrent que la dissociation de la liaison suit un profil d'énergie en fonction de la distance comprenant plusieurs barrières d'activation à franchir (fig. 3.2B). Comme l'avait prédit Bell [8], l'application d'une force permet d'abaisser ces barrières d'activation et ainsi de diminuer le temps de vie de la liaison. La vitesse de dissociation augmente alors exponentiellement avec la force appliquée (équation (3.7)). Les mesures obtenues par Merkel *et al.* leur ont permis de remonter au profil d'énergie de la liaison streptavidine-biotine. En effet la courbe de la force de rupture en fonction du logarithme de la vitesse d'application de la force est composée de plusieurs segments linéaires (fig. 3.2A) dont la pente peut être définie comme  $k_B T/x_i$  où  $x_i$  représente la distance entre le minimum d'énergie et la  $i^{\text{ème}}$  barrière. Merkel *et al.* ont ainsi détecté deux barrières d'énergie à franchir pour la dissociation de la streptavidine et de la biotine à 0,12 et à

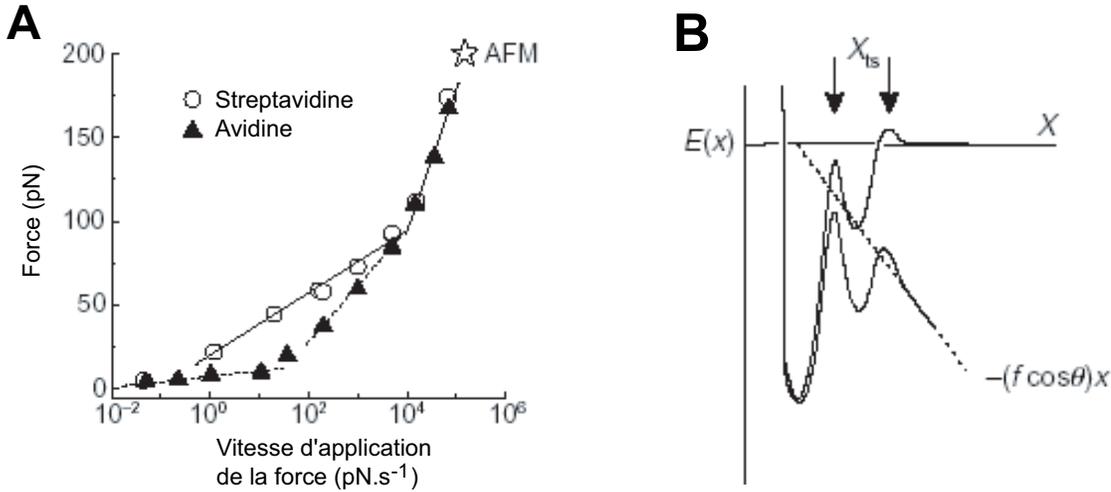


FIG. 3.2 – A : Force dynamique de la liaison streptavidine-biotine (○) et avidine-biotine (▲) en fonction de la vitesse d'application de la force extérieure. Les pentes (définies comme  $k_B T/x_i$ ) du profil streptavidine-biotine donnent la position des barrières d'activation de la dissociation à 0,12 et 0,5 nm. Les mesures effectuées sont en accord avec les mesures précédentes faites en AFM (★) qui correspondent à une vitesse très importante d'application de la force. B : Profil d'énergie schématisé de la dissociation du couple streptavidine biotine en présence d'une force. L'application d'une force extérieure dans la direction  $\theta$  par rapport à l'axe moléculaire, ajoute un potentiel mécanique  $-(f \cos \theta)x$  qui change le profil d'énergie et diminue la hauteur des barrières d'activation. Lorsque la barrière d'activation extérieure est diminuée d'un facteur  $k_B T$  par rapport à la barrière d'activation intérieure, c'est celle-ci qui domine la cinétique. Même si l'orientation des molécules fluctue pendant la dissociation, la position des barrières d'activation reste constante et peut être projetée selon la direction de la force :  $x_i = \langle x_{ts} \cos \theta \rangle$ . Extrait de ref. [2]

0,5 nm.

Utilisation de la chambre à flux : Pierres *et al.* [20, 21] utilisent la chambre à flux pour mesurer la cinétique de formation et de dissociation du lien streptavidine-biotine. La méthode consiste à mesurer la fréquence et la durée des arrêts de billes greffées streptavidine se déplaçant dans un flux à proximité d'une surface recouverte de biotine. Ils observent que la durée des arrêts varie énormément et en déduisent qu'il existe un état intermédiaire d'association de la streptavidine avec la biotine, à partir duquel le couple peut se dissocier avec une fréquence de  $5,3 \text{ s}^{-1}$  ou évoluer spontanément vers un état plus stable avec une fréquence de  $1,3 \text{ s}^{-1}$ .

Adhésion de vésicules sur une surface : Cuvelier *et al.* [7] comparent la cinétique d'étalement d'une vésicule recouverte de streptavidine sur deux types de surface biotinylées. Dans une première série d'expériences, la biotine est greffée à de la caséine, adsorbée sur une surface de verre. Dans une deuxième série d'expériences, la biotine est lié à la surface de verre par l'intermédiaire d'un poly(éthylène glycol) (PEG). Ils observent que la vésicule s'étale plus rapidement dans le cas du PEG que dans le cas de la caséine (de quelques secondes à une dizaine de minutes). Lorsque le

ligand est attaché à la surface par l'intermédiaire d'une molécule flexible (le PEG), la réaction est très rapide et la cinétique est contrôlée par la diffusion des streptavidines à la surface de la vésicule. Par contre, lorsque la streptavidine est greffée à la surface sans espaceur, la cinétique semble contrôlée par la réaction qui est très lente. Ils mettent ainsi en évidence l'importance de l'accessibilité du ligand et montrent que la présence d'un espaceur (ici le PEG) peut contribuer à augmenter la vitesse de réaction.

D'autres expériences ont permis d'explicitier le rôle de l'espaceur dans la reconnaissance moléculaire. Nous les décrivons ci-après.

### 3.1.3 Rôle de l'espaceur

Lorsque le ligand ou le récepteur est attaché à la surface par l'intermédiaire d'une molécule flexible appelée espaceur (polymère par exemple), la vitesse de formation du lien dépend de la dynamique du polymère et de la force de la liaison ligand-récepteur. Wong *et al.* [22, 23] ont utilisé la SFA pour montrer le rôle de l'espaceur. Les molécules de streptavidine sont adsorbées sur l'une des deux surfaces alors que l'autre surface est recouverte de biotines fixées à l'extrémité d'un poly(éthylène glycol) (PEG) de taille variable (fig. 3.3).

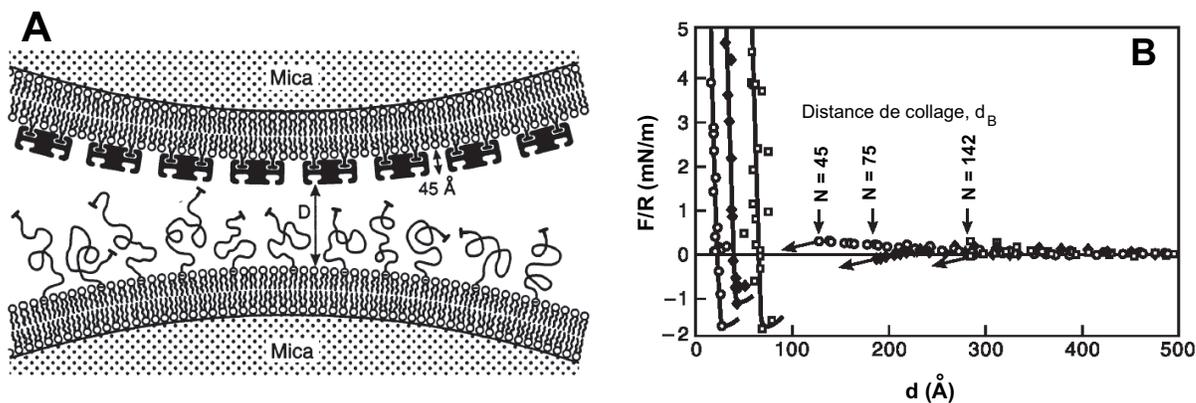


FIG. 3.3 – A : Schéma des surfaces de SFA recouvertes de streptavidine et de PEG-biotinylé. B : Profil force distance expérimental pour des longueurs de PEG de  $N = 45$  (o), 75 (◆) et 142 (□) monomères. Les flèches indiquent la distance  $d_B$  à laquelle les surfaces "sautent" au contact, ce qui a lieu lorsqu'un nombre suffisant de liens s'est formé et que la force élastique de rappel des PEG étirés devient supérieure à la force du ressort de mesure. Extrait de ref. [23]

Alors que Helm *et al.* [16] avaient observé une attraction de très courte portée ( $< 1$  nm) pour des surfaces recouvertes de biotine et de streptavidine, lorsque la biotine est attachée à la surface par l'intermédiaire d'un PEG, on observe une attraction à longue distance. Les polymères explorent toutes les conformations possibles, y compris les conformations les plus étirées et la liaison se produit lorsque les polymères sont proches de leur extension maximale  $L_c$ . Ce résultat est

surprenant puisque les conformations étirées sont beaucoup moins probables que les conformations en pelote avec une distance bout à bout proche du rayon de Flory ( $R_F$ ). La formation d'une liaison entre un récepteur et un ligand lié à un espaceur, dépend de trois facteurs principaux : (i) l'énergie intrinsèque  $E_0$  de la liaison ligand-récepteur, (ii) la taille et la structure moléculaire du ligand, (iii) et la longueur de l'espaceur (qui détermine sa flexibilité). Pour le couple streptavidine-biotine, l'énergie intrinsèque est très importante et on peut considérer la réaction comme irréversible. De plus, la biotine est petite comparée au PEG et a donc une mobilité translationnelle et rotationnelle bien supérieure à celle de l'espaceur. C'est donc le polymère qui joue le rôle le plus important dans la formation de la liaison streptavidine-biotine.

La vitesse de formation des liaisons entre les deux surfaces dépend de la distance  $d$ . En effet, lorsque  $d$  est légèrement inférieure à  $L_c$ , la longueur du polymère, il faut attendre un temps relativement long pour que la liaison ait lieu alors que lorsque  $d$  est proche de  $R_F$ , la liaison est très rapide.

En utilisant la théorie de la diffusion-réaction des polymères, Jeppesen *et al.* [23] montrent que la fraction de molécules liées  $\rho$  varie en fonction de la distance et du temps comme une simple exponentielle :

$$\rho(d, t) = 1 - e^{-t/\tau(d)} \quad (3.8)$$

où  $\tau(d)$ , le temps caractéristique de la réaction, est indépendant de la fréquence rapide de réaction du couple streptavidine-biotine  $q$ , la réaction est considérée comme irréversible. Si le couple ligand-récepteur était plus faible, la réaction deviendrait réversible et on aurait  $\tau(d) \approx 1/q$ . Dans l'expérience de Jeppesen *et al.* [23], le temps  $\tau(d)$  dépend uniquement de la dynamique du polymère. Ces calculs sont en accord avec les expériences effectuées.

Moreira *et al.* [24, 25] ont décrit plus précisément l'équation de diffusion-réaction qui s'applique à ces expériences en tenant compte de la force de la liaison ligand-récepteur, de la taille du polymère et de la vitesse d'approche des deux surfaces. Leur modèle théorique permet de définir tous les cas de figure allant d'une liaison réversible à une liaison irréversible.

Toutes ces expériences ont montré la différence importante entre des cinétiques 3D en solution et des cinétiques 2D pour lesquelles le ligand et le récepteur sont tous les deux fixés à des parois. Il y a, dans la plupart des cas, des interactions importantes entre le récepteur et la paroi. Ces interactions peuvent induire une déformation de la protéine et la liaison spécifique, largement gouvernée par la structure du récepteur, en sera affaiblie. De plus, la présence des parois exerce en générale une force sur cette liaison, qui diminue le temps de vie du complexe. Enfin, les molécules perdent des degrés de liberté de mouvement et donc deviennent moins facilement accessible, ce qui diminue encore la rapidité de la réaction.

Nous avons mesuré la cinétique 2D de formation du complexe biotine-streptavidine. La biotine est attachée par l'intermédiaire d'un espaceur, l'ADN, à la surface d'une bille et la streptavidine est greffée à la surface de la bille voisine. Ces expériences permettent de travailler en molécule unique (un seul ADN biotinylé entre deux billes) tout en faisant la moyenne sur un grand nombre

d'événements. Chaque événement est observé directement puisque lié à la formation d'un doublet de billes.

## 3.2 Techniques de Mesures

Les billes ayant un diamètre inférieur à 200 nm, il est très difficile de les observer directement au microscope optique. La mesure par analyse d'image de la formation de longues chaînes permanentes s'avère donc impossible. De plus, on cherche à mesurer la formation d'un lien d'ADN entre deux billes. Or, lorsque l'on forme de longues chaînes d'ADN, tous les événements ne sont pas indépendants. Autrement dit, la cinétique d'accrochage d'une nouvelle bille sur une bille déjà attachée à une chaîne est certainement différente de celle de deux billes complètement libres en rotation et en translation. On se place donc dans le cas le plus simple, où le nombre d'ADN est petit devant le nombre de billes en solution afin de ne former que des doublets. Ces doublets peuvent ensuite être détectés par sédimentation sur gradient de glucose à l'aide d'une centrifugeuse à disque (CPS, Annexe B).

### 3.2.1 Protocole expérimental

1. Une suspension de billes greffées par de la streptavidine est préparée à environ 0,08 % en volume dans un tampon phosphate 5 mM à pH 7,2 et Symperonic F127 à 0,5 %. La fraction volumique exacte est déterminée par mesure de l'absorbance à 350 nm (chap. 1.2.4).
2. Une solution d'ADN de concentration fixée est préparée dans le même tampon.
3. 5  $\mu\text{L}$  de la suspension de billes sont mélangés à 5  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADN dans un microtube. Un temps d'incubation de 10 min à température ambiante, permet l'adsorption des ADN sur les billes.
4. L'échantillon est placé sous champ magnétique d'intensité fixée pendant un temps  $t$ .
5. Après interruption du champ magnétique, 100  $\mu\text{L}$  de tampon sont ajoutés afin d'augmenter le volume de la suspension de billes et de permettre l'injection dans la centrifugeuse. L'ajout du tampon et l'injection dans la centrifugeuse se font rapidement, afin de limiter la possibilité de dissociation des doublets.

Les quantités de matériaux utilisés sont faibles, ce qui permet de travailler sur des systèmes biologiques purs généralement disponibles en faibles quantités.

### 3.2.2 Principe de la détection des doublets

La détection du nombre de doublets se fait par injection dans une centrifugeuse CPS (Annexe B). Celle-ci est constituée d'un disque, contenant un gradient de sucrose, qui tourne à une vitesse fixée pouvant aller jusqu'à 18000 tr/min. La suspension de billes est injectée au centre du disque et les particules (plus denses que le gradient de glucose) migrent vers l'extérieur du disque. Un laser et un détecteur optique placés sur le chemin des billes, perpendiculairement au disque,

permettent de détecter les particules migrant en fonction du temps. On obtient donc la distribution des temps de migration des particules. Au début de l'expérience, les temps de migration des particules sont répartis selon une gaussienne dont la largeur dépend de la polydispersité en taille de l'échantillon initial. Les doublets migrant plus vite que les singulets, on observe ensuite l'apparition d'un pic caractéristique qui augmente avec le nombre de doublets dans la suspension, c'est à dire avec le temps d'application du champ magnétique (fig.3.4A). On vérifie par un petit calcul que ce pic correspond bien au temps de migration des doublets (Annexe B).

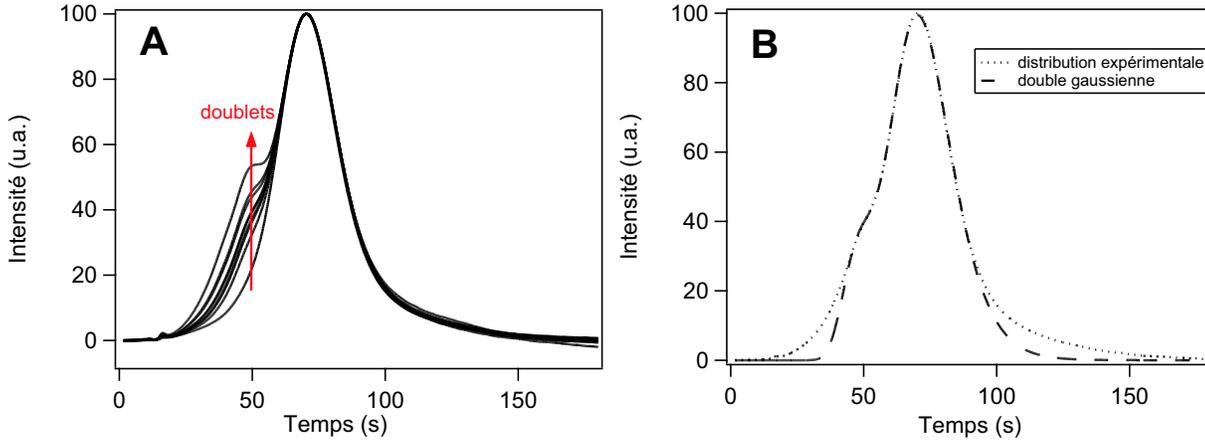


FIG. 3.4 – A : Distribution des temps de passage dans la centrifugeuse CPS : Augmentation du pic correspondant aux doublets en fonction du temps d'application du champ magnétique, B : Les expériences sont modélisées par une double gaussienne.

Le nombre de doublets formés est obtenu en modélisant la distribution des temps par une double gaussienne (fig. 3.4B). Le rapport des aires des deux gaussiennes nous donne directement le rapport des doublets sur les singulets.

On calcule également :

$$\frac{N_d}{N_i} = \frac{A_d}{A_s + 2 \cdot A_d} \quad (3.9)$$

où  $N_d$  et  $N_i$  sont respectivement le nombre de doublets et le nombre de billes initial et  $A_d$  et  $A_s$  les aires, déduites de la double gaussienne, correspondant aux doublets et aux singulets.

On vérifie que l'on ne forme pas des agrégats plus grands. Pour cela, la différence entre l'aire de la courbe expérimentale et l'aire de la double gaussienne doit rester inférieure à 10 %.

Enfin, on veut s'assurer que cette méthode de détection des doublets n'engendre pas leur dissociation. Pour cela, on réalise deux fois la même expérience à des vitesses de rotation du disque différentes. L'écart entre les résultats obtenus est inférieur à la barre d'erreur estimée (chap. 3.2.4). De plus, un rapide calcul (Annexe B) nous donne la force subie par les doublets dans la centrifugeuse, elle est d'environ 2 pN, ce qui est faible comparé aux forces de rupture du

lien biotine-streptavidine de 260 pN mesuré en AFM [17]. D'après la relation de Bell [8] :

$$k_{off}(F) = k_{off}(F = 0) \cdot e^{\frac{F}{F_0}} \quad (3.10)$$

où  $F_0$  est la force de rupture du lien et  $F$  la force appliquée. Pour  $k_{off,0} = 6.10^{-6} s^{-1}$ , on trouve  $k_{off}(2 pN) = 6,1.10^{-6} s^{-1}$ . Même après 1 min dans la centrifugeuse, on peut considérer que très peu de doublets se sont dissociés.

### 3.2.3 Quantité d'ADN

L'expérience consiste à mesurer la formation de doublets uniquement. Dans l'idéal, il faudrait donc ajouter un nombre d'ADN inférieur au nombre de billes dans le milieu. Les solutions d'ADN utilisées doivent donc avoir des concentrations très faibles (de l'ordre de  $10^{-9}$  à  $10^{-10}$  M). Cela engendre quelques difficultés :

- Il devient difficile de doser ces solutions en fluorescence, sachant que l'on ne dispose que de petits volumes ( $\sim 5 \mu L$ ).
- Le nombre d'ADN s'adsorbant aux parois du microtubule devient non négligeable devant le nombre d'ADN en solution (au bout de 24 heures les solutions sont inutilisables).

En conséquence, des solutions mères d'ADN de l'ordre de  $10^{-7}$  M sont préparées et dosées précisément en fluorescence. Elles peuvent être conservées car la fraction d'ADN qui s'adsorbe aux parois devient négligeable devant le nombre d'ADN important en solution. Puis les solutions d'ADN à la concentration désirée sont préparées par dilution au dernier moment et utilisées dans l'heure qui suit. Pour vérifier que l'adsorption aux parois est négligeable pendant le temps d'une série d'expériences, on effectue une mesure du nombre de doublets formés avec un champ de 40 mT appliqué pendant 5 min à chaque fois au début et à la fin d'une série d'expérience. On compare ensuite ces mesures entre elles. Cela permet également de renormaliser toutes les courbes pour s'affranchir des erreurs de dilution. La concentration d'ADN utilisée est comprise entre 0,3 et 6 ADN par bille. C'est un nombre d'ADN important, si l'on considère que l'on ne veut former que des doublets. Mais un grand nombre d'ADN n'est certainement pas actif (collage sur les parois par exemple) et la technique de la centrifugeuse permet de vérifier que l'on ne forme jamais plus que des doublets.

### 3.2.4 Reproductibilité

Afin d'estimer la reproductibilité des mesures de cinétique, on réalise 5 fois la mesure de cinétique de formation de doublets avec un ADN de 76 pb pour un champ de 40 mT.

Si l'on modélise les différentes courbes obtenues (fig. 3.5) par une cinétique d'ordre 1, on obtient une valeur moyenne de  $k_{app}$  de  $0,032 s^{-1}$  et l'erreur absolue est de  $\pm 0,012 s^{-1}$  ce qui équivaut à 31 %. Cette erreur prend en compte toutes les étapes de l'expérience, allant de la dilution des solutions au traitement des distributions de temps données par la centrifugeuse.

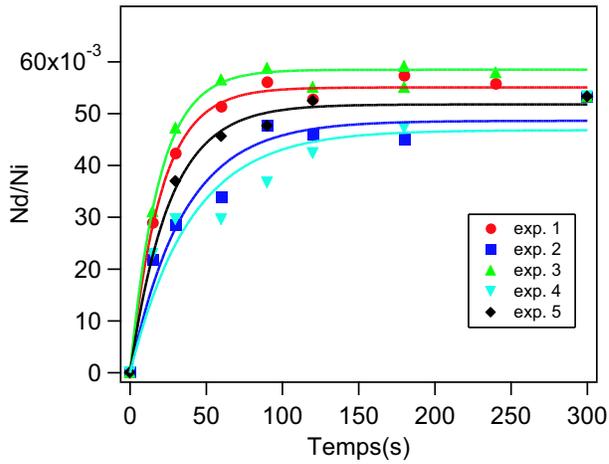


FIG. 3.5 – Reproductibilité des mesures de cinétique, ADN 76 pb, 40 mT. Lorsque les 5 expériences sont modélisées par un ordre 1, on trouve les valeurs de  $k_{app}$  suivantes :  $k_1 = 0,049s^{-1}$ ,  $k_2 = 0,028s^{-1}$ ,  $k_3 = 0,053s^{-1}$ ,  $k_4 = 0,025s^{-1}$ ,  $k_5 = 0,039s^{-1}$ .

### 3.3 Résultats expérimentaux

Pour toutes les expériences réalisées ici, on se place dans un tampon phosphate 5 mM à pH 7,2 en présence de Symperonic F127 à 0,5 %.

#### 3.3.1 Mesure des distances de réaction, profil force-distance

Le profil force-distance est tout d'abord mesuré afin de connaître la distance entre les billes pour chaque champ magnétique appliqué. On peut également tracer la distance entre les billes à l'équilibre en fonction du champ magnétique appliqué (fig. 3.6).

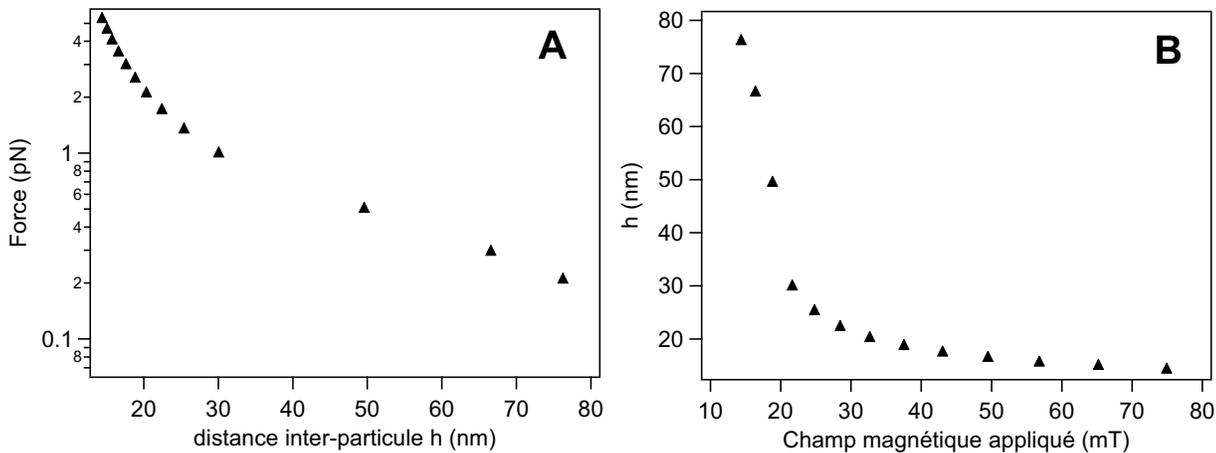


FIG. 3.6 – A : Profil de force des billes magnétiques dans le tampon phosphate 5 mM pH 7,2 + F127 0,5 %. B : Distance inter-particule  $h$  en fonction du champ magnétique appliqué.

### 3.3.2 Mesure des cinétiques de réaction

#### Mesures de $k_+$

Les mesures de la vitesse de formation des doublets sont effectuées avec des champs compris entre 20 mT et 80 mT en utilisant des liens d'ADN de 76 pb, 151 pb et 315 pb.

En première approximation, on modélise les courbes par une loi de cinétique d'ordre 1 :  $N_d/N_i = N_t(1 - \exp(-k_{app}t))$ , où  $N_d$ ,  $N_i$  et  $N_t$  sont respectivement le nombre de doublets, le nombre de billes initiales et le nombre total de liens possibles. La constante  $k_{app}$  obtenue s'apparente à un  $k_+$  de réaction et englobe toutes les étapes de la réaction : diffusion de la bille, du polymère et complexation streptavidine-biotine. En utilisant cette loi, on considère que  $k_{off} \ll k_{app}$ , ce qui est vérifié par la suite. Le profil de force mesuré pour les billes seules dans le tampon phosphate 5 mM (chap. 3.3.1) nous donne, pour chacun des champs magnétiques appliqués, la distance moyenne entre les billes dans la chaîne. On peut alors tracer la constante  $k_{app}$  en fonction de la distance.

ADN 76 pb : L'ADN de 76 pb mesure 26 nm de longueur contour.

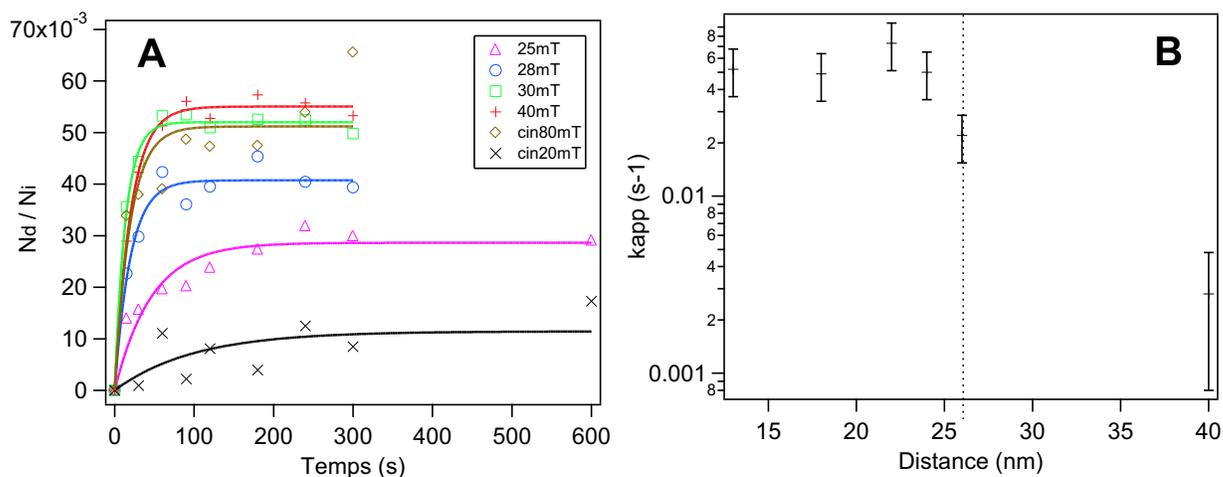


FIG. 3.7 – ADN 76 pb. A : Evolution du nombre de doublets en fonction du temps et du champ magnétique appliqué. Les points expérimentaux sont modélisés par une loi cinétique d'ordre 1 :  $N_d/N_i = N_t(1 - \exp(-k_{app}t))$ . B :  $k_{app}$  en fonction de la distance moyenne des billes dans la chaîne. La ligne verticale représente la distance correspondant à la longueur de l'ADN étiré. Les barres d'erreurs sont de  $\pm 30\%$  sauf pour la distance de 40 nm où elle est beaucoup plus importante et est due principalement à l'erreur obtenue lors de la modélisation de la courbe expérimentale qui est très bruitée à cause de son plateau très bas.

Pour une même quantité d'ADN, les courbes expérimentales obtenues n'ont pas toutes le même plateau (fig.3.7). Notamment, on remarque que les courbes effectuées à faible champ magnétique ont un plateau très bas. Le puits de potentiel formé par application d'un champ magnétique faible est peu profond. Les billes ne participent alors pas toutes aux chaînes et un équilibre se forme entre les billes alignées et les billes isolées. Toutes les billes portant des ADN ne sont pas alignées dans les chaînes. Le nombre total de doublets pouvant réagir est donc plus faible. Le plateau est

plus bas et on arrive aux limites de détection des doublets par la méthode de la centrifugeuse. La courbe de cinétique est alors très bruitée et l'erreur sur la constante de cinétique obtenue est importante.

ADN 151 pb : L'ADN 151 pb a une longueur contour de 51 nm. Dès l'application du champ minimum de 20 mT, les billes se trouvent donc à une distance inférieure à la longueur de l'ADN.

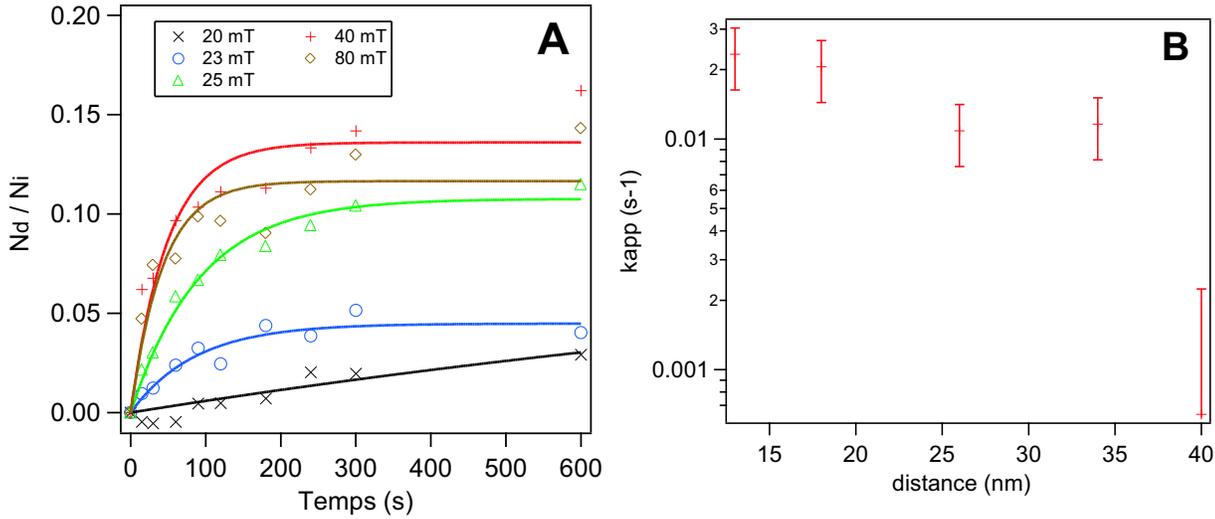


FIG. 3.8 – ADN 151 pb. A : Evolution du nombre de doublets en fonction du temps et du champ magnétique appliqué. Les points expérimentaux sont modélisés par une loi cinétique d'ordre 1 :  $N_d/N_i = N_t(1 - \exp(-k_{app}t))$ . B :  $k_{app}$  en fonction de la distance moyenne entre les billes dans la chaîne. Les barres d'erreurs sont de  $\pm 30\%$  sauf pour la distance de 40 nm où elle est beaucoup plus importante et est due principalement à l'erreur obtenue lors de la modélisation de la courbe expérimentale, qui est très bruitée à cause de sa hauteur de plateau très basse.

Encore une fois, on voit que pour les champs magnétiques faibles, le plateau est plus bas et la mesure bruitée (fig. 3.8). A 20 mT, les billes sont à une distance de 40 nm. L'ADN est donc plus long que la distance interparticule et on peut en déduire que la cause est bien colloïdale. Par la suite, on ne tiendra donc pas compte de la mesure faite à 20 mT.

ADN 315 pb : L'ADN 315 pb a une longueur contour de 107 nm, ce qui est largement supérieure à la distance entre les billes quelque soit le champ appliqué.

La formation des liens entre les billes est plus lente que pour les ADN plus courts (fig. 3.9).

Comparaison des vitesses de formation des liens en fonction de la longueur de l'ADN :

Si l'on trace toutes les constantes de formation mesurées sur le même graphique (fig. 3.10), on observe une diminution importante de la vitesse de formation des liens lorsque la longueur de

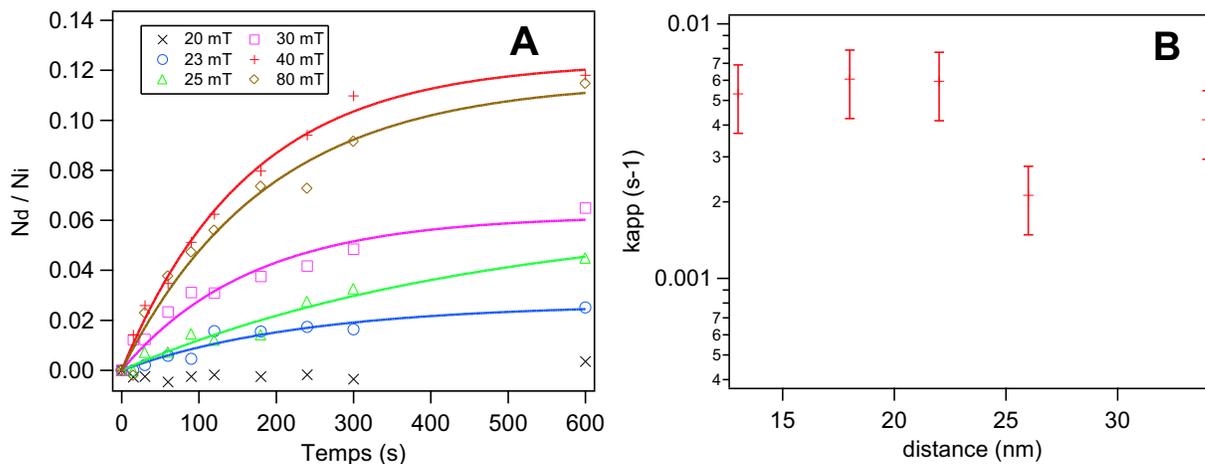


FIG. 3.9 – ADN 315 pb. A : Evolution du nombre de doublets en fonction du temps et du champ magnétique appliqué. Les points expérimentaux sont modélisés par une loi cinétique d'ordre 1 :  $N_d/N_i = N_t(1 - \exp(-k_{app}t))$ . B :  $k_{app}$  en fonction de la distance moyenne des billes dans la chaîne.

l'ADN augmente.

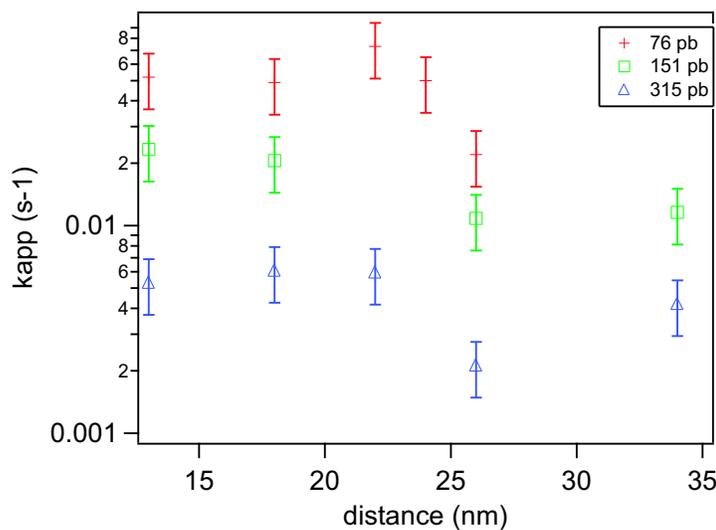


FIG. 3.10 – Constantes de formation mesurées en fonction de la longueur de l'ADN et de la distance entre les billes.

La constante mesurée est la constante de formation globale, elle prend en compte la diffusion des deux molécules l'une vers l'autre et la complexation biotine-streptavidine proprement dite. La différence observée entre les différents ADN peut être due à une dynamique de l'espaceur différente en fonction de sa longueur ou à une réaction intrinsèque du couple streptavidine-biotine plus lente pour de plus gros ADN. Nous la discuterons plus loin.

### Mesure du $k_{off}$

Le protocole de mesure de la constante de dissociation des doublets est le suivant : 25  $\mu\text{L}$  de solution d'ADN 76 pb sont ajoutés à 25  $\mu\text{L}$  de suspension de billes à 0,08 % en volume. Après un temps d'incubation de 10 min, l'échantillon est placé sous un champ magnétique de 40 mT pendant 5 min. Puis 5  $\mu\text{L}$  de cette suspension sont prélevés à intervalles de temps fixés, ajoutés à 95  $\mu\text{L}$  de tampon et injectés dans la centrifugeuse à disque. On observe la diminution du nombre de doublets avec le temps (fig. 3.11).

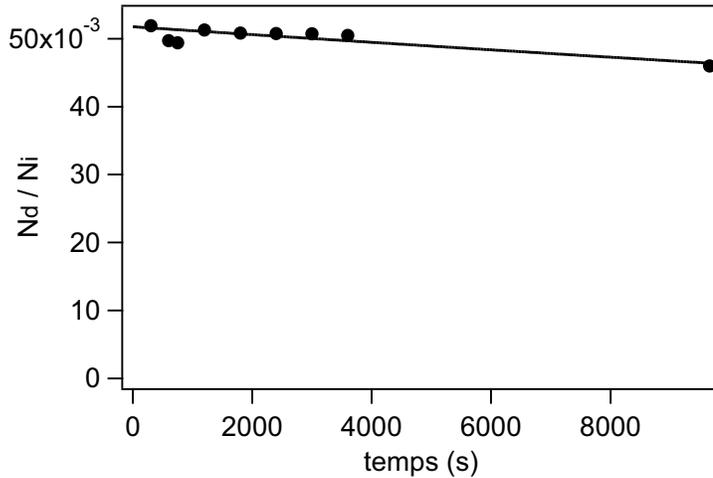


FIG. 3.11 – ADN 76 pb. Diminution du nombre de doublets avec le temps : mesure de la constante de dissociation.

Les résultats expérimentaux sont modélisés avec une loi de cinétique d'ordre 1 :  $N_d/N_i = (N_d/N_i)_0 \exp(-k_{off}t)$ . On obtient un  $k_{off}$  d'environ  $10^{-5}\text{s}^{-1}$  qui est négligeable devant les valeurs de  $k_{app}$  mesurées précédemment. La constante de dissociation mesurée est légèrement plus importante que la constante de dissociation à 3D qui est de  $6.10^{-6}\text{s}^{-1}$  [14]. La répulsion entre les surfaces induit une force qui diminue le temps de vie de la liaison.

### 3.4 Description du système : les différents temps caractéristiques

Trois phénomènes d'origines différentes entrent en jeu dans la formation du lien :

- La diffusion des billes magnétiques : Les billes magnétiques se situent dans un puits de potentiel dont la forme change en fonction du champ magnétique appliqué. L'agitation thermique leur permet de diffuser à l'intérieur de ce puits de potentiel autour de leur distance d'équilibre. Elle peuvent même sortir facilement du puits lorsque celui-ci est peu profond, aux faibles champs magnétiques. De plus, les billes peuvent certainement tourner sur elles-mêmes.
- La diffusion du polymère : Pour que le lien puisse se former, il faut que l'extrémité de la molécule d'ADN s'approche à une distance de contact d'environ 5 Å [16] du site streptavidine sur la bille opposée. Lorsque la longueur de l'ADN augmente, il se trouve confiné entre les deux surfaces. Quel est l'influence de la dynamique du brin d'ADN ?

- La réaction de reconnaissance streptavidine-biotine peut être considérée comme irréversible à l'échelle de temps de la manipulation, vue les valeurs de  $k_{off}$  mesurées. La constante de formation intrinsèque du complexe sera estimée.

### 3.4.1 Diffusion des billes magnétiques

#### Cinétique d'agrégation des particules en présence d'un champ magnétique

On veut calculer le temps de formation des doublets réversibles (première collision entre deux billes isolées) en présence de champ magnétique afin de vérifier que l'agrégation des billes est rapide devant la formation des liens permanents d'ADN. Ce calcul est valable à partir du moment où l'énergie magnétique attractive est supérieure à l'énergie brownienne ( $\geq 20$  mT). Promislow *et al.* [26] ont étudié la cinétique d'agrégation des particules magnétiques en chaîne. Ils calculent le temps de formation des doublets réversibles en fonction de l'énergie magnétique attractive. Pour cela, ils considèrent  $h_c$ , la distance inter-particule critique en dessous de laquelle l'énergie magnétique attractive est supérieure à  $kT$ . Lorsque les billes sont loin les unes des autres, elles subissent un mouvement brownien classique, mais lorsqu'elles se rapprochent à une distance égale ou inférieure à  $h_c$ , il y a formation irréversible d'un doublet. Comme l'énergie magnétique est anisotrope, la distance  $h_c$  dépend de l'angle  $\theta$  entre la direction du champ magnétique et la direction d'approche des billes. On a :

$$h_c = [4(3\cos^2\theta - 1)]^{1/3} r_1 \lambda^{1/3} \quad (3.11)$$

où  $\lambda$  est le rapport de l'énergie magnétique maximale (lorsque les deux cœurs durs se touchent et que  $\theta=0$ ) sur l'énergie thermique  $kT$ .

$$\lambda = \frac{E_{magn}}{kT} = \frac{\pi\mu_0 r_1^3 \chi_s^2 H^2}{9k_B T} \quad (3.12)$$

Pour un champ de 20 mT,  $\lambda$  vaut environ 18. Le volume de capture décrit par  $h_c(\theta)$  est supérieur au volume de la bille. On calcule donc une fraction volumique effective de billes qui prend en compte ce volume de capture :

$$\phi_{eff} = 4\left[\left(\frac{1}{3}\right)^{1/2} - \left(\frac{1}{3}\right)^{3/2}\right]\lambda\phi \quad (3.13)$$

Les billes diffusent selon un mouvement brownien jusqu'à ce qu'une particule entre dans le volume de capture d'une autre, il se forme alors un doublet. Le temps de formation d'un doublet est :

$$t_B = \frac{1}{6} \frac{r_2^2}{D\phi_{eff}} = \frac{r_2^2}{24\left[\left(\frac{1}{3}\right)^{1/2} - \left(\frac{1}{3}\right)^{3/2}\right]D\lambda\phi} \quad (3.14)$$

où  $D = 2,17 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  est le coefficient de diffusion des billes (mesuré en diffusion de la lumière, chap. 1.2.5).  $r_2 = 88 \text{ nm}$  est le rayon des billes et  $\phi = 0,00045$  est la fraction volumique en bille utilisée dans les expériences de cinétique. Le temps de formation de doublets réversibles est donc de 50 ms à 20 mT. Ce temps diminuera encore pour des champs magnétiques plus forts

puisqu'il est inversement proportionnel à  $H^2$  (équations (3.14) et (3.12)).

La cinétique est mesurée sur des gammes de temps allant de 15 s à 10 min, donc le temps de formation des doublets magnétiques est négligeable devant le temps de formation de doublets permanents liés par l'ADN.

### Diffusion et rotation des billes dans les chaînes

Une fois alignées, les billes magnétiques sont piégées dans un potentiel d'énergie à l'intérieur duquel, elles peuvent diffuser et tourner. Leur diffusion dépend du profil d'énergie des billes dans la chaîne.

Les profils d'énergie des billes magnétiques sont obtenus à partir du profil force-distance mesuré par diffraction de la lumière (fig. 3.12).

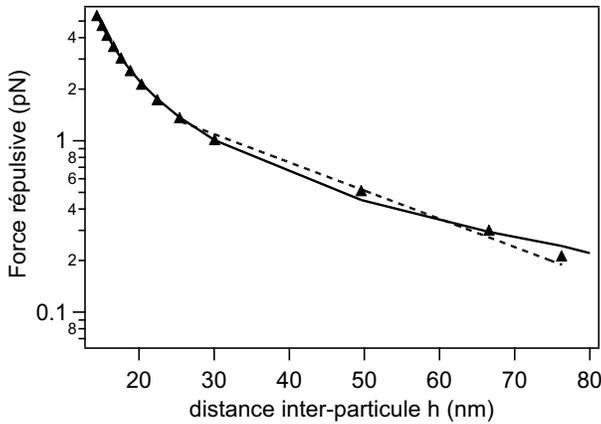


FIG. 3.12 – Profil de force des billes magnétiques dans le tampon phosphate 5 mM pH 7,2.  $\blacktriangle$  : résultats expérimentaux, ligne pleine : modélisation par une loi de puissance  $F_{rep}(h) = ((h - 9, 2)/21, 0)^{-1,2}$ , ligne pointillée : modélisation par une loi exponentielle  $F_{rep}(h) = 3, 4e^{-0,04h}$ .

Profil d'énergie : Il est obtenu à partir du profil force-distance des billes magnétiques. Celui-ci est modélisé par une loi de puissance sur tout l'intervalle de mesure :

$$F_{rep}(h) = \left( \frac{h - 9, 2}{21, 0} \right)^{-1,2} \quad (3.15)$$

où  $h = d - r_2$  est la distance bord à bord des billes dans la chaîne (cœur dur + polymère dense). Par contre, on sait que cette loi de puissance n'est pas valable aux grandes distances puisque les répulsions stériques ou électrostatiques sont de type exponentiel. On va donc modéliser la fin de la courbe expérimentale par une loi exponentielle afin d'extrapoler les résultats aux distances supérieures à la gamme de mesure. On obtient alors pour  $h \geq 25$  nm :

$$F_{rep}(h) = 3, 4e^{-0,04h} \quad (3.16)$$

L'énergie répulsive est obtenue par intégration, pour  $h \leq 25$  nm :

$$E_{rep}(h) = - \int_h^{25} \left( \frac{x - 9, 2}{21, 0} \right)^{-1,2} dx - \int_{25}^{+\infty} 3, 4e^{-0,04x} dx = -67, 1 + 187, 3(h - 9, 1)^{-0,22} \quad (3.17)$$

et pour  $h \geq 25$  nm :

$$E_{rep}(h) = - \int_h^{+\infty} 3,4e^{-0,04x} dx = 90,0e^{-0,04h} \quad (3.18)$$

La force d'attraction de Van der Waals est de la forme (chap. 1.1.2)

$$F_{VdW}(h) = -\frac{r_2}{12} \left( \frac{A_{232}}{h^2} - \frac{2A_{123}}{(h+e)^2} + \frac{A_{121}}{(h+2e)^2} \right) \quad (3.19)$$

L'énergie attractive due aux interactions de dispersion est obtenue par intégration de la force de Van der Waals :

$$E_{VdW}(h) = -\frac{r_2}{12} \left( \frac{A_{232}}{h} - \frac{2A_{123}}{(h+e)} + \frac{A_{121}}{(h+2e)} \right) \quad (3.20)$$

où  $e$  est l'épaisseur de la couche de polymère réticulé. On définit

$$\boxed{E_{bille} = E_{rep} + E_{VdW}} \quad (3.21)$$

la somme de toutes les interactions entre billes qui ne dépendent pas du champ magnétique.

Enfin, la force magnétique attractive est de la forme suivante (chap. 1.1.2) :

$$F_{magn}(d, m) = -1,202\mu_0 \frac{3m^2}{2\pi d^4} \quad (3.22)$$

avec

$$m(d, H_{ext}) = \frac{4/3\pi r_1^3 \chi_s}{1 - \frac{1,202 \cdot 4/3 r_1^3 \chi_s}{d^3}} H_{ext} \quad (3.23)$$

Ce qui donne :

$$F_{magn}(d, H_{ext}) = -1,202\mu_0 \frac{8}{3} \pi r_1^6 \chi^2 H_{ext}^2 \cdot \frac{d^2}{\left(d^3 - 1,202 \cdot \frac{3}{4} r_1^3 \chi\right)^2} \quad (3.24)$$

L'intégration de l'équation (3.24) est triviale et nous permet d'obtenir l'énergie magnétique qui dépend du champ magnétique appliqué et de la distance entre les billes.

$$\boxed{E_{magn}(d, H_{ext}) = -\frac{1,202\mu_0 \frac{8}{9} \pi r_1^6 \chi^2 H_{ext}^2}{d^3 - 1,202 \frac{4}{3} r_1^3 \chi}} \quad (3.25)$$

Lorsque l'on trace  $E_{bille}$  en fonction de la distance  $h$  puis  $E_{magn}$  et  $E_{tot}$  à un champ donné, tel que

$$\boxed{E_{tot} = E_{bille} + E_{magn}} \quad (3.26)$$

on obtient la forme du puits de potentiel dans lequel la bille est piégée (fig. 3.15A).

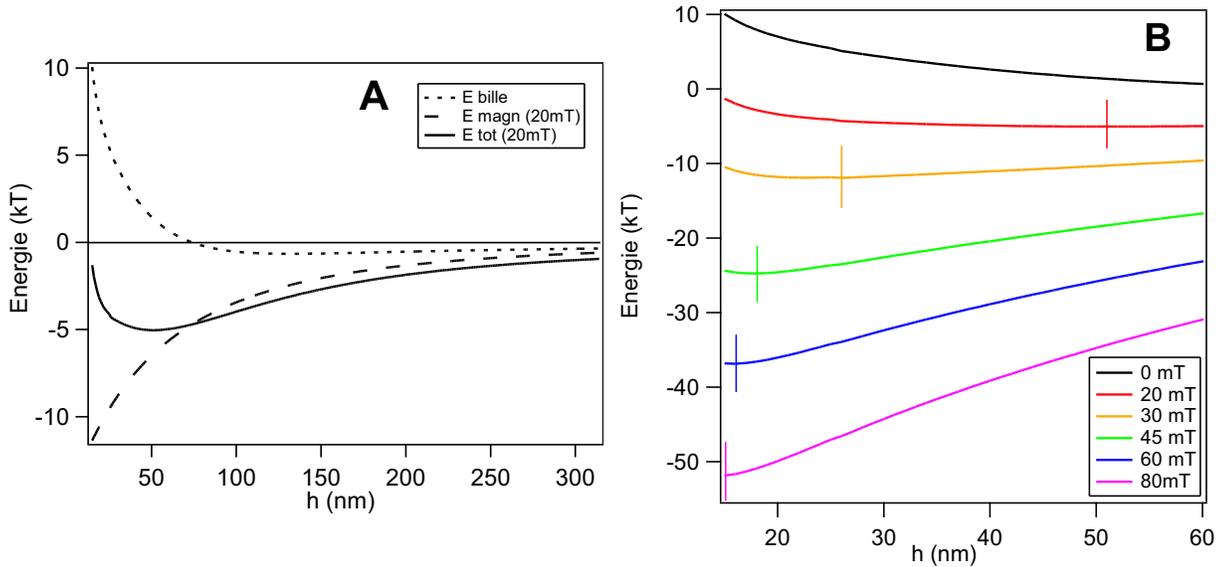


FIG. 3.13 – A : Profil d'énergie des billes à 20 mT, B : Profils d'énergie des billes en fonction du champ magnétique appliqué, les barres verticales correspondent à la position du minimum d'énergie.

En l'absence de champ magnétique, le profil d'énergie est globalement répulsif et pour s'approcher à 25 nm, il faut une énergie de plus de 5 kT, ce qui explique que les billes sont plutôt stables en l'absence de champ magnétique et qu'aucune agrégation n'est observée pendant plus d'une heure, temps supérieur à la durée des expériences de cinétique. Par contre, lorsque le champ magnétique augmente, le profil énergétique change, il devient attractif et un puits de potentiel apparaît et se déplace progressivement vers les petites distances (fig. 3.15B). Pour 20 mT, la profondeur du puits de potentiel est faible, un équilibre est alors observé entre de petites chaînes de billes et des billes en solution. Une bille située dans le puits de potentiel peut en sortir assez facilement. Enfin, lorsque le champ magnétique appliqué augmente, la profondeur du puits augmente également et les billes restent alors piégées dans les chaînes jusqu'à interruption du champ magnétique.

Les billes peuvent diffuser à l'intérieur du puits de potentiel autour de la position d'équilibre. Cependant celle-ci se trouve proche de la longueur maximale de l'ADN le plus court (26 nm) dès que l'on applique un champ magnétique supérieur à 25 mT.

A 20 mT, avec une énergie de l'ordre de  $k_B T$ , les billes peuvent diffuser à des distances comprises entre 25 et 75 nm environ, ce qui correspond à un temps de diffusion de l'ordre de  $\frac{x^2}{2D}$  ou  $x$  est la distance parcourue et  $D$  le coefficient de diffusion de la billes. On trouve alors des temps de l'ordre de 0,6 ms. La diffusion des billes à l'intérieur des chaînes est donc très rapide.

On constate également que pour des champs faibles, les distances mesurées entre les billes sont des distances moyennes et les billes fluctuent beaucoup. Par contre, lorsque le champ magnétique augmente, le puits de potentiel devient plus profond et les distances de diffusion des billes plus faibles. Ainsi à 30 mT, les billes diffusent entre 16 et 36 nm environ et à 80 mT, les billes sont bloquées entre 13 et 18 nm.

Rotation des billes magnétiques : Les billes magnétiques étant composées d'un très grand nombre de particules d'oxyde de fer, orientées dans toutes les directions, elles peuvent certainement tourner indépendamment du champ magnétique. Dans ce cas, on peut calculer leur coefficient de rotation maximal, pour une rotation due à l'énergie thermique :

$$D_{rot} = \frac{k_B T}{8\pi\eta R_h^3} \quad (3.27)$$

où  $\eta$  est la viscosité de l'eau et  $R_h$  est le rayon hydrodynamique des billes, mesuré par diffusion de la lumière (chap. 1.2.5) soit 110 nm. On trouve alors un coefficient de rotation de  $120 \text{ rad}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 3.4.2 Dynamique du lien d'ADN

La longueur des ADN utilisés étant du même ordre de grandeur que leur longueur de persistance, on peut les considérer comme des bâtonnets rigides dont l'une des extrémités est fixée à la surface de la bille par une articulation libre. En effet, la biotine est accrochée à l'ADN par un petit espaceur comprenant 5 carbones  $sp^3$  donc entièrement libre de rotation. La diffusion de la biotine à l'autre extrémité de l'ADN vers la surface de la bille opposée est donc due à un mouvement de rotation du bâtonnet.

Le coefficient de rotation d'un bâtonnet rigide est obtenu d'après la relation suivante [27] :

$$D_{rot} = \frac{k_B T}{\zeta_r} = \frac{3k_B T \left( \ln \left( \frac{L}{b} \right) - 0,8 \right)}{\pi\eta L^3} \quad (3.28)$$

où  $\zeta_r$  est le coefficient de friction du bâtonnet,  $L$  sa longueur et  $b$  son diamètre. Pour l'ADN, on prendra  $b \approx 2 \text{ nm}$ . On trouve alors respectivement  $3,8 \cdot 10^5$ ,  $7,0 \cdot 10^4$  et  $9,9 \cdot 10^3 \text{ rad}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour des ADN de 76, 151 et 315 pb. Si l'on considère que les bâtonnets diffusent dans une demi-sphère, le temps de la diffusion varie entre  $10^{-5} \text{ s}$  et  $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}$  en fonction de la longueur de l'ADN.

Cependant, ce calcul ne tient pas compte des effets d'interactions hydrodynamiques entre le bâtonnet et la paroi.

### 3.4.3 Constante intrinsèque de formation de la liaison streptavidine-biotine

La constante intrinsèque de formation de la liaison biotine-streptavidine est très rapide en solution. Elle est de l'ordre de  $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [2]. Cependant, dans notre expérience, la streptavidine est greffée à une surface. Elle subit donc des interactions avec la surface qui peuvent modifier légèrement sa structure. Alors la cavité d'accueil de la biotine pourrait être déformée, ce qui diminuerait la force des interactions entre les deux molécules et ralentirait la formation du complexe. De plus, la présence de l'ADN induit de la gêne stérique.

Nous prendrons donc la valeur de la constante de cinétique 3D mesurée par Huang *et al.* [28] pour des systèmes proches du nôtre. En effet, ils mesurent la cinétique d'adsorption de molécules courtes d'ADN biotinylé à la surface de billes de latex recouvertes de streptavidine. La constante de formation mesurée est de l'ordre de  $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  soit déjà deux ordres de grandeurs en dessous

de la constante de cinétique à 3D.

On peut estimer la constante de cinétique 2D à partir de la constante 3D en tenant compte d'un facteur géométrique  $\gamma \sim 1 - 100$  [8, 10]. Ainsi, si l'on veut convertir ces constantes de formation 3D en temps de réaction à 2D, il faut considérer le volume dans lequel est contenu la biotine, pour estimer une concentration. On aurait alors :

$$\tau = \frac{V * \mathcal{N}}{\gamma k_{on}^{3D}} \quad (3.29)$$

avec  $\mathcal{N} = 6,023.10^{23}/mol$ , la constante d'Avogadro,  $V \sim 4.10^{-21}$  L et  $k_{on}^{3D} \sim 10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, on obtient un temps de réaction d'environ 2 ms pour  $\gamma = 1$ , et de 200 ms pour  $\gamma = 100$ .

Cette constante  $\gamma$  contient les différents facteurs liés à la géométrie du système, comme la rugosité de la surface, l'accessibilité des sites actifs, la perte des degrés de liberté des molécules par rapport à ces molécules libres en solution.

### 3.4.4 Comparaison

Si l'on compare les différents temps caractéristiques du système (table 3.1), on remarque qu'ils sont tous très rapides devant les temps de réaction mesurés. Cependant, jusqu'à maintenant, nous n'avons pas pris en compte les facteurs liés à l'état des surfaces des billes : la présence de cheveux de polymère et la rugosité, par exemple. Or tous ces facteurs ont un rôle très important. Ainsi,

Formation des chaînes magnétiques	$\leq 50$ ms
Diffusion des billes dans les chaînes	$\leq 0,6$ ms
Rotation des billes	$\leq 160$ ms
Rotation des ADN	entre $10^{-5}$ s et $5.10^{-4}$ s
Réaction biotine-streptavidine	$\sim 2-200$ ms
Durée des expériences	15 s - 10 min

TAB. 3.1 – Comparaison des temps caractéristiques du système.

Cuvelier *et al.* [7] ont montré, dans leur expérience d'adhésion de vésicules sur des surfaces, que la vitesse de la réaction pouvait varier d'un facteur  $10^6$  selon la façon dont la biotine était liée à la surface, son accessibilité et l'état de la surface.

## 3.5 Discussion, Coll. C. Marques

Les différences de vitesse de formation des liens observées entre les ADN les plus longs et les ADN les plus courts, conduit à penser que l'ADN a un rôle important dans la réaction. Nous nous sommes donc intéressés à décrire plus précisément la dynamique de ce polymère entre deux particules avant réaction.

Les molécules d'ADN ayant des longueurs proches de la longueur de persistance de l'ADN, on va dans un premier temps, modéliser l'ADN par un bâtonnet de longueur  $L_c$ . L'un des bouts de ce bâtonnet est fixé à un plan (fig. 3.14) tout en y étant librement articulé. La biotine est liée à l'autre extrémité du polymère par une petite chaîne alkyle de 5 carbones. Elle diffuse librement, sous l'effet de l'agitation thermique, sur la sphère de rayon  $L_c$ . Lorsque la biotine touche le plan opposé (la surface réactive de la bille voisine), elle réagit avec une probabilité  $q$ . La vitesse de diffusion de la biotine sur la sphère dépend du coefficient de rotation du bâtonnet  $D_{rot}$ . Celui-ci varie en  $1/L_c^3$  (chap.3.4.2). Pour écrire ce modèle, on fera l'hypothèse que la réaction est rapide et irréversible.

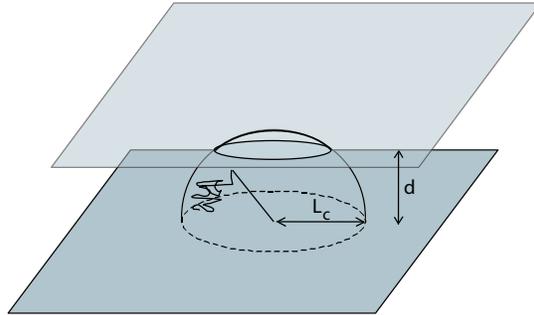


FIG. 3.14 – Représentation de l'expérience par un schéma simplifié.

### 3.5.1 Description du modèle de réaction-diffusion :

Dans un premier temps, nous considérons un certain nombre d'hypothèses pour simplifier le modèle. Ces hypothèses devront ensuite être corrigées afin de décrire plus précisément la réalité de l'expérience :

- La molécule d'ADN est représentée par un bâtonnet rigide de longueur  $L_c$  dont l'une de ses extrémités est fixée à l'origine des coordonnées tout en y étant librement articulé.
- Les surfaces des billes sont considérées comme des plans, la géométrie de l'expérience devient donc cylindrique. Le mouvement diffusif peut donc être décrit par l'évolution de l'angle  $\theta$  décrivant l'orientation du bâtonnet dans le plan normal aux surfaces des billes.

La géométrie considérée est représentée par le schéma de la figure (3.15A).

#### Diffusion du bâtonnet :

On calcule tout d'abord la distribution de probabilité associée au mouvement du bâtonnet  $\Psi(\theta, t)$ . Elle possède la valeur d'équilibre  $\Psi_{eq} = \frac{1}{2}$  et suit l'équation de diffusion :

$$\frac{\partial \Psi}{\partial t} = D_{rot} \mathcal{L}_\theta \Psi \quad (3.30)$$

où  $D_{rot}$  le coefficient de diffusion et  $\mathcal{L}_\theta$  est l'opérateur de diffusion angulaire :

$$\mathcal{L}_\theta = \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) \quad (3.31)$$

$G(\theta, \theta', t)$  est la probabilité conditionnelle de trouver le bout réactif à la position  $\theta$  au temps  $t$ , sachant qu'il était en  $\theta'$  pour  $t = 0$ .  $G(\theta, \theta', t)$ , aussi appelé propagateur, obéit à :

$$\left[ \frac{\partial}{\partial t} - D_{rot} \mathcal{L}_\theta \right] G(\theta, \theta', t) = \delta(\theta - \theta') \delta(t) \quad (3.32)$$

La forme du propagateur est calculée plus précisément en annexe (Annexe G)

### Equation de diffusion-réaction :

Nous décrivons maintenant la réaction entre le ligand porté par le bout du bâtonnet et un plan, couvert de façon homogène par des récepteurs. Si la distance  $d$  entre le point d'origine (point d'articulation du bâtonnet) et le plan réactif est inférieure à la longueur  $L_c$  du bâtonnet, celui-ci pourra réagir. On placera alors un puits réactif en  $\cos \theta = \frac{d}{L_c}$ , qui correspond à l'intersection du plan réactif avec la sphère de diffusion de la biotine. Lorsque la biotine passe en ce point, elle a une probabilité  $q$  de réagir.

Nous cherchons alors la distribution angulaire du bâtonnet,  $\Psi(\theta, t)$ , et en déduisons la fraction de bâtonnets n'ayant pas réagi au temps  $t$ ,  $\rho(t) = \int_0^\pi \Psi(\theta, t) \sin \theta d\theta$  et son complémentaire  $1 - \rho(t)$  qui mesure la fraction de particules ayant réagi au temps  $t$ . La figure (fig. 3.15B) décrit l'évolution de la distribution de probabilité angulaire en fonction du temps.

La distribution de probabilité  $\Psi(\theta, t)$  obéit à l'équation de diffusion-réaction suivante :

$$\left[ \frac{\partial}{\partial t} - D_{rot} \mathcal{L}_\theta \right] \Psi(\theta, t) = -q \delta(\cos \theta - \frac{d}{L_c}) \Psi(\theta, t) \quad (3.33)$$

où  $-q \delta(\cos \theta - \frac{d}{L_c})$  est le terme puits. On notera que nous comptons à la fois la réaction des bouts arrivant sur le puits par au-dessus ( $\theta > \arccos(\frac{d}{L_c})$ ) aussi bien que par en-dessous ( $\theta < \arccos(\frac{d}{L_c})$ ), ce qui expérimentalement est impossible, étant donnée la présence de la paroi.

L'équation (3.33) peut être transformée en l'équation intégrale :

$$\Psi(\theta, \tau) = \Psi_{eq} - q \int_0^\tau d\tau' G(\theta, \arccos \frac{d}{L_c}, \tau - \tau') \Psi(\arccos \frac{d}{L_c}, \tau') \quad (3.34)$$

Cette équation intégrale est résolue par transformation de Laplace  $\hat{\Psi}(\theta, s) = \int_0^\infty d\tau \Psi(\theta, \tau) e^{-\tau s}$ .

Si la réaction locale entre le ligand et le récepteur est beaucoup plus rapide que tous les autres temps caractéristiques du système, et en particulier plus rapide que les temps de diffusion, on

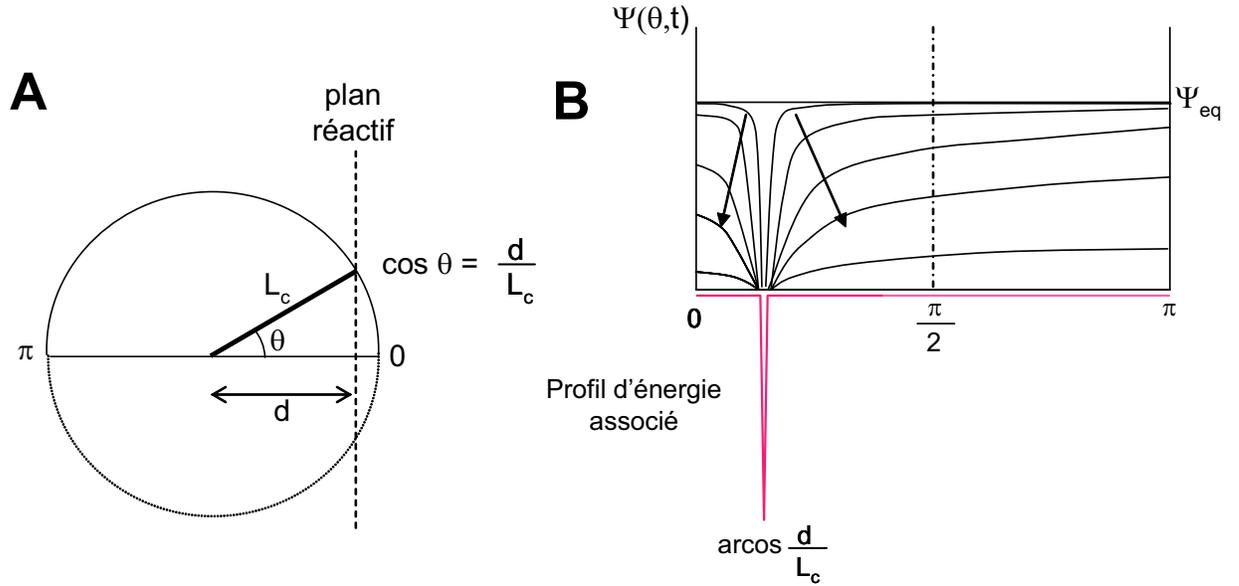


FIG. 3.15 – A : Description géométrique utilisée pour le modèle, B : Evolution de la distribution angulaire des bâtonnets en fonction du temps en présence d'un puits étroit et profond en  $\arccos(\frac{d}{L_c})$ . A  $t = 0$ , les bâtonnets sont répartis de façon uniforme selon  $\Psi_{eq}$ , puis en présence du puits, la probabilité que le bâtonnet n'ait pas réagi, diminue avec le temps. Tous les bâtonnets qui arrivent en  $\arccos(\frac{d}{L_c})$  disparaissent avec la probabilité  $q$ .

peut prendre la limite  $q \rightarrow \infty$ . On obtient alors :

$$\hat{\rho}(s) = \frac{h(s)}{\sinh(s) + 1} \quad (3.35)$$

avec  $h(s)$  une fonction auxiliaire définie par :

$$h(s) = \frac{\hat{G}(\arccos \frac{d}{L_c}, \arccos \frac{d}{L_c}, s)}{\Psi_{eq}} - \frac{1}{s} \quad (3.36)$$

L'évolution aux temps longs de la fraction de bouts ayant réagi est donc donnée par :

$$1 - \rho(\tau) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.37)$$

avec un temps caractéristique  $\tau$  donné par le plus petit pôle négatif de  $\hat{\rho}(s)$ . En écrivant  $\tau$  sous la forme :

$$\tau = D_{rot}^{-1} f\left(\frac{d}{L_c}\right) \quad (3.38)$$

où  $f(\frac{d}{L_c})$  est une fonction que nous avons déterminée numériquement. On obtient la forme approchée suivante :

$$\tau = \frac{1}{2} D_{rot}^{-1} \left( 1 - 1,6 \ln \left( 1 - \frac{d}{L_c} \right) \right) \quad (3.39)$$

Le temps de réaction est essentiellement proportionnel au cube de la longueur du bâtonnet, mais dépend aussi logarithmiquement du rapport  $\frac{d}{L_c}$ .

Si on normalise le temps de réaction mesuré  $\tau = \frac{1}{k_{app}}$  par le coefficient de rotation de chaque ADN, on peut placer les points de mesure pour tous les ADN sur une même courbe en fonction de  $\frac{d}{L_c}$ . Alors que la gamme de distance accessible par l'expérience était faible par rapport à la taille des ADN, on a maintenant accès à toute la gamme de  $\frac{d}{L_c}$  comprise entre 0,1 et 1 (fig. 3.16). On peut modéliser la courbe par une loi de la forme  $f(\frac{d}{L_c}) = A(1 - 1,6 \ln(1 - \frac{d}{L_c}))$ .

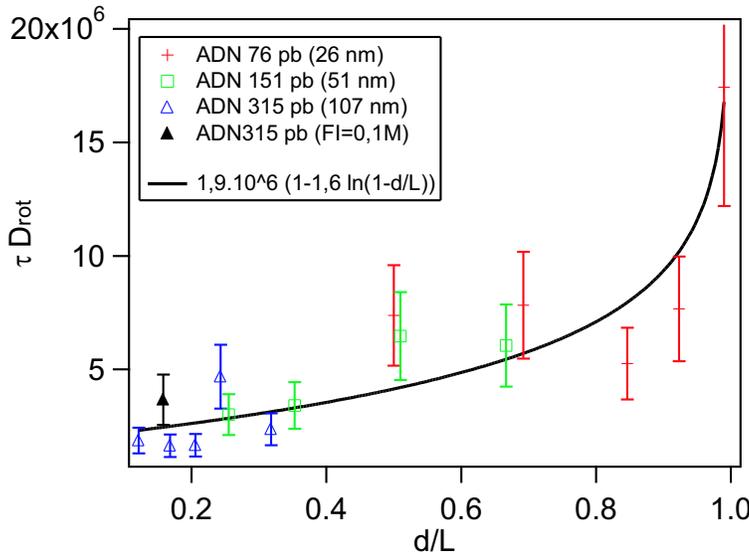


FIG. 3.16 – Temps de réaction normalisé par le coefficient de rotation du bâtonnet pour chaque ADN en fonction de  $\frac{d}{L_c}$ . ▲ : Expérience réalisée pour l'ADN 315 pb en présence de sel à force ionique de 0,1 M.

Les points se distribuent relativement bien sur la courbe, ce qui tend à montrer que la dynamique du polymère pourrait effectivement avoir un rôle important dans la formation des liens. Cependant, le préfacteur  $A = 2 \cdot 10^6$  est beaucoup plus important que celui prévu par le modèle. Nous allons maintenant discuter la validité de ce modèle qui est à améliorer.

### 3.5.2 Validité du modèle :

Tout d'abord, la configuration décrite par ce calcul est encore assez éloignée de notre situation expérimentale. Les deux premières critiques que l'on peut faire, sont directement liées aux calculs effectués :

- Les bâtonnets, même s'ils sont librement articulés, ne peuvent pas décrire une calotte sphérique complète, mais sont confinés, en absence de toute autre interaction ou réaction, sur une hémisphère. Il faudrait donc écrire la distribution de probabilité entre les angles  $\theta = 0$  et  $\theta = \frac{\pi}{2}$ . La prise en compte de ce phénomène aurait principalement pour effet de modifier l'aspect de la courbe pour  $\frac{d}{L_c} \rightarrow 0$ . En effet, si les deux plans sont très proches, la réaction doit être instantanée et  $\tau \rightarrow 0$ , ce qui n'est pas le cas ici.

- Seuls les bouts réactifs au dessus de la ligne de réaction définie par  $\cos \theta = \frac{d}{L_c}$  participent à la réaction. Deux solutions sont envisageables, à l’approche du plan opposé : soit tous les bâtonnets ayant un angle  $\theta < \arccos(\frac{d}{L_c})$  sont redistribués entre  $\arccos(\frac{d}{L_c})$  et  $\frac{\pi}{2}$ , soit ils réagissent instantanément, ce qui aura pour effet de modifier la forme de la courbe de cinétique (fig. 3.17). Cette deuxième solution est moins réaliste. L’approche de la bille voisine aura certainement pour effet de repousser les bâtonnets. La densité de streptavidine étant faible à la surface, il y a peu de chance pour que les bâtonnets réagissent instantanément.

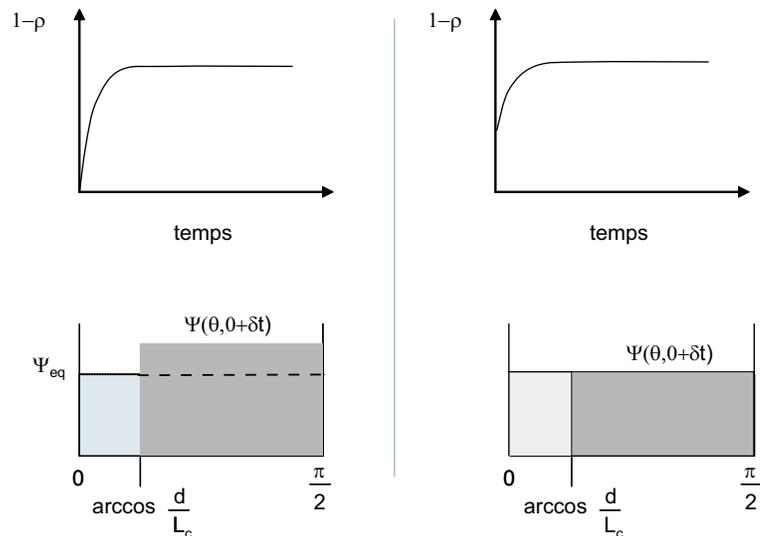


FIG. 3.17 – Prise en compte de la paroi réactive dans le modèle de réaction-diffusion. Cas A : Les bâtonnets qui étaient présents à un angle inférieur à  $\arccos \frac{d}{L_c}$  avant l’approche de la bille voisine, sont redistribués dans l’espace inter-billes. Cas B : Ils réagissent instantanément et disparaissent de la distribution. La courbe de cinétique, ne passe alors plus par l’origine.

De plus, différents facteurs ralentissant la diffusion n’ont pas été pris en compte et sont donc contenus dans le préfacteur  $A = 2.10^6$ .

- La densité de récepteurs sur la paroi réactive peut être calculée : pour 135 sites actifs par bille, sachant que l’aire projetée d’une molécule de streptavidine est de l’ordre de  $25 \text{ nm}^2$  [29], la surface recouverte de streptavidine ne représente que 3,5 % de la surface totale. Cela diminue d’autant la probabilité de réaction de la biotine lorsqu’elle touche la surface de la bille opposée.
- La mobilité du support : en effet, les ligands et les récepteurs sont portés par des billes soumises à un mouvement de rotation. Les ligands ne sont donc pas face à la bille voisine pendant tout le temps de l’expérience, ce qui a également pour effet de ralentir la réaction. Pour la prendre en compte, il faudrait faire une moyenne sur les temps de réactions en fonction de la position de l’ADN sur la bille par rapport à la bille voisine.
- La présence des cheveux de polymères à la surface des billes augmente légèrement la viscosité

du milieu, ce qui aura pour effet de diminuer le coefficient de rotation des bâtonnets.

Enfin, pour ce modèle, nous avons considéré un profil d'énergie présentant uniquement un puits profond en  $\arccos \frac{d}{L_c}$ . Il pourrait y avoir une barrière d'énergie à franchir pour que l'extrémité biotinylée s'approche suffisamment près de la paroi (à une distance de  $5 \text{ \AA}$  environ) pour pouvoir réagir (fig. 3.18). Dans ce cas, il y aura un préfacteur de la forme  $e^{-\frac{U}{k_B T}}$  important devant l'équation (3.39).

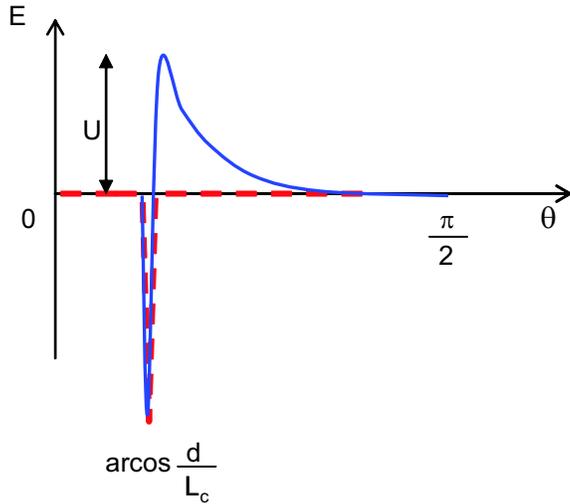


FIG. 3.18 – Profil d'énergie du système en fonction de l'angle. Ligne pointillée : profil considéré dans le modèle utilisé. Ligne pleine : profil d'énergie en présence d'une barrière d'énergie.

Cette barrière d'énergie peut être due à une répulsion stérique due aux cheveux de polymère ou à la rugosité de la paroi par exemple. Nous avons cependant vérifié qu'elle n'était pas due à la répulsion électrostatique, en réalisant une expérience à force ionique plus élevée (100 mM, fig. 3.16) ce qui n'a pas accéléré significativement la réaction.

### 3.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible de mesurer des constantes de cinétique à 2D en utilisant des colloïdes magnétiques. Cette méthode présente plusieurs avantages :

- Elle est simple à mettre en œuvre.
- La distance entre les deux surfaces est contrôlée par le champ magnétique. Les surfaces ne sont pas écrasées comme c'est le cas pour la méthode des micropipettes ou en AFM où l'on pousse les surfaces au contact avec une force de l'ordre de 50 pN pour les micropipettes et encore plus importante pour l'AFM.
- En utilisant un faible taux de ligands par unité de surface, on peut être certain de n'avoir qu'une seule liaison entre deux billes, directement observable en comptant le nombre de doublets formés.

Cependant, les expériences effectuées jusqu'à présent, ne nous permettent pas de définir clairement le rôle de la dynamique de l'espaceur et le rôle de la réaction intrinsèque du couple streptavidine-biotine dans la formation des liens entre les billes.

Il faudrait tout d'abord mesurer la cinétique de réaction entre des biotines libres fluorescentes et des billes greffées streptavidine, puis la cinétique de réaction entre des biotines liées à l'ADN et les billes greffées streptavidine. On pourrait ainsi déjà mettre en évidence le ralentissement de la réaction intrinsèque entre la biotine et la streptavidine dû au greffage de la streptavidine sur la surface, et à la gêne stérique engendrée par l'ADN.

Puis, on pourra apporter les améliorations les plus importantes au modèle, pour prendre en compte la gêne stérique due aux cheveux de polymères et la rotation des billes par exemple. Ceci nous permettra également de comprendre le rôle des cheveux de polymère.

On pourra alors utiliser cette méthode pour mesurer les cinétiques de liaison d'autres couples ligand-récepteur moins forts. En effet, le couple que nous avons choisi a une constante d'affinité très élevée.



# Bibliographie

- [1] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.*, 72 :1541–1555, 1997.
- [2] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397 :50–53, 1999.
- [3] R. Alon, D. A. Hammer, and T. A. Springer. Lifetime of P-selectin carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*, 374 :539–542, 1995.
- [4] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :3477–3481, 1996.
- [5] S. E. Chesla, P. Selvaraj, and C. Zhu. Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. *Biophys. J.*, 75 :1553–1572, 1998.
- [6] A. Pierres, A.-M. Benoliel, and P. Bongrand. Studying receptor-mediated cell adhesion at the single molecular level. *Cell Adhesion Commun.*, 5 :375–395, 1998.
- [7] D. Cuvelier and P. Nassoy. Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Phys. Rev. Lett.*, To be published.
- [8] G. I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200 :618–627, 1978.
- [9] G. I. Bell, M. Dembo, and P. Bongrand. Cell Adhesion. *Biophys. J.*, 45 :1051–1064, 1984.
- [10] M. L. Dustin, S. K. Bromley, M. M. Davis, and C. Zhu. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 17 :133–157, 2001.
- [11] D. A. Lauffenburger and J. J. Linderman. *Receptors*. Oxford University Press, New York, 1996.
- [12] N. M. Green. *Adv. Protein Chem*, 29 :85–133, 1975.
- [13] N. M. Green. Avidin and Streptavidin. *Methods Enzymol.*, 184 :51–67, 1990.
- [14] A. Chilkoti and S. Stayton. Molecular origins of the slow streptavidin-biotin dissociation kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, 117 :10622–10628, 1995.
- [15] P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano, and F. R. Salemme. Crystallographic and thermodynamic comparison of natural and synthetic ligands bound to streptavidin. *J. Am. Chem. Soc.*, 114 :3197–3200, 1992.
- [16] H. A. Helm, W. Knoll, and J. N. Israelachvili. Measurement of ligand-receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 :8169–8173, 1991.

- [17] V. T. Moy, E. L. Florin, and H. E. Gaub. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*, 266 :257–258, 1994.
- [18] G. U. Lee, D. A. Kidwell, and R. J. Colton. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir*, 10 :354–357, 1994.
- [19] S. S. Wong, E. Joselevich, A. T. Wooley, D. L. Cheung, and C. M. Lieber. Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology. *Nature*, 394 :52–55, 1998.
- [20] A. Pierres, A.-M. Benoliel, and P. Bongrand. Use of a laminar flow chamber to study the rate of bond formation and dissociation between surface-bound adhesion molecules : Effect of applied force and distance between surfaces. *Faraday Discussion*, 111 :321–330, 1998.
- [21] A. Pierres, D. Touchard, A.-M. Benoliel, and P. Bongrand. Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys. J.*, 82 :3214–3223, 2002.
- [22] J. Y. Wong, T. L. Kuhl, J. N. Israelachvili, N. Mullah, and S. Zalipsky. Direct measurement of a tethered ligand-receptor interaction potential. *Science*, pages 820–822, 1997.
- [23] C. Jeppesen, J. Y. Wong, T. L. Kuhl, J. N. Israelachvili, N. Mullah, S. Zalipsky, and C. M. Marques. Impact of polymer tether length on multiple ligand-receptor bond formation. *Science*, 293 :465–468, 2001.
- [24] A. G. Moreira, C. Jeppesen, F. Tanaka, and C. M. Marques. Irreversible vs reversible bridging : when is kinetics relevant for adhesion ? *Europhys. Lett.*, 2003.
- [25] A. G. Moreira and C. M. Marques. The role of polymer spacers in specific adhesion. *J. Chem. Phys.*, 120(13) :6229–6237, 2004.
- [26] J. H. E. Promislow, A. P. Gast, and M. Fermigier. Aggregation kinetics of paramagnetic colloidal particles. *J. Chem. Phys.*, 102(13) :5492–5498, 1995.
- [27] M. Doi and S. F. Edwards. *The theory of polymer dynamics*. Clarendon, Oxford, 1986.
- [28] S.-C. Huang, M. D. Stump, R. Weiss, and K. D. Caldwell. Binding of biotinylated DNA to streptavidin-coated polystyrene latex : effects of chain length and particle size. *Analytical Biochemistry*, 237 :115–122, 1996.
- [29] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, and F. R. Salemme. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 243(4887) :85–88, 1989.

# Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que l'on pouvait utiliser des colloïdes magnétiques browniens pour réaliser des études en molécule unique. La manipulation implique le contrôle des forces dipolaires entre les billes magnétiques, la distance étant mesurée par diffraction de la lumière. Plus particulièrement, nous avons montré que cette approche peut s'appliquer à l'étude des biomolécules de 10-50 nm environ, ce qui correspond à la taille de l'espace interparticules. Afin de valider cette méthode, nous avons choisi d'utiliser un système modèle, simple et bien caractérisé : l'ADN et la liaison biotine-streptavidine.

Nous avons ainsi montré qu'il était possible, par cette méthode, de mesurer la flexibilité d'un polymère semi-flexible de petite taille. Ce régime n'avait jusqu'alors jamais été étudié en molécule unique à cause des difficultés expérimentales liées au contrôle précis de distances faibles.

Nous avons également montré que cette méthode permet de mesurer des cinétiques de reconnaissances de type ligand-recepteur lorsque les deux molécules sont accrochées à des surfaces. Pour la première fois, la cinétique d'accrochage de deux surfaces par une seule molécule a pu être mesurée, en fonction de la distance entre ces surfaces.

Cependant, il reste des incertitudes dues notamment à la présence de polymère à la surface des colloïdes. Il faudrait donc améliorer la connaissance de la surface ou utiliser des billes magnétiques plus régulières (billes non polymérisées, billes de silices). Ces expériences permettraient de mieux comprendre le rôle de l'espaceur et celui des cheveux de polymères entourant la streptavidine.

On pourra ensuite envisager d'appliquer cette méthode à l'étude de systèmes plus complexes d'intérêt biologique.

On pourra par exemple mesurer les interactions ADN-protéines dans des régimes de longueur d'ADN faible, jusqu'alors inaccessible en utilisant les techniques classiques de micromanipulation de molécules uniques. Ainsi, on pourra mesurer la contrainte de flexion exercée par certaines protéines sur l'ADN. Sur de longues molécules d'ADN, cette contrainte est difficilement mesurable car elle engendre une diminution de flexibilité faible devant la flexibilité de longues molécules d'ADN.

On pourra également s'intéresser aux interactions de l'ADN avec des enzymes. Nous avons ainsi réalisé des expériences préliminaires montrant que l'on pouvait casser les chaînes permanentes formées en utilisant une enzyme de restriction, ceci montre que les enzymes peuvent agir sur le lien d'ADN bien que l'espace entre les deux billes soit restreint.

Enfin, on pourra également mesurer la cinétique d'autres couples ligand-récepteur en fonction de la distance entre les surfaces. La compréhension de ces phénomènes pour des systèmes diversifiés permet d'envisager leur utilisation pour des tests immunologiques rapides et précis.

## Annexe A

# Calcul des forces de Van der Waals entre les particules

Les billes sont constituées d'un cœur dur comprenant de l'oxyde de fer et du polymère et d'une croute de polymère réticulé enveloppant le cœur dur. Lorsque l'on calcule les Forces de Van der Waals entre deux billes à travers l'eau, il faut donc tenir compte de trois milieux : le cœur dur, la croute de polymère et l'eau. On considère en première approximation que le polymère, formé à partir d'un mélange de différents monomères, est du polystyrène. On considère que l'on a 5 couches disposées comme le montre la figure (A.1).

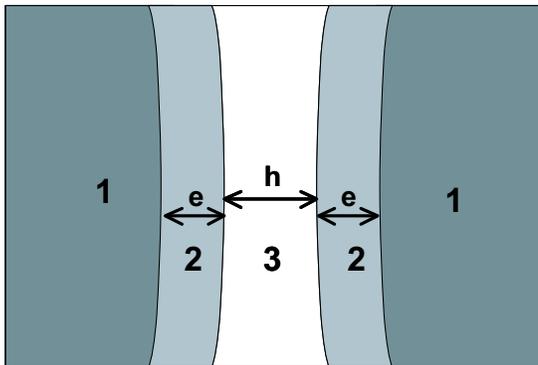


FIG. A.1 – Schéma des couches intervenant dans la force de Van der Waals. Milieu 1 : cœur dur. Milieu 2 : polymère. Milieu 3 : eau.

La force de Van der Waals qui s'exerce au travers d'un tel système est de la forme<sup>1</sup> :

$$F_{VdW}(h) = -\frac{r_2}{12} \left( \frac{A_{232}}{h^2} - \frac{2A_{123}}{(h+e)^2} + \frac{A_{121}}{(h+2e)^2} \right) \quad (\text{A.1})$$

où  $r_2$  est le rayon d'une bille (cœur dur + couche polymère) et  $A_{ijk}$  est la constante de Hamaker qui dépend de la nature des milieux considérés. Les milieux 1, 2 et 3 sont respectivement le cœur dur, la couche de polymère et la solution aqueuse.

<sup>1</sup>J. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces, second edition*. Academic Press, San Diego, second edition, 1991.

## Estimation de l'indice de réfraction du cœur dur

Le cœur dur est formé d'oxyde de fer et de polystyrène. Sa densité est d'environ 2,3 (Ademtech).

La composition du cœur dur est donc calculée à partir des densités de l'oxyde de fer et du polystyrène. On prendra respectivement pour les densités, les valeurs de 5,1 et 1. On en déduit donc la fraction massique d'oxyde de fer dans le cœur dur :  $\phi_m(Fe_2O_3) = 0,7 \%$ , ce qui correspond à une fraction molaire  $x_{Fe_2O_3} = 0,6$  (en prenant  $M_{Fe_2O_3} = 160$  g/mol et  $M_{PS} = 104$  g/mol la masse molaire d'un monomère de styrene).

Afin de calculer l'indice de réfraction du mélange, on calcule d'abord la réfraction molaire des différents composants. Pour cela on utilise la relation de Lorenz-Lorentz<sup>2</sup> qui relie la constante diélectrique  $\varepsilon$  à une fréquence donnée d'un corps pur à sa masse volumique  $\rho$  :

$$\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} = R \cdot \frac{\rho}{M} \quad (\text{A.2})$$

où  $M$  est la masse molaire du composé. À partir de cette expression, on calcule  $R_{Fe_2O_3} = 20,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  et  $R_{PS} = 36,1 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  en prenant<sup>3</sup> :  $\varepsilon_{Fe_2O_3} = 6,76$  et  $\varepsilon_{PS} = 2,6$ .

Pour estimer la réfraction molaire du mélange, on utilise une relation d'additivité des réfractances molaires, bien qu'elle ne soit rigoureusement valide que pour des liquides apolaires<sup>4</sup> :

$$R = \sum_j x_j R_j \quad (\text{A.3})$$

où  $x_j$  est la fraction molaire du composé  $j$  et  $R_j$  sa réfraction molaire. On obtient donc  $R_{cœur\ dur} = 26,8 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ . Enfin, en inversant l'équation (A.2), on peut calculer l'indice de réfraction du cœur dur sachant que, pour les fréquences de la lumière visible,  $n^2 = \varepsilon$ .

On trouve finalement  $n_{cœur\ dur} \simeq 1,8$ .

## Calcul des constantes de Hamaker

Les trois phases en présence ont les caractéristiques suivantes :

- Cœur dur :  $n_1 = 1,8$ ,  $\varepsilon_1 = 3,4$
- Polymère :  $n_2 = 1,6$ ,  $\varepsilon_2 = 2,6$
- eau :  $n_3 = 1,33$ ,  $\varepsilon_3 = 80$

<sup>2</sup>J. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces, second edition*. Academic Press, San Diego, second edition, 1991.

<sup>3</sup>D. R. Lide. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 2001-2002.

<sup>4</sup>A. Urbanczyk and W. A. Van Hook. *J. Chem. Thermodynamics*, 28 :975, 1996.

On calcule les constantes de Hamaker de la façon suivante<sup>2</sup> :

$$A_{232} = \frac{3}{4}k_B T \left( \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3} \right)^2 + \frac{3h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_2^2 - n_3^2)^2}{(n_2^2 + n_3^2)^{3/2}} \quad (\text{A.4})$$

$$A_{121} = \frac{3}{4}k_B T \left( \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^2 + \frac{3h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_2^2)^2}{(n_1^2 + n_2^2)^{3/2}} \quad (\text{A.5})$$

et

$$A_{123} = \frac{3}{4}k_B T \left( \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) \left( \frac{\varepsilon_3 - \varepsilon_2}{\varepsilon_3 + \varepsilon_2} \right) + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_2^2)(n_3^2 - n_2^2)}{(n_1^2 + n_2^2)^{1/2}(n_3^2 + n_2^2)^{1/2}\{(n_1^2 + n_2^2)^{1/2} + (n_3^2 + n_2^2)^{1/2}\}} \quad (\text{A.6})$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $h$  la constante de Planck,  $T$  la température en Kelvins et  $\nu_e \simeq 3.10^{15} \text{s}^{-1}$  la fréquence de plasma d'un gaz d'électrons libres.

On trouve alors :

$$A_{232} = 2,2.10^{-20} \text{ J}; A_{121} = 1,1.10^{-20} \text{ J}; A_{123} = -1,5.10^{-20} \text{ J}$$



## Annexe B

# La centrifugeuse à disque de CPS instrument

### Principe

La centrifugeuse à disque est constituée d'un disque creux transparent, qui tourne à une vitesse constante pouvant aller jusqu'à 18000 tr/min (fig. B.1). Le disque est rempli d'une solution de sucrose formant un gradient de densité. La suspension de particules est injectée au centre du disque et les particules (plus denses que le gradient de glucose) migrent vers l'extérieur du disque. Un laser et un détecteur optique placés sur le chemin des billes, perpendiculairement au disque, permettent de détecter les particules migrant en fonction du temps.

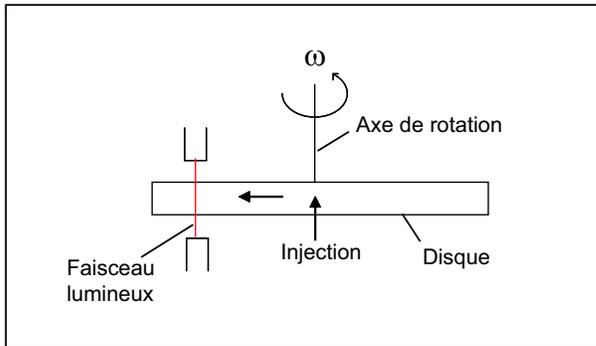


FIG. B.1 – Schéma simplifié de la centrifugeuse à disque.

Les particules sont séparées selon leur taille par sédimentation différentielle avant l'arrivée devant le détecteur.

Les particules sont soumises à deux forces antagonistes, la force gravitationnelle et la force de frottement visqueux. À l'équilibre :

$$F_{visc} = F_{grav} \quad (\text{B.1})$$

d'où

$$3\pi D\eta V = \frac{\pi}{6} D^3 (\rho_p - \rho_f) g \quad (\text{B.2})$$

où  $D$  est le diamètre de la particule,  $V$  sa vitesse,  $\rho_p$  et  $\rho_f$  les masses volumiques des particules et du fluide et  $g = \omega^2 R_d$  l'accélération gravitationnelle,  $R_d$  étant le rayon du disque.

On en déduit  $V$ , la vitesse de sédimentation en fonction du diamètre de la particule :

$$V = \frac{D^2(\rho_p - \rho_f)\omega^2 R}{18\eta} \quad (\text{B.3})$$

Cette équation est valable pour des particules sphériques.

## Séparation des doublets

Pour des doublets, on considère que l'on a un sphéroïde dont le rapport des rayons est de  $b/a = 0,5$ , dans ce cas les facteurs de frictions parallèles et perpendiculaires à l'axe le plus grand, sont corrigés par un facteur  $K$  par rapport à une sphère de rayon  $b = r$ <sup>1</sup> :

$$F_{//} = f_{//} \cdot V = 6\pi\eta r K_{//} \cdot V \quad (\text{B.4})$$

et

$$F_{\perp} = f_{\perp} \cdot V = 6\pi\eta r K_{\perp} \cdot V \quad (\text{B.5})$$

avec  $K_{//} = 1,20$  et  $K_{\perp} = 1,81$ . Par analogie avec le cas des bâtonnets<sup>2</sup> le coefficient de friction effectif d'un sphéroïde ayant une orientation quelconque par rapport au flux, est donné par la formule suivante :

$$\frac{1}{f_{eff}} = \frac{1}{3} \left( \frac{1}{f_{//}} + \frac{2}{f_{\perp}} \right) \quad (\text{B.6})$$

d'où

$$f_{eff} = f_{sing} * 1,55 \quad (\text{B.7})$$

On a donc pour un doublet de particules :

$$3\pi D\eta * 1,55V = 2 * \frac{\pi}{6} D^3 (\rho_p - \rho_f) g \quad (\text{B.8})$$

d'où

$$V_{doublet} \simeq 1,29V_{sing} \quad (\text{B.9})$$

## Estimation de la force appliquée sur un doublet

Dans la centrifugeuse, le doublet subit une force que nous estimons :

$$F_{visc} = 3\pi\eta DV \quad (\text{B.10})$$

<sup>1</sup>J. Happel, H. Brenner, *Low Reynolds number hydrodynamics*, 1983, The Hague, Martinus Nijhoff Publishers.

<sup>2</sup>A. De Keizer, W. P. T. van der Drift, J. T. G. Overbeek, *Electrophoresis of randomly oriented cylindrical particles*, *Biophys. Chem.*, 1975, 3(1), 107-108.

où  $D$  est le diamètre du disque d'environ 200 nm et  $V$  est sa vitesse de sédimentation.

$$V = \frac{D^2(\rho_p - \rho_f)\omega^2 R_d}{18\eta} \quad (\text{B.11})$$

avec  $\rho_p = 1,8\text{g/cm}^3$  et  $\rho_f = 1,045\text{g/cm}^3$  les masses volumiques de la particule et du fluide,  $R_d \simeq 15\text{cm}$  le rayon du disque et  $\eta \simeq 1,2 \cdot 10^{-3}\text{Pa.s}$  la viscosité du fluide.  $\omega = 18000\text{tr/min}$  est la vitesse de rotation du disque. On trouve alors une vitesse de sédimentation de  $7,45 \cdot 10^{-4}\text{ m.s}^{-1}$ .

La force s'appliquant sur le doublet est donc d'environ 2 pN.



## Annexe C

# Quantification du nombre de sites actifs par la biotine fluorescente

Mise au point du protocole : C. Gauchotte, projet de 3<sup>eme</sup> année, ESPCI.

### Préparation du tampon

Le tampon utilisé est un tampon tétraborate à **pH=8,5**, à 0,01 M.

- Dissoudre **0,4779 g** de sodium tetraborate (MW=381,4 g.mol<sup>-1</sup>) dans **50 mL**, on obtient une solution à **9,55g/l**.
- Dissoudre **0,4342 g** d'acide borique (MW=61,8 g.mol<sup>-1</sup>) dans **60 mL**, on obtient une solution à **6,21g/l**.
- Mélanger **50 ml** de la solution d'acide borique avec **14,5 mL** de la solution de tétraborate de Sodium, puis on porte à un volume total de **500ml**.
- Ajuster le pH avec HCl concentré et NaOH à 1 M.
- Ajouter 1 g de tween 20 et 0,1 g de NaN<sub>3</sub> (0,02 %).

### Préparation d'une solution de stockage de Biotine Fluorescéine.

Une solution de stockage de 1 mg/mL BF est préparée en dissolvant 1 mg de BF solide dans 1 ml de DMF (diméthylformamide). La solution de stockage peut être stockée dans le noir au réfrigérateur et durera plusieurs mois.

### Préparation d'une solution de BF : $S_0$

- $S_0$  est préparée avec 50  $\mu\text{L}$  de la solution de stockage dans 10 mL de tampon.
- La concentration exacte de  $S_0$  est déterminée par son absorbance à 494 nm :

$$c_0 = \frac{\varepsilon}{106945}$$

(  $\varepsilon$  déterminée grâce à la droite d'étalonnage)

## Préparation d'une solution de BF à 10<sup>-8</sup> : S<sub>1</sub>

S<sub>1</sub> est préparée à partir de S<sub>0</sub>.

Diluer  $V = \frac{10^{-8}}{c_0} * 10 * 10^{+3} \mu\text{L}$  de S<sub>0</sub> dans 10 mL de tampon.

## Préparation des billes

- La quantité nécessaire de billes est de 70  $\mu\text{L}$  de billes à 0,5 % (dilution adéquate réalisée préalablement).
- Les billes sont lavées 5 fois dans le tampon.
- Préparer 5 échantillons en faisant varier la quantité de billes :

Nom de l'échantillon	Quantité de billes( $\mu\text{L}$ )	Volume de tampon ( $\mu\text{L}$ )	Volume de BF (S <sub>1</sub> )( $\mu\text{L}$ )
10	10	40	950
15	15	35	950
20	20	30	950
25	25	25	950
Ref	0	50	950

- On laisse tourner les échantillons dans du papier aluminium à 10 sur le soleil pendant 30 minutes.

## Préparation des mesures

- Pour chaque échantillon, séparer les billes de la solution avec un aimant.
- Récupérer la solution avec une seringue (5 ml).
- Filtrer avec des filtres non stériles 0,22 $\mu\text{m}$  millex dans les cuves en plastique à 4 faces optiques.
- Réaliser également un échantillon de tampon filtré (le blanc).

## Mesures

Les mesures de fluorescence sont effectuées à l'aide du spectrofluorimètre SPEX Fluoromax-2. L'excitation se fait à 490 nm et l'observation à 520 nm. Une droite de calibration de la fluorescence de la BF en fonction de sa concentration dans les mêmes conditions a été effectuée au préalable.

Tracer

$$\frac{Intensite_{echantillon} - Intensite_{blanc}}{Intensite_{ref} - Intensite_{blanc}} = f(\mu\text{Ldebilles})$$

On observe une droite décroissante.

Si  $K_1$  est la pente de la droite,  $c_{ref}$  la concentration de la référence et  $K_2$  la pente de la droite de calibration, alors

$$c_{ref} = \frac{Intensite_{ref}}{K_2}$$

et

$$moleBiotine/mg = \frac{c_{ref} * 10^{-3} * K_1}{0.01 * 0.5 * 100}$$



## Annexe D

# Protocole de greffage de la streptavidine

Ce protocole de greffage a été mis au point pour les billes Ademtech 0212b d'environ 200 nm de diamètre et ayant un nombre de COOH d'environ 500 nmol par mg de billes. Il permet d'obtenir environ 60 à 80 pmol de sites actifs par mg de billes (dosage à la biotine fluorescente). Il conviendra de l'adapter en fonction des billes utilisées (taille, nombre de fonction COOH) et de la quantité de streptavidine que l'on désire greffer.

### Tampons utilisés :

	Composition
Tampon 1	Tampon MES 20 mM à pH 5,5
Tampon 2	Tampon phosphate 10 mM à pH 7,2
Tampon 3	Tampon phosphate 10 mM à pH 7,2 + glycine (15 g/L)

**Préparation des billes** Les billes sont livrées dans une solution de Symperonic F127 0,3 % (taux de solide = 3 %).

- Prélever 32 ml de billes et ajouter 18 ml de tampon 1.
- Effectuer 3 lavages dans le même tampon : on obtient 50 ml de billes à 2 %w/w dans le tampon 1.
- Vérifier l'état d'agrégation des billes au microscope optique.

**Préparation de la solution de streptavidine** La solution de streptavidine utilisée est à une concentration de 4 g/L.

- Dissoudre 1 mg de Streptavidine déshydratée (Sigma) dans 250  $\mu$ L de tampon 2.
- Aliquoter la solution par tubes de 105  $\mu$ L et congeler les aliquots non utilisés.

**Préparation des solutions d'agent de couplage** L'EDC (N'(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide hydrochloride, Aldrich) est sensible à l'eau, il faut donc préparer les solutions d'agent de couplage au dernier moment.

- Dissoudre 10 mg d'EDC et 10 mg de NHSS (sel de sodium de la N-hydroxysulfosuccinimide, Fluka) dans 4 mL de tampon 1.

#### **Activation des fonctions COOH**

- Ajouter à la suspension de billes préparée, 50  $\mu\text{L}$  de solution d'agent de couplage.
- Placer le mélange dans un bain thermostaté à 44°C pendant 20 min.

#### **Élimination de l'excès d'EDC et de NHSS**

- Effectuer 2 lavages (100 $\mu\text{L}$ ) avec le tampon 2. Pour le deuxième lavage, redisperser les billes dans seulement 50  $\mu\text{L}$  de tampon 2.

#### **Réaction de couplage**

- Ajouter 50  $\mu\text{L}$  de solution de streptavidine à la suspension de billes.
- Agiter et placer le mélange dans un bain thermostaté à 44°C pendant 30 min.

#### **Arrêt de la réaction**

- Ajouter 50  $\mu\text{L}$  de tampon 3
- Laver 3 fois avec 100  $\mu\text{L}$  de tampon 3.
- Vérifier la stabilité des billes au microscope.
- Conserver au réfrigérateur à 4°C.

Le tampon de conservation peut également contenir du Symperonic F127 à 0,5 % pour une meilleure stabilité à long terme.

## Annexe E

# Synthèse de l'ADN par PCR

La PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet d'amplifier une courte séquence nucléotidique donnée, de manière sélective et rapide, en grande quantité, à partir d'une matrice d'ADN qui la contient. C'est une technique de réplication ciblée *in-vitro*. Elle est largement utilisée, par exemple pour les tests de diagnostic des maladies génétiques ou pour fournir de grandes quantités de gène, à partir d'un échantillon d'ADN.

### Principe

La PCR est basée sur l'utilisation de l'ADN polymérase pour copier une séquence d'ADN grâce à des cycles répétés de température.

La polymérase, l'enzyme de la réplication, recopie l'ADN en suivant l'un des brins dans le sens 5' vers 3'. La polymérase utilisée est isolée d'une bactérie thermophile, elle est donc stable à des températures bien supérieures à celle des ADN polymérases eucaryotes, de sorte qu'elle n'est pas dénaturée lors des différentes étapes du cycle de température.

La polymérase est orientée vers la séquence cible par une courte amorce d'oligonucléotides hybridée à la matrice d'ADN au début de la séquence désirée. Ainsi pour une séquence cible, on utilise deux amorces, l'une sur chaque brin, débutant la réplication dans le sens 5' vers 3'. Ces amorces encadrent donc la séquence cible. Les amorces doivent être synthétisées chimiquement, la PCR peut être utilisée pour cloner des séquences d'ADN dont le début et la fin sont connus, où pour reproduire des séquences en choisissant des primers au hasard (random priming).

Un cycle de réplication comprend trois étapes à des températures différentes (fig. E.1A) :

- Pendant la première étape, l'ADN est chauffé pour séparer les brins d'ADN (dénaturation,  $T \sim 94^{\circ}\text{C}$ ).
- Pendant la deuxième étape, la température est abaissée afin de permettre l'hybridation des amorces sur les brins d'ADN ( $T \sim 60^{\circ}\text{C}$ )
- La troisième étape correspond à la synthèse de l'ADN par la polymérase à partir des amorces et en présence des quatre désoxyribonucléosides triphosphates ( $T \sim 72^{\circ}\text{C}$ ).

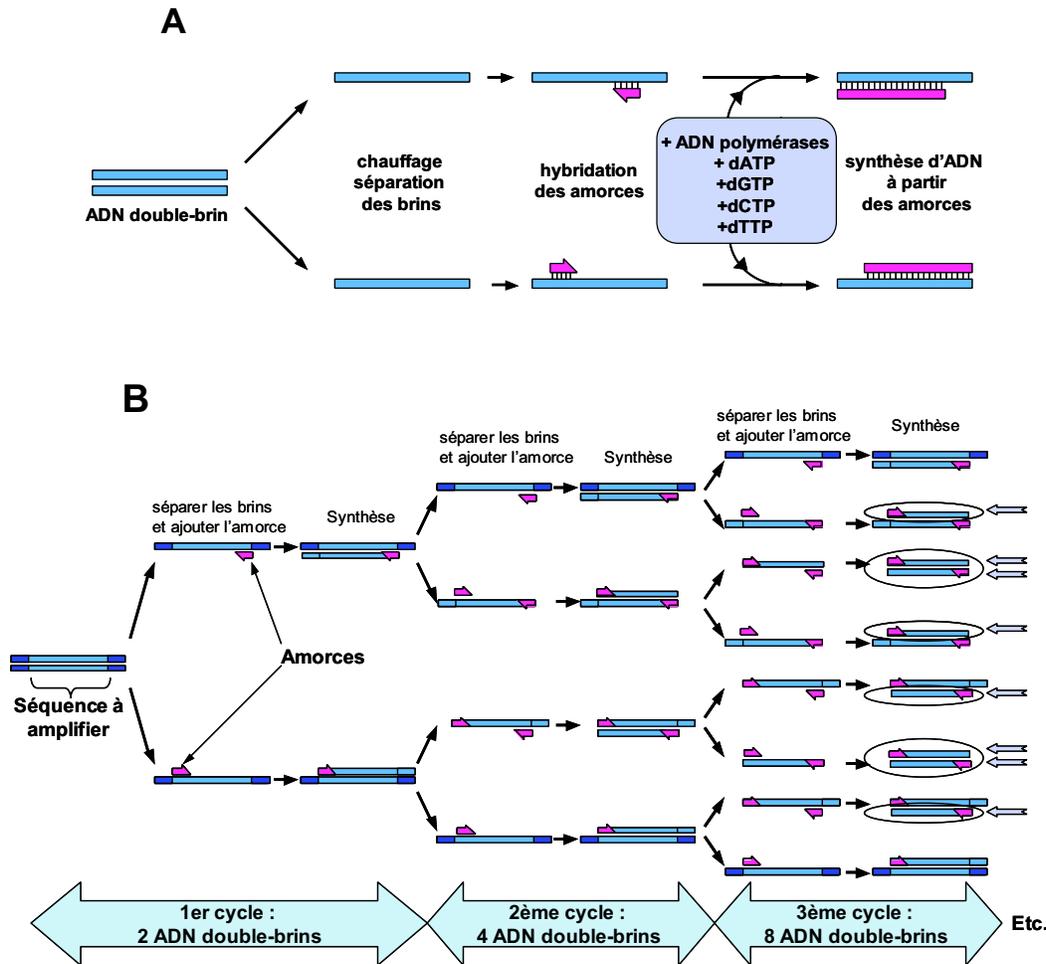


FIG. E.1 – Schéma de principe de la PCR. A : Les trois étapes d'un cycle de PCR. B : Produits obtenus après les premiers cycles de PCR. Les brins d'ADN entourés au troisième cycle correspondent exactement à la séquence à amplifier.

A chaque cycle de réplication, la quantité de séquence d'ADN copiée est en théorie doublée. Au bout de  $n$  cycles, on obtient alors  $2^n$  copies identiques de la séquence voulue<sup>1</sup>. L'exemple donné (fig. E.1B) montre que, après trois cycles, huit brins d'ADN sur seize correspondent à la longueur désirée, les autres brins contiennent de l'ADN supplémentaire en aval de la séquence initiale, qui est répliquée dans les premiers cycles. Au bout de quatre cycles supplémentaires, 240 des 256 brins d'ADN auront la longueur désirée, et après plusieurs cycles supplémentaires, on peut considérer que tous les brins d'ADN ont la même longueur, le nombre de brins plus longs étant négligeable.

La PCR est extrêmement sensible. Elle permet de détecter une seule copie d'une séquence

<sup>1</sup>En pratique, la phase exponentielle ne concerne que les 10 premiers cycles, par la suite, on atteint un plateau dû à la modification de la quantité de réactifs au fil des cycles.

	right1	right2	right3	right 4	right 5
left1	151 pb	1257 pb	4721 pb		
left2	2347 pb			757 pb	
left3	944 pb				
left4		468 pb			109 pb
left5	315 pb				
left6		76 pb			

TAB. E.1 – Taille des ADN obtenus en utilisant les différentes combinaisons d’amorces gauches et droites (left et right).

d’ADN située dans un échantillon quelconque, et cela en l’amplifiant suffisamment pour qu’elle devienne détectable en la colorant par exemple, après séparation par électrophorèse sur gel.

## Produits

**Matrice d’ADN :** ADN du bactériophage  $\lambda$  (Sigma).

**Polymérase :** Kit de PCR (Expand High Fidelity PCR System, Roche Applied Science, Meylan) comprenant un mélange de *Taq* et de *Pwo* ADN polymérases ainsi que les tampons nécessaires à la PCR.

**Désoxyribonucléosides triphosphate :** Mélange des 4 bases (dNTPs, Roche Applied Science, Meylan).

**Amorces :**  $\sim 20$  nucléotides avec une biotine en 5’ (synthétisées par Eurogentec, Seraing, Belgique).

La combinaison de 6 amorces ”gauches” et de 5 amorces ”droites” permet ici la synthèse de 10 ADN de tailles différentes. Les combinaisons utilisées sont présentée dans le tableau E.1.

Les séquences des amorces sont choisies à l’aide du logiciel PRIMER3<sup>2</sup>, elles s’écrivent dans le sens 5’ vers 3’ (tableau E.2).

## Protocole

Pour chaque microtube de PCR (volume total 100  $\mu\text{L}$ ), le milieu réactionnel contient 100 ng de la matrice d’ADN à copier, 100 pmol de chacune des amorces biotinyllées, 3,5 unités d’ADN

<sup>2</sup>PRIMER3 : [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Nom	Séquence
left1	GACGATTCATAAGTTCCGCTGT
left2	ATAAATTCGCACAGCAGCAAC
left3	GAATGGCAAAGGCACCAGTA
left4	AAAGCCAGAACTCCCCGTAT
left5	GGAGGCTATTTCCGTATGTCG
left6	GATTGAAGGTCCGGTGGATG
right1	GTTACGCCACCAGTCATCCT
right2	GGTATTCCCCTCAGTGTCCAG
right3	TCACGTTAATCCCTTTCAGATG
right4	TTCGTGCCGTCGTTGTTAAT
right5	CGTACAGAACAGGCAGAACATT

TAB. E.2 – Séquences des amorces utilisées.

polymérase et 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs dans 100  $\mu\text{L}$  de solution de  $\text{MgCl}_2$  à 1,5 mM.

L'amplification *in vitro* a lieu dans un Thermocycleur Perkin Elmer. 30 cycles sont effectués comprenant chacun, une étape de dénaturation à 94°C pendant 45 s, une étape d'hybridation à 60°C pendant 45 s et une étape de synthèse d'ADN à 72°C pendant 2 min.

Les ADN obtenus sont alors purifiés au travers de colonnes d'exclusion stérique Chroma Spin+TE-100 (pour les ADN de 76 à 468 pb) ou Chroma Spin+TE-600 (pour les ADN de plus de 757 pb, BD Bioscience, Palo Alto, Ca, USA), précipités dans 2 volumes d'éthanol- $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,3 M pH 5,2, lavés dans 2 volumes d'éthanol, séchés, puis resolubilisés dans le tampon Tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 8 (TE).

Une électrophorèse sur gel (fig. E.2) est effectuée pour vérifier que l'ADN désiré est bien présent et suffisamment pur.

Chaque solution d'ADN est ensuite quantifiée par fluorescence en utilisant le PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, Or, USA).

## Quantification

Une solution mère d'ADN  $\lambda$  à 50 ng/ $\mu\text{L}$  est préparée. 70  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ensuite prélevés et dilués 10 fois. L'absorption de la solution diluée est mesurée à 260 nm. La concentration exacte en ADN est calculée sachant qu'une solution à 5 ng/L a une absorption  $A_{260nm} = 0,1$ . La solution mère, dont on connaît maintenant précisément la concentration, servira à réaliser des étalons contenant une quantité connue d'ADN.

Une solution de PicoGreen diluée dans le tampon TE, est préparée au dernier moment à partir de la solution concentrée obtenue du fournisseur (dilution à 5  $\mu\text{L}$  par mL de tampon) et conservée à l'abri de la lumière. Dans des microtubes de 1,5 mL, sont ajoutés à 1 mL de solution diluée de

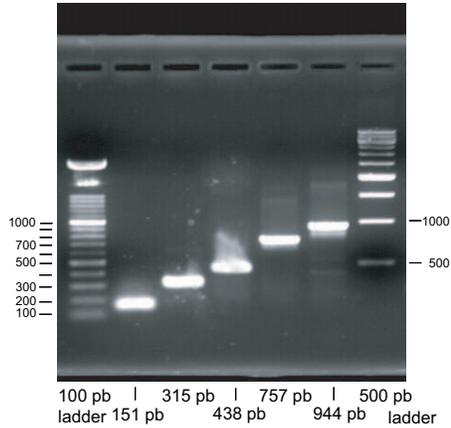


FIG. E.2 – Gel d'électrophorèse : gel d'agarose à 1,5 % dans un tampon tris-acétate-EDTA 1X à pH 8,3 (10 V/cm).

PicoGreen, 4  $\mu\text{L}$  de solution d'ADN à doser, ou, pour les étalons, respectivement 2, 4, 8 et 12  $\mu\text{L}$  de la solution mère d'ADN  $\lambda$  à 50 ng/ $\mu\text{L}$ . Une solution de référence est également préparée sans ADN. Les tubes sont conservés à l'abri de la lumière pendant 5 min puis la fluorescence est mesurée à 520 nm (excitation = 480 nm). Une droite de calibration est tracée à partir des étalons :  $fluo - fluo(ref) = f(\text{qtité d'ADN en ng})$  (fig. E.3).

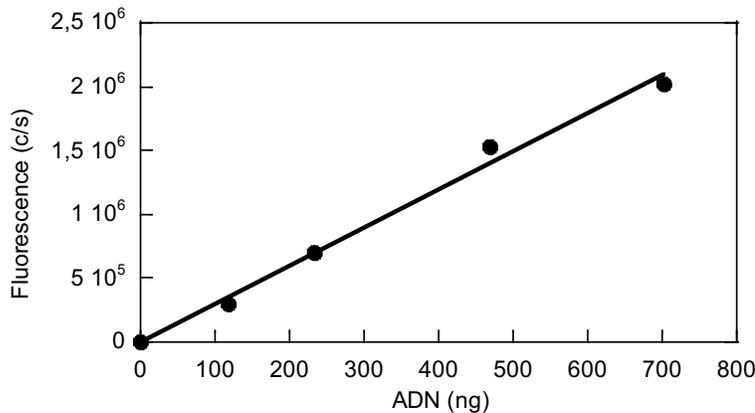


FIG. E.3 – Droite d'étalonnage pour le dosage de l'ADN par le PicoGreen. Les points de mesures sont modélisés par une droite passant par l'origine. La pente est de  $2997 \pm 87$ , l'erreur sur la mesure est d'environ 3 %. A chaque dosage, cette droite d'étalonnage est à nouveau réalisée afin de tenir compte des variations des conditions de manipulation.

La masse d'ADN dans la solution à doser est ensuite déduite de cette droite d'étalonnage par proportionnalité. Connaissant la masse molaire des ADN en fonction de leur taille, on en déduit la concentration en ADN des solutions obtenues par PCR ( $M(1\text{pb}) = 635 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

## Conclusion

Les concentrations typiques obtenues (pour deux microtubes de PCR) sont de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$  pour un ADN de 151 pb et de 0,1  $\mu\text{m}$  pour les ADN les plus longs (>2347 pb).



## Annexe F

# Formation de chaînes permanentes avec de longs ADN

L'influence de la longueur de l'ADN sur la formation des chaînes permanentes a été étudiée. Les expériences sont effectuées dans les conditions suivantes :

- Concentration en billes : 0,1 % en masse.
- Concentration en ADN :  $3 \cdot 10^{-8}$  M.
- Tampon : phosphate 10 mM + Symperonic 0,5 %.
- Temps d'incubation : 10 min.
- Champ magnétique : 30 mT pendant 10 min.

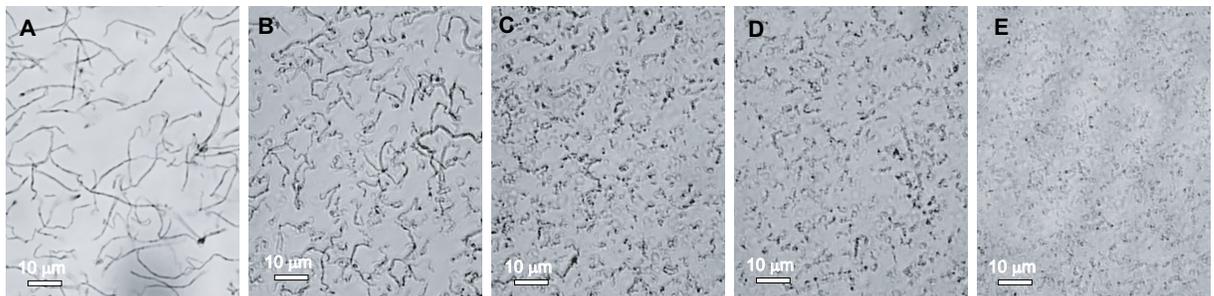


FIG. F.1 – Chaînes de billes 0,1% + ADN  $3 \cdot 10^{-8}$ M dans tampon phosphate + F127 en fonction de la force ionique après 10 min à 30 mT. A : ADN 151 pb, B : ADN 315 pb, C : ADN 438 pb, D : ADN 757 pb, E : ADN 2347 pb.

On voit que, plus les ADN utilisés sont longs, plus les chaînes permanentes sont courtes et flexibles (fig. F.1). Les ADN les plus longs sont très flexibles car ils ont une longueur égale à plusieurs fois la longueur de persistance. Ils peuvent donc certainement réagir aux deux extrémités sur la même bille en formant une boucle à la surface des billes, et cela pendant le temps d'incubation, avant même que l'on ait aligné les billes sous champ. Deux solutions sont proposées ici pour tenter de contourner ce problème.

La première solution consiste à différencier les deux extrémités des brins d'ADN en synthétisant des ADN ayant une biotine à une extrémité et une digoxygénine à l'autre extrémité, chaque extrémité réagissant respectivement avec une bille greffée streptavidine et une bille greffée anti-digoxygénine. L'inconvénient est qu'il faut une alternance parfaite de billes streptavidine et anti-digoxygénine pour pouvoir former de longues chaînes. Nous avons essayé de placer l'échantillon dans un champ magnétique alternatif afin de redisperser les billes qui ne seraient pas accrochées puis de reformer des chaînes, et cela un grand nombre de fois. Les résultats n'ont pas été vraiment concluants puisque lorsque l'on redisperse les billes, les petites chaînes déjà formées perdent leur orientation et lorsque le champ est à nouveau appliqué, elle ne s'alignent pas correctement (formation d'épingles). On obtient alors des chaînes permanentes très épaisses qui ne ressemblent plus vraiment à des lignes parfaites (fig. F.2).

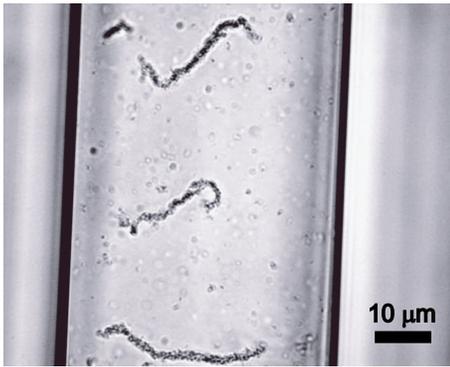


FIG. F.2 – Cliché de microscopie optique : Formation de chaînes avec de l'ADN 757 pb en champ alternatif.

La deuxième solution consiste à aligner d'abord les billes streptavidine sous champ et à ajouter l'ADN dibiotine une fois les chaînes formées. Biswal *et al.*<sup>1</sup> ont utilisé cette méthode pour fabriquer des chaînes permanentes avec de longs PEG dibiotine qui sont très flexibles. Mais cela nécessite un montage un peu plus compliqué, de plus on ne peut alors pas contrôler le nombre de liens d'ADN entre chaque bille. Cette piste semble toutefois la plus prometteuse pour former des chaînes avec de longs ADN. En effet, si l'on mélange l'ADN et les billes et que l'on place immédiatement le mélange sous champ (sans temps d'incubation), on peut arriver à former des chaînes d'une vingtaine de microns. Cependant il reste aussi un nombre important de billes isolées même après 1 heure sous champ magnétique.

<sup>1</sup>S. L. Biswal and A. P. Gast. Mechanics of semiflexible chains formed by poly(ethylene glycol)-linked paramagnetic particles. *Physical Review E*, 68 :021402, 2003.

## Annexe G

# Couples ligand-récepteur avec un espaceur rigide (coll. C. Marques)

Nous considérons dans une première étape un bâtonnet de longueur  $L$ , dont un des bouts est fixé à l'origine des coordonnées  $(0,0,0)$ , tout en y étant librement articulé. L'autre bout porte un groupe réactif qui décrit donc, en absence de toutes forces extérieures autres que celles résultant de l'agitation thermique, une trajectoire diffusive sur la sphère de rayon  $L$ . Ce mouvement diffusif peut être décrit par l'évolution des deux angles  $(\theta, \varphi)$  décrivant l'orientation du bâtonnet dans le système de coordonnées sphériques habituel. La distribution de probabilité associée au mouvement du bâtonnet  $\psi(\theta, \varphi, t)$  possède la valeur d'équilibre  $\psi_{eq} = \frac{1}{4\pi}$  et suit l'équation de diffusion

$$\frac{\partial \psi}{\partial t} = D_{rot} \mathcal{L}_{\theta, \varphi} \psi \quad (\text{G.1})$$

où  $\mathcal{L}_{\theta, \varphi}$  est l'opérateur de diffusion angulaire et  $D_{rot}$  le coefficient de diffusion :

$$\mathcal{L}_{\theta, \varphi} = \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \quad (\text{G.2})$$

La probabilité conditionnelle de trouver le bout réactif à la position  $(\theta, \varphi)$  au temps  $t$ , sachant qu'il était en  $(\theta', \varphi')$  pour  $t = 0$ , notée  $G(\theta, \varphi, \theta', \varphi', t)$  et aussi appelée propagateur ou fonction de Green, obéit à

$$\left[ \frac{\partial}{\partial t} - D_{rot} \mathcal{L}_{\theta, \varphi} \right] G(\theta, \varphi, \theta', \varphi', t) = \delta(\theta - \theta') \delta(\varphi - \varphi') \delta(t) \quad (\text{G.3})$$

Sa forme peut être écrite sur une base d'harmoniques sphériques, fonctions propres de l'opérateur diffusion

$$G(\theta, \varphi, \theta', \varphi', t) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=0}^l \mathcal{Y}_l^m(\theta, \varphi) \mathcal{Y}_l^m(\theta', \varphi') e^{-D_{rot} l(l+1)t} \quad (\text{G.4})$$

Nous ne considérerons que des situations à symétrie cylindrique, pour lesquelles la coordonnée  $\varphi$  est non pertinente et définissons

$$\Psi(\theta, t) = \int_0^{2\pi} d\varphi \Psi(\theta, \varphi, t) \quad (\text{G.5})$$

Bien sûr la valeur d'équilibre de la distribution de probabilité en  $\theta$  est désormais  $\Psi_{eq}^\theta = 1/2$  de façon à ce que le nombre total de bouts réactifs soit normalisé à l'unité  $\rho = \int_0^\pi d\theta \sin \theta \Psi_{eq} = 1$ .

Si on rappelle que les harmoniques sphériques s'écrivent en fonction de polynômes de Legendre associés  $P_l^m$  comme

$$\mathcal{Y}_l^m(\theta, \varphi) = \sqrt{\frac{(2l+1)}{4\pi}} \sqrt{\frac{(l-m)!}{(l+m)!}} P_l^m(\cos \theta) e^{im\varphi} \quad (\text{G.6})$$

on peut maintenant définir le propagateur adéquat à la symétrie cylindrique des problèmes que nous aurons à traiter

$$G(\theta, \theta', t) = \int_0^{2\pi} d\varphi G(\theta, \varphi, \theta', \varphi', t) = \frac{1}{2} \sum_{l=0}^{\infty} P_l(\cos \theta) P_l(\cos \theta') (2l+1) e^{-D_{rot}l(l+1)t} \quad (\text{G.7})$$

où  $P_l$  sont les fonctions de Legendre, aussi appelées polynômes de Legendre. Notons plusieurs propriétés importantes du propagateur ainsi défini et rappelons quelques propriétés mathématiques importantes des polynômes de Legendre. Le propagateur reste une quantité normalisée à tous temps

$$\int_0^\pi d\theta \sin \theta G(\theta, \theta', t) = 1 \quad (\text{G.8})$$

et relaxe aux temps longs vers la distribution d'équilibre

$$\lim(t \rightarrow \infty) G(\theta, \theta', t) = \Psi_{eq}^\theta = \frac{1}{2} \quad (\text{G.9})$$

Ces résultats peuvent être facilement dérivés étant données les propriétés suivantes des polynômes de Legendre

$$\frac{1}{2} \int_0^\pi d\theta \sin \theta P_l(\cos \theta) = \delta_{l,0} ; \quad \frac{1}{2} \int_0^\pi d\theta \sin \theta P_l^2(\cos \theta) = \frac{1}{2l+1} \quad (\text{G.10})$$

Notons aussi que pour les temps longs le propagateur est bien représenté par les premiers termes du développement en fonctions propres

$$G(\theta, \theta', t) = \frac{1}{2} + \frac{3}{2} \cos \theta \cos \theta' e^{-2D_{rot}t} + \frac{5}{8} (3 \cos^2 \theta - 1) (3 \cos^2 \theta' - 1) e^{-6D_{rot}t} + \dots \quad (\text{G.11})$$

Nous décrivons maintenant la réaction entre le ligand porté par le bout du bâtonnet et un plan couvert de façon homogène de récepteurs. Nous voulons calculer l'évolution de la distribution de probabilité à partir du moment où le plan est approché à une distance  $d$  du point d'articulation du bâtonnet. Ceci permettra par intégration de connaître aussi l'évolution de la fraction de bouts réactifs n'ayant pas réagi au temps  $t$ ,  $\rho(t) = \int_0^\pi d\theta \sin \theta$ , et son complémentaire  $1 - \rho(t)$  qui mesure la fraction de particules ayant réagi après un temps  $t$ . La distribution de probabilité  $\Psi(\theta, \varphi, t)$  obéit à l'équation

$$\left[ \frac{\partial}{\partial t} - D_{rot} \mathcal{L}_{\theta, \varphi} \right] \Psi(\theta, \varphi, t) = Q(\theta, \varphi, t) \Psi(\theta, \varphi, t) \quad (\text{G.12})$$

où  $Q(\theta, \varphi, t)$  est le puits réactif, que nous admettrons ici être infiniment mince, avec un taux de réaction  $q$  :

$$Q(\theta, \varphi, t) = -q\delta(\cos\theta - \frac{d}{L_c}) \quad (\text{G.13})$$

Cette forme demeure une bonne approximation tant que la taille du bâtonnet est significativement plus grande que celle du puits réactif. La solution générale de l'équation (G.12) est aussi solution générale de l'équation intégrale

$$\Psi(\theta, \varphi, \tau) = \Psi_{eq} - q \int_0^\tau d\tau' \int_0^{2\pi} d\varphi' \int_0^\pi d\theta' \sin\theta' G(\theta, \varphi, \theta', \varphi', \tau - \tau') \delta(\cos\theta' - \frac{d}{L_c}) \Psi(\theta', \varphi', \tau - \tau') \quad (\text{G.14})$$

qui prend la forme suivante lorsque le potentiel garde une symétrie cylindrique

$$\Psi(\theta, \tau) = \Psi_{eq} - q \int_0^\tau d\tau' G(\theta, \arccos \frac{d}{L_c}, \tau - \tau') \Psi(\arccos \frac{d}{L_c}, \tau') \quad (\text{G.15})$$

Cette équation intégrale peut être résolue par transformée de Laplace  $\hat{\Psi}(\theta, s) = \int_0^\infty d\tau \Psi(\theta, \tau) e^{-\tau s}$

$$\hat{\Psi}(\theta, s) = \frac{\Psi_{eq}}{s} - q \hat{G}(\theta, \arccos \frac{d}{L_c}, s) \hat{\Psi}(\arccos \frac{d}{L_c}, s) \quad (\text{G.16})$$

En calculant d'abord la valeur de la fonction sur le puits, et remplaçant ensuite le résultat dans (G.16) on obtient

$$\hat{\Psi}(\theta, s) = \frac{\Psi_{eq}}{s} \left( 1 - \frac{q \hat{G}(\theta, \arccos \frac{d}{L_c}, s)}{1 + q \hat{G}(\arccos \frac{d}{L_c}, \arccos \frac{d}{L_c}, s)} \right) \quad (\text{G.17})$$

Si la réaction locale entre le ligand et le récepteur est beaucoup plus rapide que tous les autres temps caractéristiques du système, et en particulier plus rapide que les temps de diffusion, on peut prendre la limite formelle  $q \rightarrow \infty$  pour obtenir

$$\hat{\Psi}(\theta, s) = \frac{\Psi_{eq}}{s} \left( 1 - \frac{\hat{G}(\theta, \arccos \frac{d}{L_c}, s)}{\hat{G}(\arccos \frac{d}{L_c}, \arccos \frac{d}{L_c}, s)} \right) \quad (\text{G.18})$$

Décrivons maintenant le nombre de bouts réactifs survivants

$$\rho(t) = \int_0^\pi d\theta \sin\theta \Psi(\theta, t) \quad (\text{G.19})$$

Il est à noter que cette définition compte aussi bien les réactions des bouts arrivant sur le puits par en dessous aussi bien que par au dessus, ce qui dans notre cas est impossible, étant donnée la présence de la paroi. Nous corrigerons plus tard cette " erreur " de description, car il est instructif d'obtenir d'abord l'évolution de  $\rho(t)$ . On obtient

$$\hat{\rho}(s) = \frac{h(s)}{\sinh(s) + 1} \quad (\text{G.20})$$

avec  $h(s)$  une fonction auxiliaire définie par :

$$h(s) = \frac{\hat{G}(\arccos \frac{d}{L_c}, \arccos \frac{d}{L_c}, s)}{\Psi_{eq}} - \frac{1}{s} \quad (\text{G.21})$$

L'évolution aux temps longs de la fraction de bouts ayant réagi est donc donnée par :

$$1 - \rho(\tau) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (\text{G.22})$$

avec un temps caractéristique  $\tau$  donné par le plus petit pôle de  $\hat{\rho}(s)$ . En pratique il faut donc déterminer la plus petite valeur négative de  $s$  telle que

$$\sum_{l=0}^{\infty} \frac{s(2l+1) P_l^2(\frac{d}{L_c})}{D_{rot}(l(l+1)+s)} = 0 \quad (\text{G.23})$$

Il est évident que le temps de réaction s'écrit sur la forme

$$\tau = D_{rot}^{-1} f(d/L_c) \quad (\text{G.24})$$

où  $f(x)$  est une fonction que nous avons déterminé numériquement. Elle est bien décrite par la forme approchée suivante

$$f(x) = \frac{1}{2} (1 - 1,6 \ln(1 - x)) \quad (\text{G.25})$$

Nous retenons donc de ce premier calcul que le temps de réaction est essentiellement proportionnel au cube de la longueur du bâtonnet, mais dépend aussi, encore que moins fortement, du rapport  $\frac{d}{L_c}$ .