

## Stage M2 : Mécanique statistique de l'ADN

Sébastien Neukirch

*Institut Jean Le Rond d'Alembert  
CNRS & UPMC Univ Paris 06 : UMR 7190  
75 005 Paris, France  
sebastien.neukirch@upmc.fr*

Stage et thèse en collaboration avec John Marko (Department of Molecular Biosciences, Northwestern University – près de Chicago).

### La molécule d'ADN

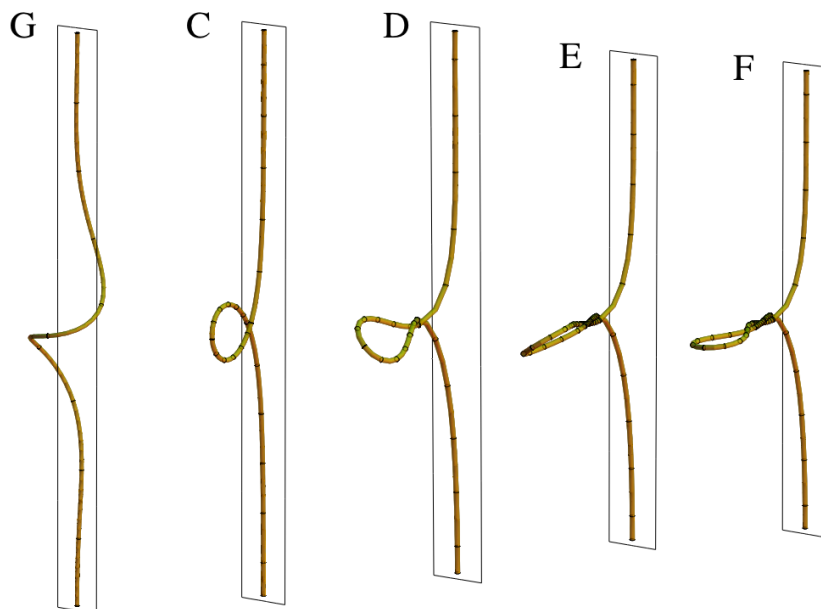


FIGURE 1 – Cinq configurations d'équilibre d'une poutre soumise à une contrainte de torsion de plus en plus importante. La poutre fini par s'enrouler sur elle même, formant des plectonèmes.

On retrouve beaucoup de 'filaments' en biologie. Evidemment un système biologique est un système complexe et la tendance qu'ont les mathématiciens, mécaniciens et physiciens à dénuder un système ou un modèle de toutes les couches non nécessaires à la compréhension du mécanisme étudié laissent parfois les biologistes perplexes. La phrase que l'on entend le plus souvent en interagissant avec un biologiste est : "mais c'est plus compliqué que ça !". Souvent, ce qui est compliqué c'est de débroussailler le problème. Une fois le mécanisme isolé, c'est souvent (relativement) simple...

La molécule d'ADN porte notre information génétique. Il y a deux mètres d'ADN dans chacune de nos cellules (de taille  $\sim 10 \mu\text{m}$ ). Cet ADN est donc fortement condensé dans le noyau cellulaire. Néanmoins à chaque fois qu'il faut lire un gène, pour la synthèse d'une protéine, ou le code génétique complet, lors de la division cellulaire, cet ADN doit être décondensé. Les propriétés mécaniques du filament d'ADN (e.g. rigidité de flexion et de torsion) jouent donc un rôle important dans la biologie de la cellule. Pour tester ces propriétés mécaniques, des biochimistes et biophysiciens ont construit des appareils capables de manipuler des molécules individuelles d'ADN [1, 2]. Les

expériences sont des tests de traction-torsion, voir Figure 1. Nous avons montré comment on pouvait utiliser les relevés expérimentaux pour donner une estimation de la rigidité de torsion de la molécule d'ADN [3], ainsi que pour caractériser l'interaction électrostatique de la molécule avec elle-même [4].

### Les expérience sur molécules individuelles

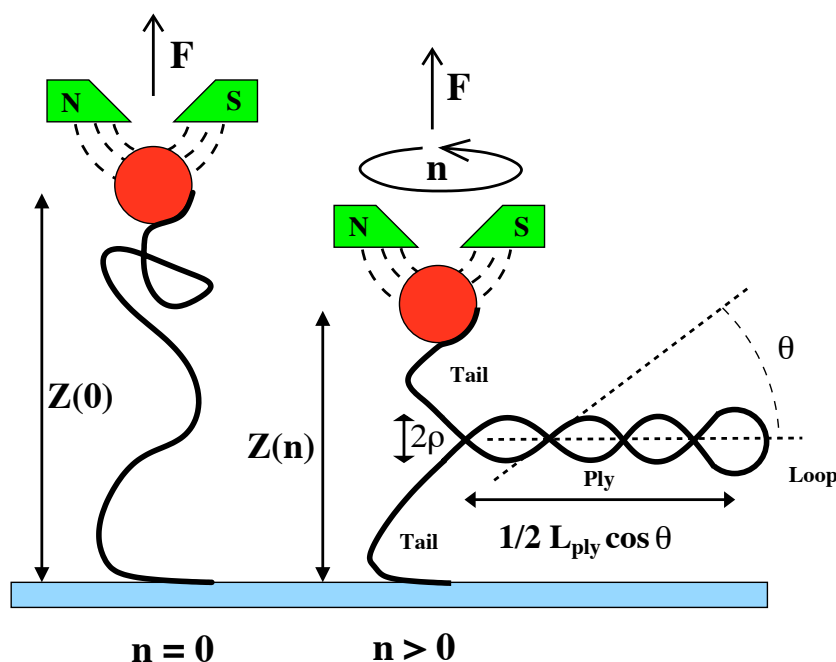


FIGURE 2 – Une expérience de traction-torsion sur la molécule d'ADN. Si le nombre de tours imposés dépasse un seuil, la molécule s'entortille sur elle-même : formation de plectonèmes.

De nombreux dispositifs expérimentaux ont été créés pour étudier la molécule d'ADN. Les expériences de migration de molécules dans un gel soumis à un champ électrique (électrophorèse sur gel) permettent de séparer les molécules selon leur taille mais aussi selon le degré de sur-enroulement. La microscopie électronique permet de 'voir' les structures tertiaires des molécules, bien que les conformations soient confinées à un plan. La technique d'imagerie par force atomique, qui utilise un petit bras flexible capable de générer des forces allant jusqu'au nano Newton (force typique de rupture de la liaison covalente), permet de tester la résistance à la rupture de nombreuses molécules. Des méthodes utilisant la force de trainée visqueuse peuvent permettre d'étirer la molécule ou de la sortir d'une capsid de virus par exemple. Mais nous nous intéresseront ici aux expériences où ce sont des 'pinces' (optiques ou magnétiques) qui viennent saisir la molécule (ou plutôt une bille collée à la molécule). Le dispositif permet alors, via la pince, de soumettre *une* molécule d'ADN à des contraintes de tension et de torsion. Plus précisément dans le dispositif des pinces magnétiques, figure 2, développé il y a maintenant plus de dix ans au Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure de Paris dans le groupe animé par V. Croquette et D. Bensimon, une molécule d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases est agrafée à une de ses extrémités sur un capillaire de verre tandis que l'autre extrémité est attachée à une bille (super-para-) magnétique [2]. De forts aimants permanents ( $\sim 0,5$  Tesla) permettent de tirer la bille vers le haut et en même temps de lui imposer une rotation autour d'un axe vertical : l'expérience est réalisée en force imposée ( $\sim$  pN) et rotation imposée (plusieurs dizaines de tours). Une camera CCD et un microscope permettent de suivre les déplacements verticaux de la bille : l'extension bout à bout  $\Delta Z$  de la molécule est relevée pour chaque valeur du nombre de tours  $n$  imposé au système. Les courbes expérimentales ainsi obtenues sont appelées courbes d'extension-rotation, voir figure 3.

Lorsqu'aucune rotation  $n$ 'est imposée, l'extension  $\Delta Z$  de la molécule est relevée en fonction de la force appliquée. Le modèle du ver donne une formule [5] liant la force appliquée  $F_{ext}$  et l'extension  $\Delta Z$ . Cette formule permet d'extraire la longueur de persistance  $L_p$  des données expérimentales, par ajustement. On maintient maintenant la force fixée et on impose une rotation à la bille. A faible nombre de tours, l'extension  $\Delta Z$  décroît avec  $n$  de manière quadratique [6]. La configuration de la molécule ressemble toujours à un ver mais un peu plus entortillé qu'auparavant. Pour une valeur seuil du nombre de tours, une transition a lieu et l'extension de la molécule décroît alors linéairement avec  $n$ . La transition est d'autant plus nette que la force imposée est importante. La configuration de la molécule change qualitativement et comprend maintenant deux régions : (i) des parties 'linéaires' en forme de ver et (ii) une (ou des) parties où la molécule est enroulée autour d'elle-même à la manière d'une torsade à deux

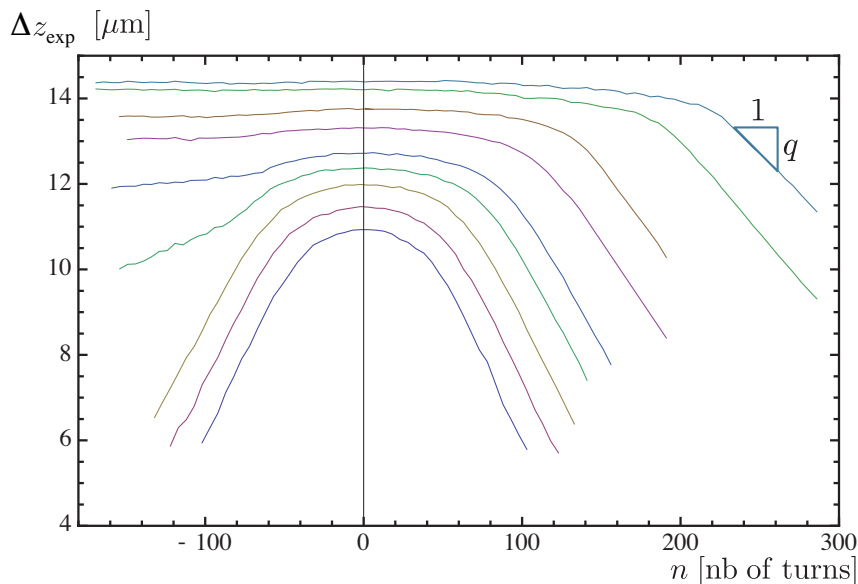


FIGURE 3 – Courbes expérimentales d’extension-rotation comprenant une zone de décroissance linéaire (de pente  $-q$ ) de l’extension  $\Delta z_{\text{exp}}(n)$  en fonction du nombre de tours imposés  $n$ . Ces courbes ont été réalisées avec la molécule d’ADN de 48kpb du virus bactériophage  $\lambda$ . Chaque courbe correspond à une force de tension fixe,  $F_{\text{ext}}$  : 0.25, 0.33, 0.44, 0.57, 0.74, 1.10, 1.31, 2.20, 2.95 pN (du bas vers le haut). Ces données proviennent du groupe de V. Croquette et D. Bensimon (CNRS).

brins : on parle de plectonèmes.

## Résultats

Nous avons d’abord montré que l’on pouvait extraire la valeur de la rigidité de torsion de la molécule d’ADN en utilisant les courbes expérimentales [3]. En effet nous avons montré que la partie linéaire de la courbe extension-rotation pouvait être décrite par la formule :

$$\frac{\Delta Z(n)}{\Delta Z(0)} = 1 + \frac{K_0}{K_3} \left( \frac{1}{\cos 2\theta} - 1 \right) - \frac{4\pi R}{L \sin 2\theta} n \quad (1)$$

où  $R$  et  $\theta$  sont le rayon et l’angle de sur-enroulement, propriétés de la phase plectonémique, et  $K_0 = L_p kT$  la rigidité de flexion de la molécule. Cette formule montre bien que  $\Delta Z(n)$  est une fonction linéaire de  $n$  et que la donnée de l’ordonnée à l’origine permet de calculer la valeur de  $K_3$ , jusqu’ici inconnue.

Puis, dans le cadre de la thèse N. Clauvelin (voir par exemple [4]), nous avons montré comment ces expériences d’enroulement sous contrainte de torsion de la molécule d’ADN pouvaient apporter de l’information sur le potentiel de répulsion électrostatique de la molécule sur elle-même (la molécule est un polymère fortement chargé, et ses interactions avec les enzymes dépendent de ce potentiel de répulsion électrostatique). En effet nous avons montré que les propriétés de la phase plectonémique (i.e.  $R$  et  $\theta$ , rayon et angle de sur-enroulement) pouvaient être calculées grâce un modèle faisant appel à l’énergie d’interaction d’un polymère chargé en solution saline. Nous avons comparé des énergies d’interaction dérivant de la théorie de Poisson-Boltzmann (PB) et de la théorie de la condensation des contre-ions de Manning (CC), et montré qu’une énergie calculée dans l’approximation linéaire Debye-Huckel de la théorie de Poisson-Boltzmann donnait des prédictions des propriétés de la phase plectonémique, et donc des pentes des courbes d’extension-rotation (facteur de  $n$  dans l’équation (1)) proches des valeurs expérimentales, et ceci sans paramètre ajustable, voir figure 4.

Enfin nous avons donné une prédiction du moment de torsion présent dans la molécule lors de la phase de sur-enroulement [7]. Ce moment de torsion est une quantité importante car il a été montré par exemple que la polymérase ARN (ARNP : enzyme à l’origine de la transcription du code génétique en protéine) était sensible au moment de torsion présent dans la molécule d’ADN, à savoir qu’un moment de torsion trop grand empêche la formation du complexe ARNP-promoteur [9]. La formule théorique que nous avons proposée a été testée et vérifiée dans le cadre d’expériences du groupe Croquette-Bensimon, voir figure 5.

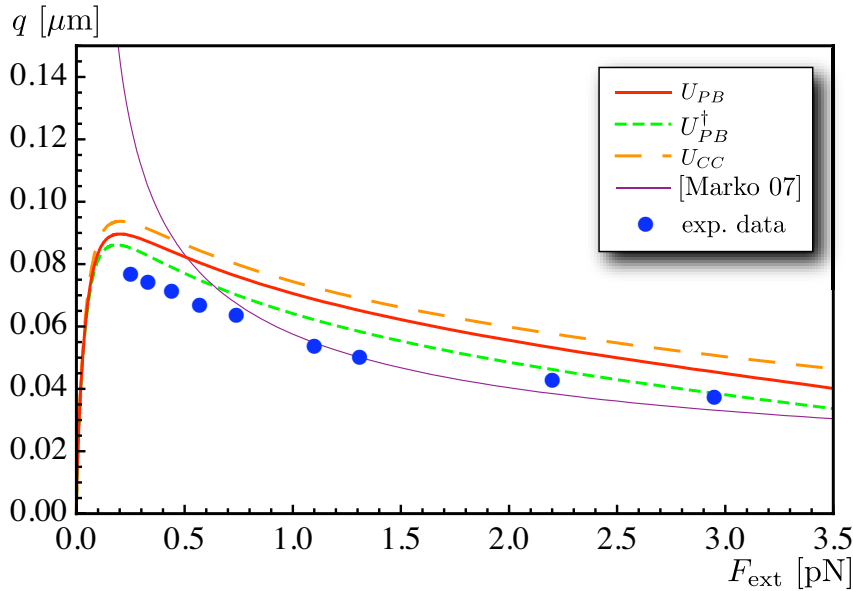


FIGURE 4 – Valeurs théoriques de la pente  $q$  de la partie linéaire des courbes d’extension-rotation en fonction de la force appliquée  $F_{\text{ext}}$ . Les disques correspondent aux relevés expérimentaux (cf. Fig. 2 dans [7]). La courbe (mauve) en trait fin est tracée d’après le modèle introduit dans [8], où les paramètres suivants ont été utilisés :  $A = 50$  nm,  $C = 95$  nm and  $P = 28$  nm.

## Projet : Mécanique statistique de l’ADN

Les expériences sur molécules individuelles d’ADN sont pratiquées à température ambiante sur des filaments d’ADN nanométriques. Il est donc évident que les fluctuations thermiques jouent un rôle important dans la réponse de la molécule. De fait, lorsqu’aucune torsion n’est appliquée à la molécule, ses configurations et son extension sont décrites par le modèle du ver (worm-like-chain) [5]. Lors du sur-enroulement nos travaux ont montré que les fluctuations thermiques pouvaient être prises en compte de manière simple, en renormalisant la longueur des parties terminales (i.e. des parties non sur-enroulées) [3, 7, 4, 11].

Si les zones de faible rotation imposée (avec réponse type worm-like-chain) et de forte rotation imposée (réponse type plectonèmes) sont bien comprises, la zone de transition, elle, reste à étudier. Des expériences récentes [12] ont montré que la transition pouvait avoir lieu de manière brutale (voir courbe rouge sur figure 6). Cette transition est un exemple type du comportement statistique de la molécule. En effet si les expériences étaient réalisées sur un filament macroscopique (une poutre sous torsion) la transition aurait lieu au point de bifurcation fourche sous-critique (‘buckling at  $T=0$  K’ sur la figure 6), lorsque l’état droit sous torsion perd sa stabilité. Les fluctuations thermiques présentes dans un filament microscopique modifient profondément cette transition qui a lieu bien avant (pour une rotation imposée bien plus petite). La transition a lieu dès que les énergies des deux états sont égales (même probabilité de présence dans chacun des états).

Le but ici est de faire un traitement de type mécanique statistique où la probabilité d’une configuration est donnée son poids de Boltzmann ( $e^{-F/kT}$ , où  $F$  est l’énergie libre de la configuration). A priori on doit considérer toutes les configurations possibles, c’est à dire toute les orientations possibles de chaque segment décrivant chaque petite partie de la molécule. Néanmoins ici nous ferons une hypothèse réduisant drastiquement l’espace des états : on ne considère que des configurations de type worm-like-chain, plectonémiques et comprenant un boucle unique, voir figure 7. Cette restriction vient de l’observation des configurations stables calculées dans le cadre de l’équilibre élastique d’une poutre sous contrainte de torsion et tension (voir Activités de Recherche). On commencera donc par écrire l’énergie libre des différents états comprenant  $n$  boucles isolées et  $m$  parties plectonémiques, voir figure 7. La fonction de partition et les probabilités sont alors calculées simplement :

$$Z = \sum_{n,m,\dots} e^{-F(n,m,\ell,R,\theta,\gamma,\dots)/kT} \quad (2)$$

Les résultats de quelques calculs préliminaires sont présentés en figure 8.

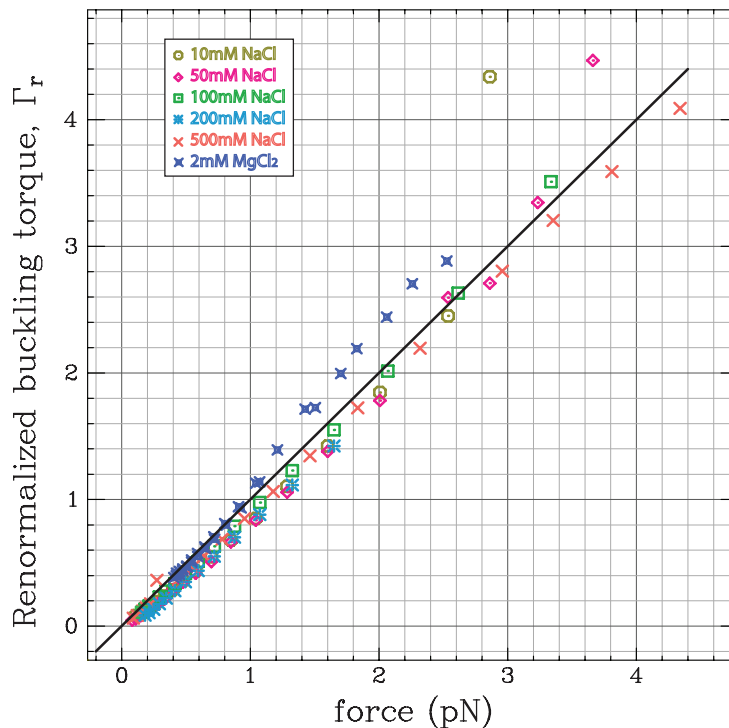


FIGURE 5 – Prédiction théorique du moment de torsion dans la molécule d’adn sur-enroulée (droite de pente 1) et comparaison avec les données expérimentales de [10].

### Interaction ADN-protéines

Les expériences sur molécules individuelles ont montré que l’élasticité et les forces engendrées aux échelles nanométriques jouent un rôle majeur dans les interactions entre les enzymes (protéine ou autre molécule qui joue le rôle de catalyseur dans les processus biologiques de la cellule) et l’ADN. Les techniques de micro-manipulation permettent en fait souvent de mesurer les taux de réaction, les sauts entre les configurations de ces enzymes en fonction de la concentration en ATP ou bien des contraintes présentes dans la molécule d’ADN. Il faut rappeler que le fait que les bases (qui portent le code génétique) soient cachées au centre de la double hélice fait que l’ADN est une molécule très stable. Par conséquent les enzymes ont fort à faire lorsqu’il s’agit d’initier une opération de duplication, transcription, correction ou autre.

Dans ce cadre le but sera d’étudier par exemple des enzymes dont le rôle est de courber l’ADN (type HU ou HMG) et de voir comment l’activation du complexe protéine-ADN peut être mesuré grâce à l’appareillage des pinces magnétiques. De la même façon des protéines du type Lac repressor induisent des boucles sur l’ADN [13]. Il s’agira d’abord de faire un calcul élastique pour déterminer l’énergie de déformation élastique, puis d’utiliser cette information dans un traitement du type mécanique statistique, semblable à celui décrit plus haut.

### Références

- [1] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258 :1122–1126, 1992.
- [2] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271 :1835–1837, 1996.
- [3] S. Neukirch. Extracting DNA twist rigidity from experimental supercoiling data. *Physical Review Letters*, 93(19) :198107, 2004.
- [4] N. Clauvelin, B. Audoly, and S. Neukirch. Elasticity and electrostatics of plectonemic DNA. *Biophysical Journal*, 96(9) :3716–3723, 2009.
- [5] J. F. Marko and E. D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28 :8759–8770, 1995.
- [6] J. David Moroz and Philip Nelson. Entropic elasticity of twist-storing polymers. *Macromolecules*, 31 :6333–6347, 1998.
- [7] N. Clauvelin, B. Audoly, and S. Neukirch. Mechanical response of plectonemic DNA : An analytical solution. *Macromolecules*, 41(12) :4479–4483, 2008.

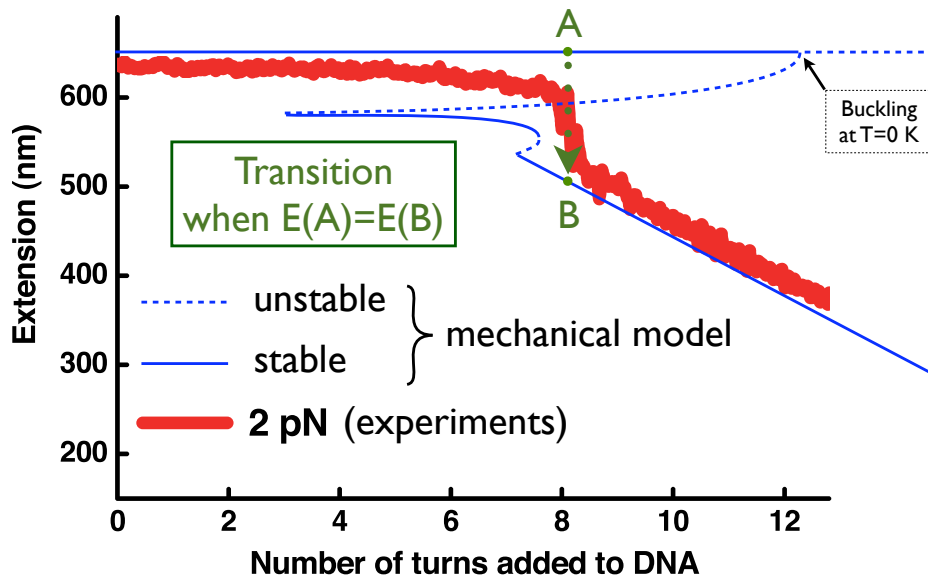


FIGURE 6 – A cause des fluctuations thermiques, la transition entre l'état droit sous torsion et l'état sur-enroulé n'a pas lieu au point de bifurcation 'classique' mais dès que les énergies des deux états sont égales.

- [8] J. F. Marko. Torque and dynamics of linking number relaxation in stretched supercoiled DNA. *Physical Review E*, 76 :021926, 2007.
- [9] Andrey Revyakin, Richard H. Ebright, and Terence R. Strick. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase : Detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14) :4776–4780, 2004.
- [10] Francesco Mosconi, Jean-François Allemand, David Bensimon, and Vincent Croquette. Measurement of the torque on a single stretched and twisted dna using magnetic tweezers. *Physical Review Letters*, 102(7) :078301, 2009.
- [11] Sébastien Neukirch and John F. Marko. Analytical description of extension, torque, and supercoiling radius of a stretched twisted DNA. *Phys. Rev. Lett.*, 106(13) :138104, 2011.
- [12] Scott Forth, Christopher Deufel, Maxim Y. Sheinin, Bryan Daniels, James P. Sethna, and Michelle D. Wang. Abrupt buckling transition observed during the plectoneme formation of individual DNA molecules. *Physical Review Letters*, 100(14) :148301, 2008.
- [13] Alexander Balaeff, L. Mahadevan, and Klaus Schulten. Modeling DNA loops using the theory of elasticity. *Phys. Rev. E*, 73(3) :031919, 2006.

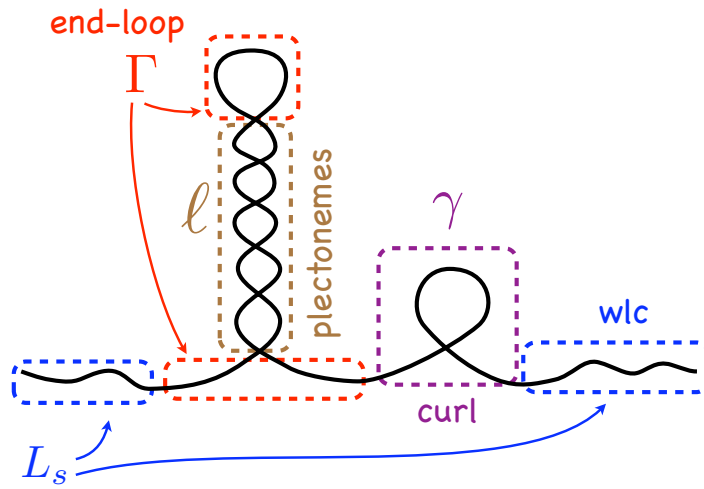


FIGURE 7 – Un traitement de type physique statistique du filament fait intervenir plusieurs zones dans la molécule qui contribuent de manière différentes à l'énergie libre du système global.

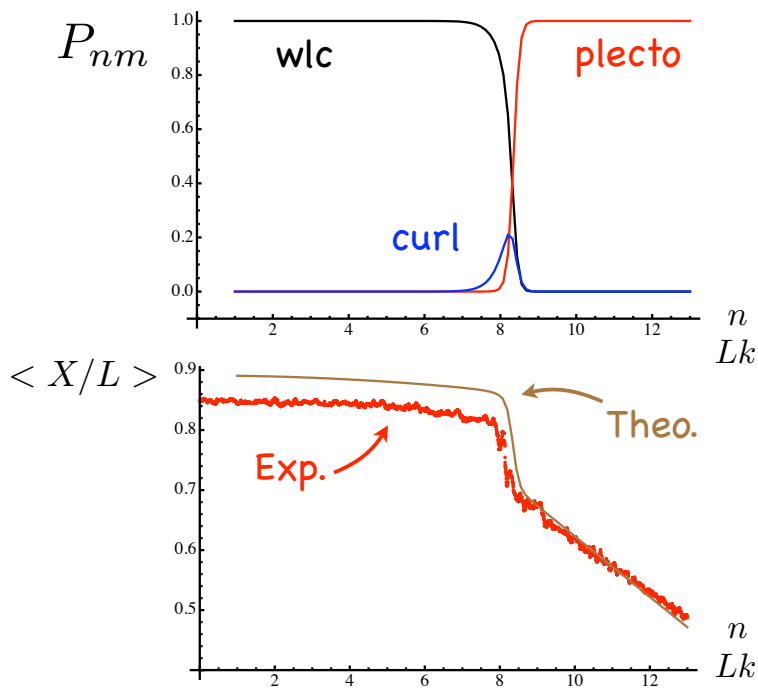


FIGURE 8 – Premiers résultats : (i) calcul des probabilités d'existence des différentes configurations (haut), et (ii) extension moyenne théorique (trait fin, marron) et expérimentale (courbe bruitée, rouge) du filament (bas).