

Chapitre 1

La molécule d'ADN

S EN 1868 le chimiste suisse Friedrich Miescher a découvert dans les noyaux de cellules vivantes un nouveau produit qu'il nomme nucléine. La nucléine contient des protéines et un acide qui sera nommé plus tard acide désoxyribonucléique, ou ADN. Miescher avait deviné que l'ADN avait un rôle lié à l'hérédité, mais n'a pas pu le prouver. Dans les années 1930 Erwin Schrödinger avait quant à lui estimé que le support de l'hérédité devait être une molécule très grande (Schrödinger, 1944).

Grâce au développement de la cristallographie aux rayons X, on a pu dans les années 1950 commencer à déterminer certaines structures moléculaires. C'est en 1953 que l'on a compris grâce à ces techniques la nature de la structure de l'ADN. On distingue trois niveaux de structure appelés primaire, secondaire et tertiaire (sections 1.1a-c). En quinze ans, les mécanismes de réplication de l'ADN, le code génétique et la transcription de l'information génétique en protéine ont été étudiés et décrits par les biologistes. Aujourd'hui les applications de la génétique sont innombrables. Nous commençons ce chapitre par une description du modèle de la double hélice (Watson et Crick, 1953).

Depuis quelques années on sait manipuler les molécules d'ADN une par une. Ces expériences ont permis de mieux comprendre la physique à l'échelle de la molécule et des comportements très riches on été mis en évidence (Smith et coll., 1992; Cluzel et coll., 1996; Strick et coll., 1998). L'objet de cette thèse est de mieux comprendre les expériences de micromanipulation de la molécule d'ADN que nous présentons dans la

section 1.2 et les liens qui existent entre les fluctuations thermiques de la géométrie de l'ADN et son élasticité. Nous précisons nos objectifs dans la section 1.3.

1.1 Un double polymère : l'ADN

1.1.a Structure primaire

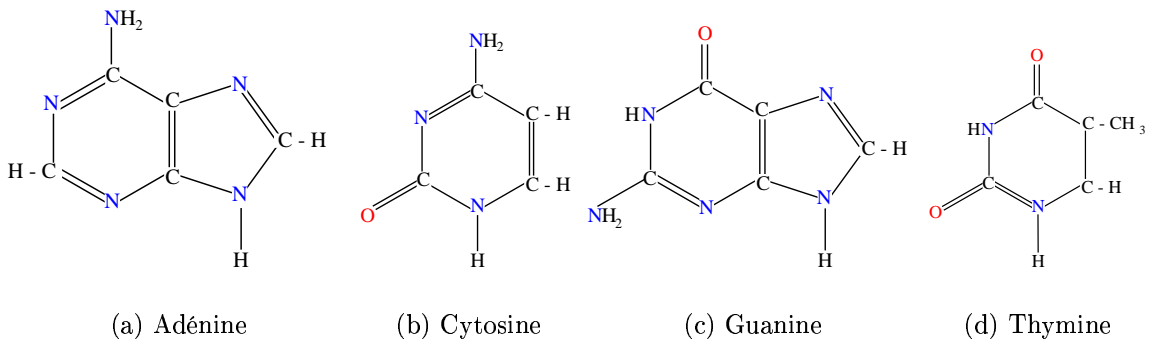


fig. 1.1: Les quatre bases servant d'alphabet à l'ADN. Elles sont notées par leurs initiales A, C, G et T. Les bases A et G sont les **purines** et les bases C et T les **pyrimidines**.

L'acide désoxyribonucléique ou ADN a été découvert en 1868, mais ce n'est que dans les années 1950 que son rôle de support de l'hérédité a été démontré. Aujourd'hui, on sait le synthétiser, le lire et le modifier. Le rôle de la molécule d'ADN est de conserver l'information génétique d'un être vivant. L'expression des gènes permet le développement et la vie de l'individu, la transmission de ces informations permet de perpétuer l'espèce. L'information est stockée sur ce support à l'aide d'un « alphabet » de quatre lettres, comme le binaire en a deux (succession de 0 et de 1). Ces lettres sont des *bases* nommées adénine, cytosine, guanine et thymine (voir la figure 1.1) que l'on abrège en A, C, G et T. La succession de ces bases constitue l'information génétique. Elles sont disposées séquentiellement sur un **brin** constitué d'un sucre, le désoxyribose, et d'un groupement phosphate (voir figure 1.2). Le brin est *orienté*, ce qui est indispensable pour lever l'ambiguïté du sens de lecture. Un brin peut être lu pour être copié ou *traduit* selon le code génétique, qui fait correspondre à trois bases un acide aminé. La séquence d'acides aminés ainsi créée est aussi une chaîne que l'on appelle *protéine*.

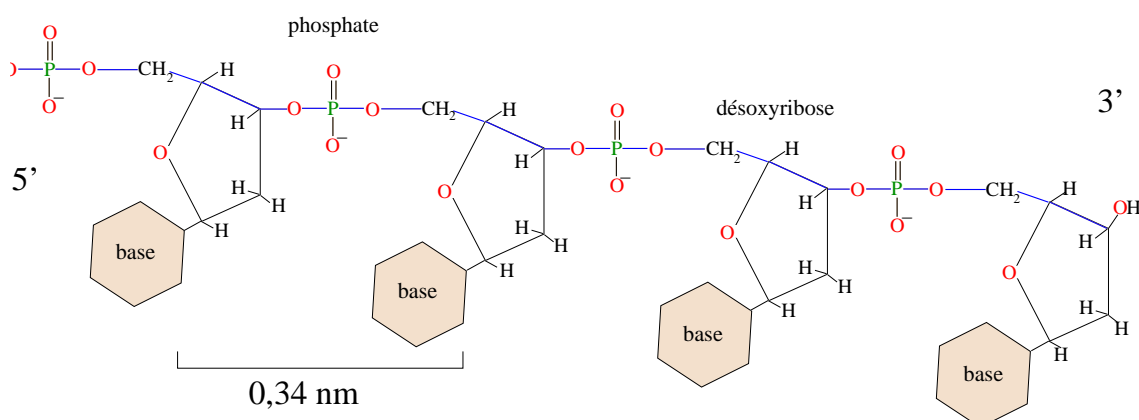


fig. 1.2: Structure primaire de l'ADN. Une chaîne de désoxyribose et de phosphate porte les bases (figure 1.1) du code génétique. On appelle cette chaîne un brin. Le brin est orienté du carbone 5' vers le carbone 3'.

1.1.b Structure secondaire

L'ADN a une structure secondaire constituée de deux brins en forme d'hélice qui s'enroulent l'un autour de l'autre ; on appelle cette structure une **double hélice**. Elle a été découverte par Franklin, Wilkins, Watson et Crick (Watson et Crick, 1953). Les bases sont tournées vers l'intérieur de la double hélice et se lient par des liaisons hydrogène. Celles qui se font face sont complémentaires : A avec T et G avec C ; si bien que les deux brins portent la même information en miroir. La double hélice adopte diverses formes selon le milieu dans lequel elle se trouve. Dans les conditions physiologiques typiques, l'ADN est sous la forme B, la double hélice est gauche et son pas est alors d'environ 10,5 paires de bases soit $p_{ADN} = 3,57$ nm et son rayon environ 1 nm.

En faible hydratation, on trouve la forme A, gauche elle aussi, mais le pas est plus court et le rayon plus grand. D'autres formes existent comme l'ADN Z (Cluzel et coll., 1996), qui a la particularité d'avoir une hélice droite, ou l'ADN P (Allemand et coll., 1998) avec les bases orientées vers l'extérieur.

1.1.c Structure tertiaire

L'étude de la structure tertiaire de l'ADN est le sujet principal de cette thèse. On l'étudie sans se préoccuper de la structure primaire de la molécule. La géométrie de la molécule d'ADN est un sujet d'étude expérimental et théorique actif. Il fait appel à des techniques d'imagerie. Du point de vue théorique on s'intéresse notamment à la formation de plectonèmes et d'hélices (solénoïdes) qui sont des segments de la molécule enroulés sur eux-mêmes (voir figure 1.4). Le plectonème joue un rôle

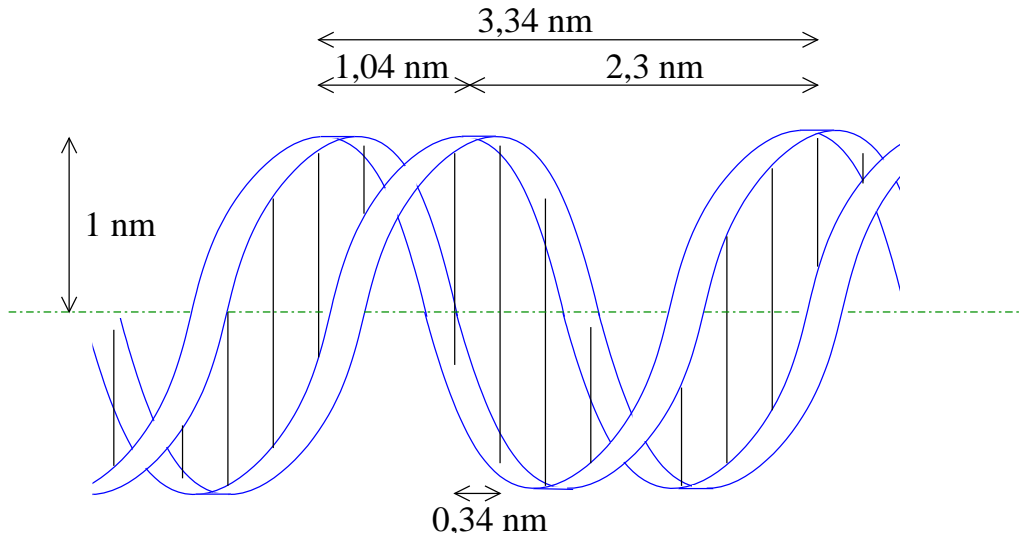


fig. 1.3: Structure secondaire de l'ADN sous la forme B. C'est la forme « naturelle » de l'ADN dans le milieu vivant. Deux brins complémentaires s'enroulent l'un autour de l'autre en une double hélice. Les bases complémentaires se font face et sont disposées régulièrement. Il y a environ 10,5 paires de bases sur la longueur d'une pas de la double hélice qui vaut environ 3,4 nm. Le rayon de l'hélice est de 1 nm environ.

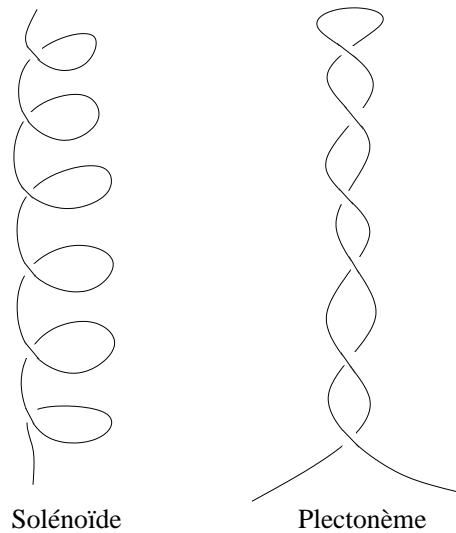


fig. 1.4: Deux superstructures courantes de l'ADN.

important en biologie. Ces structures tertiaires apparaissent lorsque l'on fait subir des tours à une extrémité de la molécule. On appelle ces tours des *supertours* pour faire la distinction avec les tours de la structure secondaire.

Chez les eucaryotes l'ADN est sous forme de chromosomes, un complexe formé avec des protéines (histones). Les procaryotes possèdent, en plus de leurs chromosomes, de l'ADN en structure fermée sur elle-même, que l'on appelle plasmide. Notons que des enzymes appelés *topoisomérases* peuvent modifier la structure tertiaire de la molécule pour démêler l'ensemble des chromosomes, notamment lors de la division cellulaire.

1.2 Les expériences de micromanipulation sur molécule unique

Grâce à des techniques chimiques, on accroche les extrémités d'une molécule d'ADN à divers objets qui permettent de manipuler la molécule comme avec des pinces. On attache généralement une bille dont on observe les mouvements avec un appareil optique. Des mesures de relations force–extension ont été réalisées dans un premier temps, montrant le comportement élastique de la molécule (Smith et coll., 1992) ou la surextension (Cluzel et coll., 1996). D'autres expériences ont permis de mesurer les effets de l'enroulement (Allemand, 1997; Léger et coll., 1999). C'est cette expérience que nous décrivons. Nous abordons le dispositif expérimental et nous expliquons ensuite comment on effectue les mesures.

1.2.a Principe

Comment attraper la molécule?

Les techniques de biologie moléculaire permettent de greffer par liaison covalente des *groupes fonctionnels* à l'ADN dans le but de manipuler les molécules (Allemand, 1997). La technique est la suivante : par *peignage* on étend les molécules dans une direction, ce qui permet d'effectuer un traitement chimique différent aux deux extrémités. Sur chacune de ces deux extrémités, on greffe une fonction chimique différente. Pour chacune d'elles il existe une fonction chimique complémentaire avec laquelle elle a une forte affinité. Ces deux groupes fonctionnels sont capables de s'attacher de façon très robuste.

Dispositif expérimental

Les expériences de micromanipulation effectuées avec une molécule unique d'ADN se présentent comme illustré sur la figure 1.5. Une des extrémités est d'abord attachée

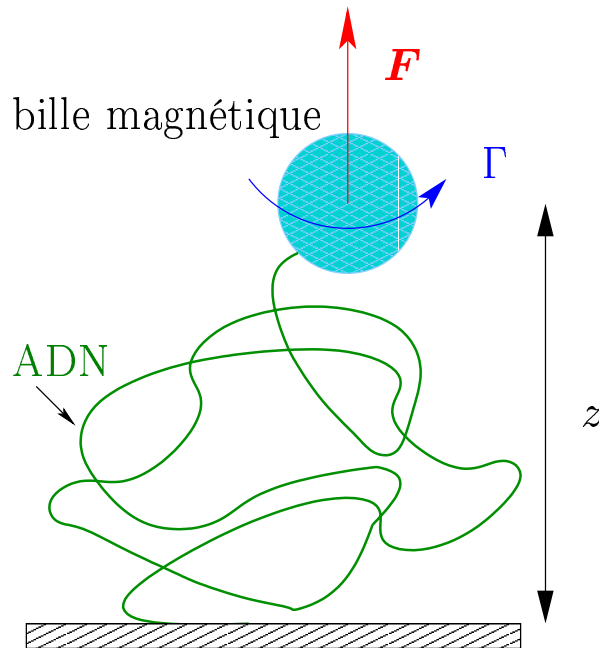


fig. 1.5: *Expérience de micromanipulation de l’ADN*

au substrat par une liaison digoxigénine–antidigoxigénine. Ensuite des billes recouvertes de streptavidine sont envoyées et se fixent à la biotine de l’autre extrémité. Les billes utilisées sont *magnétiques*, on les manipule grâce aux champs électrique et magnétique et on leur applique une force \mathbf{F} et un couple Γ . On n’observe pas directement l’ADN mais la position de la bille, grâce à un microscope sur lequel est branchée une caméra à transfert de charge (CCD).

1.2.b Les mesures

Mesure de l’extension

Pour mesurer z , on utilise l’image de la bille fournie par la caméra. L’image obtenue n’est pas uniforme : on observe des anneaux concentriques dont le profil varie en fonction de la distance de la bille à l’objectif*. On établit alors une correspondance entre la figure obtenue et la valeur de z . En pratique la calibration pour chaque diamètre de bille est faite une fois et la mesure de z est effectuée par un logiciel de traitement d’images.

*Il semble que l’origine précise de ces figures d’interférence soit encore mal comprise (Jean–François Allemand, communication privée, 2002).

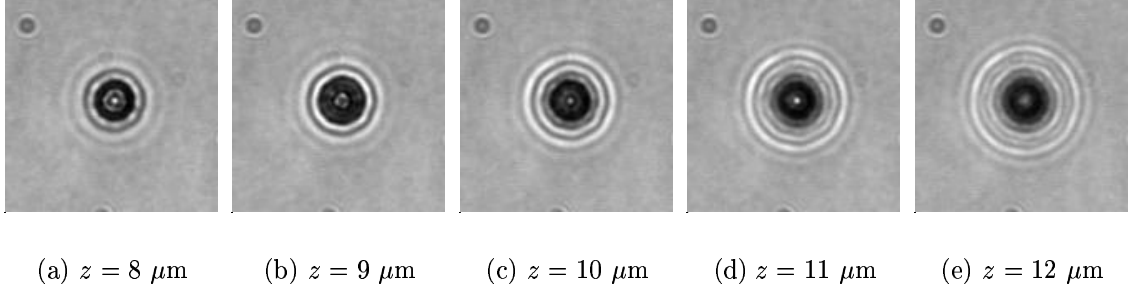


fig. 1.6: Exemples de figures d'interférence en anneaux observées au microscope pour l'image de la bille magnétique. On établit une correspondance univoque entre une figure et la valeur de z (images aimablement fournies par Jean-François Allemand).

Mesure de la force

La mesure de la force n'est pas directe*, elle se fait grâce aux fluctuations de la position de la bille, en prenant un modèle élastique. Sur la figure 1.7 on a représenté schématiquement le principe de ce calcul. La force de rappel $\delta \mathbf{F}$ vaut

$$\delta \mathbf{F} \simeq \frac{\delta x}{z} \mathbf{F}.$$

Comme elle est proportionnelle à δx , on a l'équivalent d'un ressort de raideur F/z . Il y a deux degrés de liberté horizontaux, dont l'énergie vaut en vertu du théorème d'équipartition

$$\frac{1}{2} \left(\frac{F}{z} \right) \langle (\delta x)^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

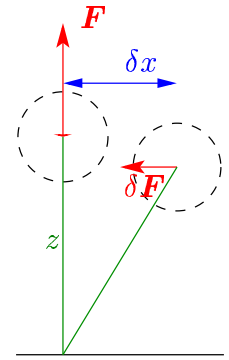


fig. 1.7: Mesure de \mathbf{F}

ce qui permet de mesurer la force à partir de mesures de fluctuations de position

$$F = k_B T \frac{z}{\langle (\delta x)^2 \rangle}. \quad (\text{I-1.1})$$

Mesure de l'angle de supertour

L'angle de supertour total χ est mesuré comme étant l'angle de rotation de la bille. Le champ magnétique imposé sur celle-ci par les aimants est suffisamment important pour que la rotation des aimants et la rotation de la bille soient *synchrones*. La mesure

* Contrairement aux expériences de (Smith et coll., 1992) où elle est calculée par la relation de Stokes $F = 6\pi\eta r v$ à partir de la vitesse.

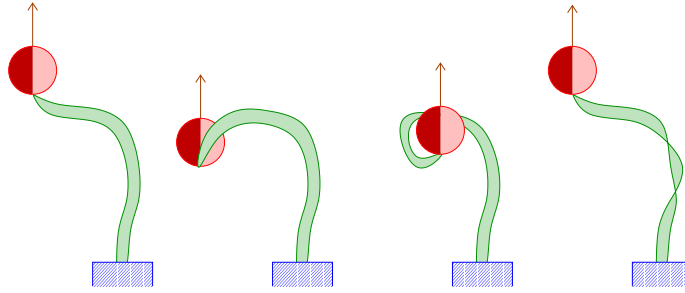


fig. 1.8: *Supertour induit par le mouvement de la bille. La bille ne tourne pas au cours des différentes étapes, mais son mouvement modifie l'angle de supertour de $\pm 4\pi$. Au cours du mouvement l'axe vertical passant par le centre de la bille coupe la molécule.*

de l'angle de supertour est directe. Cependant il ne faut pas négliger la possibilité pour la bille de passer « sous » la molécule (voir la figure 1.8). Ce mouvement a le même effet sur la molécule qu'une rotation de deux tours de la bille, alors que celle-ci *ne tourne pas*. Il faut noter que l'axe vertical passant par le centre de la bille coupe la molécule au cours de ce mouvement.

Notons a la taille de la bille. Pour effectuer le mouvement de la figure 1.8 elle doit se déplacer sur une distance de l'ordre de a . En l'absence de force, le temps caractéristique d'un tel mouvement est donné par

$$t \sim \frac{a^3 \eta}{k_B T} \quad (\text{I-1.2})$$

et pour une bille de taille micrométrique, ce temps est de l'ordre de plusieurs secondes. Si l'on applique une force F sur la bille, ce temps caractéristique évolue comme $\exp(Fa/k_B T)^*$. La force caractéristique $F_a = k_B T/a$ est de l'ordre du femtonewton, et pour des forces de quelques F_a ce processus est supprimé. Nous n'en tiendrons pas compte au cours de notre étude.

* La force totale exercée sur la bille est $F_{\text{totale}} \sim \eta a v + F$ avec $v \sim a/t$. Le travail de cette force étant de l'ordre de $k_B T$ on a

$$\frac{\eta a^3}{t} \simeq k_B T - F a \simeq k_B T \exp\left(-\frac{F a}{k_B T}\right).$$

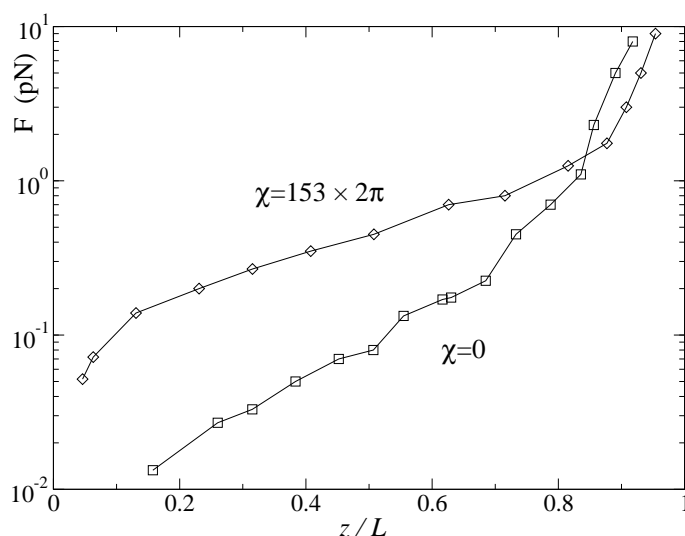


fig. 1.9: Deux courbes de relation force–extension mesurées sur une molécule d’ADN de longueur $L = 2,9 \mu\text{m}$. La courbe avec les symboles \square a été obtenue à partir d’une molécule à laquelle on n’a pas fait subir de supertour ($\chi = 0$) et la courbe avec les symboles \diamond a été obtenue après avoir fait subir à la bille 153 tours. D’après (Allemand, 1997).

1.2.c Résultats expérimentaux

Les deux courbes de la figure 1.9 présentent la relation force–extension pour une même molécule d’ADN surenroulée ou non. L’interprétation de ces courbes sera possible quand nous aurons construit un modèle pour décrire l’ADN et que nous aurons élaboré une théorie physique. C’est l’objectif des deux prochains chapitres.

1.3 Objectifs de la thèse

Nous nous intéressons au comportement physique de la molécule d’ADN lors des expériences de manipulation de molécules uniques. Notre travail consiste dans un premier temps à modéliser la double hélice d’un point de vue mathématique. Nous utilisons pour cela des concepts empruntés à la topologie et à la géométrie que nous adaptons à nos besoins. Cette construction est effectuée dans le chapitre suivant. Il ressort de ce travail préliminaire que le concept de vrille, que nous définissons dans la section 2.3, est crucial pour remplir notre objectif, car les fluctuations de la vrille décrivent les fluctuations thermiques la géométrie de la molécule. La formulation

mathématique de la vrille est l’objet d’un travail attentif, en particulier on montre que la formule dite de Fuller n’est pas générale.

Nous présentons dans le chapitre 3 les différents modèles de la théorie des polymères auxquels nous ferons appel pour interpréter nos résultats. On commence par chercher une description de la courbe de la figure 1.9. Le choix du modèle du ver s’impose, mais il ne prend pas en compte le supertour. On présente alors d’autres modèles cherchant à combler cette lacune. Celui de la tige élastique utilisant la formule de Fuller présente une divergence non physique. Il nous faut élucider l’origine de cette pathologie.

Nous présentons nos résultats numériques du calcul des fluctuations de la vrille dans le chapitre 4 en comparant les formules de Fuller et de Călugăreanu. Cette comparaison nous conduit à écarter la première. Nous étudions ensuite les fluctuations de la vrille en fonction de la longueur de la molécule et de la force imposée. De façon surprenante, il apparaît un épaulement dans cette dernière dépendance. Nous étudions la convergence de cet épaulement avec la longueur et nous expliquons son origine en introduisant la notion de segment retourné, dont le nombre reflète la quantité de boucle formées dans la chaîne.

Dans le chapitre 5, nous calculons un terme correctif à nos résultats du chapitre 4. La molécule d’ADN ne peut pas se croiser elle-même ce qui se traduit topologiquement par le fait que la configuration de nœud initiale est conservée. Nos simulations ne prennent pas cette restriction en compte. On introduit quelques notions de théorie des nœuds et on les emploie au tri des différentes conformations nouées pouvant apparaître dans les simulations. En introduisant la notion de vrille topologique, on est en mesure d’estimer la correction qu’il convient de faire aux résultats numériques du chapitre 4 pour prendre en compte la présence de nœuds parasites dans nos simulations.

Le chapitre 6 a pour but d’effectuer une analogie entre la molécule d’ADN et un rayon lumineux polarisé circulairement. On commence par quelques rappels d’optique puis on introduit la notion de diffusion multiple de la lumière et on montre que l’on a une analogie entre la rotation de la polarisation et l’enroulement de la double hélice de l’ADN dans un régime de diffusion multiple précis. Cette analogie nous permet de comprendre géométriquement le phénomène de perte de mémoire de la polarisation rectiligne en diffusion multiple ainsi que la formation de motifs à symétrie d’ordre quatre lorsque la lumière est observée en rétrodiffusion.