

Étude des changements conformationnels de la molécule d'ADN induit par la présence d'un défaut local

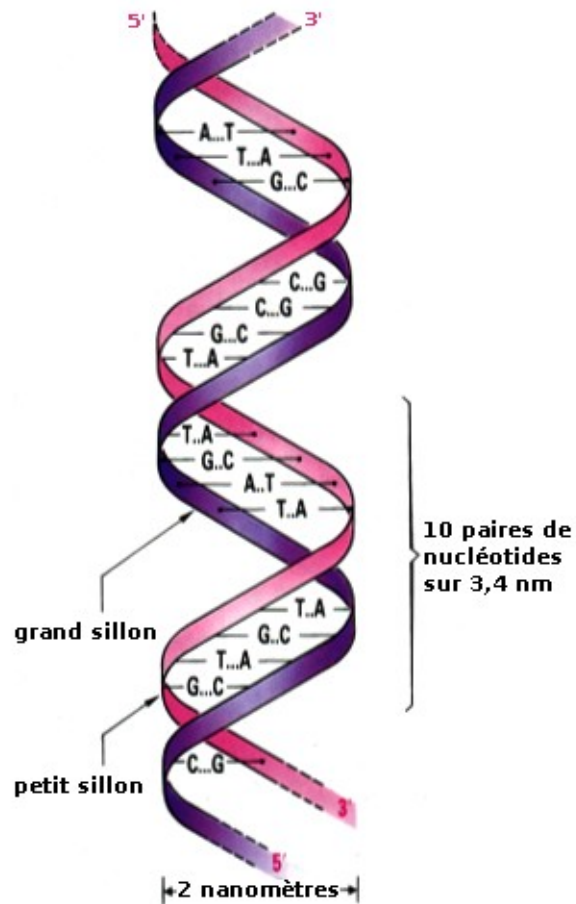
Annaël Brunet^{*#} (09/2012 – 10/2015)

----- *Rencontres Scientifiques des Grands Causses 2015* -----

Introduction

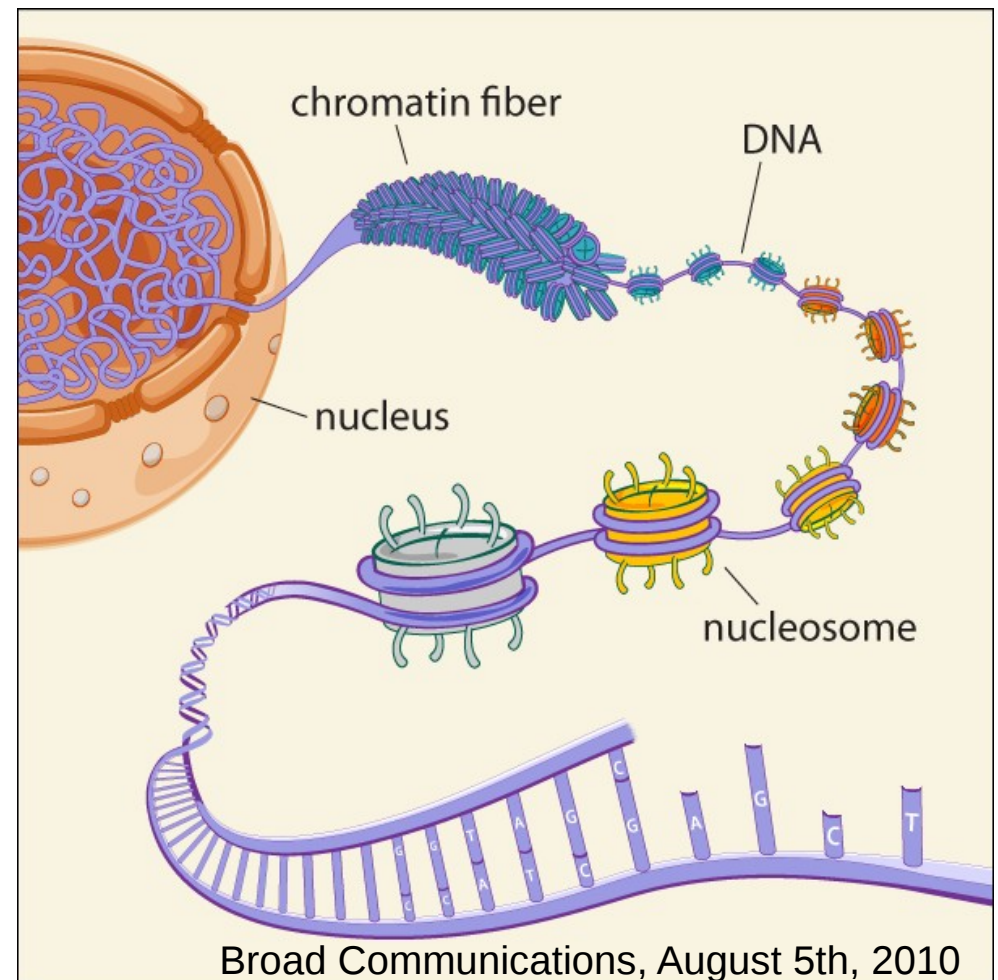
La molécule d'ADN *in vivo*

Structure la plus commune



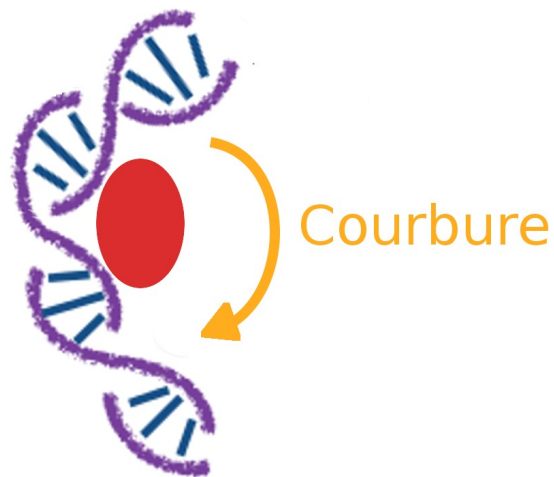
Les différents états de l'ADN :

- Dépendants de l'échelle d'observation

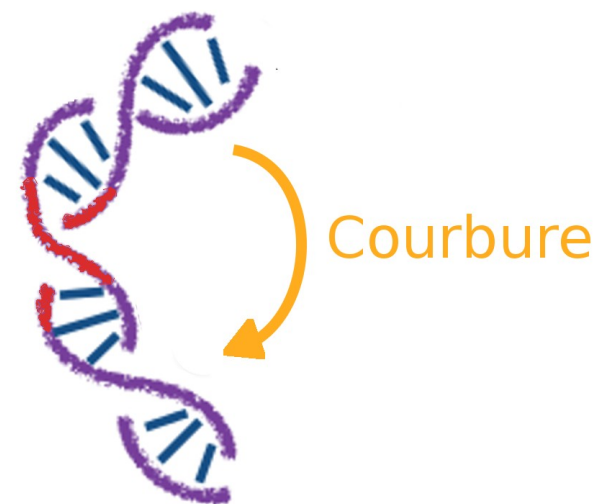


II – Effet local : courbure intrinsèque

Brunet, A., et al., *NAR*,
2015, 42 (11), pe 72(7)



Courbure extrinsèque
induite par la fixation de
protéine



Courbure intrinsèque
induite par la séquence même
de l'ADN

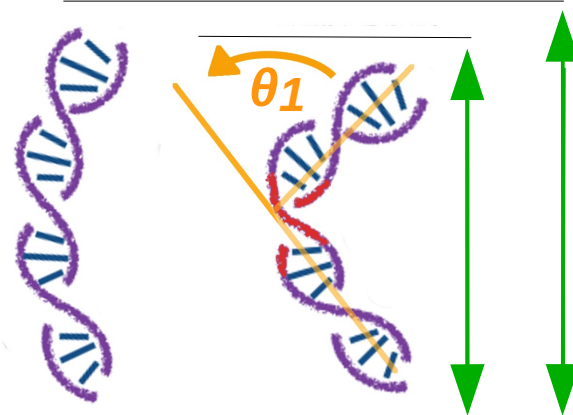
II – Effet local : courbure intrinsèque

Séquence intrinsèque courbante :

- Séquence nommée **A-Tracts** [MLC82]
- Séquence **CAAAAACGG**, l'une des plus courbantes [KC87]
- Existant in vivo [S85]

[MLC82] J. C. Marini, S. D. Levene, D. M. Crothers, and P. T. Englund. Proceedings of the National Academy of Sciences, 79(24) :7664–7668, **1982**
[KC87] H. S. Koo, D. M. Crothers, *Biochemistry*, 26 : 3745-3748, **1987**
[S85] K. Struhl. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82(24) : 8419–8423, **1985**

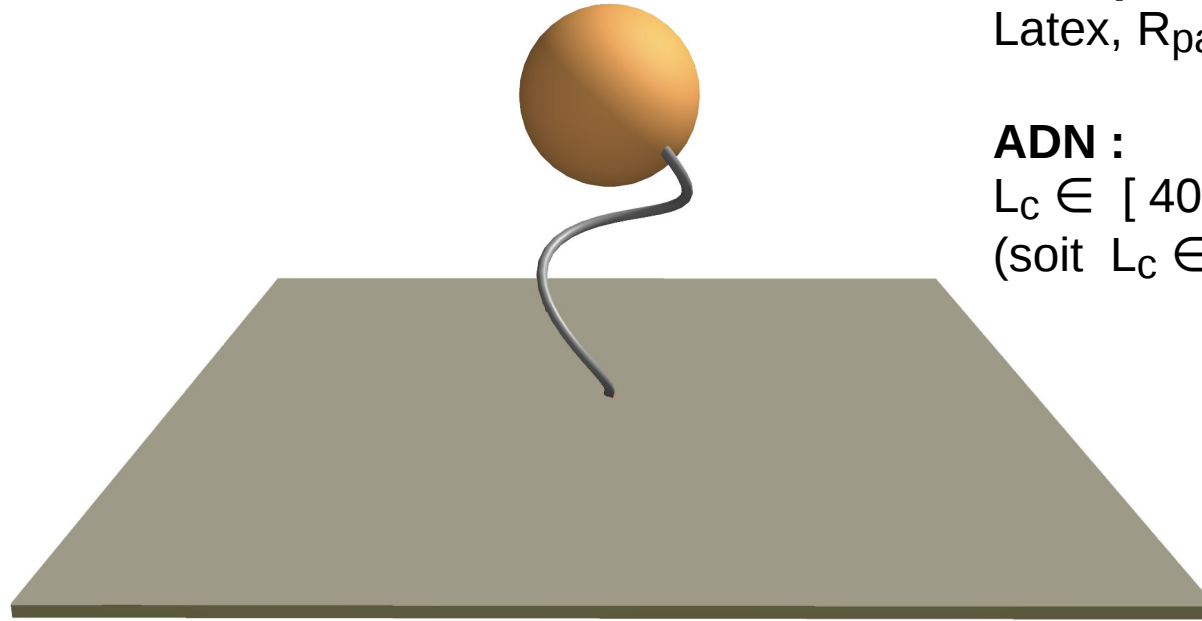
À quoi faut-il s'attendre pour $L < L_p$?



Diminution de la
longueur apparente
de l'ADN en fonction
de l'**angle** de
courbure

Que se passe-t-il à notre échelle
d'observation où $L > L_p$?

I – Approche expérimentale : Tethered Particle Motion (TPM)



Nanoparticule :

Latex, $R_{\text{par}} = 150 \text{ nm}$

ADN :

$L_c \in [400 : 4000] \text{ bp}$

(soit $L_c \in [200 : 2000] \text{ nm}$)

I – Approche expérimentale : Tethered Particle Motion (TPM)

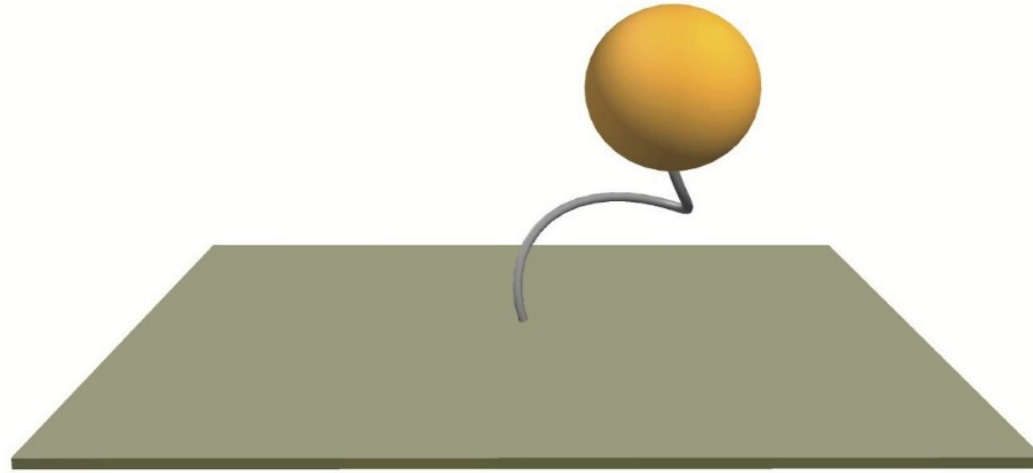
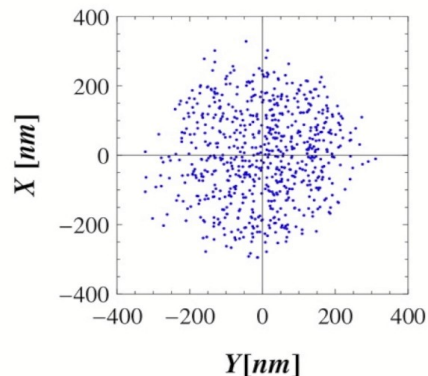
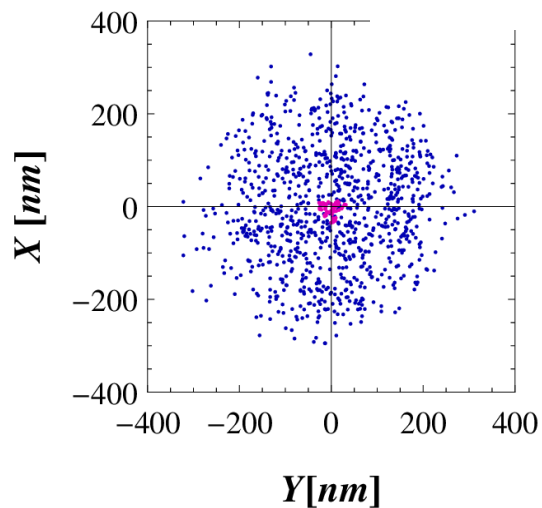
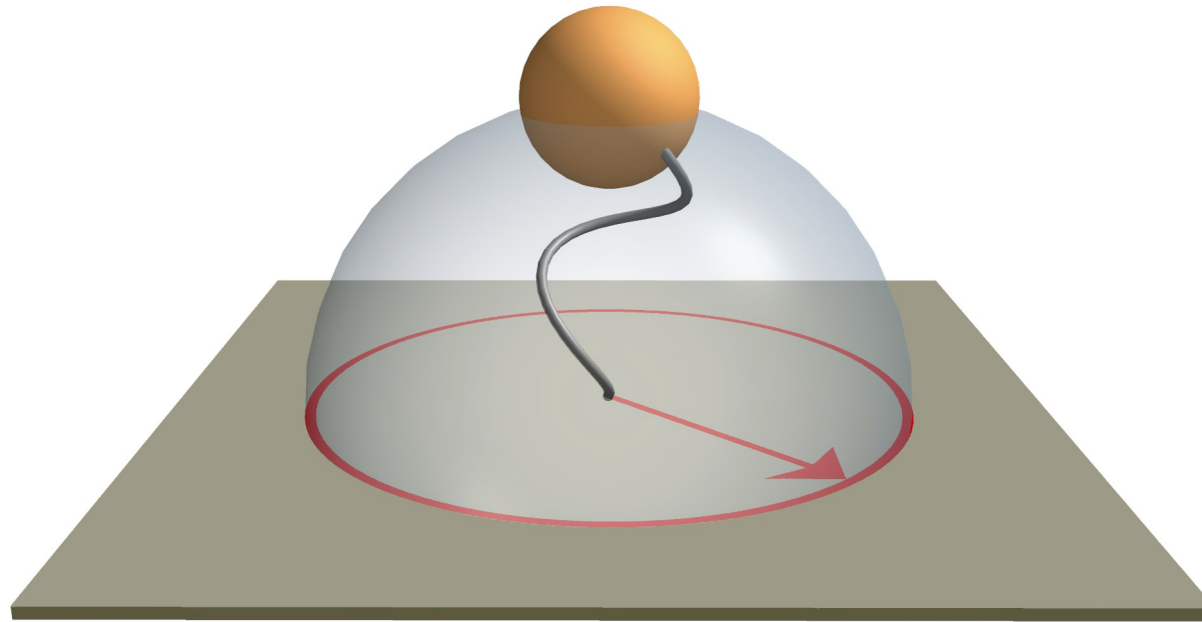


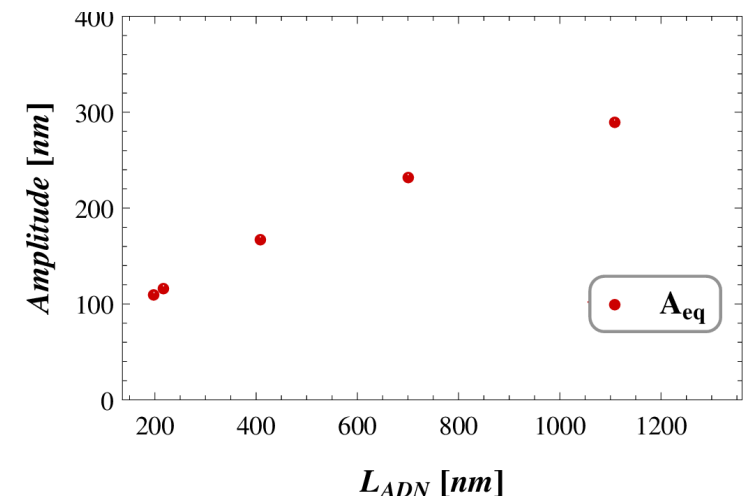
Illustration du principe



I – Approche expérimentale : Mesure de l'amplitude du mouvement



L'Amplitude du mouvement croît avec la **longueur apparente** de la molécule d'ADN

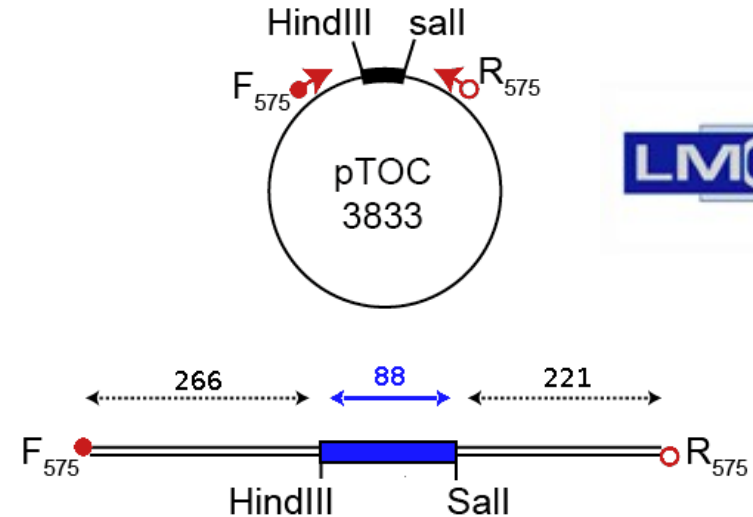


II – Effet local : courbure Stratégie

Stratégie expérimentale :

Construction d'une **série** d'ADN possédant un nombre croissant de **A-tracts** positionnés **en phase** avec le pas de l'hélice dans l'insert de 88 bp

Construction des molécules d'ADN

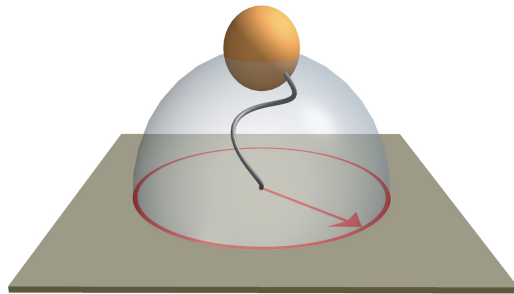


- 6An0** : GCTTCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATGTGGCTAGCACCATGGAGGATCCCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCCGACTGGGCTGTCGACCG
- 6An1^P** : GCTTCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATGTGGCTAGC**AAAAAACGG**GATCCCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCCGACTGGGCTGTCGACCG
- 6An2^P** : GCTTCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTAGGCTAGC**AAAAAACGGCAAAAACGG**GATCCCGCTATGGAACCTCGCCGCCCGACTGGGCTGTCGACCG
- 6An3^P** : GCTTCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCGCTAGC**AAAAAACGGCAAAAACGGGCAAAAAACGG**GATCCGGAACCTCGCCGCCCGACTGGGCTGTCGACCG
- 6An4^P** : GCTTCCATCTCGAACCGACGTTGGCTAGC**AAAAAACGGCAAAAACGGGCAAAAAACGGCAAAAACGG**GATCCTCGCCGCCCGACTGGGCTGTCGACCG
- 6An6^P** : GCTTCCGACGTTGGCTAGC**AAAAAACGGCAAAAACGGGCAAAAAACGGGCAAAAAACGGGCAAAAAACGGGCAAAAAACGG**GATCCTCGCCGCGTCGACCG
- 6An7^P** : AAGCTTTTGGCTAGC**AAAAAACGGCAAAAACGGGCAAAAAACGGGCAAAAAACGGGCAAAAAACGGGCAAAAAACGG**GATCCTCGTCGAC

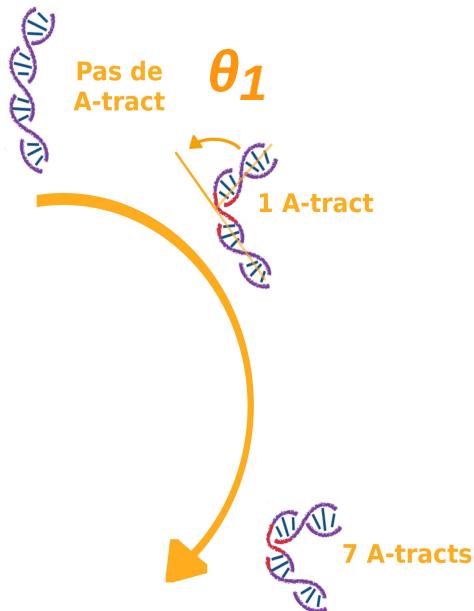
II – Effet local : courbure

Stratégie

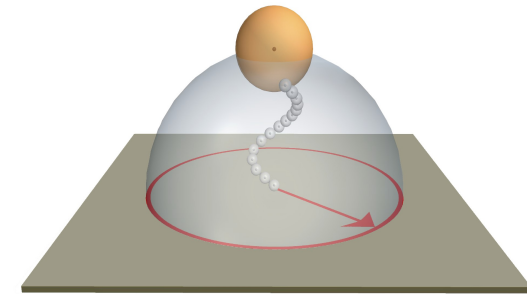
Approche *in vitro* :



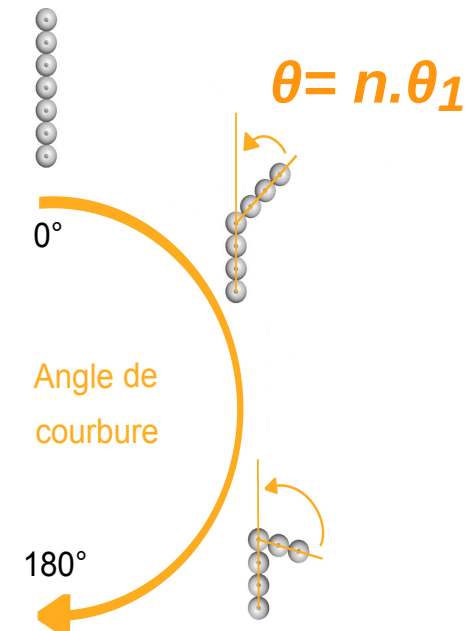
Série d'ADN construit avec des séquences **A-tracts en phase** et en nombre n croissant



Approche *in silico* :

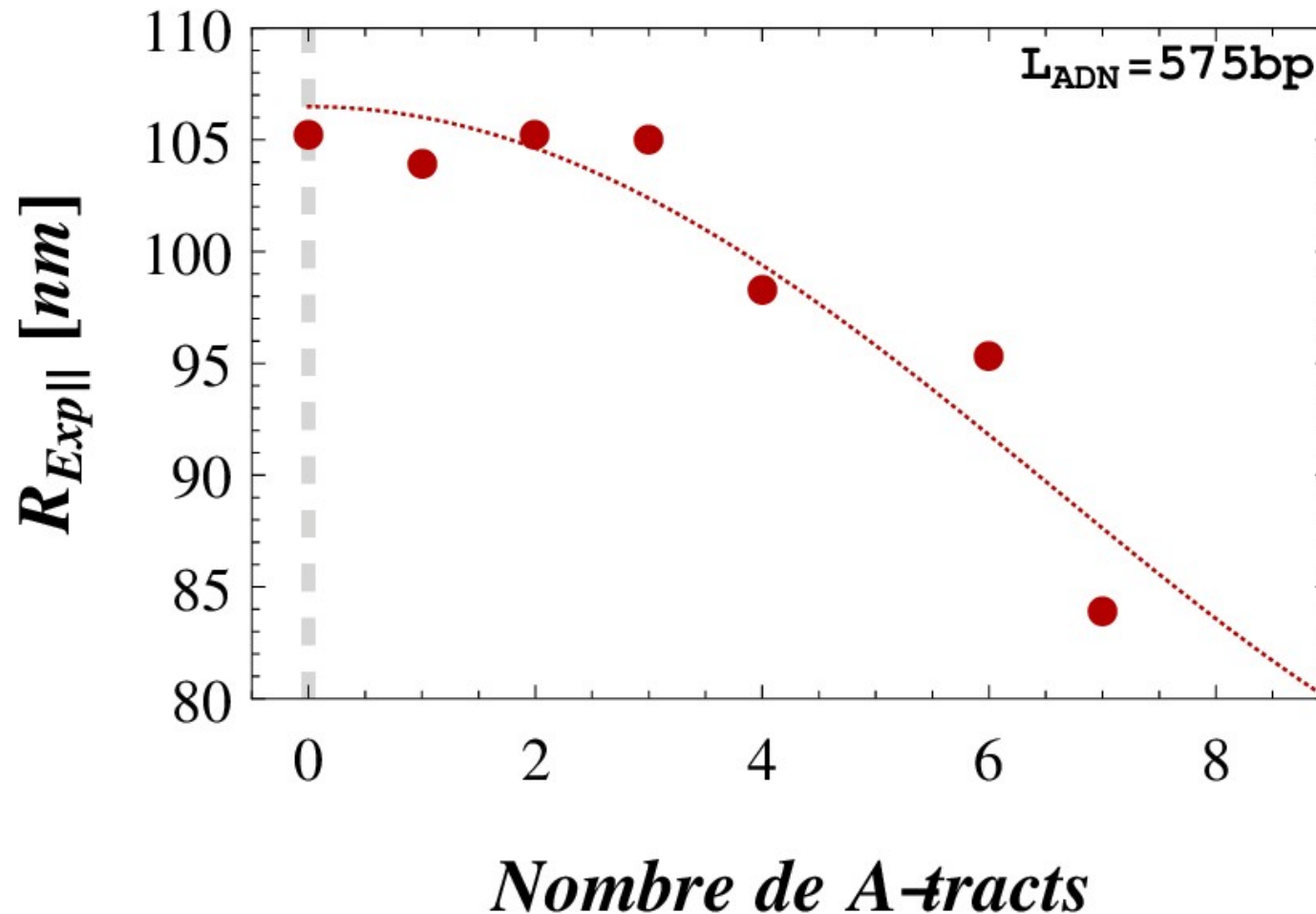


ADN modélisé avec un **angle fixe**, entre 3 monomères successifs, assimilé aux **A-tracts** et de valeur croissante



II – Effet local : courbure

Résultats - Exploitation



$$R_{WLC} \text{ }_{l=313} = D \left[\sqrt{1 + 0.338 \times \cos(n.\theta_1)} \right]$$

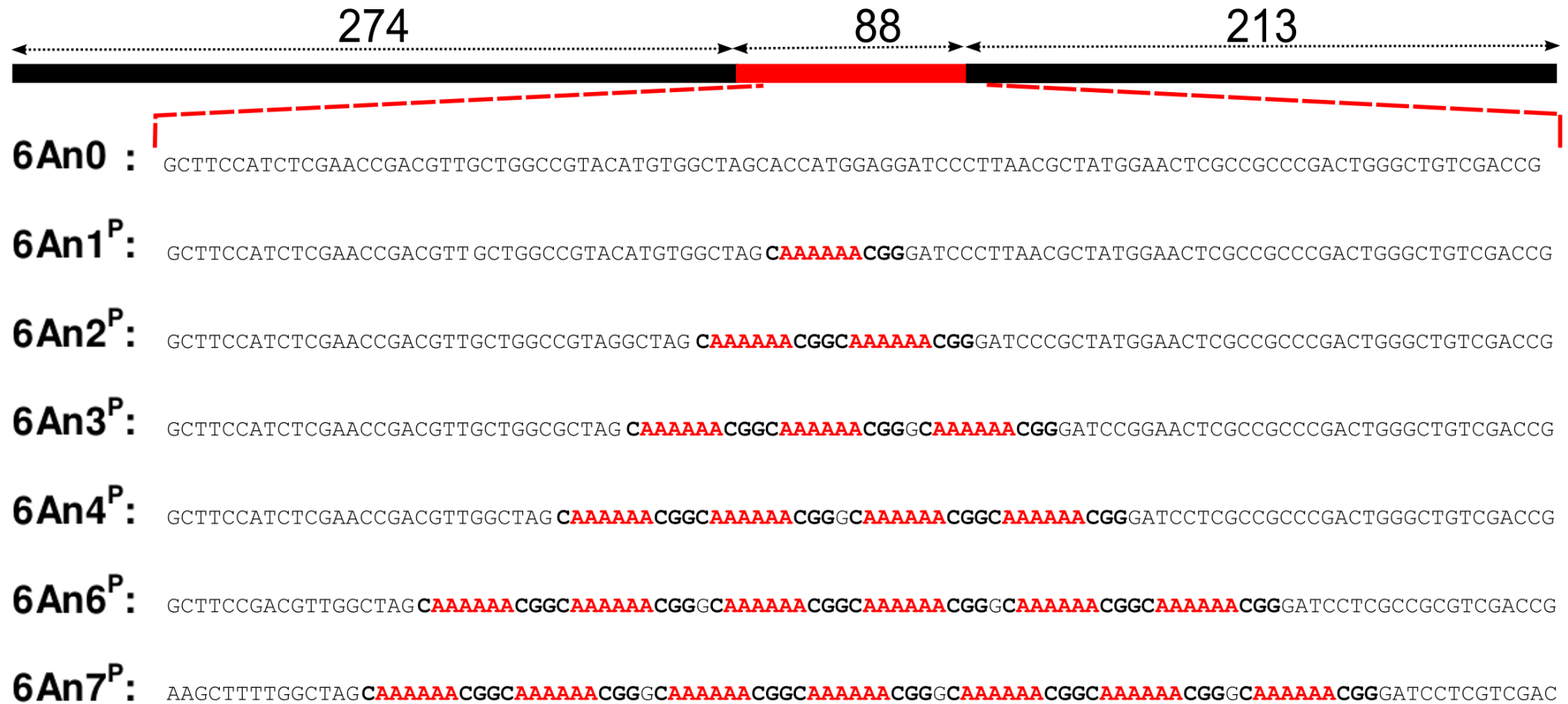


D , nm	92 ± 2
θ_1	$15^\circ \pm 2^\circ$

II – Effet local : courbure

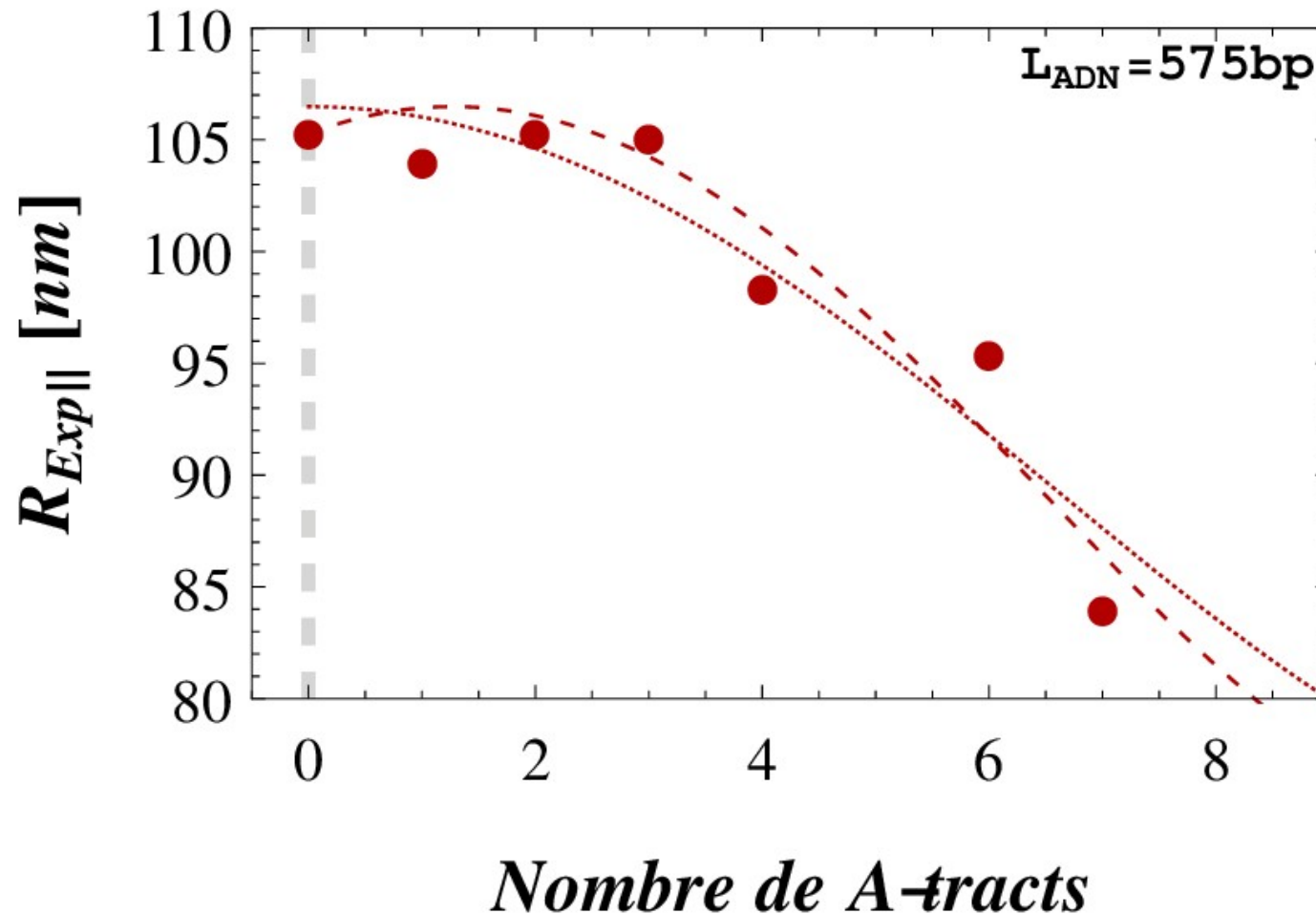
Résultats - Exploitation

Brunet, A., et al., NAR, 2015, 42 (11), pe 72(7)



II – Effet local : courbure

Résultats - Exploitation

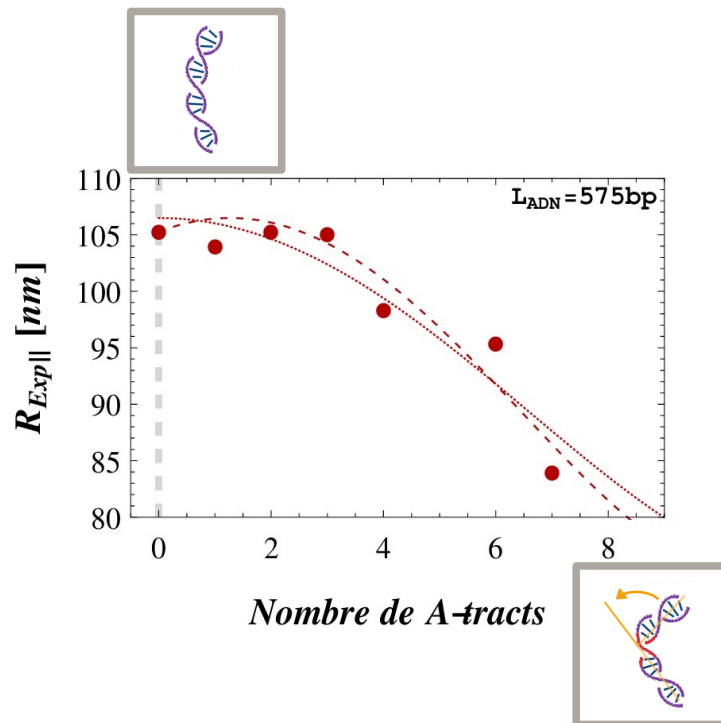


$$R_{ADN,WLC} \text{ }_{l=313} = D \left[\sqrt{1 + 0.338 \times \cos(n.\theta_1 - \theta_0)} \right] \longrightarrow$$

$D', \text{ nm}$	91 ± 2
θ'_1	$19^\circ \pm 4^\circ$
θ_0	$25^\circ \pm 19^\circ$

III – Conclusions

Propositions de méthodologies qui permettent une véritable détection et quantification de l'influence d'un défaut local



Résultats en accord avec les données de la littérature

Mise en évidence d'une courbure globale de l'ADN

Développement d'une méthode simple d'extraction de la valeur de θ :

$$\cos \theta = 1 + \frac{\exp\left(-\frac{L}{L_p}\right) + \frac{L}{L_p} - 1}{1 - \exp\left(-\frac{L-l}{L_p}\right) - \exp\left(-\frac{l}{L_p}\right) + \exp\left(-\frac{L}{L_p}\right)} \left[\frac{R_{ADN}^2(\theta) - R_{ADN}^2(0)}{R_{ADN}^2(0)} \right]$$

CAAAAACGG = $19^\circ \pm 4^\circ$

Tout ADN est courbé en moyenne

Remerciements

Merci de votre attention

----- ***Rencontres Scientifiques des Grands Causses 2015*** -----

LPT- IRSAMC, TOULOUSE :
Nicolas Destainville# (directeur),
Manoel Manghi #

LMGM, TOULOUSE :
François Cornet,
Philippe Rousseau,
Maya Salhi

IPBS, TOULOUSE :
Catherine Tardin*(directrice),
Laurence Salomé
Sébastien Chevalier

