

# Une nouvelle structure de la molécule d'ADN induite par une contrainte de torsion

V. CROQUETTE<sup>†</sup>, J.-F. ALLEMAND<sup>†</sup>, T. STRICK<sup>†</sup>, S. KOMILIKIS<sup>†</sup>,  
R. LAVERY<sup>•</sup> et D. BENSIMON<sup>†</sup>

<sup>†</sup> LPS, ENS, URA D 1306 CNRS, associé aux universités Paris VI et Paris VII  
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>•</sup> Laboratoire de Biochimie Théorique, UPR 9080 CNRS,  
Institut de Biologie Physico-Chimique,  
13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France.

## Résumé

Nous décrivons des expériences d'élasticité réalisées sur une molécule d'ADN. En utilisant de simple aimants et en attachant à l'extrémité de la molécule une microbille magnétique, nous pouvons réaliser des contraintes d'étirement et de torsion jamais atteintes à ce jour. Nous mesurons la force de traction sur cette molécule grâce à une technique basée sur l'analyse des fluctuations browniennes de la bille. Nous montrons que la structure en double hélice de l'ADN est très sensible à la contrainte de torsion que nous lui appliquons : lorsque nous déroulons la double hélice, nous observons qu'au-delà d'un seuil faible en torsion, l'ADN adopte localement une structure particulière bien connue, il se dénature ; de même, quand nous surenroulons la double hélice au delà d'une valeur seuil, nos mesures révèlent la coexistence d'ADN-B avec une structure d'ADN inconnue à ce jour. Des modélisations numériques permettent de dire que cette nouvelle structure est très semblable à celle qu'avait proposé PAULING [1] avant que CRICK et WATSON ne décrivent la double hélice de l'ADN-B [2].

## 1 Introduction

Nous présentons ici des expériences de micromanipulation sur une molécule d'ADN, qui nous permettent de mettre en évidence l'apparition d'une nouvelle structure au sein de la molécule lorsqu'une contrainte de torsion est appliquée à la double hélice. Afin d'effectuer les mesures de force nécessaires, nous avons mis au point une nouvelle technique basée sur le mouvement brownien. C'est durant les expériences du cours d'hydrodynamique que Pierre BERGÉ réalisa à l'école de Physique et Chimie de Paris en 1978, que l'un d'entre nous (V. CROQUETTE) découvrit ce phénomène du mouvement brownien. Pierre BERGÉ avait apporté en cours un appareillage impressionnant : un laser, un photomultiplicateur et des solutions de billes de latex dont il nous montra les fluctuations par la technique de diffusion de la lumière. Sa présentation des relations d'EINSTEIN fut un temps fort de ce cours et leur illustration

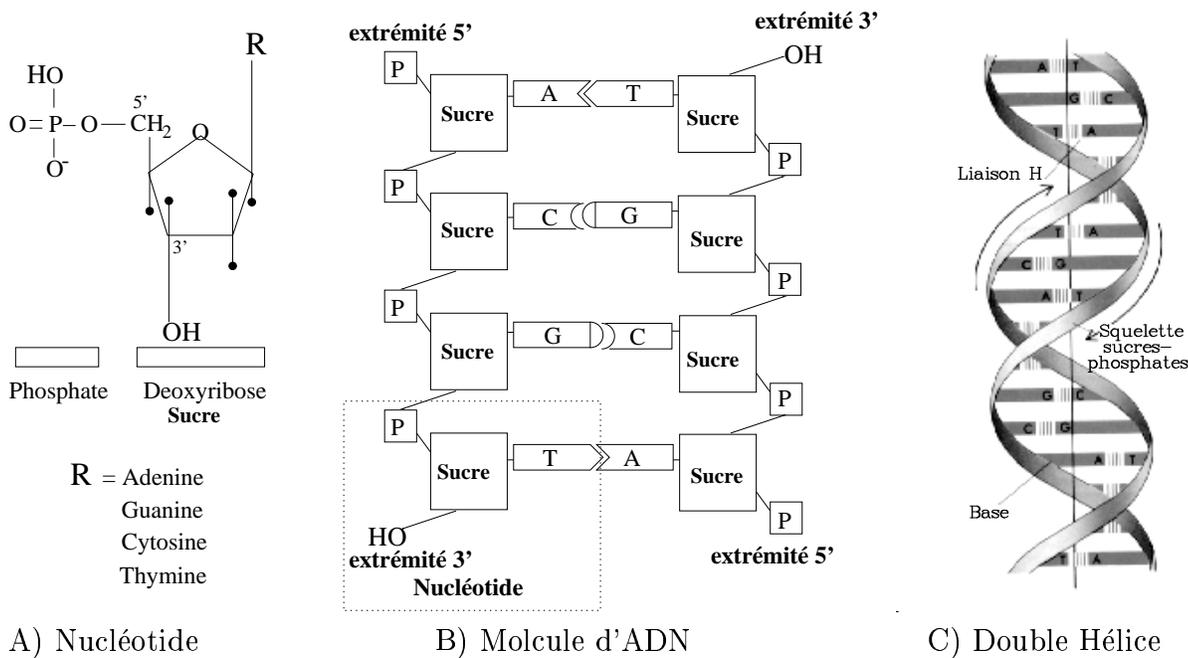


FIG. 1: La constitution chimique de la molécule d'ADN est celle d'un polymère. a) Le monomère de base est constitué par l'association d'un groupement phosphate et d'un sucre auquel vient s'attacher une des quatre bases (A,C,G,T). Cet ensemble forme un nucléotide. b) Le polymère est constitué par l'enchaînement de nucléotides dont les groupes phosphate et sucre peuvent être vus comme le montant d'une échelle tandis que les paires de bases forment les échelons. La très forte affinité des bases A pour les bases T et G pour C conduit à l'association de deux polymères ayant des bases complémentaires. c) Les deux brins d'ADN complémentaires forment une structure spatiale en double hélice qui permet aux bases de s'empiler les unes sur les autres en restant associées par paire.

expérimentale les rendit simples et inoubliables. Lors de ce cours passionnant, il décrit également la façon de mesurer la vitesse de déplacement des spermatozoïdes vivants et le moyen de distinguer ce déplacement de leur mouvement brownien. Ces expériences de cours ont joué un rôle déterminant dans la méthode de mesure que nous décrivons ici. Comme nous le verrons, cette méthode est extrêmement simple, et aurait donc certainement séduit Pierre BERGÉ.

## 2 La molécule d'ADN

La molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) possède une structure à plusieurs niveaux. C'est d'abord un polymère constitué par une alternance de groupes sucres et phosphates lié de façon covalente qui forme une longue chaîne. Sur chaque groupe "sucre" est attaché l'un des nucléotides suivants l'*adénine* (A), la *cytosine* (C), la *guanine* (G) et la *thymine* (T) que l'on nomme les bases de l'ADN. Celles-ci sont formées de cycles, elles sont plates comme

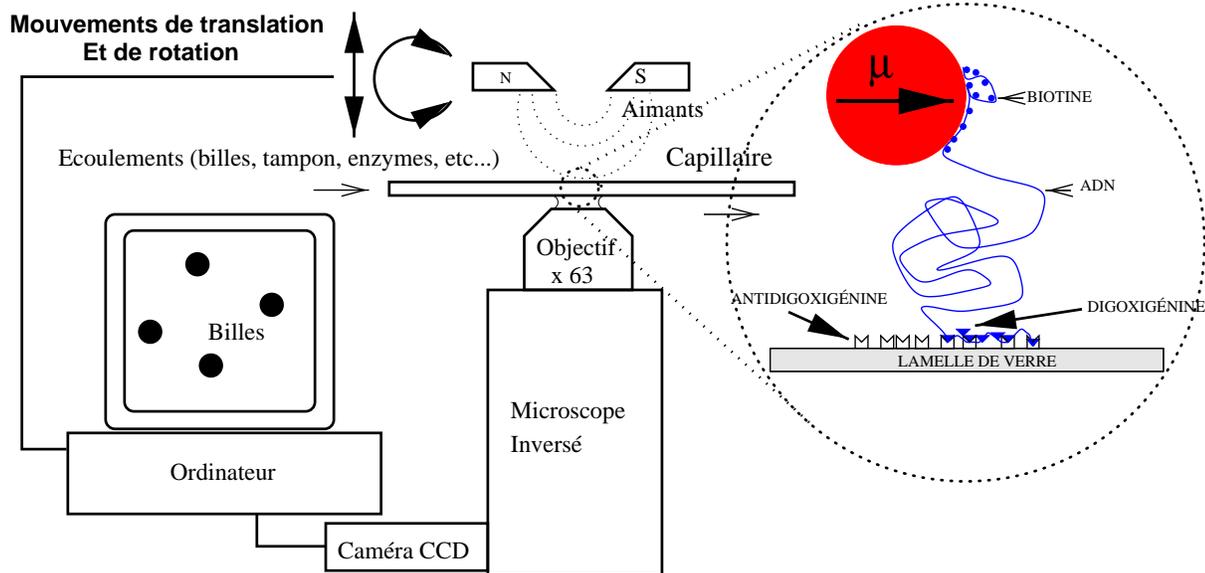
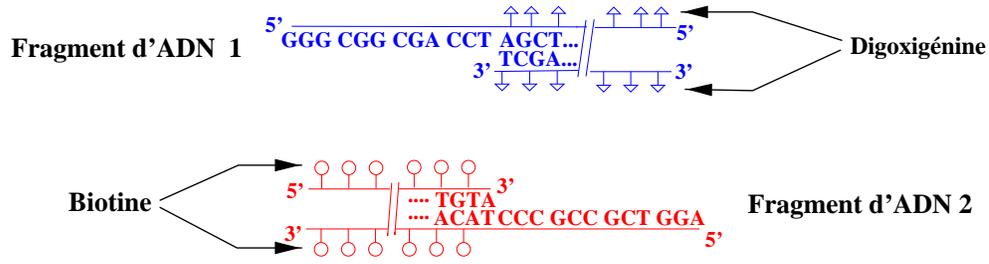


FIG. 2: Principe de l'expérience : a) les molécules d'ADN sont introduites dans un capillaire disposé sur un microscope inversé. Des aimants réglables en hauteur et pouvant tourner sur eux-mêmes permettent d'appliquer une contrainte de traction et de torsion sur la molécule par l'intermédiaire d'une microbille magnétique. Une caméra CCD reliée à un ordinateur enregistre les déplacements de la bille. b) L'ADN est fixé à la bille recouverte de streptavidine par son extrémité biotinilée et à la surface recouverte d'*antidigoxigénine* par son autre extrémité traitée à la *digoxigénine*.

une molécule de benzène. Nous venons de décrire un ADN simple brin, dans nos cellules, notre code génétique est constitué d'ADN double brin où deux molécules simple brin sont accolées par leurs bases. En effet, celles-ci ont la particularité de s'associer spécifiquement par liaison-hydrogène. Ainsi l'*adénine* forme avec la *thymine* deux liaisons hydrogène tandis que la *cytosine* forme trois liaisons avec la *guanine*. On représente souvent l'ADN double brin comme une échelle dont les montants sont constitués des squelettes phosphodiester et les échelons sont des paires de bases complémentaires (AT), (GC). C'est la fameuse double hélice de WATSON et CRICK, encore appelée l'ADN-B [2].

La structure de la molécule est liée à la très forte interaction qui existe entre les bases : celles-ci sont hydrophobes et comme elles sont plates, elles préfèrent s'empiler les unes sur les autres comme des assiettes afin de minimiser leur surface de contact avec l'eau. L'épaisseur de l'assiette est de 3.4 Å, la distance qui sépare deux points d'attache successifs sur le squelette phosphodiester est d'environ de 7 Å. Dans la double hélice, les squelettes phosphodiester sont donc fortement inclinés, les 7 Å se projettent ainsi en 3.4 Å au prix d'une rotation d'environ 36° entre paires de bases successives.

## 1) Fabrication de molécules d'ADN marquées (par UV ou PCR)



## 2) Accrochage sélectif des fragments à l'ADN du phage $\lambda$

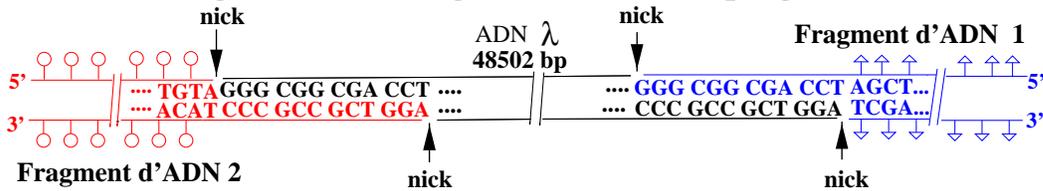


FIG. 3: Pour attraper une molécule d'ADN par les deux extrémités, on utilise des couples de molécules qui s'associent par le principe *clef serrure* que l'on attache à une molécule d'ADN grâce à la spécificité du code génétique. On greffe de la *biotine* à un petit morceau d'ADN que l'on synthétise avec un code complémentaire de la molécule que l'on se propose d'utiliser. On répète la même opération avec de la *digoxigénine* à l'autre extrémité. En mettant ces différentes molécules en présence, on obtient une molécule présentant de la *biotine* à son extrémité gauche et de la *digoxigénine* à son extrémité droite. A ce stade, la molécule présente quatre coupures simple brin : des *nicks* qu'il faut éliminer grâce à une enzyme la *ligase*.

## 3 Comment attraper une molécule d'ADN par les deux bouts

Pour réaliser des expériences d'élasticité sur une molécule d'ADN, il faut pouvoir différencier ses extrémités, en attacher une sur une surface de verre tandis que l'autre est accrochée à une microbille. Nous réalisons ainsi un Jokari moléculaire. L'utilisation d'une bille magnétique, permet d'exercer une force sur la molécule en appliquant un gradient de champ magnétique sur la bille grâce à des aimants placés au voisinage du Jokari. La figure 2 donne le schéma de principe de l'expérience. Les échelles des différents composants n'étant pas respectées; en effet, le diamètre de la bille est de l'ordre de  $3\mu m$  tandis que les aimants font quelques *mm*.

Afin d'accrocher chacune des extrémités de la molécule à un substrat différent, nous utilisons un processus biochimique très classique : le système clef-serrure. Dans nos cellules, les assemblages supramoléculaires sont réalisés par des combinaisons de deux molécules ayant une très grande affinité sélective. La *biotine*, par exemple, (plus connue sous le nom de vitamine H) est une petite molécule (une clef) qui peut se loger dans une poche (serrure) d'une protéine nommée la *streptavidine*. Lorsque cette clef est placée dans cette serrure, elle y est maintenue par un très grand nombre de liaisons hydrogène dont l'association produit

une liaison presque aussi solide qu'une liaison covalente.

Pour attraper l'une des extrémités de la molécule d'ADN nous utilisons le code génétique de celle-ci : il est en fait possible de couper une molécule d'ADN de façon dissymétrique par rapport aux deux brins. Il apparaît ainsi à l'extrémité de la molécule un morceau d'ADN simple brin de quelques bases qui présente une affinité spécifique pour un autre morceau d'ADN simple brin dont le code génétique est complémentaire (voir (Fig.3)). Or, on sait synthétiser de petites molécules d'ADN simple brin de quelques dizaines de bases dont l'une est modifiée chimiquement : on lui a accroché une molécule de *biotine*. Ainsi en mélangeant en solution des molécules d'ADN convenablement coupées et de petites molécules simple brin, on peut accrocher une molécule de *biotine* à l'une des extrémités d'une molécule d'ADN. À ce stade, cet accrochage n'est réalisé que par les liaisons hydrogène entre bases d'ADN complémentaires, et ne résisterait pas à une élévation de température. Pour le renforcer, nous utilisons une enzyme, la *ligase*, qui est capable de reformer la continuité des liens phosphodiester entre ADN simple brin et double brin.

Une molécule d'ADN ainsi préparée viendra spontanément se lier, en solution, à la surface d'une bille magnétique recouverte de *streptavidine*. En utilisant un deuxième système clef-serrure, à savoir le couple *digoxigénine/antidigoxigénine*, nous pouvons réaliser un accrochage spécifique de la deuxième extrémité de la molécule sur une surface de verre recouverte d'*antidigoxigénine*.

La partie la plus délicate de l'opération d'accrochage est celle de la préparation de la molécule d'ADN dont une extrémité est solidaire d'une *biotine* tandis que la seconde est couverte de *digoxigénine*. En fait, nous avons préparé des molécules d'ADN qui présentent plusieurs *biotines* et plusieurs *digoxigénines*. L'accrochage de chaque extrémité se fait ainsi en plusieurs points, ce qui le rend plus solide mais surtout interdit toute rotation autour des points d'attache, nous permettant ainsi de tordre la molécule. Pour préparer un échantillon, nous absorbons de l'*antidigoxigénine* sur les parois d'un capillaire, nous y injectons alors une solution de molécules d'ADN attachées à des billes magnétiques recouvertes de *streptavidine* et nous laissons incuber. Le Jokari moléculaire se fabrique spontanément. Nous avons choisi des concentrations d'ADN et de billes telles qu'en moyenne, il y ait une molécule d'ADN par bille ; cependant, nous n'avons aucun moyen d'empêcher que plusieurs molécules s'accrochent à la même bille. Nous devons donc déterminer *a posteriori* le nombre de molécules attachées à une bille. Pour cela, nous mesurons la force qu'il faut développer pour écarter la bille de la surface du capillaire, cette force étant minimum quand une seule molécule est impliquée dans la liaison. Nous allons maintenant décrire la méthode de mesure de force que nous utilisons.

## 4 Mesurer la force d'étirement d'une molécule d'ADN

Précisons d'abord l'ordre de grandeur des forces mises en jeu à l'échelle d'une molécule. Évaluons par exemple, la force nécessaire pour casser une liaison covalente : l'énergie correspondante est de l'ordre de l' $eV$  soit  $1.6 \times 10^{-19} J$ , et les distances mises en jeu dans une telle liaison sont de l'ordre de l' $\text{Å}$ , la force de rupture de la molécule est donc de l'ordre de  $10^{-9} N$ . Une autre échelle d'énergie est donnée par l'agitation thermique,  $k_B T = 4.21 \times 10^{-21} J$  ; sur une distance de quelques  $\text{Å}$ , nous obtenons cette fois une force de quelques picoNewtons qui est typiquement la force qu'il faut développer pour étirer une molécule d'ADN. C'est aussi

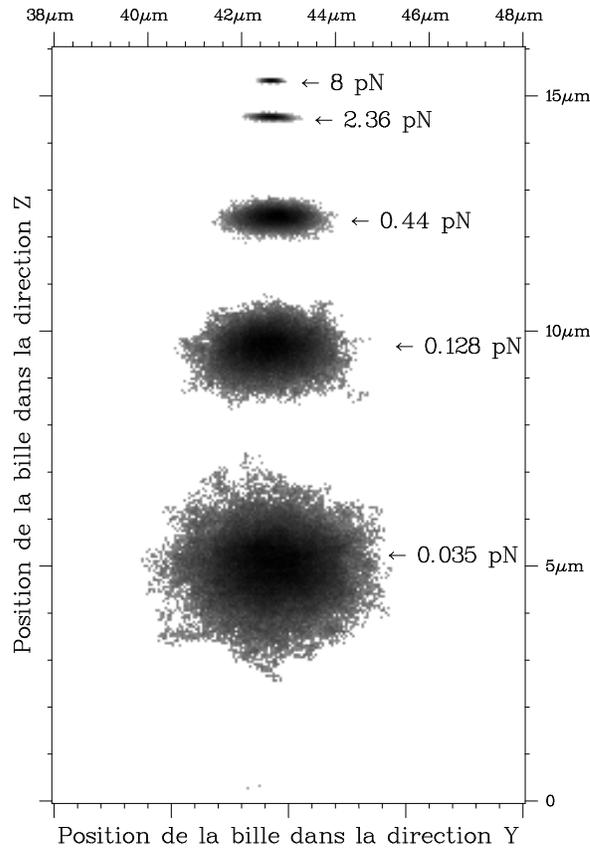


FIG. 4: Enregistrement du mouvement brownien d'une bille de  $2.8 \mu m$  de diamètre pour différentes forces appliquées. En rapprochant les aimants de la bille on augmente la force de traction sur la bille, plus celle-ci est grande, plus la molécule s'allonge, et plus le mouvement brownien est restreint.

une force extrêmement petite qu'il n'est pas facile de détecter avec les dispositifs de mesure classiques. Nous avons mis au point une technique de mesure de force bien adaptée à cette gamme de force qui s'inspire largement de la méthode proposée par Einstein [3] pour mesurer la raideur d'un ressort.

En effet, lorsque nous appliquons une force sur la bille magnétique grâce à un gradient de champ, la molécule étirée et la bille forment un minuscule pendule. La bille est animée d'un mouvement brownien, lié à l'agitation des molécules d'eau qui l'entourent. Le petit pendule magnétique est ainsi perturbé par une force aléatoire qui l'écarte de sa position d'équilibre vers laquelle il est ramené par la force de traction exercée par l'ADN. Le petit pendule magnétique possède une raideur  $k$  qui, dans la limite des petits mouvements, s'écrit simplement  $k = F/l$  (où  $F$  est la force de traction et  $l$  l'extension de la molécule). L'équipartition de l'énergie nous permet d'écrire que  $(1/2)k\langle\delta x\rangle^2 = (1/2)k_B T$ , où  $k$  est la raideur et  $\delta x$  est l'écart de la bille par rapport à sa position l'équilibre dans la direction  $x$  perpendiculaire à la force  $\vec{F}$ . En explicitant l'expression de la raideur  $k = F/l$ , nous pouvons écrire

que  $F = k_B T l / \langle \delta x \rangle^2$ . Pour mesurer la force de traction sur la molécule d'ADN, il suffit de déterminer l'allongement  $l$  de la molécule et  $\langle \delta x \rangle^2$ , les fluctuations quadratiques moyennes. Pour mesurer ces fluctuations, il faut suivre les déplacements de la bille pendant un certain temps, comme le fit Jean PERRIN. Nous avons mis au point un programme informatique qui analyse en temps réel l'image vidéo de la bille observée au microscope et détermine ses déplacements avec une précision de  $10nm$ . En fait, ce programme permet d'enregistrer les déplacements de la bille dans les trois directions de l'espace et ce, pendant plusieurs heures si besoin est. La très grande résolution dans la mesure des déplacements de la bille est obtenue par une technique de corrélation d'image qui permet une excellente interpolation [4]. Cette mesure de force présente certains avantages :

- elle est automatiquement calibrée en force, dès lors que les déplacements de la bille sont mesurés.
- elle ne nécessite pas de contact avec la bille, l'image vidéo de la bille étant suffisant. C'est donc une mesure non invasive.
- elle a une très grande sensibilité, d'autant plus grande que la force de traction sur la molécule est petite. Nous pouvons ainsi mesurer des forces de 10 femtoNewtons avec une précision de 10 %.
- elle a une très grande dynamique de mesure : en effet, comme la détermination de  $\delta x$  se fait sur une gamme de deux ou trois décades (du  $\mu m$  au  $nm$ ) et que la force est inversement proportionnelle au carré de  $\delta x$ , la gamme de force s'étend elle sur cinq décades, de la dizaine de femtoNewtons à la centaine de picoNewtons.

Elle a néanmoins un défaut majeur : son manque de rapidité. Pour avoir une mesure précise, il faut accumuler suffisamment de fluctuations pour obtenir une bonne statistique. La mesure d'une force de  $1pN$  nécessite une minute d'acquisition, la mesure d'une dizaine de femtoNewtons demande d'attendre une heure et demie.

#### 4.1 Mesure d'élasticité d'une molécule d'ADN

Comme nous l'avons dit, nous devons vérifier que la bille que nous décidons d'étudier, n'est reliée à la surface du capillaire que par une seule molécule. Pour cela, nous mesurons la courbe d'élasticité correspondant à la molécule en faisant varier la force appliquée sur celle-ci et en déterminant son allongement. Un aimant associé à des pièces polaires permet de créer un gradient de champ magnétique intense. La distance des pièces polaires à la bille est pilotée par une platine motorisée, ce qui permet d'ajuster la force dans une large gamme : celle-ci varie dans un rapport 1/1000 en écartant les pièces polaires de  $10mm$ . La relation entre la distance des pièces polaires à la bille et la force appliquée est non-linéaire mais elle est univoque, ne présente pas d'hystérésis, et varie peu d'une bille à l'autre. En faisant varier la force depuis quelques dizaines de femtoNewtons à quelques picoNewtons, l'extension de la molécule varie depuis une valeur presque nulle jusqu'à une extension quasi totale de la molécule (c'est-à-dire la longueur cristallographique).

La courbe force/extension d'une molécule d'ADN est très bien décrite par le modèle du ver (Worm Like Chain en anglais) [5, 6] pour lequel on peut écrire une formule approchée très précise [7]. Cette courbe dépend de deux paramètres : la longueur cristallographique  $L_0$  de la

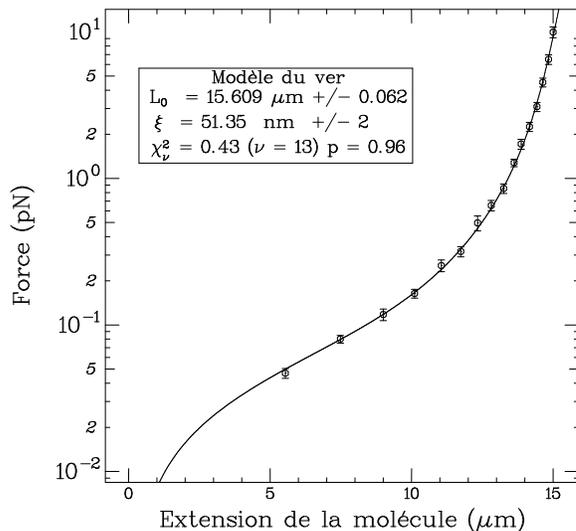


FIG. 5: Courbe de force correspondant aux fluctuations browniennes de la figure 4 (avec les barres d'erreur). En trait plein, courbe théorique du modèle du ver ajustant au mieux les points expérimentaux.

molécule et la longueur de persistance  $\xi$  du polymère. Cette dernière correspond à la longueur du polymère qu'il faut atteindre pour que ses fluctuations thermiques de courbure aient une énergie moyenne de  $k_B T$ . Pour la structure ADN-B dans des conditions ioniques de 10 mM de tampon phosphate,  $\xi$  vaut  $50\text{nm}$  [11]. Comme la longueur de la molécule d'ADN que nous étudions est connue, il est facile de prédire exactement l'allure de la courbe force/extension et de la comparer aux résultats expérimentaux. L'accord est très bon, comme on peut le voir sur la courbe de la figure 5. Si deux molécules relient la même bille à la surface de verre, nous obtenons une courbe deux fois plus raide, facile à identifier. La courbe force/extension nous permet donc aisément de garantir que nous étudions une molécule unique; elle nous permet également de calibrer la relation entre la distance des aimants à la bille et la force exercée, ce qui accélère les mesures ultérieures sur la même molécule.

Lorsque la force de traction sur la molécule d'ADN est augmentée au delà de 10 pN, les liaisons chimiques se déforment d'abord faiblement puis une transition brutale apparaît pour une force  $\approx 70$  pN : la molécule devient presque deux fois plus longue [8, 9]. Cette transition correspond à l'apparition d'une nouvelle phase de la molécule : l'ADN-S dont deux structures possibles ont été proposées [10].

## 5 L'élasticité d'une molécule d'ADN soumise à une contrainte de torsion

Jusqu'à présent nous n'avons pas envisagé la possibilité de tordre la molécule d'ADN. Or, les pièces polaires de l'aimant produisent un champ magnétique dont la direction est perpendiculaire à la direction d'extension de la molécule d'ADN. Il est ainsi possible de faire

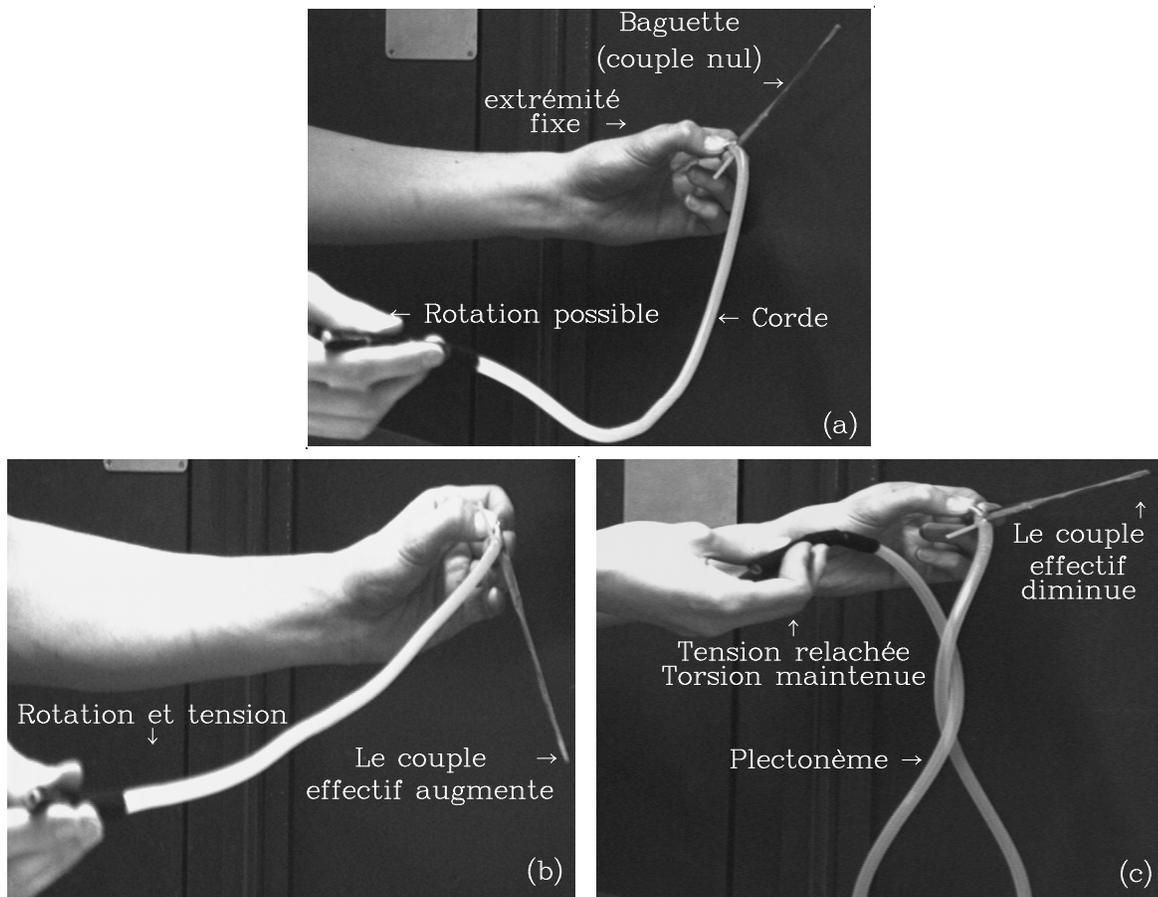


FIG. 6: On tourne une des extrémités d'une corde tout en maintenant l'autre fixe ; un ressort et une baguette permettent de visualiser le couple effectif appliqué sur la corde. (a) : pas de torsion. (b) : on tourne en maintenant la corde tendue : le couple augmente comme le nombre de tours. (c) : on diminue la tension en conservant les contraintes de rotation aux extrémités : le couple diminue et des *plectonèmes* se forment.

tourner la direction du champ en gardant constante la force appliquée, simplement en faisant tourner les aimants. La bille magnétique présente une direction de facile aimantation, et suit donc fidèlement la direction du champ, comme le ferait une boussole. Comme la molécule d'ADN est attachée à la bille en plusieurs points, la rotation de la bille contrôle la torsion de la molécule d'ADN. En tournant les aimants nous tordons la molécule d'ADN. Évidemment, pour que cette contrainte de torsion existe, il faut non seulement, que la molécule soit attachée en plusieurs points à la surface du verre mais surtout, qu'elle ne présente aucun *nick*, c'est-à-dire aucune coupure simple brin : en effet, il est courant que la longue chaîne de liens phosphodiester présente une coupure qui n'affecte pas l'intégrité de la molécule, puisque le second brin ne présente pas de coupure au même endroit. Mais ce type de défaut permet de relaxer toute contrainte de torsion puisque la molécule peut tourner librement autour d'un brin. Dans nos cellules, les enzymes de type *ligase* réparent systématiquement ce type de défauts. Dans notre expérience en revanche, ces *nicks* sont assez fréquents et il n'y a qu'un

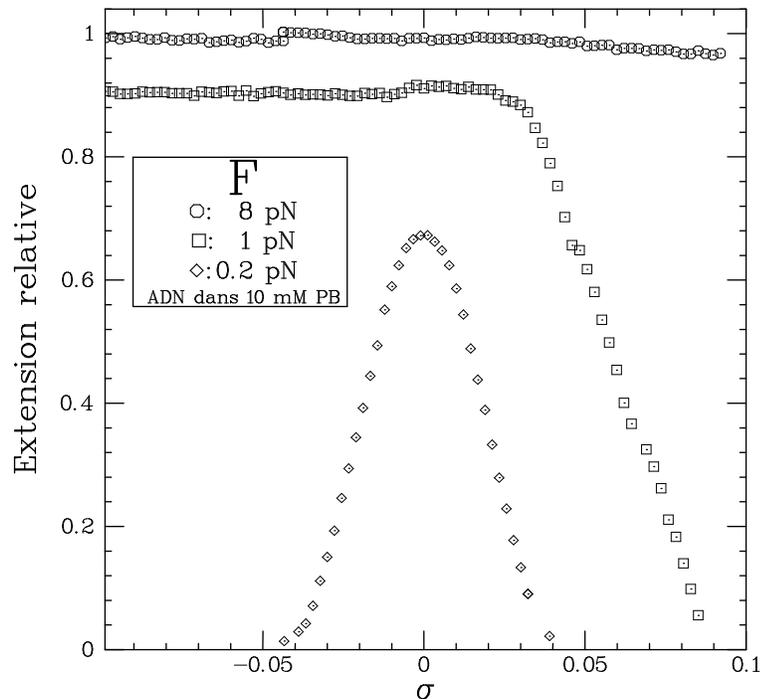


FIG. 7: Courbes de l’extension relative en fonction du degré de surenroulement à force constante. Elles ont été baptisées “courbes en chapeau” du fait de leur forme à basse force.

petit nombre de molécules qui présente une chaîne intacte et est sensible à une contrainte de torsion. Heureusement, nous préparons plusieurs milliers de “Jokaris moléculaire” à la fois, ce qui nous permet de trouver de “bonnes” molécules facilement.

L’effet de la torsion sur une molécule d’ADN est très important au niveau de la cellule. En effet, une batterie d’enzymes, les *topoisomérases*, régulent le degré de torsion de l’ADN, tant chez les bactéries que dans nos cellules. Si nous bloquons l’action de ces enzymes, nous tuons la cellule. Dans toutes les cellules qui vivent à température ordinaire, l’ADN présente une contrainte de torsion négative, c’est-à-dire que la molécule est un peu sousenroulée. Par contre, l’ADN des bactéries vivant dans les sources chaudes (70°C et plus) présente lui un léger surenroulement. La contrainte de torsion est donc un paramètre biologique important. Pour la caractériser, on compare le nombre de tours  $n$  ajoutés ou enlevés à la molécule au nombre de tours  $Lk_0$  que présente la double hélice en l’absence de contrainte, à savoir un tour toutes les 10.5 paires de bases. Le rapport de ces deux nombres  $\sigma = n/Lk_0$  permet de comparer des molécules de taille différente. Dans notre expérience, les molécules d’ADN sont de deux types, les plus courtes sont composées de  $\sim 17000$  paires de bases (bp) soit  $Lk_0 \sim 1600$ , tandis que les plus longues possèdent 48502 bp soit  $Lk_0 \sim 4600$  [12].

L’effet de la torsion sur une molécule d’ADN a été étudié avec soin par WHITE [13], il se comprend facilement si nous cherchons à tordre un tube de caoutchouc comme sur la figure 6. Si nous tordons le tube régulièrement en maintenant une force de traction, celui-ci accepte cette contrainte mais il y oppose un couple qui est proportionnel à l’angle dont on l’a tordu. Si maintenant, nous relâchons la force de traction sur le tube en maintenant l’angle de torsion

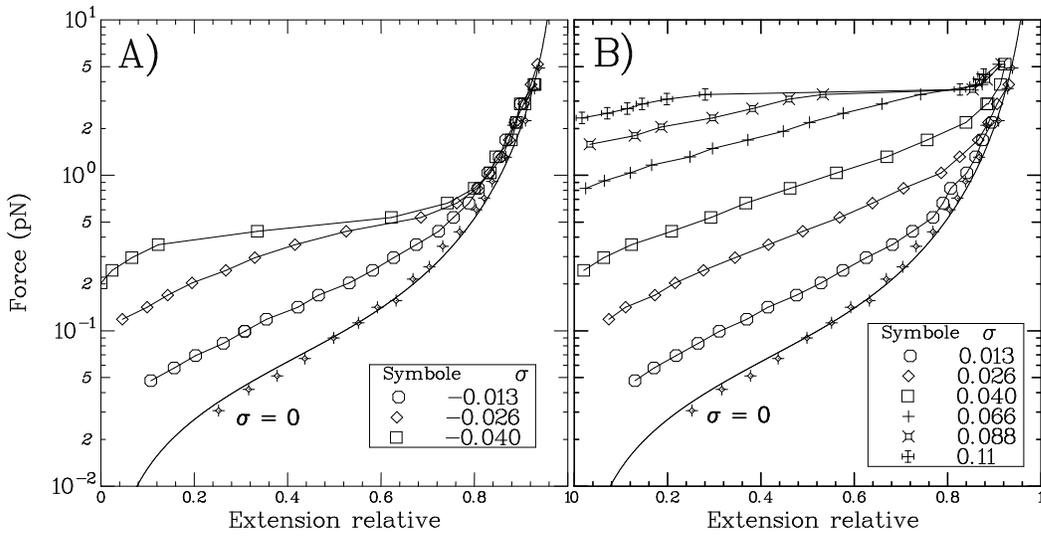


FIG. 8: Courbes de l'élongation en fonction de la force pour différents degrés de surenroulement ; (A) :  $\sigma < 0$ , (B) :  $\sigma > 0$ . La rigidité de la molécule croît avec  $\sigma$  ; des variations brutales d'extension apparaissent à des forces bien définies quand la molécule est suffisamment surenroulée et sont associées à des transitions de structure.

constant, une instabilité ne tarde pas à apparaître sous forme de "tortillons", bien connu sur les fils des combinés téléphoniques. Lorsque ces tortillons se forment, le couple de torsion diminue de façon notable. Les tortillons absorbent une part importante de la torsion. En fait, l'apparition de cette instabilité est, comme il se doit, le résultat d'une compétition entre deux mécanismes : l'énergie mécanique du tube de caoutchouc se répartit entre une contribution de torsion pure et une contribution de courbure. Pour des petites contraintes de torsion, le tube reste droit afin de minimiser son énergie de courbure. Pour de fortes contraintes, il devient rentable de se courber afin de réduire le couple de torsion et donc l'énergie de torsion. A l'échelle de la molécule d'ADN, les bilans énergétiques sont presque équivalents, il faut seulement ajouter de grandes fluctuations thermiques qui adoucissent l'instabilité d'apparition d'entortillements (encore appelés *plectonèmes*). Ces tortillons produisent un raccourcissement de la molécule. Ainsi, si nous appliquons une faible force sur une molécule d'ADN et si nous portons l'allongement de celle-ci en fonction du nombre de tours qui lui sont appliqués, nous observons une courbe en cloche. L'extension est maximale lorsqu'aucune contrainte de torsion n'est appliquée, et diminue quand la contrainte de torsion augmente et ce, quelque soit son signe. Ce comportement correspond à la courbe symétrique de la Fig. 7, qui est en excellent accord avec les prédictions théoriques [15, 16, 17, 18].

Lorsque nous répétons cette mesure avec une force de traction plus importante (de  $1pN$ ) nous observons un comportement dissymétrique en fonction de  $\sigma$ . Pour  $\sigma > 0$ , la molécule se raccourcit comme précédemment, en revanche, pour  $\sigma < 0$ , la longueur de la molécule ne semble plus dépendre de  $\sigma$ . Ce changement de comportement est encore plus net sur les courbes de force/extension réalisées à  $\sigma$  constant (voir Fig. 8). Dès que  $\sigma$  est assez négatif, l'extension de la molécule présente une transition abrupte depuis une valeur nulle jusqu'à l'extension maximale et ceci pour une force typique de  $0.5pN$ . Cette dissymétrie relative

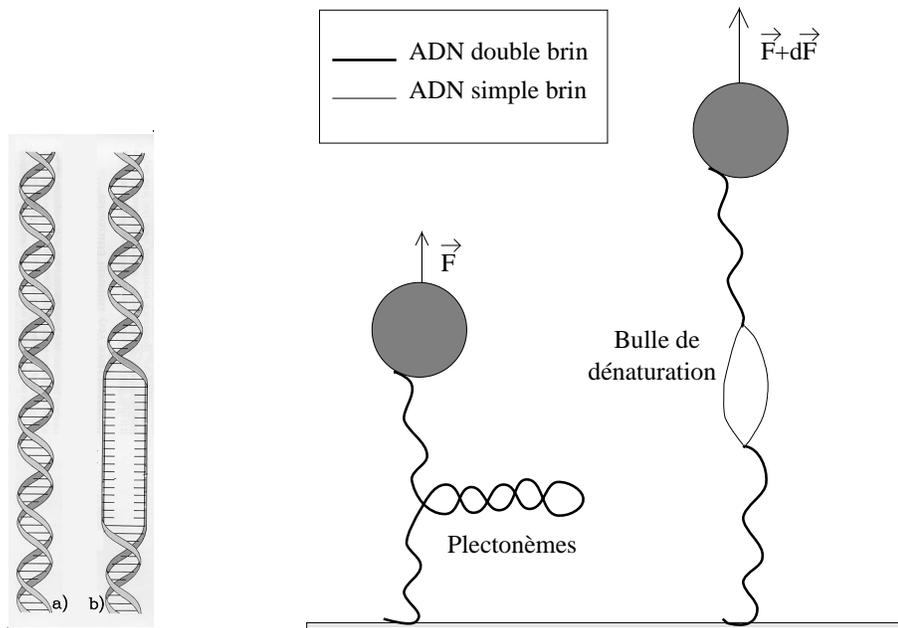


FIG. 9: A gauche : (a) : double hélice classique. (b) : au sein de la double hélice, bulle de dénaturation correspondant à la séparation des bases sur environ deux tours. - A droite : passage d'une situation avec plectonèmes et faible extension à une situation avec bulle de dénaturation et grande extension. Ceci correspond à une force  $F$  de l'ordre de  $0,5pN$ .

au signe du degré de torsion est prévisible puisque la molécule d'ADN est chirale et que par conséquent, surenrouler n'est pas équivalent à sousenrouler. Nous verrons plus loin que la transition que nous décrivons correspond à l'apparition d'une "bulle de dénaturation". En sousenroulant la double hélice, on provoque l'apparition d'une petite région où les liaisons hydrogène qui maintiennent les bases complémentaires des deux brins cèdent sous la contrainte (voir Fib.9)[14].

En augmentant encore la force de traction sur l'ADN, nous observons un phénomène identique du côté des  $\sigma > 0$ . Au delà de  $3pN$ , l'extension de la molécule d'ADN devient quasiment insensible à  $\sigma$ . Cette transition correspond également à l'apparition localement d'une nouvelle phase de l'ADN que nous discuterons plus loin.

## 6 Le sousenroulement provoque une dénaturation locale de la double hélice

Revenons à l'étude de l'ADN sousenroulé, et imaginons que nous puissions mesurer le couple qui s'exerce sur la molécule; on comprend aisément que lorsque la molécule reste complètement allongée, ce couple augmente linéairement avec le nombre de tours dont nous déroulons la double hélice, et que l'énergie de torsion augmente, elle, de façon quadratique avec le nombre de tours appliqués, soit en  $\sigma^2$ . Au niveau de sa structure, la molécule présente une certaine élasticité qui lui permet d'accommoder, sur toute sa longueur, un pas hélicale légèrement différent de son pas naturel ( $10.5 bp$  par tour). La constante de torsion de l'ADN-

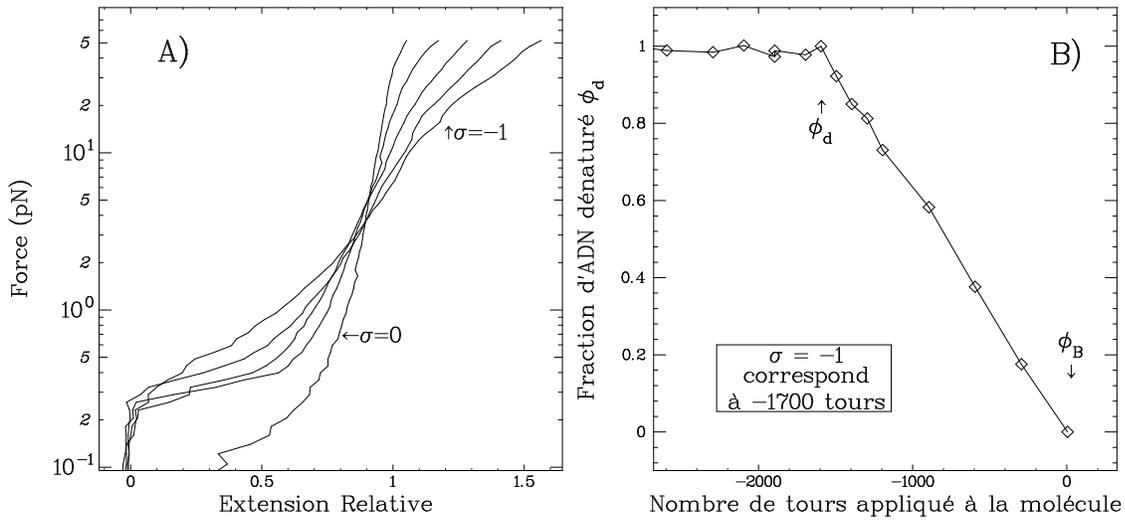


FIG. 10: A gauche : (a) : Courbe force/extension d'une molécule d'ADN soumise à une contrainte de torsion négative ( $\sigma < 0$ ). Pour  $\sigma = 0$ , nous obtenons la courbe d'élasticité de l'ADN-B. Au fur et à mesure que l'on déroule la double hélice, la courbe de force (pour  $f > 0.3pN$ ) devient de moins en moins raide. (b) Il est possible de décrire toutes les courbes de forces de (a) comme la combinaison linéaire de la courbe à  $\sigma = 0$  et de celle à  $\sigma = -1$  correspondant à de l'ADN dénaturé. La fraction d'ADN dénaturé augmente régulièrement avec le nombre de tours appliqué à la molécule.

B est importante mais le couple disponible au niveau de la bille magnétique est très fort. Il est ainsi possible de soumettre la molécule à des contraintes redoutables. Or, si l'on détord une corde formée de plusieurs torons, ceux-ci ont tendance à se désolidariser ; le même phénomène se produit pour l'ADN-B : au delà d'un couple critique, l'énergie de torsion accumulée à chaque tour devient plus grande que l'énergie qu'il faut pour dénaturer l'ADN-B c'est-à-dire pour casser les liaisons hydrogène qui relient les deux brins. Par ailleurs, lorsque les brins sont dénaturés, ils n'ont plus besoin de s'enrouler l'un autour de l'autre, ils peuvent rester simplement parallèles. Ainsi, une bulle de dénaturation ne présente pas d'enroulement naturel comme l'ADN-B, et en apparaissant permet de réduire la contrainte de torsion appliquée à la molécule. Un petit calcul d'ordre de grandeur nous permet d'estimer que le couple critique, pour lequel la première bulle de dénaturation apparaît, correspond à  $\sigma \sim -0.015$ . Cela signifie que la molécule d'ADN-B ne peut pas tolérer une contrainte telle que son pas hélical soit augmenté de plus de 1,5% !

Que se passe-t-il quand nous continuons à dérouler la molécule ? C'est à cette question que nous avons tenté de répondre en explorant la courbe force/extension d'une molécule, pour des valeurs de  $\sigma$  variant depuis 0 jusqu'à -1. Comme on peut le voir sur la figure 10, les courbes de force évoluent continûment au fur et à mesure que  $\sigma$  diminue. On peut, en fait, décrire toutes ces courbes comme la combinaison linéaire des deux courbes obtenues à  $\sigma = 0$  et à  $\sigma = -1$ . On écrit ainsi :  $L_\sigma(F) = aL_{(\sigma=-1)}(F) + (1 - a)L_{(\sigma=0)}(F)$ . De plus, nous pouvons vérifier que  $a = -\sigma$  (voir figure 10b). A l'échelle de cette figure, le couple critique

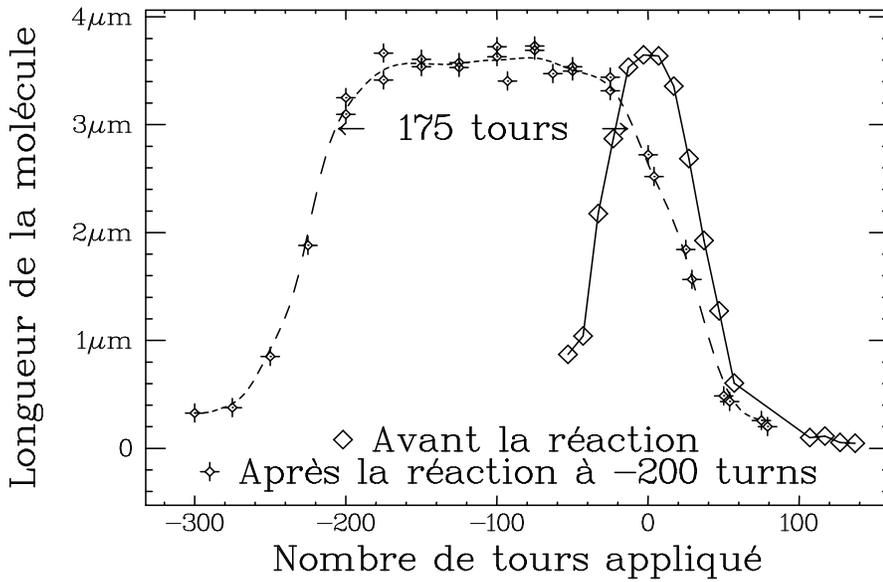


FIG. 11: Attaque chimique par le *glyoxal* des bases exposées dans la bulle de dénaturation : la courbe en trait plein est celle de référence obtenue avant l'attaque. Elle représente l'extension d'une molécule, soumise à une force de traction constante, en fonction du nombre de tours qui lui est appliqué. Son maximum se situe à  $\sigma = 0$ . Après une attaque au *glyoxal* faite sur cette molécule tendue et déroulée de 200 tours, nous observons que l'extension de la molécule en fonction du nombre de tours présente maintenant un plateau d'environ 175 tours qui confirme l'existence de bases exposées lors de l'attaque.

de  $\sigma \sim -0.015$  n'est pas distinguable de  $\sigma = 0$ .

L'évolution des courbes de force avec  $\sigma$  s'interprète ainsi par l'augmentation régulière de la longueur des bulles de dénaturation. En effet, la courbe de force de l'ADN-B ( $\sigma = 0$ ) est différente de celle de l'ADN dénaturé ( $\sigma = -1$ ), ce qui permet une évolution continue pour  $-1 \leq \sigma \leq 0$ . En particulier, à haute force ( $\sim 10 pN$ ), l'ADN dénaturé est sensiblement plus long que l'ADN-B : la longueur d'une molécule d'ADN sous une traction de  $10 pN$  augmente donc linéairement avec  $-\sigma$ . Cette transition est l'équivalent d'une transition de phase du premier ordre (par exemple liquide/gaz) en fonction d'une contrainte (équivalente au volume). Elle a ici lieu sur une molécule unique et à une dimension et n'est sans doute pas stricto-sensu du premier ordre mais suffisamment brusque pour apparaître comme telle.

Évidemment, avec les seules mesures d'élasticité, nous ne pouvons pas garantir que la molécule d'ADN présente effectivement des bulles de dénaturation lorsque nous la sous-roulons. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences complémentaires qui ont confirmé notre modèle [14]. La première série d'expériences que nous ne décrivons que succinctement, correspond à la possibilité d'hybrider un morceau d'ADN simple brin sur l'un des brins de la bulle de dénaturation. Cette technique permet, grâce à la préparation d'un morceau d'ADN ayant un code spécifique, d'assurer que la bulle de dénaturation s'est ouverte à un endroit défini. La deuxième série d'expériences est moins précise mais s'applique aussi à la phase d'ADN apparaissant sous contrainte de surenroulement. Nous avons choisi

un composé chimique, le *glyoxal*, qui altère les bases de l'ADN non impliquées dans une liaison hydrogène avec une base complémentaire. Ainsi, le *glyoxal* est sans effet sur l'ADN-B double brin mais modifiera de façon irréversible des morceaux d'ADN simple brin. De fait, le *glyoxal* modifiera les bases d'ADN qui font partie d'une bulle de dénaturation sans altérer celles qui font partie de la molécule double brin.

En sousenroulant une molécule que nous soumettons à une force de traction plus grande que  $1pN$ , nous ouvrons rapidement une bulle de dénaturation. Dans ces conditions, nous introduisons le *glyoxal* dans la cellule expérimentale et nous laissons agir ce composé pendant quelques dizaines de minutes, nous réalisons une attaque chimique des bases dénaturées. Nous pouvons alors ramener la contrainte de torsion à zéro, rincer le *glyoxal* et mettre en évidence l'attaque chimique. Pour cela, nous réalisons une mesure de l'extension de la molécule en fonction de  $\sigma$  à une faible force ; si aucune attaque chimique n'a eu lieu, nous retrouvons une courbe symétrique comme celle de la figure 7, possédant un maximum marqué à  $\sigma = 0$ . Après une attaque au *glyoxal* sur une bulle de dénaturation, nous obtenons cette fois une courbe dissymétrique du côté des  $\sigma < 0$ , présentant un plateau où l'extension est maximale (voir Fig. 11), le signal est identique dans le cas de l'expérience d'hybridation. L'interprétation de cette courbe est la suivante : du côté  $\sigma > 0$ , la molécule se comporte comme avant l'attaque, le surenroulement produit des plectonèmes qui raccourcissent la molécule. Du côté  $\sigma < 0$ , ce raccourcissement ne se fait qu'après avoir déroulé la molécule d'un nombre de tours un peu inférieur à celui dont elle était déroulée lors de l'attaque au *glyoxal*. En effet, les bases de la bulle, modifiées chimiquement, ne forment plus de bonnes liaisons hydrogène. Dès que nous sousenroulons la molécule, elles se dénaturent, même à faible force, relâchant ainsi la contrainte de torsion. Lorsque toutes les bases altérées se sont dénaturées, la contrainte de torsion peut à nouveau augmenter et la molécule se raccourcit en formant des plectonèmes. Ainsi, le plateau observé permet de déterminer aisément le nombre de bases chimiquement modifiées par le *glyoxal*. Nous observons que ce plateau est, en nombre de tours, sensiblement égal à celui dont nous avons sousenroulé la molécule lors de l'attaque. Ceci confirme l'augmentation de la longueur des bulles de dénaturation avec la contrainte de sousenroulement appliquée.

## 7 Le surenroulement conduit à l'apparition d'une nouvelle structure de l'ADN

L'existence de bulles de dénaturation était déjà connue pour des molécules d'ADN sousenroulées [19, 20]. Notre grande surprise fut de découvrir l'existence d'une transition vers une nouvelle structure de la molécule lorsque celle-ci est surenroulée. En effet, si nous appliquons à une molécule une force de traction supérieure à  $3pN$ , et si nous la surenroulons régulièrement, nous observons également une évolution continue des courbes de force avec  $\sigma$ , caractéristique d'une partition de la molécule entre deux phases.

Comme on peut le voir sur la figure 12, les contraintes de torsion appliquées deviennent très importantes puisque  $\sigma$  atteint la valeur de 3, ce qui signifie que l'on a augmenté le nombre de tours de la molécule d'un facteur 4 ! Encore une fois, les courbes de force peuvent toutes être décrites par une combinaison linéaire de la courbe à  $\sigma = 0$  et de celle à  $\sigma = 3$ . Pour cette valeur de la contrainte torsionnelle, la longueur de la molécule tend vers 0 lorsque la

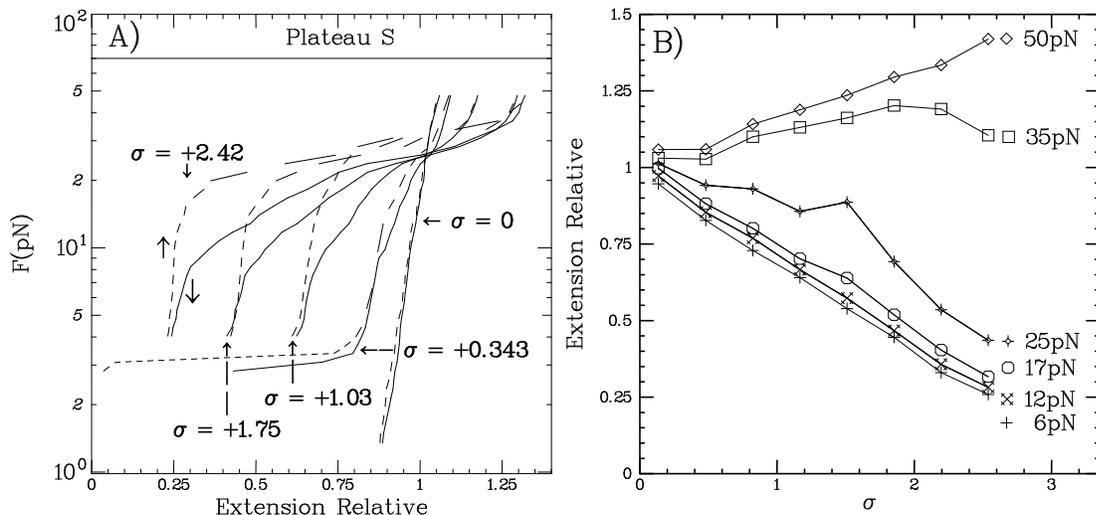


FIG. 12: Évolution des courbes de force/extension en fonction de la contrainte de surenroulement  $\sigma$  appliquée. Cette évolution est continue, la molécule se raccourcit lorsque  $\sigma$  augmente pour  $F < 25$  pN. Pour  $F > 35$  pN le comportement est inversé.

force de traction appliquée est inférieure à  $25$  pN. En revanche, lorsque la force est supérieure à  $25$  pN, la longueur de la molécule devient nettement plus grande que celle de la phase B. En fait, pour  $F < 25$  pN la nouvelle phase de la molécule d'ADN (que nous appelons ADN-P) présente sans doute des entortillements qui seraient responsables du raccourcissement de la molécule. Lorsque la force de traction atteint  $25$  pN, ces entortillements disparaissent et la phase d'ADN-P présente alors sa vraie longueur. Pour rendre compte de nos résultats expérimentaux, il faut que la phase ADN-P présente 2.6 paires de bases par tour et que sa longueur soit 1.75 fois plus grande que celle de l'ADN-B.

Les modélisations moléculaires réalisés sur ordinateur, grâce au programme JUMMA [21, 22], permettent de prédire la structure de l'ADN-P. L'énorme torsion que présente cette phase oblige les bases à se désappareiller pour que les liens phosphodiester puissent se rapprocher, comme on peut le voir sur la figure 13. Cette structure n'est pas sans rappeler la structure de l'ADN proposée par PAULING [1], qui avait placé les bases à l'extérieur pour que le code génétique de l'ADN soit accessible facilement. Cette structure est évidemment plus coûteuse en énergie que l'ADN-B car, d'une part, l'énergie d'appariement des bases est perdue mais surtout, les groupes phosphodiester chargés positivement sont très proches l'un de l'autre. Or, DAY et LIU ont trouvé il-y-a quelques années, qu'une phase d'ADN très similaire existe dans le virus *Pfl* [23, 24]. Pour ce virus, on pouvait penser que la structure de l'ADN était dictée par deux facteurs : les protéines d'enveloppes mais également le fait que cet ADN est un plasmide simple brin incapable de former une double hélice. Nos expériences montrent que cette phase est propre à l'ADN. Par ailleurs, les conditions requises pour l'apparition de l'ADN-P ne sont pas très difficile à remplir puisqu'il suffit d'un taux de surenroulement de  $\sigma = +0.035$  et d'une force de traction de  $\sim 3$  pN. Ce taux de surenroulement est important pour un micro-organisme mais néanmoins observable ; en particulier on peut espérer atteindre cette contrainte en amont d'une *ARN-polymérase* dont on sait déjà qu'elle peut exercer une

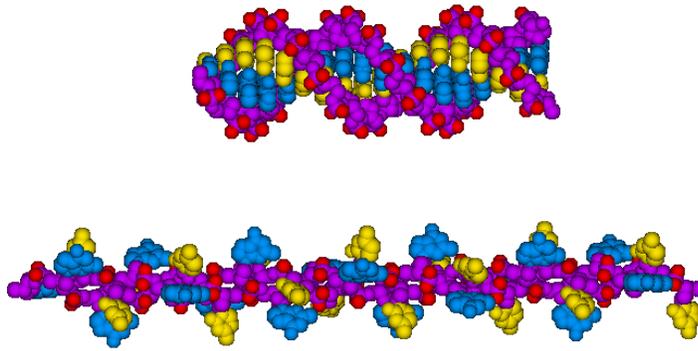


FIG. 13: Structure d'une même molécule d'ADN sous les deux formes : en haut la double hélice de l'ADN-B, en bas la nouvelle phase que nous appelons ADN-P déduite grâce à la modélisation moléculaire. Cette représentation décrit l'encombrement des atomes constituant ici une double chaîne de 18 bases GC. Les squelettes phosphodiesters sont coloriés en pourpre tandis que les bases de *guanine* sont en bleu et celles de *cytosine* sont en jaune, les atomes d'oxygène ionisés eux sont en rouge. Ces modèles ont été réalisés grâce au programme JUMNA [21, 22], en imposant une contrainte de torsion et une géométrie hélicoïdale sur la séquence de bases.

force de  $14pN$  sur l'ADN [25].

Nous n'avons pas la possibilité de déterminer la structure cristallographique d'une molécule unique et nous ne pouvons pas assurer que la phase adoptée corresponde exactement à celle calculée par ordinateur. Toutefois, nous avons utilisé le *glyoxal* pour vérifier que la nouvelle phase d'ADN-P présentait également des bases non appariées. Les résultats sont identiques à ceux que nous avons obtenus dans le cas des bulles de dénaturation, la seule différence étant qu'il faut appliquer trois fois plus de tours dans le cas de l'ADN-P que dans celui de la dénaturation pour observer le même nombre de bases altérées. Ceci confirme le surenroulement de la phase ADN-P par rapport à l'ADN-B.

## 8 Conclusions

Depuis quelques années, plusieurs équipes se sont lancées dans des expériences de micro-manipulation de molécules uniques destinées à élargir le champ d'investigation en biologie moléculaire. En utilisant des "pinces optiques" il a été possible de mesurer la force élémentaire d'une protéine musculaire [26]. De même, le fonctionnement d'un moteur moléculaire rotatif, existant au sein de nos cellule, a pu être visualisé [29]. Grâce à un microscope à force

atomique (AFM), la force de rupture du couple récepteur-ligand *biotine/streptavidine* a pu être obtenue [27], la cinétique de dénaturation d'une protéine soumise à une force de traction est connue [30, 31]. En utilisant la très grande souplesse d'une micro-pipette en verre, l'énergie d'appariement des bases de l'ADN peut être mesurée [28]. Nous venons de montrer qu'un dispositif fort simple constitué d'aimants et d'un microscope permet de manipuler des molécules uniques d'ADN, pourvu qu'elles soient attachées à une microbille magnétique et à un substrat. Le mouvement brownien de cette bille permet de déterminer facilement la force de traction exercée sur la bille sans qu'aucun contact ne soit nécessaire. Grâce à ce dispositif expérimental, nous avons pu étudier le comportement élastique d'une molécule d'ADN soumise à une contrainte de torsion qui tend à modifier le pas hélical de la double hélice. Nous avons exploré des contraintes plusieurs dizaines de fois supérieures à celles connues dans les cellules vivantes. Lorsque nous déroulons la double hélice, nous observons une bulle de dénaturation dans laquelle les deux brins d'ADN sont séparés. La taille de cette bulle augmente régulièrement avec la contrainte de torsion. En revanche, si nous cherchons à augmenter le nombre de tours de la double hélice, nous montrons pour la première fois qu'une nouvelle phase de la molécule d'ADN apparaît. Cette phase, que nous appelons ADN-P, présente les liens phosphodiester à l'intérieur de la structure tandis que les bases, désappariées, sont expulsées vers l'extérieur de la molécule. Cette nouvelle phase qui n'est pas sans rappeler la structure proposée originellement par PAULING pour décrire l'ADN présente une très grande similitude avec la structure de l'ADN du virus *Pfl*. Une question naturelle est donc l'implication possible de cette phase ADN-P dans les mécanismes cellulaires. Nous espérons pouvoir y répondre bientôt.

## Références

- [1] PAULING L. & COREY R.B. (1953) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **39**, 84–97.
- [2] J.D. WATSON and F.H.C. CRICK, Molecular structure of nucleic acids, *Nature* **171**, 737–741, (1953)
- [3] EINSTEIN A. *Investigation on the theory of Brownian Movement* (Dover), London, 1956
- [4] J. GELLES, B. J. SCHNAPP, and M. SHEETZ, Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature* **331**, 450 (1988).
- [5] C. BUSTAMANTE, J. F. MARKO, E. D. SIGGIA and S. SMITH, Entropic Elasticity of  $\lambda$ -Phage DNA *Science* **265**, 1599 (1994).
- [6] MARKO, J. & SIGGIA, E. Stretching DNA (1995) *Macromolecules* **28**, 8759–8770.
- [7] C. BOUCHIAT, M.D. WANG, S. M. BLOCK, J.-F. ALLEMAND and V. Croquette; *Measuring persistence length of single DNA molecule*. To appear in *Biophysical Journal*.
- [8] CLUZEL, P., LEBRUN, A., HELLER, C., LAVERY, R., VIOVY, J.-L., CHATENAY, D. & CARON, F. DNA : an extensible molecule (1996). *Science* **271**, 792–794.
- [9] SMITH, S., CUI, Y., & BUSTAMANTE, C. Overstretching B-DNA : the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules (1996) *Science* **271**, 795–799.
- [10] LEBRUN, A. & LAVERY, R. (1996) *Nucleic Acid Res.*, **24**, 2260–2267.

- [11] S.B. SMITH, L. FINZI, and C. BUSTAMANTE. Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA Molecules by using Magnetic Beads *Science*, 258 :1122–1126, 1992.
- [12] STRICK, T.R., ALLEMAND, J.F., BENSIMON, D., BENSIMON, A. & CROQUETTE, V. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule (1996) *Science* **271**, 1835–1837.
- [13] WHITE, J.H. (1969) *Am. J. Math.* **9**, 393–728
- [14] STRICK, T.R., ALLEMAND, J.F., BENSIMON, D. & CROQUETTE, V. The behavior of supercoiled DNA (1998) *Biophys. J.* **74**, 2016–2028. T. STRICK, V. CROQUETTE and D. BENSIMON ; Homologous pairing in stretched supercoiled DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **95**, 10579-10583, (1998).
- [15] MARKO, J. & SIGGIA, E. Fluctuations and Supercoiling of DNA (1994) *Science* **265**, 506–508.
- [16] MARKO, J. & SIGGIA, E. Statistical mechanics of supercoiled DNA (1995) *Phys. Rev. E* **52**, 2912–2938.
- [17] C. BOUCHIAT AND M. MÉZARD (1997). Elasticity model of a supercoiled DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.*, **80** 1556–1559.
- [18] J.D. MOROZ and P. NELSON. 1997. Torsional directed walks, entropic elasticity and DNA twist stiffness. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **94** : 14418-14422.
- [19] KOWALSKI, D., NATALE, D.A. & EDDY, M.J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**, 9464–9468 .
- [20] PALECEK, E. Local Supercoil-Stabilized Structures (1991) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 151–226.
- [21] LAVERY, R. (1994) *Adv. Comput. Biol.* **1**, 69–145.
- [22] LAVERY, R. ZAKRZEWSKA, K. & SKLENAR H. (1995) *Comput. Phys. Commun.* **91**, 135–158.
- [23] LIU, D.J. & DAY, L.A. (1994) *Science* **265**, 671–674.
- [24] DAY, L.A., WISEMAN, R.L. & MARZEC, C.J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**, 1393–1403.
- [25] YIN, H., WANG, M., SVOBODA K., LANDICK, R., BLOCK, S. & GELLES, J. Transcription against a applied force (1995) *Science* **270**, 1653–1657.
- [26] J.T. FINER, R.M. SIMMONS and J. A. SPUDICH Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometre steps ; *Nature*, **368**, 113–119, (1994).
- [27] E.L. FLORIN, V.T. MOY and H.E. GAUB ; Adhesion Force Between Individual Ligand-Receptor Pairs, *Science*, **264**, 415–417, (1994).
- [28] B. ESSEVAZ-ROULET, U. BOCKELMANN and F. HESLOT, Mechanical separation of the complementary strands of DNA ; **Proc. Nat. Acad. Sci.**, (1997), **94**, 11935-11940.
- [29] H. NOJI, R. YASUDA, M. YOSHIDA and K. KINOSITA, Direct Observation of the Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase, *Nature*, **386**, 299-302, (1997)
- [30] M. RIEF, M. GAUTEL, F. OESTERHELT, J.M. FERNANDEZ and H.E. GAUB. 1997. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science*. **276** : 1109–1112.

- [31] M.S.Z. KELLERMAYER, S.B. SMITH, H.L. GRANZIER and C. BUSTAMANTE. 1997. Folding-Unfolding Transition in single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers. *Science*. **276** : 1112–1116.