



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

NOTICE

The quality of this microform is heavily dependent upon the quality of the original thesis submitted for microfilming. Every effort has been made to ensure the highest quality of reproduction possible.

If pages are missing, contact the university which granted the degree.

Some pages may have indistinct print especially if the original pages were typed with a poor typewriter ribbon or if the university sent us an inferior photocopy.

Reproduction in full or in part of this microform is governed by the Canadian Copyright Act, R.S.C. 1970, c. C-30, and subsequent amendments.

AVIS

La qualité de cette microforme dépend grandement de la qualité de la thèse soumise au microfilmage. Nous avons tout fait pour assurer une qualité supérieure de reproduction.

S'il manque des pages, veuillez communiquer avec l'université qui a conféré le grade.

La qualité d'impression de certaines pages peut laisser à désirer, surtout si les pages originales ont été dactylographiées à l'aide d'un ruban usé ou si l'université nous a fait parvenir une photocopie de qualité inférieure.

La reproduction, même partielle, de cette microforme est soumise à la Loi canadienne sur le droit d'auteur, SRC 1970, c. C-30, et ses amendements subséquents.

Canada

**Étude théorique de
l'électrophorèse de piégeage
du complexe streptavidine-ADN**

par

Claude Desruisseaux

Thèse déposée à

l'École des études supérieures et de la recherche
en vue de l'obtention de la maîtrise ès sciences en physique

Département de Physique

Faculté des Sciences

Université d'Ottawa

©Claude Desruisseaux, Ottawa, Ontario, Canada, 1994



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

THE AUTHOR HAS GRANTED AN
IRREVOCABLE NON-EXCLUSIVE
LICENCE ALLOWING THE NATIONAL
LIBRARY OF CANADA TO
REPRODUCE, LOAN, DISTRIBUTE OR
SELL COPIES OF HIS/HER THESIS BY
ANY MEANS AND IN ANY FORM OR
FORMAT, MAKING THIS THESIS
AVAILABLE TO INTERESTED
PERSONS.

L'AUTEUR A ACCORDE UNE LICENCE
IRREVOCABLE ET NON EXCLUSIVE
PERMETTANT A LA BIBLIOTHEQUE
NATIONALE DU CANADA DE
REPRODUIRE, PRETER, DISTRIBUER
OU VENDRE DES COPIES DE SA
THESE DE QUELQUE MANIERE ET
SOUS QUELQUE FORME QUE CE SOIT
POUR METTRE DES EXEMPLAIRES DE
CETTE THESE A LA DISPOSITION DES
PERSONNE INTERESSEES.

THE AUTHOR RETAINS OWNERSHIP
OF THE COPYRIGHT IN HIS/HER
THESIS. NEITHER THE THESIS NOR
SUBSTANTIAL EXTRACTS FROM IT
MAY BE PRINTED OR OTHERWISE
REPRODUCED WITHOUT HIS/HER
PERMISSION.

L'AUTEUR CONSERVE LA PROPRIETE
DU DROIT D'AUTEUR QUI PROTEGE
SA THESE. NI LA THESE NI DES
EXTRAITS SUBSTANTIELS DE CELLE-
CI NE DOIVENT ETRE IMPRIMES OU
AUTREMENT REPRODUITS SANS SON
AUTORISATION.

ISBN 0-612-00582-8

Canada



UNIVERSITÉ D'OTTAWA
UNIVERSITY OF OTTAWA

Table des matières

Table des matières	2
Remerciements	5
Sommaire	6
Chapitre 1: Introduction	7
Le modèle de reptation	11
Chapitre 2: Régimes anomaux transitoires	14
2.1 Introduction	14
2.2 La reptation du complexe S-ADN: simulations	15
2.3 Résultats des simulations	18
2.4 Discussion: étude semi-quantitative	24
2.5 Conclusion	28
Chapitre 3: L'électrophorèse de piégeage, un modèle analytique	31
3.1 Introduction	31
3.2 Les résultats de DV	33
3.3 Le processus de dépiégeage	35
3.4 Équation de diffusion	37
3.5 Résultats	41
3.6 L'état stationnaire	41
3.7 La limite du piégeage faible	44
3.8 La limite du piégeage fort	45

3.9 Le régime transitoire	47
3.10 Discussion	53
Chapitre 4: Dynamique moléculaire en champs pulsés	54
4.1 Introduction	54
4.2 Expériences de UDG	56
4.3 Le modèle analytique de DV	56
4.4 Effets du temps de pulse inverse t_b	58
4.5 Effets du temps d'avance t_a	62
4.6 Étude en fonction de N: pulses courts	67
4.6.1 Effets transitoires	67
4.6.2 Relation vitesse-masse et diffusion-masse	70
4.7 Étude moyenne sur un pulse court	73
4.8 Étude en fonction de N: pulses longs	79
4.9 Étude d'un pulse long où $t_a \gg t_b$	82
4.10 Conclusion	84
Chapitre 5: Conclusion	86
Bibliographie	92

*cette thèse est dédiée
à la mémoire de Lise Desruisseaux*

Remerciements

Je veux premièrement remercier Gary Slater dont les généreuses contributions (financières et autres) ont non seulement permis la réalisation de cette thèse mais ont surtout fait naître en moi le désir de me dépasser. Sa critique rigoureuse, complète, méthodique et d'une pertinence étourdissante m'a aidé à mieux diriger les recherches. Ses nombreuses lectures, ses corrections, ses suggestions, ses savoureux mots d'esprit et la confiance enivrante qu'il m'a insufflée ont contribué à me faciliter la tâche et à me faire passer pour meilleur que je ne le suis en réalité.

Je tiens aussi à remercier Pascal Mayer qui a, lui-aussi, su me conseiller lors de la rédaction de cette thèse. Ses (très) nombreuses corrections ont permis d'alléger le texte originalement trop lourd et ainsi de le rendre beaucoup plus accessible.

Merci aussi à Grant Nixon, qui m'a éclairé dans la rédaction de publications (dans la langue de Shakespeare, of course).

Merci à Hong Guo et à Ivan L'Heureux pour leurs contributions au calcul de $\Delta\tau^2$ (voir équation (20) du chapitre 3).

Merci à Song Yan Wu, Sylvain Hubert, Robert Parent et Saeed Hadjifaradji pour les nombreuses heures de discussions.

Merci à Guy Drouin pour sa confiance sans borne et pour les résultats préliminaires de ses expériences d'électrophorèse de piégeage.

Finalement, un merci affectueux à ma douce moitié, Marilou Prud'homme, sans qui cette thèse n'aurait pu naître.

Sommaire

Dans le cadre du programme international d'analyse du génome humain, nombres d'efforts sont actuellement déployés pour augmenter le nombre de bandes qui peuvent être lues par expérience d'électrophorèse. Ici, nous étudions comment le fait d'ajouter une grosse protéine neutre (la streptavidine) à un des bouts des molécules d'ADN va modifier leur dynamique quand on en fait l'électrophorèse dans un gel. Un modèle analytique basé sur une équation de diffusion a été développé et montre des résultats qui sont en accord qualitatif avec les simulations numériques et avec les expériences. Ce modèle est le seul qui permet d'étudier le coefficient de diffusion, ce qui nous permet d'évaluer le facteur de résolution. En plus de ce modèle théorique, des simulations ont été effectuées et nous ont permis de mieux comprendre comment les processus de piégeage et de dépiégeage vont influencer la dynamique du système en champs constants et en champs pulsés. Nous prévoyons ainsi certains effets anomaux qui pourront être vérifiés sous peu. De plus, les résultats de nos simulations nous suggèrent de nouvelles méthodes pour augmenter l'efficacité de l'électrophorèse de piégeage.

Chapitre 1

Introduction

Depuis 1984, l'utilisation de champs pulsés [1] pour l'électrophorèse sur gel a mené à une augmentation spectaculaire (d'un facteur 200) de la taille des molécules d'ADN qui peuvent être séparées sur un gel d'agarose (de 40 kbp (pour kilobasepairs) à 8000 kbp, approximativement). Par contre, aucune amélioration majeure n'a été signalée, durant cette période, dans le nombre de bases d'ADN qui peuvent être séquencées sur gel de polyacrylamide (environ 500). Parce que le séquençage de l'ADN est maintenant la "plaque tournante" du projet du génome humain, les chercheurs tentent de développer des méthodes pour améliorer l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide [2,3]; d'autres tentent plutôt de développer de toutes nouvelles techniques de séquençage, non basées sur l'électrophorèse [4].

Parce que l'électrophorèse demeure une méthode simple et accessible, il serait avantageux d'améliorer ses performances dans des buts de séquençage. Malheureusement, l'utilisation de champs pulsés n'est pas très efficace pour un gel de polyacrylamide. La difficulté du séquençage consiste en ce que nous devons séparer des centaines de molécules avec une résolution d'une seule base. La vitesse V dépend de la taille moléculaire M (en nombre de bases) de la façon

suivante: $V(M) \propto 1/M$, quand M est inférieure à une taille critique (dépendante du champ électrique et du gel utilisé), et $V(M) = \text{constante}$ quand M est supérieure à cette taille critique [5]. Il peut être démontré que ce type de relation vitesse-masse ne peut mener à la séparation de molécules dont la taille est de l'ordre du kilobase. Nous devons donc modifier le processus de sorte que la vitesse $V(M)$ décroît beaucoup plus rapidement avec la taille M qu'en temps normal, spécialement pour $M > 500$ (la présente limite).

Une suggestion innovatrice, proposée par Ulanovsky, Drouin et Gilbert (UDG) [6], est d'ajouter une grosse protéine neutre, la streptavidine, à un bout des molécules d'ADN à séquencer (figure 1.1). La molécule modifiée, ayant plus ou moins l'allure d'un fléau d'armes, sera soumise au piégeage, car la grosseur de la streptavidine est supérieure à la grosseur des petits pores du gel. Voici un aperçu des résultats de UDG:

Nous voyons, sur la figure 1.2, que la vitesse (mobilité) décroît très rapidement avec la taille M pour une plage (malheureusement trop) restreinte de tailles moléculaires, et que $V(M) \rightarrow 0$ au delà de cette plage. UDG ont aussi utilisé des champs pulsés pour élargir la zone où la relation $V(M)$ est utile (nous étudierons les champs pulsés au chapitre 4 et nous y discuterons alors des résultats de UDG).

Slater et Villeneuve (SV) [7] ont développé un algorithme pour simuler la migration du complexe streptavidine-ADN (S-ADN). Leurs résultats corroboraient (qualitativement) les mesures de UDG. De plus, les simulations de SV ont permis d'observer, pour la première fois, comment évolue le coefficient de diffusion en fonction de la taille moléculaire. En fait, SV ont pu observer une augmentation dramatique du coefficient de diffusion. Le chapitre 2 nous permettra de mieux comprendre la physique qui explique les résultats de SV.

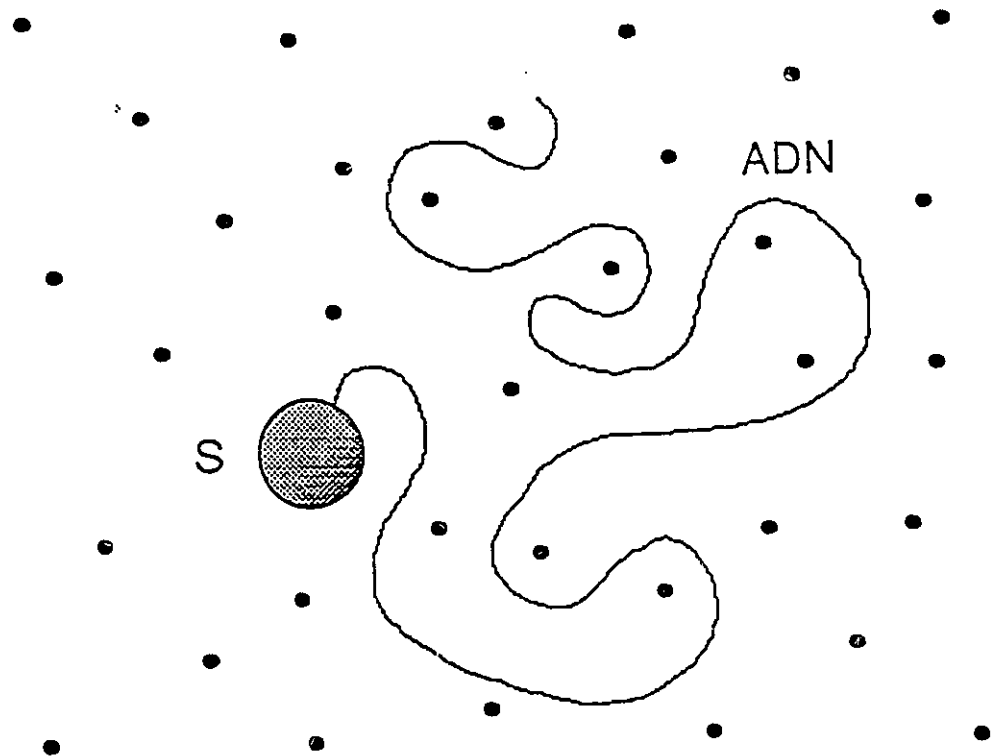


Figure 1.1- Représentation schématique du complexe streptavidine-ADN. La grosse boule représente la streptavidine qui est liée à la chaîne d'ADN et les points noirs représentent les fibres du gel.

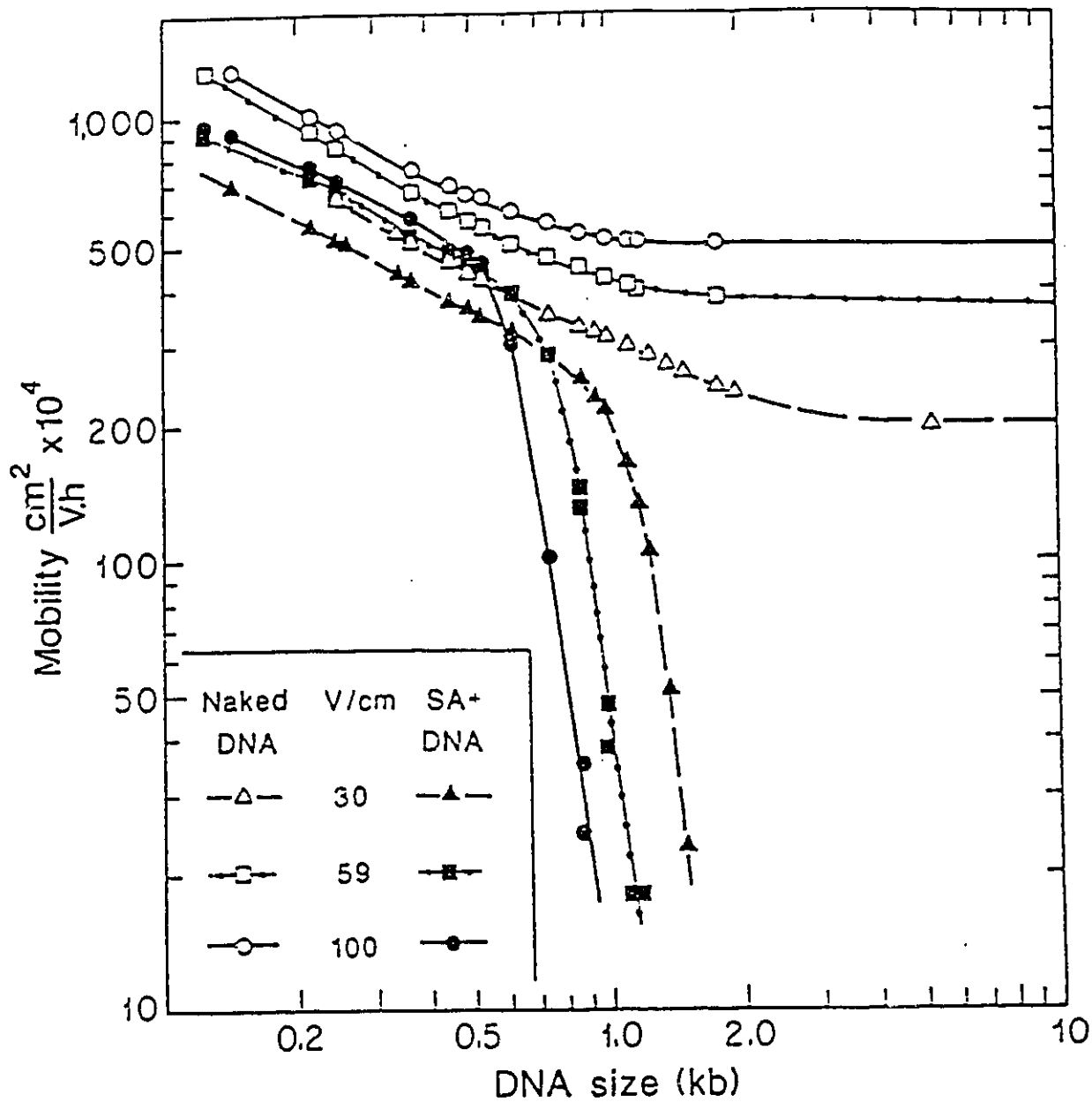


Figure 1.2- Résultats obtenus par UDG pour la mobilité électrophorétique en fonction de la taille moléculaire (M). Les symboles blancs sont utilisés pour l'ADN simple et les symboles noirs pour le complexe streptavidine-ADN. Trois champs électriques ont été étudiés (30, 59 et 100 V/cm).

En plus des expériences de UDG et des simulations de SV, un modèle analytique pour la migration du complexe streptavidine-ADN (S-ADN) a été développé par Défontaines et Viovy (DV) [8,9]. Ce modèle prédit le même type de décroissance de la vitesse que celle observée par UDG et SV. Par contre, ce modèle est inexact pour des champs électriques faibles et ne prédit rien en ce qui a trait au coefficient de diffusion. Un nouveau modèle analytique sera présenté dans le troisième chapitre.

Le modèle de reptation

Dans le modèle de reptation [10,11], utilisé pour comprendre la dynamique des solutions de polymères, la chaîne de polymère a seulement deux degrés de liberté: (i) La chaîne bouge dans un tube formé par les contraintes topologiques de l'environnement; le mouvement net de la molécule se fait donc le long de l'axe du tube, car tous les mouvements transversaux sont rapidement arrêtés par les obstacles. Ce mouvement Brownien unidimensionnel est biaisé quand on applique un champ électrique si le polymère est chargé. (ii) La tête de la molécule, qui trouve son chemin à travers les obstacles pour créer une nouvelle section de tube à chaque saut, a l'autre degré de liberté (en fait ceci représente deux degrés de liberté, car le segment a deux degrés de liberté angulaire).

La chaîne, modélisée ici (figure 1.3) [12] comme une série de N segments vectoriels \mathbf{r}_i ($1 \leq i \leq N$), doit donc se déplacer parmi les obstacles qui en limitent le mouvement transversal; ces obstacles sont les fibres du gel de polyacrylamide. À chaque unité de temps $\tau = \tau_B = a^2/2D_c$, où a est la grosseur moyenne des pores et D_c est le coefficient de diffusion curvilinéaire dans le tube topologique, la chaîne (et donc le tube) effectuera un saut de longueur a . L'équation du

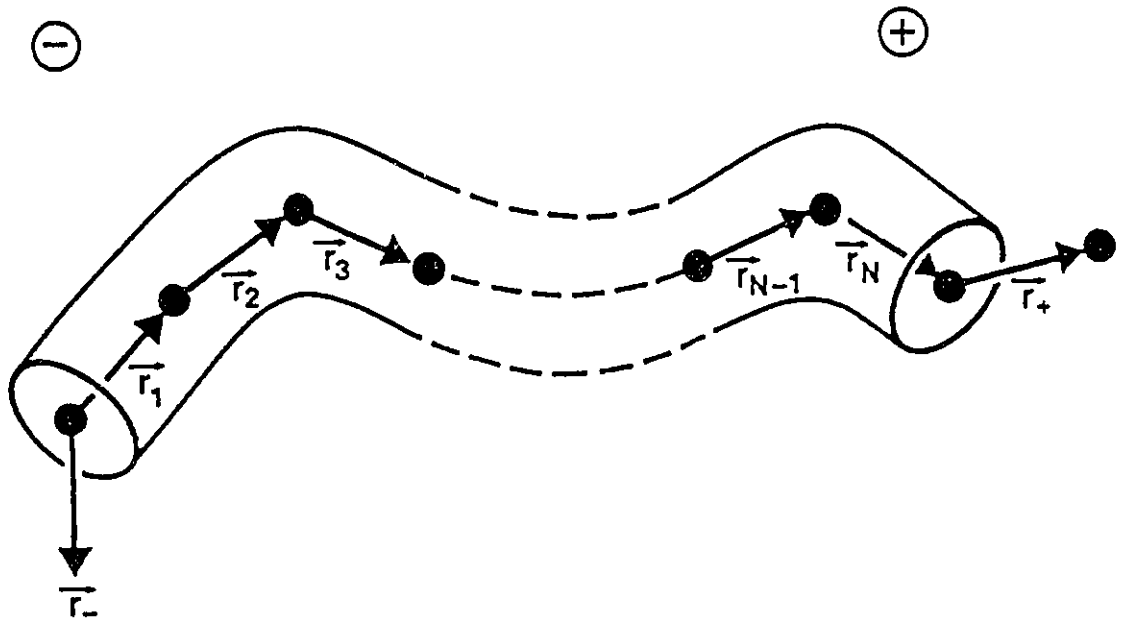


Figure 1.3- Représentation schématique de la chaîne dans son tube. La chaîne est constituée de $N+1$ billes jointes par N segments vectoriels r_i ($1 \leq i \leq N$) qui pointent dans la direction arbitraire "+" du tube. Quand le mouvement Brownien force le segment r_N (ou r_1) à quitter le tube dans la direction + (ou -), une nouvelle section de tube orientée comme $r_N = r_+$ (ou $r_1 = r_-$) est créée, et la section r_1 (ou r_N) disparaît au bout - (ou +) du tube.

mouvement, en l'absence de champ électrique, pour de tels sauts est la suivante:

$$r_i(t+\tau) = \frac{1}{2} [1+\zeta(t)] r_{i+1}(t) + \frac{1}{2} [1-\zeta(t)] r_{i-1}(t) \quad (1)$$

où $\zeta(t)$ est une variable stochastique qui prend des valeurs $\zeta=+1$ (pour un saut vers l'avant (+) où le segment r_N quitte le tube) et $\zeta=-1$ (pour un saut vers l'arrière (-) où le segment r_1 quitte le tube). Ces sauts se font de façon aléatoire en absence de champ électrique, i.e. la probabilité de faire un saut vers l'avant $p[\zeta(t)=+1] \equiv p_+ = 1/2$ est égale à la probabilité de faire un saut vers l'arrière $p[\zeta(t)=-1] \equiv p_- = 1/2$. Il est à noter que $|r_i|=a$, i.e. la longueur des sauts est constante.

Quand on applique un champ électrique, la dynamique est modifiée ($p_+ \neq p_-$, $\tau \neq \tau_B$). Les détails concernant ces deux probabilités (p_+ et p_-), le temps requis pour effectuer un saut (τ) et l'orientation des segments ajoutés seront décrits dans le prochain chapitre.

Chapitre 2

Régimes anomaux transitoires¹

2.1 Introduction

La diffusion et la migration dans un environnement aléatoire montrent souvent des effets complexes. Par exemple [13], le déplacement moyen $\langle x(t) \rangle$ peut augmenter proportionnellement à t^α , où t est le temps et où l'exposant $\alpha \leq 1$; d'autre part, la dispersion $\langle \Delta x^2(t) \rangle \equiv \langle x^2(t) \rangle - \langle x(t) \rangle^2$ peut augmenter comme t^β avec $\beta \geq 1$. Dans des conditions "normales", on retrouve $\alpha = \beta = 1$. Nous présentons dans ce chapitre les résultats de simulations numériques où les effets anomaux (α et/ou $\beta \neq 1$) prédominent. Ici, l'environnement aléatoire est créé par les différentes conformations moléculaires accessibles au polymère et non par l'environnement lui-même (i.e. le gel), ce qui en fait un cas inusité. Puisque le nombre de telles conformations est grand, mais fini, les effets anomaux sont transitoires même s'ils peuvent être de très longue durée. De plus, puisque que le

¹Les résultats de ce chapitre ont été publiés dans: C. Desruisseaux et G. W. Slater, *Physical Review E* 49, 5885 (1994).

champ électrique influe directement sur les conformations du polyélectrolyte, des séries d'effets anormaux (dépendants de la valeur du champ électrique) pourront être observées pour de grandes tailles moléculaires (pour lesquelles il y a un grand nombre de conformations fortement piégées). Ces régimes peuvent être directement reliés à la distribution de temps écoulé entre deux pièges consécutifs, si nous comparons le processus piégeage/dépiégeage à une marche dirigée sur un réseau périodique de pièges ayant une large distribution de temps de sortie [13,14]. Finalement, nous discuterons de la pertinence de ces effets transitoires anormaux pour le système expérimental correspondant.

2.2 Reptation du complexe S-ADN: simulations

Comme nous l'avons mentionné précédemment, Slater et Villeneuve (SV) [7] ont généralisé le modèle de reptation biaisée pour l'électrophorèse de l'ADN sur gel [15,16] et ont pu ainsi simuler numériquement l'électrophorèse de piégeage. Voici en bref cet algorithme que nous utiliserons.

Le complexe S-ADN se déplace en "reptant" entre les obstacles du gel. Les forces électriques biaisent le sens du mouvement à l'intérieur du tube de reptation ainsi que l'orientation moyenne de ce tube. Chaque déplacement curvilinéaire de longueur $\pm a$ (a est la taille moyenne d'un pore) est de durée [16]:

$$\tau(h_x) = \tau_B \times \frac{\tanh[\delta(h_x)]}{\delta(h_x)}, \quad (2)$$

où h_x est la distance d'un bout à l'autre de la molécule d'ADN dans la direction (x) du champ électrique E , $\tau_B = a^2 / (2 D_c)$ est le temps Brownien pour le cas non biaisé (i.e. champ $E=0$), D_c est

le coefficient de diffusion curvilinéaire (i.e. le long de l'axe du tube), $\delta = \epsilon h_x / a$ est le facteur de biaisage, $\epsilon = qEa / 2k_B T$ est le champ électrique réduit, et q est la charge nette d'un segment primitif de reptation de longueur a . Notons que D_c dépend de la taille moléculaire N (nombre de segments de reptation): en effet, $D_c = k_B T / \xi (N + \alpha)$, où ξ est le coefficient de friction par segment d'ADN et α le coefficient de friction (relatif) de la streptavidine. Les sauts (+ ou -) ont lieu avec les probabilités [16]

$$p_{\pm}(h_x) = \frac{1}{1 + e^{\mp 2\delta(h_x)}}, \quad (3)$$

où le \pm désigne la direction du mouvement à l'intérieur du tube (sauts de longueur $\pm a$). Une nouvelle section de tube est créée après chaque saut de durée $\tau(h_x)$. Si la nouvelle section de tube est créée par le bout chargé de la chaîne, son orientation, qui est biaisée par le champ électrique, suit une fonction distribution de Boltzmann $\exp[\epsilon \cos(\theta)]$, où θ est l'angle entre cette nouvelle section de tube et l'axe du champ électrique (x) [15]. Les sections de tube créées dans la direction du bout neutre (le bout où se trouve la streptavidine) sont orientées aléatoirement, car la charge portée par la streptavidine est négligeable.

Le modèle de reptation biaisée peut être modifié de façon à tenir compte du piégeage qui a lieu quand la streptavidine ne peut passer dans une ouverture trop étroite. Une fraction $f \ll 1$ des passages entre deux pores sont choisis "trop étroits" pour laisser passer la streptavidine. Tous les sauts qui feraient passer la streptavidine à travers un tel passage sont rejetés, mais la durée τ de ce saut est pris en compte. Quand la streptavidine est bloquée par un passage étroit, le dépiégeage requiert que la molécule recule sur une distance curvilinéaire égale à Na , où N est le nombre de segments d'ADN formant la molécule. Ce processus de dépiégeage est un de ceux suggérés par

UDG et DV, et est le seul permis par le modèle de reptation [7]. Puisque le facteur de biaisage $\delta = \epsilon h_x / a$ dépend du champ électrique réduit ϵ et de la distance d'un bout à l'autre du polymère (h_x), le processus de dépiégeage devient très improbable pour de forts champs ou de longues molécules orientées (une grande valeur de δ indique qu'un saut dans la direction de la streptavidine est peu probable). Ce phénomène est couplé aux fluctuations de $h_x(t)$ et au fait que le champ a tendance à aligner le tube (ce qui augmente h_x) [15,16]. Comme nous le verrons, cela engendre des séries de régimes transitoires compliqués.

Les simulations ont été effectuées sur des SUN 10-41, SUN-LX et sur un IBM RISC/6000-320 à l'aide d'un code Fortran. Au total, les simulations présentées dans ce présent chapitre ont demandé environ 5 mois de CPU. Nous décrivons les résultats obtenus pour une grosse molécule de S-ADN (on a choisit une molécule pour laquelle $N=30$, une taille où les effets anomaux étaient prédominants) avec un faible champ (on choisit un champ faible $\epsilon=0.05$ pour pouvoir observer à la fois une région où le piégeage est faible et une autre pour laquelle le piégeage est important) dans un gel où la fraction de pores trop étroits est de $f=0.001$. Nous avons choisit $f \ll 1/N$ de sorte que les pièges soient bien séparées dans l'espace. La position moyenne $\langle x(t) \rangle$, la dispersion moyenne $\langle \Delta x^2(t) \rangle$, la forme de la bande (formée par un grand ensemble de molécules identiques), et les statistiques du temps passé entre deux pièges consécutives ont été étudiées. Les résultats des simulations sont donnés en unités de a (pour les distances) et de $\tau_b(N=30)$ (pour les temps).

2.3 Résultats des simulations

La figure 2.1 nous montre l'évolution du rapport "vitesse", défini par $\langle x(t) \rangle / t$, en fonction du temps. On y distingue nettement trois régimes différents. Pour des temps courts, on observe un plateau. Ce plateau correspond à la vitesse V_0 , obtenue en l'absence de pièges (i.e. pour $f=0$; résultats non montrés). Le fait que ce plateau n'est pas strictement plat peut s'expliquer ainsi: même en l'absence de pièges, il faut un certain temps pour atteindre l'état stationnaire. Le temps requis pour atteindre le plateau- V_0 (ou l'état stationnaire dans le cas où $f=0$) est de l'ordre du temps requis pour entrer dans le premier piège (ce qui diminue le rapport vitesse) pour ce cas particulier. Dans le régime des temps courts, les molécules n'ont donc pas encore rencontré de piège et se déplacent librement. Pour des temps très longs, ($t > 10^9$), on observe aussi un plateau qui définit la vitesse dans l'état stationnaire. Dans cette limite, les molécules ont été piégées plusieurs fois et leur vitesse nette est donnée par $V_{ss} = d \langle \tau \rangle^{-1} = 10^{-3.0}$, où d est la distance moyenne entre deux pièges et $\langle \tau \rangle$ est le temps moyen passé entre deux pièges. Finalement, pour des temps intermédiaires, le rapport $\langle x(t) \rangle / t$ décroît progressivement: le piégeage réduit la vitesse nette des molécules. Ce dernier régime, que nous appellerons le régime anomal, s'étend sur plusieurs décades sur l'axe des temps.

La figure 2.2 nous montre l'évolution du rapport "diffusion", défini comme $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$, en fonction du temps. Pour des temps courts (i.e. $t \leq 10^2$), ce rapport augmente régulièrement (parce que nous avons commencé la simulation avec une distribution piquée de type delta). Le rapport atteint une valeur plus ou moins constante qui correspond au coefficient de diffusion $D_0 = 10^{-1.73}$, caractéristique de la diffusion sans piégeage. Ici aussi, le plateau n'est pas totalement plat parce que le temps requis pour atteindre un plein plateau- D_0 est de l'ordre du temps requis pour entrer

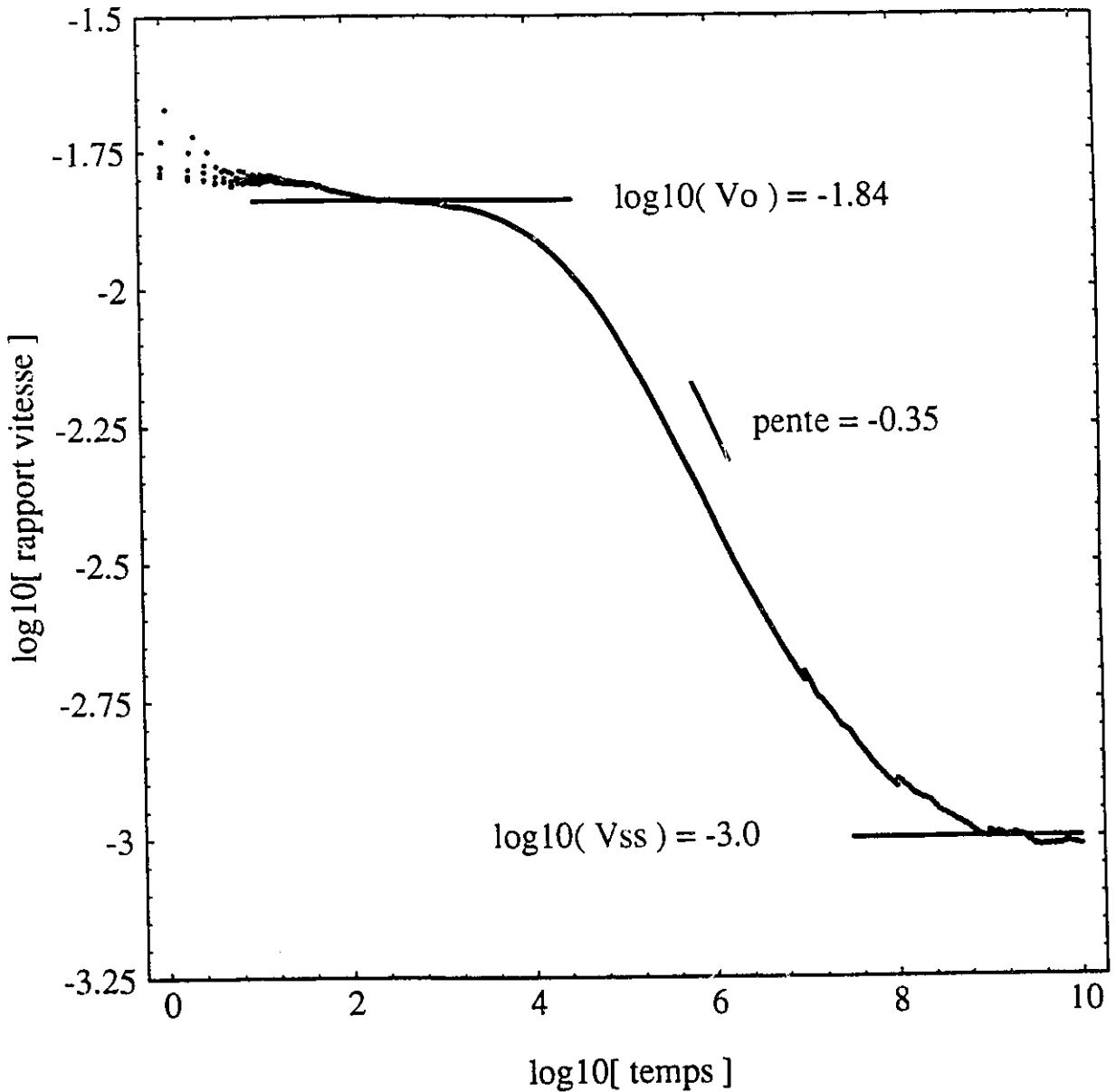


Figure 2.1- Rapport vitesse $\langle x(t) \rangle / t$ vs temps t pour $\varepsilon=0.05$ et $f=0.001$, obtenu par simulation. Notons que l'ensemble varie de 12000 particules pour des temps courts à 30 pour des temps longs (d'où les petites discontinuités). Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et le rapport vitesse en unités de $a/\tau_b(N=30)$.

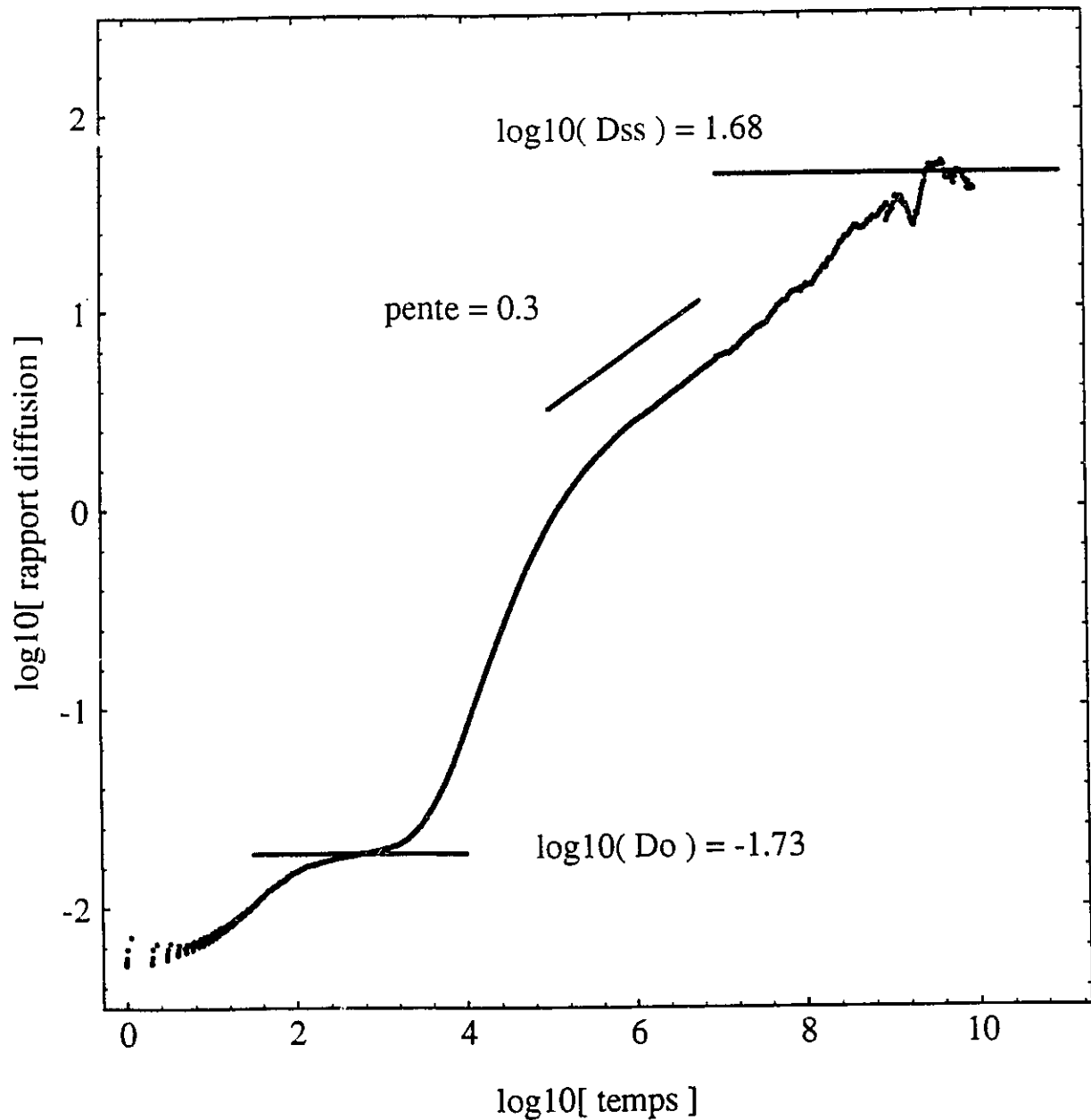


Figure 2.2- Rapport diffusion $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ vs temps t où le rapport diffusion est en unités de $a^2/\tau_B(N=30)$. Voir figure 2.1 pour détails. Le coefficient de diffusion à l'état stationnaire $D_{ss}=10^{1.68}$ montré ici a été confirmé entre 10^{10} et $10^{11} \tau_B(N=30)$ pour un ensemble de particules qui décroissait continuellement de 40 à 4 (non montré ici).

dans le premier piège. Le coefficient de diffusion passe lui aussi par un régime transitoire où $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ augmente substantiellement, ce qui indique clairement que le piégeage augmente la dispersion. Enfin, après un temps suffisamment long ($t \geq 10^{9.6}$), l'état stationnaire est obtenu et le rapport $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ atteint un plateau qui définit le coefficient de diffusion à l'état stationnaire $D_{ss} = 1(t)^{1.68}$.

La figure 2.3 montre l'évolution temporelle du rapport $\langle x(t) \rangle^2 / \langle \Delta x^2(t) \rangle$ (i.e. le nombre de plaques théoriques tel que défini en chromatographie). Dans les conditions normales (i.e. $\langle x(t) \rangle \propto t$ et $\langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t$) nous observerions une droite de pente unité. Ici, ce comportement linéaire est observé pour des courts temps ($t < 10^3$), dans une région où le piégeage commence à peine et ne domine pas encore la dynamique du système. Pour des temps plus grands ($10^4 < t < 10^5$), la pente de la courbe est négative, ce qui veut dire que la dispersion domine le mouvement des molécules. Pour des temps intermédiaires ($t = 10^{5-7}$), nous observons un quasi-plateau (le rapport varie de moins de 26%, tandis que le temps augmente par un facteur 100) qui indique que la bande électrophorétique est alors en train de s'élargir et de se déplacer au même rythme! On remarque aussi que $\langle x(t) \rangle^2 / \langle \Delta x^2(t) \rangle = 10^{0.5}$ dans cette région; c'est donc le piégeage et non la vitesse électrophorétique qui domine la dynamique pour des temps $t \leq 10^7$. Les conditions normales se retrouvent seulement pour des temps très longs $t \geq t_{ss} > 10^{9.6}$, i.e., le temps où l'état stationnaire est obtenu pour la vitesse et la diffusion à la fois, et pour $t < 10^3$ (ce qui définit le temps requis pour rencontrer le premier piège).

La figure 2.4 montre la forme de la bande $p(x,t)$ (i.e., la fonction densité de probabilité pour la position) pour un temps $t = 10^7$, ce qui correspond à la fin du plateau observé sur la figure 2.3. On constate que, même pour un temps très long, un grand nombre de molécules sont encore

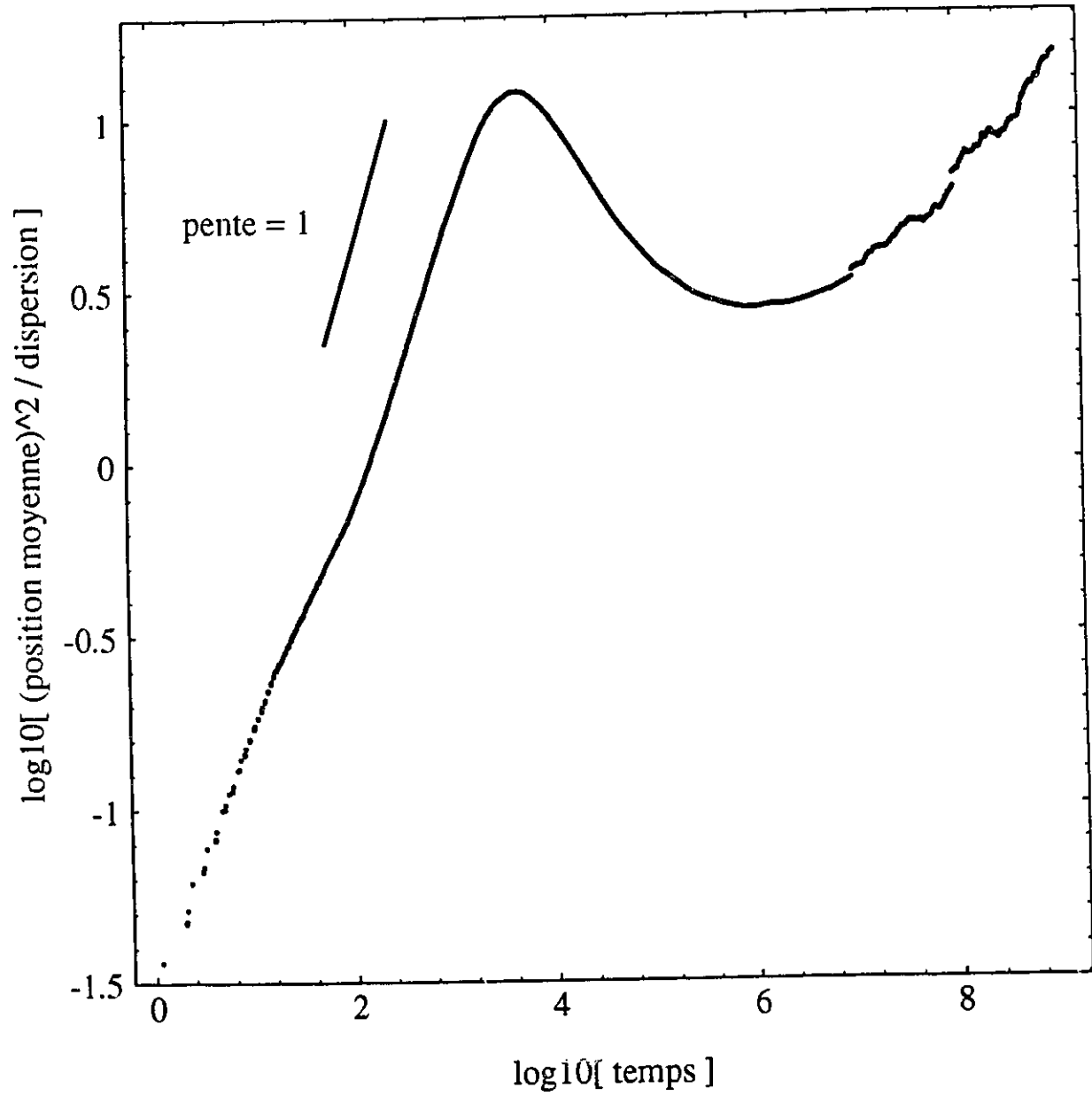


Figure 2.3- Rapport $\langle x(t) \rangle^2 / \langle \Delta x^2(t) \rangle$ vs temps t . Voir figure 2.1 pour détails.

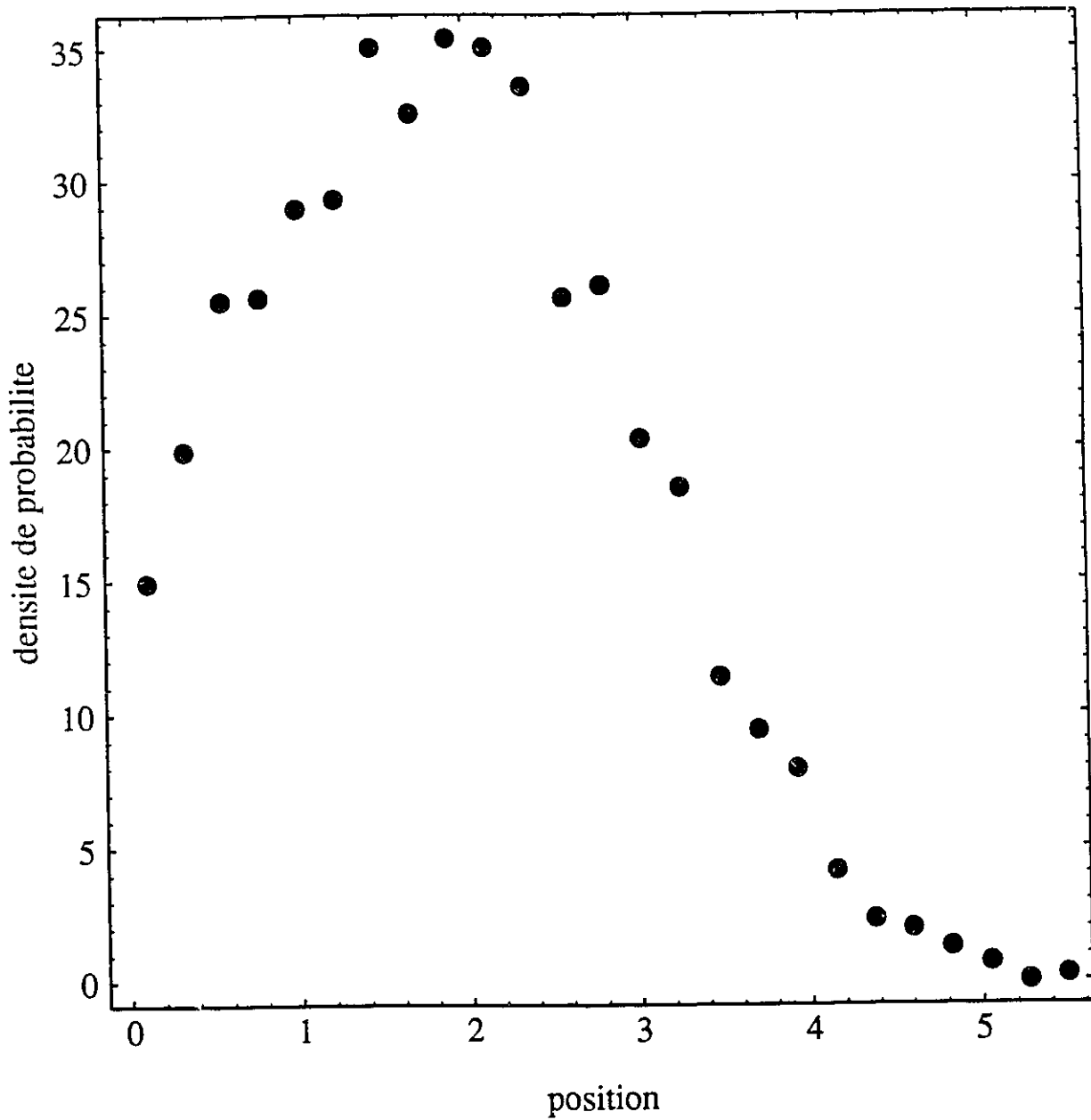


Figure 2.4- Densité de probabilité $p(x, t=10^7)$ vs position x (ensemble de 3000 molécules).

La probabilité $p(x, t=10^7)$ est en unités arbitraires.

près de l'origine. Le nombre de pièges très profonds (i.e., avec de très grands temps de sortie) est donc loin d'être négligeable, ce qui explique pourquoi le temps requis pour atteindre l'état stationnaire (t_{ss}) est si long.

La figure 2.5 nous montre la fonction densité de probabilité $P(\tau)$ pour le temps τ écoulé entre deux piégeages consécutifs (comprenant le temps requis pour entrer dans un nouveau piège, τ_0 , et le temps requis pour sortir de ce même piège, τ_d ; on obtient presque exactement le même résultat en traçant la densité de probabilité pour τ_d car $\tau_d \gg \tau_0$). Nous notons que $P(\tau)$ atteint un maximum pour $\tau \approx 10^4$, et on trouve aussi que $\langle \tau \rangle \approx 10^{5.5}$. La queue de cette distribution décroît essentiellement comme une loi de puissance $P(\tau) \propto \tau^{-1.65}$ pour $10^{4.5} < \tau < 10^{7.5}$ et comme une autre loi de puissance $P(\tau) \propto \tau^{-3.5}$ pour $\tau > 10^{7.5}$. L'état stationnaire est alors obtenu seulement quand environ $t_{ss} / \langle \tau \rangle \approx 10^{9.6} / 10^{5.5} \approx 10^4$ pièges ont été visitées.

2.4 Discussion: étude semi-quantitative

Dans nos simulations, le gel est un réseau aléatoire de pièges, et la distance entre deux pièges n'est pas strictement constante. La présence du champ électrique fait que les "sauts" d'un piège à l'autre se font la plupart du temps dans la direction du champ électrique. Si nous négligeons le fait que les sauts ne sont pas toujours exécutés dans la même direction et ne sont pas de longueur constante, notre modèle peut être comparé à une marche dirigée [13,14] sur un réseau périodique de pièges qui ont un espacement constant et égal à d (d est la distance moyenne entre deux pièges consécutifs), mais où la probabilité qu'un temps de sortie sur un site donné soit compris entre τ et $\tau+d\tau$ est simplement $P(\tau)d\tau$.

De tels systèmes sont reconnus pour leur propriétés anormales de transport quand la

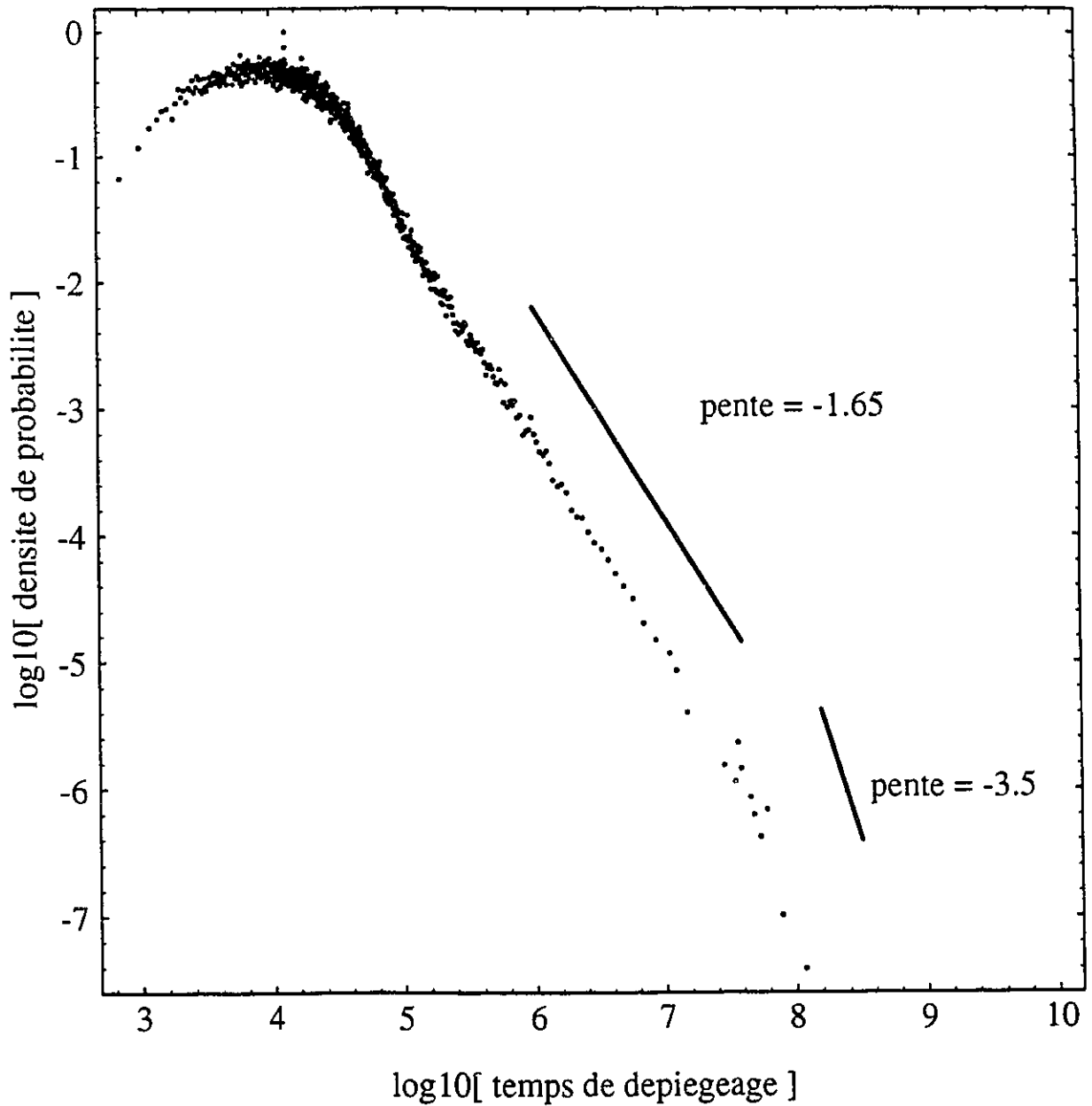


Figure 2.5- Densité de probabilité $P(\tau)$ vs temps de dépiégeage τ (total de 50000 événements de piégeage). Le temps de dépiégeage est en unités de $\tau_b(N=30)$ et la densité de probabilité est en unités arbitraires.

fonction $P(\tau)$ a une décroissance lente. Les régimes anomaux observés plus tôt peuvent être compris semi-quantitativement comme suit. Après M pièges, une molécule (dont la position est simplement donnée par Md) a visité des pièges dont les temps de sortie τ sont compris entre $\tau=0$ et $\tau=\tau_{\max}(t)$, le temps de sortie maximal rencontré jusque-là. La probabilité d'avoir choisi ce temps de sortie maximal $\tau_{\max}(t)$ est alors approximativement égal à $1/M$, de sorte que:

$$\int_{\tau_{\max}(t)}^{\infty} P(\tau) d\tau \approx \frac{1}{M} = \frac{d}{x(t)}. \quad (4)$$

Nous nous intéressons aux pièges qui influent fortement sur la dynamique du système, i.e., celles pour lesquelles on a $\tau \approx \tau_{\max}(t) = t$. Si la queue de la distribution $P(\tau)$ décroît lentement, $x(t)$ sera directement relié à la forme de cette queue. Par exemple, si la densité de probabilité $P(\tau)$ décroît comme une loi de puissance $P(\tau) \propto \tau^{-(1+\mu)}$, la position va augmenter elle aussi comme une loi de puissance puisque:

$$x(t) \propto \left[\int_{t=\tau_{\max}(t)}^{\infty} \frac{d\tau}{\tau^{1+\mu}} \right]^{-1} \propto t^{\mu}; \quad (5)$$

ce qui s'applique évidemment seulement pour $0 < \mu < 1$ ($\mu=0$ donne une vitesse nulle et $\mu=1$ aucun effet de piégeage). Pour un tel système, Bouchaud et Georges [13] nous donnent les expressions

suivantes pour la dépendance temporelle de la position $\langle x(t) \rangle$ et de la dispersion $\langle \Delta x^2(t) \rangle$ pour différentes valeurs de l'exposant μ :

$$\langle x(t) \rangle \propto t^\mu, \quad \langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t^{2\mu} \quad \text{pour } 0 < \mu < 1; \quad (6)$$

$$\langle x(t) \rangle \propto t, \quad \langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t^{\frac{2}{\mu}} \quad \text{pour } 1 < \mu < 2; \quad (7)$$

$$\langle x(t) \rangle \propto t, \quad \langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t \quad \text{pour } \mu > 2. \quad (8)$$

Comme on le voit sur la figure 2.5, $P(\tau)$ décroît approximativement comme $\tau^{-(1+\mu)}$ avec $0 < \mu < 1$ pour $10^4 < \tau < 10^{7.5}$. Les droites tracées sur les figures 2.1, 2.2 et 2.5 correspondent à $\langle x(t) \rangle \propto t^{0.65}$, $\langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t^{2 \times 0.65}$ et $P(\tau) \propto \tau^{-(1+0.65)}$, respectivement, en accord avec l'équation 6. La figure 2.5 indique aussi que $P(\tau) \propto \tau^{-(1+\mu)}$ avec $\mu > 2$ pour $\tau > 10^{7.5}$; c'est pourquoi les conditions normales ($\langle x \rangle - t$ et $\langle \Delta x^2 \rangle - t$) sont retrouvées et un état stationnaire est éventuellement atteint pour $t > t_s$ (voir équation 8).

Bouchaud et Georges [13] nous donnent aussi des expressions pour la forme de la bande électrophorétique $p(x,t)$. Selon ces expressions, dans le régime où $0 < \mu < 1$, la largeur de la bande augmente comme t^μ et la probabilité $p(0,t)$ d'être encore à l'origine après un temps t décroît seulement comme $t^{-\mu}$. Les résultats que nous avons obtenus en utilisant la forme de la bande pour des temps de $10^5, 10^6$ et 10^7 , montrent que $p(0,t)$ décroît approximativement comme $t^{-0.8}$ et que la largeur de la bande augmente approximativement comme $t^{0.7}$, ce qui est en accord avec le fait que $\mu=0.65$. Une autre conséquence de la décroissance en loi de puissance approximative de $P(\tau)$

est que $p(x,t)$ décroît pour des grands x comme une exponentielle allongée $\exp[-(x/x_0)^{1-\mu}]$, où x_0 est une fonction du temps. La figure 2.6 nous montre $\ln[p(x,t)]$ en fonction de $x^{1-\mu}$ pour un temps de $t=10^7$ (à la fin du régime transitoire) et pour $\mu=0.65$. On notera que l'on obtient bien une droite, en accord avec la théorie des marches dirigées anormales.

2.5 Conclusion

Pour une expérience typique d'électrophorèse dans un gel de polyacrylamide, nous estimons que $\tau_b(N=30)\approx 3$ msec et que $a\approx 10^{-6}$ cm. Par conséquent, le régime pour lequel on observe une loi de puissance, tant pour la position que pour la dispersion, correspond à des temps expérimentaux de $5 \text{ min} < t < 8 \text{ h}$. Pendant cette période, le déplacement moyen du pic est de ~ 0.1 mm et la largeur de la bande augmente elle aussi de ~ 0.1 mm. On note aussi qu'il est impossible d'atteindre l'état stationnaire dans un temps raisonnable ($t_{ss} \approx 10^{9.6} \approx 138$ jours).

La forme de la bande apparaît comme le facteur limitatif de l'électrophorèse de piégeage. En fait, l'étirement du front de diffusion est tellement grand et la vitesse si petite qu'il est impossible d'améliorer le séquençage de l'ADN en utilisant l'électrophorèse de piégeage pour des valeurs de N ou ϵ trop grandes. Un autre facteur dominant est le fait que le régime transitoire dure beaucoup plus longtemps pour la diffusion que pour la vitesse. La forme de la bande ne redevient gaussienne que pour des temps $t > t_{ss}$.

Ce large étirement du front de diffusion est aussi observé pour de plus grandes valeurs de N , et la queue de la distribution $P(\tau)$ décroît de plus en plus lentement lorsque N augmente. L'inefficacité de l'électrophorèse de piégeage [6] est sans doute liée au fait que, pour de grandes tailles moléculaires N , la distribution de temps de sortie est trop large. Afin de réduire la largeur

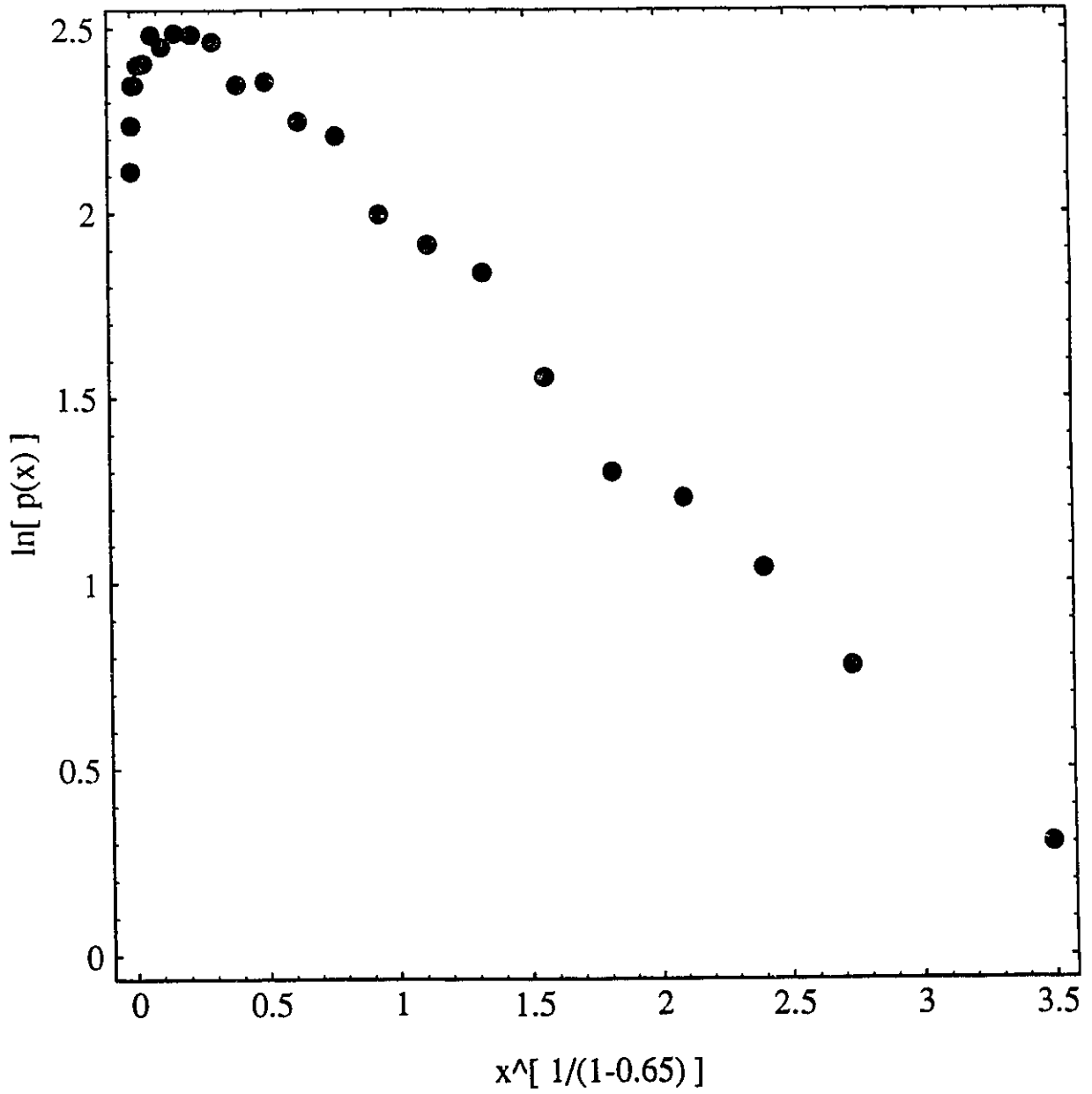


Figure 2.6- $\ln[p(x, t=10^7)]$ vs $x^{1/(1-0.65)}$ où les deux expressions sont en unités arbitraires.

de $P(\tau)$ et de diminuer les effets anomaux observés pour les grands N , nous devons accélérer le processus de dépiégeage, en utilisant par exemple des champs pulsés (inverser la direction du champ pendant une courte période de temps forcerait les molécules à sortir des pièges), comme suggéré par UDG. Ceci est le sujet du chapitre 4.

Nous avons aussi étudié les effets transitoires pour d'autres valeurs de la taille moléculaire N et d'autres intensités du champ électrique ϵ . Ces effets deviennent moins importants pour de plus petites molécules ou de plus faibles champs. Par exemple, dans le cas où $\epsilon=0.05$, le rapport vitesse $\langle x(t) \rangle / t$ ne montre aucun régime anormal pour $N < 22$, tandis que le rapport diffusion $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ nous montre des régimes anomaux seulement pour $N > 15$. On explique ce phénomène par le fait que la fonction distribution de probabilité $P(\tau)$ décroît approximativement comme $\tau^{-(1+\mu)}$, avec $\mu > 2$ pour $N < 15$, et $1 < \mu < 2$ pour $16 < N < 22$ (voir équations (6-8)). Pour le champ $\epsilon=0.05$, l'exposant μ est donné grossièrement par $\mu=(N/23)^{-5/3}$.

En conclusion, notre étude nous montre que l'état stationnaire de l'électrophorèse de piégeage peut être précédé par un régime transitoire anormal de longue durée où la diffusion domine le déplacement. Ce régime anormal peut être compris en terme d'une marche dirigée dans un réseau périodique de pièges ayant une large distribution de temps de sortie. Cette migration anormale des molécules dans le gel peut avoir un effet important quand des champs pulsés sont appliqués, car la migration pourra alors être anormale durant chaque pulse [14].

Chapitre 3

L'électrophorèse de piégeage:

Un modèle analytique²

3.1 Introduction

Défontaines et Viovy (DV) [8,9] ont été les premiers à présenter un modèle analytique de la migration électrophorétique du complexe S-ADN. Leur modèle est basé sur une version légèrement modifiée du modèle de reptation biaisée [17] et contient les modes d'étirement moléculaire intra-tube. Ce modèle prédit une décroissance rapide de la mobilité pour des masses supérieures à une masse moléculaire critique N^* , et cette masse critique dépend du champ électrique. Ce résultat est en bon accord qualitatif avec les expériences de UDG. Slater et Villeneuve (SV) [7] ont étudié ce problème en utilisant un algorithme de simulation numérique basé sur le modèle de reptation biaisée (MRB). Leurs résultats montrent également une décroissance exponentielle de la vitesse, mais ils observent en plus un accroissement très important du coefficient de diffusion. De plus, dans la limite où le modèle de DV se réduit aux

²Les résultats de ce chapitre seront soumis à la revue "Electrophoresis" en octobre 1994.

simulations de SV, les simulations montrent une décroissance beaucoup plus rapide de la mobilité quand la taille moléculaire ou le champ augmentent. Finalement, on a montré dans le chapitre 2 que les effets anomaux (expliqués par la largeur de la distribution $P(\tau)$) entraînent une augmentation du coefficient de diffusion D_{ss} et du temps requis pour atteindre l'état stationnaire t_{ss} .

Dans ce chapitre, nous présentons un nouveau modèle analytique pour l'électrophorèse de piégeage du complexe S-ADN. Ce modèle est basé sur celui de reptation biaisée, car il est le seul qui donne des équations et un modèle analytique simples et, de plus, le MRB s'est montré adéquat pour décrire les expériences de séquençage de l'ADN sous des conditions normales [5]. Notre modèle décrit le processus de dépiégeage par une équation de diffusion avec des conditions frontières appropriées. Ceci nous permet d'obtenir des résultats qui sont valides même pour de faibles champs électriques. De plus, notre modèle nous permet de calculer le coefficient de diffusion. Nous montrons qu'il augmente exponentiellement avec la taille moléculaire. Cet effet réduit considérablement l'utilité de l'électrophorèse de piégeage du complexe S-ADN en champ constant. Finalement, nous discuterons de la nature des cycles piégeage/dépiégeage qui peuvent mener à de fortes propriétés de transport anomaux pendant des temps qui sont de l'ordre des temps expérimentaux (tel le temps d'un pulse en électrophorèse en champs inversés, FIGE), en accord avec les résultats du chapitre 2.

3.2 Les résultats de DV

Dans la limite où le polyélectrolyte n'est pas extensible, i.e. on suppose que la longueur du tube de reptation du MRB est de longueur constante et égale à Na , le modèle de DV [9] prédit que le temps moyen de dépiégeage est donné par:

$$\frac{\tau_d(\epsilon, N)}{\tau_B(N)} = \frac{\langle \tau_d(\epsilon, N, h_x) \rangle}{\tau_B(N)} \approx \left\langle \frac{h_x^2}{a^2} \right\rangle^{\frac{1}{4}} \exp \left[\left(\frac{h_x^2}{4a^2} \right)^{1/2} \epsilon N \right] \quad (9)$$

où N est le nombre de segments de reptation (qui est proportionnel à la taille moléculaire M de l'ADN), a est la taille moyenne d'un pore dans le gel de polyacrylamide, h_x est la distance bout-à-bout de la molécule d'ADN dans la direction du champ (x), $\epsilon = qEa/2k_B T$ est le champ électrique réduit (E est le champ électrique et q la charge d'un segment de reptation); finalement, $\tau_B(N) = a^2/2D_c(N)$ est le temps brownien relié au coefficient de diffusion curvilinéaire $D_c(N) = k_B T/\xi(N+\alpha)$, où ξ est le coefficient de friction par segment d'ADN et α le coefficient de friction relatif de la streptavidine ($\alpha=1$; P. Mayer et G. Drouin, non publié). La moyenne notée par les crochets $\langle \dots \rangle$ veut dire que nous moyennons sur toutes les conformations moléculaires possibles, i.e., sur la fonction de distribution de la distance bout-à-bout h_x . Pour une conformation aléatoire pour laquelle $\langle h_x^2 \rangle = Na^2/3$, l'équation (9) donne:

$$\tau_d(\epsilon, N) \propto N^{\frac{5}{4}} \exp \left[\epsilon \frac{N^{3/2}}{\sqrt{12}} \right] \quad (10)$$

Ces calculs supposent que la fraction f de pores qui peuvent piéger la streptavidine est très faible, i.e. $f \ll 1/N$. Dans ce cas, la molécule rencontre un seul piège à la fois. La migration

du complexe S-ADN est donc composée de cycles de piégeage/dépiégeage. La mobilité nette est alors simplement donnée par:

$$V(\epsilon, N) = \frac{V_0(\epsilon, N)}{1 + \frac{\tau_d(\epsilon, N)}{\tau_0(\epsilon, N)}} \quad (11)$$

où $\tau_0(\epsilon, N)$ est le temps moyen écoulé entre deux événements de piégeage (temps de migration libre), $\tau_d(\epsilon, N)$ le temps moyen écoulé dans un piège, et V_0 la vitesse moyenne de la molécule entre les pièges. L'équation (11) prend simplement en considération le temps "perdu" dans les pièges. En utilisant les équations (10) et (11), DV prédisent que dans la limite où la molécule n'est pas extensible, la vitesse électrophorétique devrait décroître exponentiellement comme $V \propto \exp[-\epsilon N^{3/2}/(12)^{1/2}]$, en accord qualitatif avec les résultats expérimentaux de UDG.

Le modèle de DV mène aussi à une variété d'autres régimes intéressants quand la molécule s'étire à cause du champ électrique (ceci correspond à un accroissement de la longueur du tube). Par contre, l'équation (9) n'est pas valide dans la limite où le champ électrique est tellement faible que le processus de dépiégeage se fait simplement par diffusion Brownienne [8]. Dans ce chapitre, nous supposons que le champ électrique est faible et que la molécule ne s'étire pas (dans le langage commun du modèle de reptation, nous assumons que la longueur du tube de reptation $L=Na$ est constante). Nous ferons les moyennes sur la distribution de distances bout-à-bout h_x d'une façon qui est fondamentalement différente de celle utilisée par DV. Finalement, nous calculerons non seulement la mobilité, mais aussi le coefficient de diffusion du complexe S-ADN, ceci afin de pouvoir prédire la résolution de la séparation.

3.3 Le processus de dépiégeage

Dans le modèle de reptation biaisée [8,17,18], le mouvement de la molécule d'ADN est restreint à un tube de reptation formé par les contraintes que les fibres du gel imposent au mouvement de la molécule. La vitesse longitudinale (selon l'axe du tube) de la molécule d'ADN est donnée par :

$$V_{tube}(\epsilon, N, h_x) = \frac{\epsilon h_x}{\tau_B(N)} \quad (12)$$

On note que V_{tube} est une fonction de la valeur instantanée de la projection de la distance bout-à-bout h_x dans la direction du champ électrique. La valeur de h_x fluctue rapidement dans le temps. La force longitudinale gardant la molécule à l'intérieur d'un piège est donc:

$$F_{piège} = \xi(N+\alpha) V_{tube} = \frac{\epsilon \xi(N+\alpha) h_x}{\tau_B(N)} \quad (13)$$

Cette force est une fonction de $h_x(t)$; conséquemment, les différents pièges peuvent avoir des profondeurs très différentes selon la valeur de $h_x(t)$. Ceci est similaire à ce qu'on obtient lors de la diffusion (et migration) dans un environnement constitué de pièges ayant des profondeurs aléatoires (suivant une distribution donnée).

La figure 3.1 montre un scénario possible de dépiégeage où la molécule se déplace queue (i.e. le bout avec la streptavidine) première dans la direction du champ, pour former un système de type poulie. Il est à noter que la molécule va souvent reculer pendant un certain temps pour se piéger à nouveau, mais avec une différente conformation. Ceci va la plupart du temps accroître la valeur de h_x en fonction du temps. DV ont obtenu l'équation (10) pour le temps de dépiégeage $\tau_d(\epsilon, N)$ en utilisant l'approximation de Kramer et le type de scénario décrit sur la figure 3.1.

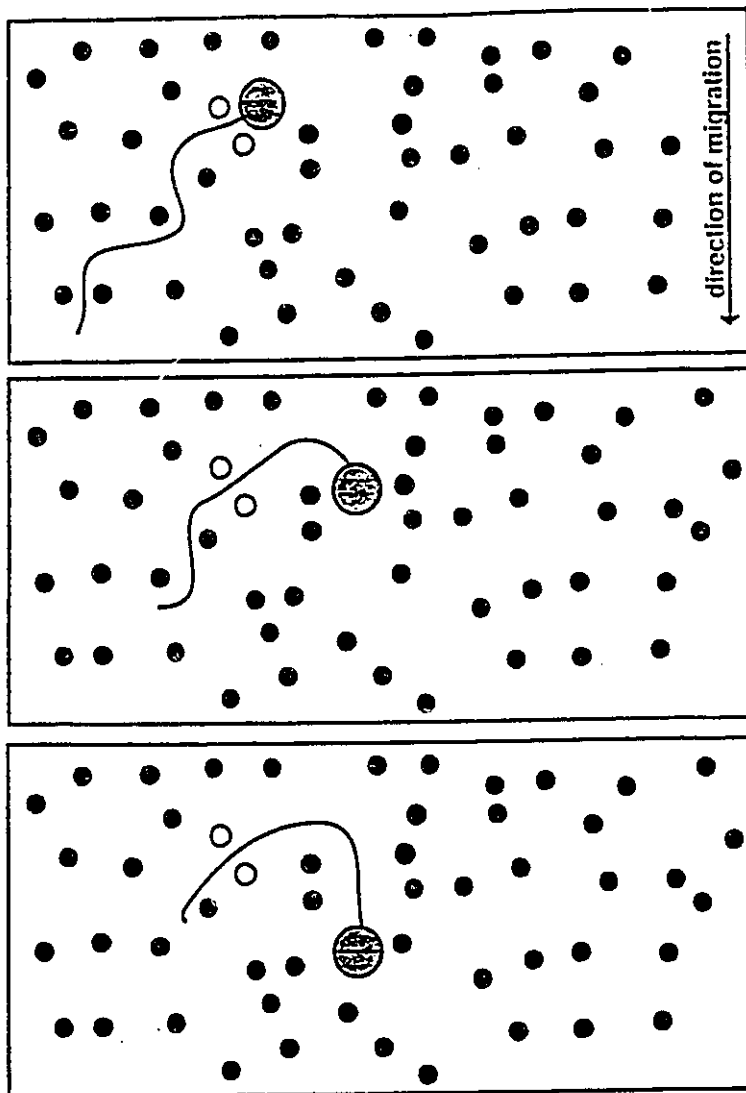


Figure 3.1- Représentation schématique du scénario de dépiégeage où la molécule se déplace queue première dans la direction du champ pour former un système de type poulie. Ce scénario est celui utilisé dans le modèle analytique de Défontaines et Viovy (DV).

Dans notre modèle, nous supposons plutôt que h_x demeure constant pendant le dépiégeage, tel que schématisé sur la figure 3.2. Nous utilisons cette approximation pour deux raisons: (i) le problème peut ainsi être résolu analytiquement; (ii) il n'y a aucune raison de croire que la streptavidine va se déplacer dans la direction du champ (comme pour le scénario décrit à la figure 3.1), car elle est neutre. Par contre, les deux approches négligent les fluctuations de h_x pendant le processus de dépiégeage. Ces fluctuations peuvent jouer un rôle majeur, mais rendent le problème très difficile à traiter analytiquement.

3.4 Équation de diffusion

Si nous assumons que la molécule se dépiege suivant le scénario décrit sur la figure 3.2, le problème de la chaîne dans son tube devient similaire à celui du problème unidimensionnel d'une particule située sur un mur réfléchissant à $s=0$ (elle est alors piégée) essayant d'atteindre un mur absorbant situé à $s=-Na=-L$ (où elle devient libre) avec une vitesse constante $(ds/dt)_{t=0} = s'(0) > 0$ donnée par l'équation (12) et un coefficient de diffusion donné par $D_c(N) = k_B T / \xi(N + \alpha)$. L'équation de diffusion pour le temps moyen d'absorption (temps de dépiégeage) $\tau_d(s)$ pour ce processus est:

$$D_c \frac{\partial^2 \tau_d(s)}{\partial s^2} + \left(\frac{\partial s}{\partial t} \right)_{t=0} \times \frac{\partial \tau_d(s)}{\partial s} + 1 = 0 \quad (14)$$

où s est maintenant la position initiale de la particule entre les deux murs. Il est à noter que la vitesse demeure constante (égale à la valeur à $t=0$) parce qu'on suppose que la valeur de h_x est

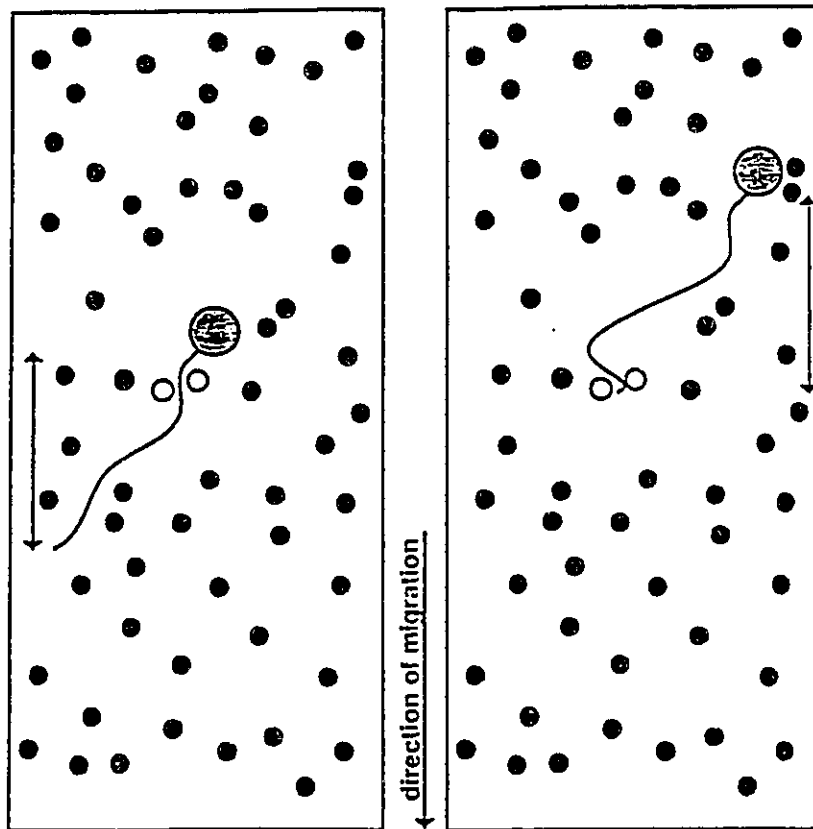


Figure 3.2- Représentation schématique du scénario où la molécule sort de son piège en gardant la valeur de sa distance bout-à-bout h_x constante. C'est le type de scénario que nous utilisons dans notre modèle analytique.

constante durant le processus de dépiégeage. Les conditions frontières sont:

$$\left(\frac{\partial \tau_d(s)}{\partial s} \right)_{s=0} = 0 \quad (15)$$

$$\tau_d(s=-L) = 0 \quad (16)$$

L'équation (15) décrit le fait que la particule (molécule) est réfléchi (piégée) quand elle atteint le mur situé à $s=0$ (la streptavidine rencontre le mur à nouveau). L'équation (16) décrit l'absorption de la molécule par le mur absorbant, i.e., la fin du processus de dépiégeage.

La solution des équations (14-16) est donnée par:

$$\tau_d(s) = - \left(\frac{L+s}{s'(0)} \right) + \frac{D_c}{s'^2(0)} \times \left(e^{\frac{Ls'(0)}{D_c}} - e^{-\frac{ss'(0)}{D_c}} \right) \quad (17)$$

Pour les conditions initiales $s=0$ (qui définit le début d'un événement de piégeage), $h_x > 0$, et une vitesse curvilinéaire donnée par l'équation (12), on obtient, à partir de l'équation (17):

$$\frac{\tau_d(\epsilon, h_x, N)}{\tau_B(N)} = - \frac{Na}{\epsilon h_x} + \frac{a^2}{2\epsilon^2 h_x^2} \times \left(e^{\frac{2\epsilon N h_x}{a}} - 1 \right) \quad (18)$$

Ceci est le temps moyen de dépiégeage pour une valeur fixe de h_x , comme décrit plus haut. Le terme exponentiel qui domine ressemble à celui de l'équation (9), mais le reste de l'expression

est différent. En particulier, on note que cette équation donne la bonne expression dans la limite des champs faibles:

$$\lim_{\epsilon \rightarrow 0} \tau_d(\epsilon, N, h_x) = N^2 \tau_B(N) \propto N^2 (N + \alpha) \quad (19)$$

Ceci est le résultat obtenu pour la simple reptation avec un α supplémentaire, dû à la présence de la streptavidine. Notre approche donne donc des temps de dépiégeage qui sont bons également dans la limite du faible piégeage.

Il est aussi possible de calculer la variance $\Delta\tau_d^2(\epsilon, N, h_x)$ du temps moyen de dépiégeage (voir appendice de la thèse de maîtrise de Hong L. Guo, Université d'Ottawa, 1994):

$$\frac{\Delta\tau_d^2(\epsilon, N, h_x)}{\tau_B^2(N)} = \frac{e^{4N\delta} + 4e^{2N\delta}(1 - 2N\delta) - 4N\delta - 5}{4(N\delta)^4} \quad (20)$$

où $\delta = \epsilon h_x / a > 0$ est le facteur de biaisage du mouvement de reptation (voir équation 2). Nous verrons plus tard que la déviation standard du temps moyen de dépiégeage est comparable à $\tau_d(\epsilon, N, h_x)$ lui-même. Ceci va jouer un rôle important.

Dans la prochaine section, nous discuterons de la moyenne sur h_x de ces temps de dépiégeage, de manière à calculer la vitesse ainsi que le coefficient de diffusion du complexe S-ADN à l'état stationnaire.

3.5 Résultats

Pour une taille moléculaire N donnée, on a:

$$N^2 \leq \frac{\tau_d(\epsilon, N, h_x)}{\tau_B(N)} \leq \frac{e^{2N^2\epsilon}}{2\epsilon^2 N^2} \quad (21)$$

Les valeurs typiques pour N et ϵ sont $N=2-20$ et $\epsilon=0.1-3.0$ pour ce système. La borne supérieure pour $\tau_d(\epsilon, N, h_x)$ est donc typiquement plus grande que la borne inférieure. De plus, si nous remplaçons h_x par sa valeur moyenne en champ nul, $\langle h_x^2 \rangle^{1/2} = (Na^2/3)^{1/2}$, dans l'équation (18), nous obtenons des temps de dépiégeage "typiques", i.e. des temps de dépiégeage pour des molécules dont la distance bout-à-bout n'est pas perturbée par le champ électrique; ce temps est beaucoup plus court que ce qui a été trouvé pour la borne supérieure de l'équation (21). Il y a donc une distribution de temps de sortie très large, quoique non infinie. Cette dernière remarque a trois conséquences: (i) Nous devons être très prudents en faisant la moyenne de l'équation (18) sur les valeurs de h_x parce que les grandes valeurs de h_x peuvent avoir un effet énorme. (ii) Le temps de dépiégeage le plus long peut être supérieur au temps expérimental. Dans ce cas il est impossible d'atteindre l'état stationnaire. (iii) La largeur de la distribution de temps de sortie possibles est beaucoup plus grande que le temps de dépiégeage moyen. Nous discuterons de ces trois facteurs ci-bas.

3.6 L'état stationnaire

Comme mentionné plus haut, les grandes valeurs de h_x jouent un rôle important dans la dynamique du complexe S-ADN, car le temps de sortie $\tau_d(\epsilon, N, h_x)$ augmente exponentiellement

avec h_x . En conséquence, remplacer h_x par sa valeur moyenne dans l'équation (18) n'est pas une bonne approximation. Nous suggérons plutôt l'approche suivante.

Les seuls cas d'intérêt sont ceux pour lesquels la vitesse moyenne est non négligeable, i.e. ceux pour lesquels le temps de dépiégeage n'est pas trop grand. C'est le cas quand l'argument de l'exponentielle de l'équation (18) est petit. Ceci requiert que la distance bout-à-bout h_x reste aussi petite que possible, car nous devons éviter l'orientation moléculaire qui est typique à l'électrophorèse des polyélectrolytes. Comme mentionné par DV, les molécules d'ADN gardent leurs conformations aléatoires si $\epsilon < 3N^{1/2}$, ce qui est le seul cas intéressant. Les simulations numériques de SV montrent que les molécules orientées ont une vitesse négligeable. Alors, nous ferons le moyennage de l'équation (18) en utilisant une distribution gaussienne non biaisée pour la distribution des distances bout-à-bout h_x :

$$p(h_x) \propto \exp\left(-\frac{3h_x^2}{2Na^2}\right) \quad (22)$$

Cette approche est raisonnable du point de vue physique et elle nous permet aussi d'obtenir des résultats analytiques simples. Il est à noter que seulement des valeurs de $h_x > 0$ correspondent à des pièges. De ce fait, la moyenne d'une fonction $f(h_x)$ est définie comme:

$$\langle f(h_x) \rangle = \frac{\int_0^{\infty} f(h_x) p(h_x) dh_x}{\int_0^{\infty} p(h_x) dh_x} \quad (23)$$

Pour de faibles tailles moléculaires telles que $\Lambda \equiv (2N)^{3/2}\epsilon < 1$, nous pouvons remplacer les exponentielles des équations (18) et (20) par leurs expansions en série pour obtenir:

$$\frac{\tau_d(\epsilon, N)}{N^2 \tau_B(N)} = \frac{\langle \tau_d(\epsilon, N, h_x) \rangle}{N^2 \tau_B(N)} \approx 1 + \frac{\Lambda}{\sqrt{27\pi}} + \frac{\Lambda^2}{72} + \dots \quad (24)$$

$$\frac{\Delta \tau_d^2(\epsilon, N)}{N^4 \tau_B^2(N)} = \frac{\langle \Delta \tau_d^2(\epsilon, N, h_x) \rangle}{N^4 \tau_B^2(N)} \approx \frac{2}{3} + \frac{8\Lambda}{15\sqrt{3\pi}} + \frac{11\Lambda^2}{270} + \dots \quad (25)$$

Dans la limite où $5 < \Lambda < (9N/2)^{1/2}$, nous obtenons simplement:

$$\frac{\tau_d(\epsilon, N)}{N^2 \tau_B(N)} = \frac{\langle \tau_d(\epsilon, N, h_x) \rangle}{N^2 \tau_B(N)} \approx \left(\frac{12}{\Lambda^2} \right)^2 \exp \left(\frac{\Lambda^2}{12} \right), \quad (26)$$

$$\frac{\Delta \tau_d^2(\epsilon, N)}{N^4 \tau_B^2(N)} = \frac{\langle \Delta \tau_d^2(\epsilon, N, h_x) \rangle}{N^4 \tau_B^2(N)} \approx 8 \left(\frac{3}{\Lambda^2} \right)^4 \exp \left(\frac{\Lambda^2}{3} \right). \quad (27)$$

Pour $\Lambda > (9N/2)^{1/2}$, qui correspond à $N\epsilon > 3/4$, les grandes valeurs de h_x (i.e. $h_x \approx N$) dominent dans les intégrales et la distribution gaussienne devient inadéquate. Par contre, dans ce cas, nous ne pouvons plus présumer que la longueur du tube est encore constante. L'équation (21a) de la référence [9] indique en effet que si $h_x \approx N$, $N\epsilon > 1/2$ et $\alpha \approx 1$, on obtient $L > Na$ (le tube de reptation s'étire). Nous n'étudierons donc pas cette limite.

Les équations (24-25) montrent que les effets du champ électrique sont seulement une perturbation pour des tailles faibles telles que $\Lambda < 1$, tandis que le piégeage induit par le champ domine clairement la dynamique pour $\Lambda > 5$. Dans ce dernier cas, on note que $\tau_d(\epsilon, N) \propto \exp(2N^3 \epsilon^2/3)$; par conséquent l'équation (26) nous dit que $\tau_d(\epsilon, N)$ augmente

beaucoup plus rapidement avec la taille moléculaire (N) que ce que prédisait l'équation (10). Ceci est dû au fait que $\langle \exp(h_x/a) \rangle \gg \exp(\langle h_x \rangle/a)$. Même si la décroissance prédite de $V(N)$ est plus rapide (en utilisant l'équation (11)), la région de recoupement entre les régimes de faible et de fort piégeage est encore obtenue pour une taille critique donnée grossièrement par $N^* \propto \epsilon^{-2/3}$, tout comme DV l'avaient prédit. Finalement, on remarque que $(\Delta\tau_d^2)^{1/2}$ devient supérieur à τ_d quand Λ augmente; ceci veut dire que nous pouvons avoir une distribution de temps de dépiégeage très large dans ce système. Nous discuterons de ce fait plus tard.

3.7 La limite du piégeage faible

Avec une concentration de pièges $f \ll 1/N$, la chaîne doit se déplacer sur une distance curvilinéaire moyenne $d_0 \approx a/f$ avant de rencontrer un piège. Sachant que la chaîne a une vitesse curvilinéaire V_{tube} donnée par l'équation (12), le temps moyen entre deux pièges est:

$$\tau_0(\epsilon, N) \approx \frac{d_0}{V_{tube}} \approx \frac{\tau_B(N)}{f \epsilon \langle |h_x|/a \rangle} \approx \frac{\tau_B(N)}{f \epsilon \sqrt{2N/3\pi}} \quad (28)$$

où nous présumons, comme précédemment, que la chaîne garde une conformation aléatoire avec $\langle |h_x| \rangle \approx (2N/3\pi)^{1/2}$. Le régime des champs faibles est obtenu quand le temps entre deux pièges est supérieur au temps de dépiégeage. En utilisant $\tau_d \approx N^2 \tau_B(N)$, comme suggéré par l'équation (24) dans cette limite, nous trouvons que $\tau_d/\tau_0 \approx fN\Lambda/(12\pi)^{1/2}$. Puisque que $fN \ll 1$, nous voyons que le temps de dépiégeage est toujours faible en comparaison du temps requis pour migrer entre les pièges dans la limite des champs faibles où $\Lambda < 1$. Nous pouvons donc réécrire les équations (11)

et (24) comme:

$$\frac{V_0(\epsilon, N) - V(\epsilon, N)}{V_0(\epsilon, N)} = \frac{fN\Lambda}{\sqrt{12}\pi} \approx fN^{5/2}\epsilon < 1 \quad (29)$$

L'équation (29) montre que même si le changement relatif de vitesse est fortement dépendant de la taille moléculaire N, il est d'une intensité trop faible pour être d'une quelconque utilité pour la séparation électrophorétique visée.

3.8 La limite du piégeage fort

Le piégeage fort a lieu quand le temps de dépiégeage devient plus grand que le temps de dérive entre deux pièges, i.e. quand $\tau_d > \tau_0$. Ceci ne peut arriver que quand $\Lambda > 1$; les équations (11), (26) et (29) donnent alors:

$$\frac{V}{V_0} \approx \frac{\sqrt{3}\pi}{72} \frac{\Lambda^3}{fN} \exp\left(-\frac{\Lambda^2}{12}\right) = \frac{\epsilon^3 N^{7/2}}{f} \exp\left(-\frac{2N^3 \epsilon^2}{3}\right) \quad (30)$$

Nous prédisons alors une décroissance très rapide de la vitesse en fonction de la taille moléculaire. La dépendance exponentielle est en accord qualitatif avec UDG. L'argument de l'exponentielle est le carré de l'argument de l'exponentielle prédite par DV, ce qui semble être en meilleur accord avec les résultats des simulations de SV.

Dans l'état stationnaire, le coefficient de diffusion pour le piégeage fort est donné par [13]:

$$D = \frac{V^2 \langle \Delta \tau_d^2 \rangle}{2d_0} \quad (31)$$

où $d_0 = V_0 \tau_0$ est la distance entre les pièges. En l'absence de pièges, la vitesse électrophorétique et le coefficient de diffusion pour la migration d'une molécule d'ADN, dans la limite où $\Lambda > 1$ et $N\epsilon^2 < 1$, sont donnés par:

$$D_0 \approx \frac{a^2}{6\tau_B} \times \epsilon \sqrt{2N/3\pi} \quad (32)$$

$$V_0 \approx \frac{\epsilon a}{3\tau_B} \quad (33)$$

En utilisant les équations (26), (27), (30), (31), (32) et (33), on obtient:

$$\frac{D}{D_0} = \left(\frac{\pi}{192}\right)^{3/2} \frac{\Lambda^2}{f^2 N^2} \exp\left(\frac{\Lambda^2}{12}\right) \approx \frac{\epsilon^3 N^{5/2}}{f^2} \exp\left(\frac{2N^3 \epsilon^2}{3}\right) \quad (34)$$

Il va de soi qu'une décroissance de la vitesse, tel qu'obtenu à l'équation (30), alliée à une croissance exponentielle du coefficient de diffusion, donnée par la dernière équation, signifient que le nombre de molécules qui sont effectivement séparées est grandement diminué. Notons également que nos résultats prédisent que le coefficient de diffusion va commencer à augmenter avant (i.e. pour des molécules plus petites) que la vitesse ne commence à décroître, comme l'ont observé SV (ceci est dû au préfacteur dans chacune des expressions). La croissance de D est aussi en accord quantitatif avec les résultats de simulations de SV.

Nous en concluons donc que les résultats expérimentaux de UDG et les résultats numériques de SV peuvent être expliqués de façon qualitative par le type de piégeage suggéré dans ce chapitre et qu'un champ constant ne peut mener à une amélioration du séquençage de l'ADN à cause de l'augmentation de la diffusion générée par le processus de piégeage/dépiégeage.

3.9 Le régime transitoire

Nous retournons maintenant à l'effet de la large dispersion $\Delta\tau_d^2(\epsilon, N)$. Nous notons premièrement que dans la limite du piégeage fort, on a :

$$\frac{\Delta\tau_d}{\tau_d} \approx \frac{\sqrt{2}}{8} \exp\left(\frac{\Lambda^2}{12}\right) \gg 1 \quad (35)$$

Cette large distribution de temps de dépiégeage est typique du piégeage dans un système désordonné. Ici, nous avons un cas unique: le désordre est fourni par la large distribution de distances bout-à-bout h_x car h_x est le paramètre qui mesure la "profondeur" d'un piège. De ce fait, il s'agit essentiellement d'un cas de désordre auto-induit relié à l'existence de l'entropie moléculaire de la macromolécule.

Afin d'examiner les conséquences de cette large distribution, nous étudierons la distribution $P(\tau_d)d\tau_d$ pour le temps moyen de dépiégeage $\tau_d(h_x)$. Nous pouvons calculer cette fonction en remarquant que :

$$p(h_x)dh_x = \frac{P(h_x(\tau_d))d\tau_d}{d\tau_d/dh_x} = P(\tau_d)d\tau_d \quad (36)$$

où $p(h_x)$ est donné par l'équation (22), $d\tau_d/dh_x$ est obtenu à partir de l'équation (18), et $h_x(\tau_d)$ est obtenu en inversant l'équation (18). Par souci de simplicité, cette approche néglige la distribution de temps de dépiégeage $\tau_d(h_x)$ pour une valeur fixe de h_x , bien que celle-ci ait été incluse dans l'équation (27). Inverser l'équation (18) ne peut se faire de façon analytique et nous devons nous restreindre à une méthode numérique.

La figure 3.3 montre la fonction distribution $P(\tau_d)d\tau_d$ pour différentes valeurs du paramètre

$\Lambda=(2N)^{3/2}\varepsilon$. De façon remarquable, nous obtenons essentiellement une distribution de type loi de puissance

$$P(\tau_d)d\tau_d \approx \frac{d\tau_d}{\tau_d^{1+\mu}} \quad (37)$$

et ce sur une grande étendue (plusieurs décades) de temps de dépiégeage. L'exposant μ varie approximativement comme suit:

$$2 < \mu \quad \text{si} \quad \Lambda < 7 \quad (38)$$

$$1 < \mu < 2 \quad \text{si} \quad 7 < \Lambda < 11 \quad (39)$$

$$0 < \mu < 1 \quad \text{si} \quad \Lambda > 11 \quad (40)$$

On note que l'exposant μ décroît quand Λ augmente. Il est clair que ces valeurs ne sont qu'approximatives, car la distribution $p(\tau_d)$ ne suit pas exactement une loi de puissance. Nos calculs de la fonction distribution ne sont valides que dans l'hypothèse d'une fonction de distribution de h_x gaussienne, i.e. quand h_x n'est pas trop grand comparativement à $N^{1/2}$. Pour des valeurs plus grandes de h_x , et donc de τ_d , la fonction devrait décroître plus rapidement qu'on le prédit ici. D'après l'équation (18), cela indique que la décroissance de type loi de puissance n'est valide que pour des temps de dépiégeage approximativement plus petits que:

$$\frac{\tau_d}{\tau_B} < \frac{N^2}{\Lambda} e^\Lambda \quad (41)$$

Pour des temps plus longs, la décroissance devrait être plus rapide. Selon la théorie de diffusion

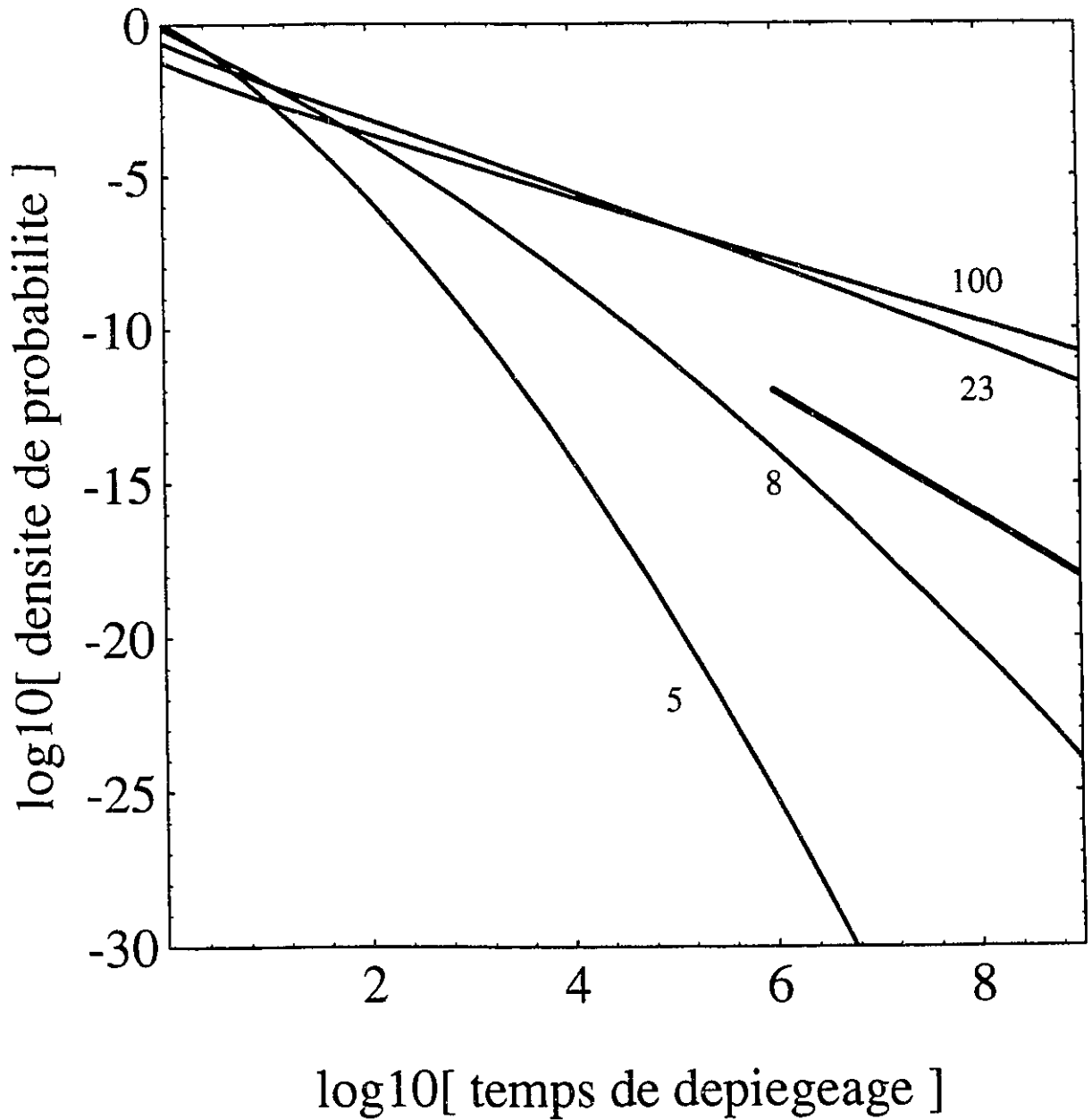


Figure 3.3- Densité de probabilité $P(\tau_d)$ vs temps de dépiégeage τ_d pour des valeurs de Λ égales à 5, 8, 23 et 100 (de bas en haut sur la figure). La droite tracée sur la figure a une pente de -2 (correspondant à une valeur de $\mu=1$; on obtient des régimes transitoires pour la vitesse et la diffusion quand $\mu < 1$).

anormale, un processus de piégeage, avec une distribution de temps de dépiégeage ayant une queue avec une décroissance comme celle donnée par l'équation (37), mène à des phénomènes de transport anormaux où la position moyenne $\langle x(t) \rangle$ et la variance $\langle \Delta x^2(t) \rangle$ (de la bande électrophorétique) suivent des lois de puissance (voir aussi les équations 6-8) [13,14]:

$$\langle x(t) \rangle \propto t^1; \quad \langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t^1 \quad \text{si } \mu > 2 \quad (42)$$

$$\langle x(t) \rangle \propto t^1; \quad \langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t^{2\mu} \quad \text{si } 2 > \mu > 1 \quad (43)$$

$$\langle x(t) \rangle \propto t^\mu; \quad \langle \Delta x^2(t) \rangle \propto t^{2\mu} \quad \text{si } 1 > \mu > 0 \quad (44)$$

La raison de ce comportement anormal est simple: quand la distribution de temps de dépiégeage décroît lentement, la particule tombe souvent dans un piège pour lequel le temps de dépiégeage est plus long que le temps total depuis le début de la migration. Dans ce cas, c'est le dernier piège qui domine la dynamique du système et la position moyenne ainsi que la dispersion de la bande sont directement reliées à la forme exacte de la queue de la distribution. Par exemple, nous pouvons montrer (voir chapitre 2) que dans le régime où $1 > \mu > 0$, la position moyenne est grossièrement donnée par:

$$\langle x(t) \rangle \propto \left[\int_0^{\infty} P(\tau_d) d\tau_d \right]^{-1} \quad (45)$$

Pour une décroissance de type loi de puissance (voir équation (37)), ceci se réduit à l'équation (44) si $0 < \mu < 1$. La figure 3.4 montre comment $\langle x(t) \rangle$ augmente avec le temps quand les équations (36) et (45) sont résolues numériquement pour $\Lambda=23$. Pour une situation normale, on devrait obtenir une droite dont la pente est égale à 1. Ici, nous trouvons plutôt une région où la

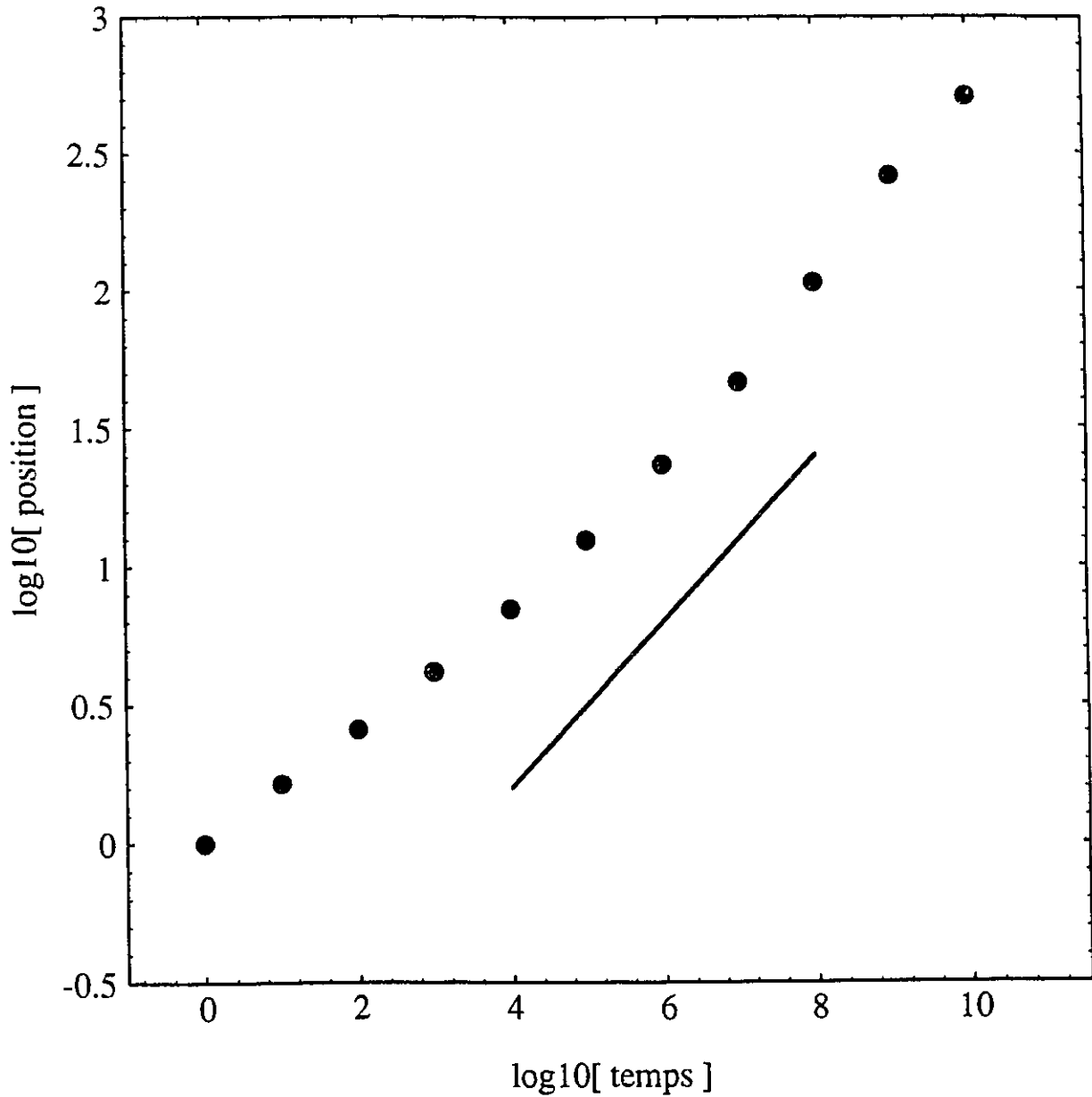


Figure 3.4- Position moyenne $\langle x(t) \rangle$ vs temps t pour le cas où $\Lambda=23$ ($N=30$ et $\varepsilon=0.05$ comme au chapitre 2). La pente de la droite tracée est égale à environ 0.30. La distance et les temps sont en unités arbitraires (on s'intéresse seulement aux lois de puissance).

position moyenne augmente comme $\langle x(t) \rangle \propto t^{0.3}$. Une droite de pente 1 (l'état stationnaire) est éventuellement obtenue, mais comme expliqué plus tôt, l'approximation gaussienne n'est pas fiable dans cette région, car elle donne trop d'importance aux temps de dépiégeage les plus longs de la queue de la fonction distribution.

Ces résultats théoriques sont en bon accord qualitatif avec les résultats des simulations présentés dans le chapitre 2, si nous considérons la panoplie d'approximations que nous avons dû faire pour obtenir les résultats analytiques. Nous avons observé dans le chapitre 2 un régime transitoire en accord avec l'équation (44) avec $\mu=0.65$, et un temps de $10^{10} \times \tau_B (N=30)$ était requis pour atteindre l'état stationnaire après quoi, les effets anomaux disparaissaient. À la figure 3.4, on voit que notre approche théorique prédit elle aussi des effets anomaux, par exemple, elle nous donne pour $\Lambda=23$, un exposant $\mu=0.3$.

En conclusion, le processus inusité de piégeage du complexe S-ADN mène à des propriétés de transport fortement anormales dans la limite où la vitesse devient fortement dépendante de la taille moléculaire. Ces régimes anomaux durent pendant de très longues périodes de temps et sont caractérisés par une vitesse lente et une forte dispersion, donc, en pratique, à une perte de résolution. Ces effets rendent l'électrophorèse de piégeage en champ électrique constant inutile pour accroître les performances d'un système de séquençage de l'ADN. Pour obtenir des résultats utiles, on doit réduire l'importance du piégeage, comme suggéré par UDG. Une approche simple consiste à utiliser des champs électriques pulsés, ce qui aura pour effet d'accélérer le dépiégeage. Il doit être mentionné que les effets anomaux resteront importants si des temps de pulse très longs sont utilisés: nous étudierons ceci dans le prochain chapitre.

3.10 Discussion

Nous avons dérivé un modèle analytique, pour l'électrophorèse sur gel du complexe S-ADN, qui donne des prédictions détaillées concernant l'état stationnaire ainsi que la présence de régimes transitoires de longue durée. Le modèle est correct dans la limite où $\epsilon \rightarrow 0$, et donne un croisement entre fort/faible piégeage pour $N^* = \epsilon^{-2/3}$, tout comme le modèle de DV [9]. Néanmoins, la décroissance prédite de la vitesse avec N est beaucoup plus rapide que les prédictions de DV pour l'état stationnaire où $\Lambda \gg 1$. Les résultats de simulations (SV et chapitre 2) sont en bon accord avec toutes les prédictions faites dans ce chapitre. Un accord qualitatif avec les résultats expérimentaux est aussi notable: par exemple, des cas où $\langle x(t) \rangle$ et $\langle \Delta x^2(t) \rangle$ ne sont pas proportionnels à t^1 ont pu être observés au cours d'expériences préliminaires (Drouin, non publié). Nous discuterons dans le prochain chapitre de simulations numériques de ce système en utilisant des champs pulsés. Finalement, nous notons aussi qu'un piégeage et des effets anomaux similaires peuvent être obtenus durant l'électrophorèse de particules sphériques dans un gel (Hong Guo, non publié).

Chapitre 4

Dynamique moléculaire en champs pulsés³

4.1 Introduction

Inspirés par UDG [6], nous nous intéressons maintenant à la dynamique en champs électriques pulsés. On veut comprendre ici ce qui va se passer si on inverse périodiquement le champ électrique. On montre, sur la figure 4.1, le type de pulses que nous allons utiliser.

Supposons qu'une molécule est piégée à la fin d'un pulse avant (plus long). On inverse ensuite le champ électrique et la molécule va tenter de sortir de son piège. Si la molécule sort totalement de ce tube avant la fin du pulse inverse, elle sera alors libre. On dit alors qu'elle a été dépiégée électriquement. Si, par contre, elle ne sort pas totalement du piège: i) elle sera contrainte par le pulse avant de retourner dans le piège ou, ii) elle sortira de ce piège par un dépiégeage thermique supplémentaire.

Les deux types de dépiégeage (thermique et électrique) sont très différents. De plus, il existe, en champs pulsés, deux types de piégeage. Une molécule peut être piégée par rapport au

³Les résultats de ce chapitre seront soumis pour publication dans les semaines qui suivent.

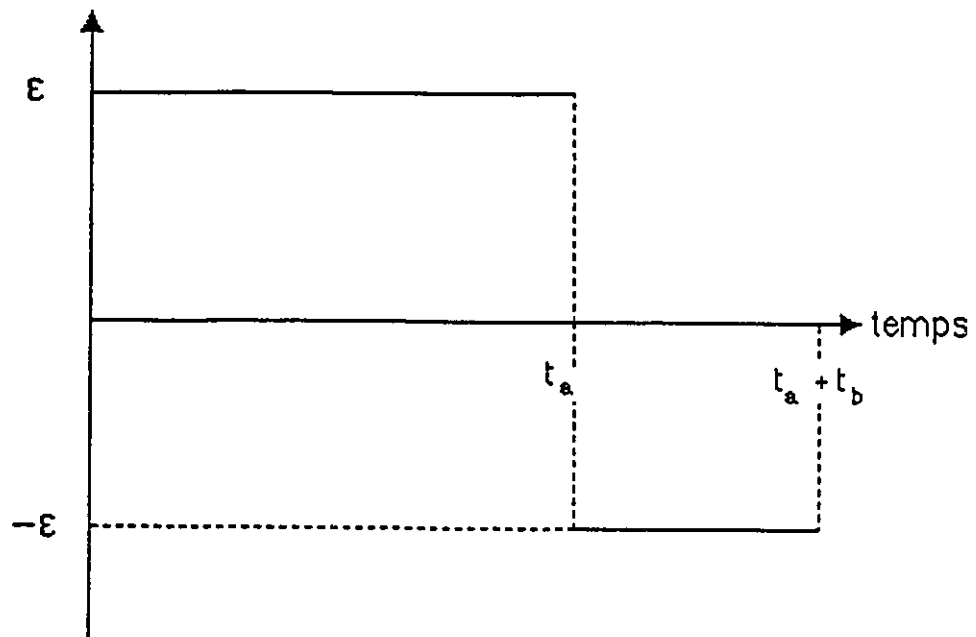


Figure 4.1- Champ électrique réduit vs temps t . Le champ électrique réduit est donné par ϵ pendant un temps t_a pour ensuite prendre une valeur de $-\epsilon$ pendant un temps t_b .

champ avant (ϵ) ou par rapport au champ inversé ($-\epsilon$). Ces deux types de piégeage auront des effets très différents sur la dynamique du système.

4.2 Expériences de UDG

UDG [6] ont étudié expérimentalement l'électrophorèse de piégeage en champs pulsés. Ils ont pu mesurer comment évolue la mobilité (ou, en d'autres mots, la vitesse) en fonction de la taille moléculaire. Tout comme pour l'électrophorèse de piégeage en champ constant, ils ont observé deux régimes que nous désignerons par les expressions "piégeage faible" ($V(M) \propto 1/M$) et "piégeage fort" ($V(M)$ descend plus vite que $1/M$) (figure 4.2).

Ils ont également constaté que la masse critique indiquant la transition entre ces deux régimes était supérieure (à celle obtenue en champ constant) quand ils utilisaient des champs pulsés.

En plus des expériences de UDG, un modèle analytique a été proposé par DV [19,20]. Nous tenterons dans la prochaine section de souligner quelques-uns des points importants de ce modèle.

4.3 Le modèle analytique de DV

Le modèle analytique de DV réussit à expliquer des effets similaires à ceux observés par UDG. Ce modèle analytique démontre comment les relations entre les différents temps caractéristiques (i.e., la durée du pulse avant t_a , la durée du pulse inverse t_b , le temps requis pour entrer dans un piège τ_0 , le temps de dépiégeage thermique τ_d et le temps de dépiégeage électrique

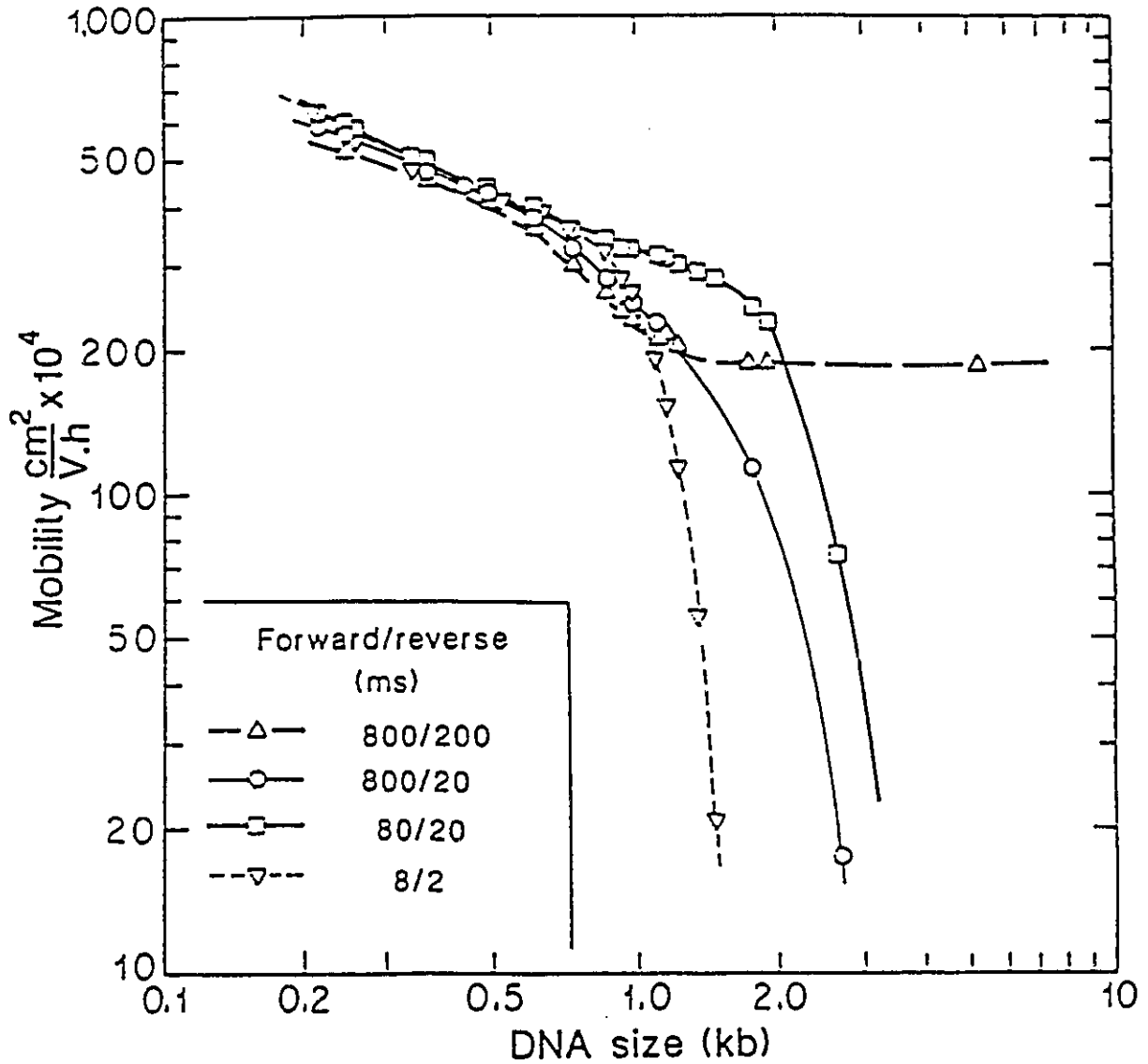


Figure 4.2- Résultats expérimentaux de UDG pour la mobilité vs la taille moléculaire. Quatre types de pulses et 2 rapports t_f/t_r ont été utilisés.

τ_e) mènent à une grande variété de régimes. Il faut noter que les trois derniers temps caractéristiques dépendent de la taille moléculaire.

Malheureusement, ce modèle analytique ne permet pas de tirer des conclusions sur le coefficient de diffusion. De plus, le modèle analytique de DV est un modèle très complexe qui tient compte de l'étirement intra-tube de l'ADN (que nous négligeons ici): c'est pourquoi nous nous contenterons d'en donner les conclusions pertinentes plus loin, i.e. lorsque celles-ci seront nécessaires à une bonne compréhension de la physique.

Dans le reste de ce chapitre, nous tenterons de démontrer comment nos simulations, basées elles-aussi sur le modèle de reptation biaisée, font le pont entre les expériences de UDG et le modèle analytique de DV.

Nous pourrons aussi tirer certaines conclusions sur l'influence des champs pulsés sur le coefficient de diffusion, ce que ni UDG ni DV ne pouvaient faire.

4.4 Effet du temps de pulse inverse t_b

Dans un premier temps, nous étudierons ce qui se passe quand, en gardant le rapport $t_e/t_b=4$ (le rapport utilisé dans la plupart des expériences de UDG), on augmente la valeur de la durée du pulse inverse t_b (et conséquemment de t_e). On étudiera le système en utilisant des valeurs de t_b comprises entre 5 et 10^6 , une masse moléculaire $N=30$, un champ électrique de $\epsilon=0.05$, et enfin un gel dont la fraction de petits pores est $f=0.001$ (la même qu'au chapitre 2, pour pouvoir comparer).

La figure 4.3 montre comment varie la vitesse terminale (dans l'état stationnaire) V_{ss} avec t_b . On observe un plateau pour des valeurs de t_b inférieures à 10^3 . Ce plateau correspond à un

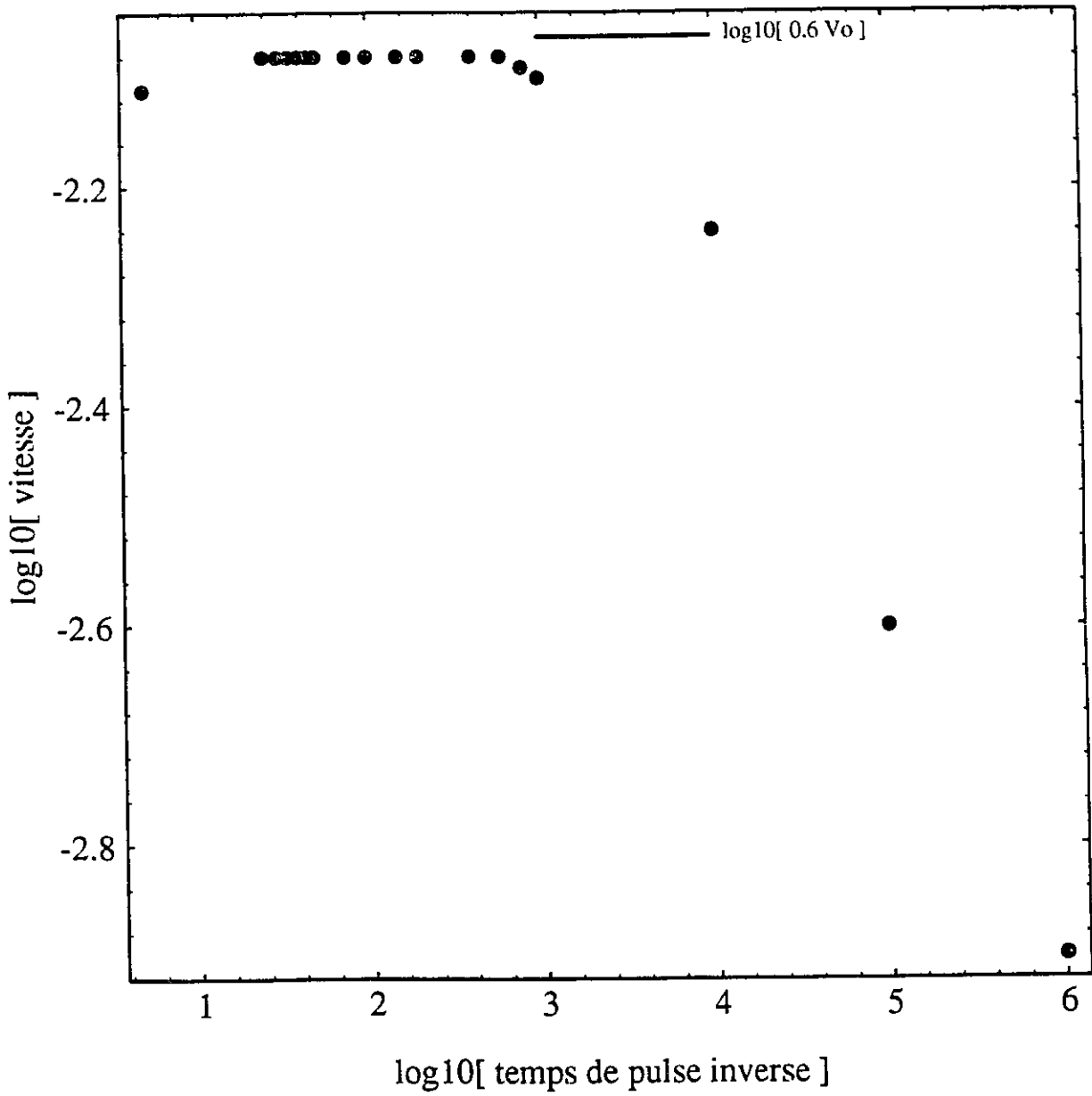


Figure 4.3- Vitesse V_s vs temps de pulse inverse t_b pour $N=30$, $\varepsilon=0.05$ et $f=0.001$, obtenu à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et la vitesse en unités de $a/\tau_b(N=30)$.

piégeage faible où la molécule avance à une vitesse V_0 (la vitesse entre les pièges) pendant un temps t_a , pour ensuite reculer avec une vitesse V_0 pendant un temps t_b . La vitesse nette de la molécule est alors donnée par:

$$V = V_0 \times \frac{(t_a - t_b)}{(t_a + t_b)} = 0.6 V_0 \quad (46)$$

L'équation (46) était une des prédictions du modèle analytique de DV [19].

On observe ensuite une diminution de la vitesse lorsque le temps de recul augmente. Cette diminution est causée par le piégeage. Plus le temps d'avance est grand, plus les molécules ont de chances de rencontrer un piège; et plus elles rencontrent de pièges, plus elles ont de chance de tomber dans un piège profond.

La figure 4.4 montre le comportement du coefficient de diffusion D_{ss} . Pour de faibles valeurs de t_b , on observe une diminution de D_{ss} . Cette diminution peut être expliquée ainsi: quand t_b augmente, le dépiégeage électrique devient plus important et le piégeage affecte moins D_{ss} . De plus, dans la limite où $t_b \rightarrow 0$, la molécule subit un champ électrique "moyen" égal à $\epsilon(t_a - t_b) / (t_a + t_b) = 0.6\epsilon$; on se retrouve alors effectivement dans le cas de l'électrophorèse en champ constant.

Pour des valeurs de $t_b \approx 60$, on a un minimum qui correspond approximativement à la valeur du coefficient de diffusion en l'absence de piégeage D_0 . Le piégeage est donc très faible pour un tel pulse. Pour des temps de recul t_b plus longs, on observe une augmentation du coefficient de diffusion. Cette augmentation est due à l'augmentation du temps d'avance t_a . En effet, quand t_a est long, toutes les molécules ont le temps de rencontrer un piège et nous avons une situation qui se rapproche de l'électrophorèse en champ constant. Le coefficient de diffusion

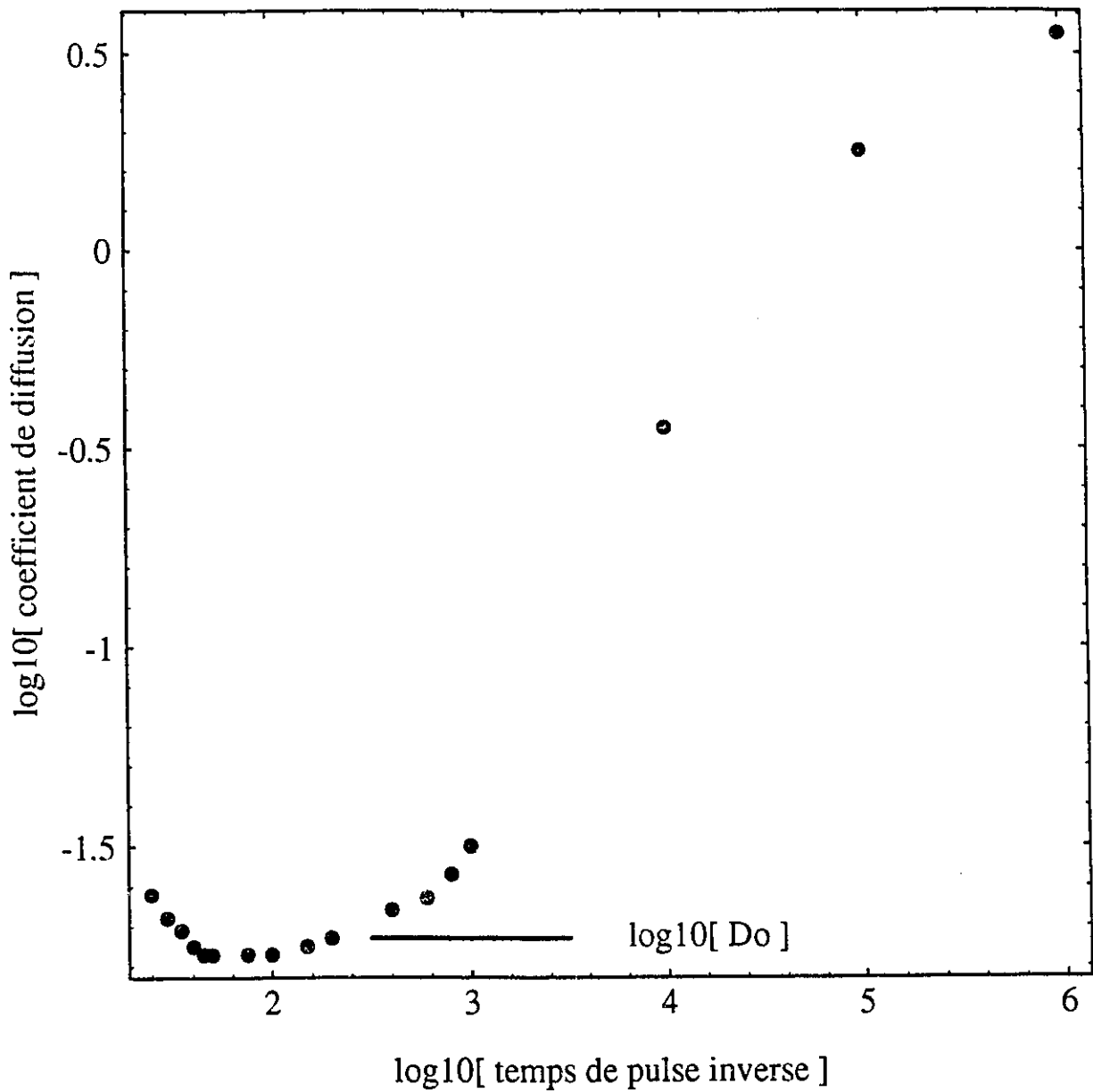


Figure 4.4- Coefficient de diffusion D_{**} vs temps de pulse inverse t_b pour $N=30$, $\epsilon=0.05$ et $f=0.001$, obtenu à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_B(N=30)$ et le coefficient de diffusion en unités de $a^2/\tau_B(N=30)$.

augmente moins rapidement pour de très longs temps t_a ; en fait, pour des temps extrêmement longs (assez longs pour atteindre l'état stationnaire à l'avance comme au recul, $t_a > t_b > t_{ss}$), la bande s'élargira de la même façon pendant le pulse avant et le pulse arrière, et nous aurons donc un plateau:

$$\lim_{t_b \rightarrow \infty} D_{ss, \text{champs pulsés}} = D_{ss, \text{champ constant}} \quad (47)$$

Dans la prochaine section, nous étudierons ce qui se passe quand on fait varier t_a en gardant t_b constant. Nous choisirons alors une valeur de $t_b=45$, soit la valeur pour laquelle nous avons la meilleure séparation, i.e. le plus petit rapport largeur/position ($D_{ss}^{1/2}/V_{ss}$, relié au nombre de plaques théoriques tel que défini en chromatographie, résultats non montrés).

4.5 Effet du temps d'avance t_a

Le choix de t_a est une opération délicate. En effet, t_a doit être suffisamment long pour permettre aux molécules de progresser et suffisamment court pour ne pas se retrouver dans la même situation de fort piégeage que lorsque nous avons des champs constants.

En utilisant $t_b=45$ (pour les raisons décrites dans la dernière section) et les mêmes paramètres de pulse ($N=30$, $\epsilon=0.05$, $f=0.001$) que précédemment, nous étudierons l'effet du temps d'avance t_a sur la vitesse et sur le coefficient de diffusion.

À la figure 4.5, on étudie comment varie la vitesse V_{ss} en fonction de t_a . On y observe un maximum pour $t_a \approx 1000$. Pour des temps d'avance inférieurs à 1000, on note qu'une chute énorme de la vitesse a lieu quand on diminue t_a (rappelons que t_b est fixe ici). Cette descente est facile à expliquer: plus le temps d'avance est court, moins la molécule avance. En effet, pour un

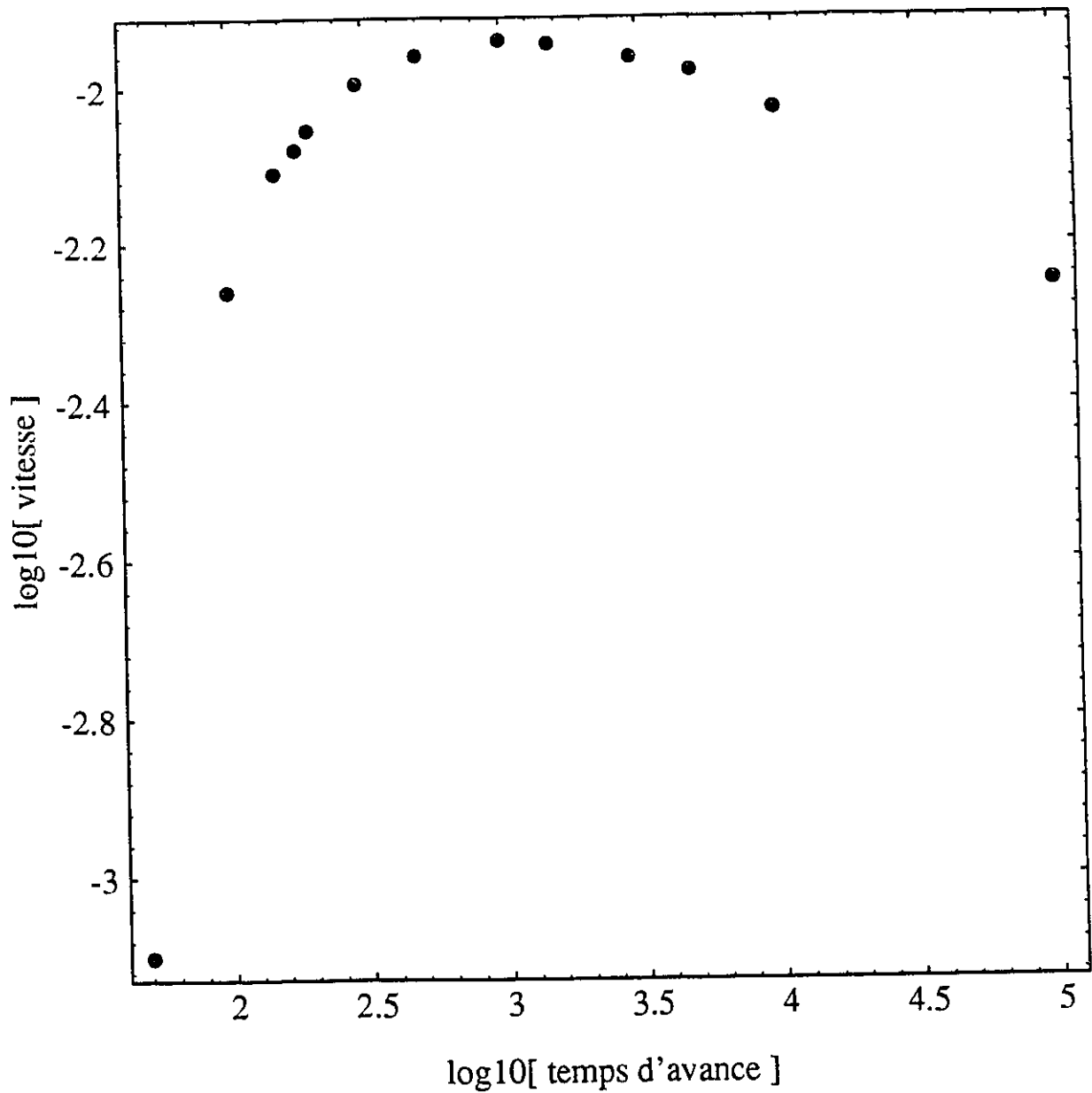


Figure 4.5- Vitesse V_{ss} vs temps d'avance t_a pour $N=30$, $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$ et $t_b=45$, obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et la vitesse en unités de $a/\tau_b(N=30)$.

temps d'avance très court, ce qui implique en général que le piégeage n'est pas dominant, la vitesse est donnée par l'équation (46). La vitesse s'annule donc lorsque $t_a = t_b = 45$.

Pour des temps supérieurs à 1000, on observe aussi une diminution de la vitesse. Cette diminution est due au piégeage. Plus le temps d'avance est long, plus le piégeage est important, et plus la vitesse est faible. Cette diminution est asymptotique, et nous obtiendrons la vitesse en champ constant ($V_{ss} \sim 10^{-3}$) pour un temps d'avance très grand (i.e. $t_a > t_{ss} > t_b$).

En traçant $V_{ss}(t_a + t_b)/(t_a - t_b)$ en fonction du temps d'avance t_a , on est en mesure d'éliminer graphiquement les effets de pulse qui ne sont pas dus au piégeage. On observe alors (figure 4.6) que plus t_a est grand, plus le piégeage est important.

Voyons maintenant ce qu'il advient du coefficient de diffusion quand on fait varier t_a . La figure 4.7 montre que plus t_a est grand, plus le coefficient de diffusion est élevé. Ceci est dû au piégeage important quand t_a augmente. Ici aussi nous aurons, dans la limite asymptotique où $t_a \rightarrow \infty$, la valeur en champ constant de D_{ss} ($D_{ss} \sim 10^{1.68}$, voir chapitre 2).

Nous allons étudier, dans la prochaine section, ce qui se passe quand, pour un temps de pulse donné, on fait varier la taille moléculaire N . Nous avons décidé d'utiliser un temps de pulse qui minimise le rapport largeur/position ($D_{ss}^{1/2}/V_{ss}$) de la bande pour $N=30$. Ce minimum est obtenu pour $t_a=300$ lorsque $t_b=45$. Donc, dans la prochaine section, nous utiliserons les paramètres de pulse suivants: $t_a=300$ et $t_b=45$.

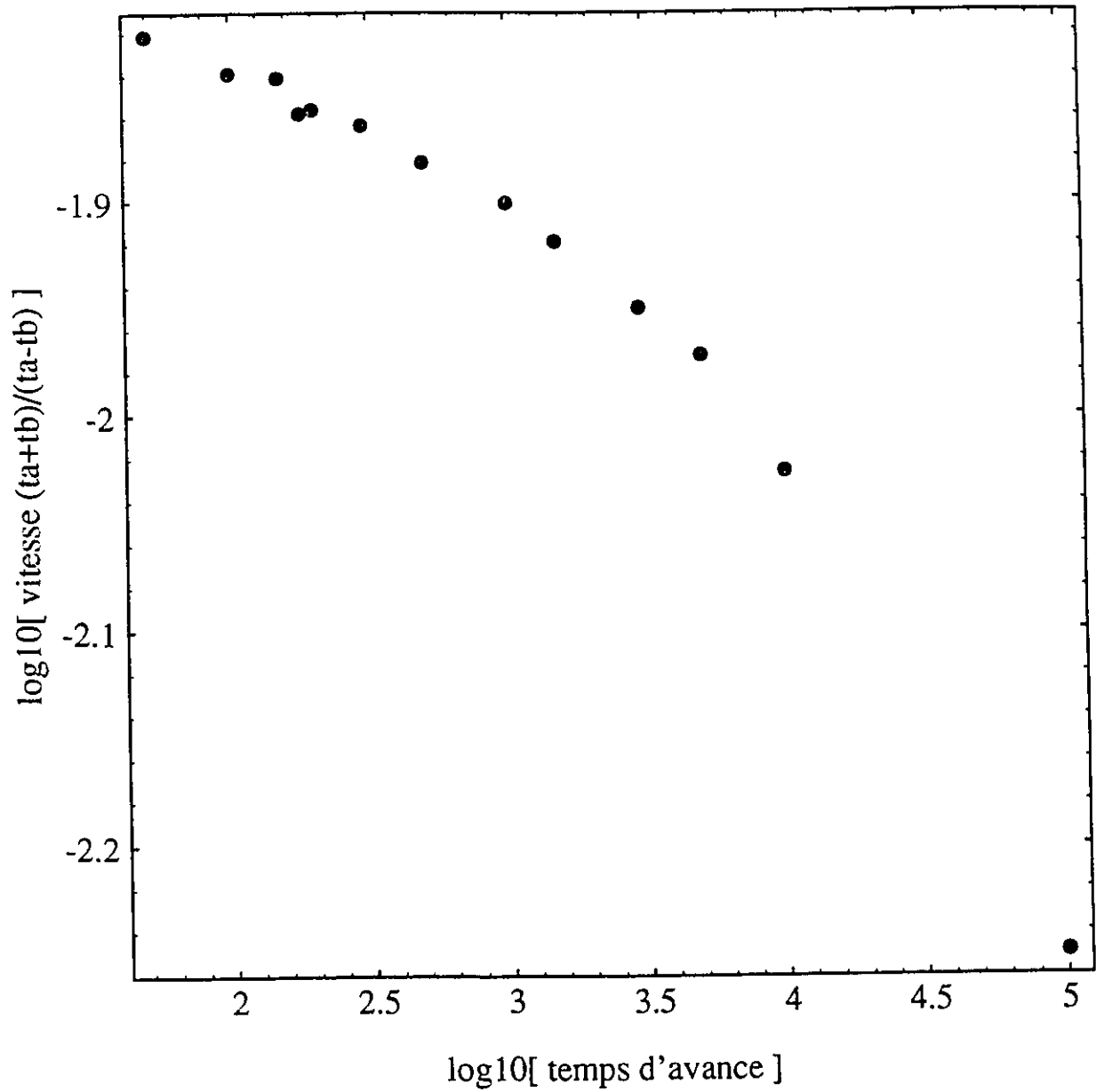


Figure 4.6- Vitesse normalisée $V_{ss}[(t_a+t_b)/(t_a-t_b)]$ vs temps d'avance t_a pour $N=30$, $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$ et $t_b=45$, obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et la vitesse en unités de $a/\tau_b(N=30)$.

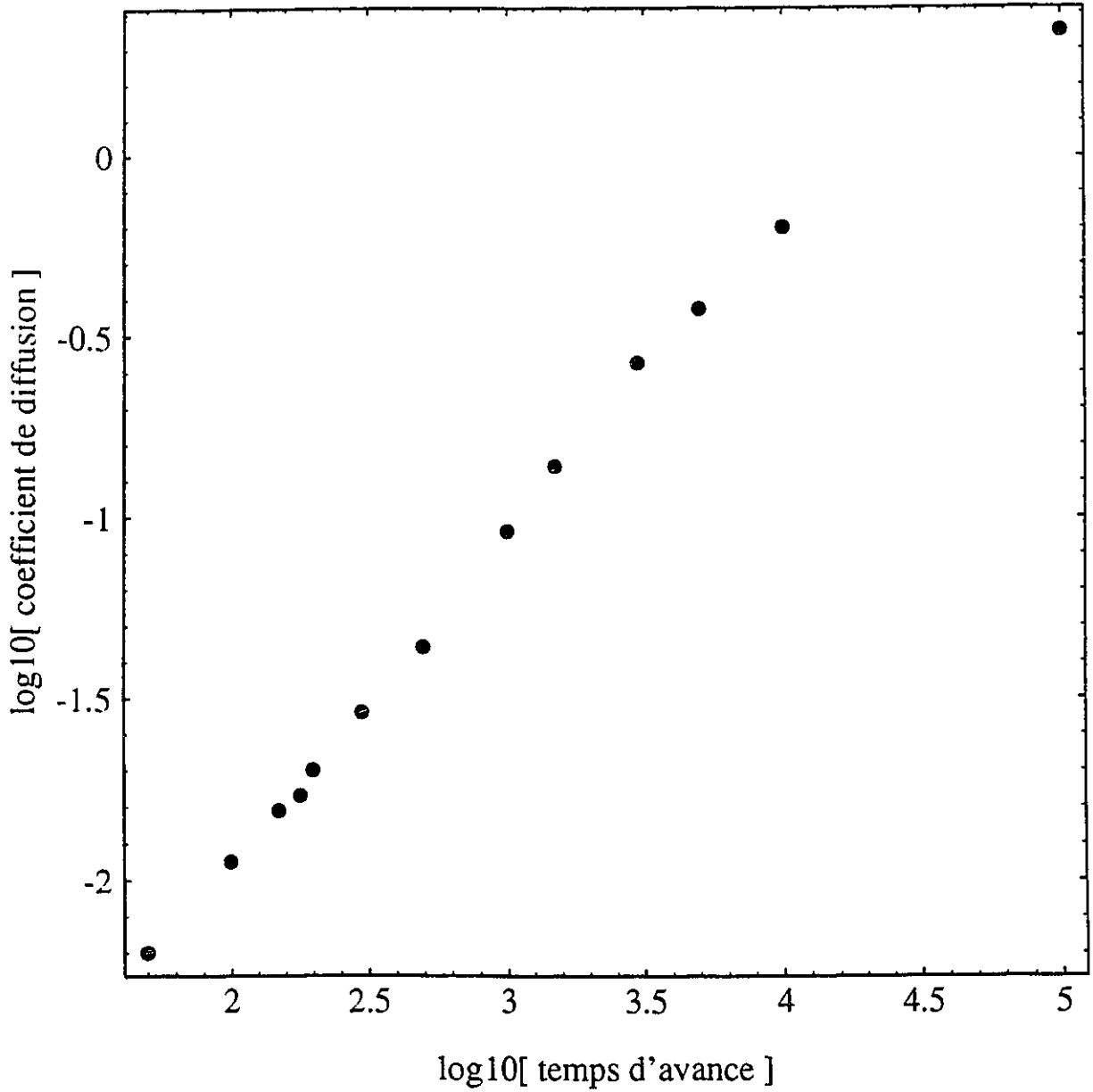


Figure 4.7- Constante de diffusion D_s vs temps d'avance t_a pour $N=30$, $\epsilon=0.05$, $f=0.001$ et $t_b=45$, obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_B(N=30)$ et la constante de diffusion en unités de $a^2/\tau_B(N=30)$.

4.6 Étude en fonction de N: pulses courts

4.6.1 Effets transitoires

Examinons premièrement comment une petite molécule ($N < 30$) atteint l'état stationnaire. Pour ce faire, nous étudierons l'évolution temporelle des rapports vitesse $\langle x(t) \rangle / t$ et diffusion $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$. La figure 4.8 montre comment évolue le rapport vitesse avec le temps pour une molécule $N=10$. On observe un quasi-plateau pour des temps courts ($t \leq t_a = 300$): ceci correspond à la vitesse V_0 obtenu en l'absence de pièges (les molécules n'ont pas encore eu le temps de rencontrer de pièges). La chute subite observée pour $t = t_a$ est expliquée par l'inversion du champ, alors que les molécules se mettent subitement à "reculer". On observe pour des temps longs un plateau qui correspond à la vitesse à l'état stationnaire $V_{ss} \approx 10^{-1.53}$. Il est intéressant de noter que cette vitesse est obtenue essentiellement après un unique pulse! Ceci semble indiquer que le piégeage est très faible pour une si petite molécule (car peu d'effets transitoires sont observés). La figure 4.8 montre aussi l'évolution du rapport $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ en fonction du temps. Les mêmes commentaires que pour la vitesse s'imposent. L'état stationnaire est obtenu après seulement un pulse, et $D_{ss} \approx 10^{-1.28}$.

Voyons maintenant ce qui se passe pour une grosse molécule ($N > 30$). La figure 4.9 montre comment évolue le rapport $\langle x(t) \rangle / t$ avec le temps pour une molécule de taille $N=40$. On observe un quasi-plateau pour des temps courts ($t \leq t_a$). Ce quasi-plateau correspond à la vitesse V_0 obtenue en l'absence de pièges. On observe ensuite une série de chutes et de montées rapides correspondant aux différentes inversions de champs. Pour de grands temps $t > 10^{5.5}$, on observe un plateau correspondant à la vitesse à l'état stationnaire $V_{ss} \approx 10^{-2.2}$. Il est à noter que l'état

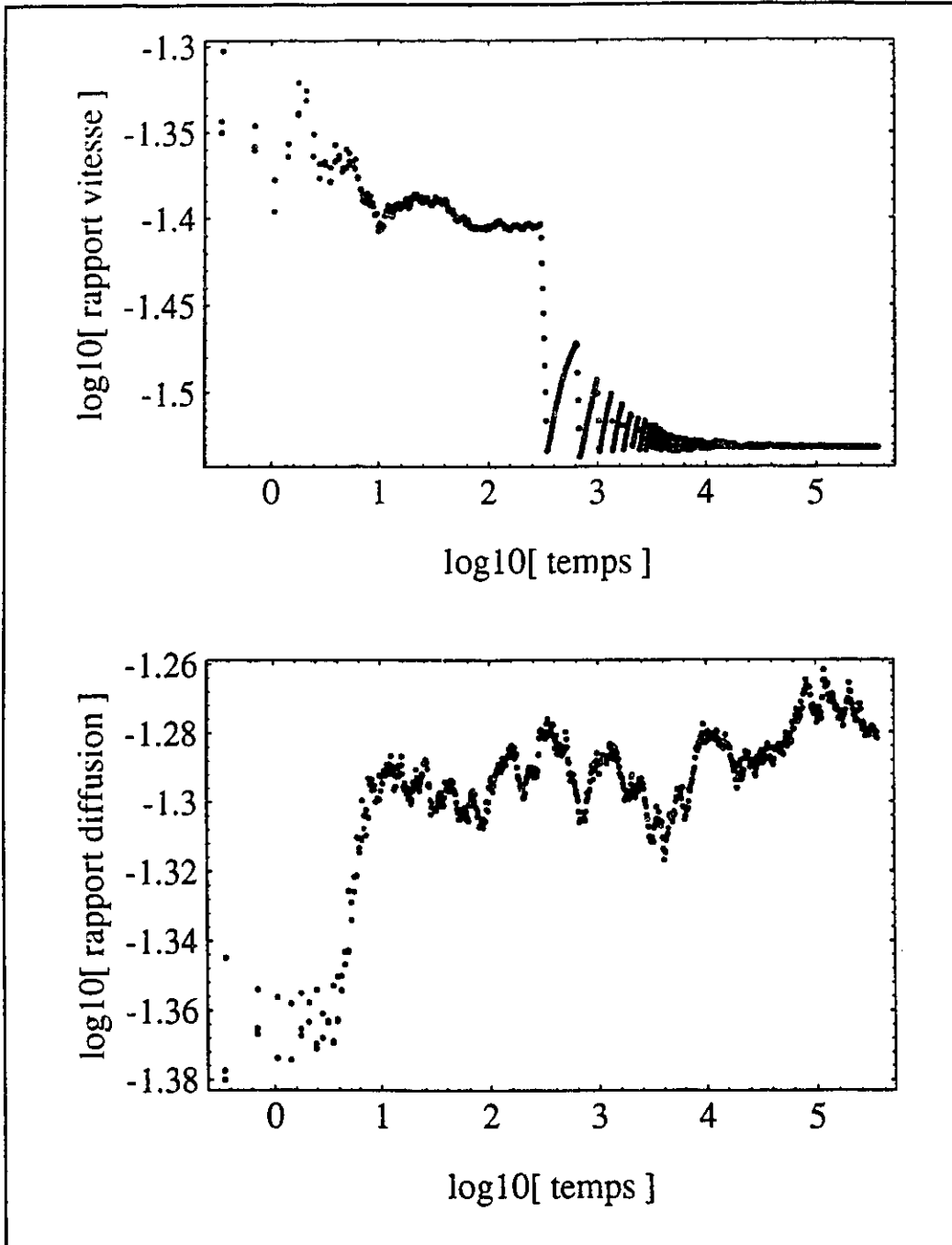


Figure 4.8- Rapport vitesse $\langle x(t) \rangle / t$ vs temps t pour $\epsilon=0.05$, $f=0.001$, $N=10$, $t_a=300$ et $t_b=45$, obtenu par des simulations (en haut). Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et le rapport vitesse en unités de $a/\tau_b(N=30)$. Rapport diffusion $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ vs temps t où le rapport diffusion est en unités de $a^2/\tau_b(N=30)$ (en bas).

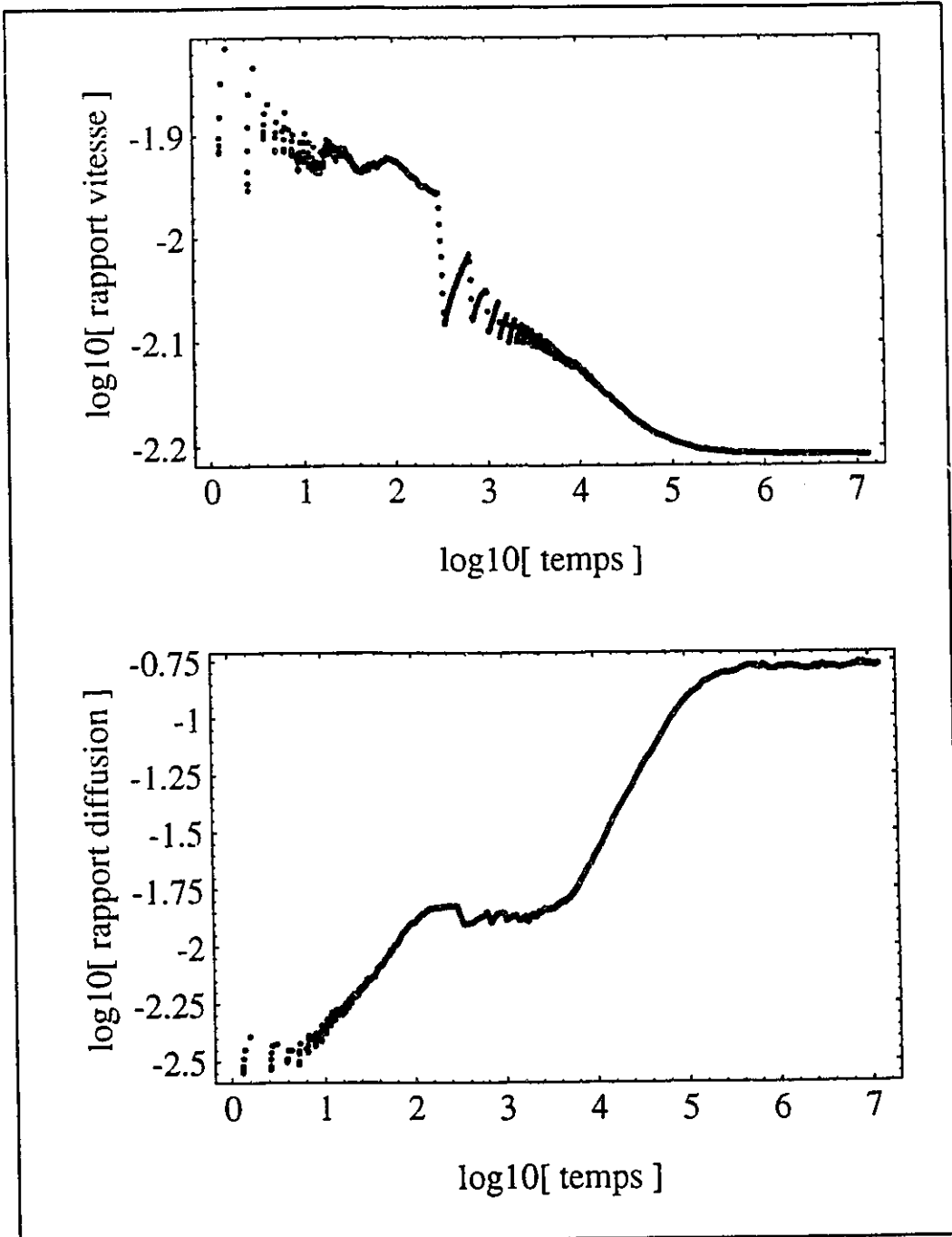


Figure 4.9- Rapport vitesse $\langle x(t) \rangle / t$ vs temps t pour $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$, $N=40$, $t_x=300$ et $t_b=45$, obtenu par des simulations (en haut). Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et le rapport vitesse en unités de $a/\tau_b(N=30)$. Rapport diffusion $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ vs temps t où le rapport diffusion est en unités de $a^2/\tau_b(N=30)$ (en bas).

stationnaire n'est pas obtenu après un seul pulse comme pour les petites molécules. En effet, un régime transitoire de longue durée précède l'état stationnaire.

Voyons maintenant ce qui arrive dans l'évolution du rapport diffusion $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ quand on utilise une grosse molécule. Nous observons, comme pour $\langle x(t) \rangle / t$, un régime transitoire qui précède l'état stationnaire ($D_{ss} \approx 10^{-9.75}$). Nous pouvons donc conclure que plus la molécule est grosse, plus le piégeage et les effets transitoires seront importants.

Il est aussi intéressant de noter que nous observons des effets transitoires qui ressemblent beaucoup à ceux observés en champ constant. C'est-à-dire qu'à première vue, la descente de $\langle x(t) \rangle / t$ et la montée de $\langle \Delta x^2(t) \rangle / 2t$ semblent suivre des lois de puissance, au moins sur un certain intervalle de temps.

Étudions enfin comment évolue le temps nécessaire pour obtenir l'état stationnaire t_{ss} en fonction de la taille moléculaire N . On observe sur la figure 4.10 que t_{ss} est plus ou moins constant pour les petites molécules ($N < 30$) et est de l'ordre du temps d'un pulse. Pour de grandes molécules, toutefois, t_{ss} augmente très rapidement en fonction de N . Ce temps est plus petit qu'en champ continu.

4.6.2 Relations vitesse-masse et diffusion-masse

Même si les effets transitoires sont importants pour de grandes molécules, nous retrouvons toujours un comportement normal de la forme:

$$\langle x(t) \rangle = V_{ss} t \quad (48)$$

pour des temps suffisamment longs. La figure 4.11 montre comment la vitesse (dans l'état

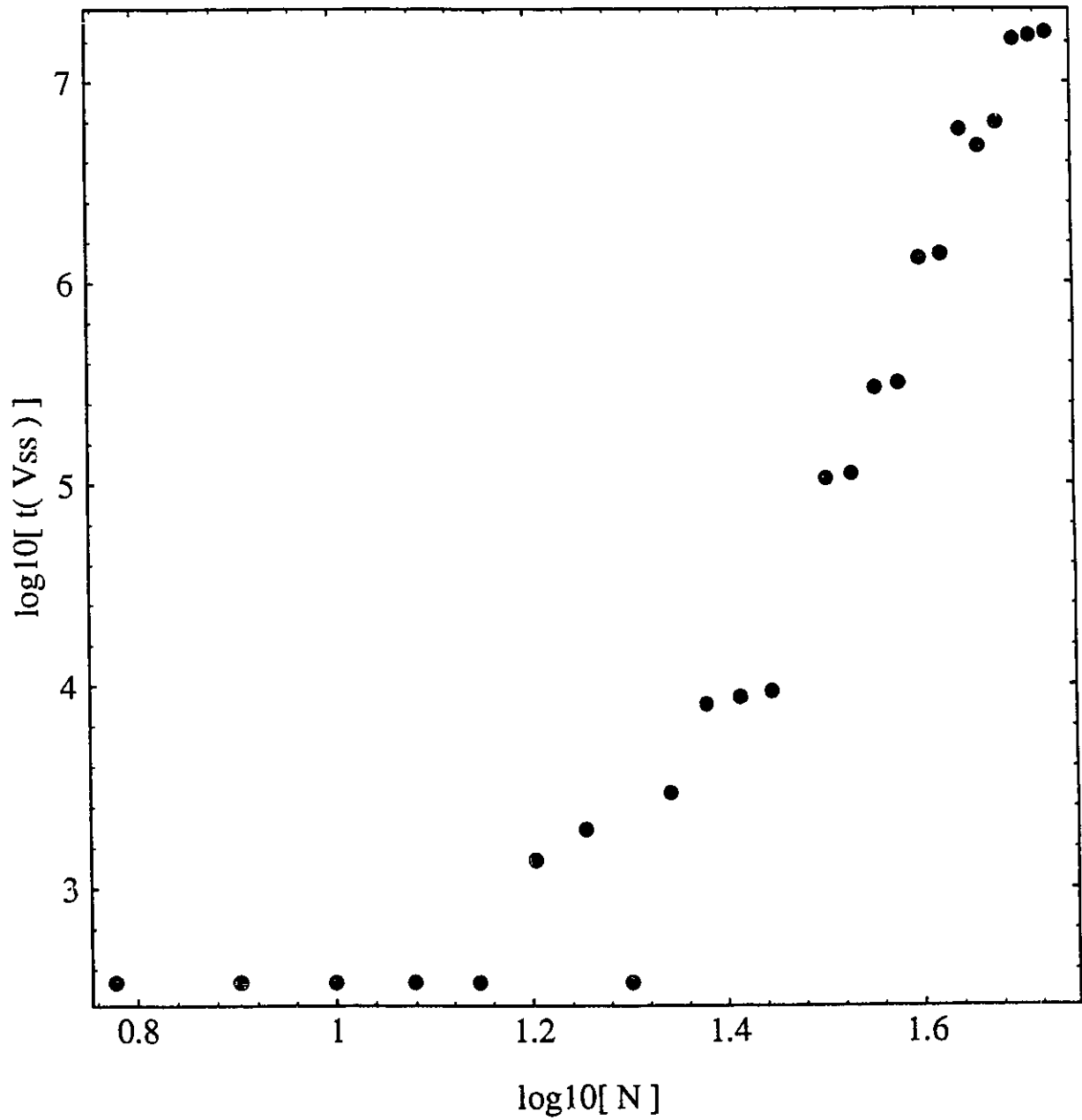


Figure 4.10- Temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire (pour la vitesse) $t(V_{ss})$ vs nombre de segments de reptation N . Le temps est en unités de $\tau_B(N=30)$.

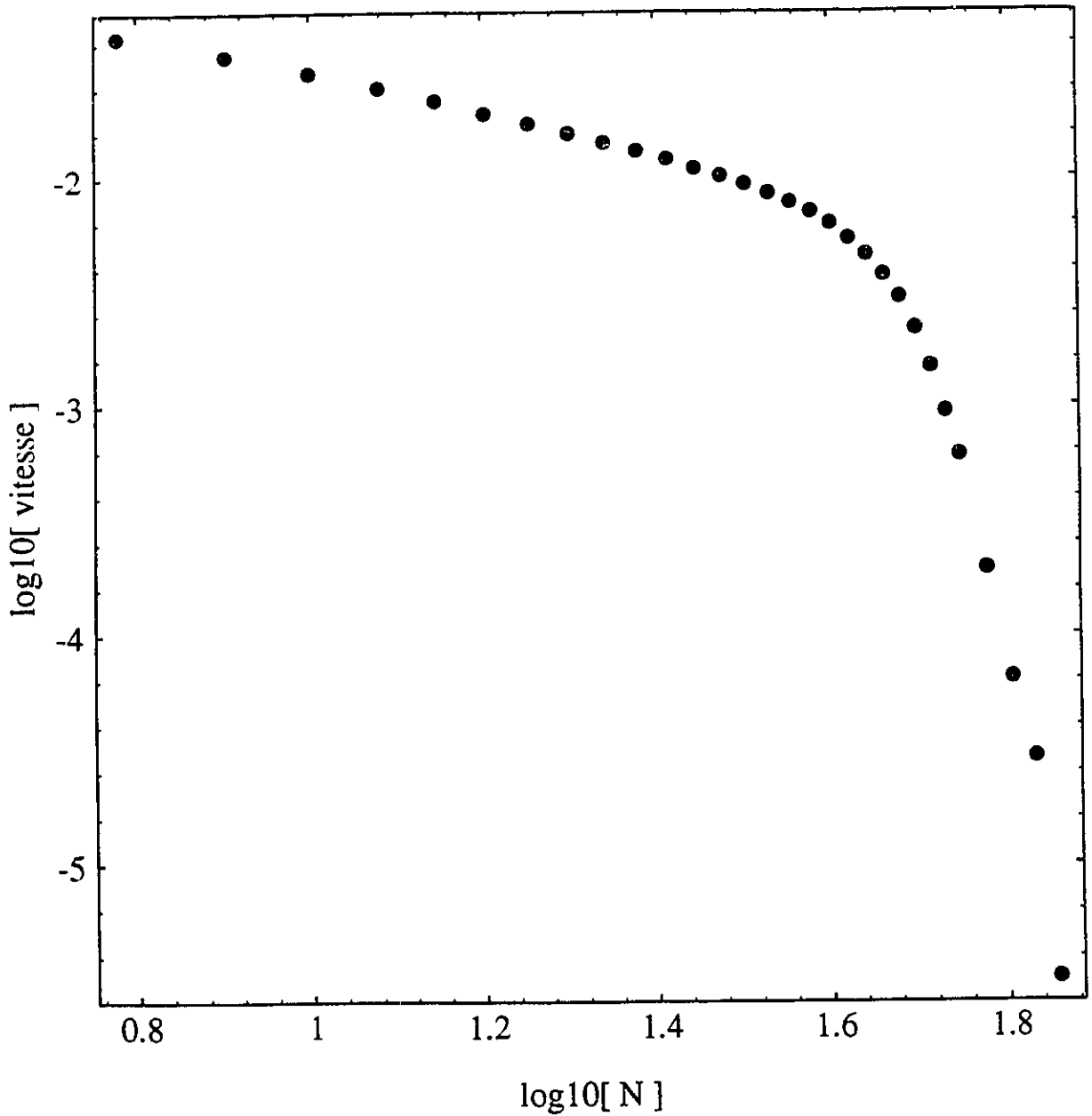


Figure 4.11- Vitesse V_{∞} vs nombre de segments de reptation N pour $\epsilon=0.05$, $f=0.001$, $t_a=300$ et $t_b=45$, obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_B(N=30)$ et la vitesse en unités de $a/\tau_B(N=30)$.

stationnaire) $V_{\infty}(N)$ varie avec la taille moléculaire N . Nous avons utilisé ici $\alpha=1$ (Drouin et Mayer, non publié) pour définir le temps.

Nous observons un comportement semblable à celui observé par SV en champs constant. Pour des petites molécules ($N < 30$), on observe un comportement du type $V(N) \propto 1/N$. On obtient, pour des molécules plus grosses ($N > 30$), une décroissance plus rapide de la vitesse en fonction de la masse. SV avaient observé sensiblement le même comportement, mais dans leur cas, la transition entre les deux régimes était obtenue pour des molécules beaucoup plus petites ($N=20$).

Nous observons sur la figure 4.12, pour le coefficient de diffusion, des résultats qui ressemblent eux aussi à ceux obtenus en champ constant par SV. Pour de petites molécules, on observe une diminution lente, suivie d'une montée rapide pour les grosses molécules. Le minimum est trouvé pour $N=25$. Le minimum qu'obtenait SV en champ constant se situait autour de $N=12$.

On en conclut donc que les champs pulsés ont pour effet d'amoindrir les effets du piégeage et de déplacer les courbes vers les tailles moléculaires plus importantes. Ceci est en accord qualitatif avec les résultats expérimentaux rapportés par UDG [6].

4.7 Étude moyenne sur un pulse court

La prochaine étape de notre étude consiste à étudier ce qui se passe, en moyenne, pendant un seul pulse. Nous présenterons les résultats obtenus pour des molécules de faibles et de fortes tailles ($N=10$ et $N=60$).

La figure 4.13 montre l'évolution, durant le pulse, des paramètres suivants: position moyenne $\langle x \rangle$, vitesse instantanée moyenne $V \equiv d\langle x \rangle / dt$, dispersion $\langle \Delta x^2 \rangle$, coefficient de diffusion

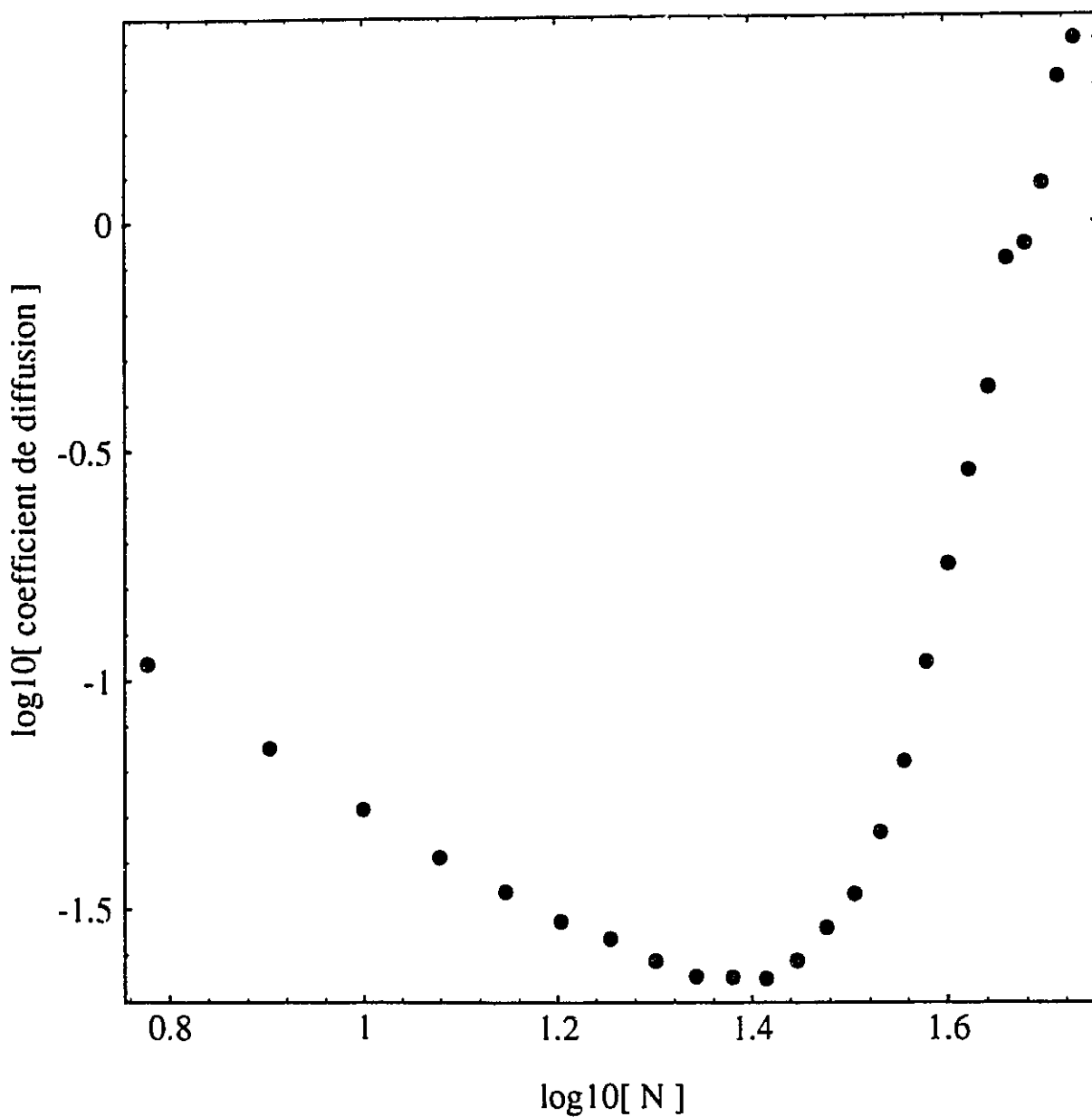


Figure 4.12- Constante de diffusion D_{ss} vs nombre de segments de reptation N pour $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$, $t_s=300$ et $t_b=45$, obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_R(N=30)$ et la constante de diffusion est en unités de $a^2/\tau_R(N=30)$.

N=10

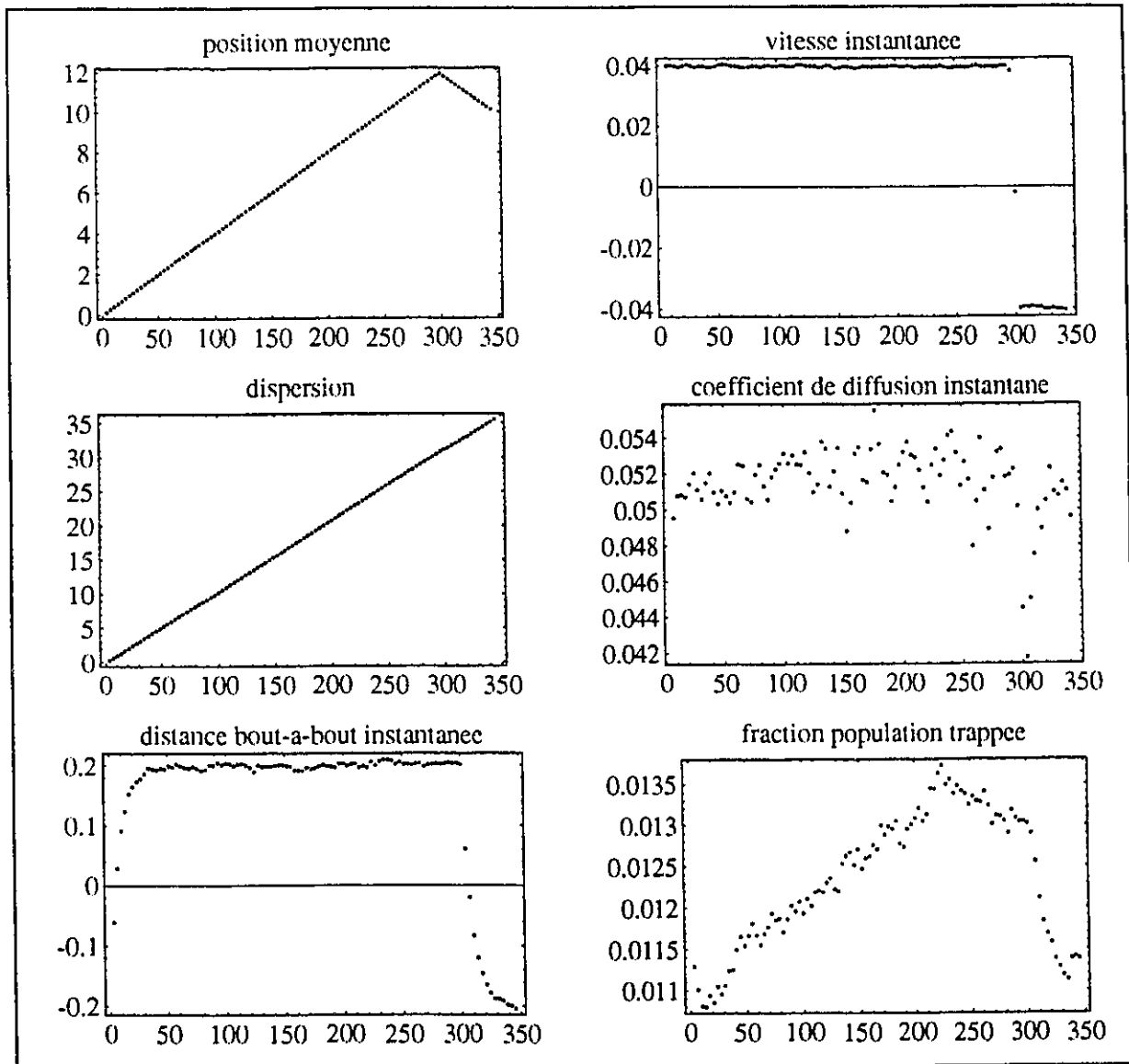


Figure 4.13- Position moyenne $\langle x \rangle$, vitesse instantanée V , dispersion $\langle \Delta x^2 \rangle$, constante de diffusion instantanée D , distance bout-à-bout instantanée h_x et fraction de la population piégée ρ vs temps t pour pour $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$, $t_a=300$, $t_b=45$ et $N=10$. Le temps est en unités de $\tau_b(N=30)$ et les distances sont en unités de a .

instantané $D \equiv d\langle \Delta x^2 \rangle / 2dt$, étirement moyen $\langle h_x \rangle$, et enfin fraction de la population piégée ρ (comprenant les molécules piégées dans les directions avant ou arrière). Nous avons ici une petite molécule de $N=10$ segments. On note que la position moyenne $\langle x \rangle$ a un comportement linéaire; conséquemment, la vitesse V de la molécule est donnée par $V_a = 0.015$ pendant tout le pulse avant et par $V_b \approx -0.015$ pendant tout le pulse de recul. Cette molécule est trop petite pour avoir des effets de piégeage importants et les vitesses V_a et V_b sont approximativement égales aux vitesses obtenues en l'absence de piégeage (V_0 et $-V_0$ respectivement). La vitesse nette V_{ss} est donc donnée par l'équation (46). L'évolution de la largeur de la bande $\langle \Delta x^2 \rangle$ a elle-aussi un comportement linéaire. En effet, en l'absence de piégeage, il n'y a aucune raison d'observer un coefficient de diffusion qui dépendrait de l'orientation du champ électrique. On observe donc une valeur du coefficient de diffusion D qui est pratiquement constante. Pour une petite molécule, le coefficient de diffusion est donc donné par:

$$D \approx D_0 \quad (49)$$

L'étirement moyen $\langle h_x \rangle$ a une valeur approximativement constante de 0.2 pendant le pulse avant. L'étirement décroît ensuite pendant le pulse arrière jusqu'à une valeur de -0.2. Ceci démontre qu'il y a orientation de la molécule dans la direction du champ et que la molécule se "retourne" pendant le pulse arrière (car la streptavidine, non chargée, forme la queue). Enfin, la fraction de la population piégée ρ est très faible. Environ 1% des molécules sont piégées en moyenne. On remarque que ρ est maximale à la fin du pulse avant, ce qui ne surprendra personne.

Voyons maintenant, sur la figure 4.14, comment varient ces mêmes paramètres (soit $\langle x \rangle$, V , $\langle \Delta x^2 \rangle$, D , $\langle h_x \rangle$, et ρ) pour une grosse molécule ($N=60$). On remarque tout de suite que, contrairement aux faibles tailles moléculaires, l'évolution de la position moyenne $\langle x \rangle$ est anormale

N=60

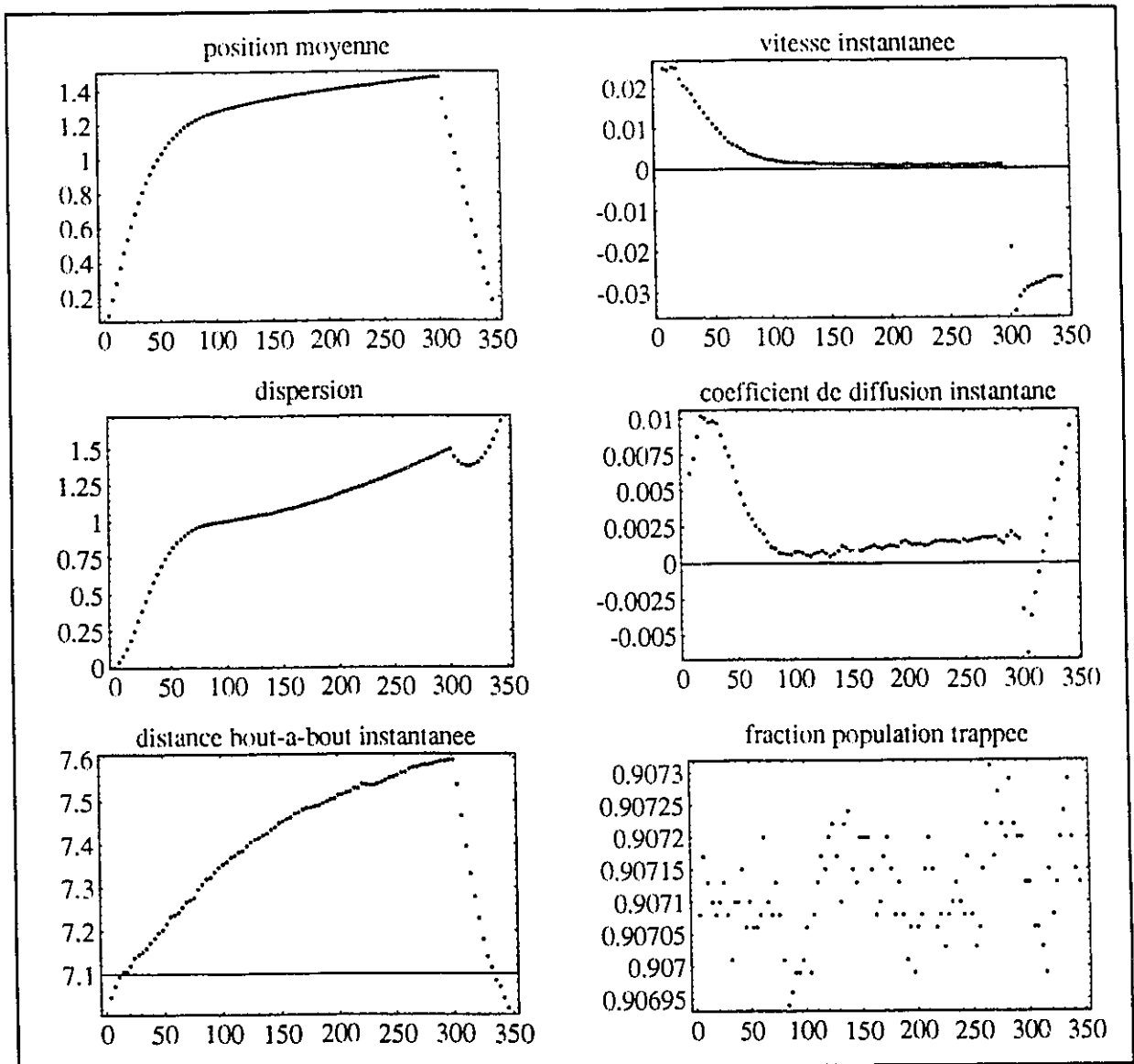


Figure 4.14- Position moyenne $\langle x \rangle$, vitesse instantanée V , dispersion $\langle \Delta x^2 \rangle$, constante de diffusion instantanée D , distance bout-à-bout instantanée h_x et fraction de la population piégée ρ vs temps t pour $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$, $t_a=300$, $t_b=45$ et $N=60$. Le temps est en unités de $\tau_p(N=30)$ et les distances sont en unités de a .

durant chaque pulse. Si on observe l'évolution de V , on remarque que la vitesse moyenne décroît rapidement durant le pulse avant. La dispersion $\langle \Delta x^2 \rangle$ a, elle-aussi, un comportement anormal. L'évolution de la dispersion est très complexe. Il est intéressant de noter qu'il existe une région où la bande se rétracte sur elle-même, ce qui correspond sur le graphique de D vs t à un coefficient de diffusion instantanée négatif! Ceci s'explique comme suit: quand on inverse le champ, une majorité de molécules qui sont piégées vont se mettre à reculer. Ces molécules vont plus ou moins reculer par le même chemin qu'elles avaient emprunté pour pénétrer dans le piège, à cause de l'information qui est conservée dans le tube de reptation. C'est un peu comme si on inversait le sens du temps! Ce phénomène est aussi observé en l'absence de streptavidine [21].

L'étirement moyen $\langle h_x \rangle$ varie entre des valeurs comprises entre 7.0 et 7.6 . La valeur maximale de $\langle h_x \rangle$ est obtenue à la fin du pulse avant. Ceci peut être expliqué ainsi: c'est à la fin du pulse avant que la molécule a le plus de chance d'être piégée: c'est donc à ce temps précis que le nombre de molécules fortement piégées est maximal. Une molécule est fortement piégée si son étirement h_x est grand. Il est donc normal d'obtenir une valeur de $\langle h_x \rangle$ qui est maximale à la fin du pulse avant. Il est intéressant de noter que la valeur de $\langle h_x \rangle$ n'est jamais négative, il n'y a donc pas une majorité de molécules qui ont le temps de se "retourner". Il devient alors évident que la majorité des molécules ne pourront être dépiégées par la simple inversion du champ pendant un temps t_p , même si cette inversion de champ accélère un peu le processus de dépiégeage. La fraction instantanée de la population piégée ρ est élevée: environ 91% des molécules sont piégées. On remarque étonnamment que ρ oscille très peu.

4.8 Étude en fonction de N: pulses longs

Nous avons étudié dans la section 4.5 l'effet qu'a la durée du pulse (en gardant le rapport t_s/t_b constant) sur une molécule de taille donnée ($N=30$). Le but de cette section est de voir globalement ce qui se passe quand on utilise un pulse 4 fois plus long, mais avec le même ratio t_s/t_b que le pulse 300:45 (i.e. un pulse pour lequel $t_s=1200$ et $t_b=180$). Nous comparerons nos résultats à ceux de la section 4.6.2.

La figure 4.15 nous montre la vitesse à l'état stationnaire, V_{ss} , en fonction de la taille N pour le pulse 300:45 (points noirs) et pour le pulse 1200:180 (points gris). Il est clair que le fait d'avoir un pulse plus long repousse la transition entre les régions de faible et de fort piégeage. De $N=40$ pour un pulse court, le croisement est passé à $N=70$ pour un pulse long. Les petites molécules ($N<30$) ne sont pas affectées par la durée des pulses lorsque ceux-ci sont longs. En effet, le piégeage est faible pour ces molécules et on obtient approximativement les mêmes vitesses si on garde le rapport t_s/t_b constant.

La figure 4.16 montre comment évolue le coefficient de diffusion D_{ss} en fonction de N pour un pulse long (point gris) et un pulse court (points noirs). Le minimum est obtenu pour $N=33$ au lieu de $N=25$ pour le pulse court. Comme précédemment pour la vitesse V_{ss} , nous obtenons les mêmes résultats pour des molécules de faible taille moléculaire. Il est intéressant de remarquer que nous obtenons une décroissance de D_{ss} au-delà d'une masse critique ($N=87$). Cette décroissance, bien qu'inusitée, peut s'expliquer assez aisément. Souvenons-nous en effet des conclusions énoncées aux chapitre 3: i) une molécule est fortement piégée quand sa valeur de h_x est grande, ii) c'est une large distribution de temps de sortie τ qui explique la forte diffusion observée en champ constant. Nous avons calculé la valeur moyenne de l'étirement ($\langle h_x \rangle$)

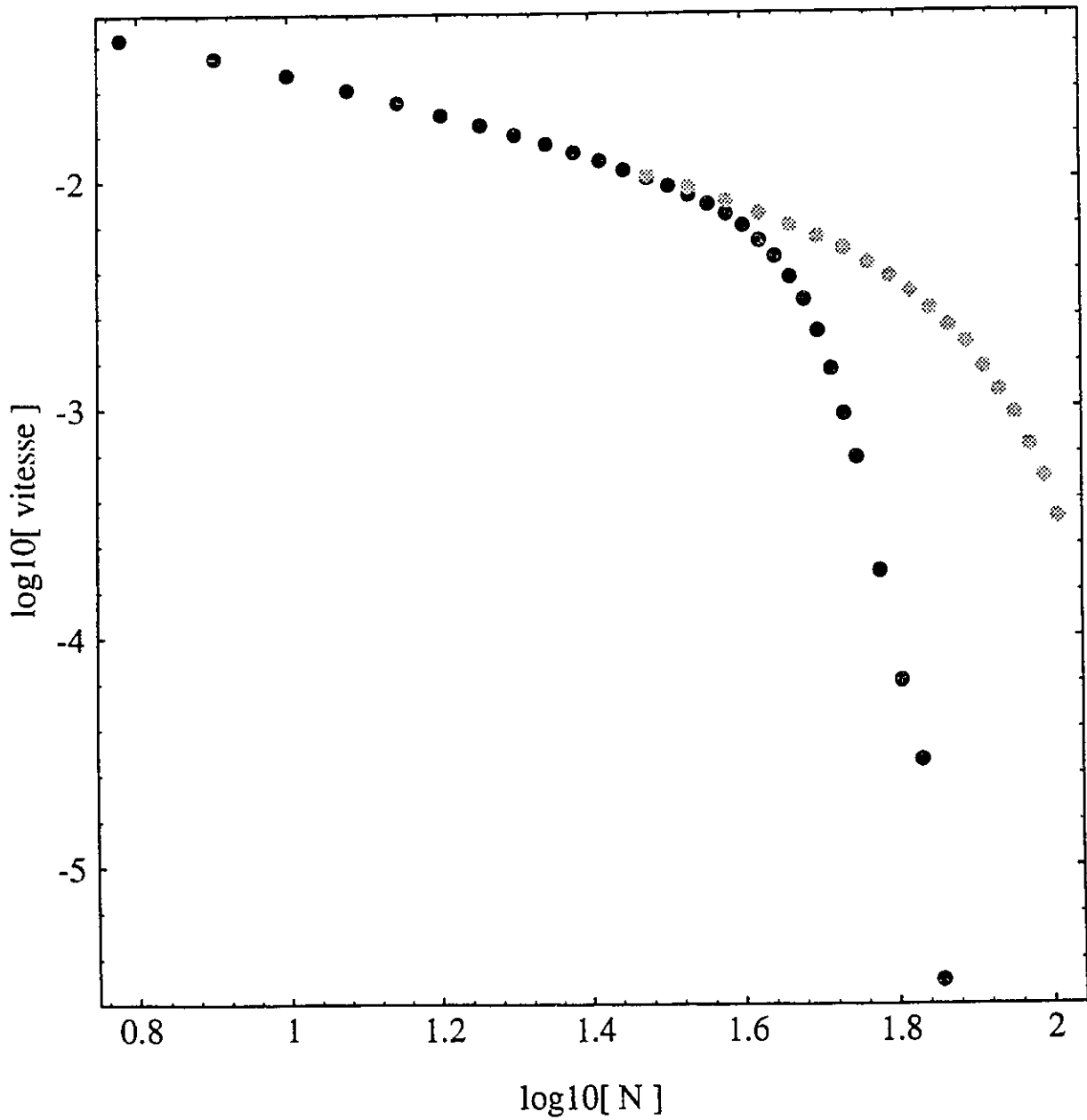


Figure 4.15- Vitesse V_s vs nombre de segments de reptation N pour $\epsilon=0.05$, $f=0.001$, (points gris: $t_a=1200$ et $t_b=180$; points noirs: $t_a=300$ et $t_b=45$), obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_p(N=30)$ et la vitesse en unités de $a/\tau_p(N=30)$.

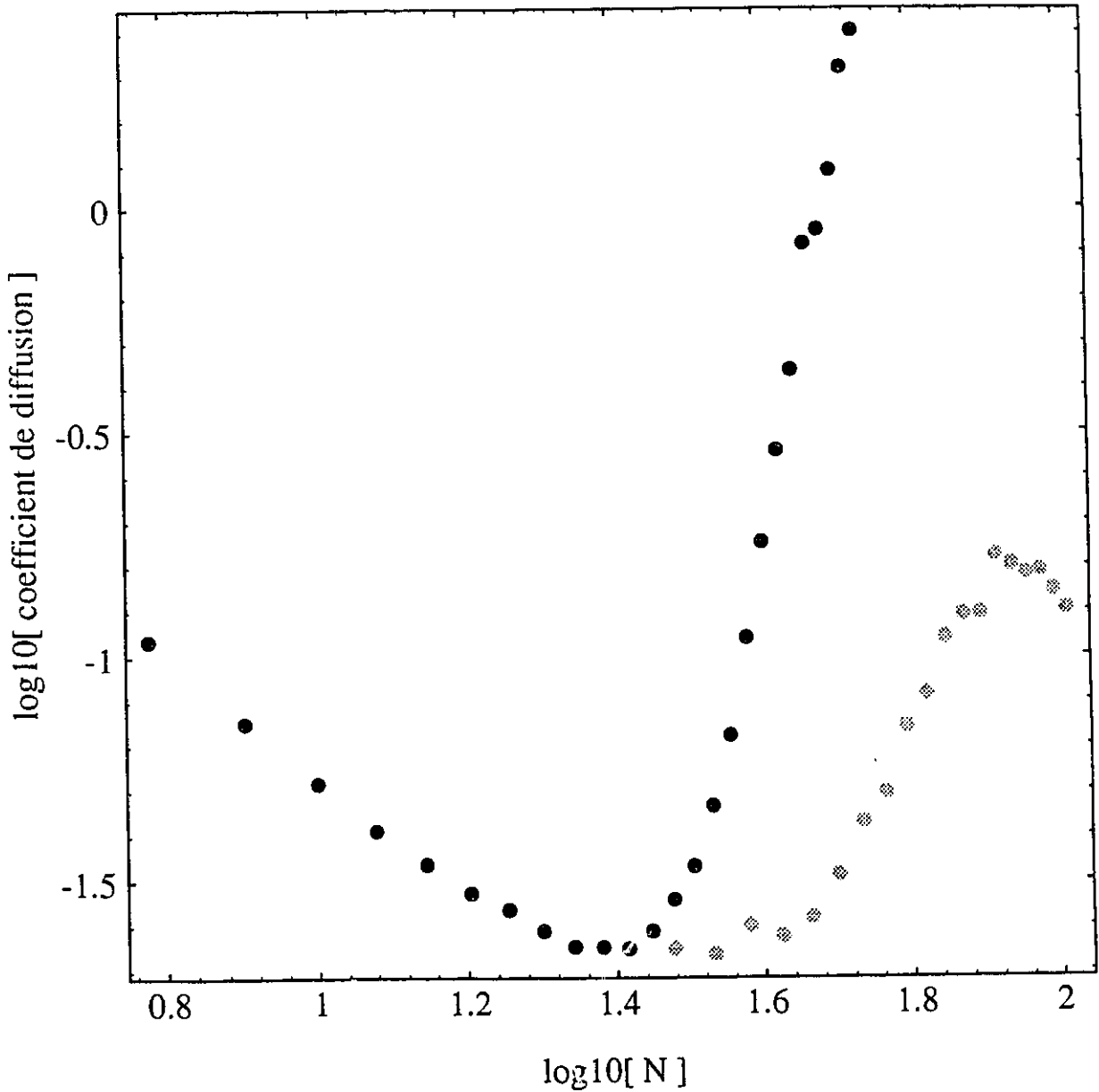


Figure 4.16- Constante de diffusion D_{ss} vs nombre de segments de reptation N pour $\varepsilon=0.05$, $f=0.001$, (points gris: $t_a=1200$ et $t_b=180$; points noirs: $t_a=300$ et $t_b=45$), obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_B(N=30)$ et la constante de diffusion est en unités de $a^2/\tau_B(N=30)$.

pour une molécule de $N=90$ segments (une molécule située autour du maximum de D_{ss} sur la figure 4.16) et nous avons obtenu $\langle h_x \rangle = 6$. Nous sommes donc en présence d'une molécule qui est fortement orientée par rapport au champ avant. Par contre, plus h_x est grand, plus la molécule va "reculer" rapidement durant le pulse arrière. Sachant que la vitesse curvilinéaire est donnée par $\epsilon h_x / \tau_B(N)$, nous pouvons calculer la fraction de la molécule qui arrive à sortir du piège:

$$\frac{V_{tube} t_b}{L} = \frac{\epsilon h_x t_b}{\tau_B(N) N} \quad (50)$$

Nous obtenons donc que la fraction moyenne de la molécule qui arrive à sortir du piège pour $N=90$ segments est approximativement égale à 20%. Cette fraction est considérable, surtout si on considère que cette valeur est une valeur moyenne.

Nous en arrivons donc à la conclusion suivante: plus la molécule est orientée, plus elle aura de la facilité à sortir pendant l'inversion du champ. Ceci aura pour effet de réduire le piégeage et de diminuer la largeur de la distribution de temps de sortie τ . Ce dernier effet se manifeste par une réduction du coefficient de diffusion.

4.9 Étude d'un pulse long où $t_a > t_b$

Nous étudions finalement les résultats de simulations obtenus pour des conditions où $t_a=10000$ et $t_b=100$. Nous nous limiterons toutefois à une étude de la relation vitesse-masse pour ce type de pulse où l'on s'attend évidemment à un fort piégeage (t_a relativement grand) et un faible dépiégeage (t_b relativement petit).

La figure 4.17 montre comment évolue V_{ss} en fonction de la taille moléculaire N . On remarque que pour ce pulse particulier, nous obtenons une inversion de bande, i.e., une région

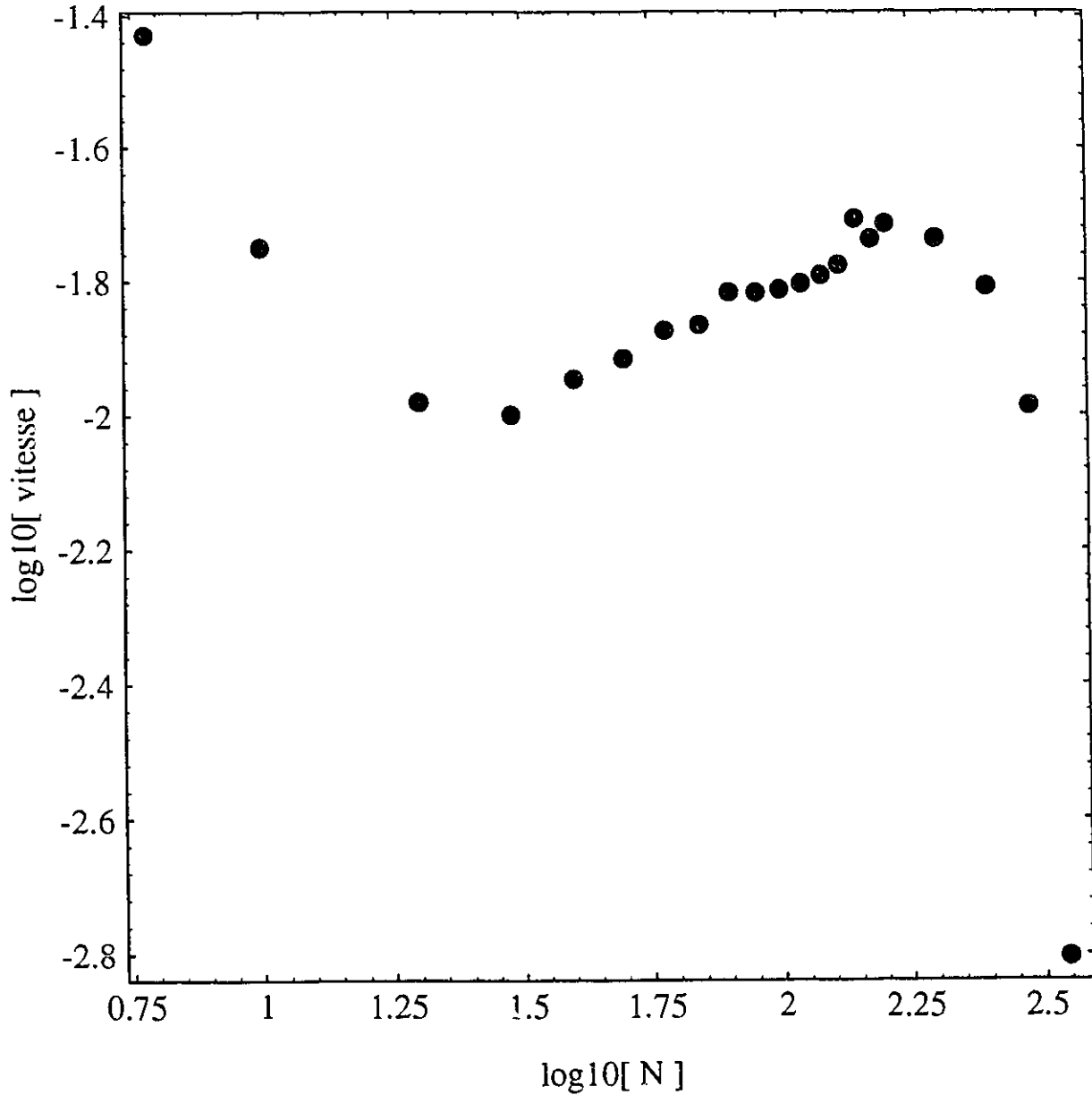


Figure 4.17- Vitesse V_{ss} vs nombre de segments de reptation N pour $\epsilon=0.05$, $f=0.001$, $t_a=10000$ et $t_b=100$, obtenue à l'aide de simulations. Le temps est en unités de $\tau_B(N=30)$ et la vitesse en unités de $a/\tau_B(N=30)$.

où la vitesse V_{∞} augmente avec la taille moléculaire. Ce phénomène avait été prédit par le modèle analytique de DV [19]. Voici comment on peut expliquer ce phénomène inusité:

Pendant le pulse avant, toutes les chaînes plus longues qu'une certaine taille critique rencontrent un seul et unique piège (très profond) de telle sorte que la distance parcourue vers l'avant n'est que très faiblement dépendante de la taille moléculaire. Pendant le pulse arrière, les chaînes les plus longues vont se déplacer moins vite, parcourant en moyenne une distance plus courte. Donc, la vitesse des grandes molécules est légèrement plus élevée. Cette explication est valide seulement si le dépiégeage électrique domine la dynamique de dépiégeage, ce qui cesse ici d'être le cas pour $N > 10^{2.25}$.

4.10 Conclusion

Nous avons étudié, par le moyen de simulations numériques, comment l'utilisation de champs pulsés modifie la dynamique moléculaire du système S-ADN. En particulier, nous avons montré comment les champs pulsés influent sur la vitesse et sur le coefficient de diffusion à l'état stationnaire. On a également effectué une étude moyenne de ce qui se passe durant chaque pulse pour comprendre l'impact des effets anomaux.

Nous obtenons des résultats en accord qualitatif avec les expériences de UDG [6] et le modèle analytique de DV [19]: la vitesse des molécules faiblement piégées ne sera pas modifiée de façon significative par les champs pulsés. Il suffit de multiplier la vitesse sans pulses par le facteur $(t_a - t_b)/(t_a + t_b)$; ce facteur ne prend seulement en considération que le fait que la molécule recule pendant un temps t_b à chaque pulse.

L'effet des pulses sur la vitesse des molécules fortement piégées est considérable. On

observe (tout comme UDG et DV) une augmentation de la vitesse causée par le dépiégeage électrique. Tout comme UDG et DV, on observe aussi, pour certains pulses, une région où la vitesse ne dépend que faiblement de la taille moléculaire.

Nos simulations nous ont aussi permis de voir ce qu'il advient du coefficient de diffusion. La diffusion n'est pas influencée par les pulses pour les petites molécules. Par contre, elle est nettement réduite par ces mêmes pulses (en comparaison à ce qu'on obtient sans pulses) pour les grosses molécules à cause de la diminution de la largeur de la distribution du temps de sortie $P(\tau_d)$.

Nous avons remarqué qu'un pulse était efficace seulement pour une plage de tailles moléculaires données. Il serait facile de vérifier, par le moyen de simulations, ce qu'il advient si on utilise un champ pulsé dont la période des pulses augmente à chaque pulse (permettant à toutes les molécules de subir à un moment donné un temps de pulse qui lui est favorable). Ceci pourrait sans doute augmenter le nombre de bandes qui seront résolues. Ceci sera étudié dans les mois qui suivent.

Chapitre 5

Conclusion

Nous avons étudié le comportement électrophorétique d'une molécule d'ADN à laquelle est attachée, à un bout, une protéine neutre (la streptavidine). Lorsque l'électrophorèse est faite dans un gel capable de retenir la protéine, de nombreux effets de piégeage sont observés, que ce soit sous des conditions de champs électriques constants ou pulsés. Le chapitre 2 décrit nos simulations en champ constant, tandis que le chapitre suivant présente un modèle analytique pour les mêmes conditions. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats de nos simulations pour des champs pulsés. Voici, en gros, les conclusions générales de ces trois études théoriques.

En premier lieu (chapitre 2), nous avons montré qu'il peut devenir impossible pour une grosse molécule d'atteindre l'état stationnaire dans un temps raisonnable à cause du piégeage stérique. De plus, l'explosion du coefficient de diffusion observée par SV [7] a pu être expliquée avec le modèle de la marche dirigée. En effet, nous avons démontré que cette explosion est liée (indirectement) au fait que la queue de la distribution de temps de dépiégeage $P(\tau)$ a une décroissance lente ($P(\tau) \sim \tau^{-1.65}$ dans le cas étudié). Nous avons aussi observé des régimes transitoires de longue durée pour la position moyenne $\langle x(t) \rangle$ et la dispersion $\langle \Delta x^2(t) \rangle$. Ici aussi, les régimes s'expliquent par la forme de $P(\tau)$. Pour améliorer l'efficacité du système, nous devons donc à tout prix réduire la largeur de la distribution $P(\tau)$; le moyen le plus facile pour atteindre

ce but est l'utilisation de champs pulsés, tel que suggéré originalement par UDG [6]. Inverser périodiquement la direction du champ pendant une courte période de temps permet, bien sûr, aux molécules de sortir plus rapidement des pièges.

Un modèle analytique du piégeage (différent de celui de DV [9]) a aussi été développé (chapitre 3). Ce modèle permet de calculer à la fois la vitesse et le coefficient de diffusion (et par le fait même le facteur de résolution de la séparation), dans la limite des faibles et forts champs, ce que le modèle de DV ne permettait pas. Nous avons pu ainsi expliquer comment la vitesse du complexe S-ADN lors de l'électrophorèse de piégeage sur gel est nettement réduite à cause du piégeage stérique. Nous avons aussi montré comment ce type de piégeage augmente substantiellement le coefficient de diffusion, ce qui rend l'électrophorèse de piégeage en champ constant incapable d'augmenter le nombre de bases pouvant être séquencées. Finalement, pour certains cas, des régimes anomaux sont prédits par ce modèle analytique, en accord avec nos résultats numériques du chapitre 2.

Dans le quatrième chapitre de cette thèse, nous avons présenté des résultats de simulations pour l'électrophorèse de piégeage du complexe S-ADN en champs pulsés. Nous avons étudié comment l'utilisation de champs pulsés modifie la dynamique du système. En particulier, nous avons montré l'influence d'un pulse sur la vitesse et sur le coefficient de diffusion. Alors que l'effet est marginal pour de petites molécules, les effets sur les grosses molécules sont beaucoup plus importants. Ainsi, on a pu observer avec intérêt une augmentation de la vitesse et une diminution du coefficient de diffusion. Nos résultats sont en accord qualitatif avec les expériences de UDG [6] et le modèle analytique de DV [19].

Pour l'utilisateur, il serait intéressant de voir comment un pulse (e.g. 300:45) va influencer la distribution des bandes sur un gel. Pour tracer le graphique représentant ce que nos études prédisent qu'un biologiste observerait sur son "scanner", nous avons utilisé les résultats de simulations de SV ainsi que ceux obtenus au chapitre 4. Les figures qui suivent montrent l'allure de bandes gaussiennes après un temps de 10^8 (assez long pour que toutes les molécules soient dans l'état stationnaire; ce temps est de l'ordre de 24 heures, donc tout à fait réaliste). Les distances et les intensités sont en unités arbitraires. Même si ces exemples ne représentent pas parfaitement ce qui se passe en réalité, ils nous permettent d'obtenir des informations qualitatives intéressantes.

La figure 5.1 montre le cas de l'électrophorèse du complexe S-ADN en champ constant; il est possible d'y lire environ 23 bandes (les bandes 1 à 6, nécessairement résolues, ne sont pas montrées, car les données de SV n'étaient pas disponibles). Au delà de cette limite, il devient impossible de lire quoi que ce soit. Les molécules plus grosses sont dispersées entre l'origine et la position de la molécule $N=23$.

La figure 5.2 nous montre la forme des bandes pour des pulses $t_a=1200$ et $t_b=180$. On remarque que le pic correspondant à $N=6$ est situé à environ $(t_a-t_b)/(t_a+t_b)\approx 74\%$ de la distance de ce même pic en champ constant. Il est intéressant de noter une vaste zone où la vitesse semble décroître de façon quasi-linéaire avec la taille moléculaire, cette zone correspondant aux molécules $17 < N < 25$. Le nombre de bandes résolues est nettement supérieur à celui obtenu en champ constant: de 23 qu'il était, il passe à 37!

Nous avons étudié l'électrophorèse de piégeage en champ constant par le biais de simulations et d'un modèle analytique. L'électrophorèse en champs pulsés permet manifestement

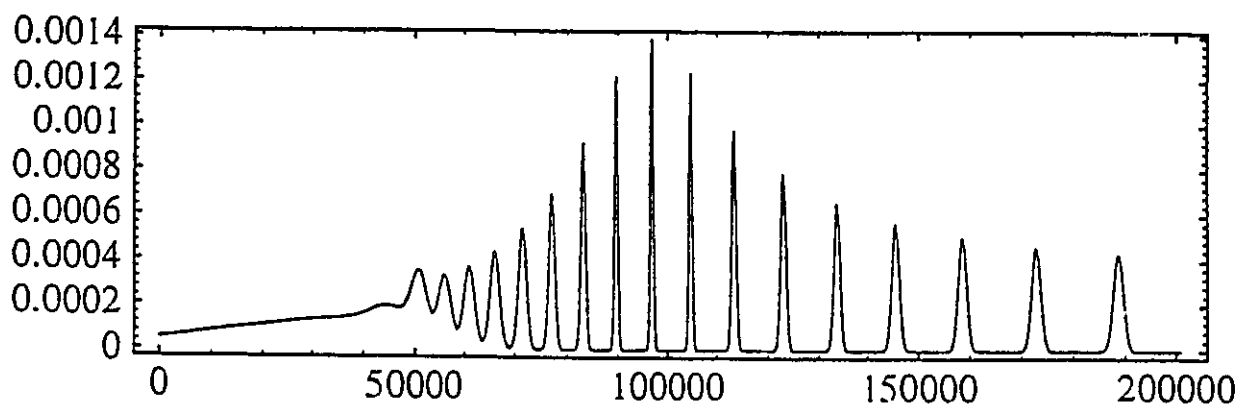


Figure 5.1- Prédiction pour l'intensité mesurée sur le "scanner" vs position pour l'électrophorèse en champ constant du complexe S-ADN ($\epsilon=0.05$, $f=0.001$ et $t=10^8 \tau_B(N=30)$).
Les intensités et les positions sont en unités arbitraires.

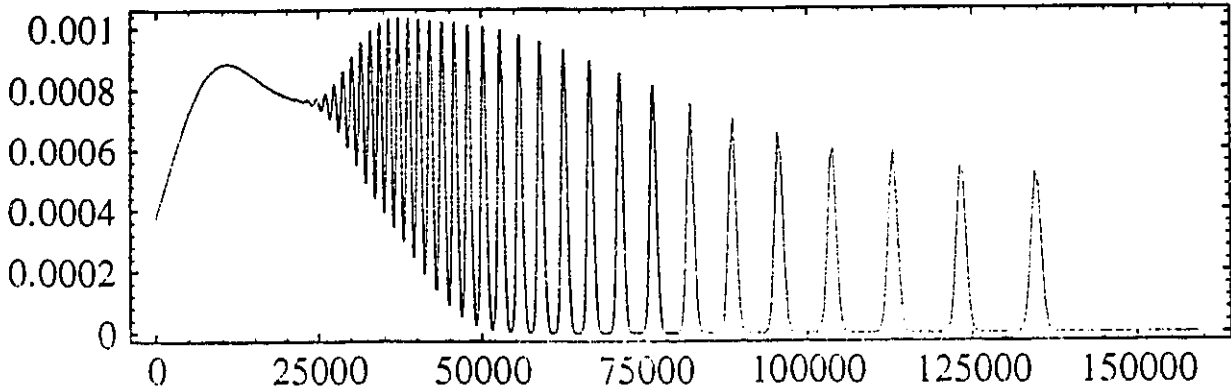


Figure 5.2- Prédiction pour l'intensité mesurée sur le "scanner" vs position pour l'électrophorèse en champ pulsé du complexe S-ADN ($\epsilon=0.05$, $f=0.001$, $t_s=300 \tau_B(N=30)$, $t_o=45 \tau_B(N=30)$ et $t=10^8 \tau_B(N=30)$). Les intensités et les positions sont en unités arbitraires.

d'obtenir une meilleure résolution. Même si certains faits ont été compris et observés dans les simulations, il reste beaucoup de travail pour optimiser les pulses à utiliser. Pour ce faire, il serait intéressant de faire une étude des distributions de temps de dépiégeage $P(\tau_{d,a})$ et $P(\tau_{d,b})$ (similaire à l'étude effectuée au chapitre 2) afin de mieux comprendre la physique sous-jacente. Il va sans dire que des vérifications expérimentales s'imposent; celles-ci seront effectuées dans le cadre de mes études doctorales. Il serait également intéressant d'étudier un système où le champ électrique n'est pas uniforme dans le gel, i.e. un champ électrique fonction de la position (pour l'ADN et pour le complexe S-ADN). Il a déjà été observé qu'un gradient de champ électrique pouvait augmenter le nombre de bases qui peuvent être lues par expérience d'électrophorèse (Mayer,Drouin et Slater, non publié).

Bibliographie

- [1] D. C. Schwartz et C. R. Cantor, *Cell*, **37**, 67 (1984).
- [2] J. A. Luckey et al., *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4417 (1990).
- [3] L. M. Smith et al., *Nature*, **321**, 674 (1986).
- [4] A. Rosenthal et al., *DNA Sequences*, **1**, 63 (1990).
- [5] P. Mayer, G. W. Slater et G. Drouin, *Appl. Theor. Electrophoresis*, **3**, 157 (1993).
- [6] L. Ulanovsky, G. Drouin, W. Gilbert, *Nature*, **343**, 190 (1990).
- [7] G. W. Slater et C. Villeneuve, *J. Polym. Sci. B*, **30**, 1451 (1992).
- [8] A.-D. Défontaines et J.-L. Viovy, *Proceedings of First International Conference on Electrophoresis, Supercomputer and the human Genome*, 1991, World Scientific, Singapore.
- [9] A.-D. Défontaines et J.-L. Viovy, *Electrophoresis*, **14**, 8 (1993).
- [10] P. G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, 1988, Cornell University Press, Ithaca et Londres.
- [11] M. Doi et J.F. Edwards, *The theory of Polymers Dynamics*, 1988, Clarendon, Oxford, U.K..
- [12] G. W. Slater et J. Noolandi, *Macromolecules*, **24**, 6715 (1991).
- [13] J.-P. Bouchaud et A. Georges, *J. Phys. A*, **23**, L1003 (1990).
- [14] J.-P. Bouchaud et A. Georges, *Phys. rep.*, **195**, 127 (1990).
- [15] O. J. Lumpkin, P. Déjardin, et B. H. Zimm, *Biopolymers*, **24**, 1573 (1985).
- [16] G. W. Slater, J. Rousseau et J. Noolandi, *Biopolymers*, **26**, 863 (1987).
- [17] G. W. Slater et J. Noolandi, *New Trends in Physics and Physical Chemistry of Polymers*,

1989, Plenum Press, New York et Londres.

[18] E. Brassard, C. Turmel et J. Noolandi, *Electrophoresis*, **13**, 529 (1992).

[19] A.-D. Défontaines et J.-L. Viovy, *Electrophoresis*, **15**, 111 (1994).

[20] J.-L. Viovy et A.-D. Défontaines, *Pulsed-Field Gell Electrophoresis, Protocols, Methods, and Theories*, 1992, The Humana Press, Totowa (NJ).

[21] P. Mayer, G. W. Slater et G. Drouin, *Electrophoresis*, **15**, 120 (1994).