

L'ADN : topologie, propriétés mécaniques et manipulation

Projet bibliographique CPES 3
Sciences expérimentales PSL

BERARD Adrien

20 mars 2022

Table des matières

1	Introduction	3
1.1	Structure primaire	3
1.2	Structure secondaire	3
1.3	Structure tertiaire	4
1.4	Forces et ordres de grandeur	4
1.4.1	Liaison covalente	5
1.4.2	Liaison non covalente	5
1.4.3	Fluctuations thermiques	5
1.4.4	Bruit thermique	5
2	Topologie et modèles théoriques	6
2.1	Topologie	6
2.1.1	Torsade, vrille et indice d'enlacement	6
2.1.2	Super-enroulement	6
2.1.3	Plectonème et solénoïde	7
2.2	Modèles théoriques de l'ADN	7
2.2.1	Modèle Gaussien	8
2.2.2	Modèle de chaîne libre (FJC pour <i>Freely Jointed Chain</i>)	8
2.2.3	Modèle du ver (WLC pour <i>Worm-Like Chain</i>)	9
2.2.4	Mesure théorique de force-extension	10
2.3	Simulations numériques	11
3	Micromanipulation de l'ADN	12
3.1	Les différentes techniques	12
3.1.1	AFM	12
3.1.2	Piège optique	13
3.1.3	Microfibres	14
3.1.4	Pincés magnétiques	14
3.2	Les questions techniques	15
3.2.1	Comment est attachée la molécule d'ADN ?	15
3.2.2	Comment mesurer la force appliquée ? La mesure de force par mouvement brownien	15
3.2.3	Analyse temporelle ou fréquentielle ?	16
3.2.4	Quelles sont les limites ?	16
3.3	Enclume de force et origamis	16
4	Conclusion	18

Abstract Ce projet bibliographique vise à faire un aperçu des différents travaux et des notions fondamentales de la mécanique de la molécule d'ADN, accessibles à un étudiant de 3^e année de licence de physique. Ici ne sera mentionné que ce qui concerne la topologie de l'ADN-B, les différentes interactions et forces structurant la molécule d'ADN ainsi que les différentes méthodes d'étude, théoriques et expérimentales. Pour finir, il sera fait mention des récentes évolutions de l'utilisation de l'ADN en tant que nano-matériau, objet d'étude jusqu'alors, elle devient maintenant instrument de mesure mais aussi vecteur ou support d'information non génétique.

1 Introduction

La molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) est sûrement la molécule la plus importante du vivant. Échelon de base de l'information génétique, sa conservation au cours de l'évolution des espèces reste remarquable. La transmission génétique de l'information du vivant est connue depuis des dizaines d'années. Néanmoins, ce n'est qu'en 1953 que Watson et Crick¹ ont mis au point leur modèle en double hélice, encore utilisé aujourd'hui, à partir des clichés de diffraction à rayons X obtenus par Rosalind Franklin. À l'époque, ce modèle faisait face à celui de Pauling et Corey mais il ne représentait finalement pas la forme la plus commune de l'ADN dans nos cellules. Ce modèle a drastiquement changé la manière d'aborder les sujets en biologie comme la réplication de l'ADN, la division des brins lors de la division cellulaire ou encore la réparation des modifications de l'ADN. Mais alors, de nombreuses contraintes intervenant sur cette molécule au cours de ces processus deviennent intéressantes pour les physiciens. Tous ces mécanismes cellulaires peuvent être abordés d'un point de vue biomécanique ou biochimique que ce soit par la théorie ou l'expérimentation. La molécule d'ADN est aujourd'hui un polymère de référence et devient même un instrument de mesure pour d'autres biopolymères (ARN, protéines,...) [8]. Comment étudier alors les propriétés mécaniques de cette molécule ? Après avoir rappelé les propriétés fondamentales de l'ADN et sa topologie, on étudiera les différents modèles théoriques caractérisant cette molécule. On s'intéressera ensuite aux différentes techniques de manipulation sur molécule unique utilisées pour étudier l'ADN. On finira sur l'utilisation de ces nouvelles connaissances sur l'ADN notamment dans des domaines technologiques ou médicaux.

1.1 Structure primaire

La molécule d'ADN est un polymère composé de nucléotides : ensemble d'un squelette sucre-phosphate et d'une base azotée. Les désoxyriboses sont liés par liaison phosphodiester entre le groupe hydroxyle en 3' et le groupe phosphate du carbone en 5'. Les bases azotées y sont reliées par le carbone 1'. Il en existe 4 différentes : A (adénine), T(thymine), C(cytosine) et G(guanine).

1.2 Structure secondaire

Ici sera mentionné la forme la plus courante de l'ADN soit l'ADN-B. Lorsqu'elle est double brin, soit la plupart du temps dans nos cellules, l'ADN est composée de deux brins antiparallèles formant une hélice à symétrie droite. Ces dernières sont complémentaires deux à deux et interagissent par des interactions hydrogène entre les bases : 2 liaisons pour A - T et 3 liaisons pour C - G. La stabilité de la molécule d'ADN provient de cette interaction entre les bases de chaque brin mais aussi de l'interaction entre base d'un même brin les unes au-dessus des autres. Cette dernière interaction, appelée empilement- π (ou *stacking interaction*) provient de l'aromaticité des bases nucléiques : les électrons dans les orbitales p interagissent alors entre les cycles. En conditions physiologiques, la double hélice fait un tour sur elle-même toutes les 10,5 paires de bases environ. Elle a un diamètre de 20 Å et l'écart entre 2 bases est d'environ 3,4 Å. Les propriétés de l'ADN, et donc les valeurs précédentes, varient avec la température, le pH et la concentration en sel et sucre du solvant. Cette molécule est très peu réactive car les bases sont placées au centre de la double hélice.

1. WATSON, J., CRICK, F. Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 171, 737-738 (1953)

1.3 Structure tertiaire

L'agitation thermique déforme les paires de base. Le squelette, chargé négativement, évite que l'ADN ne s'effondre sur elle-même. De plus, les 2 structures précédentes donnent à l'ADN une grande rigidité de courbure. En effet, la longueur typique de courbure due aux variations thermiques est d'environ 50 nm ou 150 paires de base, ce qui est très élevé en comparaison à d'autres polymères comme le PMMA. Plus précisément, cette longueur, appelée longueur de persistance, est la distance maximale d'un polymère pour laquelle les conformations du premier et du dernier monomère sont liées l'une à l'autre. Au-delà, elles ne sont plus corrélées. C'est aussi la longueur à partir de laquelle les fluctuations thermiques peuvent courber la molécule.

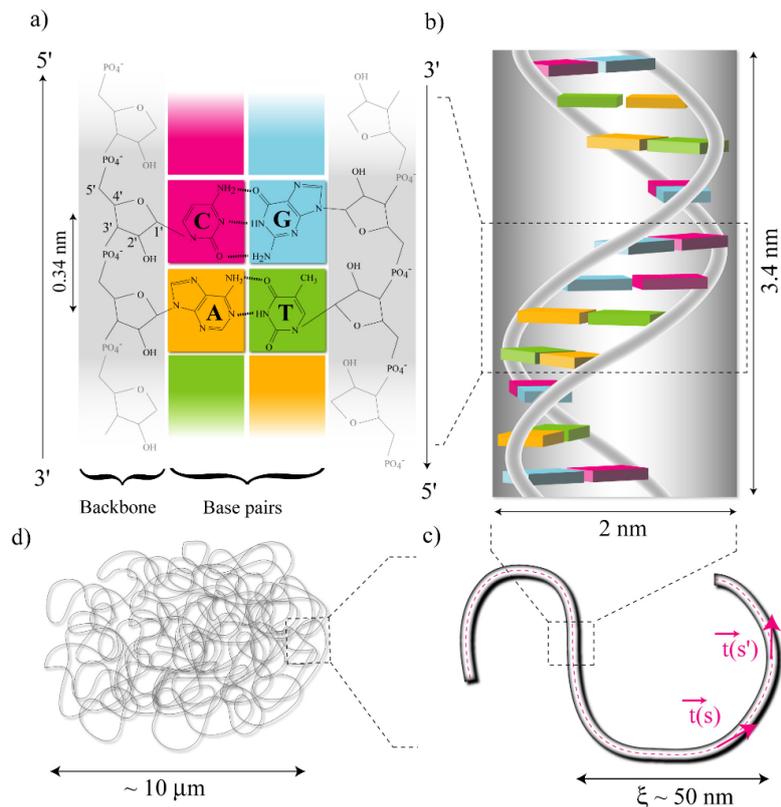


FIGURE 1 – **Structure de l'ADN-B** - a) Squelette sucre-phosphate et appariement des bases complémentaires via des liaisons hydrogène. La distance entre chaque paire de base est de 0,34nm. Les 2 brins sont anti-parallèles, extrémités 5' et 3' opposées. b) Structure secondaire de l'ADN : les deux brins s'enroulent pour former une hélice droite d'un pas de 10,5 paires de base. c) Structure tertiaire : à une échelle plus grande l'ADN se comporte comme une chaîne polymère semi-flexible. L'orientation est décorrélée à partir d'une distance $\xi. = 50nm$. d) Les longues molécules d'ADN, beaucoup plus grandes que leur longueur de persistance, $L \gg \xi$, ont un comportement semblable à celui d'une pelote statistique. Elles ont une distance quadratique moyenne $R_0^2 = 2\xi L$. Figure tirée de [3].

Les contraintes mécaniques sur les biomolécules modifient la cinétique des processus biologiques. L'étape limitante est mécanique (conformation, orientation spatiale, ...), ce n'est pas la chimie qui est limitante.

1.4 Forces et ordres de grandeur

Après avoir donné les tailles caractéristiques de l'ADN, il est intéressant de connaître les ordres de grandeur des différentes forces s'appliquant à cette molécule. On utilisera des raisonnements en

loi d'échelle où $F \approx E/d$ avec F la force, E l'énergie et d la taille de la liaison. Cette partie se base sur les considérations de G. Charvin dans sa thèse [3].

1.4.1 Liaison covalente

Une liaison covalente a une taille d'environ 1Å et une énergie d'1eV. On trouve alors $F_{max} = 1eV/0,1nm = 1,6nN$. Ceci est la borne supérieure des forces à appliquer dans l'étirement de molécule unique.

1.4.2 Liaison non covalente

Les énergies des liaisons non-covalentes, que ce soit de Van der Walls ou hydrogène, ont une énergie de l'ordre d'une dizaine de fois $k_B T$, l'énergie thermique (avec k_B la constante de Boltzmann et T la température) pour une taille de liaison d'une dizaine à une centaine d'Å. On trouve alors, à température ambiante où $k_B T = 4pN.nm$, des forces pour rompre ces liaisons comprises entre 10pN et 100pN. Ce sont les forces suffisantes pour dénaturer l'ADN car elles permettent de rompre l'appariement complémentaire des bases.

1.4.3 Fluctuations thermiques

Comme vu précédemment, la longueur de persistance est la distance à partir de laquelle les fluctuations thermiques, de l'ordre de $k_B T$, ont leur importance (voir c) de la figure 1). En conditions physiologique la longueur de persistance étant de 50nm, la force nécessaire pour surpasser les fluctuations thermiques, appelée force entropique, est $F_e = 0,1pN$. Cette force est celle que l'on doit appliquer pour étirer une pelote statistique d'ADN, d) de la figure 1. Plus le polymère est rigide, plus sa longueur de persistance est grande et donc plus la force entropique est petite et plus il est aisé d'étirer le polymère. Cette propriété est appelée paradoxe de l'entropie élastique car intuitivement cela paraît étrange que l'augmentation de la rigidité rende la force à appliquer plus petite. Néanmoins on peut l'expliquer : la force appliquée tend à réduire le nombre de configurations accessibles au polymère, elle réduit donc son entropie. Toutes choses égales par ailleurs, un polymère plus rigide aura moins de configurations possibles, donc moins il perd d'entropie lorsqu'il est étiré et donc plus la force entropique, nécessaire à étirer significativement le polymère, est faible.

1.4.4 Bruit thermique

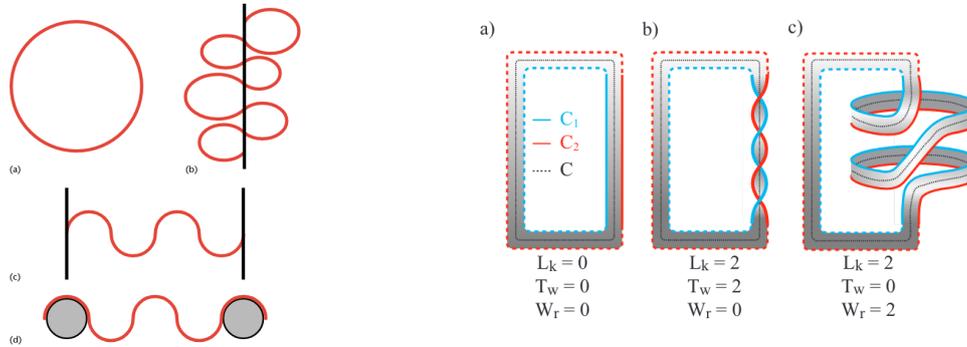
Dans un fluide visqueux, la force de Langevin caractérise les chocs aléatoires sur l'objet brownien par les molécules du solvant. Pour une bande passante Δf , la force moyenne ressentie par l'objet est $(4\pi K T \gamma \Delta f)^{1/2}$ où γ caractérise la dissipation, $\gamma = 3\pi\eta d$ pour une sphère. Dans de l'eau ($\eta = 10^{-3} Pa.s$) et pour une bille de 2 microns, l'intensité de la force moyenne durant 1 seconde vaut 10 fN. Cette force est la principale source de bruit expérimental.

2 Topologie et modèles théoriques

2.1 Topologie

Dans nos cellules, les molécules d'ADN double brin sont souvent bien plus grandes que la longueur de persistance. La structure tertiaire de la molécule peut alors être très complexe. Il est donc intéressant de comprendre la topologie de l'ADN car celle-ci est essentielle dans les processus de réplication de l'ADN notamment. La topologie de l'ADN est grandement basée sur l'étude des propriétés d'enroulement de la molécule et c'est ce que nous étudierons dans cette partie à l'aide de la revue de S. Mirkin [7]. Cela permettra de comprendre les structures possibles que prend l'ADN lors de mesure de force-extension que nous verrons par la suite.

Bien que les nucléotides soient globalement libres de tourner dans la molécule, les extrémités sont souvent contraintes soit en étant reliées comme dans un plasmide bactérien (ADN circulaire), soit en étant rattachées à des membranes ou des protéines dans les cellules eukaryotes (aux histones dans les nucléosomes par exemple). On appelle ces systèmes, sous contraintes aux extrémités, des domaines topologiques. Tous sont alors équivalents, d'un point de vue topologique uniquement, à de l'ADN circulaire.



(a) **Exemples de domaines topologiques pour l'ADN** - (a) ADN circulaire, (b) Boucles d'ADN chromosomique, (c) ADN linéaire attaché à la membrane, (d) ADN linéaire attaché à un agrégat de protéine. Figure tirée de [7]

(b) **Torsade (Tw , vrille (Wr) et indice d'enlacement (Lk)** - a) Un ruban circulaire de bords C_1 et C_2 et d'axe C . b) L'enroulement du ruban autour de son axe C de 2 tours crée de la torsade : $Tw = 2$. D'où $Lk = 2$. c) Pour un indice d'enlacement donné, la répartition de l'enroulement peut être différente. Ici elle se trouve dans la vrille $Wr = 2$. Figure tirée de [3]

2.1.1 Torsade, vrille et indice d'enlacement

L'ADN peut être enroulé de 2 manières différentes : l'enroulement de chaque brin l'un avec l'autre et l'enroulement de l'axe de la double hélice sur lui-même. On peut alors compter le nombre d'enroulement total mais aussi pour chacun de ces types d'enroulement. Le nombre d'enroulement total est appelé indice d'enlacement (ou Lk pour *Linking number*). Le nombre d'enroulement des brins l'un avec l'autre est appelé Torsade (ou Tw pour *Twist*). Et le nombre d'enroulement de l'axe est appelé Vrille (ou Wr pour *Writhe*). Lk peut être vu d'une autre manière comme le nombre de fois où l'on doit couper la molécule d'ADN (en faisant la comparaison qu'elle est circulaire au départ) pour pouvoir séparer les 2 brins. En passant, cette coupure se fait en pratique dans nos cellules lors de la réplication de l'ADN par le biais d'enzymes : les topoisomérases. On expliquera par la suite pourquoi une coupure est nécessaire lors de la réplication.

Des théorèmes de topologie montrent, ce qui est aussi intuitif, que Lk est constant (sans coupure) et toujours entier. Mais surtout que la vrille et la torsade sont les uniques moyens de s'enrouler et donc que $Lk = Wr + Tw$.

2.1.2 Super-enroulement

On définit aussi le super-enroulement $\Delta Lk = Lk - Lk_0$ avec Lk_0 l'enroulement de la double hélice naturelle, sans vrille donc, en conditions standards soit avec $\gamma = 10,5$ nucléotides par tour

d'hélice. Lk_0 est alors N/γ avec N le nombre de nucléotides. On définit la densité de super-enroulement $\sigma = \Delta Lk/LK_0$ qui est le super-enroulement relatif. On voit que ces valeurs sont positives quand on est plus enroulé que la "normale" et négatif sinon. On parle alors de super-enroulement positif et négatif.

Les notions d'intérêt sont la répartition et la position du super-enroulement. Étant donné que $Wr_0 = 0$ on a $\Delta Lk = \Delta Tw + Wr$. On peut voir ça intuitivement avec le fil torsadé d'un vieux téléphone, lorsqu'il se rétracte il va se former des vrilles.

2.1.3 Plectonème et solénoïde

2 structures typiques de super-enroulement, de degré de vrille et torsade différents mais à super-enroulement identiques, existent : le plectonème et le solénoïde (voir figure 3). Le plectonème est présent principalement chez les procaryotes alors que le solénoïde est typique des eucaryotes et de l'ADN dans les nucléosomes. On reparlera de ces structures pour analyser le comportement de l'ADN super-enroulé sous tension.

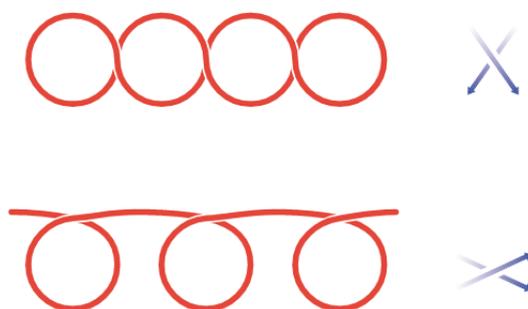


FIGURE 3 – **Plectonème et solénoïde** - En haut un plectonème et en bas un solénoïde d'ADN super-enroulé. Les flèches illustrent le fait que les deux molécules sont ici superenroulées négativement, malgré leur différence d'orientation. Libre à chacun de se faciliter la compréhension en y voyant un fil de téléphone. Figure tirée de [7].

Dans les conditions physiologiques, le rapport de torsade et de vrille est d'un quart. Néanmoins, la répartition du super-enroulement positif reste à déterminer. Le super-enroulement positif induit un stress de torsion et de courbure dans la molécule d'ADN ce qui est défavorable d'un point de vue énergétique. Il a été montré théoriquement et expérimentalement que l'enthalpie libre pour la réaction de super-enroulement négatif s'écrit sous la forme $\Delta G = 10RTN\sigma^2$ où R est la constante des gaz parfaits, T la température et N le nombre de paires de base. Un petit changement de la densité de super-enroulement induit alors une grande variation de l'enthalpie libre. Il est supposé que cette dépendance est similaire pour un super-enroulement positif.

Pour revenir à la réplication de l'ADN, lorsqu'une fourche de réplication est ouverte, localement l'ADN est super-enroulé négativement. La densité de superenroulement étant constante pour la molécule d'ensemble, il doit y avoir des zones super-enroulées positivement. Ces contraintes très fortes, car la fourche doit pouvoir laisser passer tout le complexe enzymatique nécessaire à la réplication, ne peuvent persister : l'ADN doit être coupé puis recollé pour enlever ce super-enroulement. C'est ce que font les topoisomérases [3].

2.2 Modèles théoriques de l'ADN

En 2002, S.Cocco et al. publient une revue expliquant les différents modèles théoriques utiles à l'étude de molécule unique d'ADN[5]. A partir des concepts provenant de la physique statistique et de la mécanique quantique, les auteurs débutent en expliquant les différents modèles de polymères élastiques. Ceux-ci sont ensuite expliqués dans le cas de mesures de force-extension réalisées sur des molécules uniques d'ADN simple ou double brin rendant compte de l'élasticité mais aussi des différentes transitions structurelles de cette molécule. Pour finir, ils montrent que la cinétique de dégraissage de l'ADN peut être connue en combinant les propriétés élastiques et les interactions

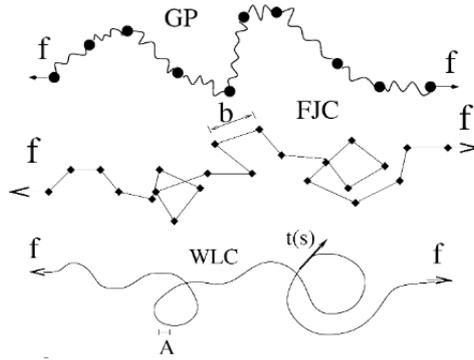


FIGURE 4 – **Représentations schématiques des modèles théoriques de polymères**- En haut on voit le modèle GP avec les ressorts entre chaque monomère. Au milieu, le modèle FJC avec une longueur b constante entre chaque monomère. En bas, le modèle WLC avec $t(s)$ le vecteur tangent à la courbe et s la coordonnée curviligne. Ce modèle continu est caractérisé par une longueur de persistance $A = \xi$. Dans les 3 cas sont indiquées des forces visant à étendre la molécule. Figure tirée de [5].

d'appariement de la molécule d'ADN. On résume ici ces différentes notions essentielles à l'étude de l'ADN en ajoutant l'intérêt de cette analyse théorique. Cette partie sera aussi complétée par une revue, plus récente mais plus synthétique, publiée en 2020 par Aggarwal et al.[1].

2.2.1 Modèle Gaussien

Ce modèle est le plus simple pour décrire un polymère. On caractérise chaque interaction entre monomères par un ressort où chaque segment est orienté de manière aléatoire. Le modèle est dit Gaussien car l'orientation du vecteur directionnel entre 2 monomères suit une loi normale centrée en 0, aucune direction préférentielle, et de variance b^2 supposée constante qui est l'écart quadratique moyen des 2 monomères. On a donc la formule suivante pour la distance entre les monomères n et $n-1$:

$$D(\vec{r}_n - r_{n-1}) = \left(\frac{3}{2\pi b^2} \right)^{3/2} \exp\left(\frac{-3(\vec{r}_n - r_{n-1})^2}{2b^2} \right) \quad (1)$$

C'est donc une marche aléatoire qui va caractériser le chemin suivi par le polymère. Par conjugaison entre la force et la position, on peut connaître la force linéaire d'étirement à appliquer en dérivant l'énergie libre du polymère, donnée par l'entropie multipliée par la température.

$$S = S_0 - 3k_B \frac{\vec{R}^2}{2 \langle R_0^2 \rangle} \quad (2)$$

$$\vec{F} = -\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial \vec{R}} = 3k_B \frac{\vec{R}}{\langle R_0^2 \rangle} \quad (3)$$

Si la force est linéaire en la position, on voit que la chaîne se comporte comme un ressort dit entropique de longueur au repos nulle et de raideur $3k_B T / N b^2$. On parle du modèle d'entropie élastique : le nombre de configurations du polymère diminue avec son élongation.

2.2.2 Modèle de chaîne libre (FJC pour *Freely Jointed Chain*)

Le modèle gaussien suppose qu'une élongation infinie est possible ce qui d'un point de vue physique est difficilement concevable pour l'étude d'extensions importantes. Au repos dans ce modèle, les monomères sont espacés d'une longueur constante dite longueur de Kuhn. L'écart quadratique entre les extrémités est alors $R^2 = N b^2$, résultat d'une marche aléatoire de N étapes. S. Cocco compare alors assez justement la réponse des monomères à l'application d'une force à celle de dipôles dans un champ électrique : ils tendent à s'aligner dans la direction du champ ou

de la force donc. Les N segments étant indépendants, l'énergie libre du polymère est alors donnée par $\mathcal{F} = -KT \ln(Z^N)$ avec Z la fonction de partition d'un monomère. L'énergie en présence d'une force est, comme pour un dipôle, $Fb \cos \theta$. On a alors la fonction de partition donnée par cette formule pour le segment n :

$$Z = \int_0^{2\pi} \exp\left(\frac{Fb \cos(\theta_n)}{k_B T}\right) \sin \theta_n d\theta_n \quad (4)$$

En introduisant cette formule dans l'énergie libre, elle-même introduite dans la conjugaison entre force et position, on en déduit l'élongation moyenne :

$$\langle z \rangle_{FJC} = Nb \langle \cos \theta \rangle = Nb \left[\coth\left(\frac{fb}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{fb} \right] \quad (5)$$

La force ne peut alors plus dépasser la longueur totale dite de contour Nb ou appelée aussi longueur cristallographique de l'ADN. Néanmoins, l'accord expérimental entre les travaux de Smith et al. [9] et ce modèle n'est pas très bon. L'extension prédite par le modèle FJC est plus grande que celle réelle car on surestime les corrélations d'orientation entre les liaisons. De plus, la validité de ce modèle à grande force n'est pas bonne.

2.2.3 Modèle du ver (WLC pour *Worm-Like Chain*)

Ce modèle est le plus utilisé dans la description de l'ADN aujourd'hui. Il ajoute au modèle FJC le caractère semi-flexible de l'ADN. C'est un modèle continu, caractérisé par un vecteur tangent unité. Au repos, ce vecteur est sujet à la fluctuation thermique et donc à des fluctuations gaussiennes centrées en zéro et de variance $1/\xi$. L'énergie totale lors de l'application d'une force est donnée par cette formule par Aggarwal et al. $E = E_{\text{étirement}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{Torsion-étirement}} + E_{\text{Courbure}} - \text{force} * \text{extension}$ qui explicitent ensuite chaque terme [1]. Néanmoins, on peut caractériser l'hamiltonien du système sans l'explicitation de chaque terme comme le fait S. Cocco avec cette formule :

$$H_{WLC} = k_B \frac{\xi}{2} \int_0^L ds \left(\frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right)^2 - f \int_0^L (\vec{z} \cdot \vec{t}) ds \quad (6)$$

où s est la coordonnée curviligne. Le premier terme est l'énergie de courbure alors que le second est lié à l'élongation. On peut alors écrire la fonction de partition de la chaîne pour une longueur L : (7)

$$Z = \int D\vec{t} e^{-H_{WLC}/k_B T} \quad (7)$$

La longueur ξ est très importante dans ces formules. En effet, on la retrouve dans la corrélation entre deux vecteurs tangents de coordonnées s et s' , soit le produit scalaire moyen.

$$\langle \vec{t}(s) \cdot \vec{t}(s') \rangle = e^{-\frac{|s-s'|}{\xi}} \quad (8)$$

Cette distance, plus communément appelée longueur de persistance, est la distance caractéristique à partir de laquelle le comportement des 2 vecteurs est décorréolé. (voir partie structure tertiaire 1.3). A partir de la même comparaison que pour le modèle FJC, WLC décrit l'évolution "temporelle" d'un dipôle possédant un moment d'inertie χ dans un champ électrique. Le temps étant la coordonnée de contour s . Ceci rend ce modèle équivalent à un problème de mécanique quantique. Cette analogie, permettant par ailleurs de relier physique des polymères et mécanique quantique, a permis à Marko et Siggia² de trouver une solution analytique à ce modèle. Ce modèle est celui qui se rapproche le plus des résultats expérimentaux, et il permet d'obtenir une estimation de la longueur de persistance proche de celle réelle ($51,6 \pm 2nm$ pour $50nm$ [3]). Depuis, des expériences ont montré quelques limites à ce modèle et Aggarwal et al. présentent des modifications à apporter pour être en accord avec les récentes données expérimentales ou les différentes conditions (force ionique différente par exemple). Il existe aussi d'autres modèles comme celui de Fratky-Porod présenté par G. Charvin dans sa thèse [3] ou encore celui de la chaîne linéaire sous-élastique (LSEC pour Linear Sub-Elastic Chain) présenté dans la revue d'Aggarwal et al. [1]. Tous les deux

2. J.F. Marko, E.D. Siggia, Statistical mechanics of supercoiled DNA, Phys. Rev. E 52 (1995) 2912

caractérisent la courbure de la molécule d'ADN rendant compte de sa rigidité ou d'un caractère linéaire de l'énergie de courbure (et non quadratique comme pour WLC).

2.2.4 Mesure théorique de force-extension

De nombreuses expériences sur l'ADN ont été réalisées avec du phage lambda. Cette molécule d'ADN double brin est un virus bactérien de E. Coli. Il est très utilisé car c'est un substrat commun des endonucléases (enzyme qui coupe l'ADN) et est facile d'utilisation en laboratoire. C'est donc pour cette raison que les résultats théoriques se font en reprenant les caractéristiques de cette molécule d'ADN de 48 502 paires de bases. S. Cocco et al. ont donc ajusté les différents modèles, GP, FJC et WLC aux caractéristiques de l'ADN lambda [5]. Ils ont alors tracé des modèles de force-extension, voir figure 5.

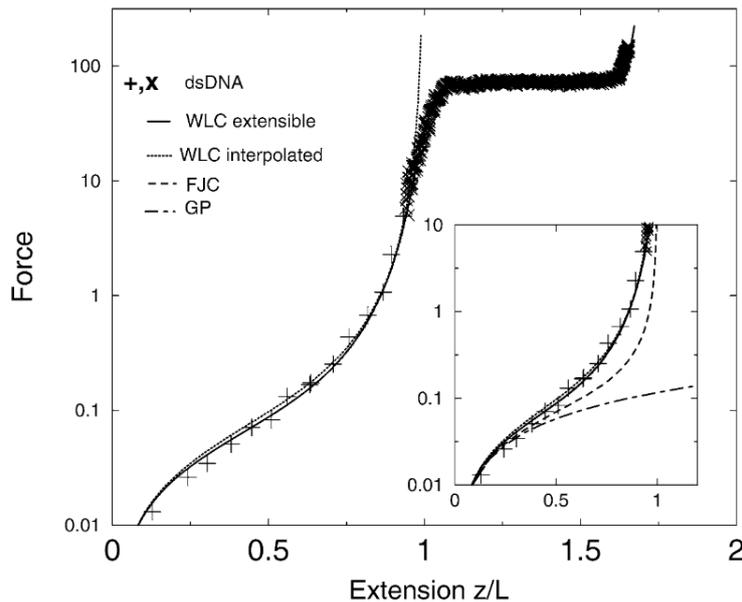


FIGURE 5 – **Courbes de force-extension théoriques pour de l'ADN- λ** - Force en pN en fonction de l'extension relative - Les données expérimentales sont représentées par les (+). Le plateau à une force de 70pN indique la transition en ADN-S. Le modèle WLC extensible reproduit de manière très précise les données expérimentales. Les prédictions des modèles GP, FJC et d'une autre solution de WLC sont aussi affichées. Figure tirée de [5]

L'ADN double brin est assez logiquement mal décrit par le modèle FJC car les interactions d'empilement des bases ne permettent pas une rotation libre et indépendante des nucléotides, hypothèse de ce modèle. Le modèle WLC s'ajuste presque parfaitement aux données expérimentales, signe que l'ADN double brin se comporte tel un polymère semi-flexible. Les 2 différentes versions de WLC sont 2 interpolations analytiques différentes proposées par Marko et Siggia ou Bouchiat³. Pour des forces inférieures à 0,1 pN le modèle FJC s'accorde tout de même bien aux données. A une force de 65 pN, la molécule d'ADN subit une transition structurale avec une autre conformation que l'ADN-B : l'ADN-S de longueur de persistance 1,7 fois plus grande que celle de l'ADN-B. Le modèle extensible de WLC est le meilleur car il inclut une réponse non linéaire ce qui lui permet d'être valable pour des forces comprises entre 0,01 et 100 pN.

Ces résultats théoriques sont très intéressants et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord d'un point de vue fondamental, cela permet de créer des modèles généraux visant à reproduire au mieux le comportement de cette molécule essentielle qu'est l'ADN. De plus, les résultats sont essentiels

3. C. Bouchiat, M.D. Wang, J.F. Allemand, T. Strick, S.M. Block, V. Croquette, Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force extension measurements, *Biophys. J.* 76 (1999) 409.

aux expérimentateurs. En effet, comme on le verra par la suite, les courbes de force-extension théoriques (de WLC) sont un excellent comparatif pour s'assurer de l'étude de molécule unique. Sans s'assurer qu'une unique molécule soit présente, ou plutôt attachée à une bille comme on le verra par la suite, quelle est la pertinence des données ? Dans une solution de fragments d'ADN, l'accrochage entre une molécule et la bille se fait de manière stochastique et sans mémoire. Cet événement suit alors une loi de Poisson⁴ :

$$P(N, M) = \frac{M^N e^{-M}}{N!} \quad (9)$$

où M est le nombre de molécules d'ADN en solution et N le nombre de molécules d'ADN qui s'accrochent à la bille. Par de rapides calculs, on voit que la probabilité de n'accrocher aucune molécule est d'environ un tiers, d'en attacher une unique est aussi d'un tiers et qu'il est aussi probable d'en attacher plus de 1. Il faut faire attention alors à la contamination des billes par plusieurs molécules d'ADN.

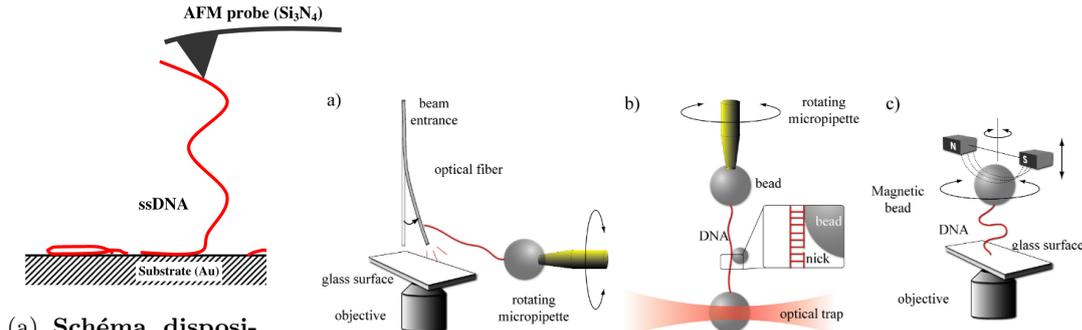
2.3 Simulations numériques

A ces modèles théoriques s'ajoutent de plus en plus de simulations numériques. Que ce soit de Monte Carlo ou de Dynamique Moléculaire, elles permettent de faire varier les paramètres d'étude et d'obtenir des résultats complémentaires aux données expérimentales. Je ne rentrerai pas dans plus de détails dans le cadre de ce projet bibliographique car j'espère les réaliser moi-même dans le cadre du projet informatique de 3ème année de CPES Sciences expérimentales, réalisé après ce papier.

4. Harbron, E. J., Barbara, P. F. (2002). The Poisson Distribution and Single-Molecule Spectroscopy. An Undergraduate Analytical Laboratory Experiment. *Journal of Chemical Education*, 79(2), 211.

3 Micromanipulation de l'ADN

Au cours des années 90, de nombreuses techniques de manipulation de molécules uniques ont été développées. Un principe est commun à toutes ces techniques : attacher la molécule à une surface d'un côté, à un senseur de force de l'autre et la mesure de l'élongation et celle de la force donnent ensuite l'élasticité de la molécule. Il existe différents types de techniques de micromanipulation de molécule unique qui seront présentées dans cette partie : le piège optique, les pinces magnétiques, analyse de force par microfibres, par AFM (*Atomic Force Microscopy* ou microscope à force atomique). Il sera ensuite évoqué une technique développée plus récemment, l'enclume de force, faisant suite au développement des origamis à ADN.



(a) Schéma dispositif AFM - Mesure de force par un AFM (b) Schéma des dispositifs de micromanipulation de molécule unique - a) Dispositif à microfibres, b) Piège optique, c) Pinces magnétiques. Figure tirée de [3] attaché à une surface de substrat d'Or. Figure tirée de [6]

3.1 Les différentes techniques

3.1.1 AFM

Inventé pour étudier la surface de matériau, l'AFM est aujourd'hui grandement utilisé dans l'étude de biomolécules. On étudiera ce dispositif par son application sur l'ADN dans l'étude des interactions d'empilement. En 2007, Ke et al. étudient ces interactions directement grâce à un AFM [6]. Le fonctionnement de l'AFM est le suivant : un microlevier (*microlever*) étudie une surface grâce à une pointe en silice. On analyse les oscillations de ce microlevier grâce à la réflexion d'un faisceau laser sur une photodiode à quadrant. On calibre la photodiode en déplaçant le faisceau. A petit déplacement, la relation linéaire entre le déplacement imposé et connu et l'intensité des quadrants récupérée dans un amplificateur opérationnel permet par la suite d'obtenir les oscillations du microlevier à partir de l'intensité. On déplace l'échantillon grâce à un piézo-électrique de haute précision. Il est calibré la plupart du temps grâce à un interféromètre. La calibration, précisée ici pour l'AFM mais qui ne le sera pas pour les prochaines techniques, est essentielle. En effet, la mesure de la force nécessite de connaître précisément le senseur et sa rigidité. En utilisant des dispositifs dont on connaît la force et en étant très précis sur le déplacement, on peut connaître la rigidité k du senseur : $F = k\delta x$ Pour un AFM la rigidité est de $10^{-2} N/m$ [3]. On peut donc accéder à une force de quelques nanoNewton. C'est le dispositif exerçant la plus grande force. L'AFM peut être utilisé pour imager des surfaces mais aussi pour réaliser des mesures de force. En effet, on peut lier par adsorption la molécule d'ADN.

Ke et al. ont identifié, grâce à ces mesures, à voir en figure 7, des régimes différents spécifiques aux interactions d'empilement-pi. On voit un 1er plateau à 23 pN pour un allongement de 80% du polynucléotides. Celui-ci caractérise les interactions d'empilement-pi. Le second plateau à 113 pN est dû à un changement de conformation du squelette sucre-phosphate. Cette expérience se dis-

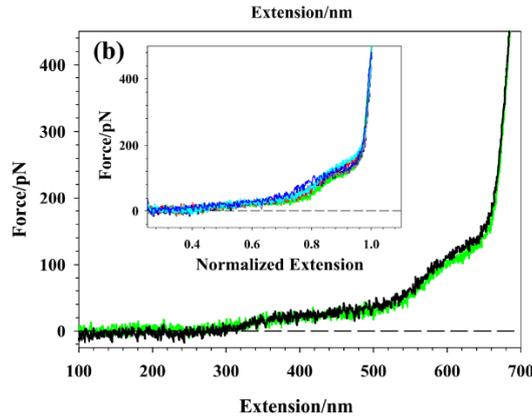


FIGURE 7 – **Force en fonction de l'extension pour des chaînes d'ADN simple brin, poly(dA)** - Les différentes couleurs correspondent à différentes expériences réalisées sur des chaînes de poly(dA) de différentes longueurs. On voit qu'en normalisant par la taille de la molécule les résultats sont identiques. Figure tirée de [6].

tingue des expériences dites de dégrafage de l'ADN⁵ qui, bien que permettant de rendre compte des interactions entre les bases, ne distinguent pas les interactions d'empilement et de complémentarité entre base. En effet ici, seules les interactions d'empilement sont étudiées alors qu'on ne peut le faire lors d'un dégrafage.

3.1.2 Piège optique

“*For the optical tweezers and their application to biological systems*” fut la motivation du prix Nobel de 2018 décerné à Arthur Ashkin⁶. Cela rend compte de l'importance de cette méthode des techniques de micromanipulation en biologie. Décédé récemment fin 2020, il découvrit le piège optique dans un article fondateur paru en 1986 [2]. Il réussit à coincer une particule diélectrique de quelques microns grâce à la pression de rayonnement dans de l'eau. Sa découverte permit de confirmer le concept de piège par champ en gradient ainsi que de démontrer l'existence de pression de rayonnement négative. Un champ électrique en gradient est appliqué. Il y a alors un déplacement du dipôle, la particule diélectrique, vers les zones de champ fort.

Son fonctionnement peut, comme expliqué dans l'article, être facilement compris grâce à l'optique géométrique et la conservation de la quantité de mouvement. En effet, on peut voir sur ce schéma 8 présent dans l'article le photon incident en **A** puis réfracté en **A'** par la différence d'indice de réfraction de la particule ou de la bille. La force résultante, différence des quantités de mouvement, se voit géométriquement par les vecteurs F_A . On comprend assez rapidement que par symétrie, la particule sera piégée proche du point focal d'un faisceau laser et rappelée vers ce point. On peut accrocher à la bille diélectrique une molécule d'ADN. A l'autre extrémité on y accroche une autre bille tenue par une micropipette. Le piège optique sert de surface d'accroche qui permet de connaître analytiquement la force appliquée par la micropipette en tension ou torsion (voir partie b) de la figure 6b).

Smith et al. ont utilisé cet outil en 1996[9] pour étudier le sur-étirement d'une molécule d'ADN. Ce fut l'une des premières utilisations significatives du piège optique pour étudier les réponses mécaniques de la molécule d'ADN.

La plus petite force mesurable est de l'ordre du dixième de picoNewton [3].

5. En voici un des premiers exemples : Essevaz-Roulet B, Bockelmann U, Heslot F. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 28

6. René-Jean ESSIAMBRE, Arthur Ashkin : Father of the optical tweezers. Proceedings of the National Academy of Sciences 2021-02-16 118(7)

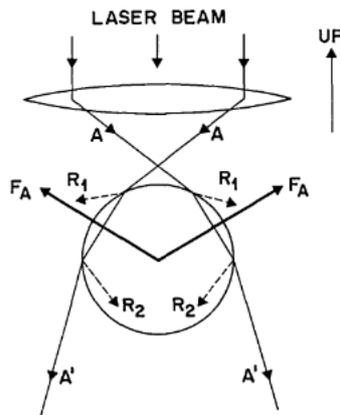


FIGURE 8 – Schéma des forces du piège optique - Schéma d'optique géométrique explicitant la trajectoire des photons incidents A et réfractés A' ainsi que les forces résultantes F_A . Figure tirée de [2].

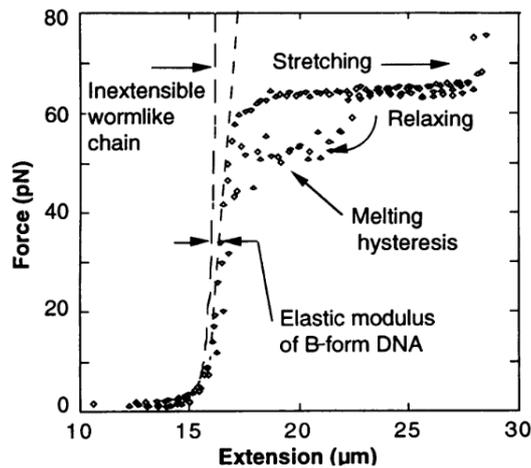


FIGURE 9 – Courbe de force-extension d'ADN- λ à partir d'un piège optique - Figure tirée de [9]

3.1.3 Microfibres

En 1996, Cluzel et al. [4] étudient l'étirement de l'ADN de manière quantitative grâce à un micro fibre optique après avoir lu les travaux de Smith et al. [9] avec le piège optique. D'un côté la molécule d'ADN est attachée à une micropipette par sous pression. De l'autre, elle est attachée à une fibre optique (voir la partie a) de la figure 6b). Cette fibre optique permet de mesurer l'élongation effective de la molécule après avoir tiré la micropipette. En effet, la mesure de la déflexion de la fibre permet de mesurer la force appliquée. Comme précédemment, on peut aussi appliquer une torsion en tournant la micropipette. Un des problèmes de cette technique est la large taille de la fibre optique qui est donc sujette à beaucoup de perturbations browniennes en solution. La rigidité du senseur est de l'ordre de $10^{-5} N/m$. À cause du bruit brownien, la résolution en force n'est néanmoins que de quelques pN [3].

3.1.4 Pinces magnétiques

En 1992, T.R Strick et al publient dans Science la nouvelle technique qu'ils viennent de développer à l'ENS Ulm : les pinces magnétiques [10]. Grâce à cette méthode, ils étudient l'élasticité de molécules d'ADN sur-enroulées. Le principe est le suivant : la molécule d'ADN est attachée à une

surface en verre sur une extrémité et à une bille paramagnétique de l'autre (voir partie c) de la figure 6b). On mesure l'élongation, Δz , par un capteur optique et les coordonnées x et y grâce à une caméra CCD placée sous la surface en verre, voir figure. La bille étant paramagnétique, il est possible d'appliquer une force verticale grâce à un champ magnétique horizontal créé par des aimants. En tournant les aimants, on peut exercer une torsion sur la molécule d'ADN par l'intermédiaire d'un couple sur la bille si le moment magnétique de la bille suit le champ magnétique. Contrairement aux précédentes techniques, les pinces imposent la force appliquée au système par l'intensité du champ et la position de l'objet biologique. En effet la distance typique de variation du champ, quelques nm si on applique comme dans l'article un champ de 0,5T, est grande devant les déplacements de l'objet biologique d'étude et donc la force reste constante. Cette force est de l'ordre de quelques dizaines de femtoNewton. Ce dispositif permet donc d'étudier les plus petits ordres de grandeur de force.

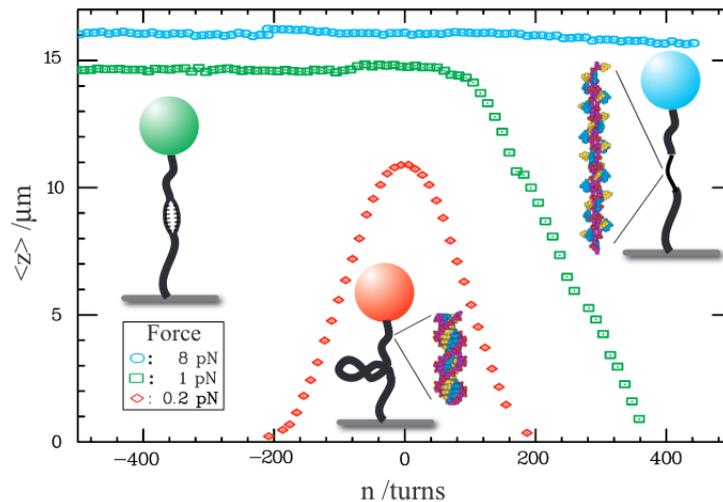


FIGURE 10 – Extension en fonction de la densité de super-enroulement à différentes forces (ADN lambda). Points rouges : $F = 0.2$ pN. L'extension décroît symétriquement pour $n > 0$ et $n < 0$. La molécule forme des plectonèmes. - Points verts : $F = 1.2$ pN. L'extension diminue lorsque $n > 0$ mais reste constante pour $n < 0$. L'ADN se dénature localement et forme des bulles simple brin. - Points bleus : $F = 8$ pN. Il n'y a quasiment aucune variation de la structure ici. L'ADN forme localement des structures appelés ADN-P⁷. Figure et légende tirées de [3], d'après des expériences de J.-F. Allemand et T.R Strick.

3.2 Les questions techniques

3.2.1 Comment est attachée la molécule d'ADN ?

La molécule d'ADN est attachée à la surface grâce au couple DIG/anti-DIG (digoxigénine et un anticorps complémentaire). Elle est attachée à la bille grâce au couple biotine/streptavidine.[3] La biotine et la digoxigénine font partie intégrante des extrémités de la molécule ce qui permet ces couplages. Il existe d'autres couples utilisables mais ceux-ci sont les plus largement utilisés aujourd'hui.

3.2.2 Comment mesurer la force appliquée? La mesure de force par mouvement brownien

A chaque instant, le mouvement brownien tend à décentrer la bille de sa position d'équilibre. Tel un pendule pour lequel la gravité serait le champ magnétique dans le cas des pinces magnétiques, une force de rappel est appliquée à son extrémité. A priori la constante de raideur n'est pas connue.

Néanmoins, le théorème d'équipartition nous permet de lui donner une valeur grâce aux fluctuations de la bille $\langle \delta x^2 \rangle$ et la longueur du "pendule" soit la longueur moyenne de la molécule $\langle z \rangle$.

$$\frac{1}{2}k_x \langle \delta x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (10)$$

On peut donc avoir la force appliquée par les aimants :

$$F = \frac{k_B T \langle z \rangle}{\langle \delta x^2 \rangle} \quad (11)$$

3.2.3 Analyse temporelle ou fréquentielle ?

On a vu que la mesure de la température permet de mesurer la force appliquée grâce au théorème d'équipartition. Néanmoins, comme expliqué durant la partie sur l'AFM, la dérive thermique vient perturber les mesures. Pour cela, un passage dans l'espace de Fourier permet d'enlever l'effet de la dérive thermique visible aux petites fréquences car elle a une dépendance en $1/f$.⁸

3.2.4 Quelles sont les limites ?

Ces instruments ont tous un problème commun, ils sont à champ proche : une faible perturbation et la mesure n'est plus valable. La perturbation inévitable est la dérive thermique. Elle est due à la dilatation thermique des composants du montage expérimental mais aussi de la paillasse. Pour éviter que la variation de température influe sur la mesure, il faut alors la réaliser durant une durée inférieure au temps typique de variation non négligeable de la température soit une centaine de microsecondes. Au-delà, il y aura une dissipation d'énergie et le travail appliqué sera évacué sous forme de chaleur. On ne mesurera alors plus exactement la force appliquée, soit le travail mais aussi le travail perdu sous forme de chaleur par dissipation. La question fondamentale change alors : on ne se demande plus quelle est la force limite à appliquer car celle-ci dépend du temps mais plutôt quelle est la durée de vie de l'interaction en fonction de la force appliquée. Ce problème s'applique à toutes les autres techniques de micromanipulation dont la suivante est le piège optique. De plus comme on a pu le voir, chaque technique a ses limites en terme de résolution et de limite de la force applicable.

3.3 Enclume de force et origamis

En 2006, Paul Rothmund, alors informaticien à Stanford, s'intéresse à l'auto-organisation à l'échelle nanométrique⁹.

Il pense alors à utiliser l'ADN pour réaliser des structures plus complexes. C'est l'invention des origamis d'ADN. En effet, en prenant une molécule d'ADN simple brin, on peut la faire suivre un algorithme dictant sa position et se fixant grâce à des oligonucléotides. De nombreux patterns de traçage d'origami existants peuvent alors être utilisés pour recréer tout cela avec de l'ADN. Des plus amusants aux plus sophistiqués, voir figure, ces origamis ont permis de penser autrement l'utilisation d'ADN. Celle-ci devient non plus l'objet d'étude mais l'instrument de mesure. C'est ce qu'ont réalisé Nickels et al. en 2016 [8].

Grâce aux origamis d'ADN, ils ont pu réaliser une enclume à force. La force voulue est exercée grâce au caractère entropique de l'ADN simple brin. L'ADN simple brin va relier l'objet d'étude à ses deux extrémités en étant elle-même reliée à 2 points d'ancrage immobile, voir figure A. En réduisant le nombre de bases de cette molécule d'ADN simple brin, on réduit sa longueur de contour ce qui affecte la force entropique résultante, voir figure A et C. La structure permettant de tenir ce système est elle-même composée d'ADN, double brin cette fois. La structure en baril permet de placer l'objet d'étude au centre en le reliant aux ADN simple brin qui sont reliés de manière fixe au support, voir figure B. La force est directement calculée en considérant l'ADN simple brin comme ressort entropique de longueur de contour $L_c = N L_b$ avec N le nombre de nucléotides et L_b la

8. Cours de biophysique de Terence Strick, L3 Biologie ENS Ulm. Ceci permet de faire aussi le lien avec le projet bibliographique de Corentin Lucas sur le bruit en $1/f$

9. Rothmund, P. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Nature 440, 297–302 (2006)

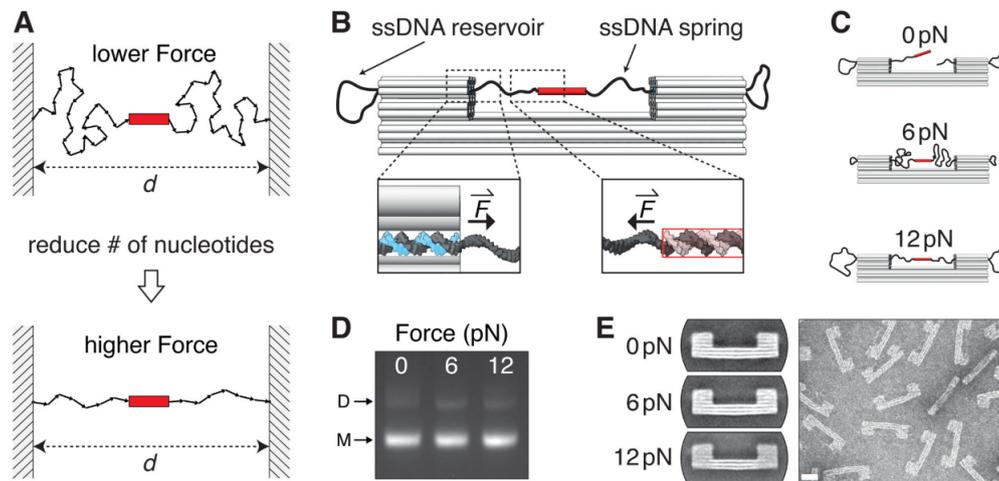


FIGURE 11 – **Enclume de force en origami d'ADN** - (A) l'ADN simple brin relie l'objet d'étude (rectangle rouge) à 2 points d'ancrage immobiles. En réduisant le nombre de nucléotides, il y a moins de configurations possibles pour l'ADN et non donc la force entropique est plus forte. (B) Schéma de la structure l'enclume de force en origami d'ADN. Des réservoirs d'ADN aux extrémités permettent de contrôler la longueur de l'ADN simple brin à l'intérieur et donc de contrôler la force (C). (D) Électrophorèse des origamis. (E) Microscopie Électronique en Transmission des origamis. A gauche les 3 différents modèles et à droite plusieurs origamis de 6pN. Barre d'échelle : 20nm Figure et légende tirées de [8]

longueur par base (voir partie 1). Cette enclume a été utilisée dans l'étude d'interactions ADN-protéine notamment dans le cadre de facteurs de transcription. De nombreux systèmes comme celui-ci peuvent être facilement produits ce qui permet d'avoir un beaucoup plus grand nombre de données de manière beaucoup plus abordable. Les inconvénients des précédentes techniques (beaucoup de bruit thermique, dérive thermique,...), notamment dus au monde macroscopique, sont ainsi évités. Par le caractère autonome de ces systèmes, l'invasivité est d'autant plus réduite. De plus, cette autonomie permet aussi la mesure de la force mais cette fois de manière ajustable contrairement à de précédents travaux.

Les origamis d'ADN sont une perspective d'avenir dans de nombreux autres domaines que l'étude mécanique des biomolécules. Que ce soit en médecine pour une probable encapsulation de médicament par l'ADN, ou en stockage de l'information, le développement de cette technologie devrait avoir un fort impact dans les prochaines années.



FIGURE 12 – **Smiley d'ADN** - Réalisé par Paul Rothemund.

4 Conclusion

Pour conclure, nous avons exposé les notions fondamentales pour étudier la mécanique de la molécule de l'ADN. Après avoir rappelé la structure de la molécule et les différentes forces présentes à cette échelle, nous avons expliqué quelques notions théoriques. Nous avons tout d'abord présenté des éléments de topologie avec l'indice d'enlacement, la vrille, la torsade et le sur-enroulement ; ainsi que les plectonèmes et les solénoïdes. Ensuite, nous avons présenté les modèles théoriques de polymères appliqués à l'ADN. Du modèle gaussien, au modèle du ver qui est le plus précis, en passant par le modèle de la chaîne libre, on a pu voir les mesures théoriques de force-extension. Nous avons pour finir présenté les différentes techniques de micromanipulation de l'ADN : l'AFM, les microfibres, le piège optique, les pinces magnétiques, et l'enclume de force. Aujourd'hui, l'heure est au développement des nanotechnologies à base d'ADN, à l'exemple des origamis. Cette molécule, fondement du vivant, est sortie des laboratoires de biologie cellulaire et moléculaire pour aller vers de nombreux nouveaux secteurs grâce à ses propriétés remarquables.

Références

- [1] A. AGGARWAL, S. NASKAR, A. K. SAHOO, S. MOGURAMPELLY, A. GARAI, AND P. K. MAITI, What do we know about DNA mechanics so far?, *Current Opinion in Structural Biology*, 64 (2020), pp. 42–50.
- [2] A. ASHKIN, J. M. DZIEDZIC, J. E. BJORKHOLM, AND S. CHU, Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Opt. Lett.*, OL, 11 (1986), pp. 288–290. Publisher : Optica Publishing Group.
- [3] G. CHARVIN, Etudes des topoisomérases de type II par micromanipulation d’ADN, p. 185.
- [4] P. CLUZEL, A. LEBRUN, C. HELLER, R. LAVERY, J. L. VIOVY, D. CHATENAY, AND F. CARON, DNA : an extensible molecule, *Science*, 271 (1996), pp. 792–794.
- [5] S. COCCO, J. F. MARKO, AND R. MONASSON, Theoretical models for single-molecule DNA and RNA experiments : from elasticity to unzipping, *Comptes Rendus Physique*, 3 (2002), pp. 569–584.
- [6] C. KE, M. HUMENIUK, H. S-GRACZ, AND P. E. MARSZALEK, Direct Measurements of Base Stacking Interactions in DNA by Single-Molecule Atomic-Force Spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.*, 99 (2007), p. 018302.
- [7] S. M. MIRKIN, DNA Topology : Fundamentals, in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, ed., Wiley, 1 ed., May 2001.
- [8] P. C. NICKELS, B. WÜNSCH, P. HOLZMEISTER, W. BAE, L. M. KNEER, D. GROHMANN, P. TINNEFELD, AND T. LIEDL, Molecular force spectroscopy with a DNA origami-based nanoscopic force clamp, *Science*, 354 (2016), pp. 305–307. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [9] S. B. SMITH, Y. CUI, AND C. BUSTAMANTE, Overstretching B-DNA : The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules, *Science*, 271 (1996), pp. 795–799. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- [10] T. R. STRICK, J.-F. ALLEMAND, D. BENSIMON, A. BENSIMON, AND V. CROQUETTE, The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule, *Science*, 271 (1996), pp. 1835–1837.