

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

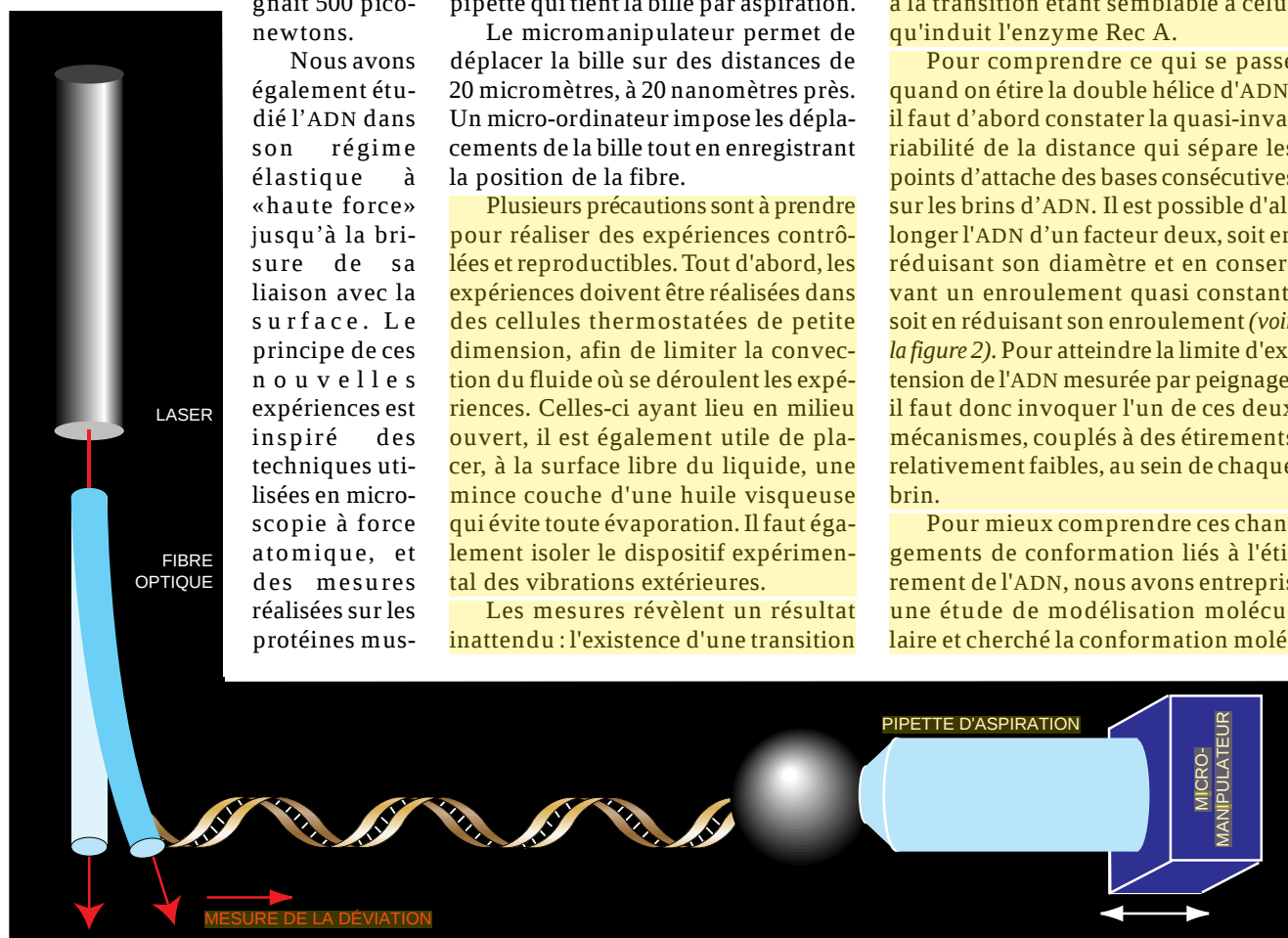
de structure de l'ADN, lorsque l'extension est supérieure à la longueur normale de la molécule. Cette transition se traduit par une extension de la molécule, lorsque la force appliquée reste quasi constante et égale à 70 piconewtons ; elle disparaît si l'on réalise la même expérience en présence de bromure 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.

culaire la plus stable en fonction de la longueur de l'ADN, de sa séquence de bases et de la façon de l'étirer. Nous avons simulé l'étirement d'ADN ayant des séquences simples et répétitives (par exemple, *GCGCGCGC...* ou *ATA-TATAT...*). Notons tout d'abord que, selon les extrémités des brins que l'on tire, la molécule peut se déformer différemment. Ainsi, si l'on étire deux extrémités n'appartenant pas au même brin, les paires de bases s'inclinent dans la direction de ces extrémités. Les extrémités des brins sont notées 5' et 3' selon l'orientation des sucres, comme indiqué dans la figure 4. Puisque les deux brins de l'ADN sont antiparallèles, chaque bout de la molécule comporte une extrémité 5' et une extrémité 3'.

Quand on étire l'ADN par les deux extrémités 3', l'hélice s'allonge principalement en se déroulant, et les paires de base se séparent le long de l'axe de la molécule. Pendant l'étirement, les bases restent quasi perpendiculaires à l'axe de la double hélice, et la conformation finale ressemble à une échelle droite, avec les paires de base au centre, et les bords formés par les brins désoxyribose-phosphate. Au-delà d'une extension supérieure à 2,1, les brins ne peuvent plus s'allonger et les liaisons entre les paires de base cèdent.

Quand on étire l'ADN par les deux extrémités 5', la déformation de la double hélice résulte principalement d'une réduction de diamètre, en raison d'une forte inclinaison des bases. L'ADN ainsi étiré ressemble à une fibre mince, la déformation rapprochant les deux brins désoxyribose-phosphate sur le côté du petit sillon de la molécule et exposant les bases du côté du grand sillon. Elle conduit également à la rupture progressive des liaisons entre les paires de base et, comme dans le cas de l'étirement par les extrémités 3', les paires de bases sont complètement séparées au-delà d'une extension d'un facteur supérieur à 2,1.

Enfin, quand on étire les deux extrémités d'un même brin, ou les deux brins simultanément, la conformation finale ressemble soit à la conformation obtenue par traction sur les deux extrémités 5', soit à la conformation obtenue par traction sur les extrémités 3', selon la séquence des bases. Quelle que soit la façon d'étirer l'ADN, la modélisation confirme que l'extension est principalement associée

au repositionnement relatif des deux brins de la double hélice. Le changement de conformation interne des brins résulte de deux phénomènes : une augmentation de certains angles que font les liaisons entre les atomes de carbone, d'oxygène et de phosphore ; une rotation autour de la liaison entre le sucre et la base (angle glycosidique) qui permet la réorientation des bases par rapport au brin.

Du point de vue énergétique, l'étirement par les extrémités 5' semble plus facile que l'étirement par les extrémités 3', car il conserve mieux l'empilement des paires de bases.

La superhélicité

Nos études de la superhélicité de l'ADN s'inspirent, enfin, de celles de C. Bustamante, mais avec la possibilité d'ajouter une torsion à la molécule. Elles apportent, par ailleurs, des améliorations qui en étendent et simplifient l'analyse, permettant l'accès direct au diagramme force-extension, sans calibrage des forces.

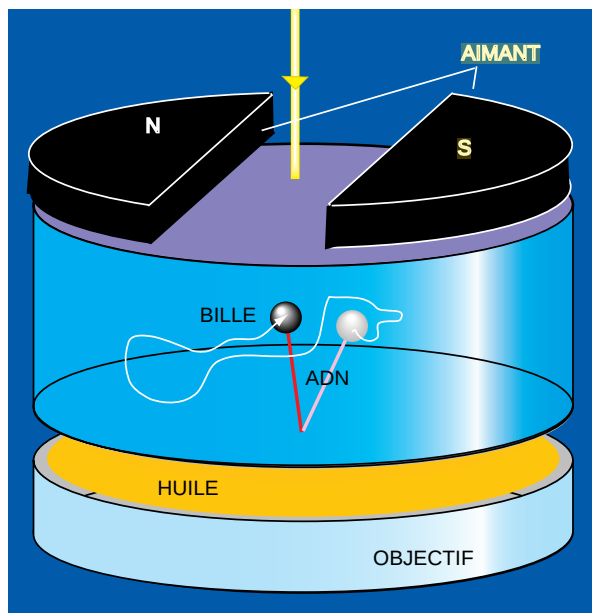
La molécule d'ADN étant ancrée par une de ses extrémités à une surface, l'autre extrémité est tirée par une microbille magnétique (l'ancrage est ici réalisé en plusieurs points, de sorte que l'extrémité ancrée ne puisse pas tourner par rapport à la surface). En présence d'un aimant, la bille est soumise à une force magnétique d'autant plus grande que l'aimant est plus près. Toutefois la microbille se comporte comme une boussole : on peut la faire tourner en faisant tourner l'aimant. À l'aide du système représenté sur la figure 7, on peut alors tirer et enrouler simultanément l'ADN. On peut alors étudier l'élasticité de la molécule après l'avoir enroulée d'un nombre de tours déterminés.

En utilisant des billes de diverses grosseurs et des aimants qui focalisent le champ magnétique sur les billes, on peut exercer des forces comprises entre 0,005 et 100 piconewtons, gamme qui permet

d'étudier l'élasticité de la molécule aussi bien dans son régime entropique que dans son régime élastique. On mesure alors la force appliquée à la bille en observant le mouvement brownien de celle-ci : plus la force de traction sur la molécule d'ADN est grande, plus le mouvement brownien est de faible amplitude. En enregistrant les fluctuations thermiques de la bille grâce à un ordinateur, on réalise une mesure de force sans contact.

Cette technique a plusieurs avantages : comme il suffit d'observer, on peut étudier des échantillons fermés, à l'abri de toute contamination (celle de l'expérimentateur, notamment), et comme la force est inversement proportionnelle au carré des fluctuations, elle permet une très large gamme de mesures. Le seul inconvénient est la durée des mesures : pour estimer précisément les fluctuations, il faut enregistrer le mouvement brownien pendant plusieurs dizaines de minutes.

Ces études révèlent la dépendance de l'élasticité entropique d'une seule molécule d'ADN en fonction de l'enroulement. Comme notre expérience quotidienne avec des cordons de téléphone le montre, une molécule sur-enroulée ou sous-enroulée est plus rigide que la même molécule quand elle est relaxée. Lorsque la force de traction atteint 0,4 piconewton, indépen-



7. ON TORD ET ON ÉTIRE L'ADN dans une cellule où la molécule est fixée à sa base au fond de la cellule et liée, à l'autre extrémité, à une bille magnétique sur laquelle agit un champ magnétique. On détermine l'élasticité de la molécule d'ADN en étudiant le mouvement brownien de la bille.