

lent d'autres molécules sur un brin d'ADN. Les biologistes disposent également de «scotch» moléculaire spécifique : la biotine présente ainsi une grande affinité pour l'avidine (une protéine), et la dioxygénine vient s'accrocher à son anticorps : l'anti-dioxygénine. Or on sait accrocher une molécule de biotine à une extrémité de l'ADN, et une dioxygénine à l'autre extrémité. L'ADN ainsi préparé se lie spontanément à une bille couverte d'avidine, d'un côté, tandis qu'il se lie à une surface couverte d'anti-dioxygénine de l'autre côté. Toutes les expériences que nous allons considérer utilisent de telles fixations.

On s'attend à détecter deux régimes d'élasticité de l'ADN : un régime élastique à hautes forces, où la molécule est complètement étirée et où la force appliquée à la molécule conduit à des déformations élastiques, réversibles : dans ce régime, l'ADN réagit comme un ressort d'acier.

Le second régime est celui des forces faibles : les nombreux chocs des molécules d'eau contre la molécule d'ADN replient cette dernière en une pelote qui fluctue sans cesse ; quand on étire cette pelote, les chocs perpendiculaires à la direction d'étirement sont plus efficaces que ceux qui s'exercent dans la direction d'étirement et tendent à raccourcir la molécule, ce qui conduit à une élasticité du même type que celle qui est responsable des spectaculaires propriétés élastiques du caoutchouc (on décrit également cette force par la notion d'entropie : dans la configuration naturelle, les fluctuations conduisent à un désordre, ou entropie, maxi-

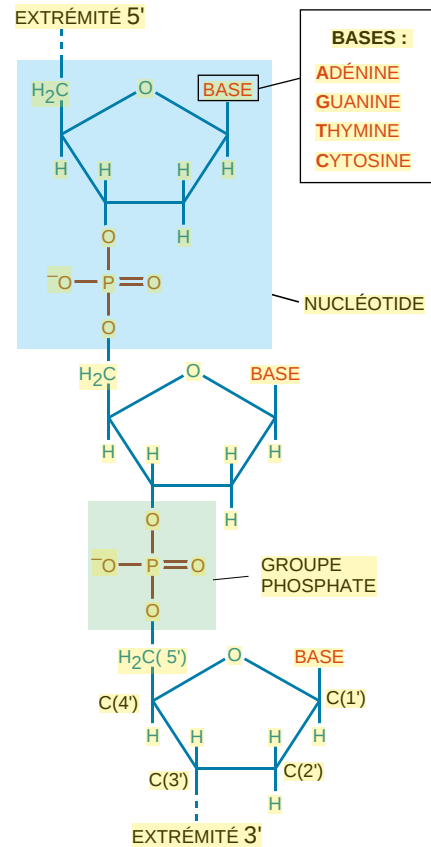
mal ; dans la configuration étirée, l'allongement de la molécule réduit le désordre moléculaire).

Tant que l'extension de la molécule d'ADN est faible, seule l'élasticité entropique joue un rôle, mais dès que cette extension est du même ordre de grandeur que la longueur de la molécule, l'élasticité intrinsèque des liaisons chimiques domine. La transition entre les deux régimes se fait pour une force de dix piconewtons environ (dix millièmes de milliardième de newton).

L'ADN étiré

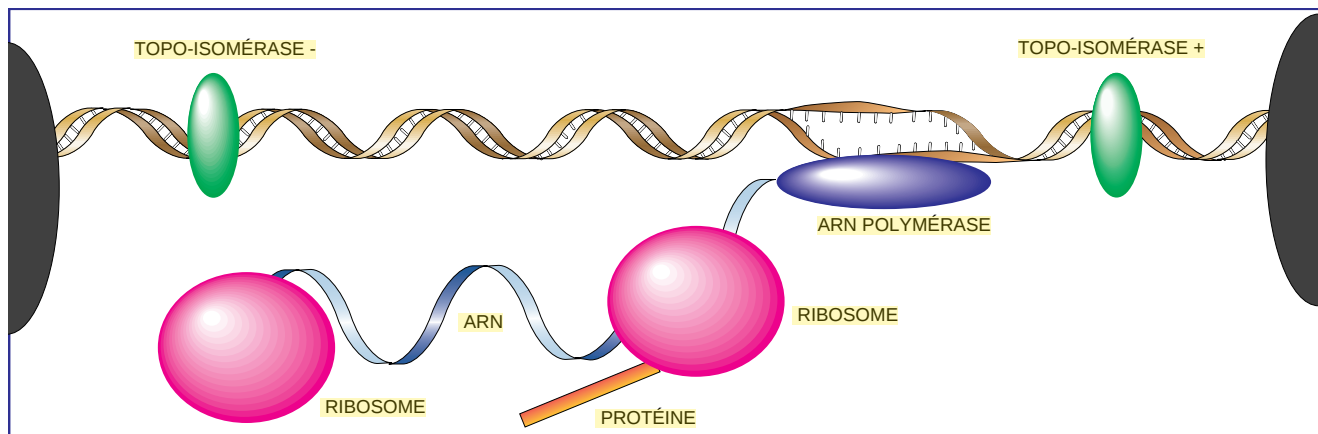
Les premières mesures de ce type ont été effectuées en 1992, par Carlos Bustamante et ses collègues de l'Université de l'Oregon. Ils utilisaient une combinaison de forces hydrodynamiques et magnétiques exercées sur une bille magnétique ; celle-ci était fixée à l'extrémité d'un brin d'ADN qui était attaché par l'autre extrémité à une lamelle de microscope. La bille était ainsi soumise à trois forces : une force hydrodynamique créée par l'écoulement d'un liquide, une force magnétique créée par un aimant, et la force d'élasticité de l'ADN. En variant la force hydrodynamique, les physiciens américains ont observé que la bille prenait diverses positions d'équilibre à partir desquelles ils ont constitué un diagramme où l'extension était portée en fonction de la force.

Ce type d'expériences nécessite des calibrations (pour chaque type de forces) difficiles, notamment en raison des interactions de l'ADN, de la bille



4. CHAQUE BRIN de la molécule d'ADN est un enchaînement de nucléotides. Les nucléotides sont composés d'un sucre nommé désoxyribose (cycles pentagonaux), d'un groupe phosphate (en vert) et d'une base. L'appariement des bases complémentaires A et T, et G et C, permet de lier deux brins ensemble, formant ainsi une double hélice.

et des parois. Néanmoins ces expériences ont une remarquable sensibilité dans le domaine des très faibles forces (inférieures à un piconewton). Les essais de traction sur l'ADN se terminent souvent lorsque la liaison la



5. DIVERSES ENZYMES modifient l'enroulement de l'ADN. Les enzymes ARN polymérases (en bleu) fabriquent un brin d'ARN en ouvrant localement la double hélice et en assemblant des nucléotides à la chaîne d'ARN en croissance. Des complexes d'acides nucléiques et de protéines nommés ribosomes (en rouge) se lient à cet ARN pour

assembler les protéines codées par les gènes. Comme l'ADN est généralement tenu à ses extrémités, et comme l'ARN polymérase a une forte inertie, la chaîne d'ADN est entortillée par la transcription. Des enzymes nommées topo-isomérases, devant et derrière l'ARN polymérase, ouvrent l'ADN et le détortillent.

plus faible cède : c'est généralement la liaison de l'ADN à la surface. Toutefois une technique de «peignage moléculaire», que nous avons récemment mise au point, donne accès à la force de rupture de la molécule. Cette technique utilise des surfaces spécialement traitées, sur lesquelles l'ADN s'ancré spontanément par ses extrémités. Lorsque la solution aqueuse où baigne l'ADN s'évapore, la partie de la molécule en solution est entraînée par le déplacement de l'interface eau-air (ménisque), car l'ADN, hydrophile, se place plutôt dans l'eau que dans l'air. La partie de la molécule qui se trouve derrière cette interface (à l'air) adhère fortement à la surface après s'être alignée perpendiculairement au ménisque, comme les algues sur la plage quand la marée descend. En marquant l'ADN par une sonde fluorescente, on visualise les molécules ainsi étirées. Par cette technique, nous avons ainsi montré qu'une molécule s'allonge plus de deux fois avant de casser, lorsque l'intensité de la force attei-

gnait 500 piconewtons. Nous avons également étudié l'ADN dans son régime élastique à «haute force» jusqu'à la rupture de sa liaison avec la surface. Le principe de ces nouvelles expériences est inspiré des techniques utilisées en microscopie à force atomique, et des mesures réalisées sur les protéines mus-

culaires par T. Yanagida et ses collègues de l'Université d'Osaka : on fixe une des extrémités d'un brin d'ADN à un ressort de rigidité connue et l'autre extrémité à une bille dont on commande la position, afin de définir l'extension du brin.

En pratique, le ressort est une fibre optique dont on mesure la flexion. La constante de rigidité de la fibre est imposée par sa forme (diamètre et longueur). Par une attaque chimique, on peut réduire le diamètre de la fibre jusqu'à dix micromètres (ou millièmes de mètre). Pour déterminer sa flexion, nous envoyons un faisceau laser dans la fibre, dont l'extrémité apparaît comme un point lumineux intense, dont on mesure le déplacement à l'aide d'une photodiode située derrière un microscope. Grâce à l'agrandissement dû au microscope, on obtient aisément une sensibilité dans les mesures de déplacement de l'ordre du nanomètre (milliardième de mètre). On commande l'extension de l'ADN en déplaçant la bille à l'aide d'un micromanipulateur piézo-électrique sur lequel est fixé une pipette qui tient la bille par aspiration.

Le micromanipulateur permet de déplacer la bille sur des distances de 20 micromètres, à 20 nanomètres près. Un micro-ordinateur impose les déplacements de la bille tout en enregistrant la position de la fibre.

Plusieurs précautions sont à prendre pour réaliser des expériences contrôlées et reproductibles. Tout d'abord, les expériences doivent être réalisées dans des cellules thermostatées de petite dimension, afin de limiter la convection du fluide où se déroulent les expériences. Celles-ci ayant lieu en milieu ouvert, il est également utile de placer, à la surface libre du liquide, une mince couche d'une huile visqueuse qui évite toute évaporation. Il faut également isoler le dispositif expérimental des vibrations extérieures.

Les mesures révèlent un résultat inattendu : l'existence d'une transition

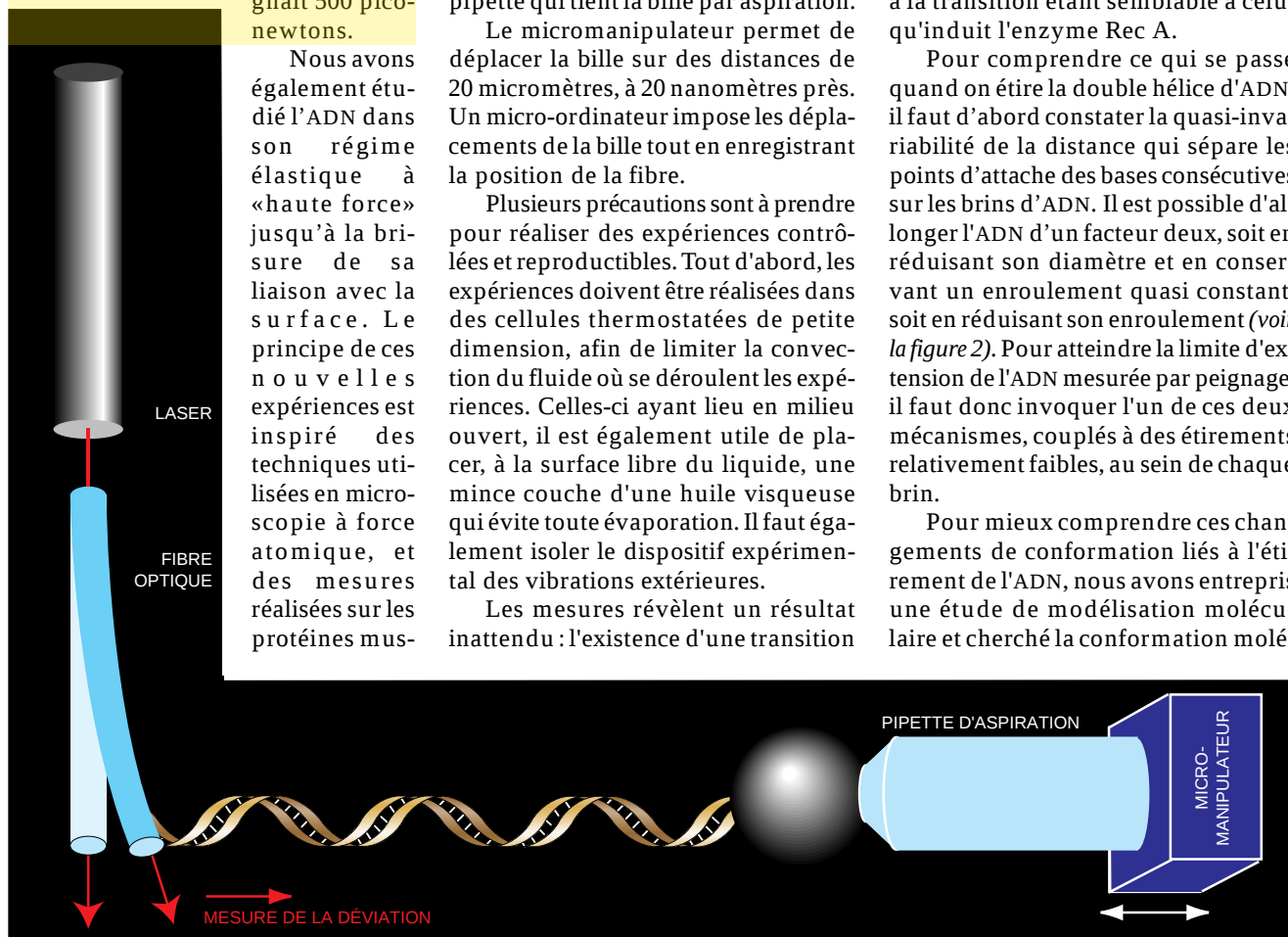
de structure de l'ADN, lorsque l'extension est supérieure à la longueur normale de la molécule. Cette transition se traduit par une extension de la molécule, lorsque la force appliquée reste quasi constante et égale à 70 piconewtons ; elle disparaît si l'on réalise la même expérience en présence de bromure d'éthidium, un composé qui, en s'insérant entre deux paires de bases, allonge la double hélice, redresse ses montants et change l'hélicité de l'ADN.

Modélisation de l'étirement

Par ordinateur, on a modélisé l'extension observée et confirmé qu'elle révèle la présence d'une forme étirée, où les bases restent appariées, mais s'inclinent le long de l'axe d'étirement, jusqu'à devenir presque parallèle à lui. Simultanément le grand sillon s'ouvre, ce qui favorise l'accès aux bases. Ce résultat pourrait être important pour comprendre certains phénomènes de reconnaissance d'acides nucléiques, l'allongement dû à la transition étant semblable à celui qu'induit l'enzyme Rec A.

Pour comprendre ce qui se passe quand on étire la double hélice d'ADN, il faut d'abord constater la quasi-invariabilité de la distance qui sépare les points d'attache des bases consécutives sur les brins d'ADN. Il est possible d'allonger l'ADN d'un facteur deux, soit en réduisant son diamètre et en conservant un enroulement quasi constant, soit en réduisant son enroulement (voir la figure 2). Pour atteindre la limite d'extension de l'ADN mesurée par peignage, il faut donc invoquer l'un de ces deux mécanismes, couplés à des étirements relativement faibles, au sein de chaque brin.

Pour mieux comprendre ces changements de conformation liés à l'étirement de l'ADN, nous avons entrepris une étude de modélisation moléculaire et cherché la conformation molé-



6. ON MESURE l'allongement de l'ADN en le couplant à une fibre optique, d'un côté, et à une bille métallique, de l'autre. On aspire

alors la bille à l'aide d'une pipette actionnée par un micromanipulateur à cristal piézo-électrique.