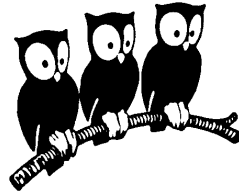


ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE
DÉPARTEMENT de PHYSIQUE



Laboratoire de Physique Statistique

CNRS - Universités Paris 6 et Paris 7

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET
MARIE CURIE

Spécialité : Physique des liquides

présentée le 12 décembre 97 par : J. F. ALLEMAND

pour obtenir le grade de Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

**Titre : MICRO-MANIPULATIONS DE MOLÉCULES D'ADN
ISOLÉES**

Devant le jury composé de :

Mme Anne Marie CAZABAT

M. Didier CHATENAY

M. Vincent CROQUETTE

M. Jean-Marc DI MEGLIO

M. Jacques DUBOCHET

M. Jacques PROST

à Corinne

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée dans l'équipe co-dirigée par David Bensimon et Vincent Croquette. J'ai pu y apprécier leurs compétences, leur enthousiasme et leur gentillesse. L'approche complémentaire des problèmes par David et Vincent fait qu'il est très enrichissant d'apprendre en leur compagnie. Ils ont passé beaucoup de temps à me faire comprendre ce que mes neurones avaient parfois du mal à assimiler. Je leur en suis très reconnaissant et j'espère que je me montrerais digne de leur enseignement à l'avenir.

Je remercie plus particulièrement Vincent qui a accepté de diriger cette thèse et dont l'approche des problèmes expérimentaux avec intuition et rigueur restera un exemple pour moi.

Terence Strick a eu l'idée de la construction d'ADN de phage λ bloquée en rotation et l'a mise en œuvre. Sans lui cette thèse aurait certainement contenue moins de résultats, je lui en suis très reconnaissant.

Il a également contribué avec David et Vincent et Charlie Gosse à l'ambiance souvent joyeuse du labo. Je les remercie tous pour leur amitié.

Tout ce travail s'est effectué dans d'excellentes conditions matérielles au Laboratoire de Physique Statistique. Je remercie pour cela les deux directeurs successifs qui m'ont accueilli à savoir Jean Vannimenus et Sébastien Balibar.

Je suis reconnaissant à Didier Chatenay et Jean-Marc Di Meglio d'avoir accepté de faire partie du jury mais aussi de remplir les tâches qui incombent aux rapporteurs. Je remercie Anne Marie Cazabat, Jacques Dubochet et Jacques Prost de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Dans la dernière partie de la thèse nous utilisons un ADN préparé par François Caron. Je n'ai malheureusement pas eu le temps de le remercier pour nous l'avoir donné, ni de lui montrer tous les résultats que nous avons obtenus avec cet ADN. Je lui suis très reconnaissant.

Je remercie tous les gens avec qui j'ai pu avoir des échanges formels ou informels. Je pense en particulier à : Ludovic Jullien, Claude Bouchiat, Marc Mézard, John Marko, Richard Lavery, Isabelle Lucas, Chrystelle Maric, Olivier Hyrien, Philippe Cluzel, Étienne Delain, Emmanuelle Lacaze, Arnaud Chiffaudel, Aaron Bensimon... Que ceux que j'ai oubliés me pardonnent.

Parmi les contributions non scientifiques mais **indispensables** à ce travail je voudrais citer celles de Carole Philippe, de Lucien Brouard, de Jacques Kerbourniou et de Jean-Claude Sutra-Fourcade.

Durant cette thèse j'ai également enseigné. Le contact des élèves et celui des autres enseignants a été un plus important qui m'a obligé à étendre mes connaissances en physique. A tous je dois beaucoup, en particulier à Virginie Emsellem.

J'ai eu durant mes études d'excellents enseignants qu'ils soient ici remerciés.

Ce manuscrit est égayé de magnifiques recettes (que j'ai testées) empruntées au livre d'Olivier Roellinger [Roellinger, 1994]. Je remercie ce très grand cuisinier ainsi que sa femme qui m'a autorisée à les reproduire. On peut trouver la référence de son ouvrage dans la bibliographie. Pour moi la grande cuisine a des points communs avec la recherche : il faut beaucoup de travail, de la technique, mais aussi de l'intuition et un certain sens de l'harmonie. Les repas à Cancale, dans le restaurant des Roellinger, avec Corinne, suivis de promenade sur la côte bretonne ont été autant d'instant privilégiés qui ont jalonné cette thèse.

Merci enfin à Corinne, à mes parents et grands-parents

Table des matières

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I | L’A.D.N. | 15 |
| 1 | Introduction | 15 |
| 2 | Structure de la molécule | 15 |
| 2.1 | Structure primaire | 15 |
| 2.2 | Structure secondaire | 16 |
| 2.3 | Structures tertiaires | 17 |
| 2.4 | Remarques | 18 |
| 3 | Intérêt de l’ADN pour le physicien | 18 |
| II | Peignage moléculaire | 23 |
| 4 | Généralités | 23 |
| 5 | Principe du peignage moléculaire | 23 |
| 5.1 | Description | 23 |
| 5.2 | Visualisation des molécules | 25 |
| 5.3 | Mise en œuvre | 26 |
| 5.3.1 | Procédé expérimental | 27 |
| 6 | Fixation à la surface | 27 |
| 6.1 | Historique | 28 |
| 6.2 | Surfaces utilisées et comportement observé | 28 |
| 6.3 | Quantification de l’effet | 29 |
| 6.3.1 | Influence du pH | 29 |
| 6.3.2 | Vérification du rôle des extrémités | 30 |
| 7 | Mécanismes | 31 |
| 7.1 | Surfaces chargées | 32 |
| 7.2 | Surfaces hydrophobes | 32 |
| 7.3 | Cas du PMMA | 33 |
| 8 | Tests du modèle | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 8.1 | Surfaces chargées positivement | 33 |
| 8.1.1 | Influence du pK_A | 33 |
| 8.1.2 | Effet de la charge de la surface | 34 |
| 8.2 | Surfaces hydrophobes | 34 |
| 9 | Intérêt de ces résultats pour les applications | 35 |
| 10 | Aspect mécanique du peignage | 36 |
| 10.1 | Homogénéité de l'étirement | 36 |
| 10.2 | Difficulté de la modélisation mécanique | 37 |
| 10.3 | Effet de la surface sur l'extension | 37 |
| 10.4 | Relation entre peignage et manipulations d'ADN isolé | 38 |
| 11 | Matériel et méthodes | 39 |
| 12 | CONCLUSION | 40 |
| III | Mesure de force par mouvement brownien | 43 |
| 13 | Introduction | 43 |
| 14 | Principe de la mesure | 44 |
| 14.1 | Corrections au modèle | 46 |
| 14.1.1 | Anisotropie du mouvement brownien | 46 |
| 14.1.2 | Point d'ancrage | 47 |
| 15 | Analyse fréquentielle | 49 |
| 15.1 | Équations du mouvement | 49 |
| 15.2 | Apport de l'analyse fréquentielle | 50 |
| 15.2.1 | Fréquence de coupure | 50 |
| 15.2.2 | Filtrages | 52 |
| 15.3 | Effet de l'acquisition vidéo | 52 |
| 16 | Mesure des fluctuations | 56 |
| 16.1 | Fluctuations transverses | 56 |
| 16.2 | Fluctuations longitudinales | 58 |
| 16.3 | Dérives du microscope | 59 |
| 16.4 | Remarques | 60 |
| 16.5 | Rotation de la bille avec les aimants | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 17 Analyse des fluctuations et extraction de la force | 61 |
| 17.1 Obtention de la force | 61 |
| 17.2 Tests | 62 |
| 18 Conclusion | 63 |
| | |
| IV Élasticité d'une molécule unique d'ADN | 67 |
| 19 Introduction | 67 |
| 20 Comment attraper une molécule d'ADN par ses deux bouts ? | 67 |
| 21 Élasticité d'une molécule d'ADN sans contrainte torsionnelle | 69 |
| 21.1 Modèles d'élasticité d'un polymère | 70 |
| 21.1.1 Modèle de la chaîne librement jointe | 70 |
| 21.1.2 Modèle du ver ou Worm Like Chain (WLC) | 72 |
| 21.2 Élasticité enthalpique et forme S | 73 |
| 21.3 Élasticité dans les domaines enthalpique et élastique | 74 |
| 22 Le surenroulement de l'ADN | 74 |
| 22.1 Introduction au phénomène | 75 |
| 22.2 Importance biologique | 76 |
| 22.3 Méthodes utilisées pour l'étude du surenroulement | 77 |
| 22.3.1 Méthodes pour faire varier le surenroulement | 77 |
| 22.3.2 Méthodes d'investigation | 78 |
| 22.3.3 Apport de notre étude | 79 |
| 22.4 Quelques notions topologiques pour décrire le phénomène | 80 |
| 23 Élasticité d'une molécule d'ADN avec surenroulement | 82 |
| 23.1 Le modèle de Marko et Siggia | 82 |
| 23.2 Le modèle de Bouchiat et Mézard | 82 |
| 24 Résultats expérimentaux | 83 |
| 24.1 Expériences à $\sigma = 0$ | 83 |
| 24.1.1 Comment être sûr de n'avoir qu'une molécule ? | 83 |
| 24.1.2 Effet du blocage en rotation pour la transition vers la forme S | 86 |
| 24.2 Courbes d'élasticité d'ADN à faible degré de surenroulement | 88 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 24.2.1 | Diagramme surenroulement-extension | 89 |
| 24.2.2 | Diagramme d'élasticité | 90 |
| 24.2.3 | Discussion | 90 |
| 24.2.4 | Force ou couple critique? | 93 |
| 24.2.5 | Influence de la salinité | 95 |
| 24.2.6 | Confrontation théorie expérience | 95 |
| 24.2.7 | Détermination du rapport C/A à partir de la théorie de Bouchiat et Mézard | 96 |
| 24.2.8 | Bilan de la comparaison théorie expérience | 98 |
| 24.3 | ADN sous forte contrainte | 99 |
| 24.3.1 | Contrainte de surenroulement positif | 99 |
| 24.3.2 | Contrainte de surenroulement négatif | 106 |
| 24.4 | Fort surenroulement positif et forme S | 109 |
| 24.5 | Conclusion | 111 |
| 25 | Récapitulatif : déroulement de l'expérience | 112 |
| 25.1 | Protocole d'ancrage | 113 |
| 25.1.1 | Fixation de l'antidigoxigénine à la surface | 113 |
| 25.1.2 | Ancrage de l'ADN aux billes | 114 |
| 25.1.3 | Construction finale | 114 |
| 25.2 | Sélection des billes accrochées par une unique molécule surenroulable | 114 |
| V | Conclusion | 116 |

Vinaigrette d'andouille

jeunes fèves et brochette de pétoncles

Olivier Roellinger [Roellinger, 1994]

Ingredients pour 4 personnes : 2kg de pétoncles vivants • 2kg de petites fèves bien vertes • 4 oursins de la manche • 4 rondelles d'andouilles de Vire • Fleurs de thym • 5cl de bouillon de volaille • 40g de beurre • Vinaigrette : 1 c. à s. de vinaigre de cidre, 4 c. à s. d'huile d'arachide, sel, poivre, noix muscade.

Préparation de base. Décortiquer les pétoncles pour ne conserver que les noix, les laver sous l'eau froide courante, les égoutter et les conserver au frais.

Eplucher les fèves, les plonger 2 minutes dans l'eau bouillante salée, les rafraîchir et les dépouiller de leur enveloppe.

Enfiler les noix sur des brochettes en bois, réserver.

Pour préparer la vinaigrette, tailler l'andouille en petis dés après avoir éliminé la peau noire, faire fondre le sel dans le vinaigre, poivrer, ajouter l'huile et un peu de noix muscade râpée. Réserver.

Récupérer les coraux d'oursins.

Dernière minute. Dans une petite casserole, réchauffer les fèves dans le bouillon de volaille avec 20g de beurre, sel, poivre et fleurs de thym.

Chauffer la vinaigrette en la fouettant.

Dans une sauteuse chaude, jeter 20g de beurre et y passer les brochettes 30 secondes, d'un seul côté sans que le beurre brûle. Les assaisonner.

Déposer les brochettes sur assiettes chaudes, côté cru dessous.

Dresser les fèves et poser quelques coraux d'oursins froids sur le dessus.

Napper les brochettes de vinaigrette bien émulsionnée, finir par sel, poivre et quelques fleurs de thym.

Première partie

L'A.D.N.

1 Introduction

L'A.D.N. ou acide désoxyribonucléïque est la molécule centrale des travaux présentés dans ce manuscrit. Il est donc naturel de débiter par une rapide description de la molécule. Bien entendu une bonne partie des lecteurs n'apprendra rien dans ce chapitre et l'autre partie, si elle est intéressée devra plutôt regarder rapidement un ouvrage de biologie[Alberts et al., 1989].

L'ADN a été découvert en 1869. Cette molécule est connue du grand public comme étant celle du support de l'hérédité, cependant ce rôle n'a été découvert que dans les années 40. Le grand moment de l'histoire de l'ADN est bien entendu la découverte de sa structure en double hélice avec l'article de Watson et Crick en 1953[Watson and Crick, 1953]. Un grand chemin a été parcouru depuis : on sait maintenant synthétiser de l'ADN, on sait le séquencer (i.e. déterminer sa structure primaire), on sait insérer des gènes dans un ADN, on peut lui rajouter des groupements fonctionnels... Bref, en cinquante années d'énormes progrès ont été accomplis sur cette molécule. Ces progrès et la nature même de la molécule ont fait qu'il est maintenant intéressant pour un physicien de travailler avec cette molécule car en dehors de son rôle biologique essentiel c'est un polymère modèle. Mais commençons d'abord par voir quelle est la structure de l'ADN.

2 Structure de la molécule

2.1 Structure primaire

Les briques élémentaires de l'ADN sont au nombre de quatre. Ces quatre éléments, que l'on nomme les bases de l'ADN, sont quatre nucléotides qui sont l'Adénine, la Thymine, la Cytosine et la Guanine (respectivement notées bases A, T, C, G). Leur structure chimique est indiquée sur la figure 1. Il est important pour la suite de noter que des liaisons hydrogènes peuvent exister entre les différentes bases permettant à celles-ci de pouvoir être liées entre elles mais pas de manière très forte comme dans le cas des liaisons chimiques. Les bases A et T peuvent former deux liaisons alors que G et C peuvent en former trois. Cette simple remarque suffit à former de manière naturelle deux couples parmi ces quatre bases, à savoir que l'on peut associer A à T et G à C.

Dans l'ADN ces quatre bases sont fixées sur un squelette de sucres-phosphates (figure 2). La demi-échelle ainsi constituée forme ce que l'on appelle un mono-brin ou brin d'ADN. Dans les conditions physiologiques les phosphates sont négativement chargés, ce qui implique que l'ADN sera un polyélectrolyte négativement chargé. La position des phosphates sur les sucres, en position 5' ou 3', donne une orientation au brin. Cette orientation est primordiale pour le fonctionnement des protéines interagissant avec l'ADN.

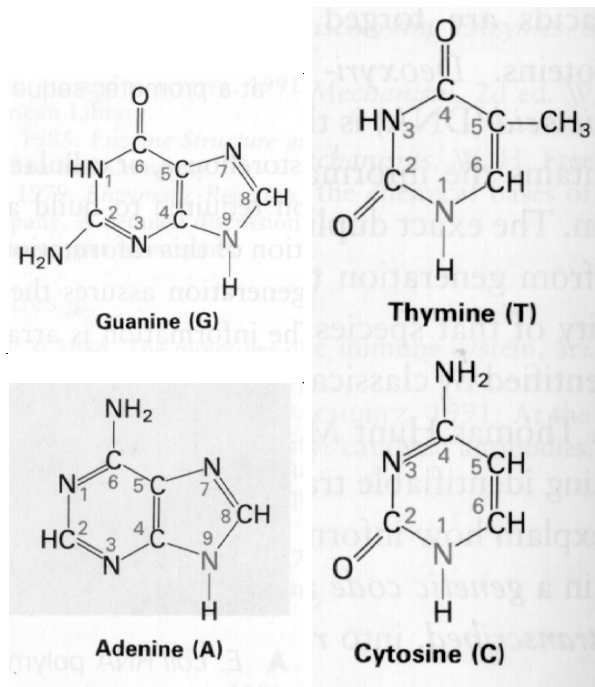


FIG. 1: Représentation chimique des quatre bases de l'ADN. Leur alternance le long de la molécule forme le code génétique.

C'est l'alternance de ces bases, ou séquence, le long d'un squelette qui forme le code génétique. Lors de la transcription ce code va être lu par une ARN polymérase qui forme alors un ARN messager qui après de nombreuses étapes va donner des protéines correspondant au code de départ [Alberts et al., 1989].

2.2 Structure secondaire

Cette structure a été découverte par Watson et Crick [Watson and Crick, 1953] à partir du cliché X de la molécule. Elle résulte de l'association des bases par couple car l'ADN est constitué de deux des squelettes décrits plus haut. Dans cette association chaque base sur un des brins a pour vis à vis sur l'autre brin sa base complémentaire. Les deux brins sont orientés en sens contraires. La forme spatiale adoptée par ces deux squelettes est une hélice : la fameuse double hélice Watson Crick.

Dans les conditions physiologiques normales cette hélice a pour dimension latérale 20 Å. Les bases dans cette double hélice forment des plateaux comme les barreaux d'une échelle. La distance entre ces plateaux est de 3.4 Å. Le pas de l'hélice est d'environ 10.5 paires de bases et c'est une hélice droite. Ces caractéristiques correspondent à la forme dite **B** de l'ADN [Kornberg and Baker, 1992].

Suivant les conditions de salinité, d'hydratation, ou de contraintes on peut trouver d'autres caractéristiques pour cette double hélice. La figure 3 donne des représentation de la

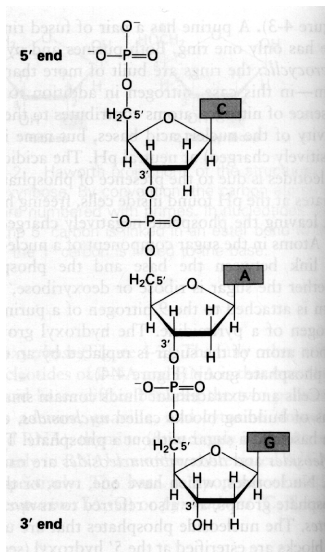


FIG. 2: Les bases s'organisent sur un squelette constitué de sucres et de phosphates pour former un brin. Ce brin est orienté du fait de la position des phosphates sur les sucres. Cette orientation est importante pour les processus biologiques.

forme **B** de l'ADN ainsi que celles des formes **A** et **Z**. La particularité de la forme **Z** est que c'est une double hélice gauche.

La stabilité de ces hélices résulte bien sûr des liaisons hydrogènes entre bases mais également des interactions hydrophobes entre bases auxquelles on donne le nom d'interaction d'empilement (stacking en anglais). Ces interactions résultent du fait que les bases présentent des cycles qui sont hydrophobes et donc préfèrent se "coller" les unes aux autres plutôt que d'être exposées à la solution aqueuse dans laquelle baigne l'ADN. On peut déstabiliser la structure en double hélice, on dit que l'on dénature l'ADN, en chauffant ou en jouant sur la répulsion électrostatique entre les brins en modifiant soit le pH soit en abaissant fortement la force ionique de la solution.

La taille des molécules est variable suivant l'organisme. Elle varie de quelques milliers à plusieurs centaines de millions de paires de bases. Pour l'homme il y en a environ quelques dizaines à quelques centaines de millions de paires de bases par chromosome (nous en possédons 23 paires) ce qui représente quelques 3 mètres d'ADN en tout dans chaque cellule.

D'autres structures peuvent éventuellement exister mais nous ne les aborderons pas ici.

2.3 Structures tertiaires

La double hélice peut elle même adopter des structures particulières. Nous reviendrons en détail dans la suite sur deux formes particulières, les plectonèmes et les solénoïdes qui apparaissent quand on impose de la torsion sur la molécule.

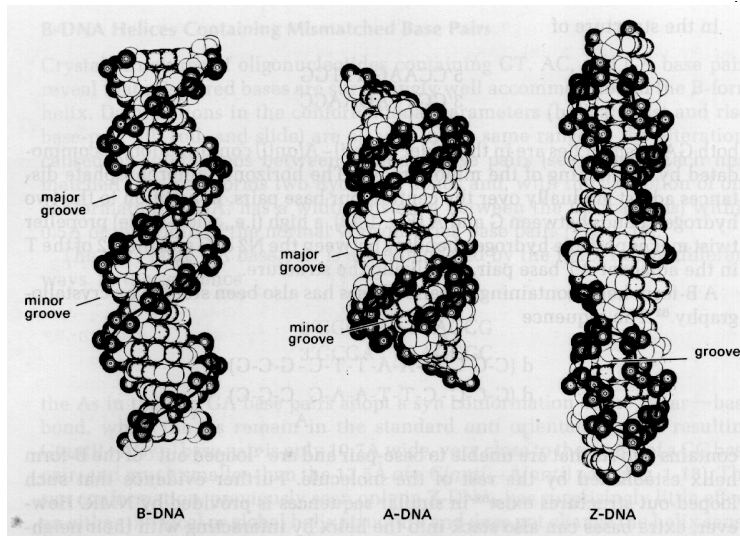


FIG. 3: Représentation de trois formes de double hélice pour l'ADN. La forme **B** est la forme qui est présente dans les conditions physiologiques normales. La forme **A** se retrouve dans des conditions de faible hydratation. La forme **Z** a la particularité de ne pas avoir la même chiralité que les autres : c'est une double hélice gauche.

2.4 Remarques

Il est bien évident que la séquence de l'ADN, i.e. l'alternance des bases, va jouer un rôle primordial en codant les protéines qui vont être exprimées. Cependant la fonction de l'ADN peut être également influencée par sa structure secondaire. Si, pour une raison quelconque, la structure en double hélice est brisée localement les bases de cette région seront alors plus facilement accessibles aux protéines. Nous reviendrons sur cette relation entre la structure secondaire et la fonctionnalité de la molécule dans la suite du manuscrit mais il est bon d'avoir dès le départ cette notion en tête car elle est moins intuitive que la simple relation entre la séquence et la fonction.

3 Intérêt de l'ADN pour le physicien

L'ADN est particulièrement intéressant car c'est un polymère modèle. C'est le seul polymère que l'on puisse obtenir identique à lui-même et parfaitement monodisperse. De plus les biologistes ont, comme nous l'avons déjà signalé, développé de nombreuses techniques pour manipuler cette molécule. En particulier ils sont capables de la fonctionnaliser de manière différentielle à ses extrémités, de la visualiser à l'aide de marqueurs fluorescents particulièrement efficaces. Rien que ces deux aspects ont déjà permis de faire des mesures d'élasticité sur des polymères isolés [Smith et al., 1992, Smith et al., 1996, Cluzel et al., 1996], de vérifier le comportement individuel de polymères dans les écoulements [Manneville et al., 1996, Perkins et al., 1994a] [Brochard-Wyart, 1995], de trouver un modèle

moléculaire de stick-slip [Bockelmann et al., 97], ou bien encore de regarder la diffusion d'un polymère avec en particulier la vérification du modèle de reptation [Perkins et al., 1994b]. De plus l'approche par des physiciens [Bouchiat and Mézard, 97, Marko and Siggia, 95a] de cette molécule permet de développer des théories de physique statistique qui sont intéressantes et non-triviales.

L'étude des moteurs moléculaires sur l'ADN [Yin et al., 95] vient juste de démarrer et la question se posera peut-être bientôt de savoir quel est l'influence de la mécanique sur la fonction biologique de l'ADN.

Consommé épicé de cancalaises et foie gras jeunes fèves et brochette de pétoncles

Olivier Roellinger [Roellinger, 1994]

Ingredients pour 4 personnes : 16 huitres plates sauvages • 180g de foie gras frais de canard • 1/4 de pied de céleri-rave • 4 petites carottes avec fanes • 4 feuilles de céleri • 2dl de vin (coteaux du Layon par exemple) • 5cl de verjus • 4dl de bouillon de volaille • 1c. à c. de sauce de soja • 2 gouttes d'huile de sésame • Mélange d'épices : 2 c. à s. de coriandre, 3 grains de poivre blanc, 1 c. à s. de fenouil vert, 1 c. à s. de macis, une noix de beurre.

Préparation de base. La veille faire chauffer à sec le mélange d'épices. Ixer dans un moulin à café et réserver dans un bocal hermétique. Faire réduire le vin de moitié. Ajouter le bouillon de volaille, incorporer 1 c. à c. du mélange d'épices et 2 petites branches de céleri, la sauce soja et le verjus. Laisser infuser 1 heure à 80 degrés puis passer dans une passoire fine. Réserver l'infusion au frais sans la bouger. Durant la nuit il y a séparation de phases : il faut garder la phase acqueuse qui est au milieu, au dessus des épices. On doit obtenir un bouillon clair. Une ampoule à décanter est conseillée.

Réalisation. Ouvrir les huitres, les décoquiller en sectionnant le pied, et en prenant garde de ne pas percer la poche de gaz de la coquille inférieure. Les réserver dans leur eau filtrée. Eplucher les carottes et les couper finement dans le sens de la longueur pour obtenir des lamelles vertes et oranges.

Tailler le céleri rave en petits carrés aussi fins que les lamelles de carottes. Découper les feuilles de céleri en fines lanières. Conserver ces légumes séparément, sous une feuille de papier absorbant humidifié. Couper le lobe de foie gras en 12 morceaux après en avoir enlevé les gros vaisseaux.

Dernière minute. Cuire séparément les légumes dans un peu d'eau salée avec une noix de beurre.

Chauffer le bouillon à 85 degrés et y pocher le foie pendant 2 minutes.

Tiédifier les huitres dans leur eau à une température inférieure à 70 degrés.

Disposer dans chaque assiette huitres foie gras, carottes et céleri.

Rectifier l'assaisonnement en sel du bouillon avec le jus d'huitre. Ajouter quelques gouttes d'huile de sésame.

Ajouter le bouillon bouillant. Parsemer des lanières de céleri.

Saupoudrer le foie gras d'un peu du mélange d'épices.

Deuxième partie

Peignage moléculaire

4 Généralités

La détection et le positionnement des gènes les uns par rapport aux autres (cartographie) est un des buts importants de la biologie moléculaire. Les applications de cette étude sont le diagnostic de maladies génétiques ou la compréhension l'architecture du génome

Une des techniques utilisées consiste à immobiliser l'ADN à étudier sur un substrat. Ceci facilite l'observation et le traitement des données. Ensuite on procède à l'hybridation de sondes marquées fluorescentes, d'où le nom de la méthode F.I.S.H., fluorescent in situ hybridization. Les sondes sont des séquences d'ADN, marquées par fluorescence, complémentaires de la séquence du gène à détecter. En chauffant les deux sources d'ADN en présence l'une de l'autre et en laissant ensuite refroidir l'ensemble on a fixé la sonde sur l'ADN. La complémentarité des paires de bases entre les sondes et l'ADN cible fait que l'ADN sonde s'est lié, hybridé, à celui qui est immobilisé qui est ainsi marqué. Tout ceci est schématisé sur la figure 4.

On peut envisager de faire une détection des sondes qui soit quantitative et par exemple détecter une trisomie. Pour cela on peut utiliser des sondes spécifiques d'un chromosome en quantité normale et de sondes pour le chromosome de la trisomie. Chaque sonde ayant un site de reconnaissance sur chaque chromosome il suffit de compter les deux types de sondes sur une quantité déterminée d'ADN cellulaire fixé sur une surface pour déterminer si un chromosome possède deux ou trois exemplaires.

Le peignage moléculaire est une technique qui assure la fixation d'ADN étiré sur une surface mais qui en plus linéarise celui-ci en étirant l'ADN de manière homogène et reproductible. Ce dernier point permet donc, en plus de ce qui a été signalé, de faire des mesures de distance et non plus de se contenter de faire du positionnement relatif. De plus cet effet d'étirement reproductible augmente la résolution que l'on peut obtenir par la méthode F.I.S.H. . Il est évident que si l'on fait une projection d'un noyau très condensé sur une surface, deux sondes spécifiques de régions proches seront indistinguables. Cela ne sera plus le cas quand l'ADN sera étiré.

Le but de notre étude a été de cerner les paramètres pertinents qui contrôlent le peignage puis de tenter d'expliquer l'origine physico-chimique de ce phénomène.

5 Principe du peignage moléculaire

5.1 Description

Prenons un ADN en solution aqueuse fixé par une de ses extrémités à un substrat. L'ADN, comme tout polymère se trouvant en solution, se présente en pelote statistique qui fluctue

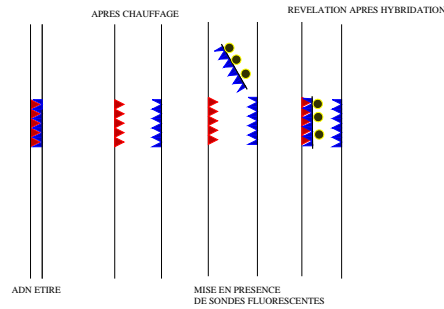


FIG. 4: Principe de la méthode F.I.S.H.(fluorescent in situ hybridization), cette technique est utilisée pour détecter des régions d'ADN de manière optique.

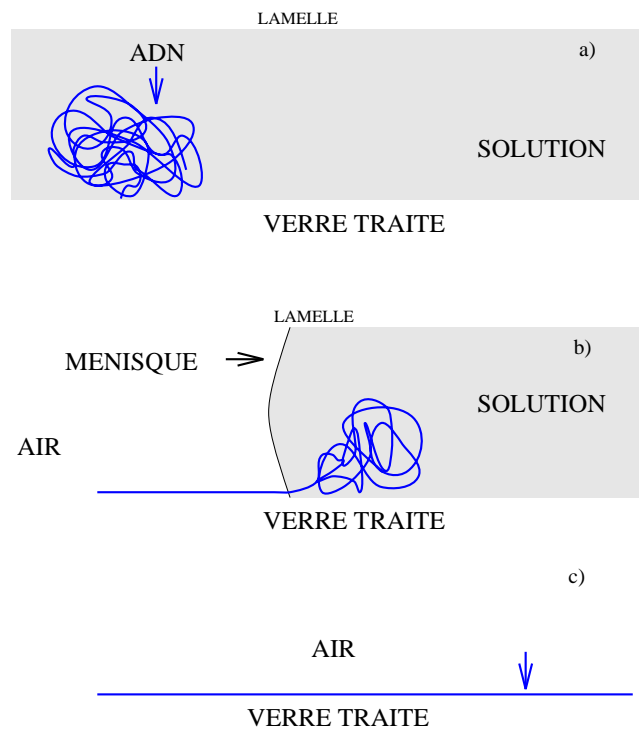


FIG. 5: L'ADN est étiré par le ménisque qui passe, comme les algues sur une plage à marée descendante.

sous l'effet du mouvement brownien. C'est un polyélectrolyte, il est donc hydrophile. Lorsque la surface va sécher, l'interface eau/air va passer sur la molécule attachée. L'ADN qui préfère être dans l'eau va chercher à rester au maximum en solution. Comme il est attaché par son bout à la surface il va se retrouver ainsi étiré (si, bien sûr, la force exercée par l'interface est suffisante) et ce perpendiculairement au ménisque. Pour avoir une image du phénomène on peut penser aux algues étirées sur la plage à marée descendante. Le principe de ce phénomène est schématisé sur la figure 5 et la visualisation réelle est montrée dans la figure 6.

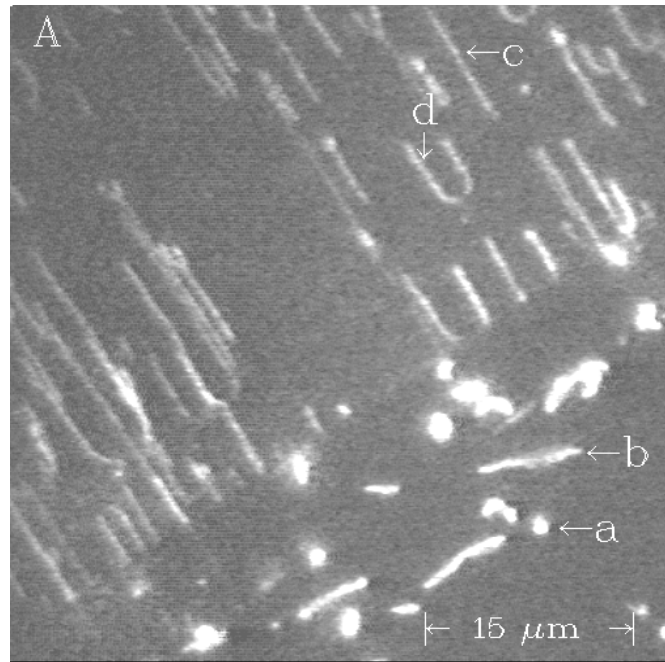


FIG. 6: Image du passage du ménisque sur les molécules ancrées. Les molécules qui ne sont ancrées que par un bout (a) sont bien sûr linéarisées (c). Celles ancrées par deux bouts (b) forment des boucles qui cassent une fois le ménisque passé (d). Les molécules qui sont encore en solution sont sous forme de pelote statistique en mouvement brownien.

5.2 Visualisation des molécules

Notre outil d'observation est la microscopie optique ⁷. Or, bien entendu l'ADN "naturel" est invisible par cette méthode. Pour visualiser les molécules nous utilisons un marqueur fluorescent de l'ADN : le YOYO1 (dimère d'oxazole jaune) (voir figure 8). Celui-ci est une molécule chargée positivement qui possède des cycles. Sa charge lui permet une interaction électrostatique attractive avec l'ADN et ses cycles assurent son intercalation dans la molécule. En effet l'insertion des cycles, qui sont hydrophobes, dans la double hélice est favorable puisque les bases de celle-ci le sont également. Il faut bien reconnaître que la fixation du YOYO1 sur l'ADN présente encore des inconnues [Carlsson et al., 1995]. Malgré cela il son efficacité comme marqueur fluorescent est très bonne.

En pratique, une source lumineuse (lampe à mercure ou à xénon) filtrée à la longueur d'onde d'excitation du YOYO1 (dans le bleu) éclaire l'échantillon en passant par l'objectif. Celui-ci collecte la lumière réémise et, après passage par un filtre correspondant à la longueur d'onde d'émission du YOYO1 (dans le jaune), la renvoi vers l'oculaire ou la caméra.

Pour vérifier que l'intercalant ne joue pas de rôle majeur pour l'ancrage et le peignage nous avons également réalisé des expériences où l'utilisation du YOYO1 ne se fait qu'une fois l'ADN peigné pour révéler le résultat de la manipulation. Ceci a confirmé le fait que le

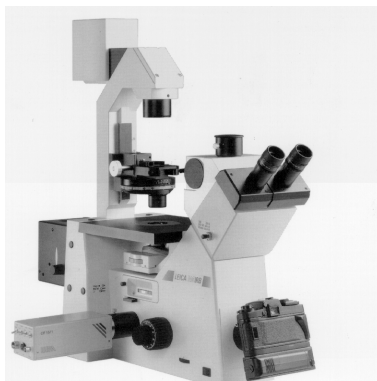


FIG. 7: Image d'un des microscopes inversés à fluorescence que nous avons utilisé. La source lumineuse est soit une lampe à xénon soit une lampe à mercure. Pour enregistrer et traiter les images une caméra C.C.D. intensifiée (Hamamatsu ou Proxitronix) est placée en sortie et connectée à un magnétoscope. Les bandes vidéos sont ensuite traitées par ordinateur pour faire les histogrammes.

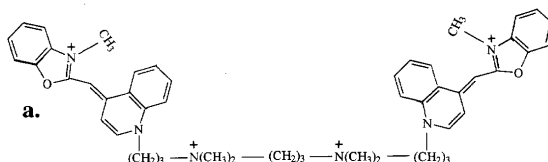


FIG. 8: Représentation de la molécule de YOYO1 qui est fluorescente et permet de visualiser l'ADN en s'intercalant entre ses bases.

phénomène n'est pas modifié de manière importante par l'intercalant. De manière générale l'ADN est teinté avant de le mettre sur la surface pour diminuer la fluorescence parasite (car le YOYO1 peut aller sur le substrat s'il n'est pas déjà fixé sur l'ADN) et faciliter son stockage (le YOYO1 doit être fraîchement dilué pour bien se fixer sur l'ADN alors que l'ADN teinté se conserve longtemps).

5.3 Mise en œuvre

Le passage du ménisque peut être assuré par la simple évaporation de la solution qui va donc faire diminuer le volume de la solution ou bien par le déplacement de la surface par rapport à la solution. Ce dernier procédé, inspiré de la technique Langmuir-Blodgett, consiste simplement en un moteur pilotant un bras qui tient la lamelle sur laquelle on effectue le peignage. Ce dispositif est schématisé dans la figure 9. La montée et la descente du moteur permettent ainsi de tremper la lamelle et de la ressortir de la solution ce qui assure le passage du ménisque. Cette dernière méthode est rapide, elle permet un grand contrôle de l'incubation et de la corrélation d'orientation des molécules sur tout l'échantillon, et possède un autre

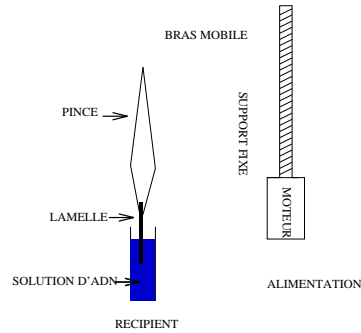


FIG. 9: Schéma du dispositif permettant d'incuber les surfaces dans la solution d'ADN et de les retirer. Nous avons nommé ce dispositif ascenseur

gros avantage qui sera discuté dans la suite.

5.3.1 Procédé expérimental

Nous donnons ici le protocole standard pour effectuer une expérience de peignage d'ADN de phage λ sur des surfaces de polystyrène dont le mode de fabrication est indiqué à la rubrique matériel et méthodes.

Il suffit de mettre en solution de l'ADN, déjà teinté au YOYO1, à une concentration de $25ng/ml$ et au pH désiré (5.5 comme on le verra dans la suite)). Le volume de notre cellule est de $2ml$ (mais cela peut être ajusté). Une lamelle de verre traitée au polystyrène est accrochée à une pince qui est fixée sur un bras piloté par un moteur. La commande de ce moteur fait descendre le bras. Ceci a pour effet de faire tremper la lamelle dans la solution d'ADN. On laisse la lamelle incuber environ trois minutes dans la solution. On active alors le moteur pour provoquer la remontée de la lamelle. En sortant la surface de la solution ce dispositif assure le passage du ménisque et donc l'étirement des molécules. Le peignage est alors effectué.

Pour effectuer l'observation on utilise un microscope inversé à fluorescence. Pour le traitement des données (histogrammes, comptage des molécules...) on utilise une caméra intensifiée qui permet ensuite de sauvegarder les images sur un magnéscope. Ces images peuvent éventuellement être ensuite envoyées sur un ordinateur muni d'une carte vidéo. Pour effectuer un histogramme de longueurs il suffit de passer chaque image en revue et de mesurer la longueur des molécules à l'aide d'un programme informatique.

6 Fixation à la surface

Le problème pratique essentiel que pose la réalisation du peignage moléculaire est la fixation de l'ADN par ses extrémités.

6.1 Historique

La découverte du peignage moléculaire [Bensimon et al., 1994] s'est faite sur des surfaces de verre traitées par un trichlorosilane portant une chaîne en C_8 se terminant par un groupement vinyle (que je nommerai surfaces C=C par la suite). L'observation du peignage s'est produite dans du tampon MES (acide 2-[N-morpholino]éthane-sulfonique) à un pH de 5.5. Ces conditions étaient initialement celle d'une réaction chimique devant intervenir dans autre expérience, ce qui explique le fait de mettre de l'ADN à un pH aussi bas. La fixation était alors supposée résulter d'une réaction chimique entre une extrémité de l'ADN et le groupement vinyle et donc être spécifique de ce type de surface [Bensimon et al., 1994].

Un groupe a effectué des expériences similaires sur des surfaces recouvertes de γ -amino-tri-ethoxy-silane [Weier et al., 1995]. Les molécules d'ADN dans ces expériences sont étirées mais moins linéaires que celles observées par les groupes de l'ENS et Pasteur sur les surfaces C=C. Nous avons alors fabriqué des surfaces de ce type. En parallèle nous avons réalisé des surfaces de verres recouvertes de polylysine qui sont plus aisées à fabriquer. La polylysine est un polyacide aminé qui possède des fonctions amines de la même manière que le γ -amino-tri-ethoxy-silane.

Les tentatives de peignage sur ces surfaces étaient entachées d'irreproductibilité mais faisaient apparaître que pour obtenir du peignage il fallait être à un pH supérieur à 5.5. A ce pH là en effet l'ADN venait se coller immédiatement sur la surface et restait ensuite insensible à tout changement et en particulier au passage du ménisque. En élevant le pH on passait par une zone où on avait effectivement peignage c'est à dire un ancrage **uniquement par les extrémités**. Enfin à haut pH l'observation montrait que les molécules n'étaient pas ancrées à la surface et que le ménisque les emportait toutes. L'irreproductibilité, due à la difficulté de contrôler l'état du verre malgré un protocole identique à chaque fois, rendait la position de la plage de pH intéressante variable d'une série à l'autre. Cependant elle restait toujours étroite en largeur. Le pH sembla alors être un paramètre important (tout au moins sur les surfaces que je viens de citer). Il nous a paru intéressant de nous pencher sur ce problème et de voir si nous pouvions généraliser nos observations.

6.2 Surfaces utilisées et comportement observé

Nous avons étudié l'ancrage de l'ADN par ses bouts et le peignage qui s'ensuit sur les surfaces suivantes :

- pour les surfaces hydrophobes :
 - C=C
 - polystyrène
 - polyméthylmétacrilate (PMMA)
 - graphite
 - PDMS (polydiméthylsiloxane) (ces surfaces nous ont été fournies par Hubert Hervet)
 - Téflon (certaines d'entre elles nous ont été données par J.C. Wittmann)

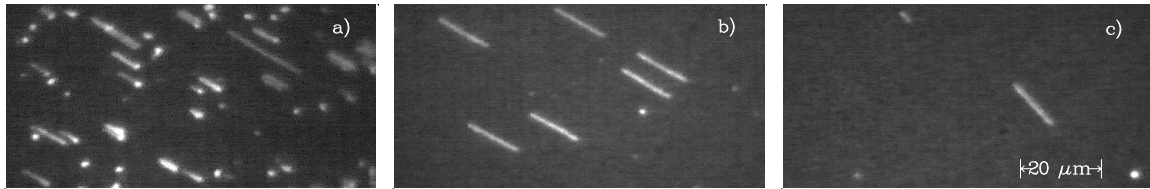


FIG. 10: Image de surface de polystyrène dans les trois régions de pH a) A bas pH avec une forte interaction b) Dans la zone où l'ancrage est spécifique des extrémités c) Dans la zone où il n'y a pas d'interaction et il reste très peu de molécules après le passage du ménisque (la concentration en solution est la même entre b) et c))

- or recouvert de thiols alkylés
- feuilles de transparents, films alimentaires, sacs plastiques, etc.
- pour les surfaces hydrophiles chargées positivement :
 - polylysine
 - γ -amino-tri-ethoxy-silane
 - polyhistidine
 - verre propre

Pour **toutes** ses surfaces le comportement observé est le **même** en fonction du pH. A savoir que :

- à bas pH, les molécules sont collées à la surface et ne fluctuent plus en solution.
- à haut pH, les molécules n'interagissent pas avec la surface et sont emportées par le ménisque.
- entre les deux il existe une plage étroite (sauf pour le PMMA où elle est assez large) où l'interaction de l'ADN avec la surface ne se fait **que** par les extrémités. C'est cette zone de pH qui permet la fixation de l'ADN par ses bouts et qui est utile pour le peignage moléculaire.

La figure 10 représente l'aspect qu'a une surface après passage du ménisque dans ces trois régions de pH.

6.3 Quantification de l'effet

6.3.1 Influence du pH

La position de la plage de pH intéressante est fonction du type de surface et de la préparation de celle-ci pour les surfaces chargées. Cependant pour les surfaces hydrophobes utilisées, à l'exception encore une fois du PMMA, le centre de cette plage est vers 5.5 et sa **largeur est de 0,2 unités pH!**

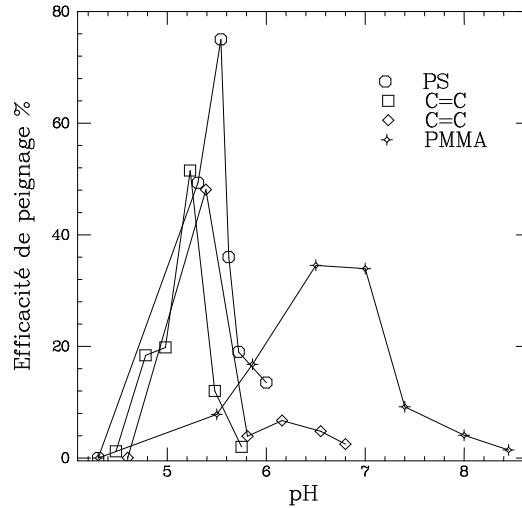


FIG. 11: Efficacité du peignage en fonction du pH sur différentes surfaces.

Ce résultat est illustré sur la figure 11. Nous y avons porté en ordonnée l'efficacité de peignage en fonction du pH. On définit celle-ci comme le rapport des molécules peignées, c'est à dire ancrées uniquement par leurs extrémités, sur le nombre de molécules collées au substrat à bas pH quand les molécules sont très fortement attirées par la surface. La faible valeur de l'efficacité à bas pH vient du fait que les molécules ne sont pas étirées par le ménisque même si elles sont bien observées sur la surface après le ménisque. De la même manière sa faible valeur à haut pH est due au fait que les molécules n'ayant pas d'interaction attractive avec la surface sont emportées par le ménisque. La chose la plus frappante sur ce graphe est la très faible largeur de la gamme de pH où l'ancrage est spécifique des bouts. La découverte du peignage apparaît en conséquence comme très fortuite.

6.3.2 Vérification du rôle des extrémités

Effet des bouts Pour vérifier cette spécificité de l'ancrage par les extrémités nous avons utilisé un plasmide, i.e. un ADN circulaire, de 42 kilo-bases fourni par I. Lucas, C. Maric et O. Hyrien. Nous avons utilisé cet ADN au pH optimum (5.5) sur des surfaces de polystyrène. Une partie a été utilisée sous forme circulaire surenroulée et l'autre a été digérée par une enzyme de restriction qui nous a donc donné le même ADN mais linéaire. Le nombre de molécules peignées dans la forme linéaire a été mesuré dix fois supérieur à celui de la forme circulaire comme on peut s'y attendre pour un effet spécifique des bouts.

Effet de la nature des extrémités Nous avons également vérifié que le phénomène ne dépend pas de l'état des extrémités. En effet les bouts de l'ADN peuvent se présenter sous deux formes : soit les deux squelettes s'arrêtent au même endroit (on dit que l'ADN est coupé blunt) ou l'un des brins est plus long que le second auquel cas il y a sur l'extrémité d'un des brins des bases non appariées dites collantes (ou sticky). Le phage λ par exemple à des

extrémités sticky ainsi que les ADN fournis par I. Lucas et digérés par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Nous avons donc peigné de l'ADN de λ digéré par l'enzyme de restriction *NruI* qui coupe en laissant des bouts blunt. Lors de cette expérience les fragments ne possédant que des bouts blunts ont également été peignés. Le peignage peut donc se faire avec les deux types d'extrémités. Nous n'avons pas effectué d'expérience quantitative pour voir s'il y a une différence d'efficacité entre les deux. En vue des applications les biologistes veulent peigner de l'ADN directement issu d'un génome et l'équipe de Pasteur a montré que cela est possible [Michalet et al., 1997].

Réversibilité de l'ancrage On peut signaler enfin que l'ancrage par une extrémité étant réalisé; on peut alors élever le pH jusqu'à la zone où la molécule n'interagit pas avec la surface (cela se fait en changeant le tampon tout en maintenant la molécule en solution). La molécule reste alors ancrée. En ce sens l'ancrage est irréversible. Cependant si l'on réhydrate les molécules sur certaines surfaces (par exemple le polystyrène ou le téflon) il est possible de les décrocher de la surface. Cette réhydratation est trop violente, et brise les molécules, lorsqu'elle est faite en visualisation directe, pour pouvoir dire si tout se désorbe ou si les extrémités restent attachées malgré tout.

Premières conclusions L'ensemble des résultats expérimentaux précédents démontre que l'on a un effet crucial du pH sur la spécificité de l'ancrage par les extrémités et ce de manière indépendante de la nature de celles-ci. Ils montrent en particulier que le pH de transition entre la phase de forte attraction et celle où il n'y a pas d'interaction est différente entre les bouts et le milieu de la molécule. Elle est décalée de 0.2 unités pH sur les surfaces très hydrophobes.

7 Mécanismes

Nous avons montré que l'ancrage peut se produire sur différentes surfaces. Nous proposons deux mécanismes pour expliquer ce phénomène suivant la nature hydrophobe ou chargée des surfaces.

Dans les deux cas nous prenons en compte l'existence d'une charge image qui existe lorsqu'une charge est près de l'interface entre deux diélectriques (cet effet nous a été rappelé par J.F. Joanny). En effet lorsqu'une charge q est située dans un diélectrique caractérisé par une constante ϵ_1 qui a une interface avec un milieu de constante ϵ_2 elle subit l'effet équivalent à celui d'une charge q' symétrique de q par rapport à l'interface. La valeur de cette charge est donnée par la relation [Jackson, 1962] :

$$q' = -(\epsilon_2 - \epsilon_1)/(\epsilon_2 + \epsilon_1)q$$

Pour notre système $\epsilon_1 = 80$ car l'ADN est dans l'eau et $\epsilon_2 = 1.5^2$ car on a une interface eau/verre. On voit donc que l'on a une charge image de même signe que celle de l'ADN ce qui implique que cet effet produit une répulsion de la molécule lorsqu'elle s'approche de la surface de verre.

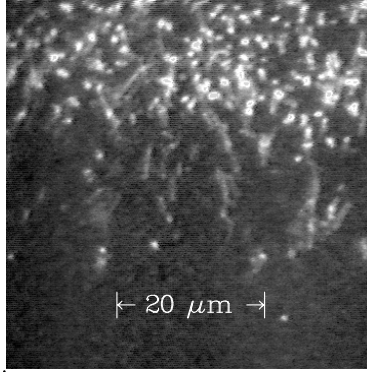


FIG. 12: Vue d'ADN en solution (à $\text{pH} \sim 6.5$) sur une surface recouverte de charges positives dans la partie haute (polylysine) et de charge négatives dans la partie basse (polylysine plus acide polyglutamique). Comme on peut s'y attendre dans un modèle électrostatique, l'ADN qui est négativement chargé est collé à la surface dans la partie haute et repoussé dans la partie basse.

7.1 Surfaces chargées

La protonation des groupes chimiques de surface en fonction du pH vient spontanément pour expliquer le passage d'une interaction électrostatique forte à bas pH à une absence d'interaction à haut pH. En effet, pour un pH supérieur au pK_A du groupe de surface, celle-ci est neutre (pour les groupes que nous avons pris). Pour un pH inférieur à ce pK_A elle est positivement chargée.

L'attraction électrostatique entre la surface positive et l'ADN négatif explique donc le fort ancrage à bas pH ($< pK_a$). A haut pH la surface est neutre, l'ADN est repoussé par sa charge image et les molécules sont emportées par le ménisque.

La transition entre ces deux régimes est différente pour les extrémités car ces dernières possèdent une charge différente du milieu de la chaîne. Plus précisément il a été démontré par des études de RMN [Stein et al., 1995] qu'elles étaient moins écrantées. Ce résultat induit qu'elles sont plus repoussées par leur charge image. Mais, à l'opposé, elles sont attirées par une plus faible charge en surface donc attirées à pH plus élevé. A priori, ces deux effets vont dans des sens différents, et rien ne permet de dire si l'interaction va perdurer plus haut en pH pour les extrémités ou pour le milieu des molécules. Cependant **expérimentalement** on observe que c'est le second effet qui est le plus fort. L'interaction attractive avec les bouts existe plus haut en pH et permet d'ancrer les molécules.

7.2 Surfaces hydrophobes

Sur les surfaces hydrophobes l'explication précédente n'est évidemment plus adaptée. Ce qui est remarquable avec toutes ces surfaces c'est que la zone où l'ADN ne s'accroche que par les bouts est identique, à l'exception du PMMA. Le pH optimum est 5.5 et ce de manière indépendante de la surface. Le mécanisme doit donc faire intervenir des propriétés,

dépendant du pH, propres à la molécule.

Lorsqu'on baisse le pH jusqu'à des valeurs très basses ($\text{pH} \sim 3$) on sait que l'on protone les bases et on dénature l'ADN, c'est à dire que l'on brise les liaisons hydrogènes entre les bases et que ainsi on sépare les brins. Quand on augmente le pH cet effet va se limiter aux extrémités, car de manière générale, quand on se rapproche de conditions dénaturantes, la dénaturation commence par les bouts [Benight and Wartell, 1983]. En abaissant le pH à 5.5 nous pensons que l'on atteint le point où l'on a dénaturation des extrémités mais pas le long de la molécule. On favorise donc l'exposition des bases à l'extérieur. Or les bases sont hydrophobes. Elles vont donc préférer se coller à la surface [Belotserkovskii and Johnston, 1996], elle même hydrophobe, qu'être exposées à l'eau. En abaissant le pH encore plus bas on va étendre cet effet au reste de la molécule et donc coller à la surface de manière non spécifique. A haut pH, les bases ne sont plus exposées, il n'y a donc plus d'interaction attractive mais il reste l'interaction répulsive due à la charge image.

7.3 Cas du PMMA

Comme cela a déjà été signalé le PMMA a un comportement différent des autres surfaces hydrophobes. D'une part son domaine de peignage n'est pas centré en 5.5 mais surtout il est beaucoup plus large que pour toutes les autres surfaces. D'autre part le PMMA est moins hydrophobe que le polystyrène donc l'interaction avec l'ADN à 5.5 doit être plus faible que sur celui-ci. D'autre part on peut imaginer que les groupements carboxyles du PMMA puissent former des liaisons hydrogènes avec les bases exposées de manière à stabiliser les bouts dénaturés.

8 Tests du modèle

8.1 Surfaces chargées positivement

Pour vérifier le modèle sur les surfaces chargées on pourrait jouer sur la densité de charges de la surface et sur la force ionique qui jouerait sur l'écrantage des charges. Malheureusement ces surfaces sont très difficiles à reproduire (nous ne sommes pas les seuls à avoir rencontré ces difficultés pour peigner sur les surfaces chargées [Yokota et al., 1997]). Les différences dues aux fluctuations des surfaces noient les autres effets. Il n'a pas été possible en conséquence de vérifier ce qui semble être une conséquence immédiate de notre hypothèse à savoir qu'à pH constant l'interaction peut être modifiée par modification de la densité de charge. Cela aurait permis de jouer sur la largeur de plage de pH entre les deux zones.

8.1.1 Influence du pK_A

Comme les pK_A , qui contrôlent la zone où se protonent les groupes, sont différents la plage de transition doit être différente pour chaque type de groupements de surface. Cette tendance a été détectée en moyenne puisque le peignage sur les surfaces de polyhistidine

(les pK_a des groupements acido-basiques de l'histidine sont 1.8, 6 et 9.2) a été observé vers $\text{pH} \sim 6$ alors que pour les surfaces de polylysine (les pK_a des groupements acido-basiques de la lysine sont 2.2, 9 et 10.5) c'est plutôt vers $\text{pH} \sim 7.5$ qu'il a été vu.

8.1.2 Effet de la charge de la surface

L'expérience qui est en fait est la plus démonstrative est assez simple. Nous avons pris une surface de polylysine que nous avons trempée à pH assez faible dans une solution d'acide polyglutamique (encore un polyacide aminé mais négativement chargé au pH de notre expérience). Dans ces conditions l'acide polyglutamique qui est alors négativement chargé se fixe spontanément à la surface de polylysine chargée positivement. Comme l'adsorption d'une charge induit celle de toute la chaîne, on a un changement de signe de la surface dans la zone qui a été ainsi traitée. La surface reste bien sûr positivement chargée sur l'autre partie. Le résultat de la mise en solution d'ADN à $\text{pH} \sim 6$ de ce type de surface est représenté sur la figure 12. Comme le modèle d'interaction électrostatique le prévoit, on observe une forte attraction sur la partie positivement chargée et une répulsion sur la partie négativement chargée et une zone indéfinie au milieu où des molécules peuvent être ancrées uniquement par les extrémités et fluctuer en solution.

On peut remarquer que Yokota *et al.* [Yokota et al., 1997] utilisent de l'ADN simple brin pour améliorer la qualité de leur peignage ce qui est concordant avec nos observations puisque cela va leur permettre de diminuer la très forte attraction.

8.2 Surfaces hydrophobes

Pour ces surfaces on peut envisager de jouer avec la température puisque c'est la variable la plus naturelle pour induire de la dénaturation. Cependant comme le pK_a et donc le pH des solutions varie avec la température on a donc un problème qui n'est pas très simple à gérer expérimentalement. De plus cela serait une série d'expériences assez fastidieuses du fait de la somme de travail demandé et pas forcément utile car la variable qui nous a permis de quantifier l'effet du pH , l'efficacité de peignage définie plus haut, n'est probablement pas la variable la plus fiable pour faire une mesure précise.

Pour vérifier le modèle nous nous sommes orientés vers la visualisation des bouts par microscopie à champ proche et par microscopie électronique. Si notre hypothèse est vérifiée les extrémités des molécules peignées devraient ressembler à des fourches en Y. Malheureusement nous n'avons pas jusqu'à présent réussi à voir les extrémités avec une résolution suffisante et de bonnes conditions de peignage avec ces techniques malgré l'aide de Etienne Delain de l'Institut Gustave Roussy et Emmanuelle Lacaze du Groupe de Physique du Solide.

La figure 13 représente deux images que nous avons obtenues avec E. Lacaze sur de l'ADN de pBr322 digéré par Nru1, qui est une enzyme qui coupe cet ADN circulaire en un seul endroit, sur une surface de polystyrène.

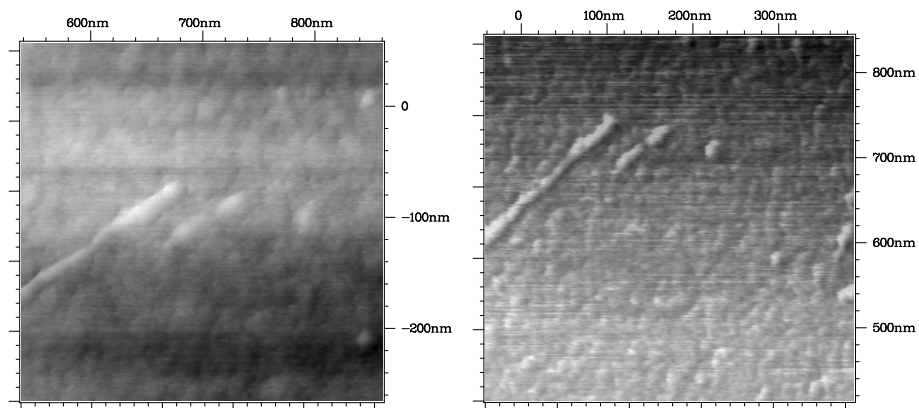


FIG. 13: Image d'ADN par AFM en tapping mode sur une surface de polystyrène. A terme les techniques de microscopie optique à champ proche devraient améliorer encore la résolution de la méthode FISH sur des ADN peignés. En attendant nous nous servons des microscopes à champ proche pour imager avec une grande résolution les extrémités pour comprendre l'origine du peignage. Nous présentons ici des images de la première étape de visualisation. L'ADN étant un mauvais conducteur nous n'avons pas pu pour l'instant imager sur le graphite les bouts des molécules avec un microscope à effet tunnel bas courant (courant de travail $\sim 1pA$). Ce travail est en cours.

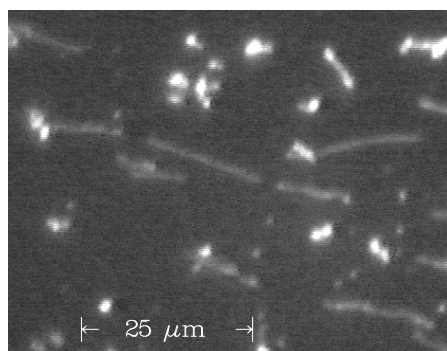


FIG. 14: Image d'ADN sur une surface de polylysine. L'étirement des molécules est dû aux écoulements lors de la mise en contact de la solution et de la surface. L'étirement est moins bon et moins uniforme qu'avec le peignage. Néanmoins c'est un moyen utilisé par les biologistes pour étirer de l'ADN sur des surfaces. Il devrait être remplacé par le peignage puisque celui ci est mieux contrôlé.

9 Intérêt de ces résultats pour les applications

En dehors de la compréhension du phénomène ces résultats sont importants pour les applications éventuelles en biologie. D'une part comme le phénomène est général on pourra utiliser le type de surface le plus facile à produire dans un laboratoire de biologie et on ne sera

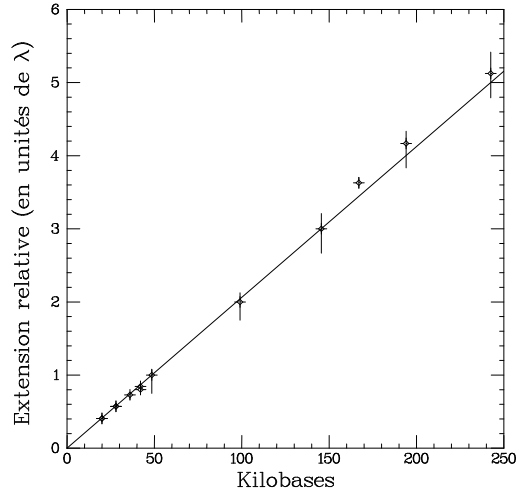


FIG. 15: Vérification de l’homogénéité de l’étirement sur différents ADN. On a procédé à cette vérification sur des surfaces C=C et polystyrène. Les longueurs ont été renormalisées par rapport au λ

pas limité aux surfaces C=C qui demandent une infrastructure particulière et qui présente certains dangers. De plus, le fait d’avoir observé que sur les surfaces très hydrophobes le pH optimum est toujours voisin de 5.5 devrait encourager l’utilisation de ce type de surfaces.

Jusqu’à présent les biologistes utilisent plutôt des surfaces chargées à bas pH (où l’ADN se colle spontanément partout), type polylysine [Meng et al., 1995], et se servent des écoulements lors de l’étalement de la solution pour étirer l’ADN. Ceci ne favorise pas un étirement uniforme et pose donc des problèmes de reproductibilité (figure 14).

Enfin la très grande sensibilité en pH indique que l’évaporation d’une goutte entre deux lamelles, qui a permis la découverte du phénomène, n’est pas la meilleure méthode pour faire du peignage. L’adsorption du CO_2 de l’air dans la solution peut suffisamment modifier le pH de cette goutte de quelques micro-litres pour sortir de la gamme où l’ancrage se fait. La technique inspirée de celle de Langmuir Blodgett est donc préférable.

10 Aspect mécanique du peignage

Lors du passage du ménisque l’ADN est étiré. L’extension d’une population déterminée d’ADN est bien définie pour une surface donnée.

10.1 Homogénéité de l’étirement

Nous avons vérifié que l’extension est bien indépendante de la longueur et de la séquence. La figure 15 présente l’extension d’un certain nombre de sources d’ADN en fonction de leur nombre de paires de bases. On trouve bien une relation linéaire entre ces deux grandeurs

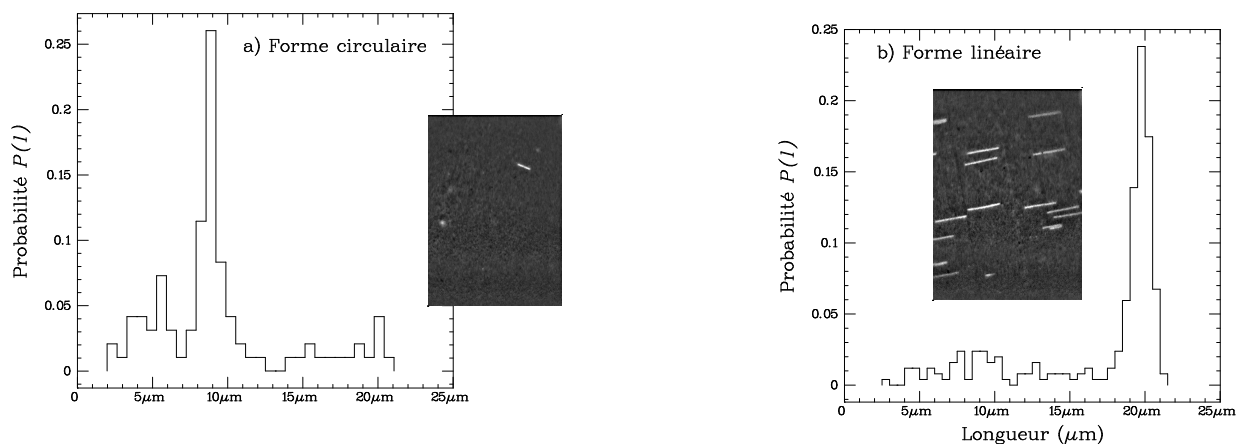


FIG. 16: Image et histogrammes obtenus à partir d'une souche d'ADN sous sa forme circulaire surenroulée et sous sa forme linéarisée par une enzyme de restriction. Le matériel biologique nous a été fourni par I. Lucas, C. Maric et O. Hyrien.

comme le prévoit un étirement homogène des molécules. Ce résultat confirme ceux obtenus par ailleurs [Bensimon et al., 1995, Michalet et al., 1997, Weier et al., 1995]. Ce résultat est important pour les applications en cartographie puisqu'il permet d'établir une relation simple entre longueur mesurée et nombre de paires de bases.

10.2 Difficulté de la modélisation mécanique

Lorsque nous avons peigné l'ADN circulaire sous sa forme surenroulée et sous sa forme linéaire nous avons vu qu'il y avait quelques molécules circulaires qui étaient peignées. Nous avons fait un histogramme de ces molécules qui s'adsorbaient de manière non spécifique 16. L'extension relative de la forme circulaire n'est pas la moitié de la forme linéaire comme on pourrait s'y attendre. En effet, la première image que l'on peut avoir serait de dire que la même force qui tirait sur un ADN va ici s'exercer sur chacun des brins. Or la raideur des brins est multipliée par deux du fait que chacun des brins est deux fois plus court. Cette hypothèse aboutit bien à une extension relative identique, ce qui n'est pas observé expérimentalement comme on peut le voir sur la figure 16. La force qui tire sur deux brins proches, comme dans notre cas, n'est donc pas le double de celle tirant sur un brin seul. Ce fait que nous n'interprétons pas, montre la difficulté de donner un modèle à l'échelle moléculaire du peignage.

10.3 Effet de la surface sur l'extension

D'après les résultats de Bensimon *et al.* [Bensimon et al., 1995], l'extension d'une molécule doit dépendre de l'hydrophobicité de la surface. Ceci avait été vérifié sur les surfaces C=C pour les surfaces hydrophobes et sur des surfaces recouvertes d'un anticorps qui rend la surface hydrophile. Nous avons confirmé cela en effectuant des histogrammes sur des

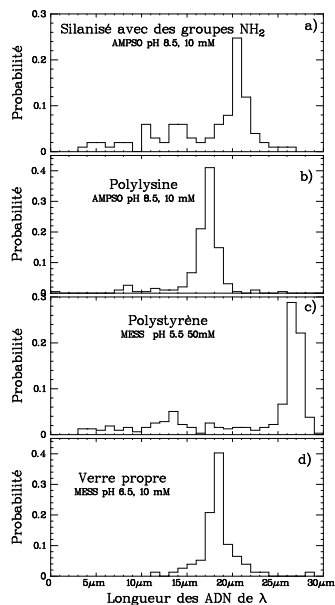


FIG. 17: Histogrammes de phage λ sur différentes surfaces. La longueur cristallographique de cet ADN est de $16.4 \mu m$. On remarque que l'extension sur le polystyrène est supérieure à celle de toutes les autres surfaces qui sont elles hydrophiles.

surfaces de polystyrène, des surfaces de polylysine, de verre propre, de polyhistidine. Ces histogrammes sont représentés sur la figure 17 et confirment bien les observations précédentes. Ainsi l'étirement sur une surface hydrophobe est supérieur à celui observé sur une surface hydrophile.

10.4 Relation entre peignage et manipulations d'ADN isolé

Depuis les résultats de Bensimon *et al.* deux groupes ont apporté des résultats importants [Cluzel et al., 1996, Smith et al., 1996] pour la gamme de force que l'on considère. Ils ont montré que pour une force de $\sim 70 pN$ l'ADN subit une transition brutale de longueur. A cette force il passe d'une extension relative de 1 à ~ 1.7 . Dans le cas du peignage on a une extension relative, après passage du ménisque, entre ~ 1.3 et ~ 1.5 ce qui situe la force de traction exactement au niveau de la force de transition. Ceci reste assez surprenant car la transition est assez brutale et se fait sur quelques picoNewtons.

Il a été montré que cette transition brutale disparaissait quand on ajoutait un intercalant tel le bromure d'éthidium [Smith et al., 1996, Cluzel et al., 1996]. On aurait pu penser que le YOYO1 aurait le même effet, ce qui aurait impliqué une moins grande définition de la force. Nous avons cependant vérifié qu'il n'en est rien puisque nous avons observé la même élongation sur des molécules teintées uniquement après peignage. Tout ceci tend à montrer que la force exercée par le ménisque est bien définie malgré la variété des extensions obtenues sur les différentes surfaces.

11 Matériel et méthodes

- YOYO1 : Sa longueur d'onde d'excitation est dans le bleu, et sa longueur d'onde d'émission est dans le jaune. Nous avons utilisé un taux moyen d'incorporation de 1 YOYO1 pour 20 paires de bases (dans du TRIS 40mM EDTA 2mM) lorsque nous l'avons utilisé pour marquer les molécules avant de peigner. Dans ce cas nous avons simplement suivi le protocole du fabricant, à savoir mise en contact de la surface avec $200\mu\text{l}$ de solution de YOYO1 2nM dans du PBS et ce pendant au moins 20 minutes.

Sur certaines surfaces l'ADN n'est plus visible après séchage. Il est possible que le YOYO1 diffuse sur la surface ou plus probablement que sa fluorescence n'est plus efficace. Il est bien sûr impossible de garantir totalement que l'ADN est bien peigné sur de telles surfaces. Cependant les écoulements qui apparaissent durant l'évaporation de la solution étirent l'ADN ancré à la surface ce qui permet de vérifier qu'il est bien attaché. D'autre part on ne le voit pas partir avec le ménisque il est donc hautement probable que comme sur les surfaces où le YOYO1 reste actif après séchage l'ADN soit peigné.

- ADN : dans la plupart des cas nous avons utilisé de l'ADN de phage λ de chez Boehringer. Cet ADN possède 48502 paires de bases et fait donc environ $16\mu\text{m}$ de longueur cristallographique. Nous avons aussi fait usage d'un ensemble de multimères de cet ADN. Nous avons également utilisé du phage T_4 (162 kilo-bases) de chez Sigma. I. Lucas, C. Maric et O. Hyrien nous ont fourni des ADN de différentes tailles sous formes circulaires surenroulées ou linéaires.

Fabrication des surfaces :

- **Surfaces C=C** : ces surfaces ont été préparées à l'Institut Pasteur par C. Schurra dont nous donnons ici le protocole. Le verre est nettoyé dans un mélange (1/3 H_2O_2 , 2/3 hydroxyde d'ammonium 30%) amené à ébullition. Il est ensuite rincé à l'eau distillée. Il est ensuite introduit dans une chambre hermétique. L'enceinte est remplie de O_2 et illuminée par des U.V. pour donner de l'ozone. La chambre est lavée à l'azote puis remplie d'azote avec 10% d'eau durant 20 minutes. Ceci est suivi d'un nouveau lavage à l'azote. On ajoute alors $100\mu\text{l}$ d'octyltrichlorosilane ($CH_2 = CH - (CH_2)_6 - SiCl_3$) pour une nuit.
- **Surfaces de polystyrène** : le polystyrène de masse moléculaire 280000 ou 50000 est dissous dans du toluène pour une concentration finale de 100 ou 50 mg/ml. Un peu de solution est déposé sur une lamelle couvre objet puis mise sur une tournette à 3000 tours/s pendant 30 s. Aucun des paramètres précédents n'est critique.
- **Surfaces de polyméthylmétacrilate (PMMA)** : le protocole est identique à celui des surfaces de polystyrène à la différence que les surfaces doivent être ensuite chauffées à 150°C durant 30 minutes. La concentration que nous avons utilisée est de 0.5mg/ml pour un PMMA de masse moléculaire 300000.
- **Surfaces de verre propre** : le verre est simplement nettoyé dans un mélange (1/3 H_2O_2 , 2/3 acide sulfurique 18 molaire) durant 30 minutes. Il est finalement rincé à

l'eau distillée, laissé 10 minutes dans de l'eau bouillante et finalement séché à l'argon. Il est utilisé immédiatement après fabrication.

- **Surfaces de polylysine ou polyhistidine** : les lamelles de verres sont nettoyées comme précédemment mais en plus sont trempées 5 minutes dans de la soude 10 M. Après lavage à l'eau pure elles sont trempées 2 minutes dans une solution aqueuse de 1 à 500 $\mu\text{g/ml}$ de polypeptide (M_W de 15000 à 50000). Les lamelles sont ensuite rincées à l'eau, séchées à l'argon, et stockées.

Malgré des protocoles identiques les surfaces ne sont pas parfaitement reproductibles.

- **Surfaces de γ -amino-tri-ethoxy-silane** : le lavage du verre est identique au précédent. Le verre est ensuite trempé dans une solution de méthanol avec 2.5 à 5 mg/ml de γ -amino- tri-ethoxy-silane durant quelques minutes. Il est finalement rincé à l'eau pure puis dans de l'éthanol et enfin séché à l'argon.

12 CONCLUSION

Nous avons montré que les extrémités de l'ADN, et uniquement les extrémités, pouvaient, sans modification de la molécule, avoir une interaction attractive avec de nombreux types de surfaces. La nature des extrémités ne joue pas sur le phénomène. Le principal paramètre à contrôler est le pH mais ce contrôle doit être précis puisque la largeur typique de la plage où l'on peut ancrer les molécules spécifiquement par leurs extrémités est très étroite (typiquement 0.2 unités pH).

La grande diversité chimique des surfaces utilisées nous a conduit à écarter le premier scénario envisagé pour expliquer l'ancrage, à savoir une réaction chimique.

Nous avons proposé deux modèles, un pour les surfaces hydrophobes et un pour les surfaces hydrophiles, pour expliquer cette attraction dépendant du pH. Cependant ces modèles demandent à être vérifié de manière plus précise (surtout pour les surfaces hydrophobes). Comme nous l'avons dit cette étape est en cours et nous espérons qu'elle aboutira rapidement.

En tout cas l'ensemble de ces résultats permet de montrer que l'utilisation du peignage, comme moyen de linéariser de l'ADN sur des surfaces, est simple. Il suffit d'avoir un tampon à pH 5.5 et des surfaces hydrophobes.

C'est maintenant aux biologistes de voir ce que cette technique peut apporter au diagnostic et à la cartographie.

Sole épaisse au four

graines lointaines et jeunes poireaux des bords de mer

Olivier Roellinger [Roellinger, 1994]

Pour 4 personnes : • 2 soles de 800g dont on fera enlever la peau noire et écailler la peau blanche • 500g de petites pommes de terre nouvelles • 20 petits poireaux • 80g de beurre • 2 gousses d'ail • 1 citron • 1 zeste de citron • 2 zestes d'orange • 2dl de bouillon de volaille

Mélange d'épices et d'amandes : 2 c..s de sésame, 1 c.à.s de noisettes, 1 c.à.s. d'amandes, 1 c.à.s de coriandre, 1/2 c.à.s de sumac, 1 c.à.s de cumin • gros sel.

Préparation de base. Un peu plus d'une heure à l'avance : dans une casserole, faire chauffer à sec les noisettes et les amandes. Aprs une légère coloration, ajouter le sésame, le cumin, la coriandre et enfin le sumac. Mixer rapidement dans un moulin à café. Conserver dans un bocal hermétique.

Blanchir deux fois les zestes d'agrumes.

Découper la tête et les barbillons des soles, les rincer et les réserver, fendre chaque sole par la moitié et la tailler en tronçons, en conservant les laitances, et faire attendre le tout au frais. Couper les têtes et les barbillons en petits morceaux et les faire revenir avec 50g de beurre, en remuant constamment avec une cuillère ou une spatule en bois, en décollant les sucs qui se forment, sans cesser de contrôler l'intensité du feu : la préparation doit "attacher" pendant 10 minutes pour obtenir ce bon goût et cette odeur particulière du "corsi". Ajouter alors 1 c.à.s. du mélange d'épices. Laisser dorer quelques instants puis ajouter les zestes d'agrumes et déglacer d'un jus de citron. Mouiller enfin avec le bouillon de volaille et un peu d'eau. Laisser cuire à feu très doux 1 heure, puis passer dans une passoire fine et presser avec une petite louche pour extraire le maximum de quintessence de sole.

Pendant ce temps, laver puis émincer les poireaux en les taillant en biais. Laver les pommes de terre sans les peler mais en les frottant simplement avec du gros sel.

Dernière minute. Couvrir les pommes de terre d'eau salée avec 10g de beurre . Porter à ébullition et surveiller la cuisson : elles ne doivent pas trop cuire.

Faire suer rapidement les poireaux dans une noix de beurre et les assaisonner. Ils ne doivent surtout pas attacher mais rester d'un joli vert blanc.

Pendant ce temps assaisonner les tronçons de soles, les faire dorer dans une poêle antiadhésive avec 20g de beurre.

Préchauffer le four et le plat de cuisson.

Disposer les tronçons dans le plat de cuisson. Mouiller avec la moitié du jus d'arête et poursuivre la cuisson au four à 220 degrés. Après 5 minutes ajouter les poireaux et les pommes de terre. Faire cuire encore 10 minutes en arrosant les soles et en ajoutant si nécessaire du jus d'arête. Vérifier l'assaisonnement en fonction de la réduction.

Servir dans le plat de cuisson et ne pas hésiter à saucer.

Troisième partie

Mesure de force par mouvement brownien

13 Introduction

L'approche conjointe de certains domaines de la biophysique par des biologistes moléculaires et des physiciens a produit des avancées spectaculaires.

Les techniques de biologie moléculaire autorisent la manipulation, au sens large, des molécules. Elles permettent de greffer des groupes fonctionnels, qui comme nous le verrons au prochain chapitre servent à attraper des molécules. Elles génèrent des mutations contrôlées.

La physique, grâce aux développements de nouveaux objets, tels les microscopes à champ proche, l'utilisation de faisceaux laser pour piéger des objets peut manipuler, au sens presque premier, et faire des mesures sur des objets microniques.

La rencontre de ces deux domaines scientifiques a donné les plus spectaculaires avancées dans le domaine des moteurs moléculaires et en particulier pour le système actine-myosine (voir l'article de revue de J. Spudich [Spudich, 1994]). Ce système est à la base du fonctionnement de nos muscles. Les manipulations sur des molécules isolées ont pu préciser qu'elle force est mise en jeu à chaque étape du mouvement et l'amplitude de chaque pas élémentaire de la myosine sur le filament d'actine. A l'aide de mutations ces expériences ont pu déterminer autour de quelle partie de la molécule de myosine s'articule le mouvement et en donner une signification par rapport au pas élémentaire (voir figure 18). La seule question majeure qui reste en suspens pour ce système est de savoir combien de pas peut on avoir pour une molécule d'ATP consommée. Ceci réclame donc, pour être fait de manière directe, en plus de la micro-manipulation de pouvoir détecter une réaction chimique unique. Or ceci a déjà démarré [Funatsu et al., 1995] et on peut raisonnablement penser que la dernière question que pose le système actine-myosine sera résolue dans assez peu de temps.

Un des problèmes que pose la micro-manipulation de molécules isolées est l'accès aux forces mises en jeu à cette échelle. Les mouvements biologiques impliquent des échelles de distance de quelques nanomètres et d'énergie de quelques $k_B T$. L'échelle typique de force est donc $4 \times 10^{-21} / 10^{-9} = 4 \times 10^{-12}$ soit le piconewton. Pour effectuer des mesures dans cette gamme là, nous avons mis au point une technique originale de mesure de force basée sur le mouvement brownien.

Cette technique est une alternative aux autres capteurs de forces existant dans cette gamme. Ces alternatives sont principalement les pinces optiques, les micro-fibres et le microscope à force atomique. Comme nous allons le voir dans la suite, notre méthode présente différents avantages sur ces techniques : elle ne réclame pas de calibration de la force, elle possède une grande dynamique, elle est assez peu onéreuse, elle n'est pas perturbative. Nous allons donc en présenter le principe, sa mise en oeuvre et en discuter les avantages et son

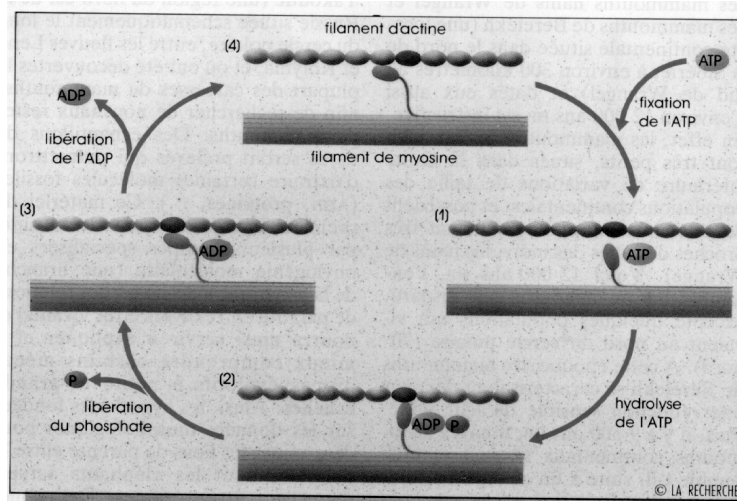


FIG. 18: Schéma du fonctionnement du couple actine-myosine qui est un constituant de nos muscles. L'actine se présente sous forme de filaments. Lorsque la myosine fixe l'ATP elle se décroche du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP va provoquer un changement de conformation sur la tête de myosine qui va provoquer la force et le mouvement. Une fois l'ADP relâché la tête est solidement attachée au filament. Ce dernier point est la cause de la rigidité cadavérique puisque une personne morte ne produit plus d'ATP, toutes les têtes s'accrochent donc dans le temps au fur et à mesure que tout l'ATP disparaît et les muscles se rigidifient.

principal inconvénient, à savoir sa lenteur .

14 Principe de la mesure

Notre modèle est une microbille soumise à une force \vec{F} , attachée par une molécule d'extension l . Dans nos expériences il s'agira d'une molécule d'ADN. L'ensemble est en solution à une température T et observé par microscopie optique. Du fait du choc des molécules d'eau la bille possède un mouvement brownien. Lorsque la bille, à cause de ce mouvement, s'écarte de sa position moyenne elle subit une force de rappel. Dans une direction perpendiculaire à la force, si l'on appelle δx l'écart à la position d'équilibre et $\delta\alpha$ l'angle entre l'axe de la molécule et de la force, la force de rappel est donnée par (voir figure 19) :

$$F_{\text{rappel}} = F \sin(\delta\alpha) \sim \frac{F\delta x}{l} \quad (1)$$

Cette force est donc proportionnelle à l'écart à la position à l'équilibre. On a donc l'équivalent d'un ressort dont la raideur effective serait :

$$K_{\perp} = \frac{F}{l}$$

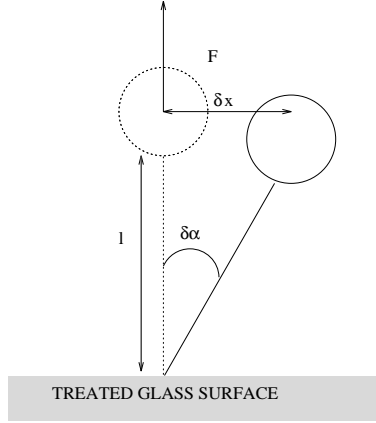


FIG. 19: Les fluctuations browniennes provoquent un déplacement de la bille par rapport à sa position d'équilibre. La force de rappel est la projection de la force sur l'axe x : $F_x = F \times \sin(\delta\alpha) \sim F \times \sin(\frac{\delta x}{l}) \sim F \times \frac{\delta x}{l}$. La force de rappel est donc proportionnelle au déplacement, comme pour un ressort. Ce point permet de définir une raideur effective $\frac{F}{l}$.

Dans la direction de la molécule la raideur est directement celle de la molécule d'où :

$$K_{\parallel} = \left(\frac{\partial F}{\partial l} \right)$$

Pour mesurer ces raideurs on peut simplement utiliser le théorème d'équipartition de l'énergie :

$$\frac{1}{2} K_w \langle \delta w \rangle^2 = \frac{1}{2} k_B T$$

où δw est l'amplitude des fluctuations dans la direction étudiée et K_w la raideur associée dans la même direction [Einstein,].

Pour remonter à la raideur de la molécule il suffit de mesurer les fluctuations de position dans la direction de la force. Pour mesurer la force il faut mesurer la longueur de la molécule et les fluctuations transverses de la bille.

Le problème de la mesure de force est donc ramené à celui, plus simple, d'une mesure de longueur. La valeur de la force est simplement reliée aux fluctuations par la relation suivante :

$$F = k_B T \frac{l}{\langle \delta w \rangle^2} \quad (2)$$

Pour la mesure de la force tout repose sur l'équation 1. Celle-ci a été introduite comme une simple approximation au premier ordre pour de petites déviations (figure 19) et ne semble donc valable que pour des situations où l'extension de la molécule est grande. Or C. Bouchiat du laboratoire de physique théorique de l'ENS a montré de manière rigoureuse que cette relation reste valable même pour des faibles extensions et que donc celle-ci est générale [Bouchiat, 1996].

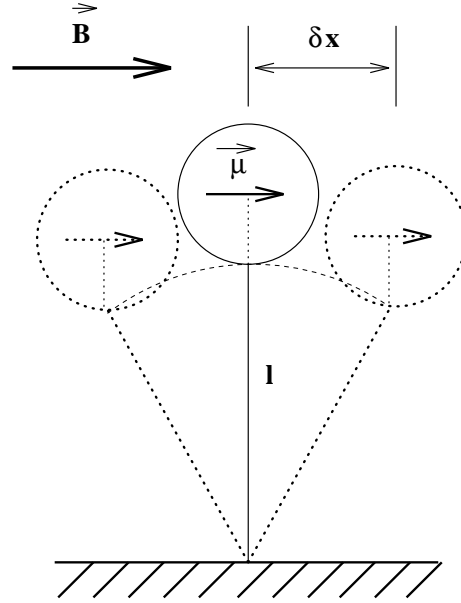


FIG. 20: A cause de l'orientation du champ magnétique dans la direction x les fluctuations Browniennes de la billes sont anisotropes dans le plan xy . Selon l'axe x la bille possède un mouvement de translation au bout de la molécule de longueur l . La raideur du ressort effectif est donc bien $\frac{F}{l}$

14.1 Corrections au modèle

Dans notre système expérimental des corrections sont à apporter à ce modèle simple. La bille est superparamagnétique. Elle se comporte en pratique comme une boussole. La force est exercée par des aimants. Cela implique l'intensité de la force va être donnée par le gradient de champ magnétique.

Par ailleurs le couple exercé par le champ extérieur sur la bille est supérieur à celui que peut produire la molécule sur la bille. La direction de la bille, ou plutôt de son dipôle, va donc être fixée par la direction du champ (voir figures 20 et 21).

14.1.1 Anisotropie du mouvement brownien

Cette dernière remarque est importante pour les fluctuations. En effet elles vont devoir se faire en maintenant le dipôle de la bille en permanence parallèle au champ. Cela veut dire que pour les fluctuations dans le plan de la molécule et de la direction du champ les fluctuations vont bien se faire par rapport au point d'attache de la molécule FIG.20, avec une simple translation de la bille. La longueur à prendre en compte pour ces fluctuations sera bien la longueur de la molécule.

Or cela n'est pas le cas pour les fluctuations dans la direction perpendiculaire à celle-ci FIG.21. Dans cette direction rien n'impose aux fluctuations de s'articuler autour du point

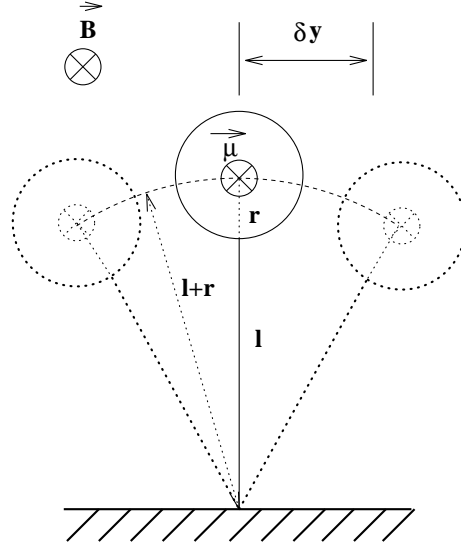


FIG. 21: Dans la direction y la bille peut pivoter autour du point de fixation de l'ADN à la différence du mouvement selon x . De ce fait la raideur effective du pendule est $\frac{F}{l+r}$ où r est le rayon de la bille.

d'ancrage et la longueur à considérer n'est plus la longueur de la molécule mais la longueur de la molécule plus le rayon de la bille.

Cet effet va rompre la symétrie de révolution dans le plan transverse à la force.

Si l'on note x la direction du champ et donc celle du dipôle de la bille dont le rayon est noté r , y sa direction perpendiculaire et z la direction de la force alors on a accès à trois raideurs différentes à partir des fluctuations dans les trois directions :

- $K_x = \frac{F}{l}$
- $K_y = \frac{F}{l+r}$
- $K_z = \left(\frac{\partial F}{\partial l}\right)_l$

14.1.2 Point d'ancrage

Jusqu'à présent nous avons supposé implicitement que la molécule était accrochée en bas de la bille. Dans notre situation expérimentale rien ne le garanti. En effet la molécule s'accroche de manière aléatoire sur la bille. Celle-ci a ensuite l'orientation de son dipôle qui est fixée par la direction du champ (voir le prochain chapitre pour plus de détails sur le protocole d'ancrage). Cela signifie que le point d'ancrage n'est pas forcément situé au point le plus bas de la bille mais à une latitude θ comprise entre 0 et 90 degrés (figure 22). La latitude est définie par rapport à la direction du dipôle et à la verticale.

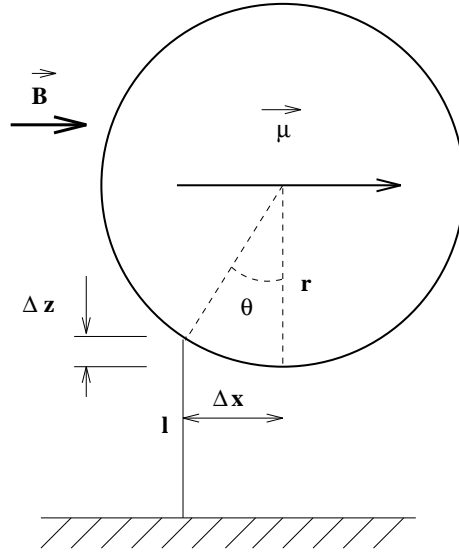


FIG. 22: Le point d'attache de la molécule n'a pas de raison particulière de se trouver sur la latitude 0 (repérée par rapport au moment dipolaire de la bille et à la verticale). Ce repérage de la latitude est possible car la bille se comporte comme une boussole : son aimantation est fixe par rapport à la bille.

Cet effet se manifeste par une excentricité de la bille quand on fait tourner les aimants puisque l'axe de la bille ne correspond pas à l'axe de rotation qui est celui de la molécule.

Le problème que cela pose est le suivant. Pour mesurer l'allongement de la molécule nous regardons de combien la bille s'est soulevée. Prenons le cas extrême où le point d'ancrage est situé sur l'équateur de la bille. En mesurant l'extension de la molécule par la hauteur de la bille nous ne prenons pas en compte une longueur de molécule égale à un rayon de la bille.

De manière générale, pour un point d'ancrage situé à une latitude θ , l'erreur sur la longueur induite par notre méthode de mesure est $r \cos \theta$ ou r est le rayon de la bille. Pour avoir des résultats précis il faudra corriger cet effet.

Pour cela nous enregistrons la position de la bille pour quatre positions des aimants décalées de $1/4$ de tour. Celles-ci sont situées sur le cercle que décrit la bille à cause de la rotation des aimants et de l'excentricité de l'ancrage à la bille. Nous en déduisons le rayon du cercle R :

$$R = r \sin \theta$$

R et r sont connus et nous pouvons alors obtenir θ ce qui permet de calculer $r \cos \theta$ et de faire la correction sur les longueurs.

Dans la pire des configurations expérimentales que l'on a utilisé la bille a pour diamètre $4.5 \mu m$ et la molécule a pour extension maximale $\sim 5 \mu m$ ce qui implique des corrections pouvant être importantes.

15 Analyse fréquentielle

Nous allons maintenant présenter l'analyse fréquentielle du mouvement brownien de la bille et voir les améliorations expérimentales qu'elle permet par rapport à la simple vision dans l'espace direct que l'on vient de voir.

Remarque : la convention que nous avons choisi de suivre consiste à ne considérer que les fréquences positives ce qui peut introduire un facteur 2 ou des bornes d'intégrations différentes par rapport à certaines références.

15.1 Équations du mouvement

Notre système est une bille de rayon r , soumise à une force de rappel élastique (caractérisée par une constante de raideur K), à la force de Stokes et à la force de Langevin.

A titre de rappel la composante selon l'axe w de la force de Langevin est caractérisée par :

$$\langle F_w(t) \rangle = 0$$

et

$$\langle F(t)_w F_w(t') \rangle = 4k_B T \gamma \eta r \delta(t - t')$$

Dans ces relations γ est le coefficient de friction visqueuse et η la viscosité. Pour fixer un ordre de grandeur l'intensité de cette force vaut $\sim 30fN/\sqrt{Hz}$ pour une bille de $3\mu m$ dans un milieu infini i.e. pour $\gamma = 6\pi$ [Landau and Lifchitz, 1971] et avec $\eta = 10^{-3}$.

L'équation du mouvement dans l'espace direct est donc donnée par :

$$m\ddot{x} = -K_{eff}x - \gamma\eta r\dot{x} + \sqrt{(4k_B T \times \gamma\eta r)}\delta(t) \quad (3)$$

Comme nous l'avons signalé γ vaut 6π pour la bille dans un milieu infini mais la présence d'une paroi modifie ce coefficient. La valeur de celui-ci dépend fortement de la distance de la bille à la surface [Happel and Brenner, 1991]. En passant dans l'espace de Fourier cette équation devient :

$$-m\omega^2\tilde{x} = -K_{eff}\tilde{x} - \gamma\eta r\omega\tilde{x} + \sqrt{4k_B T \gamma\eta r} \quad (4)$$

On peut dans cette relation négliger le terme inertiel car il fait intervenir les fréquences $\sqrt{K_{eff}/m}$ et $\gamma\eta r/m$ valent plusieurs dizaines de KHz lorsqu'on utilise les valeurs expérimentales (rayon de l'ordre du μm , densité des billes d'environ 1.3, $\eta \sim 10^{-3}$, force de l'ordre du piconewton, et longueur des molécules d'environ $10\mu m$). D'une part ces fréquences seront filtrées par la viscosité et d'autre part elles nous seront inaccessibles expérimentalement car nos acquisitions se font à l'aide d'une caméra vidéo donc à $25Hz$.

L'équation pour le spectre de puissance des fluctuations se réduit donc à :

$$|\tilde{x}^2| = \frac{\frac{4k_B T \times \gamma\eta r}{K_{eff}^2}}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^2} \quad (5)$$

avec $\omega_c = \frac{K_{eff}}{\gamma\eta r}$. Il comprend donc une partie plate à faible fréquence et une partie filtrée par la viscosité. La fréquence de coupure intervenant dans cette Lorentzienne est $\omega_c = F/(\gamma\eta r l)$.

Au niveau du spectre la force intervient donc dans la fréquence de coupure mais aussi pour l'amplitude de bruit aux basses fréquences.

La figure 33 présente des spectres expérimentaux.

15.2 Apport de l'analyse fréquentielle

L'intégrale de ce spectre permet de retrouver le théorème d'équipartition de l'énergie :

$$\frac{1}{2\pi} \int_0^\infty |\tilde{x}^2| d\omega = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T x^2 dt = \frac{k_B T}{K_{eff}} \quad (6)$$

On ne perd donc rien par rapport à l'analyse dans l'espace direct puisqu'on retrouve le résultat principal.

Le spectre de Fourier est une Lorentzienne caractérisée par deux paramètres : l'amplitude et la fréquence de coupure. Son intégrale est une fonction Arctg. Plus précisément l'intégrale vaut :

$$\frac{4k_B T}{K_{eff}} \arctan \frac{\omega}{\omega_c} \quad (7)$$

Pour avoir la valeur limite de cette intégrale et sa fréquence de coupure on peut donc simplement ajuster la Lorentzienne obtenue expérimentalement par ce type de fonction. Cependant la fonction intégrée est moins bruyante et contient les deux mêmes paramètres. On peut donc améliorer l'ajustement en utilisant la fonction intégrée et une fonction *arctan*. Cette méthode est simple mais les problèmes de filtrages liés à la fréquence d'acquisition nous ont amené à utiliser une autre méthode que nous allons préciser dans la suite.

15.2.1 Fréquence de coupure

Le premier élément supplémentaire apporté par l'analyse fréquentielle est la fréquence de coupure.

Tests Celle-ci permet différents tests :

- elle nous permet de vérifier que notre acquisition a été assez longue. En effet le temps caractéristique d'une mesure est donné par ω_c^{-1} pour avoir une bonne statistique il nous faut donc attendre plus longtemps que ce temps. Une autre façon de voir est de dire qu'il faut échantillonner assez longtemps pour avoir accès aux fréquences plus basses que ω_c . Pour situer les temps les plus longs que nous avons utilisé signalons que pour faire une bonne mesure de force à quelques dizaines de femto-Newtons sur des molécules de $30\mu m$ nous avons fait des acquisitions d'environ 1H30.
- nous vérifions la qualité de l'acquisition en comparant cette fréquence de coupure à celle de la vidéo. En effet la vidéo introduit un filtrage et éventuellement des repliements

de spectres. Ceci est du au fait que la caméra intègre le signal durant $1/25^{eme}$ ou $1/50^{eme}$ de seconde, suivant son mode de fonctionnement. Si l'on travaille sur toutes les trames ou si l'on dissocie trames paires et impaires on va donc introduire un filtrage dont le zéro se situe à 25 ou 50 Hz . Pour vérifier si ce filtrage joue sur l'acquisition ou pas il faudra pour chaque mesure comparer ω_c à cette fréquence. Dans le cas où ω_c n'est pas petit devant cette fréquence il faudra faire les corrections nécessaires (on reviendra sur ce problème dans la suite) et elles ne seront applicables que dans l'espace des fréquences.

Mesures hydrodynamiques • La valeur de la fréquence de coupure est donc :

$$\omega_c = \frac{F}{\gamma\eta R} \quad (8)$$

Cela signifie donc que si l'on connaît la fréquence de coupure, le rayon de la bille (qui se mesure directement), ainsi que F (obtenu par la valeur limite de l'intégrale du spectre) et l on peut alors en déduire la valeur du coefficient de friction visqueuse. On peut donc faire, comme dans la figure 23 des mesures d'hydrodynamique en vérifiant la loi de variation de ce coefficient en fonction de la distance à la paroi.

Faisons une petite digression pour présenter l'origine de cette loi théorique. Notre système est constitué d'une bille de rayon R attachée à la surface par un cylindre de rayon R' (égal à $\sim 2 \times 10^{-9}m$ à haute extension) et de longueur l . La force visqueuse, parallèle à la surface, s'exerçant sur la bille placée dans un écoulement à la vitesse U est donnée par [Happel and Brenner, 1991] :

$$F_{bille} = 6\pi\eta R \left[1 + \frac{9R}{16l} \right] U \quad (9)$$

La force visqueuse sur le cylindre dans un milieu infini est [Landau and Lifchitz, 1971] :

$$F_{Cyl} = \frac{4\pi\eta l U}{\frac{1}{2} - C_{Euler} - Ln\left(\frac{R'U}{4\nu}\right)} \simeq 0.4\eta l U \quad (10)$$

avec $C_{Euler} = 0.577$, et en faisant l'hypothèse que $F_{DNA} = \frac{F_{Cyl}}{2}$ à cause de la présence de la paroi qui implique que $U = 0$ au niveau de celle-ci. Le coefficient de friction visqueuse de tout le système est alors :

$$\gamma = 6\pi\eta R \left[1 + \frac{9R}{16l} + \frac{0.4 l}{6\pi R} \right] \quad (11)$$

C'est cette fonction qui est tracée en trait plein dans la figure 23 et qui est en bon accord avec les données expérimentales. On voit que la courbe tend vers la valeur théorique dans un milieu infini.

• On peut pousser plus loin l'intérêt en hydrodynamique de notre système de mesure. En effet, supposons que la force soit exercée par un écoulement. Cette force va donc être donnée, à faible nombre de Reynolds, par $\gamma\eta R V_0$ où V_0 est la vitesse du fluide. La fréquence de coupure est alors simplement $\frac{V_0}{l}$. Elle permet donc d'accéder à la vitesse du fluide sans

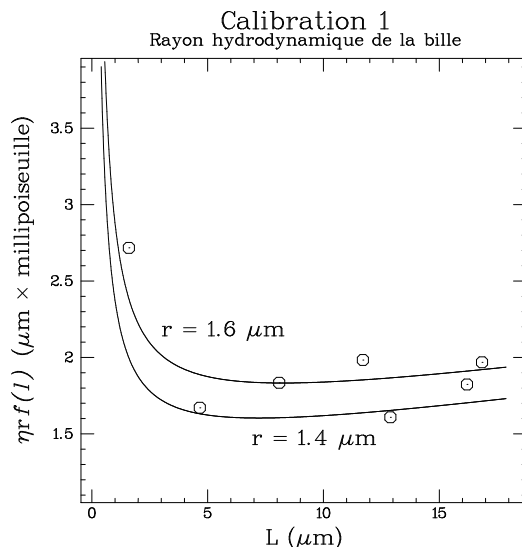


FIG. 23: Variation du coefficient de friction visqueuse en fonction de la distance à la paroi. La présence de la paroi et de la molécule d'ADN modifie le coefficient de friction visqueuse sur la bille qui s'éloigne notablement de sa valeur de 6π valable dans un milieu infini.

hypothèse sur le coefficient de friction visqueuse. La mesure de la vitesse du fluide se ramène donc à celle de l'extension de la molécule et de la fréquence de coupure.

15.2.2 Filtrages

L'autre avantage de l'analyse fréquentielle est de pouvoir appliquer des filtres. En effet notre dispositif à une sensibilité d'environ $10nm$ (voir suite). Nous poussons donc le microscope dans ses limites. Or sa mécanique n'est pas prévue pour cela. Cela signifie que sa stabilité n'est pas parfaite et qu'il est sujet à des dérives qui ne sont pas négligeables, surtout pour de longues acquisitions. Ces dérives sont cependant lentes comparées aux fréquences du mouvement brownien. En travaillant dans l'espace des fréquences nous pouvons donc appliquer un filtre passe haut qui retire ces dérives tout en ne modifiant pas les caractéristiques du mouvement brownien. Ceci est une amélioration importante par rapport à l'analyse dans l'espace direct.

Nous venons de voir les différentes améliorations que permet l'analyse fréquentielle. Nous allons approfondir l'influence de la vidéo.

15.3 Effet de l'acquisition vidéo

La figure 24 illustre bien le problème que pose la vidéo. Une caméra intègre un signal durant une certaine durée : $1/50^{\text{ème}}$ de seconde avec un décalage de $1/50^{\text{ème}}$ de seconde entre trames paires et impaires (mode field de la caméra) ou bien elles peuvent intégrer durant $1/25^{\text{ème}}$ de seconde mais être décalées de $1/50^{\text{ème}}$ de seconde (mode frame). La

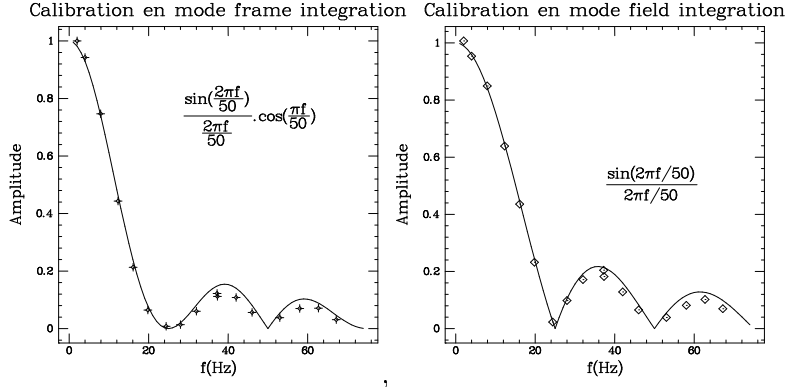


FIG. 24: Réponse fréquentielle de la chaîne d'acquisition suivant le mode de fonctionnement de la caméra. Pour les forces assez grandes le filtrage introduit par le système modifie de manière conséquente le signal. Ceci impose donc des corrections pour éliminer ce problème.

conséquence de ceci est un filtrage qui donne un zéro à $25Hz$ ou à $50Hz$. Cela conduit donc à une déformation importante du signal pour des acquisitions caractérisées par des fréquences de coupure élevées, par rapport à la fréquence vidéo.

Le premier effet concerne la force limite que peut mesurer notre système de manière fiable. Sans ce problème d'échantillonnage à la fréquence vidéo, la force maximale mesurable est donnée par la résolution du dispositif. Prenons pour exemple une molécule de $5\mu m$. En utilisant l'équation 2 avec une résolution qui, comme on le verra dans la suite, est de $10nm$ on obtient une force limite de $200pN$. Pour la même molécule, la force qui donne une fréquence de coupure de $12.5 Hz$, alors que l'amplitude du signal est presque divisée par deux à cette fréquence, n'est que d'environ $22pN$. L'échantillonnage vidéo est donc le principal élément de limitation dans la gamme de force accessible. Par ailleurs il faut noter que celle-ci dépend de la longueur de la molécule et du diamètre de la bille.

L'échantillonnage vidéo filtre donc le mouvement Brownien mais applique également des repliements de spectre au signal. L'influence de ceci sur le signal réel dépend uniquement du rapport de la fréquence d'acquisition sur la fréquence de coupure. Il nous faut donc déterminer celle-ci. Pour cela nous n'utilisons plus la méthode de l'Arctan que nous avons préalablement discuté. Nous utilisons une fonction de la seule fréquence de coupure.

Pour une Lorentzienne le rapport

$$\frac{\int_{\omega_{min}}^{\omega_{max}} \frac{\omega}{1 + \frac{\omega^2}{\omega_c^2}} d\omega}{\int_{\omega_{min}}^{\omega_{max}} \frac{1}{1 + \frac{\omega^2}{\omega_c^2}} d\omega} = \frac{\omega_c \left[\log \left(1 + \frac{\omega^2}{\omega_c^2} \right) \right]_{\omega_{min}}^{\omega_{max}}}{2 \left[\arctan \frac{\omega}{\omega_c} \right]_{\omega_{min}}^{\omega_{max}}}$$

n'est fonction que de ω_c puisque ω_{min} et ω_{max} sont connus. Nous calculons ce rapport pour notre spectre expérimental qui est lui aussi une Lorentzienne. Nous en déduisons ensuite la fréquence de coupure de notre acquisition.

Les filtrages et les repliements peuvent faire, je le rappelle, que le résultat n'est pas le bon. Pour le vérifier nous générons une Lorentzienne ayant la fréquence de coupure que nous

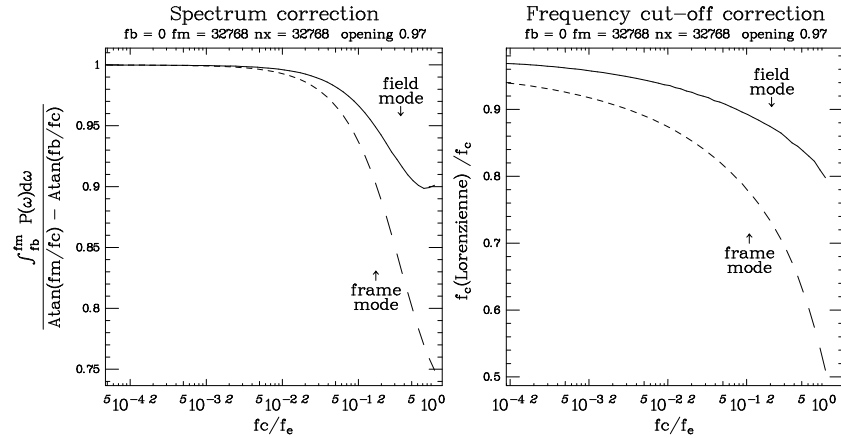


FIG. 25: Nous avons généré une Lorentzienne. Nous lui avons appliqué l'effet de l'échantillonnage (il dépend du mode de fonctionnement de la caméra). Nous avons intégré le signal et ajusté la fonction obtenue par une fonction *arctan* pour déterminer la fréquence de coupure et l'amplitude. Dès que le rapport de la fréquence de coupure par la fréquence d'échantillonnage augmente, l'écart des valeurs obtenues avec les valeurs initiales prises pour la Lorentzienne devient non négligeable.

venons de déterminer et une amplitude donnée arbitrairement. A cette Lorentzienne nous appliquons numériquement le filtrage de la caméra que nous avons déterminé ainsi que les repliements qui résultent de L'échantillonnage. Nous ajustons alors l'amplitude en comparant le spectre ainsi généré au spectre expérimental. Nous modifions alors la fréquence de coupure, en appliquant toujours au spectre le filtrage et les repliements, pour voir si les paramètres peuvent être améliorés. Nous réitérons l'opération jusqu'à obtenir une précision suffisante. L'évaluation de l'erreur sur la fréquence de coupure et sur l'amplitude en ne prenant pas en compte les corrections est discutée dans la figure 25.

Nous avons donc la valeur de l'amplitude et la fréquence de coupure de la Lorentzienne qui correspond aux données expérimentales débarrassées des problèmes liés à la fréquence vidéo. L'intégration de la Lorentzienne nous permet alors par la valeur limite trouvée d'obtenir la raideur effective du ressort associée au spectre expérimental.

Les deux effets que nous venons de discuter ne peuvent être abordés et éventuellement corrigés que dans l'espace de Fourier.

Remarques

- Si l'on ne tient compte que des lignes paires ou impaires l'acquisition ne se fait alors plus à la fréquence de 25Hz mais de 50 Hz, ce qui a pour effet de décaler ces problèmes pour des plus hautes forces.
- Ces problèmes font qu'il est très difficile de mesurer des grandes forces sur de courtes molécules attachées à de grosses billes. De plus les molécules d'ADN que nous avons utilisées pour fixer les billes ne résistent pas très longtemps à une force importante ($> 10pN$). Dans nos expériences nous avons été emmené à étudier le cas des grandes

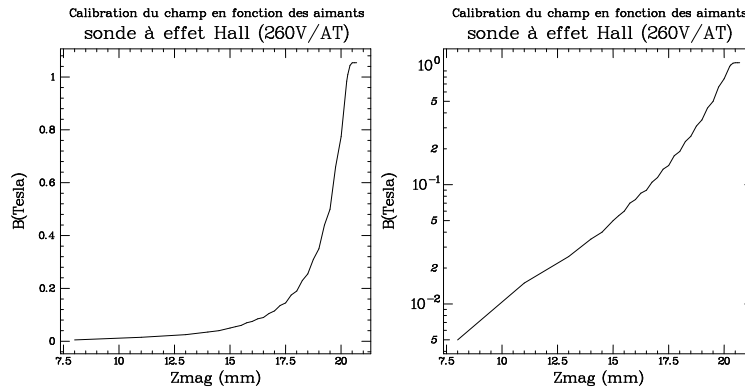


FIG. 26: Nous avons mesuré la loi de variation du champ en fonction de la position des aimants à l'aide d'une sonde à effet Hall. Après une expérience celle-ci a été placée contre le capillaire sur lequel nous avons fait nos mesures de force. Cette variation est donc semblable à celle que voit la bille.

forces sur des petites molécules. Dans la plupart des cas nous avons utilisé la loi de dépendance de la force appliquée par les aimants en fonction de leur position qui est très propre et très reproductible. De manière encore inexplicée (voir figure 26 pour avoir l'allure du champ magnétique en fonction de la position des aimants), cette loi est exponentielle dans le domaine des hautes forces comme on peut le voir dans la figure 27. Pour déterminer les forces nous avons souvent extrapolé cette loi pour des positions d'aimants où notre système ne pouvait plus mesurer les forces à cause des problèmes que nous venons d'évoquer. Nous avons vérifié que l'extrapolation donnait de bons résultats en comparant le résultat de celle-ci à la mesure sur la même bille dans le glycérol. Le changement de solvant fait augmenter la viscosité et donc baisser la fréquence de coupure de manière à l'amener dans une gamme où les problèmes d'échantillonnage ne se posent pas.

Nous avons également vérifié que cette opération est justifiée en extrapolant les données à partir des acquisitions faites à $25Hz$ et en comparant le résultat de l'extrapolation avec des mesures faites à $50Hz$ où les problèmes ne se posent pas de manière aussi critique dans la même gamme de force.

La conséquence logique de cette discussion est qu'il serait bon pour améliorer notre système d'investir dans une caméra plus rapide. Il y a un compromis à trouver entre une caméra rapide pour éliminer les problèmes que nous venons de voir et la réduction de la durée d'intégration qui fait perdre de l'intensité lumineuse mais surtout la nécessité de garder un temps de calcul suffisant pour effectuer toutes les opérations nécessaires pour détecter le mouvement en temps réel et que nous allons décrire maintenant.

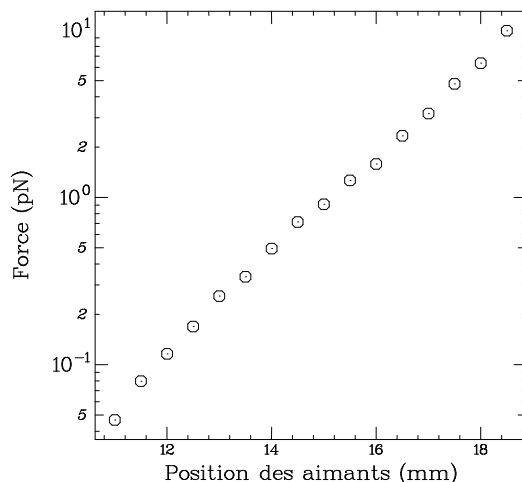


FIG. 27: La force s’appliquant sur la bille (ici de rayon $2.8\mu m$) est pour des forces suffisamment hautes une loi exponentielle en fonction de la position des aimants. Cette constatation nous permet de ne pas mesurer les hautes forces mais plutôt de les interpoler. Bien entendu nous avons vérifié que cela donne des forces correctes. Aux faibles forces la loi exponentielle doit être corrigée pour tenir compte du poids de la bille mais dans cette gamme de force nous n’utilisons jamais l’extrapolation.

16 Mesure des fluctuations

Toute l’analyse précédente repose sur la mesure des fluctuations. Nous allons maintenant décrire comment nous effectuons cette mesure en pratique.

L’observation se fait par un microscope, les molécules sont dans un capillaire, l’image est ensuite envoyée sur un ordinateur muni d’une carte vidéo qui effectue tout le traitement qui sera décrit dans la suite. La force ainsi que la direction des billes sont imposées par les aimants qui sont au dessus des billes. Les aimants sont contrôlés par des moteurs pas à pas qui sont eux-mêmes pilotés par l’ordinateur. La figure 28 schématise tout ceci.

16.1 Fluctuations transverses

Pour mesurer les fluctuations dans le plan perpendiculaire à la force, qui est aussi le plan focal de l’objectif, on utilise les profils en intensité de l’image de la bille.

Pour déterminer de combien bouge la bille entre deux images on sélectionne une région de (64×64) pixels² ou (128×128) pixels² positionnée sur la bille, et qui est donc mobile. Au centre de cette région une croix est positionnée. Le profil en intensité est déterminé suivant chacun de ses axes et sert à mesurer les déplacements de la bille en temps réel.

Partons d’une situation où le centre de la croix correspond au centre de la bille à l’image n . A l’image $n + 1$ la bille a bougé, son centre n’est donc plus au centre de la croix. Les profils d’intensité selon chacun des axes ne sont donc plus centrés. Pour mesurer le décalage

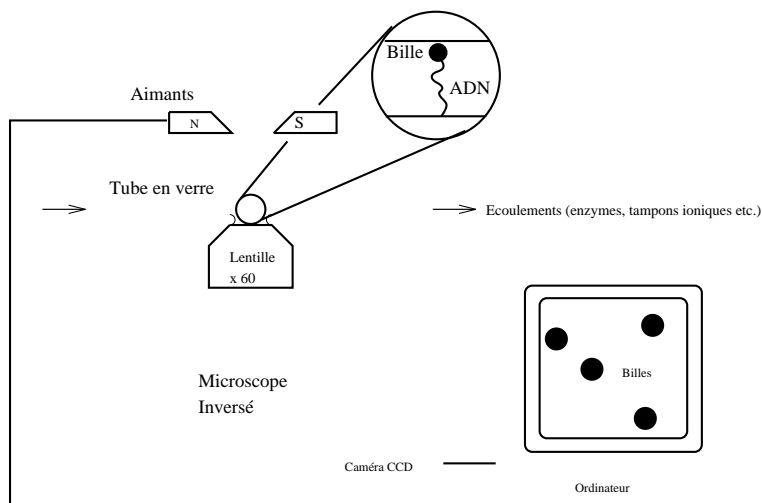


FIG. 28: Schéma du dispositif expérimental. La bille est dans un tube capillaire carré. L'observation se fait par un microscope inversé. L'image est traitée par un ordinateur muni d'une carte d'acquisition vidéo. L'ordinateur pilote également les moteurs qui fixent la force agissant sur la bille ainsi que l'orientation de cette dernière en imposant la direction du champ magnétique.

de la bille suivant un axe on utilise le profil d'intensité suivant cet axe. On prend ensuite son symétrique par rapport au centre de la croix et on effectue le produit de convolution du profil et de son symétrique en utilisant un algorithme de F.F.T.. La distance de la bille au centre de la croix est la moitié de la distance du maximum du produit de convolution au centre. En effectuant la même opération suivant l'autre axe on détermine le déplacement de la bille dans le plan à l'image $n + 1$ par rapport au centre de la croix qui n'est autre que la position de la bille à l'image n . Il suffit alors d'enregistrer ce déplacement et d'actualiser le positionnement du centre de la croix à la nouvelle position de la bille et de réitérer ce procédé.

Avec cette méthode il est possible d'extrapoler la position au $10^{ème}$ de pixel et arriver à une précision de $10nm$. Utilisons cette résolution pour estimer la force maximale mesurable sur une molécule de $10\mu m$. A partir de l'équation 2 nous obtenons une force limite mesurable de $\sim 400pN$. Comme nous l'avons vu précédemment ce n'est donc pas la résolution qui limite la mesure du côté des hautes forces mais plutôt la fréquence vidéo.

Nous sommes donc capables de suivre ainsi les déplacements transverses de la bille **en temps réel**. Ceci est d'ailleurs indispensable pour l'analyse fréquentielle. Nous avons alors tous les éléments pour mesurer la force. La seule hypothèse que nous faisons sur le profil est qu'il est axysymétrique, ce qui est on ne peut plus raisonnable pour une bille.

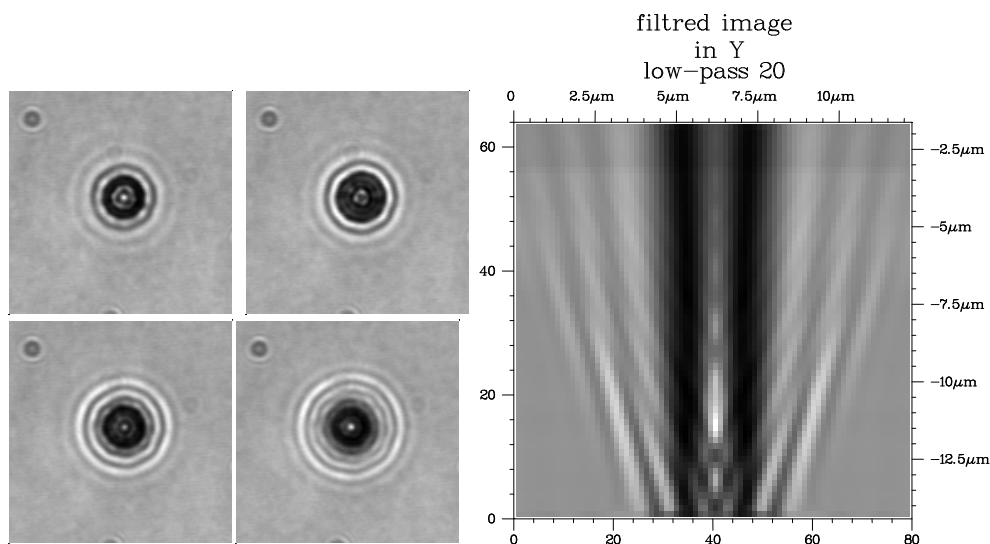


FIG. 29: Dans cette figure sont présentées, à gauche, 4 images de la bille entre lesquelles nous avons déplacé verticalement l'objectif de $1\mu m$. Chaque image est représentative de la position relative de la bille par rapport à l'objectif. Pour chacune de ces images on peut faire des moyennes selon des cercles de l'intensité lumineuse. Ainsi chaque image peut être représentée par un profil dont chaque point correspond à un diamètre. La collection de ces profils pour différentes positions de l'objectif est représentée dans l'image de droite. Elle est établie en tirant fortement sur la bille pour réduire ses fluctuations et en déplaçant l'objectif. On a ainsi accès à la position relative de la bille par rapport à l'objectif. On retire ensuite les aimants et la bille, du fait de son poids, se colle au sol. En retirant la valeur moyenne de ce mouvement de la bille au sol aux acquisitions on a alors une mesure absolue de la position. Lors d'une acquisition pour mesurer une force, chaque image est transformée comme précédemment en un profil d'intensité qui est alors comparé à la série de profils de référence. Pour augmenter la résolution on interpole entre deux profils.

16.2 Fluctuations longitudinales

On se préoccupe maintenant de la mesure des fluctuations de la molécule suivant son axe, c'est à dire aux fluctuations dans le plan perpendiculaire au plan de la force et donc au plan de visualisation de la bille.

Pour obtenir les fluctuations dans cette direction nous travaillons en lumière parallèle et nous utilisons la figure de diffraction de la bille. En effet la figure de diffraction de la bille par le microscope est très sensible à sa position par rapport à celle de l'objectif (figure 29). En pratique nous ne regardons qu'au dessus de la bille avec un microscope inversé. Cela nous permet de mesurer les fluctuations longitudinales de la bille.

Concrètement voici le procédé expérimental que nous utilisons. Avant toute manipulation sur la bille qui nous intéresse, nous commençons par lui appliquer une grande force. La molécule est alors étirée à sa longueur maximale et elle ne fluctue plus longitudinalement. Nous enregistrons alors une série de profils d'intensité pour différentes positions de l'objectif

par rapport à la bille. Chaque point d'un des profils d'intensité correspond à la valeur moyenne de l'intensité sur un cercle centré au centre de la bille. Avec tous ces profils nous construisons alors une image, dite image de calibration (figure 29). Chaque ligne de cette image est un des profils d'intensité défini ci dessus et est représentative d'une position relative de l'objectif par rapport à la bille. La position de l'objectif est elle défini à l'aide des moteurs pas à pas qui pilotent sa position, ou bien, suivant le microscope utilisé, par un détecteur deux cadrans éclairé par un laser solidaire de la tourelle de l'objectif. Nous supprimons alors la force appliquée sur la bille en enlevant les aimants. Celle-ci sédimente avec son poids. Nous enregistrons alors le mouvement de la bille, en comparant son image en temps réel à l'image des profils que nous avons construite. La valeur moyenne de ce mouvement obtenu avec la position de l'objectif et l'image de calibration nous donne alors la position absolue de la bille au sol.

Pour avoir la position et les fluctuations de la bille pour une force quelconque nous positionnons l'objectif pour que l'image de la bille corresponde à un des profils de la bille. Nous comparons ensuite en temps réel l'image de la bille à la série de profils de calibration et nous corrigeons la position relative du déplacement de l'objectif par rapport à sa position bille au sol. Nous avons ainsi les fluctuations de la bille en temps réel.

Cette méthode permet une détermination du positionnement relatif avec une précision d'environ $10nm$ pour les fluctuations. Cependant pour le placement absolu l'erreur est plutôt de $100nm$. Cette erreur pour le positionnement absolu est une de nos plus grandes sources d'erreurs.

Remarque importante : tels que nous les avons décrits les déplacements mesurés sont des déplacements de l'objectif à immersion à huile. Ils correspondent donc à des déplacements dans l'huile. Nos billes étant dans l'eau il faut tenir compte de la correction d'indice. Pour cela nous appliquons aux déplacements effectivement mesurés le facteur de correction 0.878. Ce chiffre correspond au rapport de l'indice optique de l'eau sur celui du verre $\sim 1.33/1.5$.

16.3 Dérives du microscope

Comme nous l'avons signalé précédemment un microscope n'est pas mécaniquement conçu pour mesurer des distances de quelques nm . Il est sujet à des dérives lentes, dues par exemple à des dilatations thermiques. Il nous faut donc minimiser l'influence de ces dérives au maximum. Pour cela il faut avoir un moyen des les repérer. Dans ce but nous utilisons des défauts de la surface, ou quand celle-ci n'en présente pas, nous collons des billes de verre de $0.5\mu m$ sur la surface. Ainsi avant chaque acquisition nous regardons de combien à bougé le défaut que ce soit en xy mais également en z . Nous corrigeons alors nos mesures de ces déplacements de la surface.

La figure 30 représente les fluctuations de deux billes collées sur la même surface. Les deux mouvements sont corrélés et les dérives sont lentes par rapport à celles du mouvement brownien (ce qui permet de les filtrer avec un filtre passe haut). De plus cette expérience sur deux billes collées nous permet de mesurer le bruit de nos mesures. En effet pour une bille collée le bruit résiduel, une fois retiré le bruit basse fréquence du aux dérives du microscope, est de $1nm/\sqrt{Hz}$.

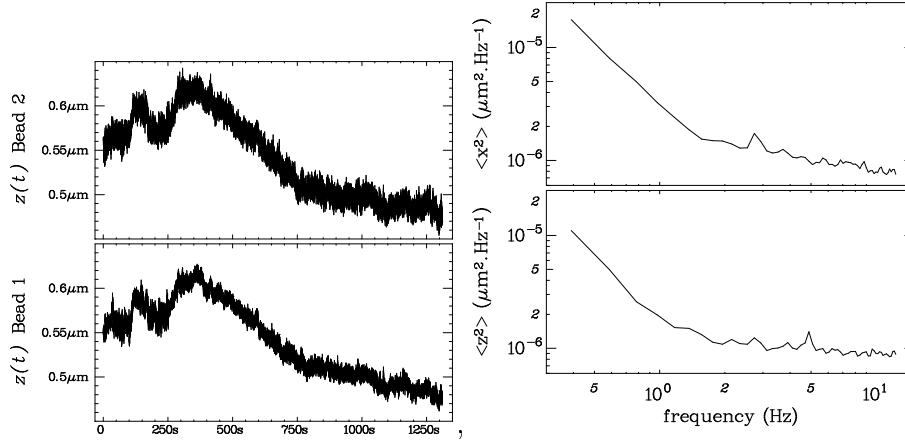


FIG. 30: Nous avons enregistré simultanément les fluctuations de deux billes collées à la surface. La corrélation entre les deux courbes pour les basses fréquences est évidente. Cela est dû aux fluctuations mécaniques de notre microscope. Le spectre des fluctuations est également représenté pour déterminer la résolution de notre système en x et y . En ôtant les fluctuations dues au microscope on arrive pour des fréquences supérieures à 2Hz à une résolution de $1\text{nmHz}^{-1/2}$.

16.4 Remarques

- Nous sommes donc capables de mesurer les fluctuations des billes **en trois dimensions et en temps réel**. La figure 31 reproduit la trajectoire de la bille dans un plan pour différentes forces. Comme on s’y attend la molécule s’allonge avec la force mais surtout l’amplitude du mouvement brownien diminue quand la force augmente. De plus l’anisotropie entre les fluctuations longitudinales, qui mesurent l’élasticité de la molécule, et les fluctuations transverses, qui mesurent la force, apparaît de manière très visible à haute force.
- La force est inversement proportionnelle au carré des fluctuations. La mesure des fluctuations se fait de quelques μm à quelques nm soit sur presque trois décades. Le fait que l’on ait une loi de la forme $F \propto \langle \delta x^2 \rangle^{-1}$ fait que la mesure de force avec cette technique possède une grande dynamique (voir figure 34). Nous avons mesuré ainsi des forces de $\sim 6\text{fN}$ à plus de 100pN sur des molécules d’ADN d’environ $16\mu\text{m}$. Cette dynamique de plus de 4 décades est très intéressante car elle est située dans une région très utile pour étudier les molécules biologiques que ce soit dans leur régime entropique ou dans leur régime enthalpique, ou bien encore les moteurs moléculaires.
- Nous venons de voir que notre précision relative est bien meilleure que notre précision absolue. A ce titre quand nous voudrions détecter de faibles variations il nous faudra utiliser des modulations. Par exemple pour mesurer un module d’Young, plutôt que prendre deux points par deux acquisitions, ce qui nous oblige à nous replacer en absolu, et de faire leur différence, nous ne ferons qu’une acquisition mais en modulant la force entre deux valeurs et en mesurant les modulations de longueur induites.

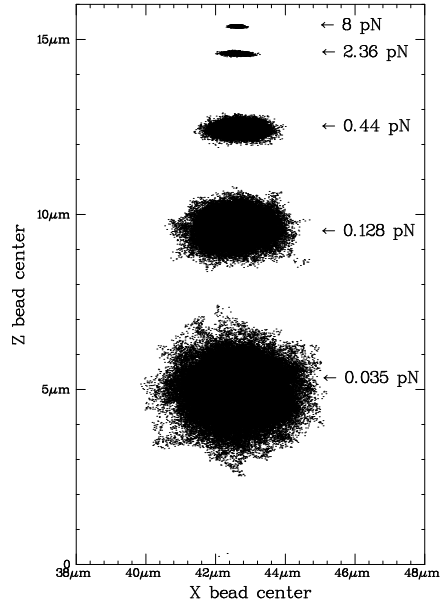


FIG. 31: Cette image prouve la capacité de notre système d'acquisition à mesurer le mouvement brownien de notre bille dans un plan vertical. Le mouvement brownien est celui d'une bille accrochée à une surface par une molécule d'ADN d'environ $16\mu m$. Chaque nuage correspond à une force particulière. On voit bien à haute force l'anisotropie due à la différence des raideurs effectives dans les deux directions ($\partial F/\partial l$ selon z et F/l selon y). Un exemple de mouvement Brownien dans le plan focal (xy) est donné figure 33.

16.5 Rotation de la bille avec les aimants

Un système analogue à ce qui vient d'être décrit permet de vérifier que la bille tourne de manière synchrone avec les aimants. Pour cela nous profitons des défauts optiques de la bille. Ceux-ci la rendent anisotrope et permettent de la suivre en rotation. Pour faire cela, nous travaillons sur le profil suivant un cercle centré sur la bille. Le défaut induit alors un extremum de lumière dans ce profil, que nous suivons par les mêmes techniques que celles utilisées pour les fluctuations transverses. Ceci nous a permis de vérifier que les nombres de tours effectués par la bille était exactement celui fait par les aimants comme on peut le voir sur la figure 32.

17 Analyse des fluctuations et extraction de la force

17.1 Obtention de la force

Lorsque les fluctuations ont été mesurées nous pouvons calculer leurs valeurs moyennes $\langle x \rangle$, $\langle y \rangle$, $\langle z \rangle$. A partir de celles-ci nous déterminons l'extension de la molécule. Avec l'image de calibration nous avons la position de la bille au sol, donnée par $\langle x_0 \rangle$, $\langle y_0 \rangle$,

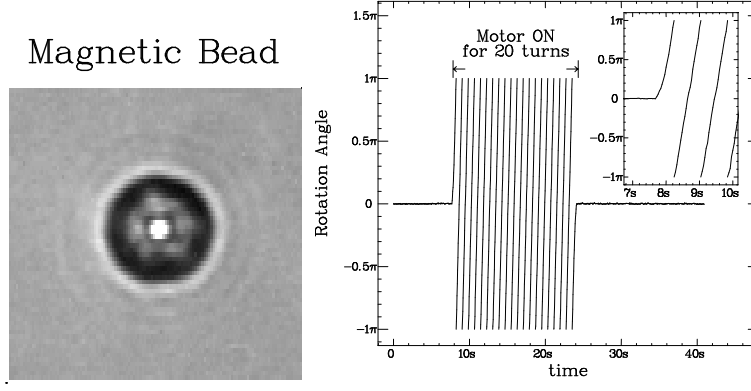


FIG. 32: Cette figure montre que la bille tourne de manière synchrone avec les moteurs. On s'assure ainsi que ce n'est pas le couplage entre les moteurs et la bille qui peut causer une perte éventuelle de tours lors de la rotation des moteurs.

$\langle z_0 \rangle$, l'extension est alors directement donnée par $l = \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + (z - z_0)^2}$.

L'écart quadratique moyen dans l'espace direct peut se calculer dans l'espace direct. Avec les valeurs de $\delta x^2 = \langle x^2 - \langle x \rangle^2 \rangle$, δy^2 , δz^2 les forces sont obtenues à l'aide de l'équation 2. Cependant comme nous l'avons signalé il est préférable d'obtenir la force dans l'espace des fréquences. Pour cela nous calculons le spectre des fluctuations. Nous filtrons les basses fréquences de ce spectre pour enlever les dérives du microscope. A partir de ce spectre corrigé nous obtenons la fréquence de coupure comme expliqué précédemment. Nous avons déjà décrit notre procédé pour trouver ensuite les paramètres du spectre (avec l'hypothèse que c'est une Lorentzienne) en tenant compte des effets de l'échantillonnage. Nous intégrons ensuite cette Lorentzienne ce qui nous donne une fonction Arctg dont la valeur limite nous permet d'accéder à la raideur effective et donc à la force.

Avec ces mesures nous sommes capables de construire les courbes $F(l)$ par les fluctuations transverses et $\frac{\partial F}{\partial l}$ avec les fluctuations longitudinales.

17.2 Tests

On peut également à partir des données faire différents tests pour vérifier la qualité de celles-ci.

Tout d'abord, on vérifie que le mouvement est bien gaussien. Dans ce cas le rapport $\langle x^4 - \langle x \rangle^4 \rangle / \langle x^2 - \langle x \rangle^2 \rangle^2$ est égal à trois.

Ensuite la fréquence de coupure est comparée à la fréquence de la vidéo. Ce problème se pose essentiellement pour les points à haute force et nous avons vu comment agir dans ce là.

Enfin, comme il l'a été signalé précédemment, nous vérifions la durée de l'acquisition. Nous regardons si après filtrage il reste suffisamment de modes correspondant à une fréquence inférieure à la fréquence de coupure. C'est très important pour bien déterminer la partie plate du spectre et donc la fréquence de coupure avec assez de précision.

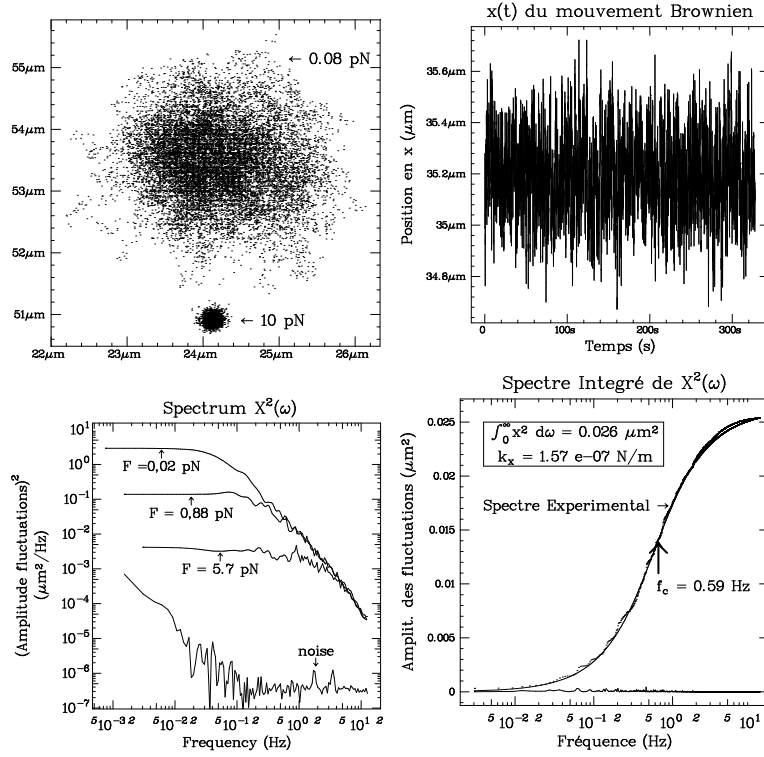


FIG. 33: Le mouvement Brownien de la bille est enregistré. Les fluctuations de la billes sont alors calculées ainsi que les valeurs moyennes du mouvement. Nous calculons alors le spectre et retirons les basses fréquences. Comme le prévoit le modèle l'amplitude décroît avec la force alors que la fréquence de coupure augmente. Nous avons représenté la courbe correspondant à une bille collée à la surface. La limite de l'intégrale du spectre dont nous avons calculé l'amplitude et la fréquence de coupure nous donne la raideur effective et donc la force.

Pour donner un ordre de grandeur du temps qu'il faut attendre pour acquérir un point à basses forces, on peut dire qu'il faut environ 1^H30 pour obtenir un point à quelques dizaines de femtoNewton sur une molécule d'une quinzaine de microns. Cette durée est le plus gros désavantage de cette technique de mesure de force par mouvement brownien.

18 Conclusion

Nous avons développé une technique originale basé sur le mouvement brownien d'une microbille pour faire des mesures de force dans une grande gamme de force qui est située dans le régime typique des forces mises en jeu au niveau biologique.

Cette technique est très intéressante car elle est non invasive. Elle n'exige pas de contact avec l'échantillon comme c'est le cas lorsqu'on utilise un AFM ou une micro-fibre de verre. De plus elle ne chauffe pas localement l'échantillon comme c'est le cas quand on utilise des pinces optiques.

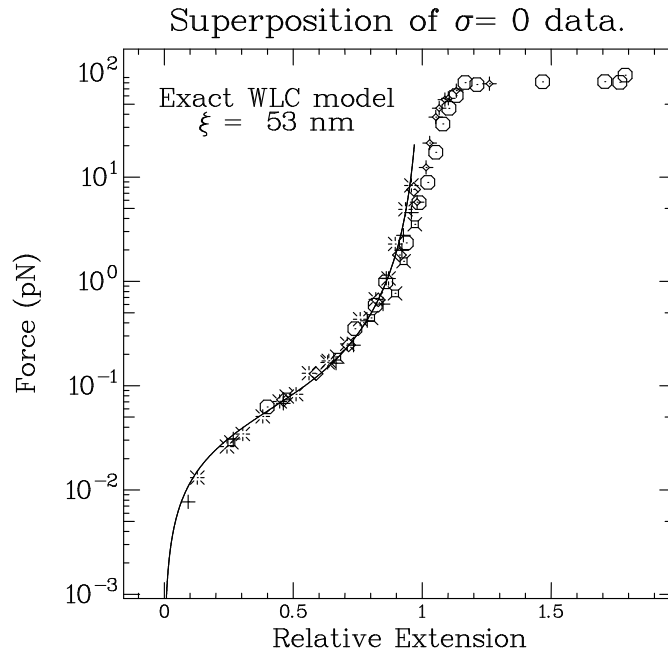


FIG. 34: Superposition de courbes obtenues avec différentes molécules d'ADN. On voit que les forces les plus basses sont de quelques femtoNewtons et que les plus grandes dépassent les 100 pN. Cette très grande dynamique est due à la dépendance de la force inversement proportionnelle au carré des fluctuations.

Par rapport à toutes ces techniques le mouvement brownien est celle qui permet de descendre le plus bas au niveau des forces (fig.34). Les micro-fibres permettent de tirer plus fort mais sont limitées vers le piconewton et les pinces optiques ne peuvent pas aller en dessous de $0.1pN$ [Wang et al., 97].

Un autre avantage important du mouvement brownien est que l'on n'a pas besoin de calibrer le système, si ce n'est une simple calibration du grossissement optique. Dans les autres systèmes cités il faut calibrer la raideur du dispositif de mesure. Certains dispositifs à pinces optiques peuvent ne pas le faire mais ils sont plus lourds à gérer puisqu'ils nécessitent deux faisceaux lasers [Smith et al., 1996].

Un dernier avantage de notre technique est son faible coût. En effet les seuls équipements sont un microscope, des aimants pour exercer la force, une caméra, un ordinateur muni d'une carte d'acquisition vidéo.

Le principal inconvénient de cette technique a déjà été signalé c'est le grand temps nécessaire pour effectuer une mesure. Nous avons signalé qu'il fallait 1^H30 pour un point à très basse force mais disons que pour un point à une force raisonnable de $1pN$ pour une molécule de $15\mu m$ il faut quelques minutes alors que pour une micro-fibre il suffit de quelques secondes pour avoir toute la courbe de force (même si elle ne va pas aussi bas).

Nous allons dans la suite appliquer cette technique en mesurant l'élasticité d'une molécule d'ADN. Cette illustration montrera tout l'intérêt de notre technique.

INVITATION AU VOYAGE

fruits et saveurs des îles, grog au rhum de Marie-Galante

Olivier Roëllinger [Roëllinger, 1994]

Ingredients pour 4 personnes : 200g de pâte feuilletée • 1 ananas • 2 bananes • 3 citrons verts • 1 mangue • 4 fruits de la passion • 10g de noix de coco râpée • 1 boîte de lait de coco • 1 litre de cidre • 300g de sucre cassonade • 1 bâton de cannelle • 1 gousse de vanille • 1 clou de girofle • 1 noix muscade • 20g de gingembre frais • 30 cl de rhum Marie Galante • 2 feuilles de gélatine • 600g de sucre • 4 brins de mélisse •.

Préparation : Ananas poché : peler l'ananas. Le couper en huit et retirer la partie dure à l'intérieur. Réserver une partie et couper les sept autres en petites lamelles.

Mettre dans une casserole 1/2l d'eau avec 250g de sucre et la moitié du bâton de cannelle. Lorsque le sirop est en ébullition, y plonger les morceaux d'ananas. Laisser cuire 20 minutes puis passer au mixer. Ajouter la gélatine préalablement trempée dans de l'eau froide et laisser refroidir.

Infusion pour le grog : dans une grande casserole mettre 1.5l d'eau, 1l de cidre, 300g de cassonade, 100g de sucre, 1/2 bâton de cannelle, une gousse de vanille fendue sur la longueur et égrénée, 1 clou de girofle, 1 noix muscade écrasée, 20g de gingembre coupé en lamelles et les zestes de 2 citrons verts. Faire bouillir puis laisser infuser 2 heures hors du feu avant de passer dans une passoire fine.

Le caramel à la noix de coco : chauffer 250g de sucre dans une casserole en remuant avec une spatule en bois. Lorsque l'on obtient un caramel blond, verser 400g de lait de coco et un jus de citron vert. Laisser bouillir afin que le caramel soit complètement fondu. Réserver.

Le mille-feuille : étaler le feuilletage en forme de rectangle de 20cm sur 30 cm et 2mm d'épaisseur. Cuire dans un four moyen à 180 degrés durant environ 15 minutes. Laisser refroidir puis avec un cutter et une règle couper des rectangles de 6cm sur 1.5cm.

La garniture : éplucher la mangue, puis la tailler, ainsi que le reste d'ananas en petits cubes de 2mm sur 2mm. Ajouter graines et pulpe des fruits de la passion en les coupant en deux.

Dernière minute. Les bananes poêlées : couper les bananes en lamelles, puis les poêler et déglacer au caramel de coco. Réserver au chaud. Passer la noix de coco au four pour obtenir une belle couleur blonde.

Pour servir, monter sur l'assiette le mille-feuille à plat, en intercalant entre les plaques de feuilletage la mousse à l'ananas. Disposer les bananes tièdes en les superposant sur le côté, puis parsemer la noix de coco râpée et grillée. Ajouter un brin de mélisse pur la décoration.

Chauffer le grog, ajouter au dernier moment le jus de 2 citrons verts et le rhum. Verser le grog dans des tasses à café avec 2 c. à s. de fruits en petits cubes.

Quatrième partie

Élasticité d'une molécule unique d'ADN

19 Introduction

A partir de maintenant nous allons considérer le cas où la bille est attachée au substrat par une molécule d'ADN. L'accrochage est réalisé de telle manière qu'il permet d'imposer une contrainte de torsion sur l'ADN.

La démarche que nous allons suivre est la suivante : nous allons d'abord présenter rapidement la méthode pour attraper l'ADN par ses bouts et le dispositif expérimental complet que nous avons utilisé. Ensuite nous verrons quels sont les modèles attendus pour l'élasticité d'une molécule unique d'ADN. Nous poursuivrons par l'effet de la torsion sur la molécule. Nous verrons enfin les résultats expérimentaux sur l'élasticité d'une molécule d'ADN dans différents régimes, avec en particulier la méthode que nous utilisons pour nous assurer que nous travaillons sur une molécule unique.

20 Comment attraper une molécule d'ADN par ses deux bouts ?

La construction globale que nous avons utilisée est celle présentée dans le chapitre précédent. Il s'agit d'une molécule d'ADN accrochée d'une part à une lamelle de verre et d'autre part à une microbille magnétique (figure 35). Lors des travaux présentés par la suite nous avons utilisé deux types de molécules d'ADN. Le premier est de l'ADN de phage λ préparé par T. R. Strick. Cet ADN comporte initialement 48.5 kilo-paires de bases, ce qui donne une longueur d'environ $16\mu m$. Le second a été préparé par F. Caron à partir de pX Δ 1 [Cluzel, 1996], il possède 17 kilo-paires de bases et mesure environ $5.5\mu m$.

Ces deux constructions utilisent les mêmes stratégies d'ancrage. Dans les deux cas une extrémité est fonctionnalisée avec de la biotine et l'autre avec de l'antidigoxigénine. La biotine, ou vitamine H, forme avec la streptavidine un couple récepteur ligand très utilisé en biologie moléculaire car il est solide et très spécifique. Il en va de même pour la digoxigénine avec l'anticorps correspondant, l'antidigoxigénine. La méthode de l'accrochage de l'ADN est donc la suivante : on recouvre une surface avec de l'antidigoxigénine sur laquelle l'extrémité de l'ADN fonctionnalisée à la digoxigénine se lie. L'autre bout, qui porte la biotine, réagit avec la streptavidine qui recouvre la microbille magnétique. Le schéma de la construction étudiée est donné dans la figure 35.

Le protocole expérimental est donné plus précisément dans le dernier paragraphe.

La figure 36 donne le schéma de principe de la méthode utilisée par T. Strick pour fonctionnaliser l'ADN de phage λ .

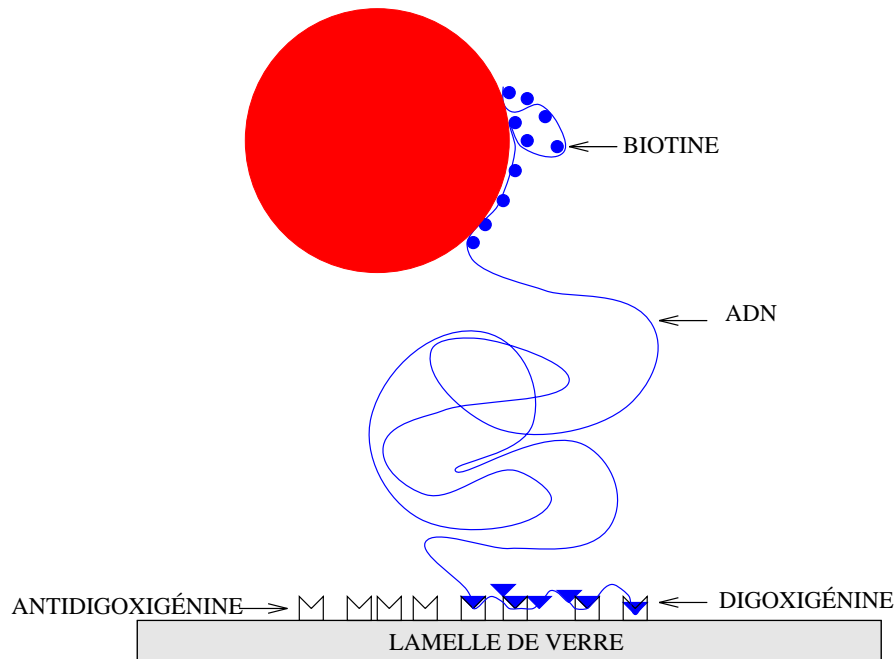


FIG. 35: L'ADN est fixé à la bille recouverte de streptavidine par sa partie biotillée et à la surface recouverte d'antidigoxigénine par son extrémité couverte de digoxigénine. La taille des billes est de $2.8\mu m$ ou $4.5\mu m$. Les ADN que nous avons pris mesurent ~ 16 ou $\sim 5\mu m$. Dans les deux cas l'ADN peut être contraint en rotation grâce à l'ancrage multiple aux extrémités.

Les deux constructions ont un autre point commun, leurs extrémités sont fonctionnalisées de manière multiple et vont donc posséder plusieurs points d'attache possibles, formant ainsi une sorte de velcro. Cette stratégie permet d'imposer une contrainte de torsion à la molécule. Un ancrage par une simple liaison aurait permis la relaxation par rotation autour de la liaison. Il sera donc possible avec ces deux sources d'ADN de pouvoir imposer des contraintes de torsion à la molécule.

Il faut noter que toutes les molécules ne seront pas sensibles à la torsion. Il y a deux raisons possibles à cela. Tout d'abord la densité de protéines servant à l'ancrage (streptavidine et antidigoxigénine) peut être insuffisante pour que plusieurs ligands puissent s'attacher. Si un seul d'entre eux se fixe alors la rotation imposée à la bille va se relaxer par libre rotation autour de cette simple liaison. La seconde possibilité, qui est probablement la plus courante, correspond au cas où la molécule est "nickée". Par définition un nick est une rupture sur un des brins du squelette de phosphates. Si un ou plusieurs nicks sont présents sur une molécule, qui est dite alors nickée, la torsion va relaxer par rotation de la molécule autour de la liaison chimique sur le brin non sectionné. Ces nicks peuvent avoir diverses origines, dont entre autres des manipulations un peu trop violentes. Malgré tous nos efforts et l'utilisation de la ligase dans nos échantillons il existe de nombreuses molécules nickées.

La ligase est une protéine qui restaure certaines liaisons chimiques sur l'ADN pour assurer

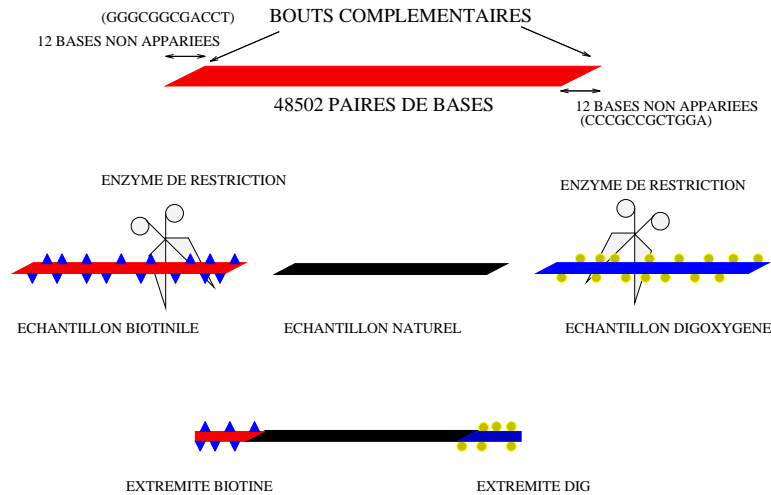


FIG. 36: L'ADN de phage λ possède 48502 paires de bases ($\sim 16.2\mu m$). Cet ADN peut se circulariser car il possède 12 bases non appariées à chacune de ses extrémités qui sont complémentaires de celles de l'autre bout. Il est possible de couper cet ADN marqué à la biotine (par photo-marquage) à l'aide d'une enzyme de restriction et de séparer les extrémités par électrophorèse. Une enzyme de restriction est une protéine qui coupe l'ADN en des sites précis déterminés par leur séquence. On peut alors attacher un des bouts biotinilés à l'extrémité complémentaire d'ADN de λ non modifié. Pour fonctionnaliser différemment l'autre extrémité il suffit donc de faire la même chose avec de l'ADN marqué à la digoxigénine et en isolant l'extrémité se couplant au bout non biotinilé. Pour restaurer la continuité des brins on utilise une protéine, la ligase. Finalement la construction fait 59 kilo-paires de bases dont 4.6 marqués à la biotine et 6.7 marqués à la digoxigénine. Ce travail a été fait par T. Strick.

la continuité de la double hélice. Elle est donc capable de réparer certains nicks.

La proportion de billes surenroulables varie d'environ 50% dans les meilleurs cas à quelques pour mille dans les pires.

21 Élasticité d'une molécule d'ADN sans contrainte torsionnelle

L'expérience que nous avons réalisée consiste à tirer avec une force donnée sur une molécule et déterminer son élongation. En répétant ceci pour différentes forces nous mesurons sa courbe de force.

Quels sont les modèles théoriques pour cette élasticité ?

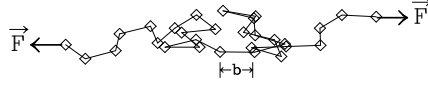


FIG. 37: Illustration d'un polymère sous traction suivant le modèle de la chaîne librement jointe avec un maillon élémentaire b .

21.1 Modèles d'élasticité d'un polymère

21.1.1 Modèle de la chaîne librement jointe

Dans ce modèle le polymère est constitué de maillons indépendants les uns des autres. La taille de ces maillons est notée b (figure 37). Nous noterons le nombre de maillons N_m . La longueur de la chaîne est par conséquent $L_0 = N_m b$. L'énergie associée à chaque maillon soumis à une force \vec{F} qui tend à l'orienter est $E_i = Fb \cos \theta_i$ où θ_i est l'angle entre la direction du maillon et celle de la force. La fonction de partition de la chaîne soumise à une force \vec{F} selon l'axe des z est par conséquent, avec l'hypothèse d'indépendance des maillons :

$$Z = \int \exp\left[\sum_{i=1}^{N_m} -\beta Fb \cos(\theta_i)\right] \prod_{i=1}^{N_m} 2\pi \sin \theta_i d\theta_i = \left(\int \exp(-\beta Fb \cos \theta) 2\pi \sin \theta d\theta\right)^{N_m}$$

θ_i est l'angle du $i^{\text{ème}}$ maillon avec l'axe z et $\beta = \frac{1}{k_B T}$.

Ce problème est formellement identique à celui du paramagnétisme de Langevin. Au lieu d'aligner des dipôles dans un champ magnétique, on aligne les maillons de la chaîne avec une force. On doit donc retrouver la fameuse fonction de Langevin, notée \mathcal{L} , caractérisant le paramagnétisme. Le résultat final donnant l'extension $\langle z \rangle$ en fonction de la force est :

$$\frac{\langle z \rangle}{L_0} = \frac{1}{L_0} \frac{\partial Z}{\partial F} = \mathcal{L} \left(\frac{Fb}{k_B T} \right) = \coth \left(\frac{Fb}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{Fb}$$

Ce modèle qui est le plus simple pour un polymère nous donne deux limites à haute et basse force :

- à basse force on a $\langle z \rangle / L_0 \sim 1/3 \frac{Fb}{k_B T}$
- à haute force $1 - \langle z \rangle / L_0 \sim \frac{k_B T}{Fb}$, on a une divergence en $1/F$

Ce modèle a le mérite de faire comprendre l'origine entropique de l'élasticité d'un polymère, puisqu'il montre qu'il faut exercer une force pour étirer la molécule alors que son énergie potentielle est nulle quelle que soit son extension. Il est aisément calculable comme on vient de le voir. Cependant comme les expériences l'ont montré [Smith et al., 1992] il ne suffit pas à rendre compte des courbes d'élasticité de l'ADN.

Pour un polymère réel cette orientation totalement aléatoire des maillons n'est pas très réaliste. Pour décrire plus précisément ce cas il faut faire intervenir une distance qui va jouer

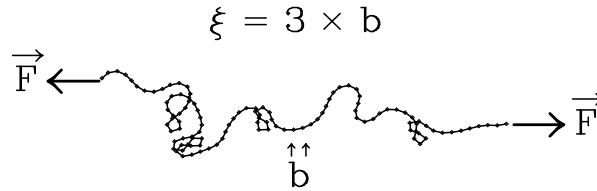


FIG. 38: Modèle de chaîne de Kratky-Porod. Dans ce modèle il existe une corrélation d'orientation entre les maillons. Cette corrélation disparaît au bout de la distance ξ , appelée longueur de persistance. Dans notre figure $\xi = 3b$. La limite continue de ce modèle (ξ fini et $b \rightarrow 0$) donne le modèle du ver.

sur toutes les caractéristiques d'un polymère et qui s'appelle la longueur de persistance. C'est la longueur au bout de laquelle les corrélations d'orientations de la molécule sont perdues (à cause des fluctuations thermiques), c'est donc une indication de la rigidité de la molécule à petite échelle. Nous la noterons ξ dans la suite. Si l'on veut décrire un polymère par le modèle de la chaîne librement jointe il faut prendre $b = 2\xi$ [Marko and Siggia, 95b].

Par rapport aux polymères classiquement utilisés tels le polystyrène ou le Poly-DiméthylSiloxane (PDMS) l'ADN possède une très grande rigidité due à la fois au stacking des bases et à sa charge. Cela signifie que sa longueur de persistance est grande. Pour le décrire il va falloir prendre en compte un effet de rigidité de courbure. C'est cette amélioration qu'apporte le modèle de Kratky-Porod (figure 38). Si l'on revient à l'analogie entre le paramagnétisme de Langevin et chaîne librement jointe, cela revient à introduire un couplage entre les dipôles.

Dans la limite continue (taille des maillons $\rightarrow 0$ et ξ fini) de ce modèle s'appelle le modèle du ver que nous allons présenter maintenant.

Remarque : l'élasticité est donc d'origine entropique. La réduction du nombre de configurations accessibles résultant de l'étirement a un coût entropique qui s'oppose à la traction. Cela implique que, paradoxalement, plus la longueur de persistance sera courte plus il sera difficile d'étirer la molécule. Pour illustrer cela on peut prendre un exemple. Nous verrons dans la suite que la longueur de persistance de l'ADN est $\sim 50nm$ alors que celle du PDMS est 5\AA . La force caractéristique mise en jeu qui apparaît dans le calcul précédent est donc dans le premier cas $\frac{k_B T}{\xi} \sim 0.08pN$ alors que pour le PDMS elle est beaucoup plus grande $\sim 8pN$.

21.1.2 Modèle du ver ou Worm Like Chain (WLC)

En tenant compte de la rigidité de courbure, l'énergie de la molécule s'écrit :

$$E(s_1, s_0) = k_B T \int_{s_0}^{s_1} \left(\frac{\xi}{2} (\partial_s \vec{t})^2 - F \cos(\theta(s)) \right) ds$$

avec \vec{t} qui est le vecteur tangent à la molécule, s l'abscisse curviligne et θ l'angle de \vec{t} avec la direction de la force (z). Le premier terme prend en compte l'énergie de courbure alors que le second est celui correspondant à l'effet de la force.

La fonction de partition associée est donc :

$$Z(\vec{t}_0, 0; \vec{t}_1, L_0; \vec{F}) = \int \mathcal{D}(\vec{t}_0, \vec{t}_1) \exp(-\beta E)$$

Cette formule représente la somme sur toutes les configurations de \vec{t} possibles dont les conditions aux bords sont \vec{t}_0 et \vec{t}_1 . Ce type de formulation en intégrale de chemin a été introduit par Feynman et permet de faire un pont entre la mécanique statistique et la mécanique quantique. Si l'on traverse le pont on s'aperçoit que notre problème est équivalent à trouver les états propres d'un dipôle dans un champ électrique [Marko and Siggia, 95b, Bouchiat, 1996] (dont la direction serait celle de la force) dont l'hamiltonien est donné par la relation :

$$\beta H_{WLC} = -\frac{1}{2 \sin \theta} \partial_\theta \sin \theta \partial_\theta - \beta \xi F \cos \theta$$

La fonction de partition est alors donnée par :

$$Z(\vec{t}_0, 0; \vec{t}_1, L_0; \vec{F}) = \langle \vec{t}_1 | \exp(-L_0/\xi \times \frac{H_{WLC}}{k_B T}) | \vec{t}_0 \rangle$$

Comme $L_0/\xi \gg 1$ ($\xi \sim 50nm$ et $L_0 > 5\mu m$) on va pouvoir ne considérer que l'état fondamental. Connaissant l'énergie du fondamental on a alors accès à la fonction de partition et donc à toutes les grandeurs. Il faut donc résoudre l'équation de Schrödinger $H_{WLC} \Psi_0 = \epsilon_0 \Psi_0$ ou Ψ_0 est la fonction d'onde du fondamental.

Ceci peut s'effectuer par intégration numérique à partir des deux pôles $\theta = 0$ et $\theta = \pi$ en raccordant les solutions de manière à avoir une solution Ψ_0 globalement régulière.

En répétant l'opération pour différentes forces on peut obtenir une courbe du modèle du ver numérique exacte.

L'extension s'obtient alors par la relation :

$$\frac{\langle z \rangle}{L_0} = \frac{k_B T}{L_0} \partial_F \log Z$$

Marko et Siggia ont été les premiers à obtenir (par une autre méthode de résolution de l'équation de Schrödinger [Marko and Siggia, 95b]) la courbe d'extension en fonction de la

force pour le modèle WLC. Ils ont également donné une formule analytique approchée des valeurs obtenues [Bustamante et al., 1994]. Cette approximation est donnée par :

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} \right] \quad (12)$$

On peut remarquer que l'on retrouve la limite basse force du modèle de chaîne librement jointe mais que à haute force on n'a pas une divergence en $1/F$, comme pour la chaîne librement jointe, mais en $1/\sqrt{F}$.

Remarque : quel que soit le modèle, le préfacteur qui fixe la force permettant d'étirer de manière notable la molécule, est donné par $k_B T/\xi$.

L'approximation de l'équation 12 marche bien à hautes et basses forces mais moins bien pour des forces intermédiaires de l'ordre de 0.1pN où l'erreur est de quelques 10%. Nous avons alors proposé une amélioration de cette formule. Le but de ceci est de donner une formule qui soit aisément utilisable pour ajuster des données expérimentales.

A partir des données numériques de la solution exacte, obtenues, avec la collaboration de C. Bouchiat, par intégration comme nous venons de le voir, nous avons soustrait la formule approchée donnée par Marko et Siggia et nous avons ajusté la différence par un polynôme pour avoir une formule analytique plus précise. En prenant un polynôme d'ordre 7 (cet ordre est arbitraire) nous arrivons à une différence inférieure à 1/10000. Le polynôme obtenu est :

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^7 a_i (z/L_0)^i \right]$$

avec $a_2 = -0.5164228$, $a_3 = -2.737418$, $a_4 = +16.07497$, $a_5 = -38.87607$, $a_6 = +39.49944$, et $a_7 = -14.17718$.

Requérir une telle précision peut surprendre a priori mais plusieurs groupes ont maintenant obtenu des courbes d'élasticité pour l'ADN et prétendent mesurer précisément ξ . Or, beaucoup d'entre eux n'utilisent que la formule approchée qui n'est donc pas très bonne [Baumann et al., 97, Wang et al., 97]. De plus d'autres groupes étudient l'élasticité d'autres macromolécules avec ce modèle [Tskhovrebova et al., 97]. Utiliser une formule, dont la valeur s'éloigne de presque 10% de ce qu'elle devrait être, pour ajuster des données expérimentales est gênant quand on prétend mesurer la longueur de persistance de l'ADN avec une grande précision en fonction des propriétés de la solution [Baumann et al., 97].

De plus en gagnant en précision on va pouvoir déterminer si des effets non pris en compte dans ce modèle comme les effets électrostatiques, ou d'encombrement stérique peuvent jouer, en particulier à faible force (ces effets sont décrits dans la référence [Marko and Siggia, 95b]).

21.2 Élasticité enthalpique et forme S

Aux grandes forces (typiquement plus de 10pN) l'allongement de la molécule correspond sensiblement à sa longueur cristallographique. Toute contribution entropique est négligeable. On commence alors à exercer une tension sur les liaisons chimiques de la molécule. Nous

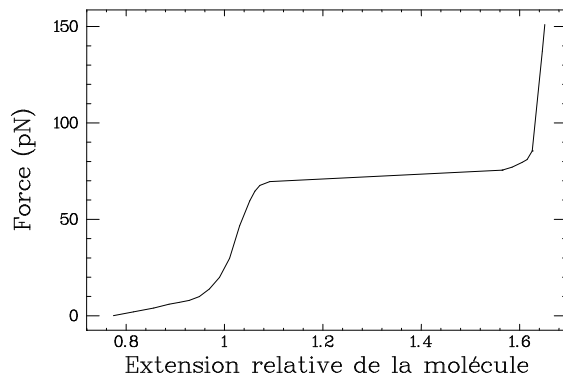


FIG. 39: Allure de la courbe de force pour une molécule d'ADN pour des grandes forces. La brutale transition de longueur est due à la transition de la forme **B** vers la forme **S**. Les données de cette courbe sont issues du lissage de données fournies par P. Cluzel.

sommes alors dans le régime enthalpique de son élasticité. Dans ce régime de force l'élasticité de la molécule est identique à celle d'un ressort et va être caractérisée par son module d'Young. A des forces plus importantes (vers 70 pN, cette valeur dépendant de la solution et de la molécule) on va avoir un changement brutal d'extension [Cluzel et al., 1996, Smith et al., 1996] comme nous l'avons déjà signalé dans le chapitre relatif au peignage moléculaire (voir la figure 39). Cette transition brutale est associée à une transition de structure entre la forme B et la forme dite S dont deux représentations possibles sont données dans la figure 40.

21.3 Élasticité dans les domaines enthalpique et élastique

Il n'existe aucun modèle exact à l'heure actuelle pour l'ADN couvrant simultanément les régimes entropiques et enthalpiques, c'est à dire dans la gamme inférieure à $\sim 50pN$. Wang *et al.* [Wang et al., 97] ont proposé de modifier la formule approchée de Marko et Siggia en remplaçant z/L_0 par $z/L_0 - F/K_0$ avec K_0 compris entre 500 et 1500pN selon les valeurs expérimentales de différents groupes [Cluzel, 1996, Wang et al., 97, Baumann et al., 97]. Pour des forces inférieures au pN cette correction est donc très faible. Il est donc cohérent d'introduire les mêmes termes polynômiaux que dans le régime entropique pur pour améliorer l'approximation.

Pour une mesure de ξ , l'introduction du terme enthalpique est importante dès que l'on a des points dans la courbe de force vers la dizaine de pN. Ne pas prendre en compte cette correction conduit à une sous estimation de ξ .

22 Le surenroulement de l'ADN

Nous allons nous concentrer dans ce paragraphe sur l'effet d'une contrainte de torsion sur l'ADN ou surenroulement, c'est à dire, l'effet d'une contrainte qui tendrait à modifier le

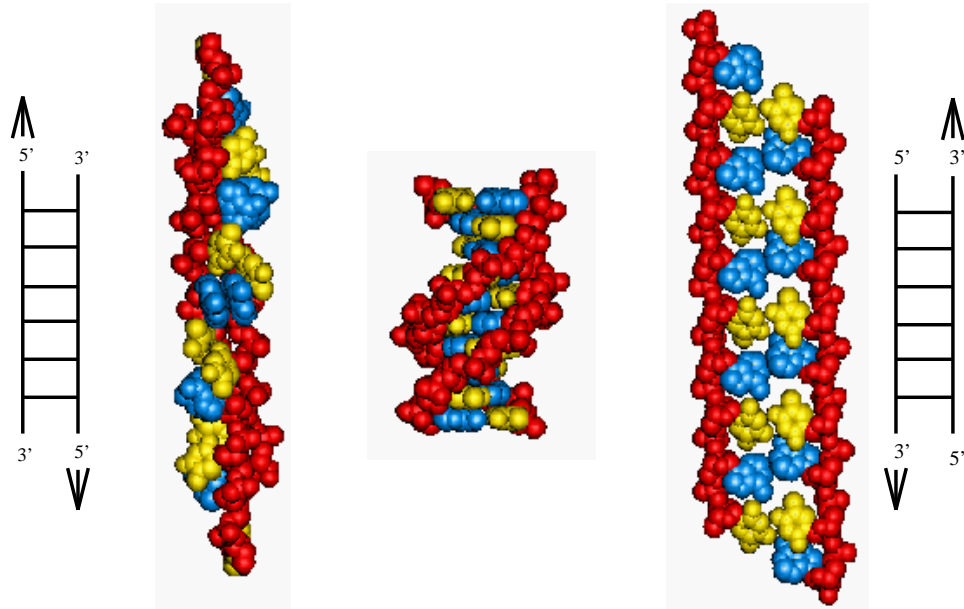


FIG. 40: Images des deux formes possibles pour l'ADN S obtenues par simulations numériques par R. Lavery et A. Lebrun. La forme obtenue dépend de la manière dont on tire sur les bouts. La forme B classique est représentée au milieu.

pas de la double hélice. Le terme de surenroulement est générique et concerne à la fois les tours que l'on peut imposer à la molécule dans le même sens que la double hélice ou dans le sens opposé. Pour distinguer ces deux cas on parlera de surenroulement positif ou négatif.

Pour fixer les idées, les ADN que nous avons utilisés possèdent un nombre naturel de tours dans la double hélice de la forme B égal à ~ 1500 pour la molécule de $\sim 5\mu m$ et ~ 5000 pour la molécule de $\sim 16\mu m$ (pour un pas hélical de 10.5 bases/tours).

22.1 Introduction au phénomène

Le plus simple pour voir certains effets du surenroulement est de prendre une corde et de tourner un des bouts en maintenant l'autre fixe. Si l'on tire fortement sur la corde seul l'effet de la torsion est visible. Il est caractérisé par une constante élastique de torsion. En diminuant la force, on voit apparaître une forme particulière, bien connue sur les fils téléphoniques, que l'on appelle plectonème dont nous avons parlé dans le premier chapitre. La représentation de cette structure, qui sera une structure tertiaire dans le cas de l'ADN, est donnée dans la figure 41. Sur la même figure est indiquée une autre forme pouvant apparaître, à savoir la forme solénoïdale. Ces deux structures ne sont que deux exemples particuliers qui interviennent avec le surenroulement, ce ne sont pas les deux seules.

La formation des plectonèmes résulte de la compétition entre l'élasticité de courbure et l'élasticité de torsion. Quand les plectonèmes apparaissent le rôle de l'élasticité de courbure augmente de façon triviale puisque la corde passe d'une situation droite à une configuration avec de nombreux entortillements. Cette apparition s'accompagne d'une diminution du

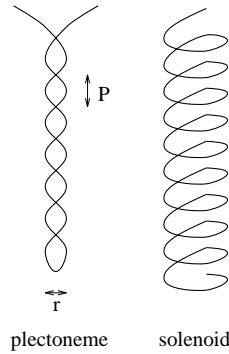


FIG. 41: Représentation d'un plectonème. Cette structure, appelée parfois supertour, apparaît pour un ADN soumis à une contrainte de torsion. Le solénoïde est également une forme qui apparaît avec du surenroulement. On a aussi d'autres formes possibles mais aussi des plectonèmes de plectonèmes...

couple de torsion. Ce fait est moins intuitif mais pourrait être tester sur un modèle macroscopique.

Ces paramètres d'élasticité que nous pouvons sentir sur le modèle macroscopique de la corde sont toujours pertinents pour l'ADN. Cependant, l'ADN étant chargé, il faut prendre en compte, en plus des effets élastiques, les effets électrostatiques. Comme nous pouvons le constater sur le modèle de la corde, les plectonèmes tendent à mettre en contact deux parties de la molécule. Ne serait-ce que dans ce cas précis, les effets électrostatiques seront donc importants. Du fait de la taille de l'ADN, l'agitation thermique va être le dernier ingrédient physique qui intervient dans le surenroulement de l'ADN.

22.2 Importance biologique

Nous allons montrer cette importance du surenroulement à partir d'exemples.

- Nous avons indiqué dans la première partie que l'ADN présent dans chaque cellule humaine mesure environ 3 mètres qui sont divisés en 46 chromosomes. En prenant un modèle de pelote statistique le rayon de gyration d'un seul chromosome peut s'estimer par :

$$R_c = \sqrt{2\xi L_c} = \sqrt{2 \times 50 \cdot 10^{-9} \times \frac{3}{46}} \sim 80 \mu m$$

Or le noyau de la cellule ne fait que quelques microns. Il est donc impossible sans autre élément de faire rentrer tout l'ADN dans un noyau. Pour y arriver la cellule utilise des protéines. Parmi celles-ci il y a les histones. La compaction de l'ADN résulte de son enroulement autour des histones qui elles mêmes sont ensuite organisées. Cet enroulement est représenté sur la figure 42 et correspond à une structure solénoïdale que l'on vient de voir. D'ailleurs pour bien sentir qu'un solénoïde est équivalent à un plectonème on peut enrouler la corde qui a déjà servie autour d'un doigt comme l'ADN autour d'un histone. Ensuite on enlève le doigt en gardant fixées les contraintes

de rotation aux extrémités. Il suffit alors de tirer sur la corde puis de relâcher la force pour voir un plectonème se former. Le surenroulement sert donc à la compaction de l'ADN.

- Le surenroulement est également important dans un processus essentiel : la transcription. Comme nous en avons déjà parlé dans le premier chapitre de présentation de l'ADN, une partie du code génétique de l'ADN sert à déterminer la séquence des acides aminés des protéines. La première étape de ce processus complexe est la lecture du code de l'ADN par une protéine pour former une autre molécule, l'ARN messenger. Cette protéine s'appelle l'ARN polymérase. La polymérase va venir lire le code comme un train sur ses rails. Ce faisant elle va pousser pour avancer, pour écarter les rails et accéder aux bases. Ceci a pour effet de créer du surenroulement positif devant elle et du surenroulement négatif derrière elle. La libre rotation de l'un par rapport à l'autre est impossible à cause d'éléments extérieurs [Liu and Wang, 1987].
- Pour éviter une trop grande accumulation de surenroulement dans cette opération, d'autres protéines, les topoisomérases [Wang et al., 97], vont relaxer cette contrainte due à la polymérase et permettre à celle-ci de continuer son travail. Les topoisomérases sont multiples et ont différents rôles. Certaines peuvent créer du surenroulement positif, d'autres négatif. D'autres encore relaxent toute contrainte torsionnelle en créant un nick temporaire. Il en existe également qui permettent à deux ADN de passer l'un au travers de l'autre sans dommage pour aucun des deux . Ceci est très utile pour démêler les nœuds. Toute cette batterie de protéines est présente pour contrôler la topologie de l'ADN, c'est à dire quand on parle d'une seule molécule, de son surenroulement.

Ces exemples suffisent à montrer l'importance du surenroulement pour le vivant.

Signalons enfin que **l'ADN dans les cellules est systématiquement surenroulé négativement d'environ 5%**.

22.3 Méthodes utilisées pour l'étude du surenroulement

22.3.1 Méthodes pour faire varier le surenroulement

Dans notre système nous modifions le surenroulement simplement par la rotation des aimants, laquelle est contrôlée par un moteur pas à pas. En tournant, les aimants entraînent la bille en rotation de manière synchrone (voir figure 32). Comme la fixation de la molécule se fait par de multiples points d'attache cela suffit à entraîner du surenroulement. Il est donc facilement contrôlable. Il est également facilement réversible. Il peut ainsi varier continuellement dans une gamme qui n'est limitée que par la solidité de la molécule.

La méthode utilisée traditionnellement ne s'applique que sur des ADN circulaires. Elle utilise des intercalants de l'ADN, en général du bromure d'éthidium. Ces molécules ont la propriété, en s'insérant, dans la double hélice de modifier son pas. Lorsqu'un ADN circulaire est coupé en présence de l'intercalant, le nombre de croisements des deux brins est modifié. La modification ne dépend que de la concentration en intercalant. La molécule est alors recircularisée avec l'aide d'une ligase (on a vu que celle-ci pouvait "reconstruire"

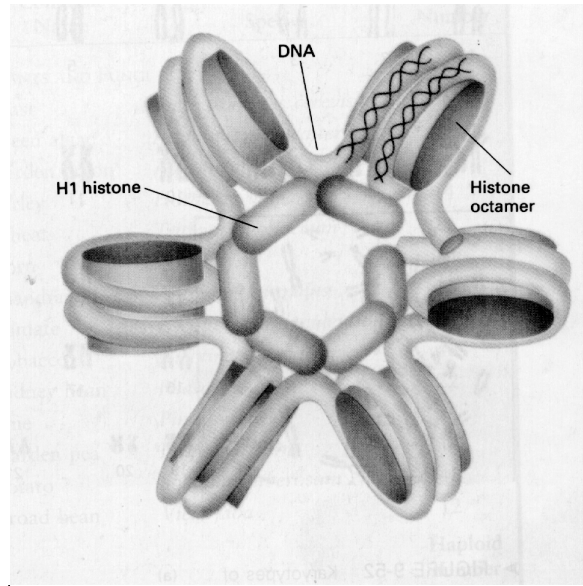


FIG. 42: Image de l'ADN s'enroulant autour d'histones. L'ADN fait environ 2 tours autour de chaque octamère d'histone. Cet enroulement autour des cylindres est équivalent topologiquement à imposer une torsion sur la molécule. Biologiquement cela sert à réduire le volume occupé par l'ADN dans le noyau.

un squelette coupé). On rince ensuite l'intercalant. Pour cela il suffit de mettre l'ADN dans une solution sans bromure d'éthidium. En retirant l'intercalant, l'ADN va retrouver son pas initial. Comme le nombre de fois où les brins s'entrecroisent est différent de ce qu'il était au départ on a donc créé du surenroulement (ici négatif).

Avec un ADN circulaire dans lequel l'intercalant ne peut pénétrer qu'une région (à l'aide de protéines par exemple) on peut créer localement du surenroulement positif, juste dans la partie où l'intercalant ne pénètre pas.

On peut également utiliser les topoisomérases pour créer le surenroulement, en particulier positif. Ces méthodes sont donc moins souples que la notre. La gamme accessible est également moins large, typiquement $|\sigma| < 0.1$.

22.3.2 Méthodes d'investigation

Les méthodes physiques expérimentales utilisées pour détecter le surenroulement sont d'une part celles basées sur la mobilité de la molécule et d'autre part la microscopie électronique.

Le premier groupe comprend les gels d'électrophorèse (figure 43), les études de sédimentations. Ces mesures sont sensibles à la mobilité de l'ADN laquelle est très sensible aux structures plectonémiques. Ces méthodes ne donnent accès qu'à des valeurs moyennes sur l'échantillon. Il est impossible d'étudier le comportement d'une seule molécule.

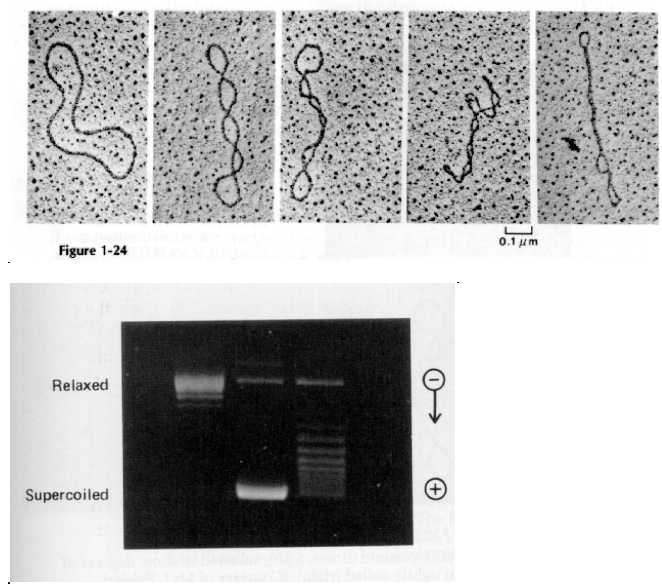


FIG. 43: La première figure est la représentation d'ADN circulaires, observés par microscopie électronique. De la gauche vers la droite le degré de surenroulement va croissant en partant d'ADN relaxé.

La seconde figure est une photographie d'un gel d'électrophorèse avec une souche d'ADN qui peut être relaxée ou surenroulée (supercoiled en anglais). Plus l'ADN est surenroulé, plus il présente des plectonèmes, et donc plus il migre vite à cause de sa forme compacte.

La microscopie électronique peut être utilisée pour observer des molécules dont on a gelé rapidement la solution (cryomicroscopie électronique) [Bednar et al., 1994]. Elle donne ainsi accès à une vue de la configuration de chaque molécule à un instant donné (voir figure 43). La moyenne se fait alors par le nombre de molécules observées.

Signalons que le surenroulement faisant apparaître des structures particulières d'ADN peut être par conséquent étudié par des méthodes biologiques (utilisation d'anticorps dirigés contre ces structures) ou chimiques (réactifs ne réagissant que lorsque ces structures sont présentes)[Palecek, 1991, Murchie et al., 92].

De plus de nombreuses simulations par ordinateur [Bednar et al., 1994] [Vologodskii et al., 1992] [Schlick and Olson, 1992] ont été effectuées pour rendre compte des observations .

22.3.3 Apport de notre étude

Notre dispositif est le premier a permettre des études de surenroulement sur des molécules isolées en donnant une grande souplesse dans le contrôle du surenroulement. De plus il permet d'atteindre de manière continue des surenroulements inégalés (voir plus loin). Comme il est couplé à un microscope, lequel permet de visualiser le système mais également dans l'avenir

des protéines, il devrait permettre à terme l'étude de l'interaction de l'ADN avec des protéines avec un très bon contrôle des paramètres de surenroulement lesquels sont cruciaux pour le fonctionnement de certaines protéines.

22.4 Quelques notions topologiques pour décrire le phénomène

Nous allons maintenant décrire le surenroulement de manière plus abstraite avec un peu de topologie. Une bonne introduction se trouve dans la référence [Bauer et al., 1980].

Pour un double brin d'ADN dont on aurait fixé les extrémités il est impossible de séparer les deux brins sans en couper un et ce même s'il n'y a pas de liaison chimique entre les deux. Cette propriété topologique de la molécule est caractérisée par une grandeur, le nombre d'enlacement (de linking number) noté L_k . Ce nombre compte le nombre de fois où les brins s'entrecroisent. Celui-ci est un entier pour un ADN circulaire puisque dans ce cas les deux brins doivent se refermer.

On peut déterminer sa valeur par une projection des deux brins sur un plan. L_k est donné par la moitié de la somme des intersections des deux courbes résultant de la projection des deux brins. Dans cette somme la valeur + ou -1 est affectée à chaque intersection suivant le sens de croisement (l'orientation de chacun des brins est ici primordiale).

Pour un ADN linéaire sans contrainte, la valeur du nombre d'enlacement vaut simplement son nombre de paires de bases divisé par le pas de l'hélice (environ 10.5) et sera noté dans la suite L_{k_0} .

Ce nombre est un invariant tant que l'on ne modifie par l'état des extrémités. Toute déformation régulière des courbes conserve sa valeur. Pour un ADN, comme pour la corde que nous avons manipulée, il a la même valeur dans le cas où il y a beaucoup de plectonèmes et dans le cas où on tire fort et où ceux-ci sont absents. Cela signifie également que pour modifier la valeur du nombre d'enlacement d'un ADN circulaire, il faut couper la molécule, la tordre et refermer la coupure.

Pour expliquer l'effet de la torsion on a besoin de modéliser l'ADN par un ruban plat. Les bords de ce ruban correspondraient aux deux squelettes de phosphates. Dans ce modèle la rotation, le long de la molécule, de l'axe perpendiculaire au ruban sert à décrire la torsion pure de la molécule. Pour une molécule d'ADN B linéaire sans contrainte la rotation de cet axe est égale à 1 tour pour 10.5 bases. On définit la grandeur caractérisant la torsion pure comme le nombre de tours que fait cet axe le long de la molécule. On la note T_w (de l'anglais Twist). Dans le cas de l'ADN linéaire sans contrainte on a $L_{k_0} = T_w$. Pour un ADN circulaire c'est bien évidemment un entier puisque la molécule doit se refermer.

Si on regarde maintenant la courbe décrite par la ligne médiane du ruban, on définit à partir d'elle une autre grandeur appelée l'entortillement et que l'on note W_R de l'anglais Writhe. Cette propriété de la courbe en trois dimensions de la molécule d'ADN se calcule de la manière suivante :

$$W_r = \frac{1}{4\pi} \int ds \int ds' \frac{\partial_s \vec{r}(s) \times \partial_{s'} \vec{r}(s') \cdot [\vec{r}(s) - \vec{r}(s')]}{|\vec{r}(s) - \vec{r}(s')|^3}$$

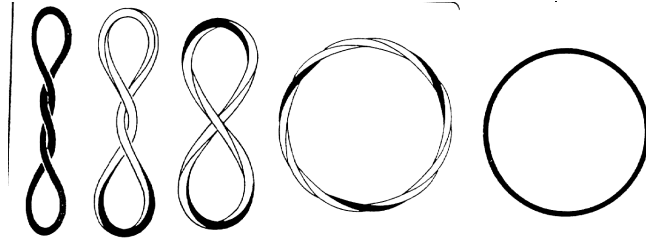


FIG. 44: Exemples de torsion et d'entortillement sur un anneau dont une face est blanche et l'autre noire. Quand l'anneau est plat et uniformément coloré (cas de droite), la torsion est évidemment nulle ainsi que l'entortillement puisque les bords ne se coupent pas lors de la projection qui est présentée. Les trois cas de gauche présentent des topoisomères, i.e. des cas où $L_k = C^{te} = 3$. De droite à gauche on a successivement : $T_w = 3$ et $W_R = 0$, puis $T_w = 2$ et $W_R = 1$, $T_w = 1$ et $W_R = 2$, $T_w = 0$ et $W_R = 3$. W_R est obtenu par le nombre de fois où l'anneau se passe par dessus (en tenant compte de l'orientation).

Son expression n'est pas très intuitive du fait de son caractère non local.

La relation importante et qui peut également être utilisée pour définir l'entortillement est :

$$L_k = T_w + W_r$$

Le nombre d'enlacement est un invariant topologique qui peut donc se présenter sous forme de torsion, comme pour la corde quand elle est tendue, ou sous forme de courbure dans l'espace comme c'est le cas dans les plectonèmes. Dans toute déformation des courbes le nombre d'enlacement est conservé mais ses deux composantes sont elles modifiées. La partition peut être modulée par une force.

Des exemples simples pour illustrer ces notions sont présentés sur la figure 44.

Un autre paramètre va nous être utile dans la suite. On l'appelle degré de surenroulement et il est défini par :

$$\sigma = \frac{L_k - L_{k_0}}{L_{k_0}}$$

$L_k - L_{k_0}$ est l'écart entre la molécule relaxée, sans contrainte de torsion, et la molécule dans son état présent. Dans notre système expérimental $L_k - L_{k_0}$ est simplement donné par le nombre de tours que l'on a fait faire aux aimants en pilotant les moteurs et L_{k_0} est donné par la longueur cristallographique de la molécule divisée par la distance entre deux bases (environ 3.4\AA), divisé par 10.5 qui est le nombre de bases par tour pour l'ADN B. L'intérêt de définir σ est que cette grandeur permet de comparer des ADN de différentes tailles pour des effets relatifs de surenroulement identiques.

Remarque : de la même manière nous utiliserons l'extension relative pour comparer différents ADN. Elle est définie comme le rapport de l'extension de la molécule par la longueur cristallographique de celle-ci.

23 Élasticité d'une molécule d'ADN avec surenroulement

L'élasticité de l'ADN n'est, nous l'avons vu, traitée de manière exacte que depuis peu de temps avec l'analyse du modèle du ver. Les théories analytiques ou semi-analytiques pour l'ADN surenroulé sont encore plus récentes. Elles sont complexes et nous allons essayer maintenant de donner, le plus simplement possible, les ingrédients essentiels des deux théories les plus convaincantes.

La base générale de ces modèles est la suivante. L'énergie de la molécule comprend donc en plus du modèle du ver une composante torsionnelle. L'énergie de la molécule sous torsion et sous traction est donc donnée par :

$$E = \int_0^L \frac{A}{2} (\partial_s \vec{t})^2 + \frac{C}{2} (\Omega(s) - \Omega_0)^2 ds - Fz$$

Dans cette relation nous avons introduit Ω qui est l'angle que fait la normale au ruban qui modélise l'ADN dans un plan perpendiculaire à l'axe de la force, Ω_0 étant sa valeur pour un ADN relaxé, donc correspondant à 10.5 bases par tour comme nous l'avons vu précédemment et C qui est la longueur de persistance en rotation, i.e. la distance au bout de laquelle les corrélations d'angle sont perdues. La valeur de C est estimée aux alentours de $75nm$.

23.1 Le modèle de Marko et Siggia

Le premier modèle est encore dû à Marko et Siggia [Marko and Siggia, 95a]. Il consiste à calculer l'énergie libre des deux formes le plus souvent rencontrées : plectonème et solénoïde. Ces deux formes ont un entortillement et une énergie de courbure connues en fonction des paramètres qui les caractérisent (rayon, pas). Par ailleurs ils calculent un potentiel entropique effectif pour tenir compte des fluctuations thermiques. Ils prennent en compte la contribution électrostatique par un potentiel de Debye-Huckel (ils montrent qu'en fait la forme exacte du potentiel joue peu du fait de la grande taille du plectonème par rapport à celle de la molécule). Ils ont donc accès aux énergies libres de ces formes. Ensuite ils proposent une partition de la molécule entre ces deux formes. Ils minimisent alors l'énergie libre globale par rapport à la partition entre ces deux structures tertiaires.

Les courbes d'élasticité s'en déduisent directement. Nous verrons par la suite que pour décrire les expériences dans toute la gamme explorée expérimentalement il faut rajouter un autre ingrédient.

23.2 Le modèle de Bouchiat et Mézard

La seconde théorie est due à Mézard et Bouchiat [Bouchiat and Mézard, 97]. C'est également une théorie qui est basée sur un modèle élastique symétrique. Ces auteurs utilisent l'analogie avec la mécanique quantique comme pour le modèle WLC. Ils montrent que le problème est l'analogie du mouvement d'une particule chargée se mouvant sur une sphère

dans un champ électrique et magnétique créé par un monopole magnétique de charge non quantifiée. Ils effectuent en parallèle des simulations Monte-Carlo.

La résolution mathématique de ce problème fait ressortir une longueur intermédiaire entre la distance entre bases et la longueur de persistance dont on ne sait pas pour l'instant si elle a un sens physique (sa valeur qui permet un bon ajustement des données expérimentales est de l'ordre de la distance correspondant à une dizaine de bases). Elle apparaît dans leurs calculs car la limite continue dans ce modèle présente une divergence. Cette longueur est donc une longueur de coupure. Celle-ci n'existe pas dans le modèle du ver car la limite continue du modèle de Kratky-Porod ne présente pas de "pathologie" mathématique. Toutefois il faut reconnaître qu'il est normal qu'un modèle élastique pour l'ADN ne puisse pas décrire des longueurs inférieures à une dizaine de bases où la discrétisation et la séquence vont être non négligeables.

Cette théorie étant basée sur un modèle symétrique, n'aura qu'un domaine d'applications limité car l'ADN étant chiral, la symétrie sera brisée à un moment ou un autre. De plus leur modèle ne prend pas bien en compte les problèmes stériques ce qui fait que leur modèle ne sera pas valable quand le surenroulement sera suffisamment grand pour produire des plectonèmes serrés.

Notons que des simulations sont également utilisées [Vologodskii and Marko, 1997].

24 Résultats expérimentaux

24.1 Expériences à $\sigma = 0$

Le premier groupe qui a effectué des mesures d'élasticité sur une molécule unique d'ADN, sans contrainte de torsion, dans le domaine entropique a été celui de C. Bustamante en 1992 [Smith et al., 1992]. Avec l'aide des théoriciens Marko et Siggia il a analysé les résultats et a montré que l'ADN suit le modèle du ver. Ceci est illustré dans la figure 45 à partir de données que nous avons prises .

Avec les courbes d'élongation en fonction de la force et connaissant la longueur cristallographique de leur molécule il a mesuré une longueur de persistance de 53 nm pour des conditions de 10mM tampon phosphate.

Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont depuis effectué des mesures similaires, avec des techniques différentes, confirmant l'ensemble de ces résultats. Ils sont très importants dans la mesure où ils nous permettent de déterminer le nombre de molécules qui sont ancrées à la bille que l'on étudie.

24.1.1 Comment être sûr de n'avoir qu'une molécule ?

Pour préparer notre échantillon nous mélangeons les billes avec une certaine quantité d'ADN. Nous avons certes ajusté cette quantité pour que la valeur moyenne donne une molécule par bille mais cela n'est vrai qu'en moyenne, or, comme nous travaillons sur des

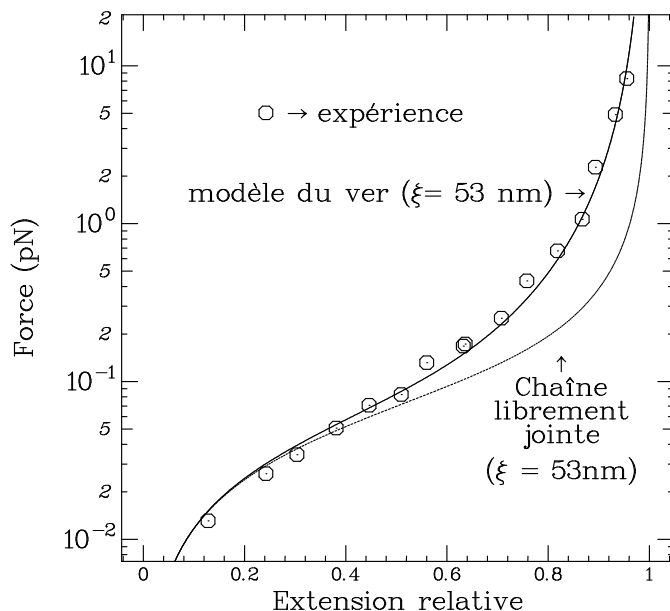


FIG. 45: L'ADN est bien décrit par le modèle du ver. Les courbes en trait plein correspondent au modèle du ver et à la chaîne librement jointe avec une longueur de persistance de 53nm .

molécules isolées il nous faut vérifier **à chaque fois** combien de molécules sont attachées à la bille que nous étudions.

Prévisions théoriques Si pour une bille donnée la courbe d'élasticité correspond à une longueur de persistance dans le modèle du ver de 53 nm , dans les conditions données plus haut, alors nous serons sûrs de n'avoir qu'une molécule.

Si, par exemple, notre situation correspond à deux molécules accrochées, alors la rigidité va être doublée, comme lorsque on a deux ressorts en parallèle. Si nous analysons les courbes d'élasticité avec le modèle du ver la longueur de persistance effective correspondant à ces deux molécules sera alors de la moitié de 53 nm , c'est à dire environ 26 nm (je rappelle encore une fois que plus ξ est petit plus il est dur d'étirer la molécule). Ce résultat peut bien sur être modifié suivant la manière dont les molécules sont fixées à la fois à la surface de verre et à la bille, comme nous l'avons vérifié numériquement. Cette valeur de 26 nm correspond au maximum que l'on peut avoir pour ξ .

Nous pouvons encore envisager le cas où une bille est attachée par une molécule et par un dimère (la construction d'ADN de λ peut effectivement contenir des multimères du fait de l'existence des bouts non appariés). Dans ce dernier cas l'analyse de l'élasticité par le modèle du ver donne une longueur de persistance effective (il ne s'agit pas de dire que ce modèle est exact dans ce cas) de 44 nm .

En conclusion toute bille ne correspondant pas à une longueur de persistance de $\sim 50\text{nm}$ dans le modèle du ver ne sera pas attachée par une molécule unique.

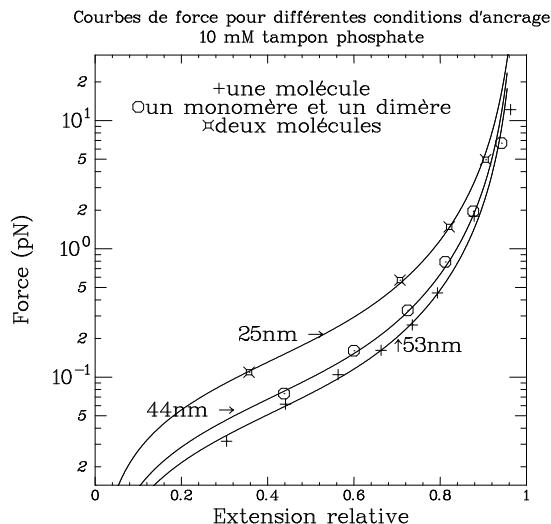


FIG. 46: Les courbes représentées sont celles du modèle du ver correspondant aux situations d'une molécule, d'une molécule plus un dimère et enfin à deux molécules attachées à la bille. Notre technique nous permet donc de distinguer différentes configurations d'ancrage.

Expérience La qualité de notre système de mesure est suffisante pour pouvoir discriminer tous ces cas. Ceci est illustré sur la figure 46. Les points expérimentaux obtenus permettent bien de distinguer la configuration à laquelle nous avons affaire.

Donc, dans le cas d'une molécule sans contrainte torsionnelle ($\sigma = 0$), cette condition étant essentielle (la torsion modifiant bien sur l'élasticité), pour savoir si nous avons une bille avec une molécule ou plusieurs, nous mesurons expérimentalement la courbe d'élasticité et nous ajustons celle-ci avec le modèle du ver. La longueur de persistance est alors, aux erreurs expérimentales près, de 53 nm dans le cas d'une molécule unique. Si ce n'est pas le cas nous avons alors une autre configuration d'accrochage de la bille.

Nous avons fait un test supplémentaire pour vérifier que la longueur de persistance d'une molécule unique est bien de 53nm pour ne pas reposer uniquement sur les résultats de [Smith et al., 1992].

Nous avons pris une molécule insensible à la torsion pour mesurer sa longueur de persistance. Ceci nous assure de l'unicité de la molécule attachée. En effet une bille ancrée par plusieurs molécules aurait une élasticité modifiée par la rotation. Dans ce cas nous torsaderions ces molécules ce qui modifierait immanquablement les propriétés élastiques (nous présentons des données sur le surenroulement de deux molécules dans la référence [Strick et al., 1997]). Mesurer la longueur de persistance d'une telle molécule est donc un bon test qui a confirmé la valeur de 53nm.

Notre méthode de mesure est donc assez précise pour assurer que nous travaillons bien sur une molécule unique. Une fois que ce fait est vérifié nous pouvons la tordre à volonté.

Remarque importante : lorsque nous ajustons la courbe d'élasticité expérimentale nous déterminons deux paramètres : la longueur de persistance ξ et la longueur de la molécule

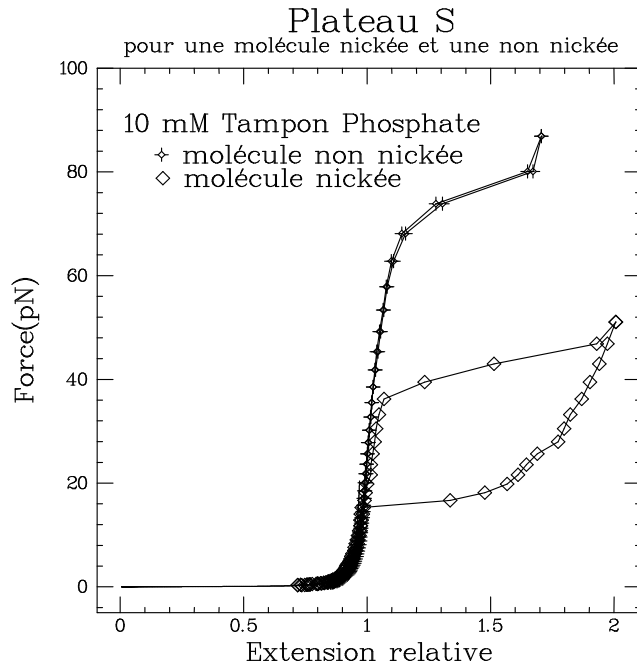


FIG. 47: Courbe de force pour atteindre la forme S. La force de transition est plus élevée pour une molécule non nickée que pour une molécule nickée (les deux courbes n’ont pas été prises sur la même molécule). Cependant la force de transition pour les molécules nickées n’est pas très bien définie. Nous avons observé un étalement des forces critiques de ~ 35 à $65 pN$ sur des molécules nickées. Sur ces dernières une hystérésis est présente ainsi qu’un vieillissement lors de tractions multiples.

L_0 . Il est important de trouver L_0 pour chaque molécule car les deux extrémités sont marquées par des ligands sur plusieurs microns et en général l’ancrage ne se fait pas sur toute cette longueur. Il faut donc à chaque fois mesurer la distance entre les points d’attache. Cela permet d’ailleurs de vérifier que L_0 est bien compris entre la longueur d’ADN non marqué et la longueur maximale de la molécule. Enfin cette valeur va nous servir pour calculer L_{K_0} qui intervient dans la valeur du degré de surenroulement de la molécule quand nous lui appliquerons une torsion.

24.1.2 Effet du blocage en rotation pour la transition vers la forme S

Commençons par la différence entre les molécules nickées et les molécules bloquées en rotation pour ce qui est de la transition vers la forme S. Notons tout d’abord que nous ne sommes pas allés jusqu’au bout du plateau sur toutes les molécules pour réduire les risques de cassure de la molécule.

La première différence est dans la force qui est nécessaire à la transition. Celle-ci est plus importante pour une molécule bloquée en rotation que pour une molécule insensible à la torsion, voir figure 47. Cependant la transition vers la forme S ne se fait pas à une force bien

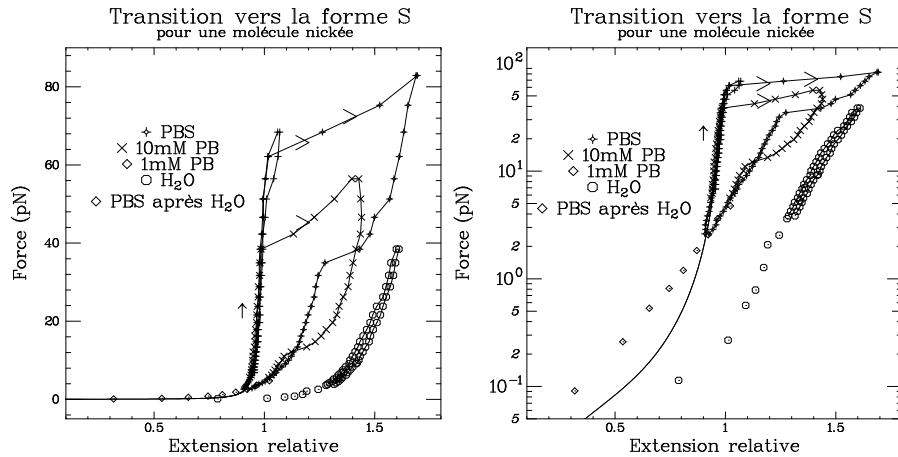


FIG. 48: Effet du sel sur la transition S pour une molécule nickée. On peut remarquer également la forte hystérésis. Cette hystérésis fait apparaître une courbe de force en exponentielle. Ce type de courbes peut se retrouver également quand on travaille dans l'eau pure. Sur certaines molécules nous ne sommes pas revenus sur la courbe initiale.

définie dans le cas d'une molécule non bloquée. Il y a un étalement des forces de transitions de ~ 35 à $\sim 65pN$. Cet étalement n'est pas observé sur les molécules bloquées en rotation et il est beaucoup trop important pour être dû à du bruit dans les mesures.

La deuxième différence est dans l'existence d'une hystérésis (voir figure 48). La courbe de traction est différente de la courbe de relaxation pour une molécule nickée et ce de manière notable. S. Smith *et al.* et Cluzel *et al.* [Cluzel et al., 1996, Smith et al., 1996] avaient certes déjà observé l'hystérésis, le premier groupe proposant même l'hypothèse (sans pouvoir la vérifier, car leurs molécules n'étaient pas sensibles à la torsion car elles ne possédaient qu'un site possible d'ancrage sur la molécule) que la cause de ceci était un nick au niveau duquel une dénaturation avait lieu lors de la transition. Cette idée est illustrée dans la figure 49. Nous avons donc vérifié qu'un nick était effectivement nécessaire.

Tout comme P. Cluzel [Cluzel, 1996] nous avons également pu voir qu'une fatigue de la molécule peut avoir lieu. Nous avons pu préciser en plus que cela n'arrive que quand celle-ci est nickée. Si on multiplie les tractions au delà de la force critique donnant la forme S on observe que parfois la molécule ne peut plus revenir sur sa courbe d'élasticité initiale. Une courbe d'élasticité particulière semblant alors apparaître avec une relation quasi exponentielle entre la force et l'élongation. Ce résultat est cohérent avec l'image donnée par S. Smith *et al.* si on suppose que la réhybridation peut ne plus revenir, ou très lentement, au bout d'un certain nombre de tractions.

Remarque : en se plaçant en eau pure avec des molécules non-surenroulables, donc potentiellement nickées, nous avons parfois pu également observer un tel comportement en quasi-exponentielle ($F \propto \exp(l)$). Rappelons qu'un tel changement de force ionique peut induire la dénaturation de la molécule.

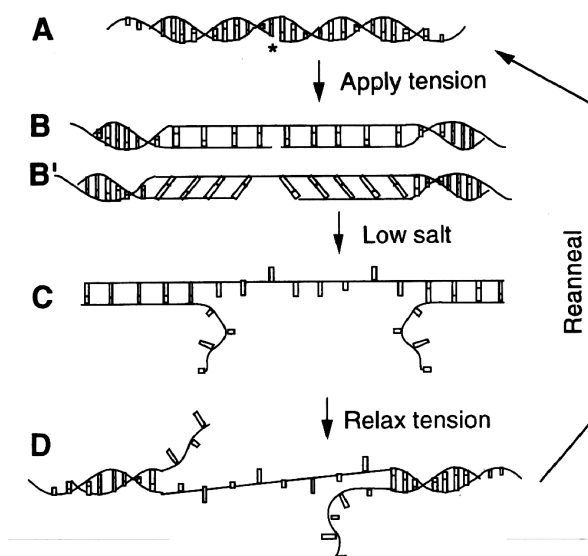


FIG. 49: Schéma du mécanisme proposé par l'équipe de S. Smith pour expliquer une hystérésis sur des molécules nickées.

En laissant la molécule longtemps exposée à l'eau pure nous avons pu produire le même type de courbe quasi-exponentielle en repassant dans le tampon phosphate salin (figure 48). La molécule est simplement plus courte que dans l'eau pure. Nous serions donc tentés de dire que nous avons mesuré la courbe de force d'une molécule, au moins partiellement, simple brin. Cependant il faut noter que ces résultats ne correspondent pas à ceux obtenus par Smith *et al.* [Smith et al., 1996] qui ont produit la dénaturation de manière différente.

Dans tous les cas de figures l'élasticité n'est décrite ni par le modèle du ver, ni par le modèle de la chaîne librement jointe.

Il reste donc des études complémentaires à faire pour mesurer de manière certaine la courbe de force d'un ADN simple brin.

24.2 Courbes d'élasticité d'ADN à faible degré de surenroulement

Avec le surenroulement nous introduisons un nouveau paramètre dans l'élasticité. L'espace dans lequel nous allons nous promener est donc à trois paramètres : l'extension, le surenroulement et la force.

Nous commencerons par regarder ce qui se passe dans le plan surenroulement-extension, c'est à dire quand on garde la force constante et que l'on modifie σ . Expérimentalement cette situation correspond au cas où les aimants ont une hauteur fixée (la force constante) mais où on les tourne pour créer du surenroulement. Les conditions ioniques de la suite sont 10mM tampon phosphate.

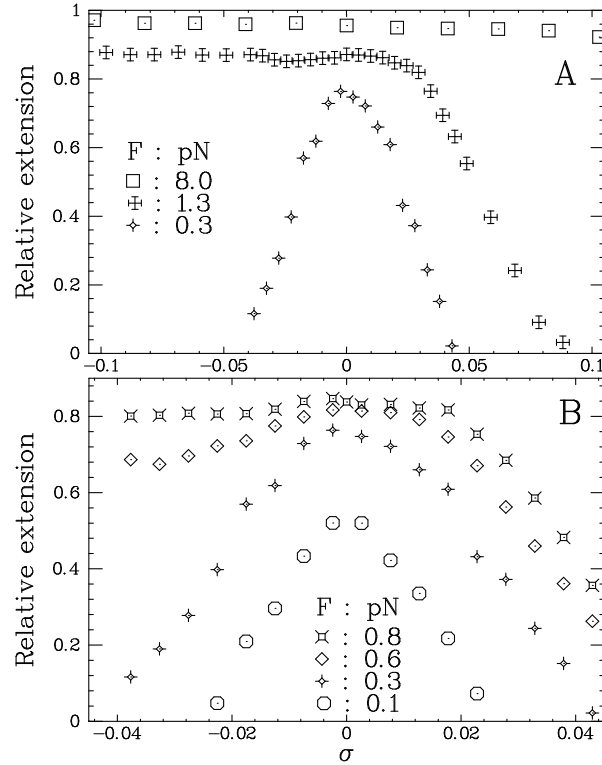


FIG. 50: Courbes de l'élongation en fonction du degré de surenroulement à force constante. La chiralité de la molécule ressort de manière flagrante dans une gamme de force comprise entre 0.6pN et 3pN (dans 10mM tampon phosphate). Le maximum de la courbe en cloche nous permet de repérer la rotation où la molécule est sans contrainte torsionnelle.

24.2.1 Diagramme surenroulement-extension

Faible force

Commençons par revenir sur l'exemple de la corde. Quand on la tord à faible force des plectonèmes se forment. Si l'on fait cela en gardant autant que possible la force exercée aux extrémités constante, on voit que la formation de ces structures s'accompagne d'un raccourcissement de la corde. Celui-ci est assez naturel car les plectonèmes absorbent de la longueur de la molécule qui ne participe plus à l'extension bout à bout.

Pour l'ADN à faible force c'est la même chose comme cela peut se voir sur la figure 50. Quand on tourne la bille, la molécule se raccourcit jusqu'à venir se coller à la surface de verre. Le raccourcissement est identique en surenroulement positif ou négatif.

On peut remarquer que les bords de cette courbe, dite "en chapeau", sont linéaires. Dans 10mM tampon phosphate cette pente vaut $0.08\mu\text{m}/\text{tour}$. Comme notre sensibilité en longueur est d'environ $0.1\mu\text{m}$ on s'aperçoit que **nous sommes sensibles à 2 tours, 2 tours sur les quelques 5000 de la molécule de λ !**

Remarque : Cette courbe en chapeau symétrique est très importante expérimentalement

car elle permet de situer la rotation des aimants où la molécule est sans contrainte de torsion. Cela se produit au maximum de la courbe. Il est important de bien repérer ce maximum car dès que l'on met un peu de torsion, typiquement quelques dizaines de tours pour la molécule de 5000 tours, l'élasticité est suffisamment modifiée pour qu'une analyse par le modèle du ver donne une longueur de persistance qui s'éloigne des $50nm$. On peut alors croire qu'il y a plusieurs molécules sur la bille. Donc, avant toute étude d'une molécule pour trouver sa longueur de persistance, il faut faire une courbe en chapeau, comme celle que l'on vient de voir, pour en trouver le maximum. C'est ensuite à ce maximum que nous mesurons la longueur de persistance pour vérifier qu'il n'y a qu'une molécule.

La symétrie de cette courbe est assez surprenante vu la structure chirale en double hélice droite de la molécule d'ADN. La chiralité ne se fait sentir qu'à plus haute force.

Force intermédiaire

Quand on se place à une force supérieure à $\sim 0.6pN$, nous reviendrons un peu plus loin sur la transition, la chiralité de l'ADN apparaît de manière flagrante. En effet, quand nous surenroulons positivement la molécule, elle se raccourcit de manière identique à ce qui se passe à plus basse force. Mais, quand nous la surenroulons négativement, elle ne se raccourcit plus mais garde une longueur (en première approximation) constante et égale (en première approximation aussi) à celle de la molécule sans torsion à la même force.

Grande force

Si on augmente encore la force au delà de $3pN$ la longueur est relativement constante dans toute la gamme comprise entre -10 et $+10\%$ de surenroulement qui est celle présentée dans la figure.

Regardons maintenant comment se fait la transition entre les différents régimes. Pour cela regardons la même situation mais avec les variables force-extension.

24.2.2 Diagramme d'élasticité

Les courbes sont présentées dans la figure 51. Les courbes du paragraphe précédent ne sont que des coupes horizontales dans cette nouvelle figure.

Nous remarquons que plus nous imposons de tours plus la molécule est rigide. Cependant, au delà d'un certain degré de surenroulement le comportement de la molécule est moins régulier. En effet nous voyons apparaître une force critique, de $0.6pN$ pour les surenroulements négatifs et de $3pN$ pour les surenroulements positifs, pour laquelle la molécule subit une transition brutale de longueur. En deçà de cette force la molécule possède une extension quasi-nulle et juste au dessus de cette force son extension est à peu près égale à celle de la molécule à la même force sans surenroulement.

24.2.3 Discussion

La rigidité croissante de la molécule avec le surenroulement est assez intuitive du fait de la présence des plectonèmes. Ce qui est plus délicat à comprendre c'est la signification des forces critiques. Comme dans le cas déjà évoqué de la forme S, où une telle transition

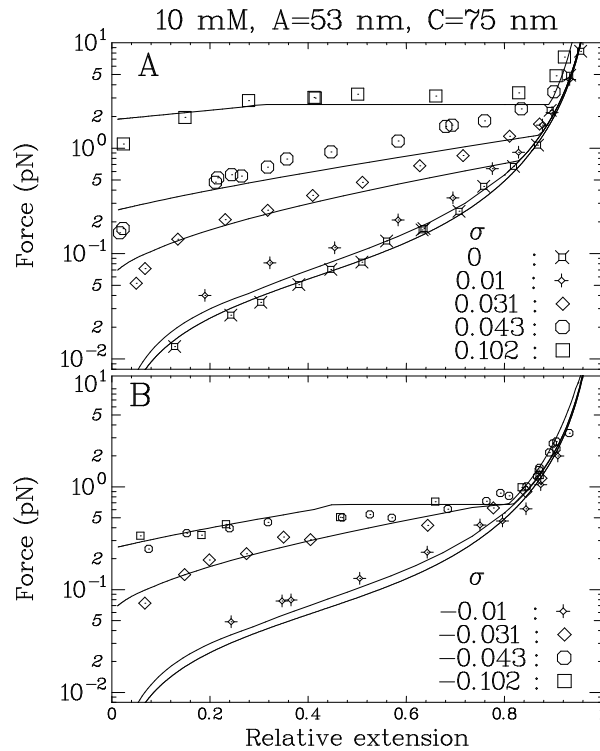


FIG. 51: Courbes de l'élongation en fonction de la force pour différents degrés de surenroulement. La rigidité de la molécule croît avec celui-ci. Des transitions de longueur à des forces bien définies apparaissent quand la molécule est suffisamment surenroulée. Nous les associons à des transitions de structure. Les courbes en trait plein représentent les résultats de la théorie de Marko et Siggia dans laquelle ont été introduites des transitions de structure.

d'extension existe également, nous associons la brutale transition de longueur à une transition de phase de type premier ordre. Comme dans le cas de la transition glace/eau, une faible variation du paramètre intensif entraîne un changement brutal des propriétés du système. Nous connaissons la phase de départ à faible force puisque c'est la forme B, mais quelles sont les structures d'arrivée ?

Nouvelle structure en surenroulement négatif Il semble naturel de penser que si on a une hélice constituée de deux fils et que nous la débobinons les deux brins vont finir par se séparer. L'hypothèse la plus naturelle est donc de dire que la forme qui est créée quand on a du surenroulement négatif est une structure où les deux brins sont séparés. Une telle région dans l'ADN est appelée bulle de dénaturation. La forme B de l'ADN a un pas bien défini. Cette bulle de dénaturation est, elle, un peu plus indéfinie puisqu'il n'a pas de pas hélical, mais si nous prenons le cas des deux brins parallèles alors le degré de surenroulement de cette structure est -1. Nous interprétons donc la transition pour les surenroulements négatifs de manière suivante.

En tordant la molécule, sans force pour l'instant, on cherche à modifier son pas hélical.

La molécule "n'apprécie" pas cette déformation car cela coûte de l'énergie de torsion. Elle préfère réagir en se courbant pour former des plectonèmes et relâcher de cette façon une partie de la contrainte de torsion pure. Quand on tire sur la molécule on va modifier la partition torsion/entortillement en favorisant la torsion, augmentant ainsi le couple effectif auquel est soumis la molécule. Lorsque celui-ci devient trop important (nous reviendrons là dessus dans la suite), plutôt que de modifier lentement le pas hélical tout le long de la molécule, il y a création d'une bulle de dénaturation. Celle-ci peut alors absorber toute la contrainte de torsion du fait de son degré de surenroulement naturel, ce qui permet au reste de la molécule de se retrouver soudainement sans contrainte importante, **presque** comme de l'ADN B relaxé. Ceci explique alors le rallongement brutal de la molécule puisque sa plus grande partie se retrouve dans le même état que la molécule relaxée.

Vérification de l'existence de bulles de dénaturation Pour vérifier la présence de cette phase dénaturée nous avons utilisé un agent chimique, le glyoxal, qui attaque les bases exposées et fragilise l'appariement de certaines d'entre elles [Palacek et al., 87].

Cet agent n'attaque que les zones où les bases sont exposées mais pas les régions où les bases sont pairées puisqu'elles sont alors inaccessibles.

Nous avons tout d'abord vérifié que sans contrainte de rotation il n'y a pas attaque. Ensuite nous avons laissé la réaction se produire après avoir imposé de la torsion et une force au dessus du plateau à 0.6pN.

Le résultat des courbes en chapeau après attaque de l'agent dans cette zone où nous pensons avoir une bulle de dénaturation est indiqué dans la figure 52. Nous voyons qu'il y a signature de l'attaque par l'apparition d'un plateau au sommet du chapeau. Précisons l'origine de cet effet.

Le glyoxal ($CHO - CHO$) forme un composé stable avec une des bases (la guanine) et des composés instables avec les autres. Cela entraîne deux conséquences. Tout d'abord les amines ne peuvent plus former de liaison hydrogène, la double hélice est donc moins stable. Ensuite le glyoxal étant lié aux bases il induit un problème stérique qui nuit à la formation de la double hélice. Les deux effets concourent donc à déstabiliser la double hélice. L'apparition d'une bulle de dénaturation est donc fortement favorisée. Elle peut alors se former même quand on surenroule négativement la molécule en dessous de la force critique.

Nous avons déjà vu qu'une bulle se manifeste par un plateau dans les courbes en chapeau. Dans le cas de notre molécule elle ne peut cependant s'étendre en dessous de la force critique que sur la région qui a été modifiée chimiquement. Au delà la molécule ne subit pas de contrainte de torsion suffisante pour produire une bulle. Donc quand nous atteignons la région non attaquée la bulle ne va plus se propager et la molécule va se raccourcir par formation des plectonèmes comme cela arrive sans attaque chimique pour les surenroulements négatifs. En surenroulement positif rien n'est modifié.

En conclusion nous avons apparition d'un plateau au sommet du chapeau. Nous avons vérifié que ce plateau possède une largeur proportionnelle à la taille de la bulle ouverte au moment de l'attaque ce qui correspond bien à ce que l'on attend.

Remarque : Une autre preuve a été apportée par T. Strick *et al.* qui ont hybridé des

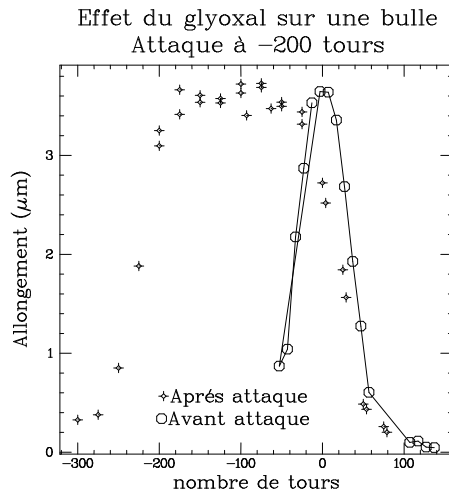


FIG. 52: Effet du glyoxal sur une bulle de dénaturation. Nous avons pour cela tourné les aimants de -200 tours par rapport au zéro et tiré au dessus du plateau. La solution contient du glyoxal 0.1M. Celui-ci attaque les bases exposées. Cela modifie les courbes en chapeau avec la formation d'un plateau dont la largeur correspond à la taille de la bulle.

bouts d'ADN complémentaires de région de la molécule de départ ce qui ne serait pas possible sans bulle de dénaturation. Ils ont d'ailleurs pu montré ainsi qu'il n'y a pas une bulle mais plusieurs et qu'elles sont mêmes localisées dans les régions riches en bases A-T comme on peut s'y attendre dans la mesure où ces bases n'ayant que deux liaisons hydrogènes sont donc moins solides. Pour plus de renseignements sur ce sujet voir T. Strick *et al.*[*in preparation*].

Nouvelle structure en surenroulement positif Le raisonnement précédent pour expliquer une force critique semble applicable au cas du surenroulement positif. On sait qu'il existe des formes d'ADN [Saenger, 1988] possédant un degré de surenroulement naturellement positif. La torsion positive serait donc relaxée dans cette structure spontanément plus surenroulée que la forme B alors que le reste de la molécule serait sous la forme B.

24.2.4 Force ou couple critique ?

Dans les courbes que nous avons présentées jusqu'à présent, il semble ressortir que c'est la force qui pilote la transition. Cependant nous pouvons observer, en prenant des chapeaux près des transitions, qu'ils ont les bouts des bords négatifs qui remontent quand nous allons assez loin en rotation sans atteindre la force critique (voir figure 53). Ceci nous porte à croire que ce n'est pas la force critique qui pilote la transition mais plutôt un couple critique. Cela signifie que la nouvelle structure apparaît quand le couple **effectif** appliqué à la molécule est trop important. A cause de l'entortillement il n'est pas lié simplement aux nombre de tours imposé à la molécule. Le rôle de la force n'est que de modifier la partition du nombre d'enlacement en diminuant l'entortillement par rapport à la torsion. Elle sert donc à augmenter le couple effectif à nombre d'enlacement constant.

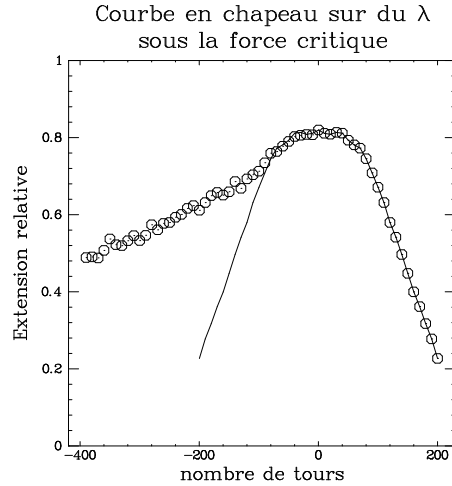


FIG. 53: Nous avons mesuré un chapeau en dessous de la force critique. La courbe en trait plein représente la courbe symétrisée obtenue à partir des valeurs en surenroulement positif. Le décollement des points expérimentaux de cette ligne ne se fait qu'à un nombre fini de tours. L'élasticité n'est modifiée que lorsque suffisamment de tours sont imposés à la molécule. Ce n'est donc pas la force qui contrôle la création d'une bulle de dénaturation mais le couple.

Les forces critiques n'apparaissent donc que comme les forces nécessaires pour induire les transitions pour des surenroulements proches de 0. En dessous de ces forces les transitions sont possibles mais il faut aller plus loin pour les rencontrer.

Une fois le couple critique atteint les tours rajoutés à la bille ne servent qu'à accroître la proportion de la nouvelle structure alors que le couple sature. Cette phénomène a également été proposé par Vologodskii *et al.* [Vologodskii et al., 1979].

Malheureusement nos essais pour vérifier cette hypothèse se sont révélés infructueux.

Essai de mesure du couple critique Par contre nous pensons avoir mis en évidence les changements de structures d'une molécule d'ADN en fonction de σ . Nous avons effectué des expériences à assez haute force pour essayer de situer le nombre de tours où les structures apparaissent (voir figure 54). Ce type de mesure demande une très grande sensibilité en longueur. Comme nous l'avons signalé dans le chapitre sur la technique de mesure, nous avons donc dû procéder à des mesures par modulation.

Nous avons pour différentes rotations, effectué des modulations de force en modulant la hauteur des aimants au dessus de l'échantillon. Lorsque le couple est assez grand, la nouvelle structure est créée. Celle-ci n'a pas de raison d'avoir la même élasticité que la forme B que l'on a au départ. Donc quand on a uniquement la forme B en modulant la force on mesure une différence de longueur entre les deux positions, et cette différence de longueur va changer quand la nouvelle structure va apparaître. Cette différence est, comme on peut le voir sur la figure 54, très faible. Cela nous oblige à moyenner sur différentes modulations pour retirer un peu du bruit et surtout à faire l'expérience à haute force où les fluctuations sont plus

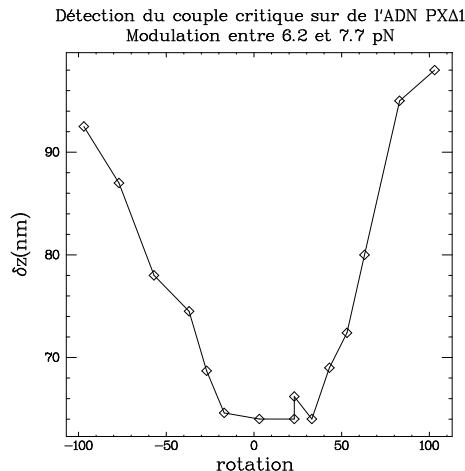


FIG. 54: Nous avons essayé de situer la rotation seuil, ou couple critique, qui déclenche l'apparition des nouvelles structures. Celles-ci n'ayant pas la même élasticité que l'ADN-B se détectent par un allongement différent de la molécule quand on fait des modulations de force, ici entre 6.2 et 7.7 pN. Malheureusement ces modulations sont trop faibles pour nous permettre de déterminer avec précision les seuils.

faibles. De plus en étant à haute force nous éliminons presque totalement la contribution de l'entortillement ce qui facilite l'interprétation. Comme on peut le remarquer sur la figure 54 la précision de notre technique n'est actuellement pas assez bonne pour donner des valeurs précises du surenroulement où les nouvelles structures apparaissent. Cela nous aurait permis en multipliant ces valeurs par la constante de torsion de donner une valeur pour le couple critique.

La valeur numérique de ce couple critique reste donc encore à déterminer mais l'apparition des structures est assez nette.

24.2.5 Influence de la salinité

Le changement des conditions ioniques (augmentation de la concentration en sel, influence du magnésium) ne modifie pas de manière drastique les résultats précédents puisque essentiellement seule la valeur des transitions est modifiée (elle augmente avec la force ionique). Pour le lecteur intéressé nous présentons ces données dans la référence [Strick et al., 1997]. La seule différence notable est l'apparition d'une hystérésis, uniquement pour les surenroulements positifs, dans des conditions plus concentrées en sel ou en magnésium.

24.2.6 Confrontation théorie expérience

- Dans la figure 51 les courbes en trait plein sont celles correspondant à la théorie de Marko et Siggia. En dessous des transitions de longueur c'est leur modèle élastique que nous avons décrit qui est représenté. Les transitions de longueur ont été ajoutées

TAB. 1: Valeurs de C/A par la courbure en 0

| <i>Extension</i> | $F(pN)$ | Courbure Γ | $\pm d\Gamma$ | C/A | C/A_{min} | C/A_{max} |
|------------------|---------|-------------------|---------------|-------|-------------|-------------|
| 0.569 | 0.116 | -0.3 | 0.1 | 1.56 | 1.14 | 2.01 |
| 0.674 | 0.194 | -0.2 | 0.08 | 2.20 | 1.52 | 2.88 |
| 0.752 | 0.328 | -0.1 | 0.1 | 2.58 | | 4.36 |

”à la main” à partir d’une transition de phase avec une certaine différence d’énergie ajustée pour mettre le plateau au bon endroit. On voit que l’accord est bon pour les surenroulements assez importants. De manière surprenante les faibles surenroulements, qui ne sont qu’une perturbation du modèle du ver, ne sont pas très bien rendus.

- Comme nous l’avons vu le modèle de Bouchiat et Mézard est restreint aux régions où la chiralité ne se fait pas sentir. Ces auteurs délimitent la zone d’application de leur modèle à $F < 0.6pN$ et $\eta = 95\sigma < 1.5$. Les courbes théoriques sont comparées à l’expérience dans la figure 56. Comme on peut le voir l’accord est très bon. De plus si d’après J. Marko les courbes de leur modèle qui ont été présentées précédemment sont assez peu sensibles à la valeur de la constante de torsion C (prise égale à 75nm dans leurs calculs). Ce n’est pas le cas pour les courbes présentées par Bouchiat et Mézard. Dans leur article ils proposent de déterminer le rapport C/A à partir des courbes en chapeau. Nous allons maintenant discuter ce point.

24.2.7 Détermination du rapport C/A à partir de la théorie de Bouchiat et Mézard

L’intérêt de mesurer C/A est dû au fait que les mesures de C ne sont pas convergentes et fluctuent entre 40 et 100nm [Taylor and Hagerman, 1990, Crothers et al., 1992]. Or A est, comme nous venons de le voir, maintenant mesuré directement. La détermination du rapport peut donc donner un accès indirect à C par une technique différente de celles déjà utilisées pour estimer C .

Première méthode La première méthode suggérée par les auteurs de ce modèle consiste à mesurer la courbure au sommet des courbes en chapeau. D’après la relation (10) de leur article cette courbure est reliée ”simplement” à la valeur de C/A . Nous avons essayé d’appliquer cette méthode sur une molécule dont les chapeaux sont particulièrement précis (figure 55). Les valeurs que nous avons obtenues sont données dans le tableau 1 où nous avons déterminé la courbure directement par la dérivée seconde et dans le tableau 2 où la courbure est obtenue par la dérivée seconde d’un ajustement des points expérimentaux par un polynôme d’ordre 4. L’incertitude de la mesure est donc conséquente. Ceci est le résultat des incertitudes sur les mesures de longueur. Celles-ci semblent faibles à la vue de la courbe mais en dérivant deux fois cette courbe on amplifie ce bruit, d’où des résultats d’assez mauvaise qualité.

Un moyen d’améliorer cela serait de faire des modulations de rotation. Pratiquement il faudrait mesurer les différences d’élongations entre deux positions en rotation des

TAB. 2: Valeurs de C/A par la courbure en 0 (ajustement polynômial)

| $Extension$ | $F(pN)$ | Courbure Γ | $\pm d\Gamma$ | C/A | C/A_{min} | C/A_{max} |
|-------------|---------|-------------------|---------------|-------|-------------|-------------|
| 0.569 | 0.116 | -0.318 | 0.08 | 1.65 | 1.30 | 2.00 |
| 0.674 | 0.194 | -0.198 | 0.03 | 2.17 | 1.92 | 2.43 |
| 0.752 | 0.328 | -0.1 | 0.04 | 2.58 | 1.79 | 3.32 |

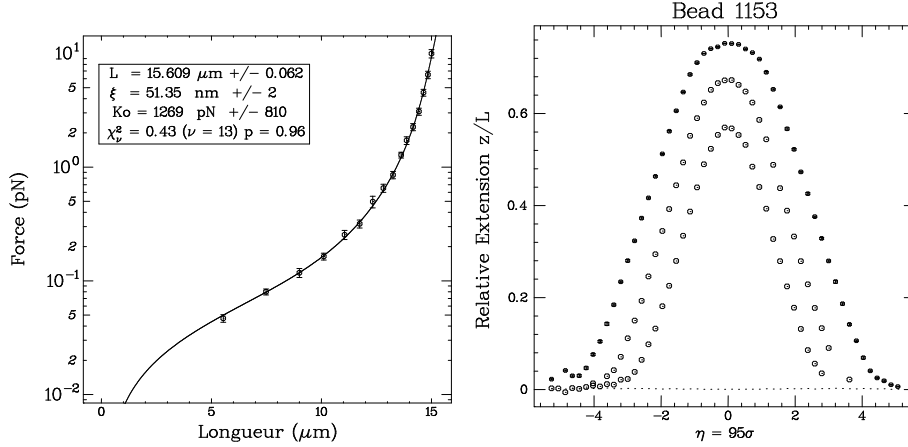


FIG. 55: Courbes en chapeau expérimentales sur lesquelles nous avons déterminé C/A . En abscisse l'unité est $\eta = 95\sigma$ qui est la variable adimensionnée utilisée par Bouchiat et Mézard. Les trois courbes correspondent à 0.116, 0.194 et 0.328pN. La courbe de force de la molécule est présentée à droite.

aimants. Comme nous l'avons souligné préalablement ce type de mesure élimine les erreurs systématiques de positionnement de l'objectif et de la poussière qui sert de référence. De plus le résultat de ces mesures donne directement la dérivée de la courbe en chapeau. Pour obtenir la courbure il ne resterait à dériver qu'une fois ce qui améliorerait encore la mesure. Nous n'avons pas encore appliqué cette méthode.

Deuxième méthode La deuxième méthode que les auteurs proposent utilise toute la partie des courbes en chapeau où leur théorie s'applique, et non pas seulement le sommet comme pour la méthode précédente.

La méthode repose sur l'inversion des relations (9) de leur article. En effectuant cette opération en chacun des points du chapeau, en prenant la moyenne, pondérée des erreurs sur les différents points, il est possible de déterminer C/A .

Les valeurs obtenues sur les courbes présentées sont $1.67 \pm .12$ pour la courbe à 0.116pN, $1.66 \pm .10$ pour la courbe à 0.197pN et 1.71 ± 0.9 pour la courbe à 0.328pN. Celles-ci ne dépendent donc pas comme il se doit de la force et sont dans la gamme des valeurs de C connues.

Un problème reste dans ce modèle : celui de la longueur de coupure. Sa valeur joue sur l'allure des chapeaux (plus elle est grande plus les bords des chapeaux se relèvent), donc sur

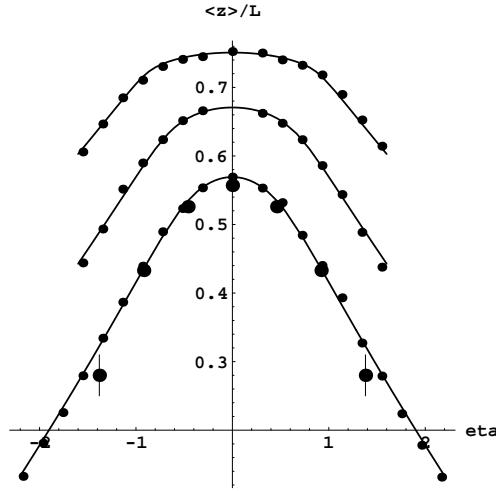


FIG. 56: Courbes en chapeau obtenues par le modèle de Mézard et Bouchiat. Elles représentent l'élongation relative en fonction de la variable $\eta = 95\sigma$. Les points expérimentaux sont les points de petit diamètre. Les autres sont les points obtenus par simulation Monte-Carlo. Les courbes en traits pleins sont issues du modèle. La valeur de C/A a été prise égale aux valeurs données dans le texte pour chaque force. Le rapport de la longueur de coupure sur la longueur de persistance vaut 0.12.

la valeur de C que l'on peut déduire. La longueur de coupure qui a été utilisée pour obtenir les résultats que nous avons donnés vaut $0.12 * \xi$. Cette valeur donne un excellent accord avec l'expérience et, les constantes de torsion, C , déterminées sont indépendantes de la force. De plus, utilisée dans le modèle de Kratky-Porod, elle donne une courbe de force qui s'accorde bien avec le modèle du ver.

Remarque : Bouchiat et Mézard ont calculé la valeur de la longueur de coupure qui permet d'obtenir les meilleurs résultats. La valeur obtenue, $0.14 * \xi$, n'apporte pas de grandes modifications aux courbes présentées.

Cette méthode semble assez prometteuse en attendant une détermination directe de C .

24.2.8 Bilan de la comparaison théorie expérience

Le modèle de Marko et Siggia repose donc sur un modèle élastique auquel on peut rajouter des transitions de formes pour décrire les plateaux. Ses points faibles sont une présupposition que l'ADN surenroulé peut être décrit par une simple partition des deux formes plectonème et solénoïde et une mauvaise description des régimes faiblement surenroulés. Par contre il décrit bien les forts surenroulements.

Le modèle de Bouchiat et Mézard repose sur un modèle purement élastique sans faire d'autres hypothèses. Il décrit très bien les faibles surenroulements pour des forces inférieures à la force de transition pour une bulle négative. Il permet une détermination du rapport C/A simplement à partir des courbes en chapeau. Comme point faible on peut dire que son domaine d'application est par conséquent limité. La valeur de la longueur de coupure qui est utilisée correspond à deux fois le pas hélical. Il semble raisonnable que cette grandeur soit une limite inférieure à un modèle qui considère la molécule comme une tige flexible.

24.3 ADN sous forte contrainte

En dehors des expériences précédentes, qui se situent dans les gammes de force et de surenroulement accessibles *in vivo*, nous avons profité de la solidité de la molécule pour explorer des régimes qui paraissent quelque peu exotiques et en tout cas jamais atteints.

Pour ces études nous avons essentiellement utilisé l'ADN de pX Δ 1 qui fait environ $5\mu\text{m}$ (il a été préparé par François Caron) et dont la proportion de molécules non nickées est très importante. L'intérêt de cette construction par rapport au λ est d'avoir à faire moins de tours pour avoir un même degré de surenroulement. Il faut un peu moins d'une seconde aux aimants pour faire un tour et comme on a été jusqu'à faire plusieurs milliers de tours en tout sur la molécule il vaut donc mieux avoir une plus petite molécule pour perdre moins de temps pendant la rotation des aimants.

Les régimes que nous explorons maintenant sont très exigeants pour la molécule. Avant d'avoir une série complète de mesures, nous avons étudié beaucoup de molécules qui se sont cassées, ou nickées, ou pour quelques unes, qui ont relaxé la totalité de leur contrainte de torsion en cédant temporairement au niveau de l'ancrage (il en résulte un glissement qui ramène la contrainte de torsion à zéro mais où la molécule reste sensible à la rotation).

Il y a une première exigence sur la torsion énorme imposée mais également sur la force. Notre système, nous l'avons vu dans la partie précédente, n'a pas la rapidité de mesure parmi ses points forts. Donc quand on étudie les très hautes forces, autour du plateau S, on doit garder la molécule sous force pendant longtemps, environ 2 secondes par point lorsqu'il ne s'agit que de faire des mesures de longueur de la molécule et pas de mesure précise de force. Ce temps fait que la probabilité de rupture des points d'ancrage augmente sérieusement dans cette gamme de force. Cet effet rend les mesures que l'on va présenter, ainsi que celle déjà vues avec la forme S, très "sportives".

24.3.1 Contrainte de surenroulement positif

Résultats Les courbes que nous avons obtenues pour les surenroulements positifs sont représentées dans la figure 57. Il ressort deux résultats de ces courbes.

- Tout d'abord, la structure qui apparaît après le plateau positif à 3pN n'a pas la même courbe de force que la forme B. Pour de faibles surenroulements positifs cet effet n'apparaissait pas, sauf dans les modulations. De plus quand on augmente le degré de surenroulement, avec des forces inférieures à 25pN la molécule se raccourcit linéairement

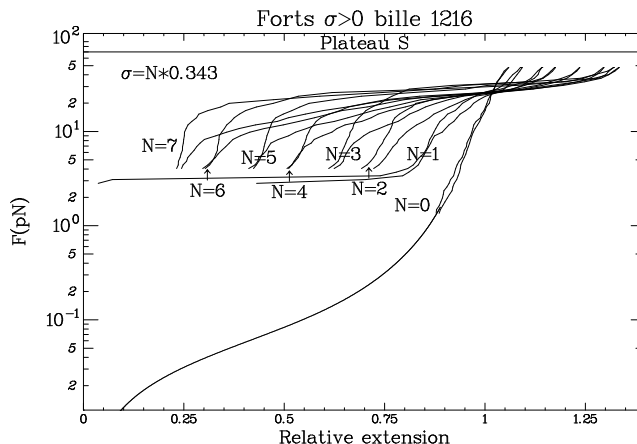


FIG. 57: Courbes de force pour de forts surenroulements positifs. Nous avons mis en évidence une nouvelle transition vers $25pN$.

avec le nombre de tours (voir figures 57 et 58). De la même manière la molécule se rallonge à peu près linéairement pour les forces voisines de $50pN$ avant la transition S.

En extrapolant la droite aux forces inférieures à $25pN$ on estime que le surenroulement relatif pour lequel cette élongation est nulle est d'environ 3. Nous avons vérifié cette valeur expérimentalement sur une autre bille que celle dont nous présentons les courbes.

- Ensuite, le résultat le plus important est qu'une nouvelle transition de longueur apparaît vers les $25pN$, force à laquelle la courbe de force intercepte celle de la forme B classique sans torsion. Il apparaît donc une nouvelle structure à une force inférieure à la force de transition vers la forme S. Cette transition vers la forme S est maintenue même si la différence de longueur que cette dernière induit est de moins en moins importante quand on augmente le nombre de tours (voir figure 68).

On en déduit donc que l'augmentation de la force de 0 à $80pN$ sur une molécule fortement surenroulée induit 3 transitions de structures. Une à environ $3pN$ de la forme B vers une forme plus surenroulée. Une autre de cette forme vers une autre forme inconnue à $25pN$. Enfin une transition faisant apparaître la forme S.

Il faut remarquer que la transition à $25pN$ s'accompagne d'une hystérésis dans les conditions que nous avons explorées.

Le comportement mécanique de l'ADN se révèle donc d'une richesse incroyable. On a pu ainsi imposer à la molécule un nombre de tours plus de trois fois supérieur à celui qu'elle possède sans contrainte!

Modélisation Essayons d'exploiter ces courbes. Pour cela notons b , x , y les proportions des trois structures qui seront notées B, X, Y. L'énergie de la molécule est donc donnée par :

$$E_{mol} = xE_X + bE_B + yE_Y$$

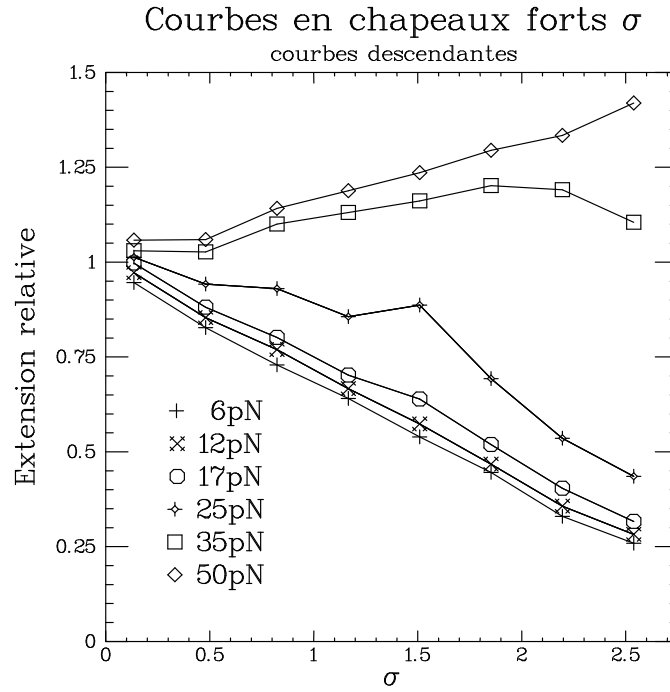


FIG. 58: Courbes en chapeau dans le domaine des forts surenroulements positifs. Les montées et les descentes sont représentées. A cause de l'hystérésis cela rajoute du bruit. En dessous du plateau à $25pN$ le raccourcissement est linéaire. La pente donne une élongation nulle vers $\sigma = +3$ ce que nous avons vérifié sur d'autres billes.

On a trivialement :

$$x + b + y = 1$$

Enfin la conservation du nombre d'enlacement s'écrit :

$$\sigma = x\sigma_X + b\sigma_B + y\sigma_Y$$

où σ_i est l'enlacement naturel de la structure i .

Quand la structure X apparaît, vers $3pN$, toute la contrainte est absorbée dans la structure X. Comme nous sommes au couple critique tous les tours rajoutés vont servir uniquement à créer la nouvelle structure. Cela signifie que pour des forces supérieures à la force critique alors $\sigma_B = 0$. La dernière relation se réécrit donc :

$$\sigma = x\sigma_X + y\sigma_Y$$

Considérons les forces inférieures à $25pN$, nous ne sommes en présence que de B et de X et donc $c = 0$. L'élongation de la molécule étant donnée par :

$$l(F) = \frac{\partial E}{\partial F}$$

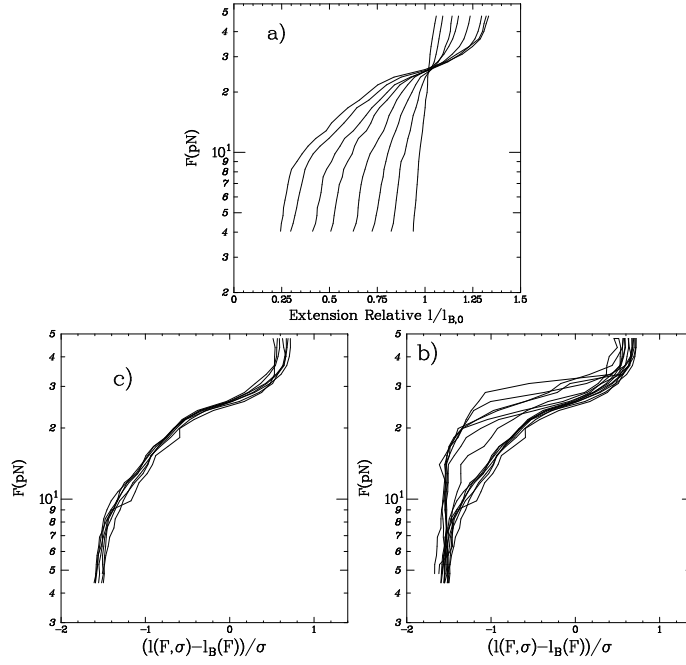


FIG. 59: Nous avons tracé, pour toutes les courbes expérimentales de la figure 57 : • en a) les points correspondant uniquement à la partie décroissante en force • en b) la fonction $\frac{l(F,\sigma)-l_B(F)}{\sigma}$ pour tous les points expérimentaux • en c) les points de b) en excluant ceux de la partie croissante en force. On peut observer en c) que toutes les courbes se ramènent à une seule sur la partie descendante de la courbe. Les différences sur les courbes de la figure b) proviennent donc essentiellement de l'hystérésis dans la partie montante.

On obtient donc en faisant l'hypothèse forte que l'énergie des structures est indépendante de σ :

$$l(F, \sigma) = \left(1 - \frac{\sigma}{\sigma_X}\right)l_B(F) + \frac{\sigma}{\sigma_X}l_X(F) \quad (13)$$

Or cette relation conduit à :

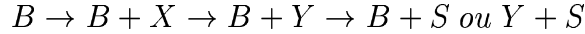
$$\frac{l(F, \sigma) - l_B(F)}{\sigma} = \frac{l_B(F) - l_X(F)}{\sigma_X}$$

Avec ces hypothèses le rapport $\frac{l(F,\sigma)-l_B(F)}{\sigma}$ est donc une fonction universelle.

On peut exécuter la même opération au dessus de $25pN$. Si la phase X disparaît pour ne laisser que la phase B et Y alors on aura également une fonction universelle. Nous devrions donc finalement avoir une fonction universelle sur toute la gamme de force, sauf éventuellement juste à la transition.

La figure 59 représente les résultats expérimentaux correspondant à ces opérations. On voit que, aux effets d'hystérésis près, toutes les courbes se ramènent bien à une seule et unique courbe ce qui valide notre hypothèse.

Avec cette analyse le résultat global des différentes transitions de structures est donc le suivant :



Hypothèse sur les formes X et Y Un aspect important de ces courbes est donc l'extension de la molécule qui tend vers 0 pour des forces inférieures à 25pN. Ce fait n'est raisonnablement explicable que par la formation de structures transverses à la molécule comme les plectonèmes. Or Marko et Siggia [Marko and Siggia, 95a] ont prévu la possibilité d'une transition de type 1^{er} ordre entre une phase plectonémique et une phase sans plectonème.

A partir de cette constatation nous avons supposé que les structures X et Y correspondent à une même structure d'ADN que nous avons nommée Pauling . Nous avons attribué la phase X à la forme Pauling avec plectonèmes et la phase Y à la forme Pauling sans plectonèmes. Nous avons donné ce nom de Pauling à cette structure car d'après les simulations de R. Lavery cette structure devrait avoir ses bases exposées à l'extérieur (voir plus loin) ce qui correspond à une forme d'ADN proposée par Pauling.

Construisons un modèle pour la transition.

Pour cela prenons un polymère décrit par le modèle du ver. Le polymère a une longueur cristallographique L , une extension que nous noterons l et comporte une proportion de plectonèmes p . Notons ϵ l'énergie gagnée par unité de longueur lorsque cette longueur forme un plectonème. Nous supposons que ces plectonèmes ne participent ensuite plus à l'élasticité.

L'énergie libre de la chaîne soumise à une force F est alors donnée par la relation :

$$\mathcal{F} = -\epsilon p L + (1 - p) L g_{M.S.}(F) + k_B T [p \log p + (1 - p) \log(1 - p)] \times \frac{L}{\xi} \quad (14)$$

$p \frac{L}{\xi}$ est le nombre de maillons de la chaîne dans la phase plectonémique. Le premier terme représente l'énergie dans la phase plectonémique, le second l'énergie élastique de la phase non plectonémique et le dernier terme est une entropie de mélange entre les deux phases.

Pour une force donnée la condition d'équilibre s'écrit :

$$\left(\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial p} \right)_{p_{eq}} = 0$$

L'extension est donnée par :

$$l = \left(\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial F} \right)_{p_{eq}} = -(1 - p_{eq}) L g'_{M.S.}$$

Pour la détermination de $g_{M.S.}$ nous avons utilisé la technique variationnelle proposée par Marko et Siggia [Marko and Siggia, 95b] :

$$g_{M.S.} = \min_a \left[\left(\frac{a\xi}{2} - f \right) \left(\coth(2a) - \frac{1}{2a} \right) \right]$$

Dans notre molécule d'ADN fortement surenroulée en utilisant l'équation 13, nous avons :

$$l(F) = \frac{\sigma}{\sigma_{Pauling}} l_{Pauling}(F) + \left(1 - \frac{\sigma}{\sigma_{Pauling}}\right) l_B(F)$$

soit

$$l(F) = l_B(F) + \frac{\sigma}{\sigma_{Pauling}} (l_{Pauling}(F) - l_B(F))$$

La courbe de force de la forme Pauling, qui comprend ses phases avec et sans plectonèmes, peut être obtenue par l'opération suivante :

$$l_{Pauling} = l_B(F) + (l(F, \sigma) - l_B(F)) \times \frac{\sigma_{Pauling}}{\sigma}$$

Pour faire cette opération nous avons du prendre une valeur de $\sigma_{Pauling}$. Comme l'extension de la molécule est nulle pour $\sigma = 3$, nous sommes sûr de n'avoir que la phase Pauling plectonémique pour cette valeur du surenroulement, si nos hypothèses sont bonnes. Les courbes expérimentales obtenues avec cette valeur pour $\sigma_{Pauling} = +3$ sont présentées sur la figure 60.

Nous avons appliqué notre modèle sur ces courbes. Le résultat est donné par la courbe en trait plein dans la figure 60 et montre un bon accord entre théorie et expériences. Les paramètres du modèle sont la longueur de persistance de la nouvelle phase, son extension relative par rapport à la forme B et l'énergie gagnée en formant un plectonème ϵ . L'ajustement que nous avons donné dans la figure correspond pour l'extension relative par rapport à la forme B à 1.75, pour ϵ à 0.53pN et pour la longueur de persistance de la forme Pauling à 19nm ce qui semble raisonnable. L'accord entre le modèle et les courbes expérimentales est donc tout à fait correct et semble confirmer nos hypothèses.

Remarques : l'effet du terme de mélange est d'augmenter la pente de la transition qui, sans cela, serait une droite horizontale. La transition $B \rightarrow B + Pauling$ est brutale et se fait avec une pente horizontale. Cela suggère que la phase B et la phase Pauling ne se mélangent pas. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pris en compte un terme de mélange avec la phase B.

En conclusion, avec un fort surenroulement positif, nous partons de la forme B avec plectonèmes. A 3pN nous passons à la forme B sans plectonèmes avec de la forme Pauling avec plectonèmes. A 25pN, pour des $\sigma < 3$, nous faisons apparaître la forme B avec de la forme Pauling sans plectonèmes. Finalement à 70pN de la forme S apparaît. Il est difficile d'en dire plus sur cette dernière transition.

Simulations numériques de R. Lavery En effectuant des simulations numériques à l'aide du programme J.U.M.N.A., avec des contraintes de torsion dans la gamme que nous venons de voir, R. Lavery a obtenu des formes d'ADN similaires à celle qui est donnée dans la figure 61. On voit que celle-ci s'éloigne sérieusement de la double hélice classique de Watson et Crick.

Les bases de la molécules sont exposées vers l'extérieur, vers la solution, alors que les squelettes sont passés à l'intérieur. Dans les simulations (sans force) des formes de ce type

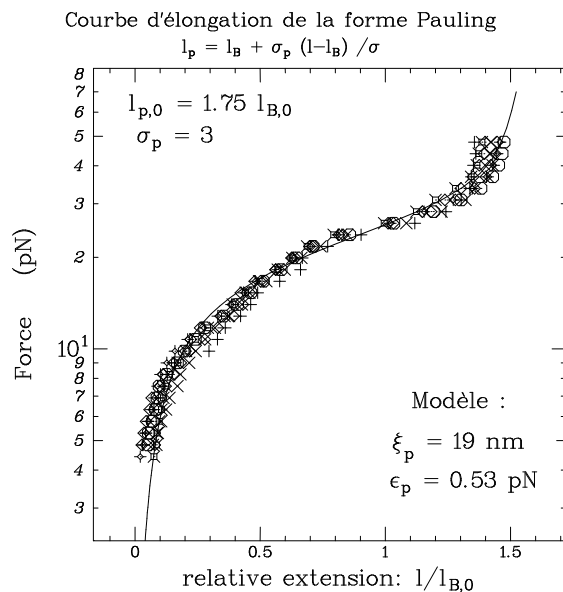


FIG. 60: Accord entre les expériences de tractions et le modèle (en trait plein) de la phase Pauling avec et sans plectonèmes. La courbe d'extension de cette forme d'ADN est obtenue à partir des données expérimentales sur lesquelles ont effectué l'opération : $l_{Pauling} = l_B(F) + (l(F, \sigma) - l_B(F)) \times \frac{\sigma_{Pauling}}{\sigma}$.

apparaissent pour des $\sigma > 1$. Ce type de structure permet évidemment d'avoir des nombres d'enlacements plus importants que dans les structures habituelles car les squelettes sont plus rapprochés. Cette forme aurait, de plus, le mérite d'expliquer une longueur plus grande pour la molécule et pourrait correspondre à la structure que nous avons notée Y précédemment. Ce modèle de molécule pour l'ADN avait été envisagé par Pauling. Nous avons appelé cet structure ADN-P pour cette raison. Elle est représentée dans la figure 61.

Avec ces structures nous pouvons expliquer l'existence de ϵ non pas seulement comme l'énergie pour former un plectonème mais également comme l'énergie pour défaire des liaisons hydrogènes entre des bases exposées de différents endroits de la molécule. Les plectonèmes dont nous avons parlé ne sont donc peut-être pas des plectonèmes classiques.

De plus ces liaisons hydrogènes qui peuvent se former expliqueraient l'hystérésis que nous observons lors de la traction.

Vérification de l'exposition des bases Nous avons procédé à une attaque biochimique au glyoxal pour vérifier l'exposition des bases. Le résultat de cette attaque est montré dans la figure 62. Comme on s'attend pour des bases exposées il y a élargissement du sommet des courbes en chapeau. De manière plus quantitative on voit que la largeur du plateau est de ~ 200 tours pour une attaque faite avec 650 tours exposés. Comme nous l'avons vu il y a 3%, donc 50 tours ici, nécessaire à la création de la phase Pauling. Donc seuls 600 tours ont été impliqué dans la création de la nouvelle phase. Celle-ci ayant un σ de +3, a donc 4

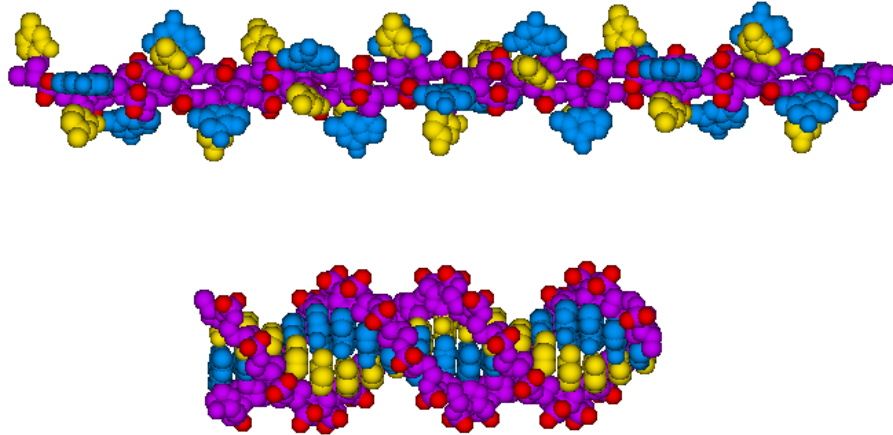


FIG. 61: Images de la structure Pauling apparaissant pour des surenroulements positifs et de la structure B classique.

fois plus de bases par tour. On s'attend donc à avoir un élargissement de $600 * 4/10.5 = 228$ tours. Il y a donc compatibilité entre le résultat obtenu et le résultat attendu.

24.3.2 Contrainte de surenroulement négatif

Nous avons pu imposer à la molécule des surenroulements négatifs importants de manière plus aisée que pour les surenroulements positifs. Nous sommes allés jusqu'à $\sigma = -5$. Cela veut dire que l'on a totalement débobiné la double hélice pour la réenrouler en sens inverse jusqu'à imposer 4 fois plus de tours à la molécule que ce qu'elle en avait au départ mais dans le sens opposé. Ceci de manière à former une double hélice gauche. Le nombre d'enlacement de cette forme à $\sigma = -5$ et le même que celui à $\sigma = +3$. Cette égalité du nombre d'enlacement des deux limites que nous avons atteintes ne nous semble être qu'une coïncidence.

Les courbes d'élongation en fonction de la force sont présentées dans la figure 63.

Contrairement aux courbes des surenroulements positifs, aucun nouvel accident visible n'apparaît sur ces courbes. Elles se déforment de manière régulière en fonction de σ . Cela est assez surprenant car si du côté des surenroulements positifs on connaît peu de structures, avec les surenroulements négatifs on s'attend à trouver au moins deux formes assez remarquables.

Tout d'abord nous avons vu qu'en tirant au dessus de 0.6pN on pouvait créer une bulle

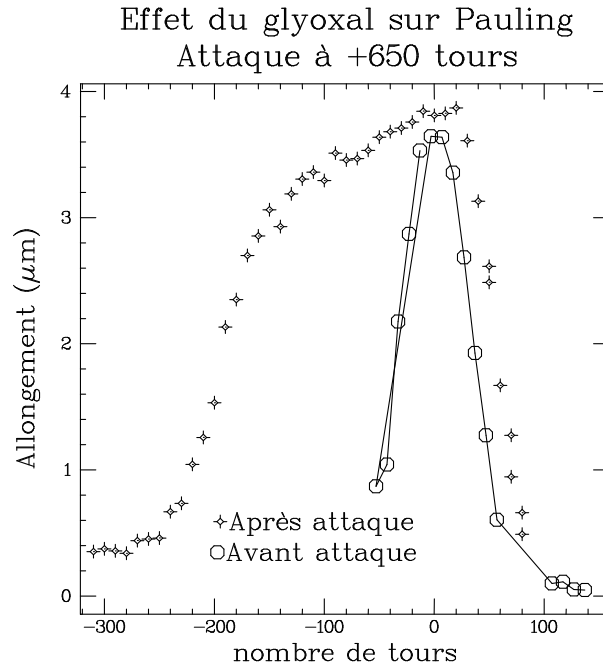


FIG. 62: Résultat de l'attaque au glyoxal sur la phase Pauling. L'élargissement du chapeau montre que cette structure à ses bases exposées. La largeur du chapeau est compatible avec un $\sigma = +3$.

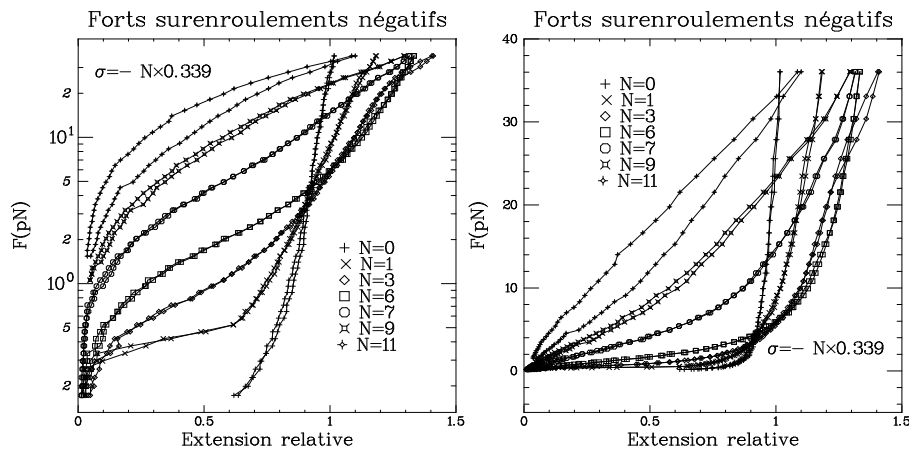


FIG. 63: Courbes de force pour des surenroulements négatifs.

de dénaturation. En tournant jusqu'à $\sigma = -1$ on devrait donc agrandir la bulle jusqu'à ce qu'elle soit aussi grande que la molécule. Cela revient à dire que cette structure correspond aux deux brins parallèles sans liaisons hydrogènes entre leurs bases.

La deuxième structure remarquable est la fameuse forme Z qui correspond grossièrement à $\sigma \sim -2.15$.

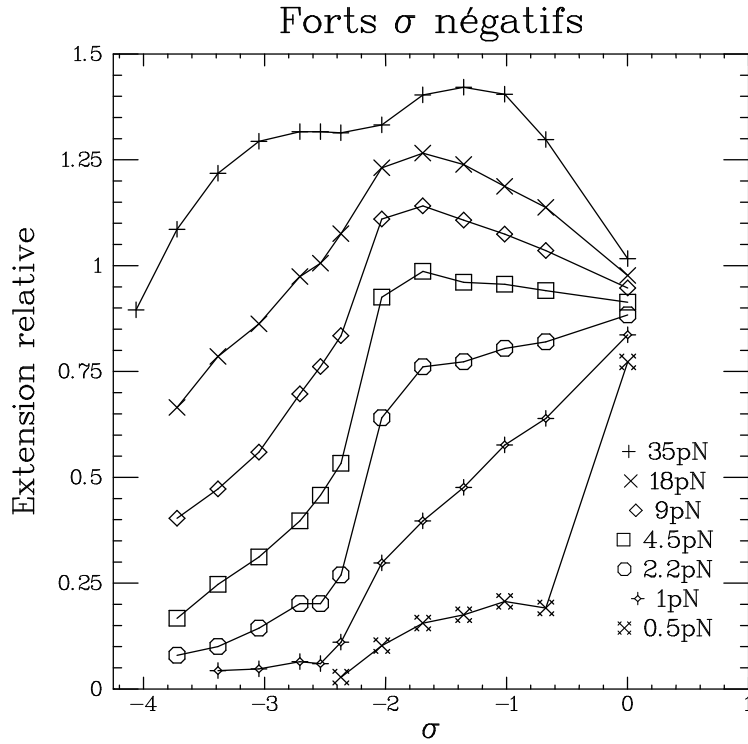


FIG. 64: Courbes en chapeau pour de forts surenroulements négatifs.

Aucun accident n'est visible dans les courbes de forces pour ces valeurs de σ . Par contre les courbes en chapeau montrent des modifications de comportement autour de ces régions.

Pour la forme Z nous n'avons aucun élément qui nous permette actuellement de prouver que nous l'avons effectivement faite apparaître par la contrainte de torsion. Les méthodes de détection de la forme Z qui seraient a priori utilisables dans notre système sont les anticorps anti-Z mais ceux-ci n'ont pas la réputation d'être totalement fiables. Nous ne les avons donc pas utilisés.

Pour ce qui est de la forme avec les brins parallèles nous avons fait une analyse similaire à celle que nous avons faite pour les surenroulements positifs. Nous supposons que nous avons une proportion de structure bulle en coexistence avec une structure B. Dans ce cas et avec la même hypothèse sur l'indépendance de chacune des structures en fonction de σ nous avons une loi pour l'élongation qui est :

$$\frac{l(F, \sigma) - l_B(F)}{\sigma} = \frac{l_B(F) - l_{Bulle}(F)}{\sigma_{Bulle}} = l_{Bulle}(F) - l_B(F) \quad (15)$$

Nous retrouvons donc une loi universelle par cette opération. Ceci est vérifié expérimentalement comme on peut le voir dans la figure 65.

Un autre point de vue consiste à dire qu'une courbe d'élongation avec $0 > \sigma > -1$ se retrouve en prenant les courbes d'élongations des deux structures pures affectées de la proportion relative des deux structures, laquelle dépend linéairement de σ . Nous avons vérifié

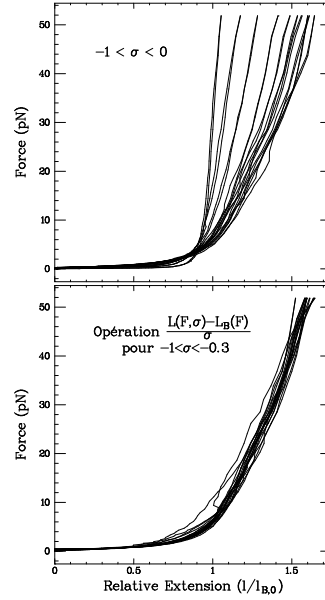


FIG. 65: Nous avons mesuré des courbes de forces pour $-1 < \sigma < 0$ et nous avons vérifié que conformément à l'équation 15 toutes les courbes se ramènent à une seule.

cette linéarité comme on peut le voir sur la figure 66. Contrairement au cas positif et comme on peut s'y attendre a priori cette loi est bien limitée jusqu'à ce que l'on ait atteint la structure brins parallèles pure.

Simulations numériques de R. Lavery Au niveau des simulations numériques R. Lavery a trouvé les mêmes comportements que pour les $\sigma > 0$ à savoir que les bases sont éjectées à l'extérieur. Il faut noter que le programme utilisé ne permet pas le retournement des sucres nécessaire au passage à la forme Z. Des images issues des simulations sont données dans la figure 67.

24.4 Fort surenroulement positif et forme S

Dans les courbes précédentes nous nous sommes arrêtés à des forces de l'ordre de 45pN. Nous n'avons pu avoir un jeu complet de courbes avec de forts surenroulements positifs en allant jusqu'à la forme S que sur une molécule. Ces données que nous n'avons pas réussi à reproduire, à cause de la fragilité relative des molécules sous de telles contraintes, sont présentées dans la figure 68. Les courbes ne sont pas très propres du fait que nous avons voulu avoir toute la courbe de force d'en dessous de 3pN jusqu'au plateau S. En faisant cela on contraint la bille et la molécules à se coller au sol par des interactions non spécifiques. Celles-ci sont responsables du bruit des courbes et probablement du raccourcissement de la molécule à haute force pour les grands surenroulements. Ces courbes restent à confirmer et nous ne les commenterons donc pas. Nous ne les donnons qu'à titre indicatif.

Ajustement de deux phases bille 1111

$L = 5.16 \mu\text{m}$ 1470tr
ref 0 at 5, ref hi at -1595

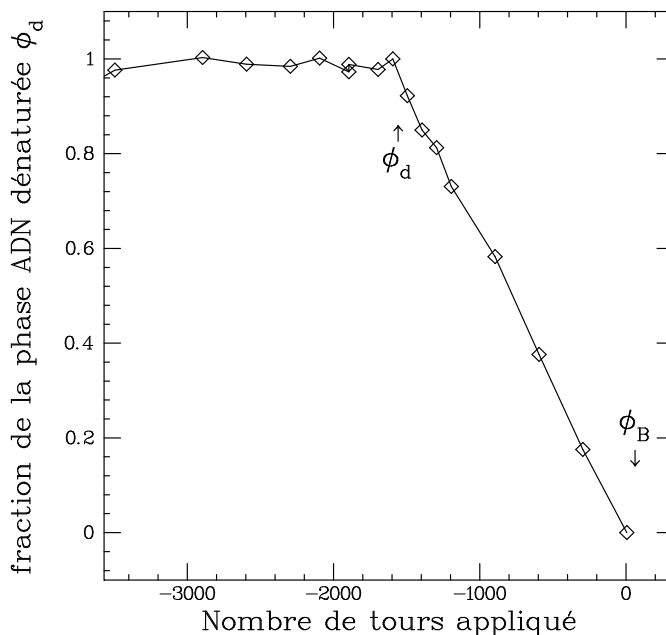


FIG. 66: Proportion de l'élasticité de la phase bulle dans une courbe d'élasticité correspondant à un $0 > \sigma > -1$. La linéarité de la courbe montre que l'équation 15 est vérifiée.

24.5 Conclusion

- Nous avons donc obtenu des courbes d'élasticité dans une gamme de surenroulement encore jamais explorée. Nous avons ainsi mis en évidence la solidité de la molécule vis à vis des contraintes de torsion ainsi que la richesse de son comportement mécanique 69.

- Pour ce qui est de la pertinence biologique de ces régimes on peut faire plusieurs remarques. Tout d'abord comme nous l'avons signalé ces régimes contiennent la région où existe l'ADN Z. Cette forme d'ADN a été l'objet de nombreuses études.

Ensuite dans la gamme $0 > \sigma > -1$ nous avons montré que la valeur de σ ne sert qu'à jouer sur la taille de la bulle de dénaturation. L'intérêt biologique d'une telle bulle est évident.

Par ailleurs certaines protéines peuvent créer des surenroulements importants (RecA en particulier permet d'obtenir des élongations de ~ 1.6 et un nombre de bases par tours de 18 au lieu de 10.5 [Cox and Lehman, 1987]).

La présence in vivo de structures avec des surenroulements aussi grands que $\sigma = 3$ ou -5 n'a cependant pas été démontrée à notre connaissance, même à un niveau local. Mais le fait que les forts surenroulements puissent exposer les bases à l'extérieur de la molécule, ce qui leur confère une bonne accessibilité est intéressant. Il est assez amusant d'ailleurs

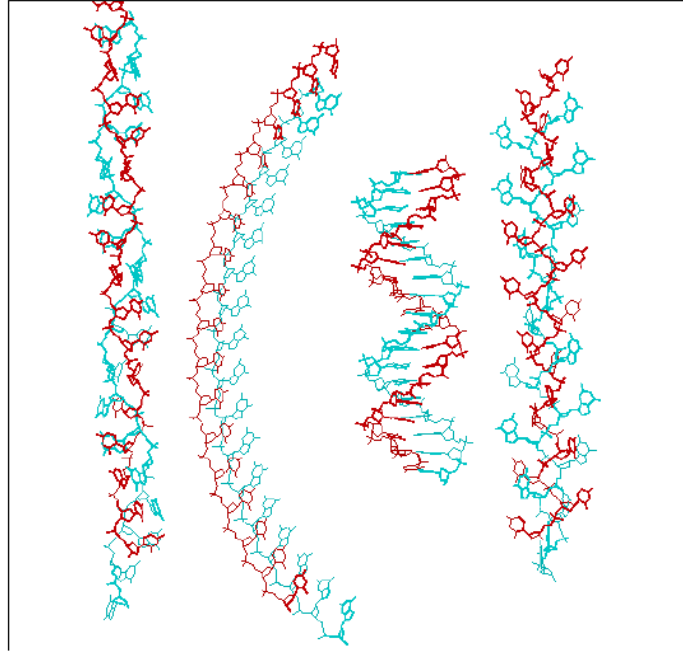


FIG. 67: Images issues des simulations numériques pour de gauche à droite $\sigma = -5, -1, 0, +5$. Pour les surenroulements extrêmes les bases sont exposées à l'extérieur de la molécule.

de retrouver là une forme d'ADN qui avait été proposée par Pauling et qui a été jetée aux oubliettes avec la découverte de Watson et Crick.

- Des expériences récentes [Yin et al., 95] ont montré que pour bloquer une polymérase durant la transcription il faut exercer une force d'environ 14pN, ce qui en fait un moteur moléculaire puissant. Or nous l'avons signalé une polymérase en phase de transcription produit du surenroulement positif devant elle. La phase Pauling n'apparaît qu'à 3pN quand le couple est suffisant (dans nos conditions ioniques). Une polymérase peut-elle générer de la structure Pauling durant la transcription ? C'est une hypothèse qui mérite réflexion.

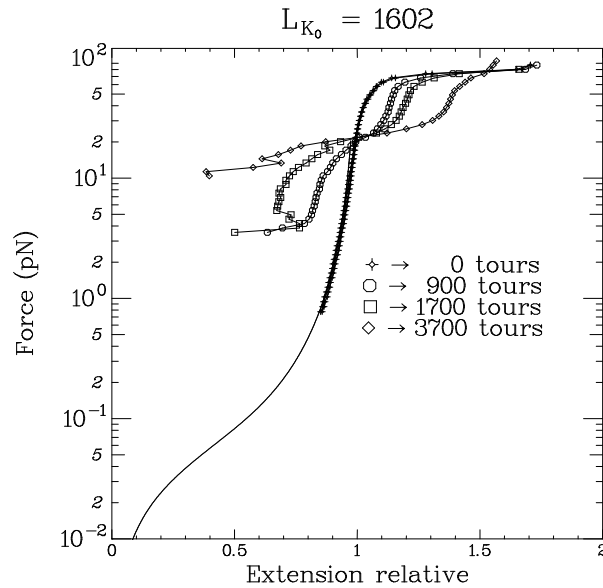


FIG. 68: Courbes de forces pour une molécule fortement surenroulée positivement et soumise à une forte tension l'amenant jusqu'à la forme S.

25 Récapitulatif : déroulement de l'expérience

Avec tous les renseignements que nous avons maintenant nous pouvons décrire le processus que nous suivons pour effectuer nos manipulations en minimisant les erreurs et le temps. Nous ne l'avons pas fait auparavant car certains résultats présentés servent à comprendre la sélection des billes intéressantes.

25.1 Protocole d'ancrage

25.1.1 Fixation de l'antidigoxygénine à la surface

La surface de verre est un tube capillaire de section $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ et de 50 mm de long. Nous faisons pénétrer par capillarité à l'intérieur de celui-ci une solution à 1% de polystyrène dans du toluène. Au bout d'une dizaine de secondes nous vidons le tube que nous séchons avec de l'argon sous pression.

Nous remplissons alors le tube avec une solution d'anticorps (polyclonal) à $5\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du tampon phosphate salin. L'incubation se fait à 37°C durant plusieurs heures.

Le tube est alors rincé et passivé. La passivation a pour but d'éviter les interactions non-spécifiques avec l'ADN et les billes que l'on mettra ensuite. La solution que nous avons adoptée utilise un mélange de savon (Tween 0.1%) et d'ADN de sperme de saumon. Le savon sert à recouvrir les parties de la surface non couvertes de protéines. L'ADN de sperme de saumon (concentration $1\text{mg}/\text{ml}$) est présent pour saturer les interactions non-spécifiques de

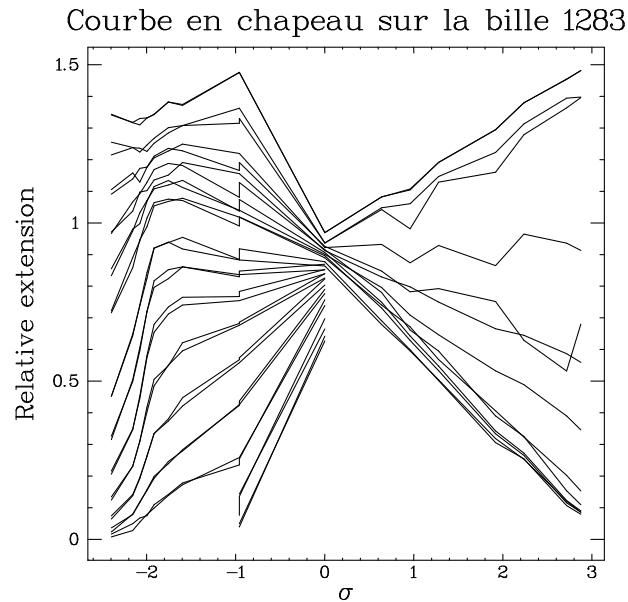


FIG. 69: Courbes en chapeau pour une unique molécule ayant subit de forts surenroulements positifs et négatifs.

l'ADN avec la surface. La surface est encore incubée plusieurs heures avec cette solution dont la base est 10mM tampon phosphate.

La construction finale que nous utiliserons sera généralement dans une solution 10mM tampon phosphate, 0.1% Tween, 0.1mg/ml ADN de sperme de saumon, et de l'azide de sodium pour éviter que la "vie" ne se développe de manière incontrôlée dans le tube.

Ces additifs servent à conserver nos échantillons plus longtemps en évitant que les interactions non-spécifiques ne nous gênent pas dans le temps. Nous avons vérifié que la présence de Tween et d'ADN de sperme de saumon ne joue pas sur les courbes que nous avons présentées.

L'intérêt des capillaires est de permettre des changements de solutions très faciles. En effet, le capillaire est relié par des tuyaux à des pots par lesquels nous faisons rentrer les billes pour qu'elles s'accrochent mais également toute solution dans laquelle nous voulons travailler.

25.1.2 Ancrage de l'ADN aux billes

Pour procéder à l'ancrage de l'ADN aux billes nous mettons en solution une des deux constructions d'ADN que nous possédons avec des billes recouvertes de streptavidine dans une solution de tampon phosphate saline.

Les billes de streptavidine (qui sont toutes superparamagnétiques) de $2.8\mu m$ sont achetées directement prêtes à l'emploi (il suffit juste de les laver). Celles de $4.5\mu m$, qui nous servent

pour exercer de grandes forces, doivent être fonctionnalisées par nos soins à partir de billes possédant des groupements tosyl en surface et de la streptavidine pure en suivant le protocole donné à cet effet par le fabricant des billes (Dynal).

L'incubation des billes avec l'ADN dure 5 minutes. Cette solution est diluée puis introduite dans le capillaire préalablement préparé et qui est monté sur le microscope (voir figure 28).

25.1.3 Construction finale

On laisse incuber toutes ces billes en l'absence d'aimants durant environ 1 heure puis on met un écoulement pour enlever les billes qui ne se sont pas fixées. L'échantillon est alors prêt pour l'étude. Il faut garder en tête que chaque échantillon possède au départ plusieurs milliers de billes et que nous n'allons en étudier qu'une à la fois.

Une bille peut être conservée plusieurs jours et un capillaire peut être réutilisé plusieurs fois et durer plusieurs semaines.

25.2 Sélection des billes accrochées par une unique molécule surenroulable

Il nous faut repérer celles qui sont attachées par des molécules surenroulables. Pour cela nous imposons un surenroulement d'environ 10%, en tout cas suffisamment grand pour que l'on soit dans une zone où les forces critiques apparaissent. Nous jouons alors avec la force. Nous passons en revue les molécules en déplaçant les aimants autour de la force critique. Pour une molécule surenroulable et uniquement dans ce cas, la modulation de la force va induire une forte transition de longueur comme nous l'avons vu précédemment. On est alors assuré d'avoir au moins une molécule surenroulable sur la bille.

Pour être sur de n'en avoir qu'une nous faisons alors une courbe en chapeau à une force inférieure à $0.6pN$. Cela nous permet de repérer la position en rotation des aimants où la molécule n'a pas de contrainte de torsion. Nous faisons alors une courbe de force pour mesurer sa longueur de persistance qui nous donne le verdict final sur le nombre de molécules ancrées à la bille.

La molécule est alors caractérisée par sa longueur, sa longueur de persistance et la rotation des aimants pour laquelle elle n'est pas contrainte en rotation. Elle est disponible pour la suite des expériences.

Cinquième partie

Conclusion

Nous avons présenté différentes expériences de manipulations de molécules d'ADN isolées.

Nous avons tout d'abord montré que l'ADN naturel peut se fixer spontanément à une surface par ses extrémités. Ce phénomène est possible sur de nombreuses surfaces. Nous avons identifié le paramètre important pour cette fixation : le pH. Nos résultats permettent donc de dire que, pour pouvoir utiliser le peignage moléculaire pour faire du diagnostic ou de la cartographie il faut utiliser des surfaces hydrophobes à un pH voisin de 5.5. Nous proposons un mécanisme pour expliquer cet accrochage spécifique des extrémités. Celui-ci reste à tester.

Dans la suite nous avons présenté une nouvelle technique de mesure de force basée sur le mouvement Brownien. Cette technique est précise, non-invasive et peut mesurer de très basses forces. Son principal inconvénient est sa lenteur.

Nous avons appliqué cette technique pour étudier l'élasticité d'une molécule isolée d'ADN contrainte en torsion. Nous avons alors mis en évidence différentes transitions de structures détectées par une forte signature dans le comportement mécanique de l'ADN. Ce dernier ce révèle donc très riche. La molécule d'ADN est extrêmement solide et nous n'avons pas pu préciser s'il existe un degré de surenroulement critique où la molécule casse.

Pour les forts degrés de surenroulement positif nous proposons l'existence d'une phase avec des bases exposées. Il nous reste à vérifier expérimentalement que cette structure à bien les bases exposées à l'extérieur.

Avec ce que nous avons pu déterminer et les renseignements apportés par les expériences de blocage d'une polymérase [Yin et al., 95] il est permis de penser que cette phase pourrait apparaître lors de la transcription.

Cette remarque nous conduit immédiatement à l'évolution logique des expériences de micro-manipulation de molécules isolées. Elle va concerner l'étude de protéines isolées sur des molécules d'ADN isolées de manière à aborder le problème complexe de l'interaction ADN-protéines avec un angle nouveau.

Les techniques sont là il reste à les mettre en œuvre.

Références

- [Alberts et al., 1989] Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, and Watson (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Garland.
- [Bauer et al., 1980] Bauer, W., Crick, F., and White, J. (1980). Supercoiled DNA. *Scient. Am.*, 243 :118–133.
- [Baumann et al., 97] Baumann, C., Smith, S., Bloomfield, V., and Bustamante, C. (97). Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 :6185–6190.
- [Bednar et al., 1994] Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E., and BatesSrich, A. (1994). The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during couterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. *J. Mol. Bio.*, 235 :825–847.
- [Belotserkovskii and Johnston, 1996] Belotserkovskii, B. P. and Johnston, B. H. (1996). Polypropylene tube surfaces may induce denaturation and multimerization of DNA. *Science*, 271 :222.
- [Benight and Wartell, 1983] Benight, A. and Wartell, R. (1983). Influence of base-pair changes and cooperativity parameters on the melting curves of short DNAs. *Biopolymers*, 22 :1409–1425.
- [Bensimon et al., 1994] Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., and Bensimon, D. (1994). Alignment and sensitive detection of DNA by moving interface. *Science*, 265 :2096–2098.
- [Bensimon et al., 1995] Bensimon, D., Simon, A., V.Croquette, and Bensimon, A. (1995). Stretching DNA with a receding meniscus : Experiments and models. *Physical Review Letters*, 74 :4754–4757.
- [Bockelmann et al., 97] Bockelmann, U., Essevaz-Roulet, B., and Heslot, F. (97). Molecular stick-slip revealed by opening DNA with piconewton force. *Physical Review Letters*, page in press.
- [Bouchiat, 1996] Bouchiat, C. (1996). Comments on the worm like chain model.
- [Bouchiat and Mézard, 97] Bouchiat, C. and Mézard, M. (97). Elasticity theory of a supercoiled DNA molecule. *submitted to P.R.L.*
- [Brochard-Wyart, 1995] Brochard-Wyart, F. (1995). *Europhysics Letters*, 30 :387.
- [Bustamante et al., 1994] Bustamante, C., Marko, J., Siggia, E., and Smith, S. (1994). Entropic elasticity of λ -phage DNA. *Science*, 265 :1599–1600.
- [Carlsson et al., 1995] Carlsson, C., Jonsson, M., and Akerman, B. (1995). Double bands in DNA gel electrophoresis caused by bis-intercalating dyes. *Nucleic Acid Research*, 23 :2413–2420.
- [Cluzel, 1996] Cluzel, P. (1996). *L'ADN une molécule extensible*. PhD thesis, Universit Pierre et Marie Curie.
- [Cluzel et al., 1996] Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.-L., Chatenay, D., and Caron, F. (1996). DNA : an extensible molecule. *Science*, 271 :792–794.

- [Cox and Lehman, 1987] Cox, M. and Lehman, I. (1987). *Ann. Rev. Biochem.*, 56 :229.
- [Crothers et al., 1992] Crothers, D., Drak, J., Khan, J., and Levene, S. (1992). *Methods in Enzymology*, 212 :3.
- [Einstein,] Einstein, A. *A. Einstein PhD : investigation of the Brownian theory of mouvement.* Dover Publication.
- [Funatsu et al., 1995] Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., and Yanagida, T. (1995). Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, 374 :555–559.
- [Happel and Brenner, 1991] Happel, J. and Brenner, H. (1991). *Low Reynolds Number Hydrodynamics.* Kluwer Academic.
- [Jackson, 1962] Jackson, J. (1962). *Classical Electrodynamics.* Wiley.
- [Kornberg and Baker, 1992] Kornberg, A. and Baker, T. (1992). *DNA replication.* Freeman.
- [Landau and Lifchitz, 1971] Landau, L. and Lifchitz, E. (1971). *Mcanique des fluides.* Mir.
- [Liu and Wang, 1987] Liu, L. and Wang, J. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :7024–7027.
- [Manneville et al., 1996] Manneville, S., Cluzel, P., Viovy, J., Chatenay, D., and Caron, F. (1996). Evidence for universal scaling behavior of a freely relaxing DNA molecule. *Europhysics Letters.*
- [Marko and Siggia, 95a] Marko, J. and Siggia, E. (95a). Statistical mechanics of supercoiled DNA. *Physical Review E*, 52(3) :2912–2938.
- [Marko and Siggia, 95b] Marko, J. and Siggia, E. (95b). Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26) :8759–8770.
- [Meng et al., 1995] Meng, X., Benson, K., K.Chada, Huff, E., and Schwartz, D. (1995). Optical mapping of lambda bacteriophage clones using restriction endonucleases. *Nature Genetics*, 9 :432–438.
- [Michalet et al., 1997] Michalet, X., Ekong, R., Fougèrouse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Povey, S., Beckmann, J., and Bensimon, A. (1997). High resolution genomic studies on combed molecular genomic dna. *Science*, in press.
- [Murchie et al., 92] Murchie, A., Bowater, R., Aboul-ela, F., and Lilley, D. (92). Helix opening transitions in supercoiled DNA. *Biochimica and Biophysica Acta*, (1131) :1–15.
- [Palacek et al., 87] Palacek, E., Boublikova, P., Nejedly, K., Galazka, G., and Klysik, J. (87). B-Z junctions in supercoiled pRW751 DNA contain unpaired or non-watson-crick base pairs. *Journal of biomolecular structure and dynamics*, 5 :297–306.
- [Palecek, 1991] Palecek, E. (1991). Local supercoil-stabilized structures. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26 :151–226.
- [Perkins et al., 1994a] Perkins, T., Quake, S., Smith, D., and Chu, S. (1994a). Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*, 264 :822–826.
- [Perkins et al., 1994b] Perkins, T., Smith, D., and Chu, S. (1994b). Direct observation of tube-like motion of a single plymer chain. *Science*, 264 :819–822.

- [Roellinger, 1994] Roellinger, O. (1994). *Le livre d'Olivier Roellinger*. Les ditions du Rouergue.
- [Saenger, 1988] Saenger, W. (1988). *Principle of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag.
- [Schlick and Olson, 1992] Schlick, T. and Olson, W. (1992). Supercoiled DNA energetics and dynamics by computer simulation. *J. Mol. Biol.*, 223 :1089–1119.
- [Smith et al., 1996] Smith, S., Cui, Y., and Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271 :795–799.
- [Smith et al., 1992] Smith, S., Finzi, L., and Bustamante, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258 :1122–1126.
- [Spudich, 1994] Spudich, J. A. (1994). How molecular motors work. *Nature*, 372 :515–518.
- [Stein et al., 1995] Stein, V. M., Bond, J. P., Capp, M. W., Anderson, C. F., and Jr, M. R. (1995). Importance of coulombic end effects on cation accumulation near oligonucleotide B-DNA using Na NMR. *Biophysical Journal*, 68 :1063–1071.
- [Strick et al., 1997] Strick, T., Allemand, J., Bensimon, D., Bensimon, A., and Croquette, V. (1997). to appear. *Biophysical Journal*.
- [Taylor and Hagerman, 1990] Taylor, W. and Hagerman, P. (1990). *Journal of Molecular Biology*, 212 :363.
- [Tskhovrebova et al., 97] Tskhovrebova, L., Trinic, J., Sleep, J., and Simmons, R. (97). Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*, 387 :308–312.
- [Vologodskii et al., 1992] Vologodskii, A., Levene, S., Klenin, K., Frank-Kamenetskii, M., and Cozzarelli, N. (1992). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.*, 227 :1224–1243.
- [Vologodskii et al., 1979] Vologodskii, A., Lukashin, A., and Frank-Kamenetskii, M. (1979). Fluctuations in superhelical DNA. *Nucleic Acid Research*, 6(3) :967.
- [Vologodskii and Marko, 1997] Vologodskii, A. and Marko, J. (1997). Extension of torsionally stressed DNA by external force. *Biophysical Journal*, 73 :123–132.
- [Wang et al., 97] Wang, M., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., and Block, S. (97). Stretching DNA with optical tweezers. *Biophysical Journal*, 72 :1335–1346.
- [Watson and Crick, 1953] Watson, J. and Crick, F. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171 :737–.
- [Weier et al., 1995] Weier, H.-U. G., Wang, M., Mullikin, J., Zhu, Y., Cheng, J.-F., Greulich, K., Bensimon, A., and Gray, J. (1995). Quantitative DNA fiber mapping. *Human Molecular Genetics*, 4 :1903–1910.
- [Yin et al., 95] Yin, H., Wang, M., Svoboda, K., Landick, R., Block, S., and Gelles, J. (95). Transcription against a applied force. *Science*, 270 :1653–1657.
- [Yokota et al., 1997] Yokota, H., Johnson, F., H. Lu, R. M. R., Belu, A., Garrison, M., Ratner, B., Trask, B., and Miller, D. (1997). A new method for straightening DNA molecules for optical restriction mapping. *Nucleic Acids Research*, 25 :1064–1070.