

Physique des objets biologiques: du nanomètre au micron

Rémi Monasson

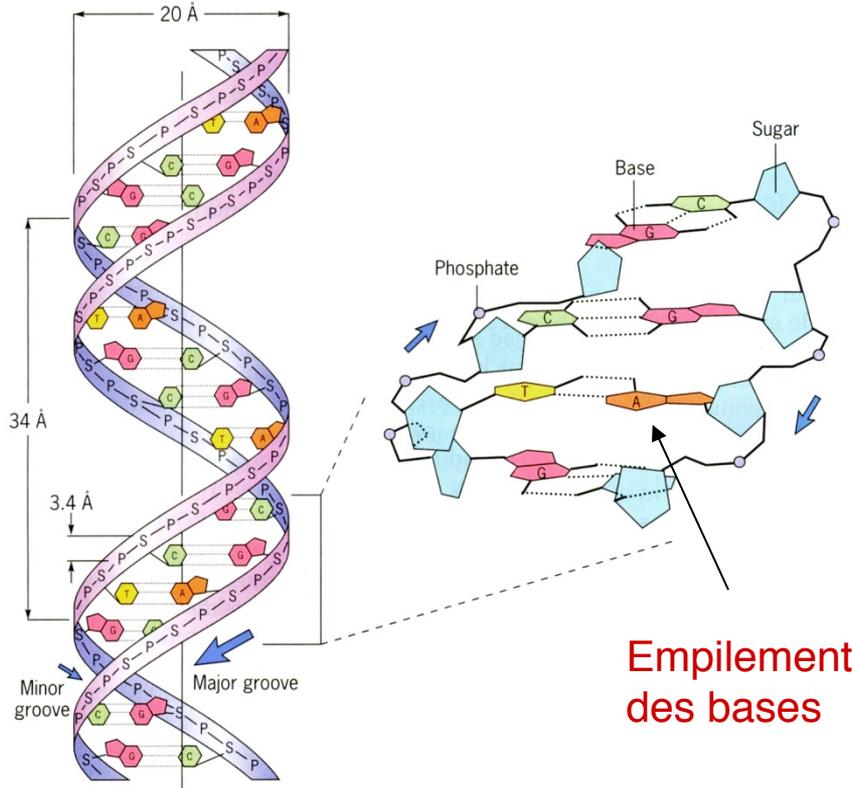
ADN et ARN : hybridation et élasticité

- 1 Introduction
- 2 Aux grandes échelles: élasticité
- 3 Aux petites échelles : hybridation
- 4 Dynamique

1. Introduction

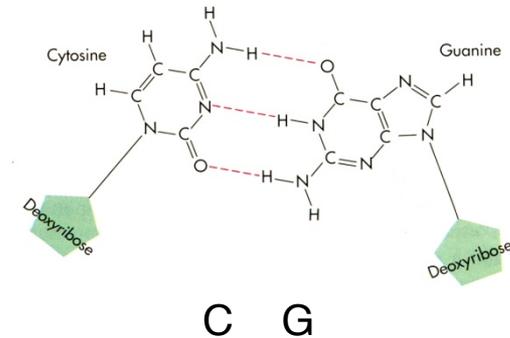
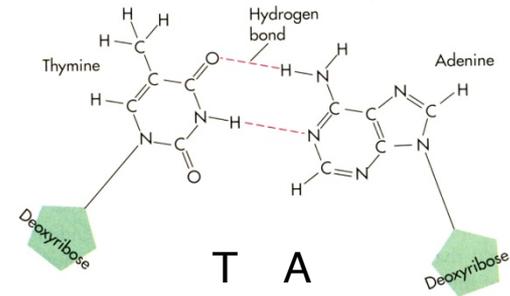
L'ADN : un assemblage spécifique de bases ...

Double hélice de l'ADN



Liaisons hydrogènes entre les bases

Pyrimidine - Purine



Information génétique: ...GTCAGTAAC...

.... avec les propriétés globales d'un polymère

ADN sur bicouche lipidique

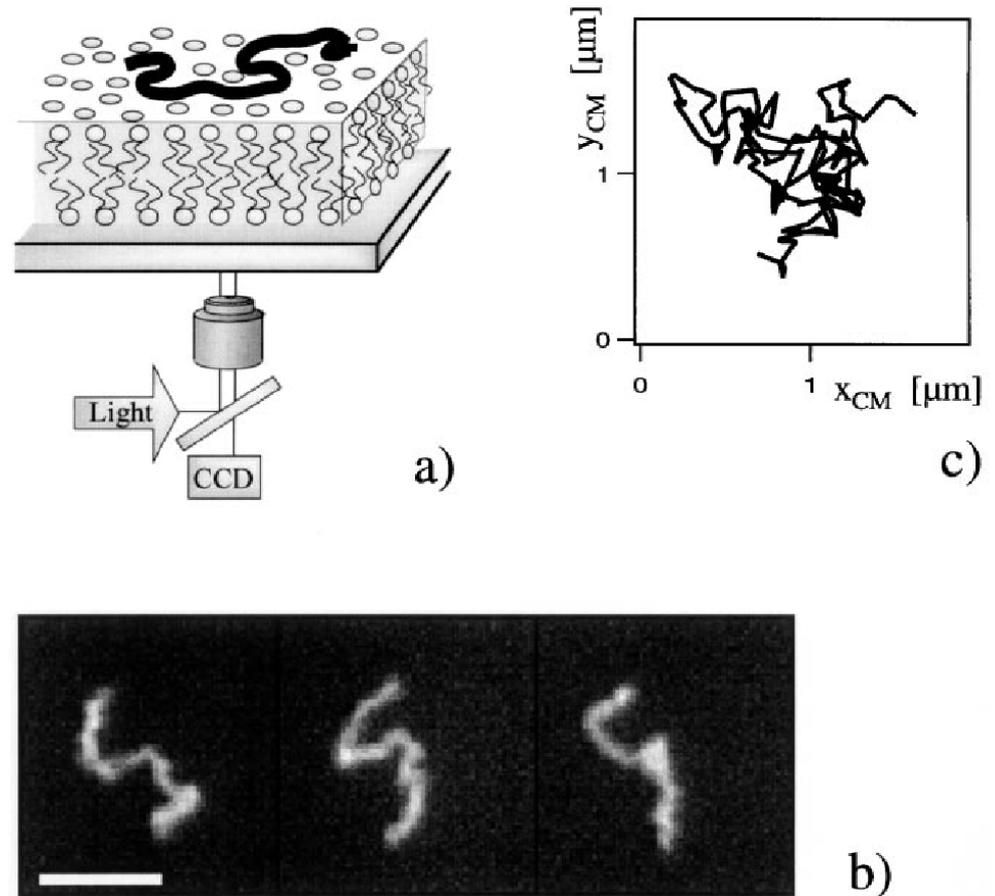


FIG. 1. Single λ -phage DNA molecule adsorbed onto a cationic lipid bilayer supported on a glass substrate. (a) Schematic (not to scale) sketch of the experimental setup. (b) Time series of fluorescence images at 2 sec intervals (bar represents 10 μm). (c) The center-of-mass motion of a 10.090 bp λ -DNA fragment following diffusive behavior.

À grande échelle : comportement d'un polymère élastique

-> caractérisation quantitative

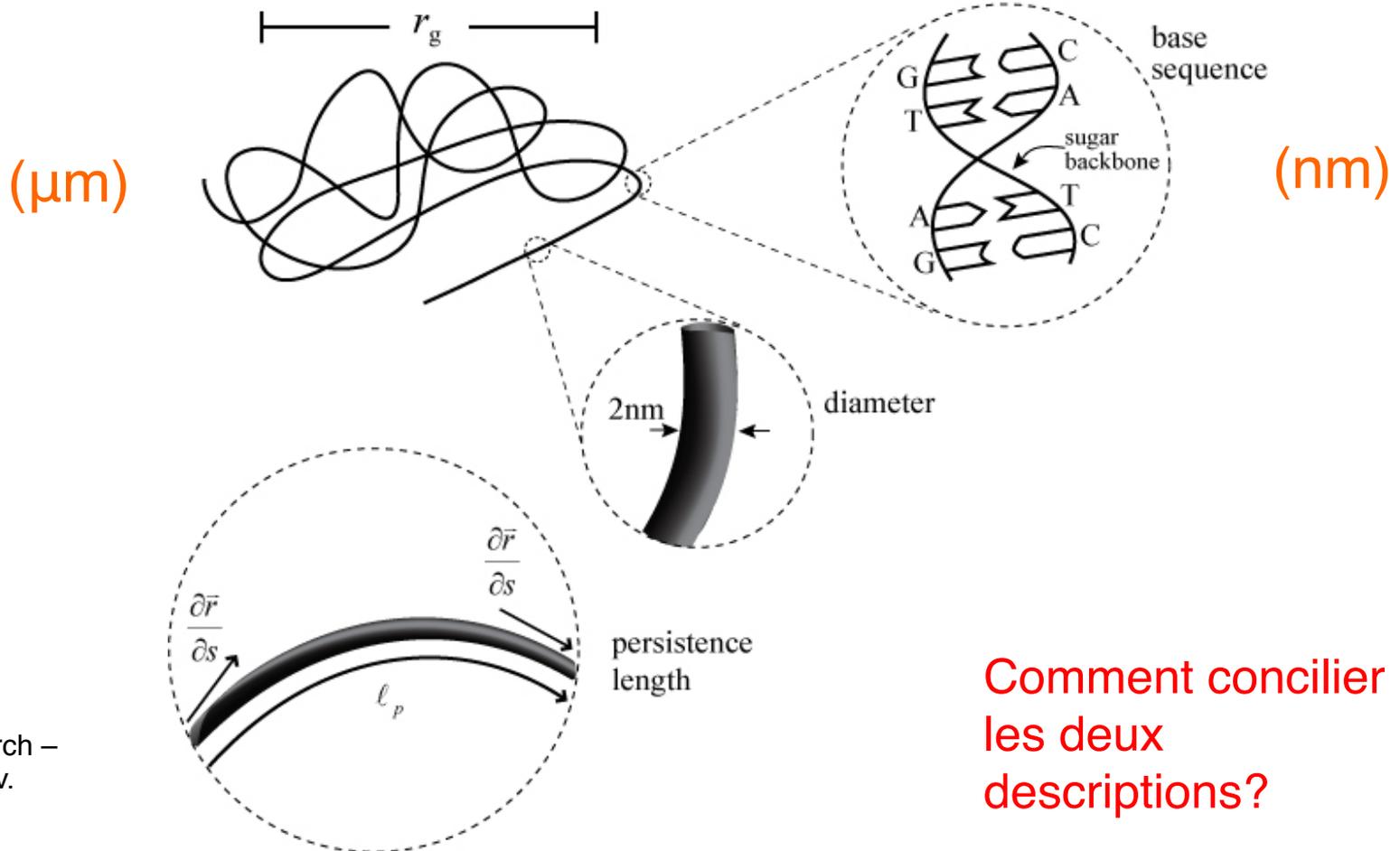
-> comportement

« universel » (indépendant de la séquence)

À petite échelle : hybridation des bases en paires

-> ouverture/fermeture locale

-> dépendance dans la séquence



Comment concilier
les deux
descriptions?

2. Description à petite échelle :

l'hybridation

Interactions spécifiques et non spécifiques, intermoléculaires et intramoléculaires:
-Compétition entre énergies de liaison et entropie

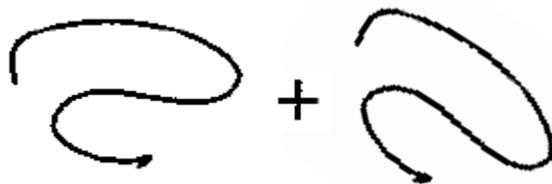
Interactions spécifiques jouent un rôle très important dans la cellule:

- Enzymes
- ARN catalytiques
- régulation de la transcription (cf. amphi)
- siARN (découvert en 1998!)
- ...

Comment mesurer, quantifier et modéliser un processus de reconnaissance spécifique entre biomolécules?

Ici: l'hybridation de l'ADN à l'équilibre thermodynamique.

A l'heure actuelle, c'est l'exemple le plus étudié et le mieux décrit de façon quantitative.



ADN simple brin

Hybridation
 \rightleftharpoons
Dénaturation
Fusion



ADN double brin

2- APPROCHES EXPERIMENTALES ET THEORIQUES

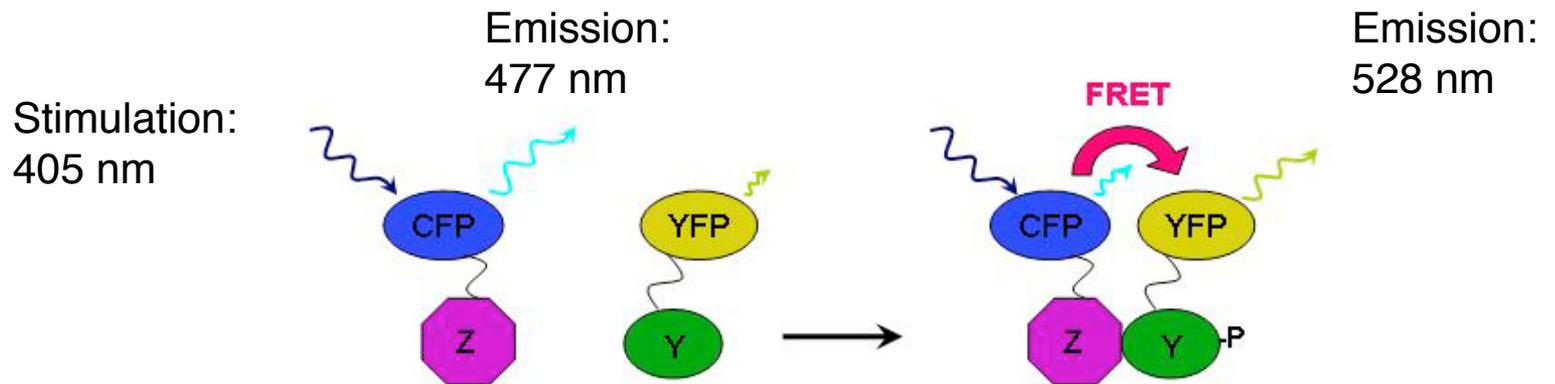
Plusieurs techniques de mesure

Principe: Mesurer la **fraction des bases appariées en fonction de la température**.

Un **signal dépendant du caractère ouvert ou fermé** peut être obtenu par plusieurs techniques:

Absorption UV (souvent 260 nm)

Fluorescence (FRET = fluorescence resonance energy transfer):



(si distance < 10 nm)

Une mesure typique

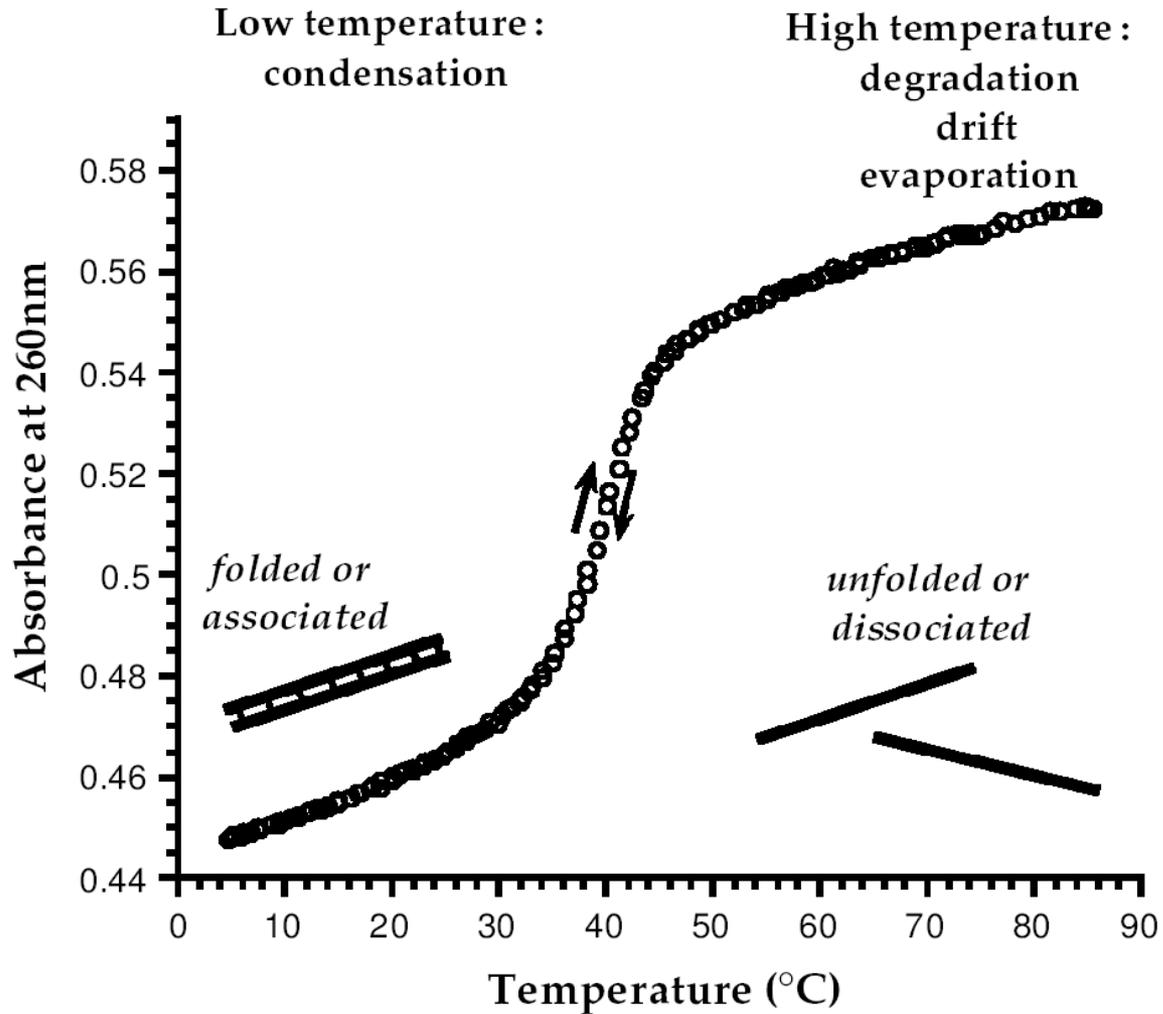
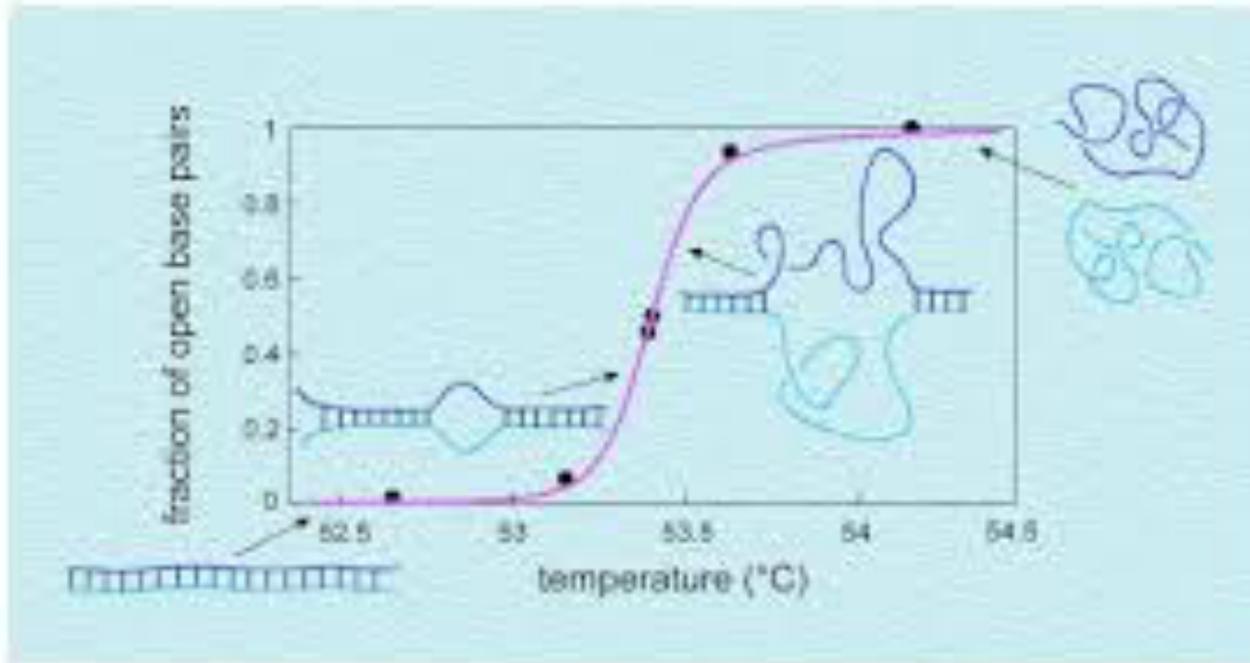


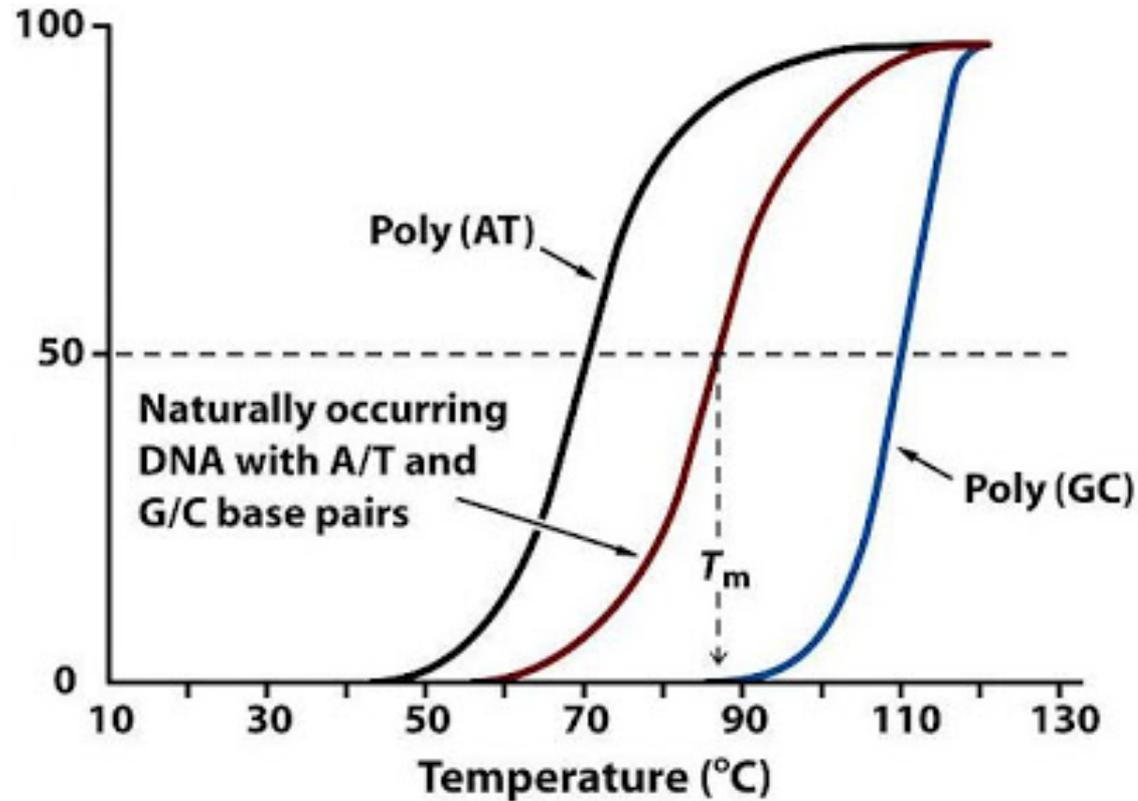
Schéma explicatif



- Possible car énergie libre de liaison H $\sim 1-2$ kT
- AT = 2 liaisons H, GC = 3 liaisons H \rightarrow dépendance en la séquence!

Dépendance dans la séquence

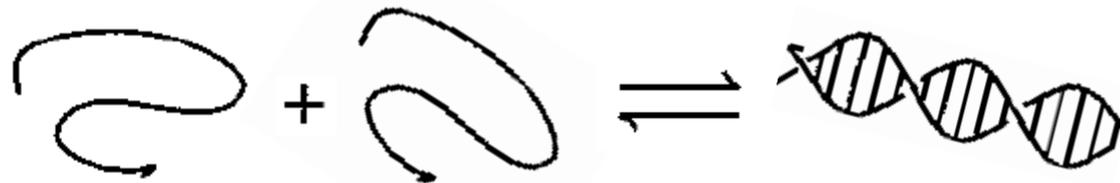
L.A.Rowland,
Univ. of Toronto



La température de dénaturation est une fonction croissante de la fraction de paires GC

Description thermodynamique

d'une équilibre chimique entre deux états



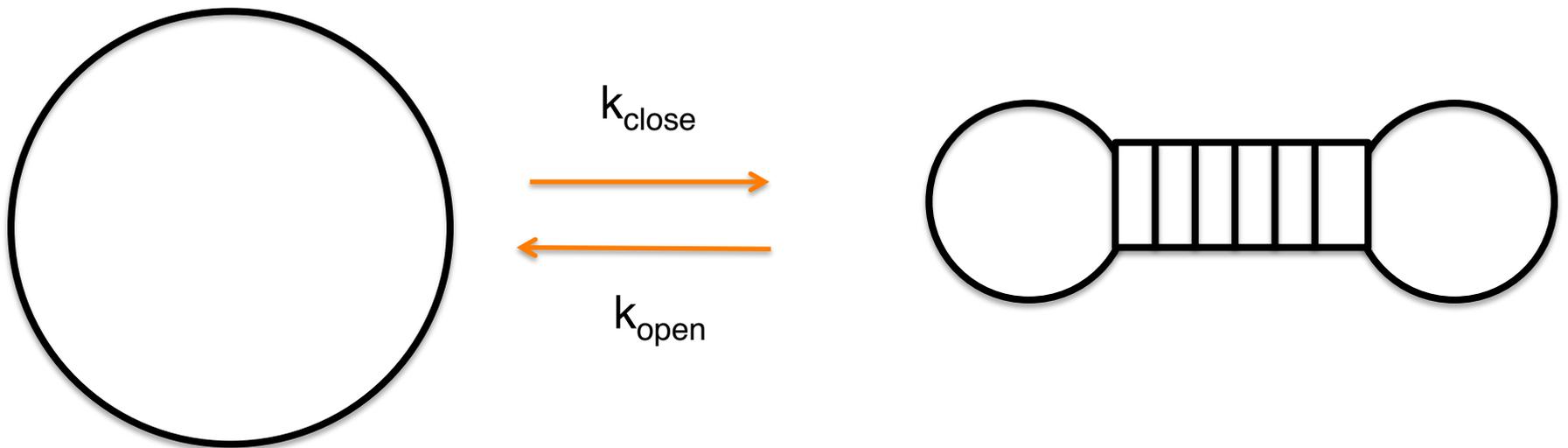
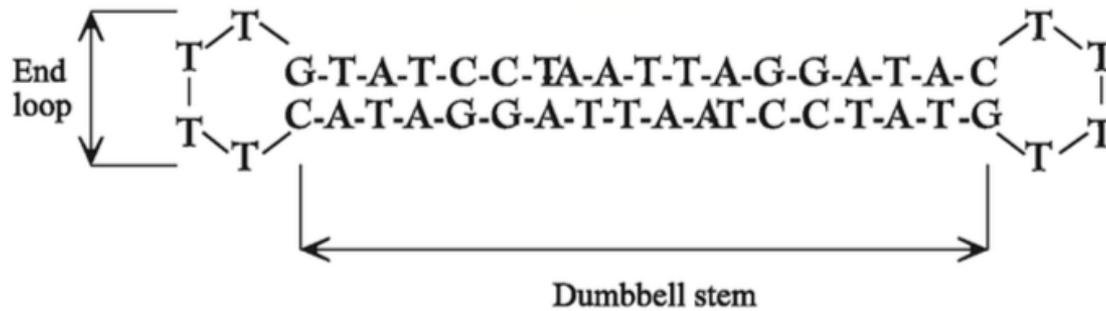
ADN simple brin

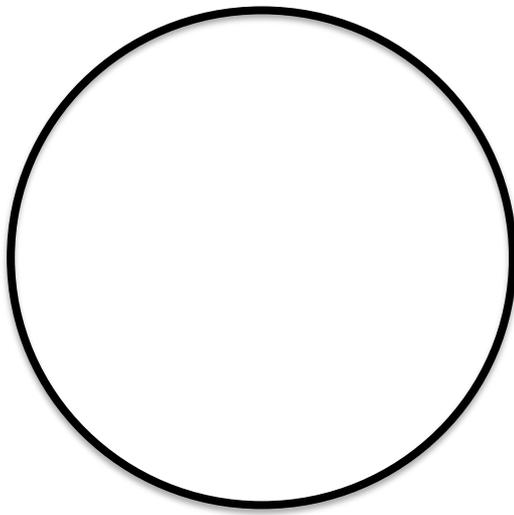
ADN double brin

EN SOLUTION

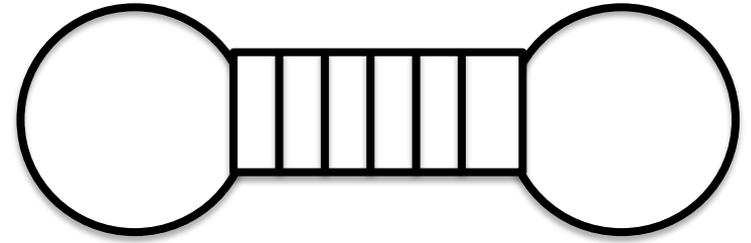
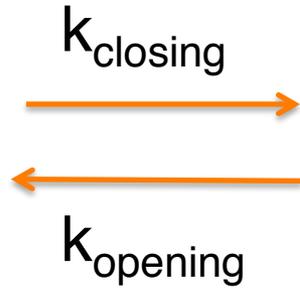
Systeme à deux états :

Exemple d'une haltère d'ADN





Energie H_{open} , Entropie S_{open}



Energie H_{closed} , Entropie S_{closed}

$$\Delta H = H_{\text{closed}} - H_{\text{open}} < 0$$
$$\Delta S = S_{\text{closed}} - S_{\text{open}} < 0$$

Fraction du temps
passée dans l'état
fermé :

$$\theta = \frac{e^{-\Delta G/kT}}{1 + e^{-\Delta G/kT}}$$

avec $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$

$$T_{\text{melting}} = \Delta H / \Delta S$$

BILAN DU MODELE A DEUX ETATS

Equilibre chimique $K_D = e^{-\frac{\Delta H - T\Delta S}{kT}}$

Bimoléculaire		Intramoléculaire
non-auto-complémentaire	auto-complémentaire	
$S_1 + S_2 \rightleftharpoons D$	$2S \rightleftharpoons D$	$S \rightleftharpoons D$
$K_D = \frac{2\theta}{c_T (1 - \theta)^2}$	$\frac{\theta}{2c_T (1 - \theta)^2}$	$\frac{\theta}{1 - \theta}$
$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + k \ln \frac{c_T}{4}}$	$\frac{\Delta H}{\Delta S + k \ln c_T}$	$\frac{\Delta H}{\Delta S}$
$\Delta H = 6kT_m^2 \left. \frac{\partial \theta}{\partial T} \right _{T=T_m}$		$4kT_m^2 \left. \frac{\partial \theta}{\partial T} \right _{T=T_m}$

COMPARAISON AUX DONNEES EXPERIMENTALES

Forme de $\Theta(T)$: constance de ΔH et ΔS

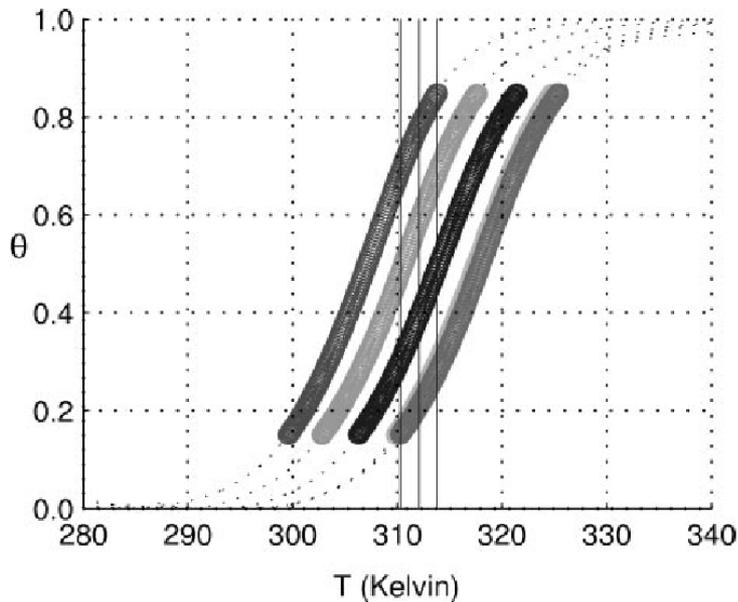
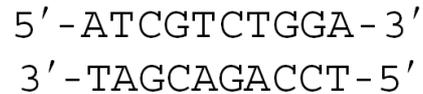


Fig. 1. Melting curves for the 10-bp DNA duplex oligomer (ODN1, $f_{GC} = 0.50$) (f_{GC} , fraction of G-C base pairs in the duplex) 5'-ATCGTCTGGA-3' (at a C_t of 2×10^{-6} M) in solutions of sodium concentrations (left to right curves) 0.069, 0.12, 0.22, 0.62, and 1.0 M. The thick black curves span a range of θ from 0.15 to 0.85, where the data are the most accurate. The central vertical line through the curves shows the temperature chosen.

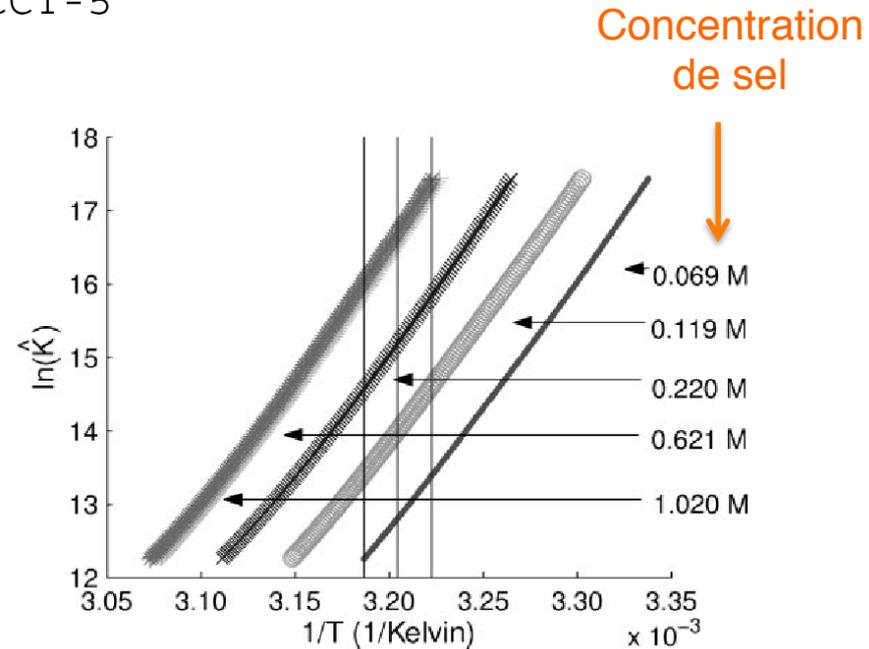
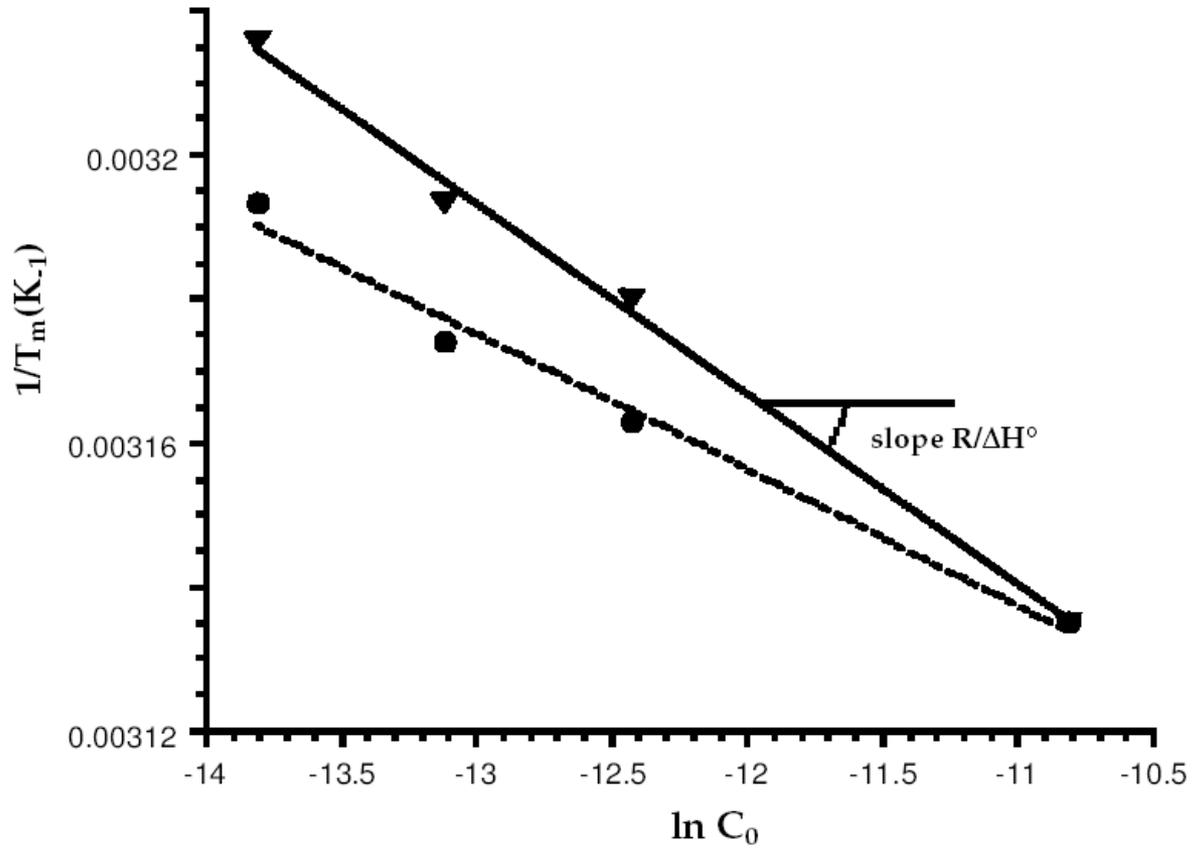
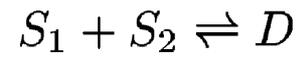


Fig. 2. Plots of $\ln \hat{K}$ vs. $1/T$ for the five Na^+ concentrations (mol/liter) for ODN1.

Effet de concentration



Prédire l'hybridation et les structures secondaires de l'ADN et l'ARN à partir de la séquence:

MODELE DU PREMIER VOISIN

Dans des conditions expérimentales appropriées, les deux représentations des données

$$\begin{array}{l} \ln K \quad \text{versus} \quad 1/T \\ 1/T_m \quad \text{versus} \quad \ln C_T \end{array}$$

permettent de déterminer ΔH et ΔS avec une bonne précision.

Ainsi, 108 oligonucléotides de tailles et séquences variables ont été analysés. 10 paramètres ont été dérivés par régression linéaire.

Ces études ont permis le développement d'un modèle qui permet de calculer ΔH et ΔS pour l'interaction entre des brins d'ADN en fonction de la séquence et en fonction des concentrations en ADN et en sel monovalent.

TABLE 1 Nearest-neighbor thermodynamic parameters for DNA Watson-Crick pairs in 1 M NaCl^a

Propagation sequence	ΔH° (kcal mol ⁻¹)	ΔS° (e.u.) = 10 ⁻³ kcal/(mol K)	ΔG_{37}° (kcal mol ⁻¹)
AA/TT	-7.6	-21.3	-1.00
AT/TA	-7.2	-20.4	-0.88
TA/AT	-7.2	-21.3	-0.58
CA/GT	-8.5	-22.7	-1.45
GT/CA	-8.4	-22.4	-1.44
CT/GA	-7.8	-21.0	-1.28
GA/CT	-8.2	-22.2	-1.30
CG/GC	-10.6	-27.2	-2.17
GC/CG	-9.8	-24.4	-2.24
GG/CC	-8.0	-19.9	-1.84

10 paires
différentes



23 kcal/mol = 1 eV = 40 kT_{300K}

Bonne corrélation entre expérience et théorie

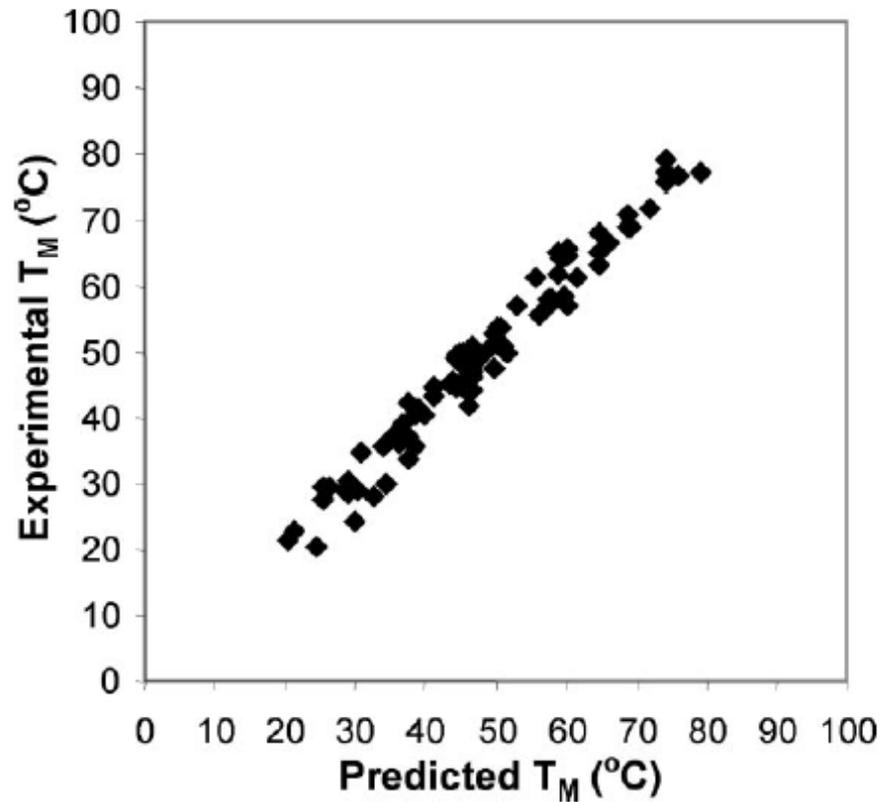


Figure 3 Experimental T_M versus predicted T_M for 81 duplexes 6 to 24 bp in length in solutions ranging from 0.01 to 0.5 M NaCl. Linear regression gives a slope of 1.02, intercept of 0.11, and $R^2 = 0.97$. The average absolute deviation is 2.3°C .

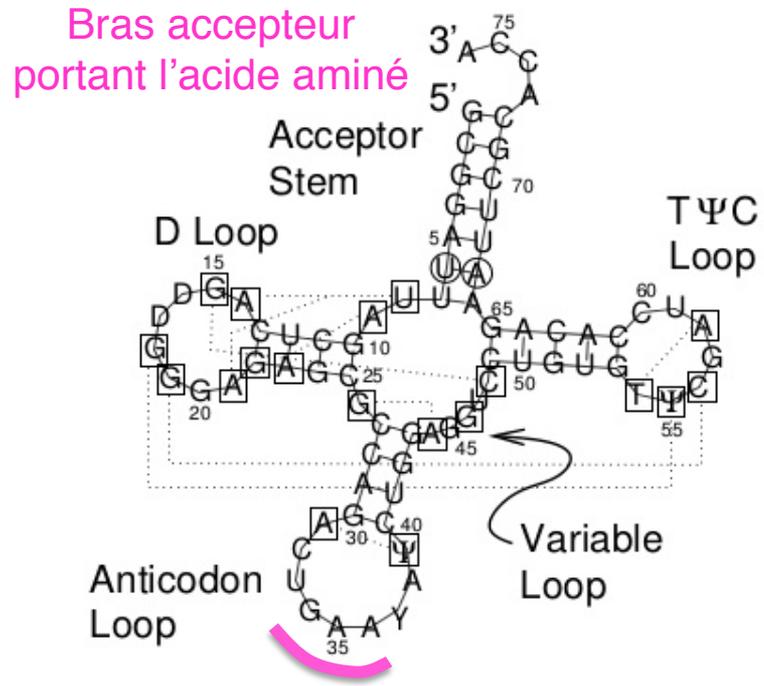
Application : structure secondaire de l'ARN

ARN de transfert

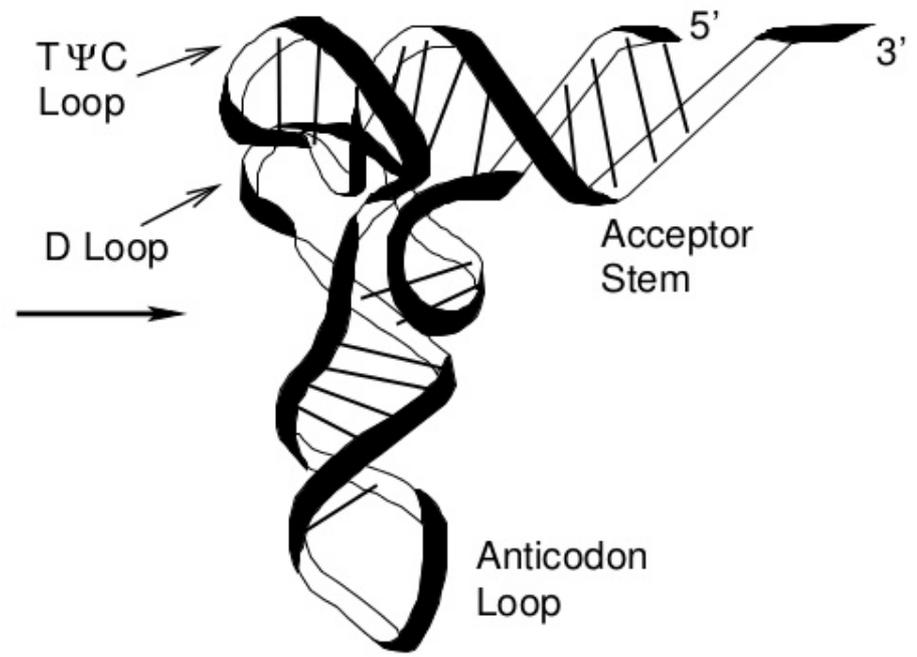
Primary Structure

5' GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGACUGAAAYΨCUGGAGGUCCUGUGTΨCGAUCCACAGAAUUCGCACCA 3'

Secondary Structure



Tertiary Structure

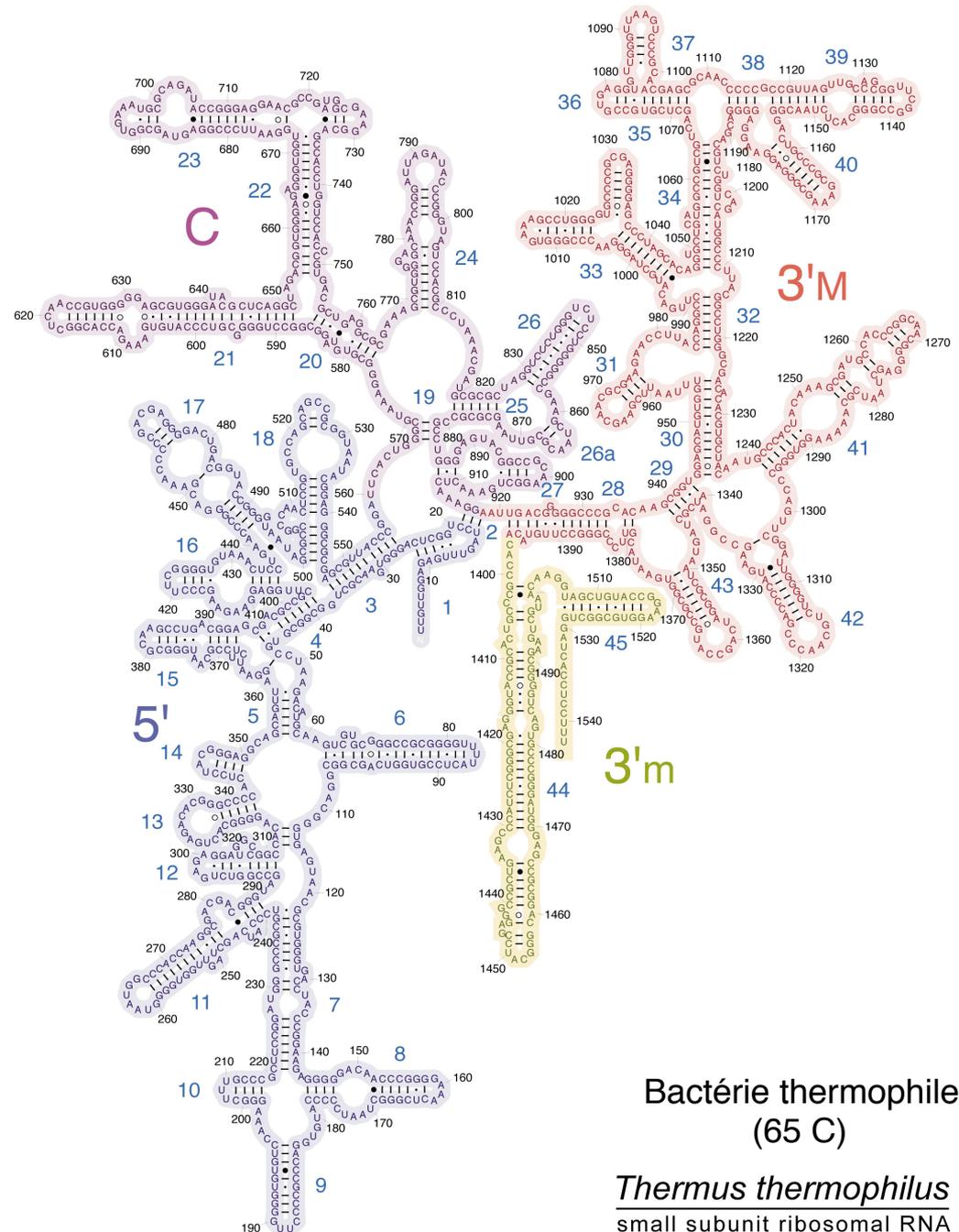


[Paul Gardner, Visualising RNA]

Application : structure secondaire de l'ARN

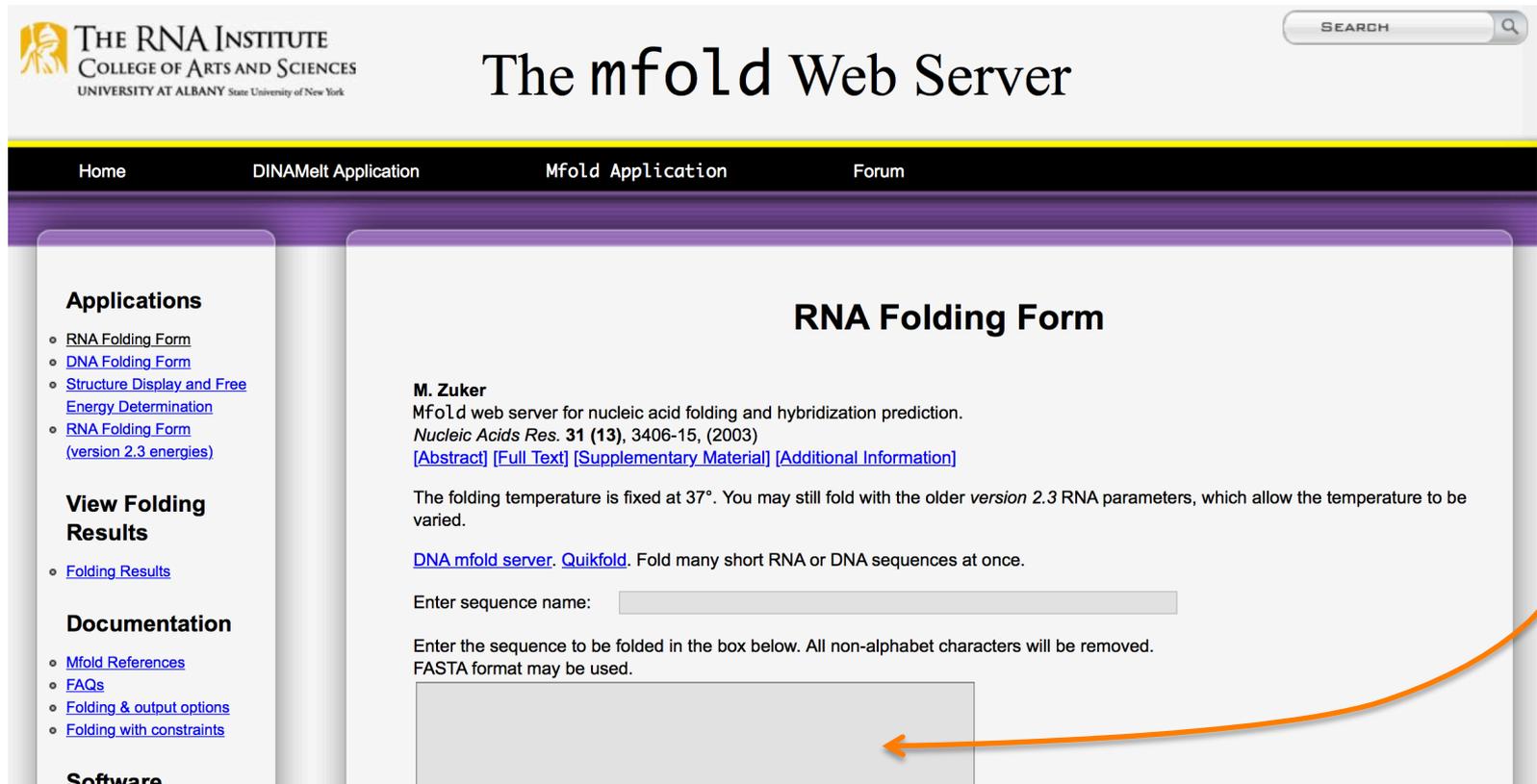
ARN ribosomal 16S

(à la base de la classification phylogénétique actuelle)



Comment déterminer la structure secondaire de l'ARN?

Un exemple : **AAAUUUGGGCGCGCGAUUAUACGAUGCUCUGAGAGUC**

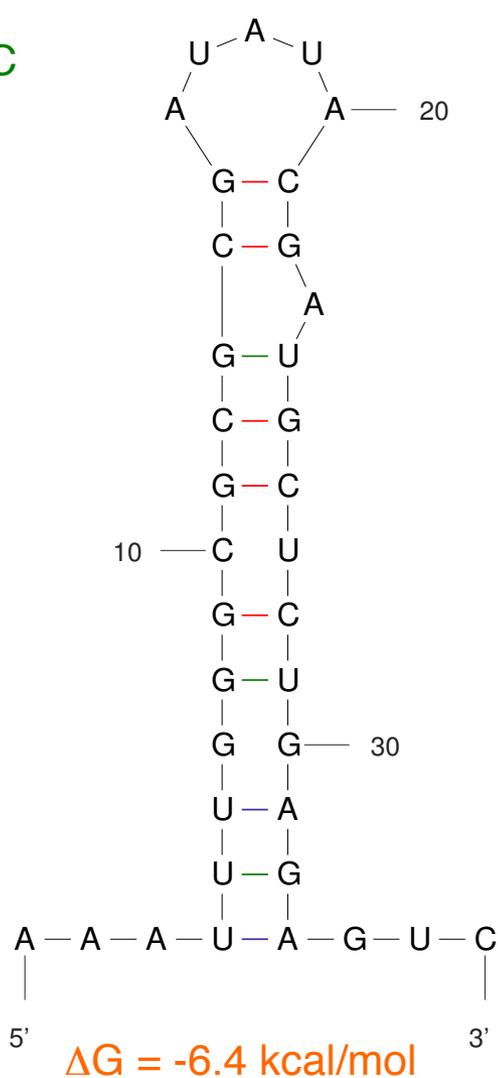


The screenshot displays the Mfold web server interface. At the top left is the logo for The RNA Institute, College of Arts and Sciences, University at Albany, State University of New York. The main title is "The mfold Web Server". A search bar is located in the top right corner. Below the title is a navigation bar with links for Home, DINAMelt Application, Mfold Application, and Forum. The main content area is titled "RNA Folding Form" and includes a citation for M. Zuker, "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31 (13)**, 3406-15, (2003). It also provides links for [Abstract], [Full Text], [Supplementary Material], and [Additional Information]. The text states that the folding temperature is fixed at 37° and that older version 2.3 RNA parameters can be used. A link for "DNA mfold server. Quikfold" is provided. There are two input fields: "Enter sequence name:" and "Enter the sequence to be folded in the box below. All non-alphabet characters will be removed. FASTA format may be used." An orange arrow points from the example sequence in the text above to the sequence input field.

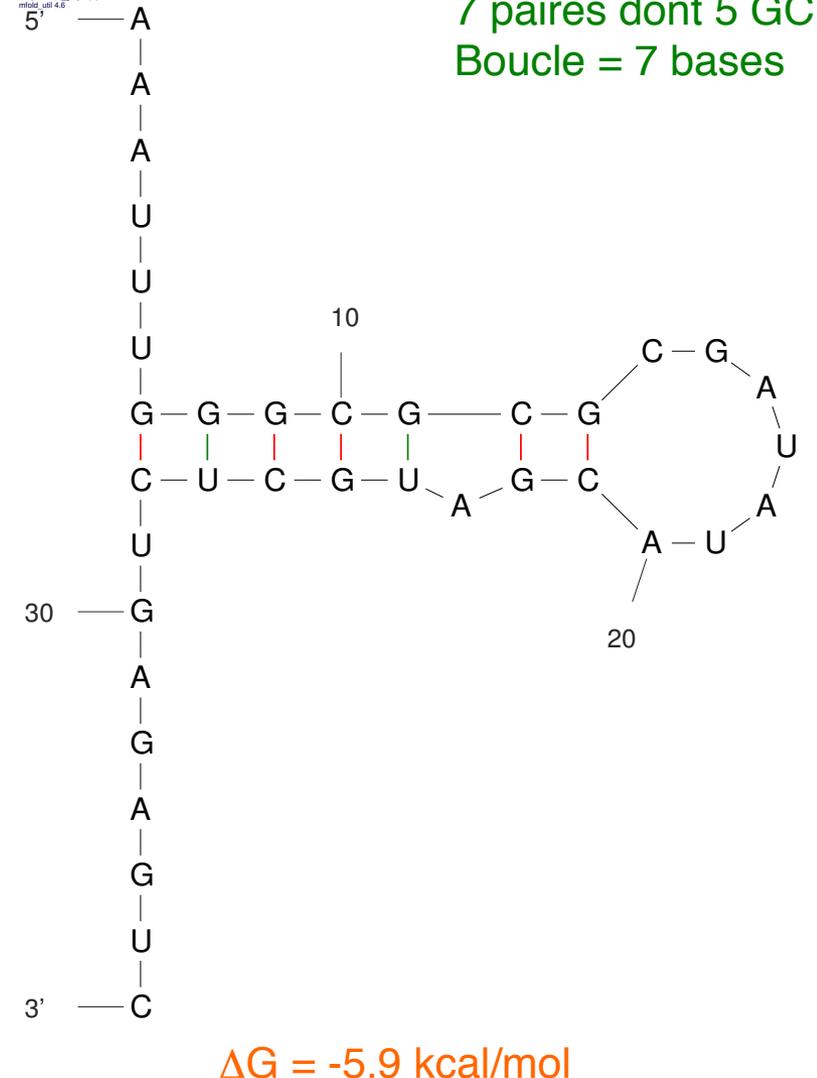
Serveur calculant les énergies libres des structures à partir de la table de 10 valeurs précédente

Application : structure secondaire de l'ARN

10 paires
dont 3 GC
Boucle =
5 bases



Output of seq_graph (6)
mfold, v1.6.6



Différence entre les deux $\Delta G \sim 1 \text{ kT} !!$

Comment l'algorithme peut-il énumérer toutes les structures secondaires?

Nombre de structures secondaires pour un ARN de longueur n :

$$\frac{(2n)!}{n!(n+1)!} \approx cst \times \frac{4^n}{n^{3/2}}$$

- Enumération impossible
- Mais algorithme de Nussinov (1978) permet de trouver la structure d'énergie libre la plus basse en un temps $\sim n^3$ à l'aide d'une construction itérative
C'est l'algorithme qu'utilise Mfold
- On ne sait pas prédire de manière systématique la structure tertiaire ...

3. Description à grande échelle :

l'élasticité

ADN sur bicouche lipidique: marche aléatoire 2D avec « volume exclu »

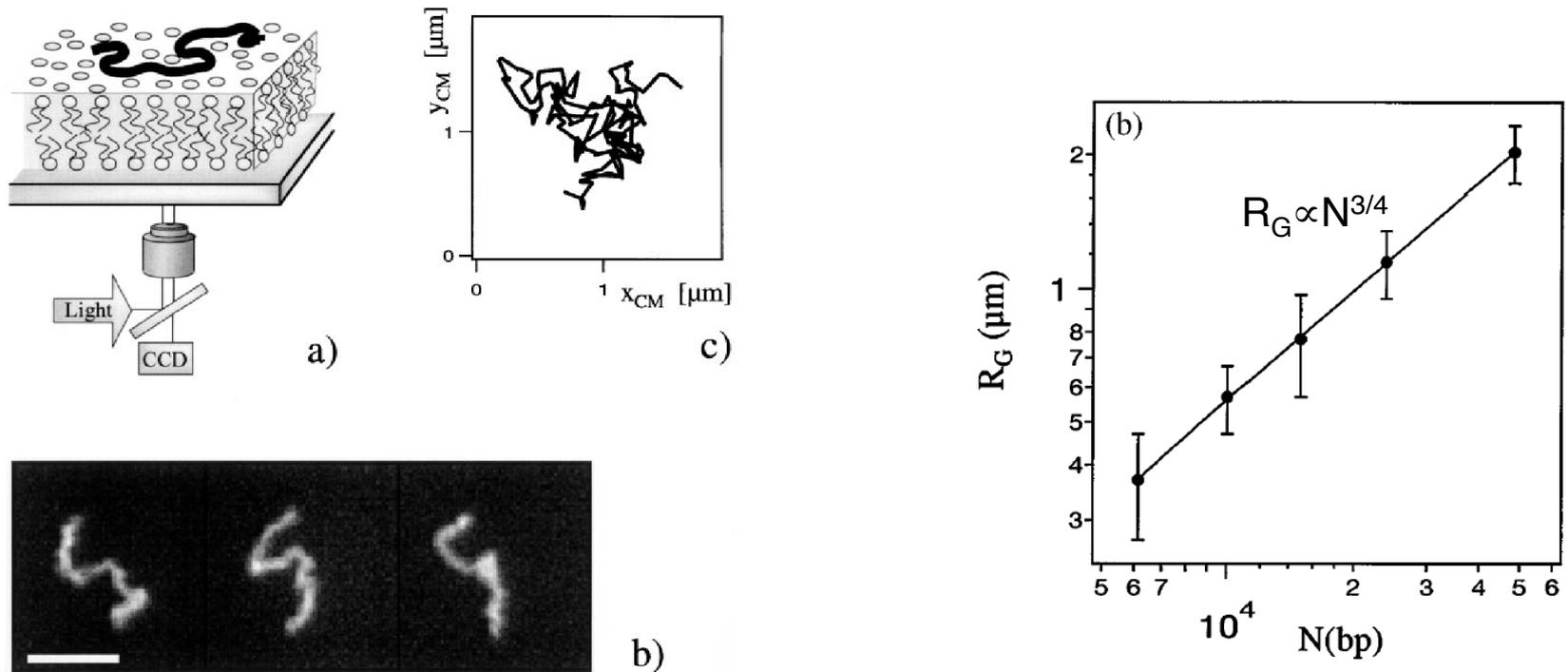


FIG. 1. Single λ -phage DNA molecule adsorbed onto a cationic lipid bilayer supported on a glass substrate. (a) Schematic (not to scale) sketch of the experimental setup. (b) Time series of fluorescence images at 2 sec intervals (bar represents 10 μm). (c) The center-of-mass motion of a 10,090 bp λ -DNA fragment following diffusive behavior.

Théorie de Flory et exposant « critique »

Polymère de longueur L , rayon de giration $R(L)$??

- En l'absence d'interaction de répulsion des monomères, on a une marche aléatoire de N pas, avec $N = L / l_p$ (longueur de persistance) donc

$$\text{Pr}(R) \sim \exp\left(-\frac{R^2}{2(Nl_p^2)}\right) \sim \exp\left(-\frac{R^2}{2Ll_p}\right)$$

$$\sim \exp\left(-\frac{E_{\text{elast}}}{kT}\right) \Rightarrow E_{\text{elast}} \sim kT \frac{R^2}{2Ll_p}$$

« énergie » élastique
(en fait entropie !!)

- En présence d'interactions :

$$E_{\text{int}} \sim \varepsilon \int d^D x c(x)^2 \quad \text{avec} \quad c(x) = \frac{N}{R^D} = \frac{L}{R^D l_p} \Rightarrow E_{\text{int}} \sim \varepsilon R^D \left(\frac{N}{R^D}\right)^2 \sim \varepsilon \frac{L^2}{R^D l_p^2}$$

énergie d'interaction due au volume exclu

Théorie de Flory et exposant « critique »

Polymère de longueur L , rayon de giration $R(L)$??

- Energie totale :

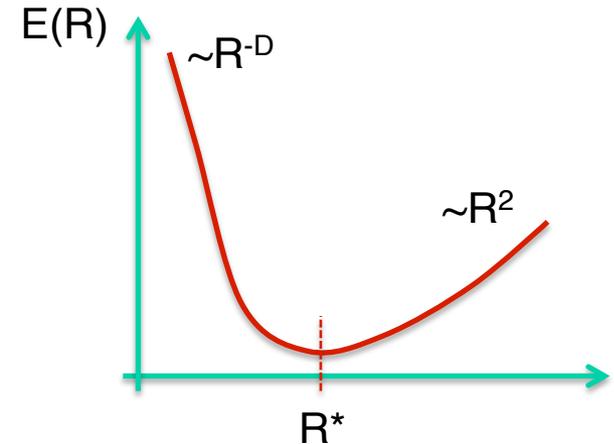
$$E(R) = E_{elast} + E_{int} \sim kT \frac{R^2}{2Ll_p} + \varepsilon \frac{L^2}{R^D l_p^2}$$

- Valeur de R minimisant l'énergie totale :

$$\frac{dE}{dR} = kT \frac{R}{Ll_p} - \varepsilon D \frac{L^2}{R^{D+1} l_p^2} = 0 \Rightarrow R \sim L^{3/(D+2)}$$

Exposant de Flory :

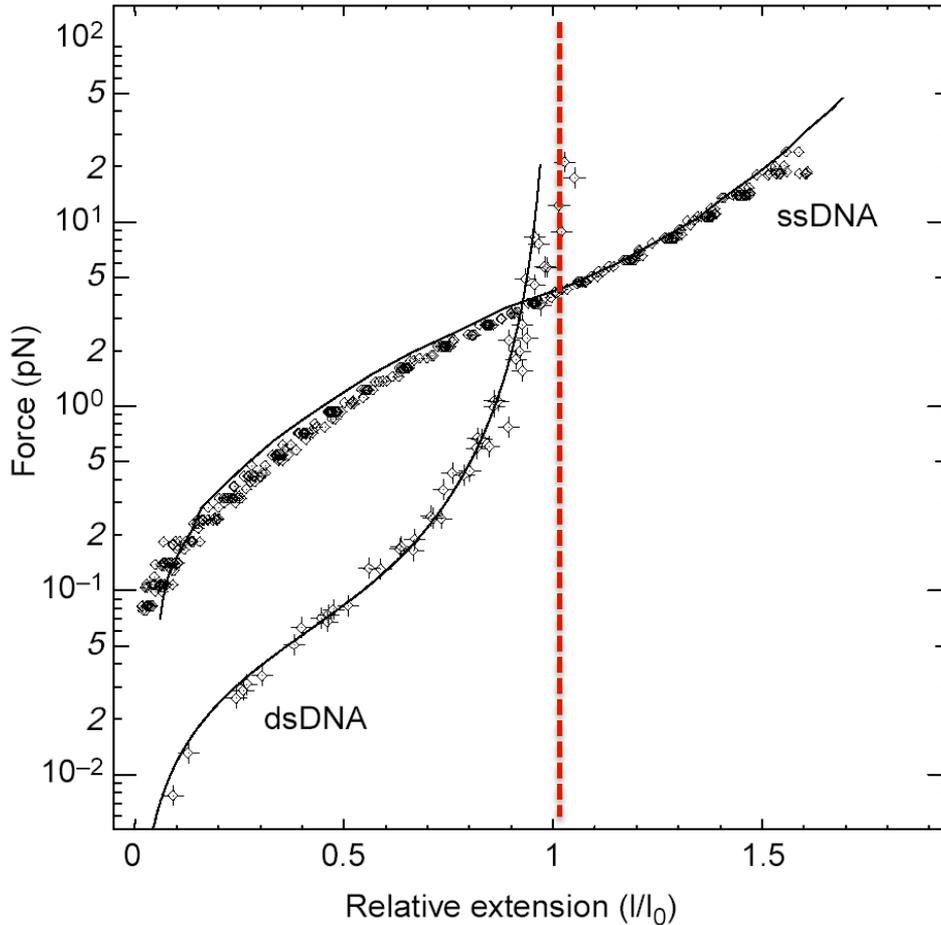
$$v = \frac{3}{D+2}$$



(exact en dimensions $D=1$ et $D=2$, approché en $D=3$: vraie valeur = 0.588...
liens très profonds et subtils avec la transition de phase para/ferromagnétique,
De Gennes 1971)

Etirement de l'ADN par « piège magnétique »

Courbe force/extension : $l(f)$ (par base)



Travail de la force

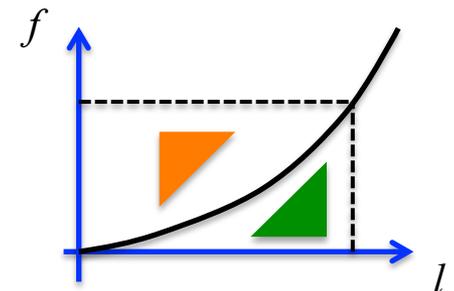
$$W(l) = \int_0^l dl' f(l')$$

$$= f \times l - g(f)$$

où

$$g(f) = \int_0^f df' l(f')$$

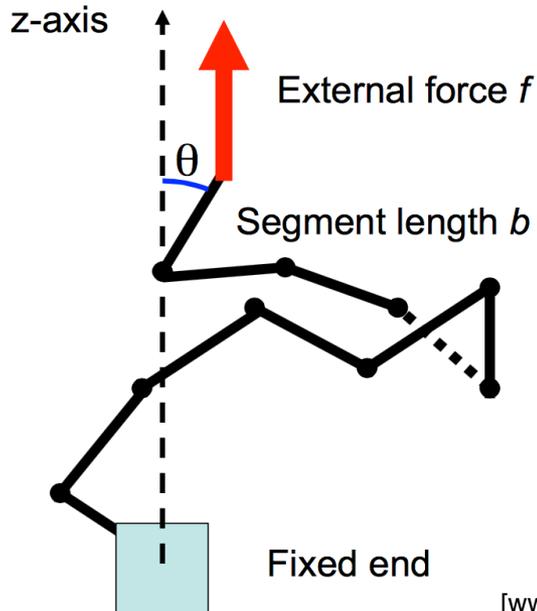
Energie libre par base



Les modèles d'élasticité

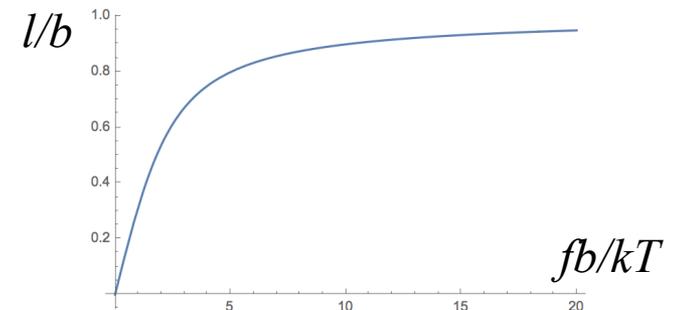
- Loi de Hooke (ressort) : $l(f) = K \times f$

- Chaîne à articulations libres : $l(f) = b \left[\coth \left(\frac{fb}{kT} \right) - \frac{kT}{fb} \right]$



[www.physik.uni-muenchen.de]

(analogie avec le modèle de Heisenberg pour le paramagnétisme)



Les modèles d'élasticité

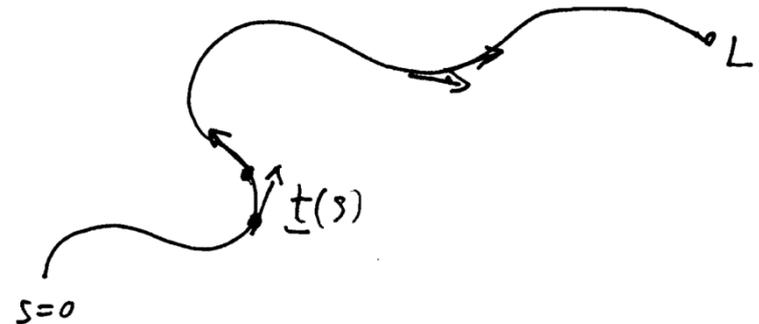
- Le modèle du ver :

Longueur totale fixée (=L). Vecteur tangent (de norme unité) qui varie le long de la chaîne

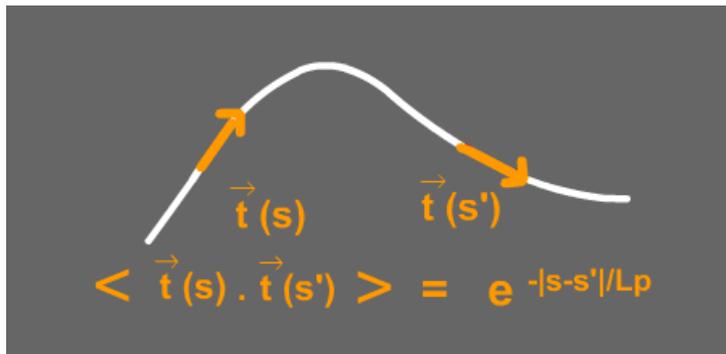
$$E = C \int_{s=0}^{s=L} ds \left| \frac{d\vec{t}}{ds} \right|^2 \quad \text{avec} \quad |\vec{t}(s)|=1$$

et $C = L_p \cdot k_B T$

(L_p = longueur de persistance)



si dt/ds grand, beaucoup de courbure



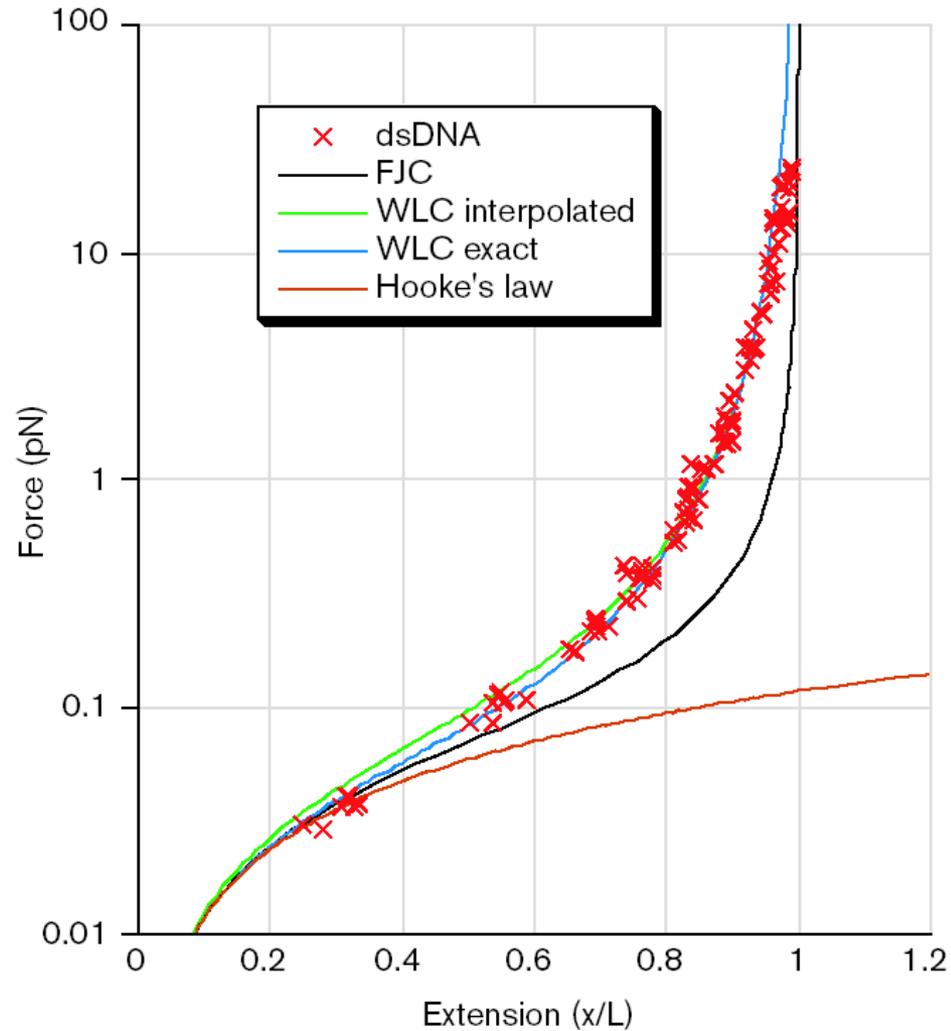
[courses.physics.illinois.edu]

Calcul compliqué ...

$$\frac{fL_p}{kT} \approx \frac{1}{4 \left(1 - \frac{l(f)}{l_0} \right)^2} + \frac{l(f)}{l_0} - \frac{1}{4}$$

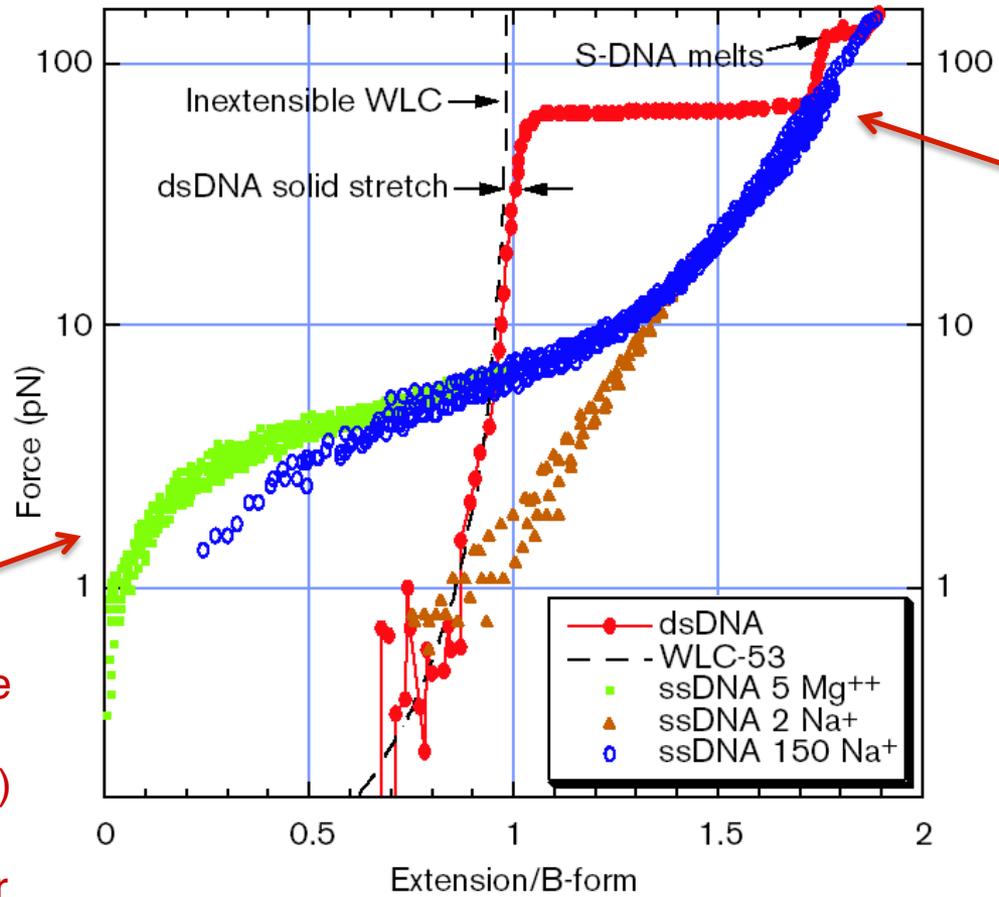
($l_0 = 0.34 \text{ nm}$, $L_p = 50 \text{ nm}$)

Que se passe-t-il si on tire sur l'ADN à l'aide d'un piège optique?



Elasticité de Hooke à faible force ...
Le modèle du ver est excellent à toute force!!

Transition de phase structurale



En présence de sel,
L'ADN simple brin se
recroqueville sur lui-
même (appariement)

-> force critique pour
casser cette structure

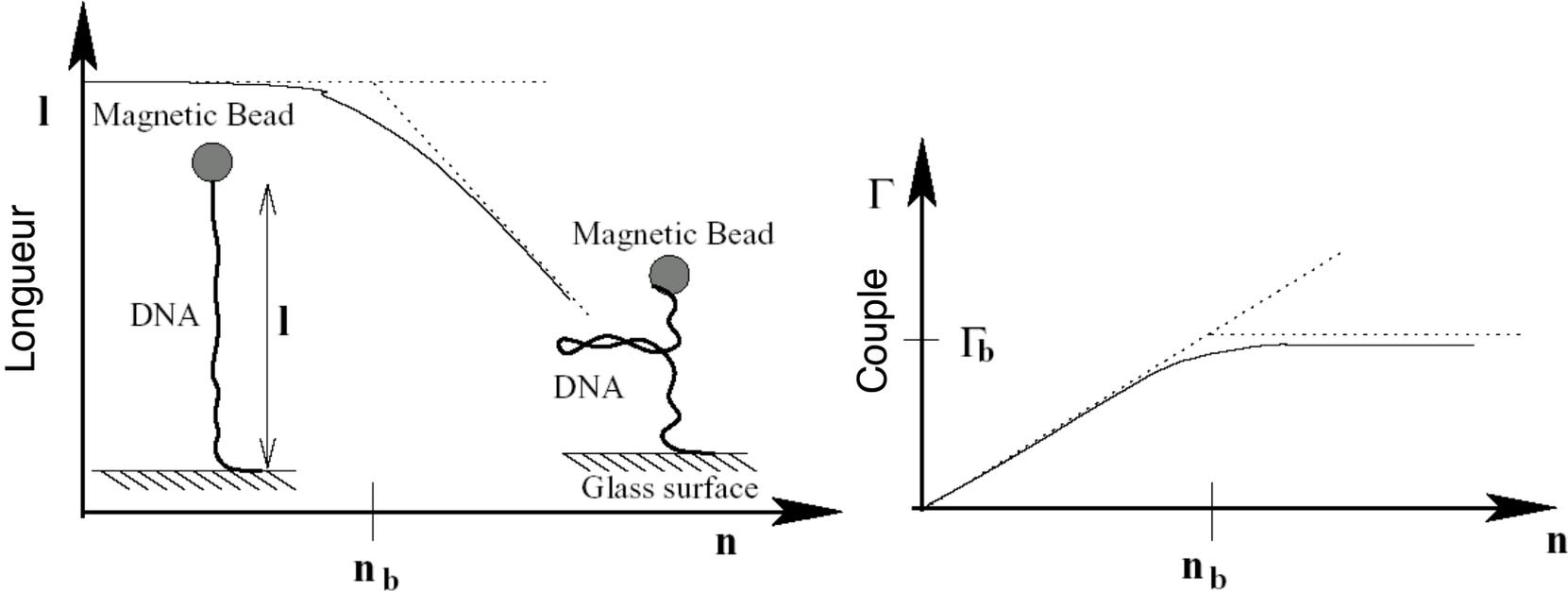
ADN surétiré =
nouvelle forme d'ADN
en double hélice

Par exemple :

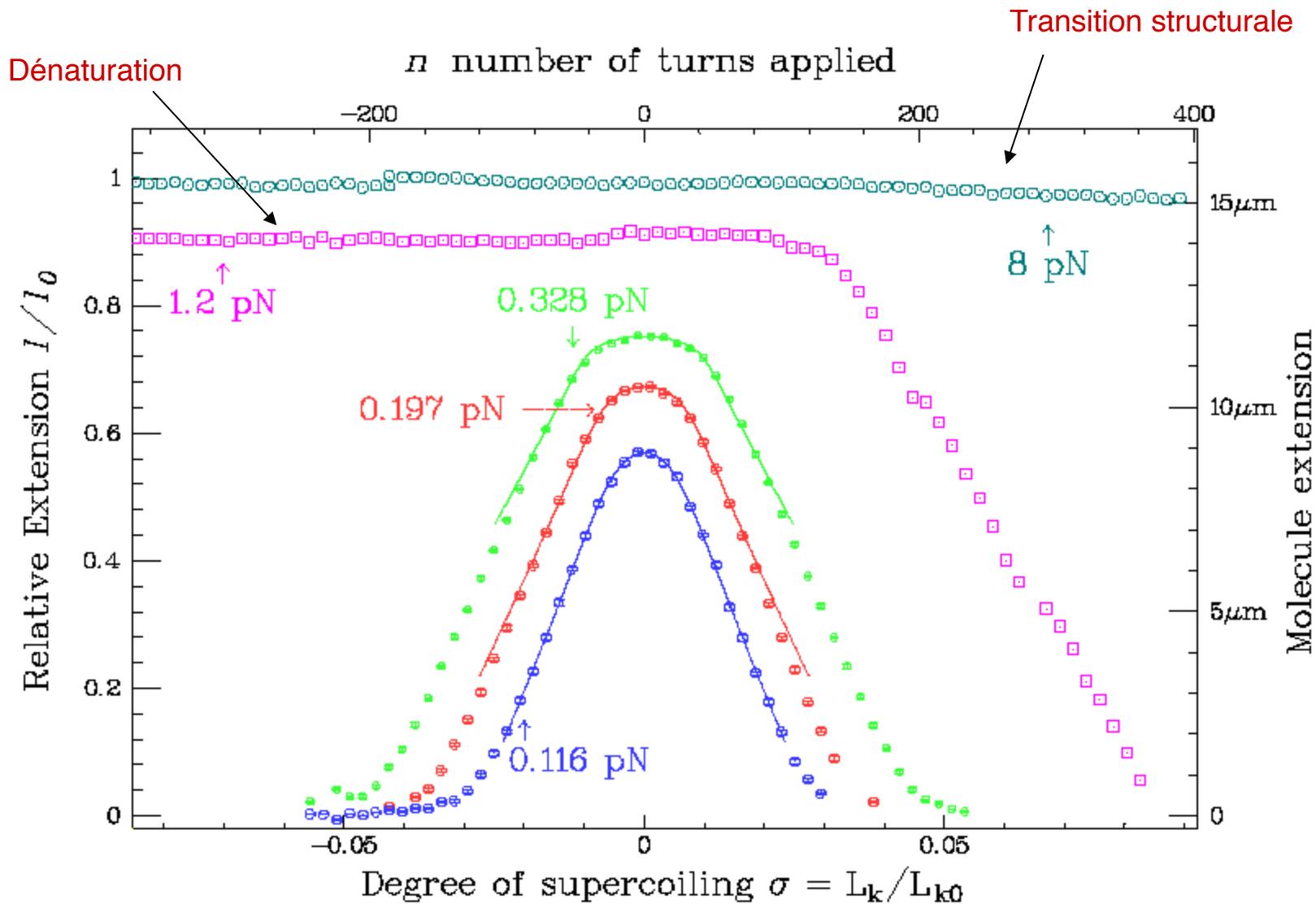
Distance entre paires
de bases contigües =
0.58 nm
(au lieu de 0.34 nm)

Couplage torsion/extension

Tube élastique: instabilité de flambage



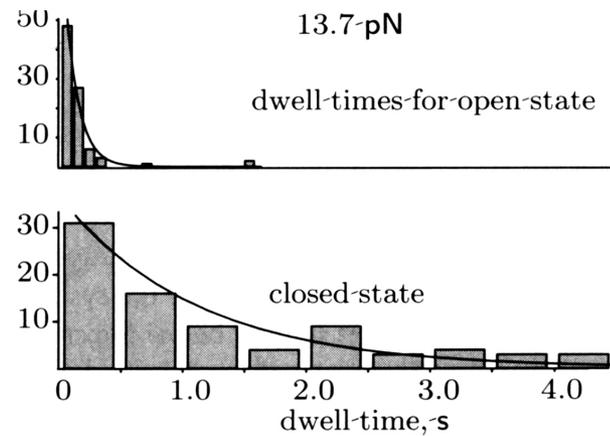
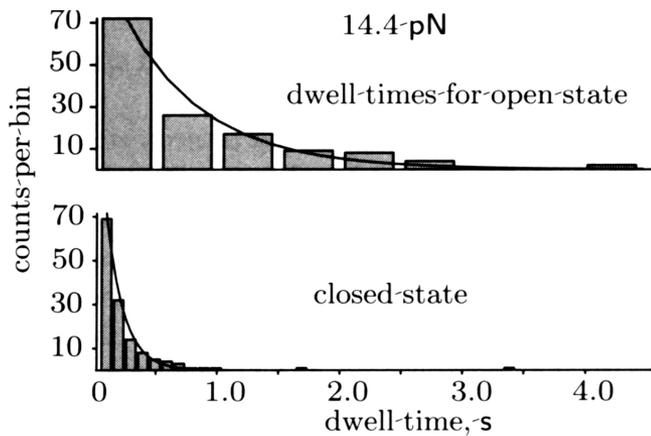
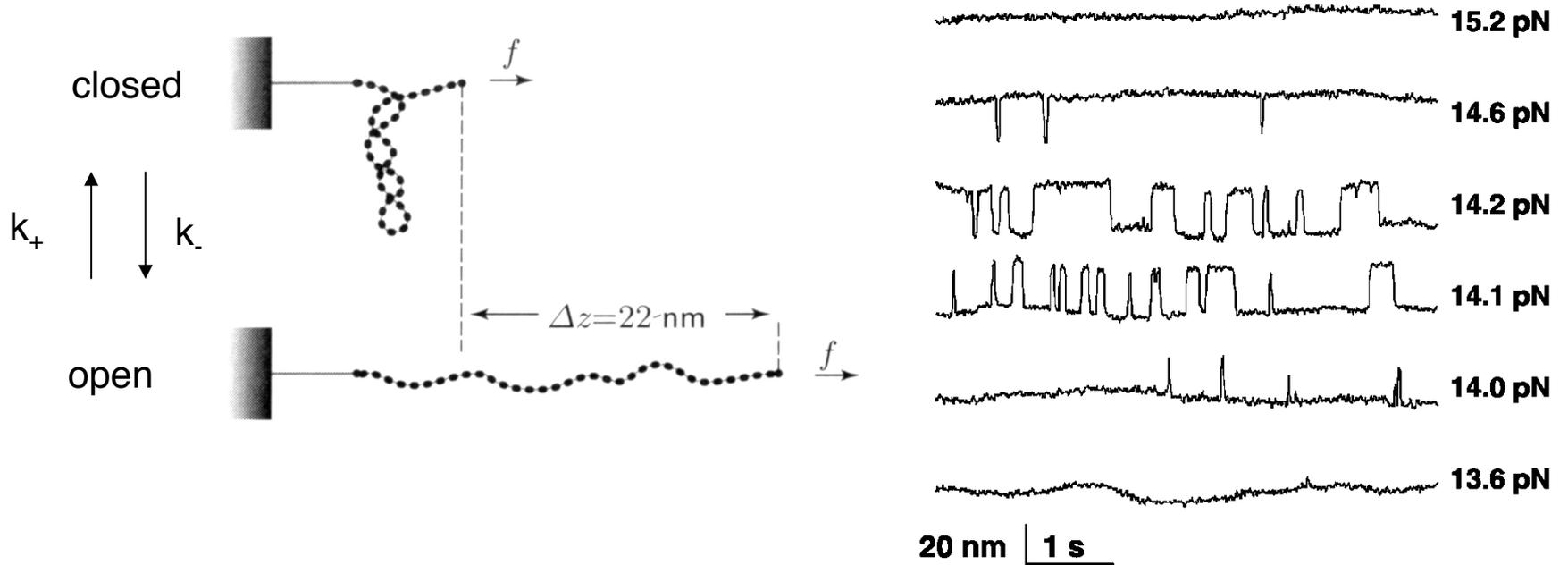
Elasticité de l'ADN: plus qu'un simple tube



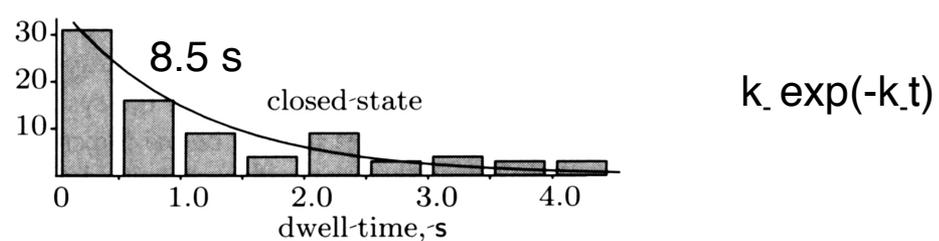
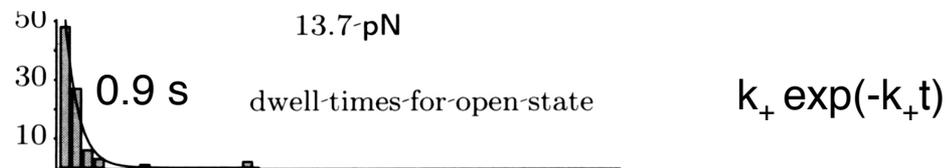
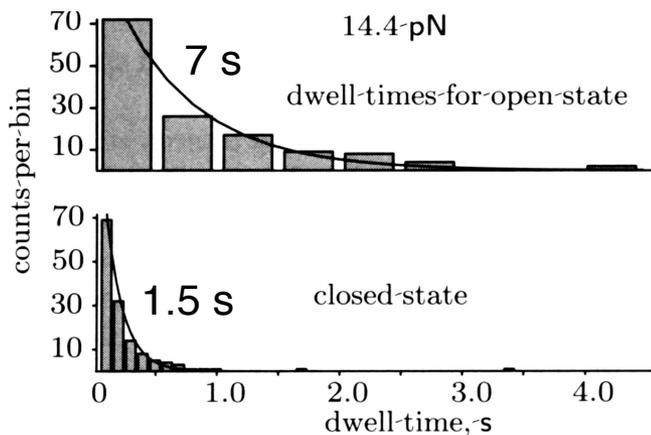
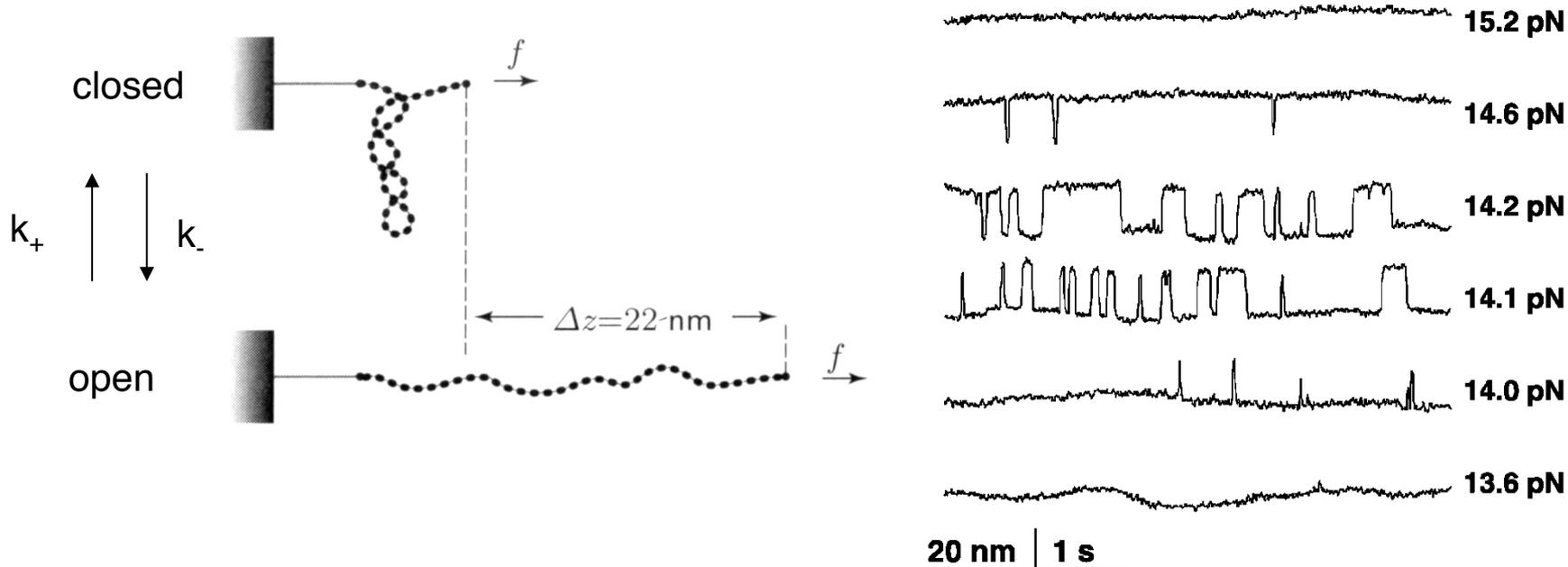
4. Dynamique

Couplage élasticité/dépliement pour une molécule d'ARN

Transitions entre l'état ouvert et l'état fermé

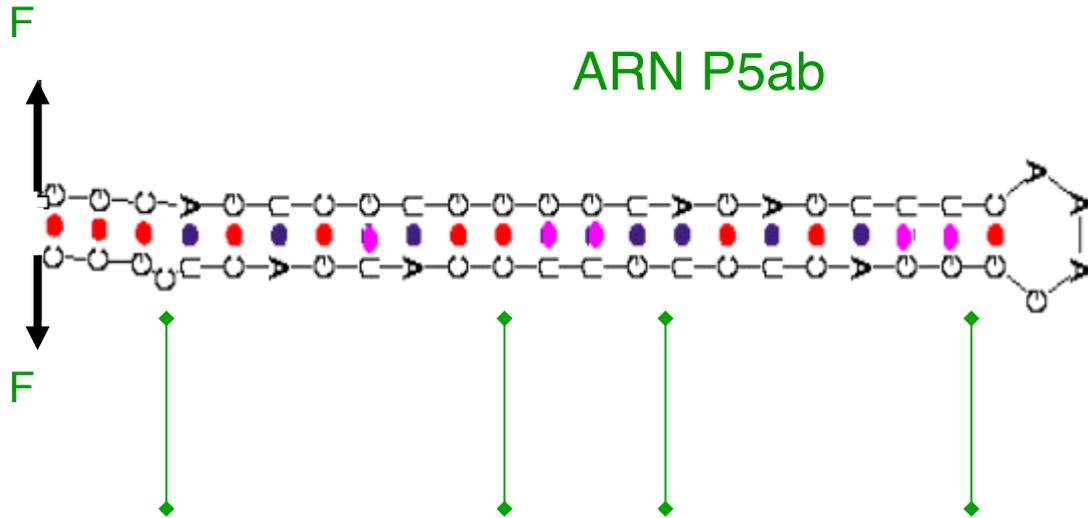


Transitions entre l'état ouvert et l'état fermé



Dynamique et passage de barrière

ARN P5ab

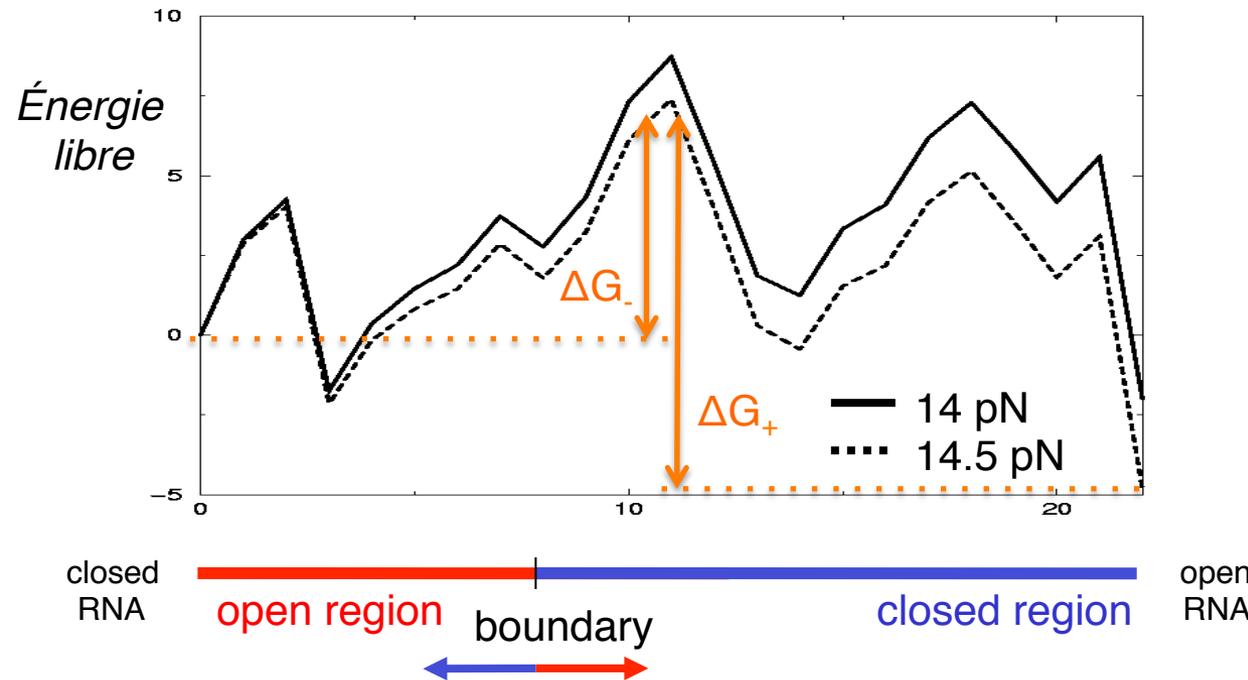


Coût en énergie libre pour ouvrir n paires de bases :

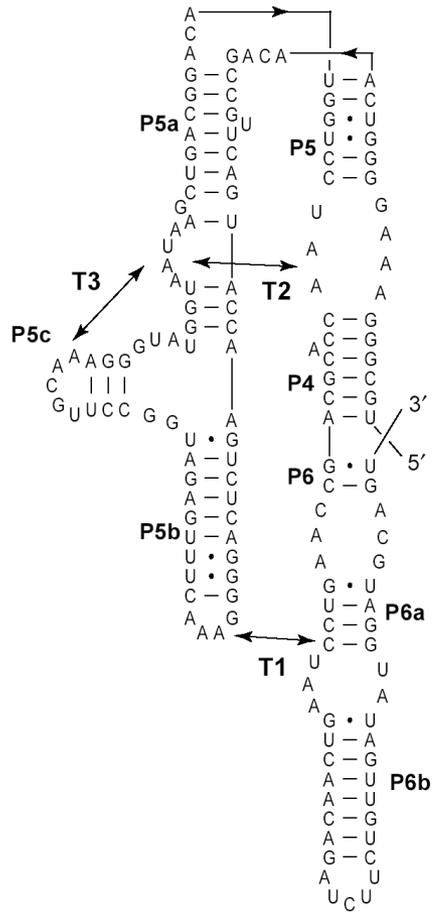
$$\Delta G(n) = \sum_{i(<n)} g(b_i, b_{i+1}) - n \times 2g_{ss}(f) \rightarrow \Delta G^*$$

$$\rightarrow k_+ \sim \exp(\Delta G_+ / kT)$$

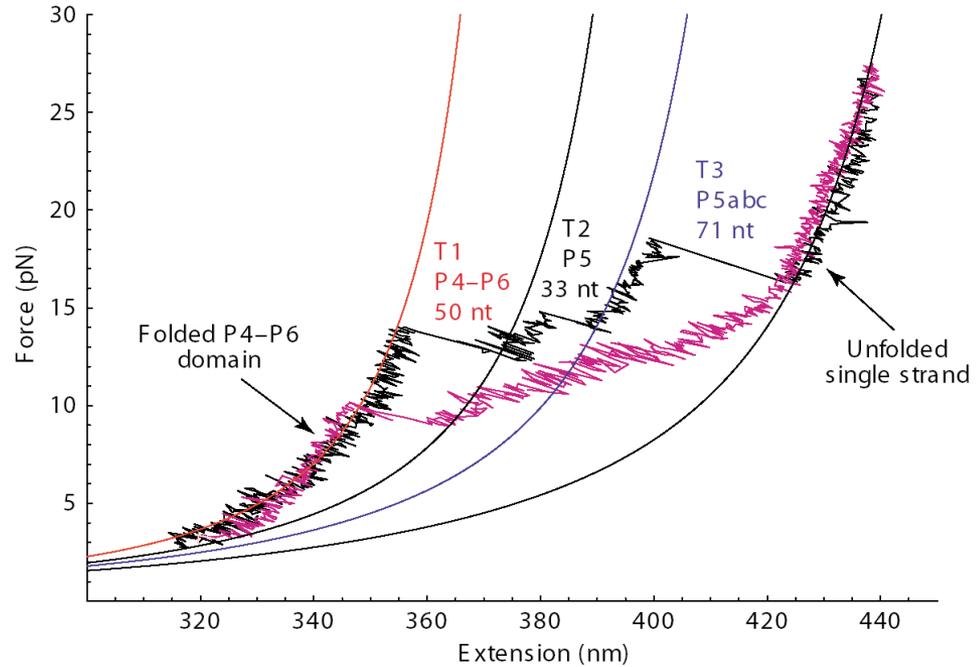
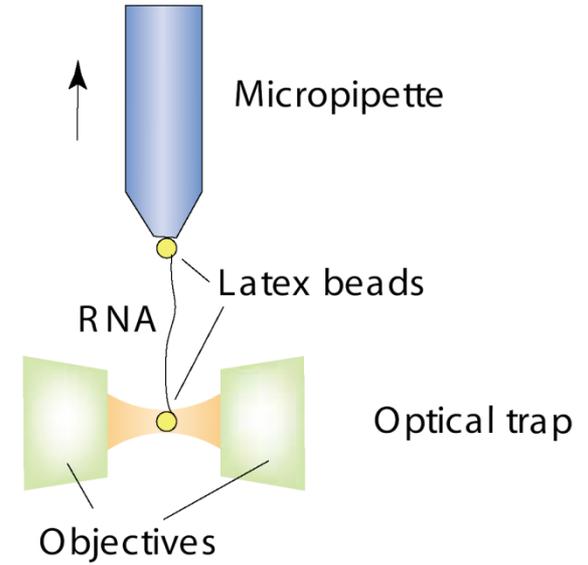
$$\rightarrow k_- \sim \exp(\Delta G_- / kT)$$



Des ARN plus complexes ...



$$kT_{300K} = 25 \text{ meV} = 4 \text{ pN nm}$$



BILAN

Manipulation de molécules uniques et mesures de force:

piège optique
« piège magnétique »
pN, kT, nm, ms-s

T
E
C
H
N
I
Q
U
E
S

Elasticité des biopolymères

modèle des maillons indépendants
modèle du ver,

et au-delà:

Couplage extension/torsion
Couplage extension/dépliement

C
O
N
C
E
P
T
S

Equilibre thermodynamique et transitions entre états:

mesure sur molécule unique peut
donner accès aux taux de transitions

Systèmes biologiques considérés:

ADN, ARN et protéines

B
I
O