

# Physique des objets biologiques: du nanomètre au micron

Rémi Monasson

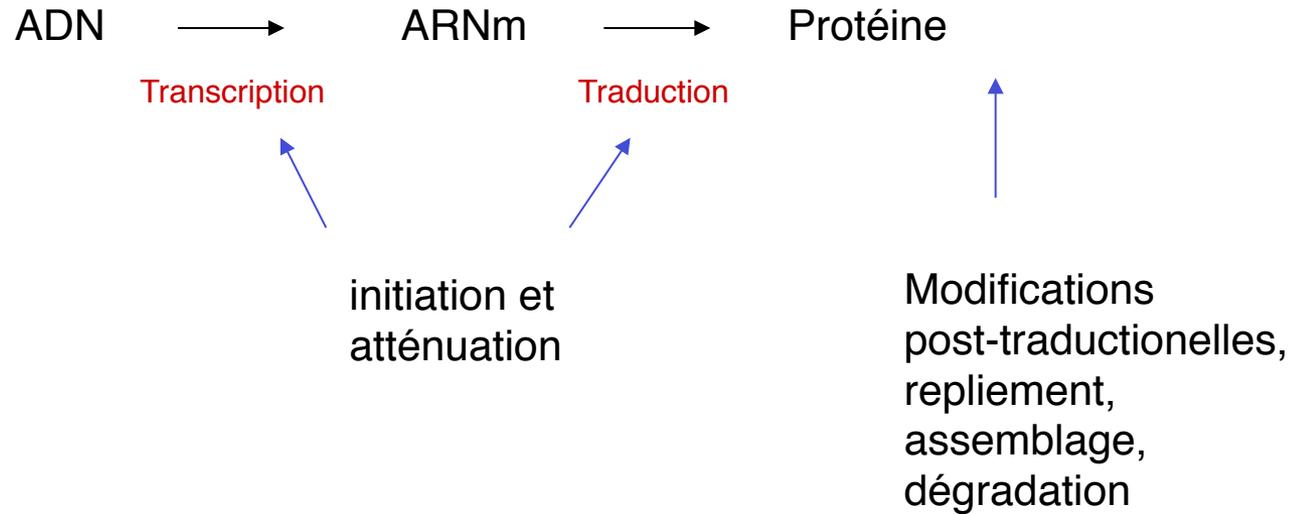
## Amphi 6 : Réseaux de régulation

- 1 Mécanismes de régulation
- 2 Introduction à l'opéron lactose
- 3 Modélisation d'un réseau de régulation
- 4 Interactions entre protéine et ADN
- 5 La course vers l'opérateur

Partie 1

Mécanismes de régulation

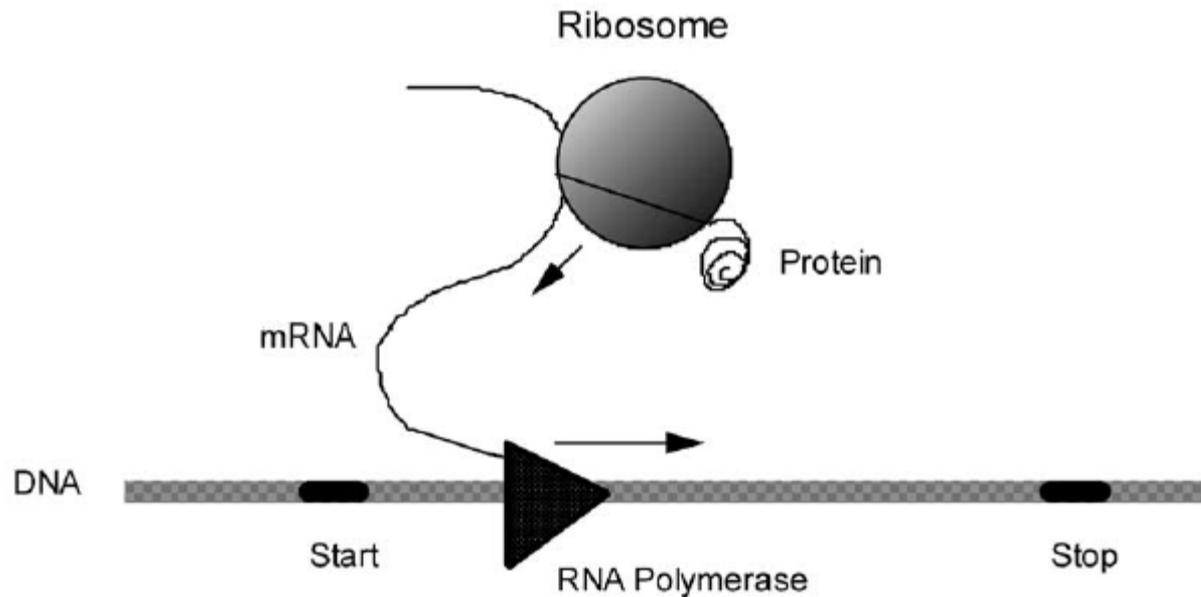
# Différentes possibilités d'adapter l'activité métabolique d'une cellule à son environnement



**Procaryotes:** régulation surtout au niveau de la transcription

**Eucaryotes:** plusieurs voies différentes

## Transcription et traduction d'un gène chez les procaryotes



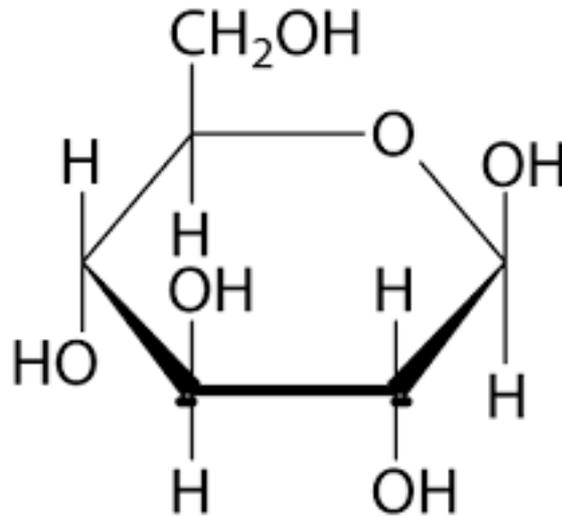
*E. coli*: procaryote, organisme unicellulaire, un chromosome de 4.5 Mb, ~2000 gènes, transcription active de ~100 gènes dans des conditions ordinaires

## Partie 2

### Introduction à l'opéron lactose

# Le glucose, un nutriment essentiel de la cellule

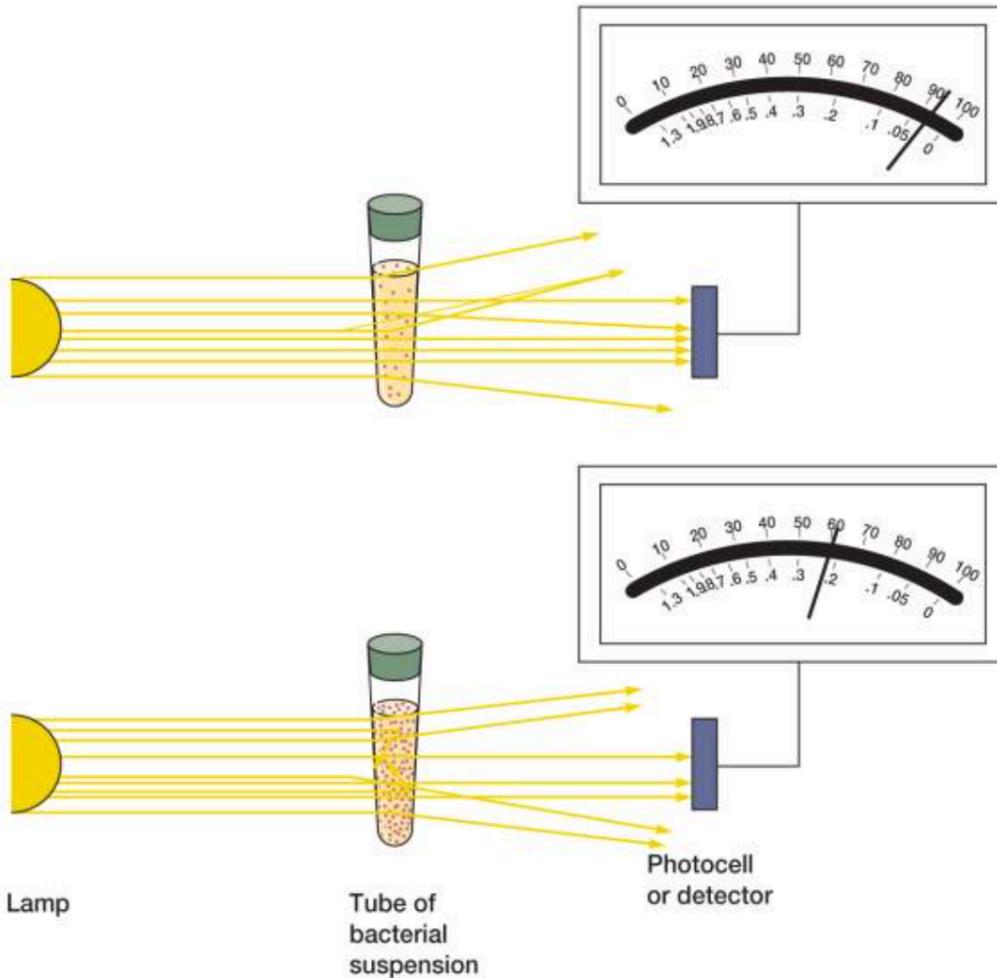
Glucose =



source principale d'énergie de la cellule -> production d'ATP

La glycolyse est un processus complexe, avec deux voies différentes selon la présence ou pas d'oxygène

# Comment mesurer la croissance du nombre de bactéries?

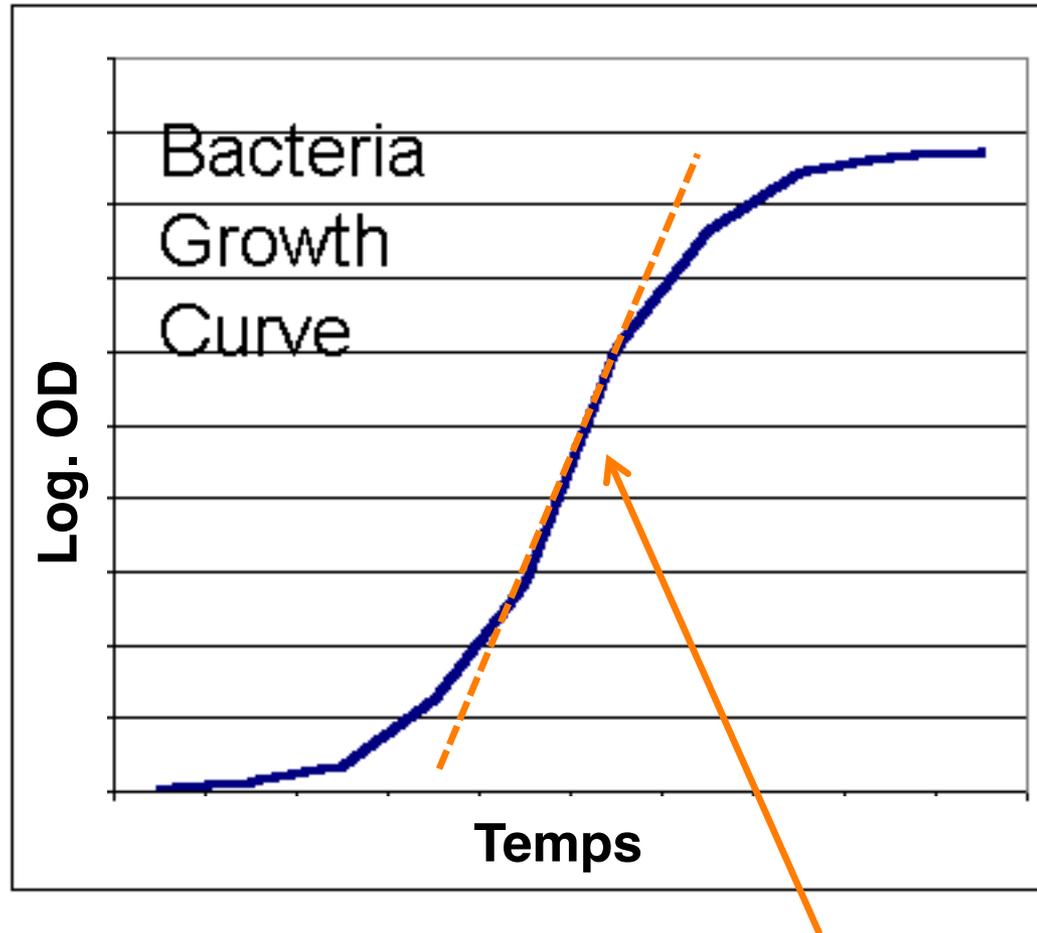


OD  
(optical  
density)

=

nb. bactéries  
par unité de  
volume

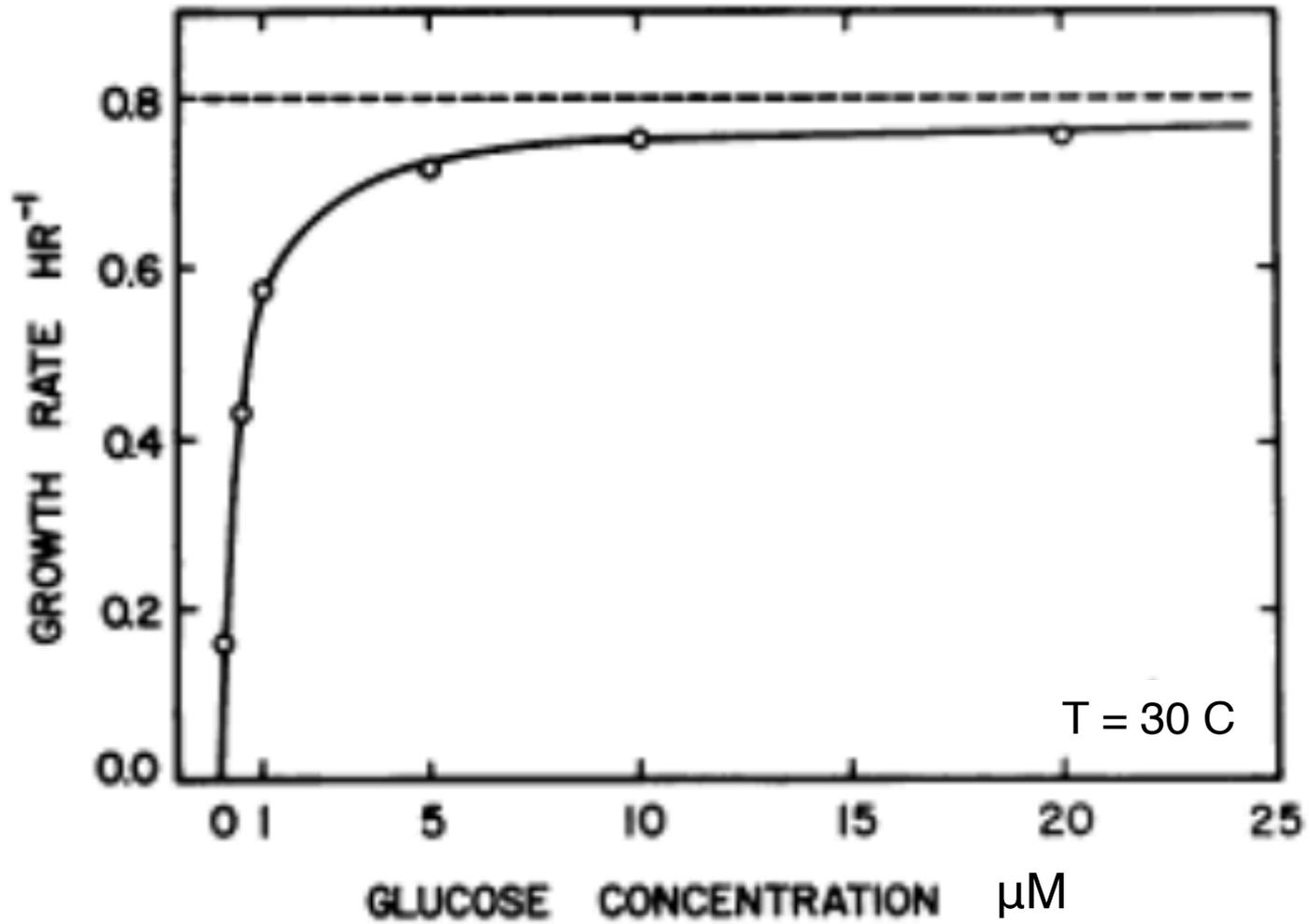
# Croissance exponentielle d'une population bactérienne



Taux de croissance : inverse du temps pour doubler la population

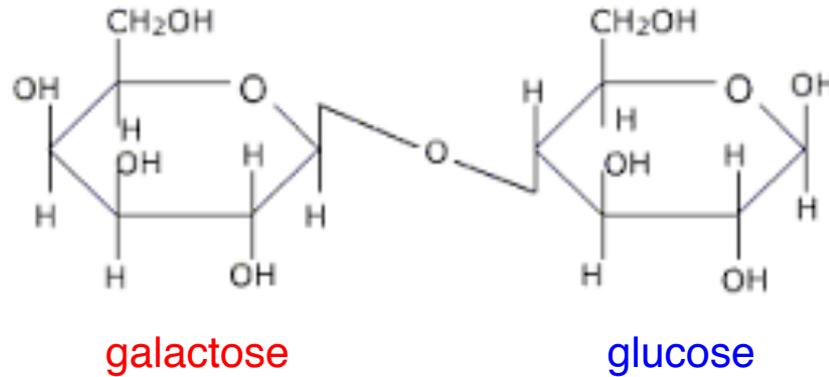
[ E. Coli : taux maximal =  $1/(20 \text{ minutes})$  ]

# Taux de croissance de *E. Coli* en fonction de la concentration de glucose



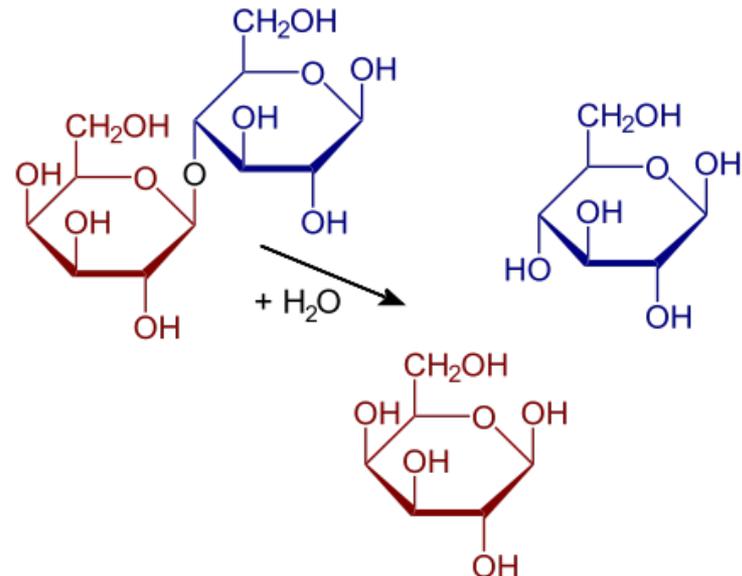
# Le lactose, un autre sucre

Lactose =

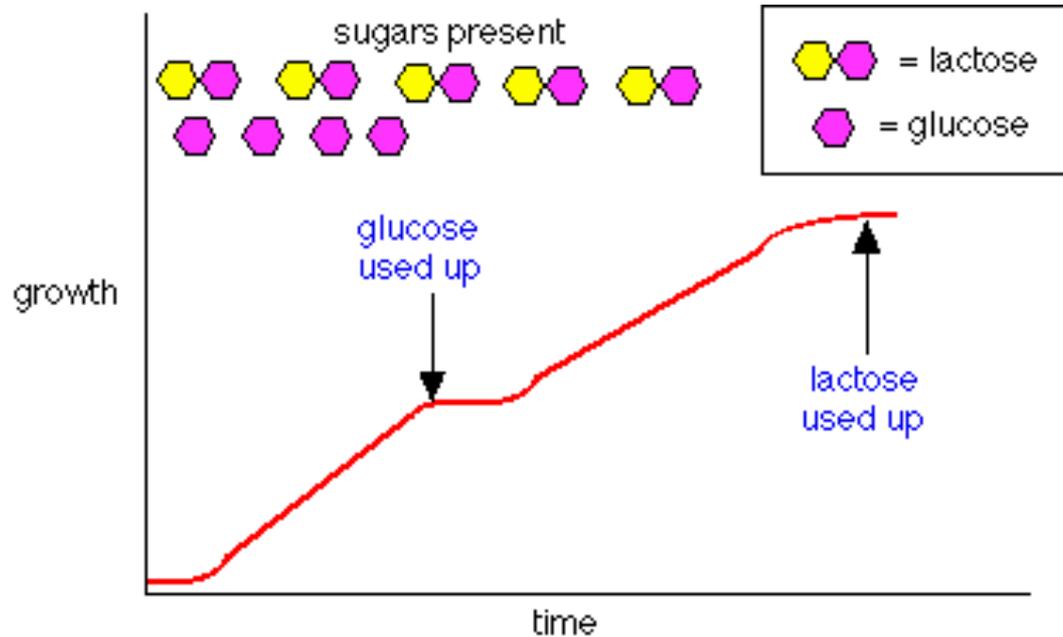


(naturellement présent dans le lait des mammifères, 20 à 80 g/litre)

Peut-être hydrolysé en présence  
d'une protéine : la  $\beta$ -galactosidase



# Le phénomène de diauxie

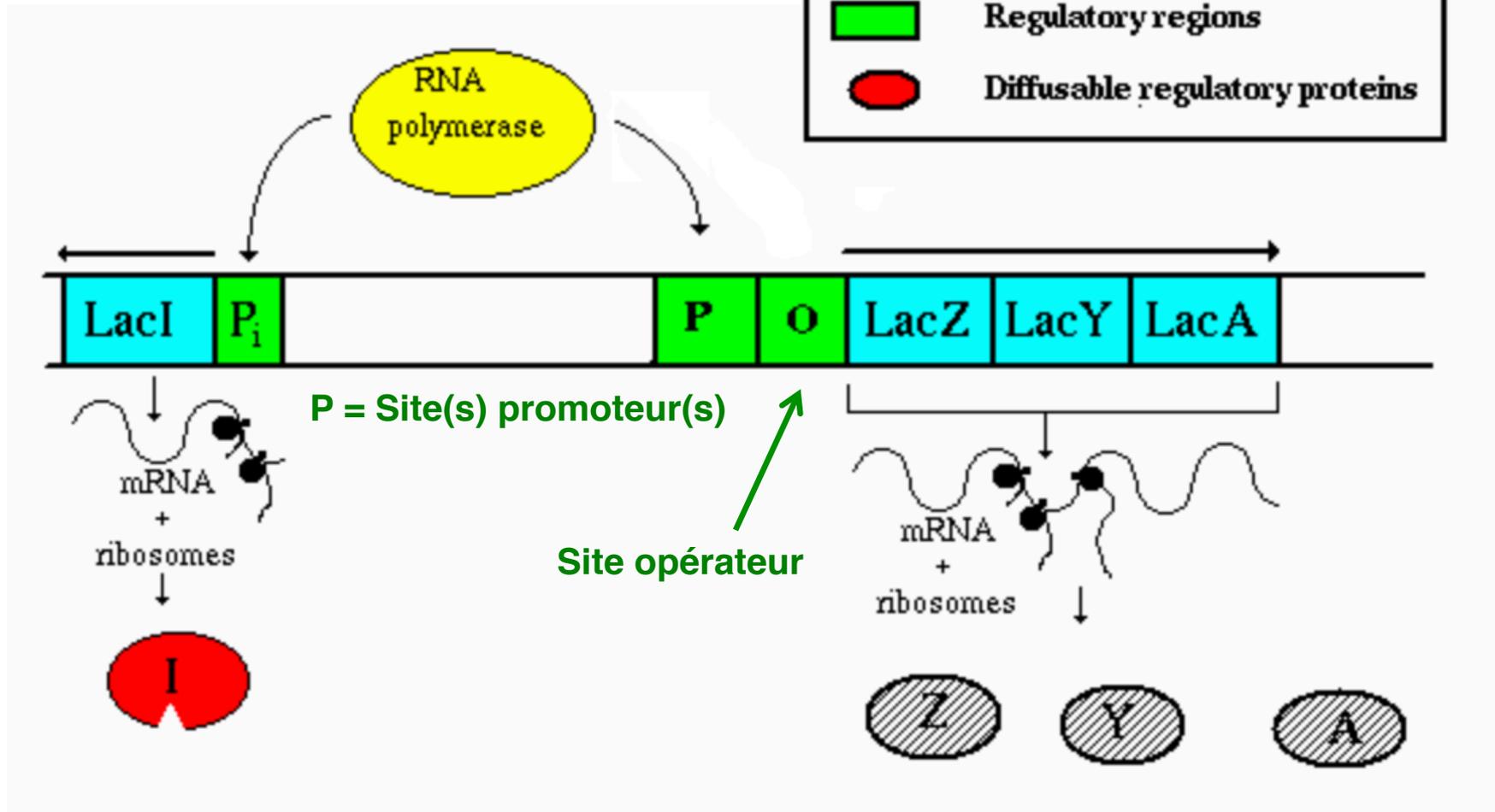
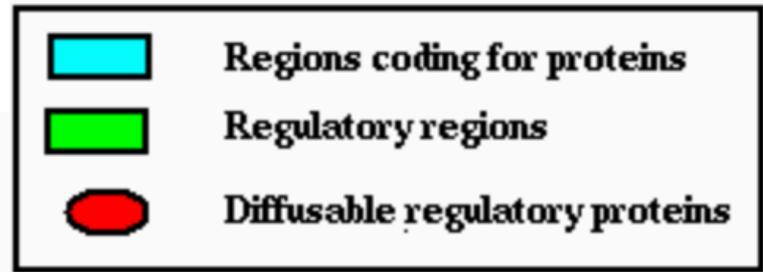


E.Coli cultivé sur milieu contenant deux sucres : le glucose et le lactose

- utilise en priorité le glucose car il est métabolisé par des enzymes constitutives;
- quand le glucose est épuisé, la bactérie synthétise des enzymes inductibles pour dégrader le lactose

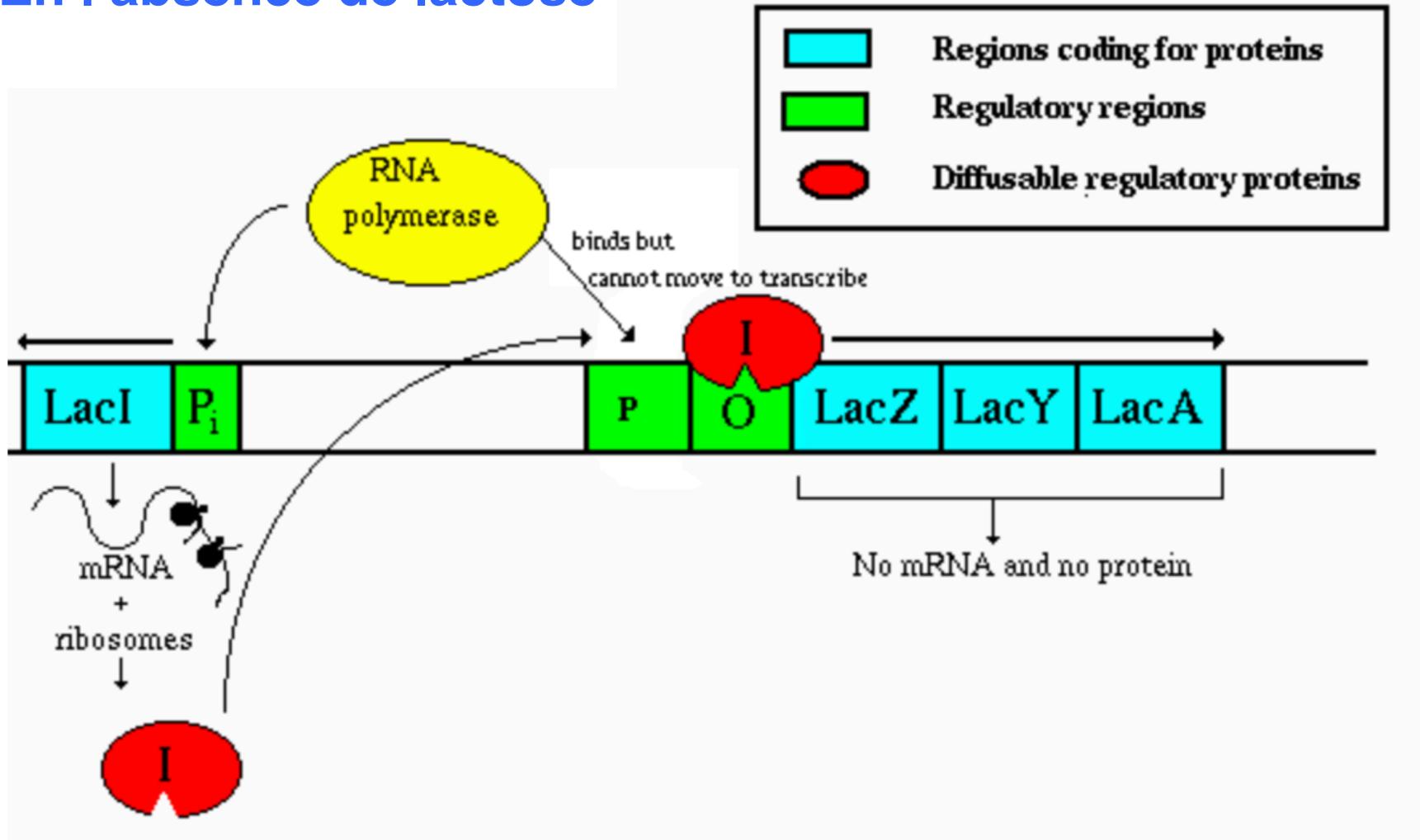
Comment la cellule bascule-t-elle d'un mode de fonctionnement à un autre?

# L'opéron lactose (Jacob-Monod, Prix Nobel 1965)



lacZ = gène de la beta-galactosidase (catalyse l'hydrolyse du lactose)  
 lacY = gène de la perméase (protéine transmembranaire facilitant l'entrée de lactose dans la cellule)  
 lacA = gène de la trans-acétylase (pas importante ici)  
 lacL = gène du répresseur

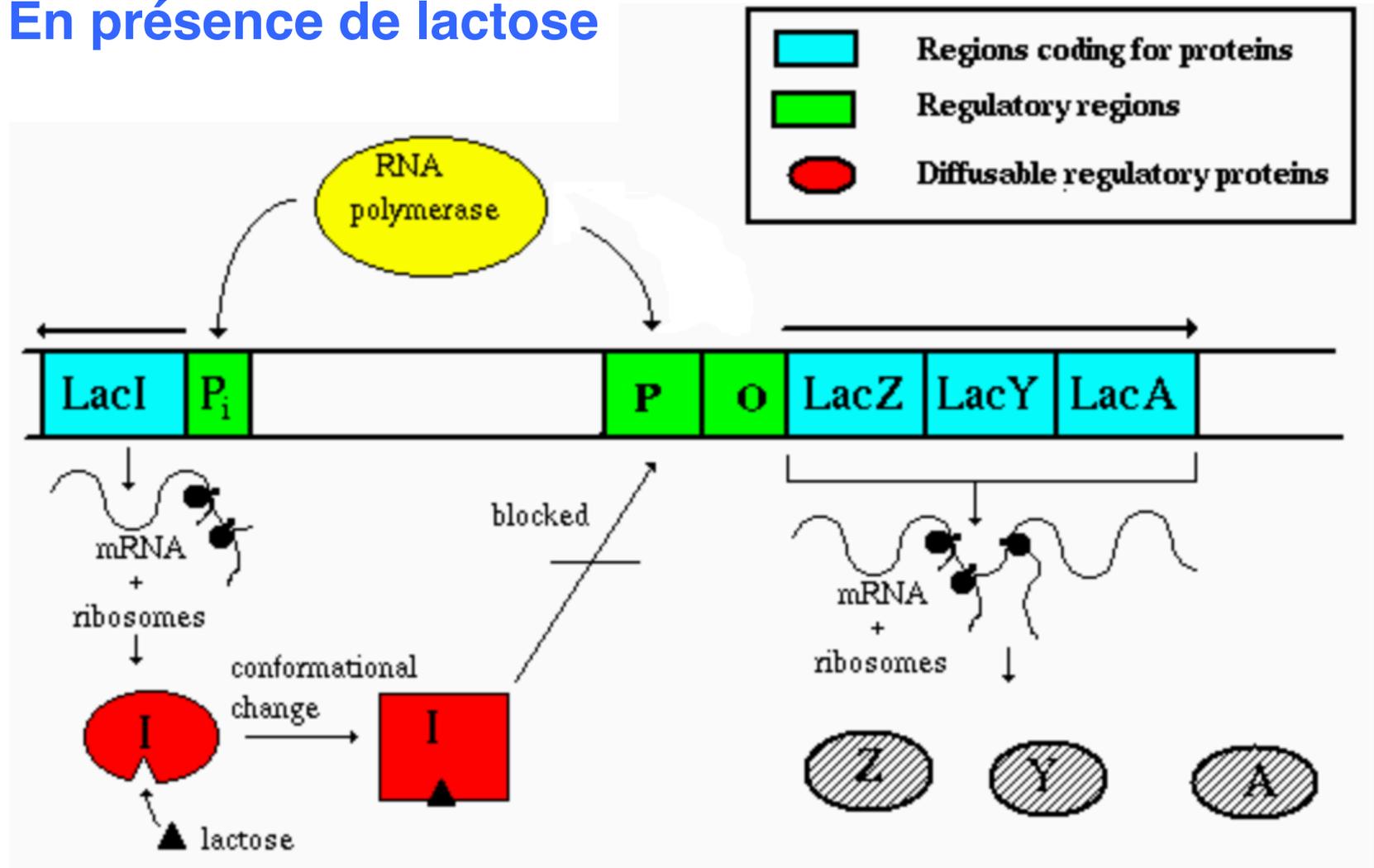
## En l'absence de lactose



Le **répresseur** est produit en permanence par LacI

Il s'attache à l'opérateur, empêche la polymérase de s'accrocher et bloque la synthèse de LacI, LacY, ...

# En présence de lactose



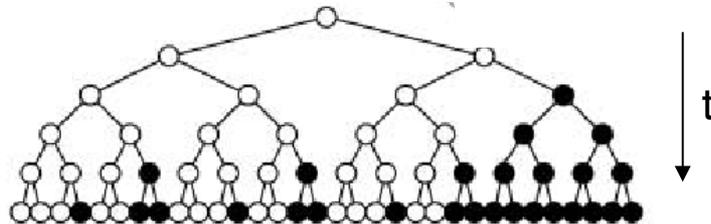
Le lactose se lie au répresseur, ce qui l'empêche de se lier au site opérateur  
La polymérase est libre de synthétiser les beta-galactosidases et les perméases :  
Plus de lactose entre dans la cellule, ce qui augmente la suppression de la répression  
(boucle de rétroaction positive)

Le film ...



## Deux remarques importantes :

- Deux états possibles pour chaque bactérie (conséquence de la rétroaction positive)
- Etat transmissible aux descendants!

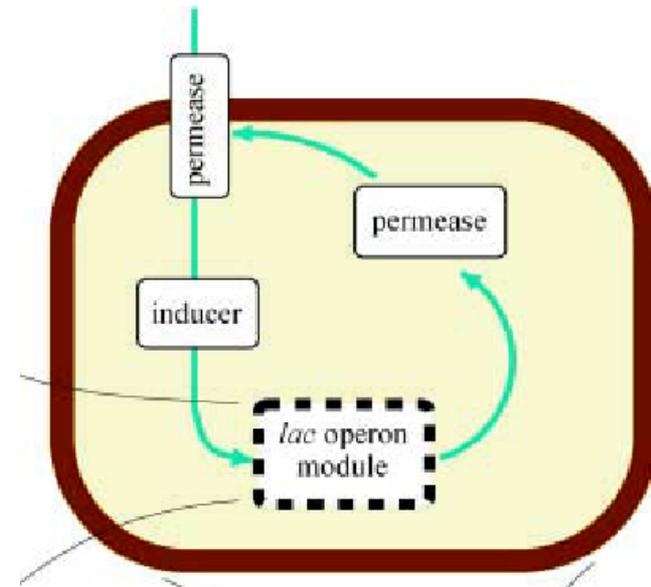


## Partie 3

Opéron lactose:  
modélisation d'un réseau de régulation

# Modéliser la dynamique du réseau de régulation

- 5 concentrations:
- perméases inactives  $Y$
  - perméases actives  $Y_f$
  - inducteurs internes  $I$
  - inducteurs externes  $I_{ex}$  (lactose)
  - $\beta$ -galactosidases  $Z$



synthèse

$$\frac{dY}{dt} = f_1(I) - a_1 Y,$$

intégration et activation

$$\frac{dY_f}{dt} = b_1 Y - a_2 Y_f,$$

Export actif

$$\frac{dI}{dt} = [f_2(I_{ex}) - f_3(I)] Y_f + b_2 I_{ex} - a_3 I,$$

Export passif

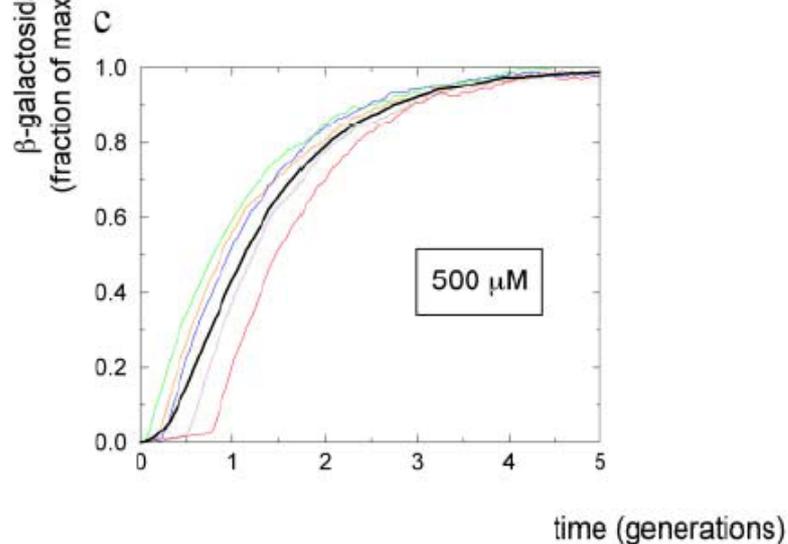
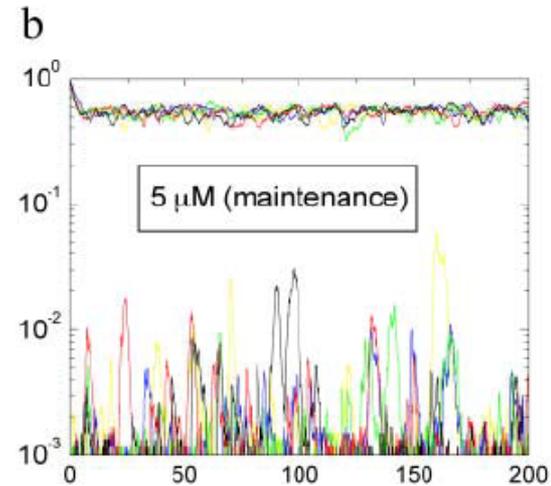
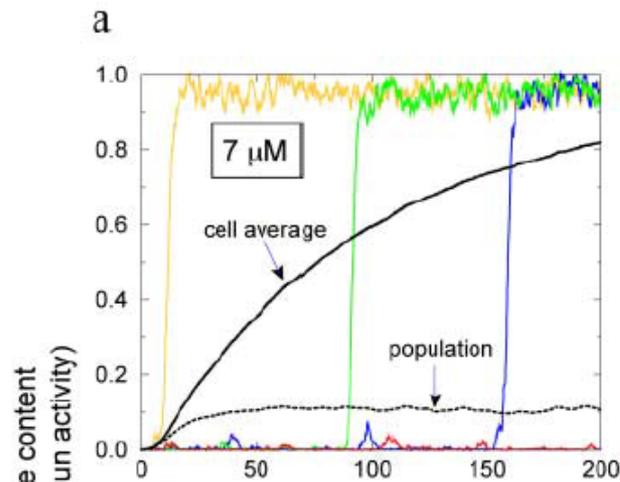
$$\frac{dZ}{dt} = g f_1(I) - a_3 Z.$$

Import passif

Import actif

synthèse

# Résultats



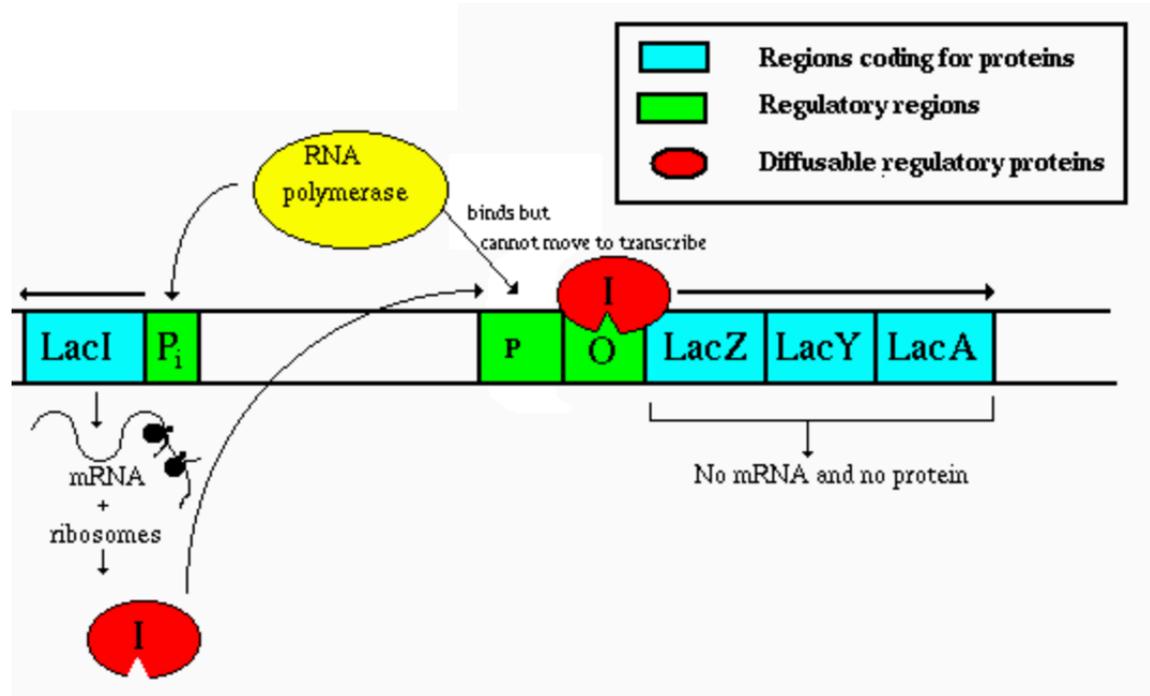
Solution numérique des Eqs 1-4  
avec événements stochastiques

Concentrations  $\rightarrow$   
nombres discrets ?

Dépendance spatiale?

# Critères pour un bon fonctionnement de la régulation de la transcription

- Spécificité
- Réversibilité
- Réactivité



## Partie 4

### Interactions entre protéine et ADN

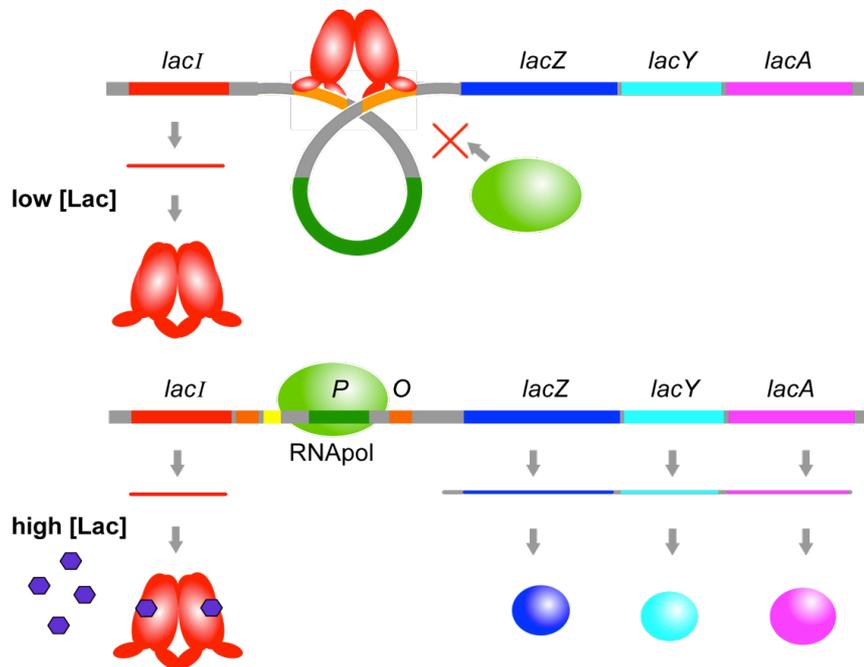
# Interactions spécifiques et changements de conformation

Interaction spécifique protéine/ protéine

Transition allostérique, coopérativité importante  
(ex : ATP + moteur moléculaire)

Interaction spécifique protéine/ADN

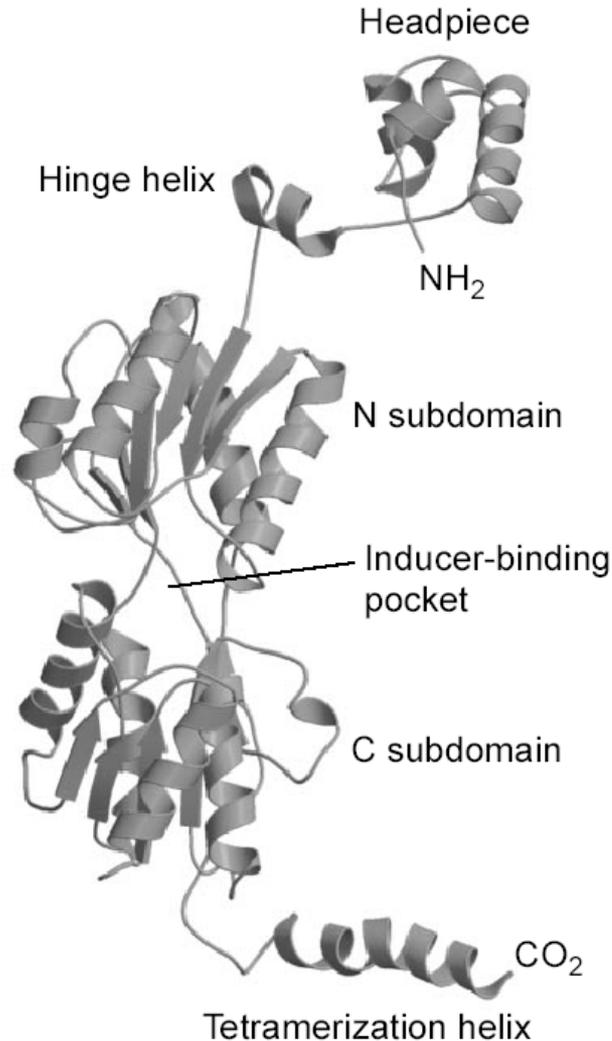
Cas du Lac Répresseur : **Création d'une boucle dans l'ADN !**



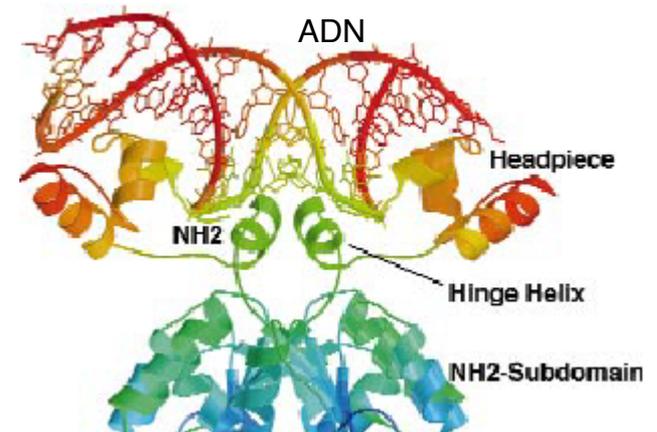
En fait, plusieurs sites opérateurs dans l'opéron lactose ...

<http://cubocube.com/>

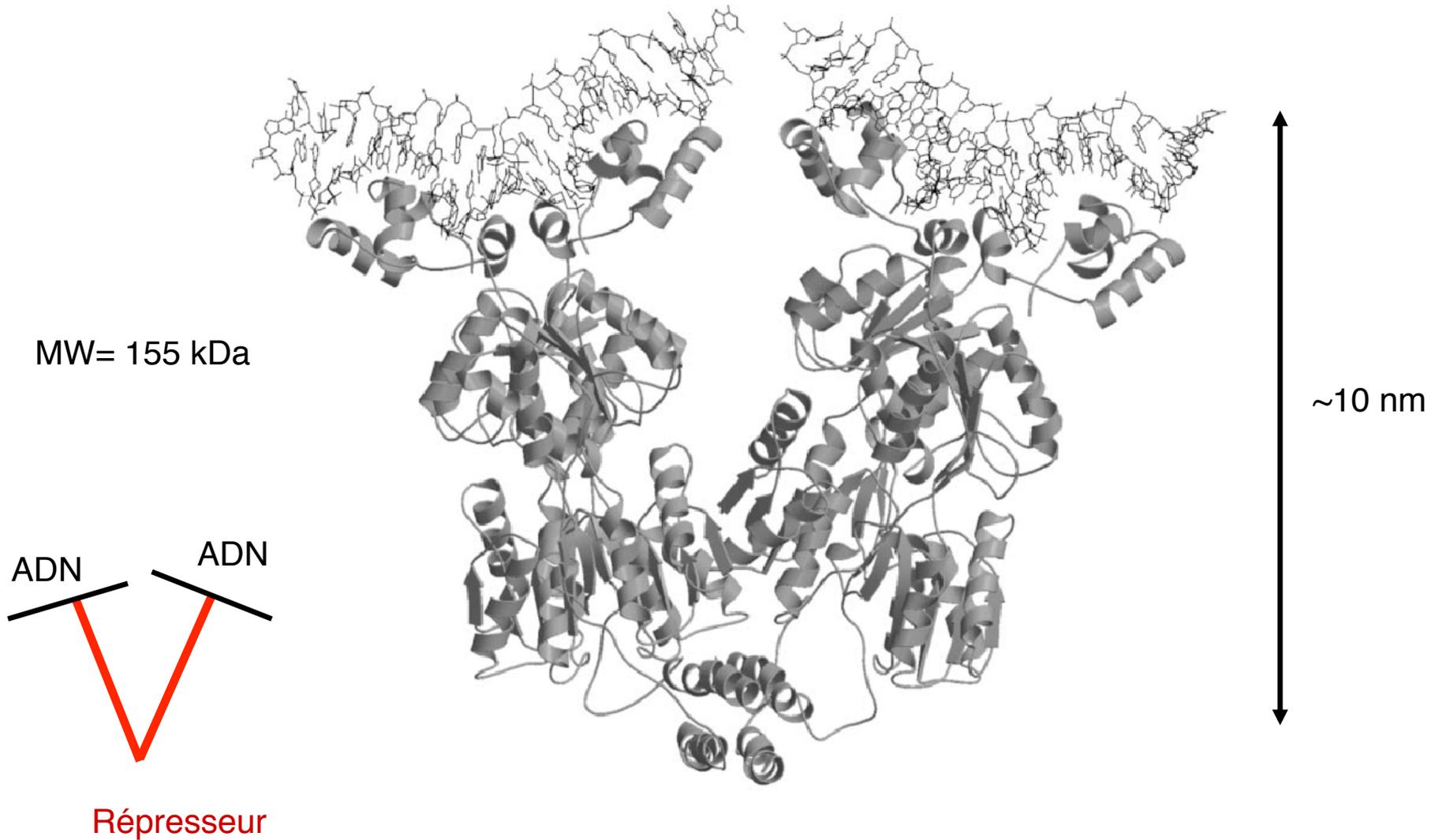
# Structure d'un monomère de répresseur Lac



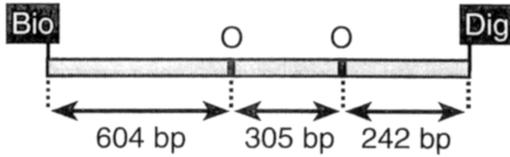
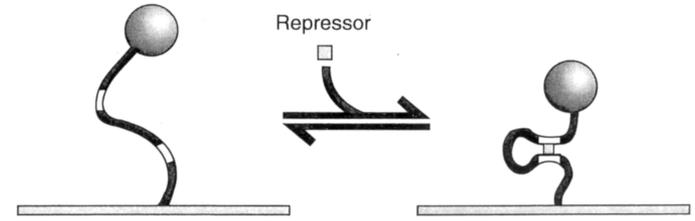
Structure of the Lac repressor bound to operator DNA (PDB code 1LBG) [3]. (a) A monomer is taken from the tetramer to show the individual structural units of the repressor. The inducer-binding pocket is located at the junction of the N and C subdomains, which form the repressor core. In the absence of DNA, the hinge helix is unfolded and the headpiece moves freely with respect to the core. (b) The V-shaped tetrameric repressor bound to two 21 base pair perfectly symmetric 'ideal' operator DNA duplexes. The hinge helices bind to the minor groove of the operator, bending it by 40° away from the repressor. Deletion of the C-terminal helix results in dimers that retain normal ligand-binding properties.



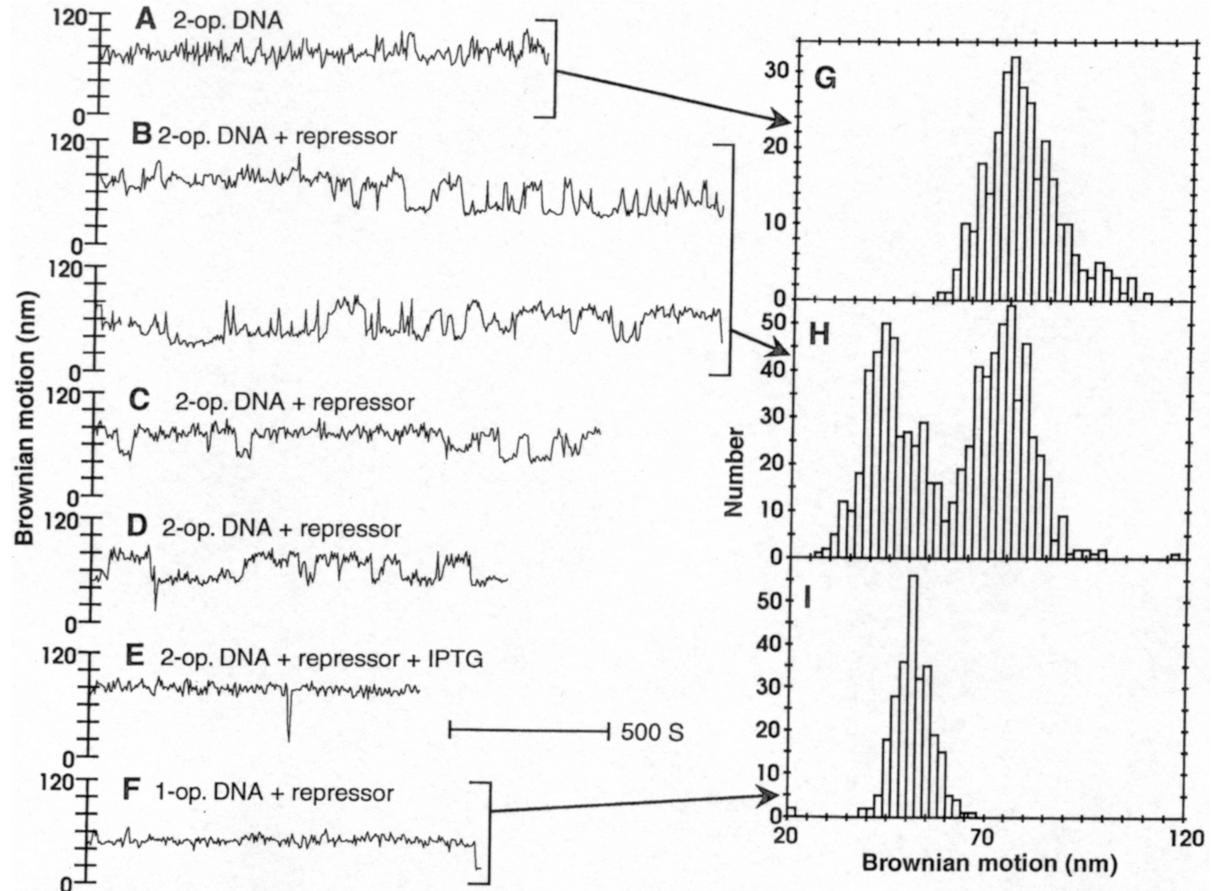
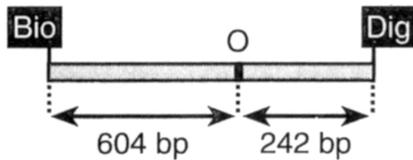
# Tétramère de répresseur Lac fixé sur deux opérateurs



# Formation de boucle, observée à l'échelle de la molécule unique



NB:  $L_p \sim 150$  bp



# Caractéristiques thermodynamiques



## Ordres de grandeurs

Volume d' une cellule de *E.Coli* :  $\sim 1 \mu\text{m}^3 \sim 10^{-15}$  litre

Un répresseur et un opérateur dans la bactérie:  $c_R = c_{ADN} \approx 10^{-9} \text{ M}$  (M = mol/litre)

Probabilité d' occupation de l' opérateur:

$$[RIADN]/ [ADN] = [R] / K_{eq} = 10^{-9}/10^{-10} = 10 \rightarrow P = [RIADN]/ ([RIADN] + [ADN]) = 10/11 = 90\%$$

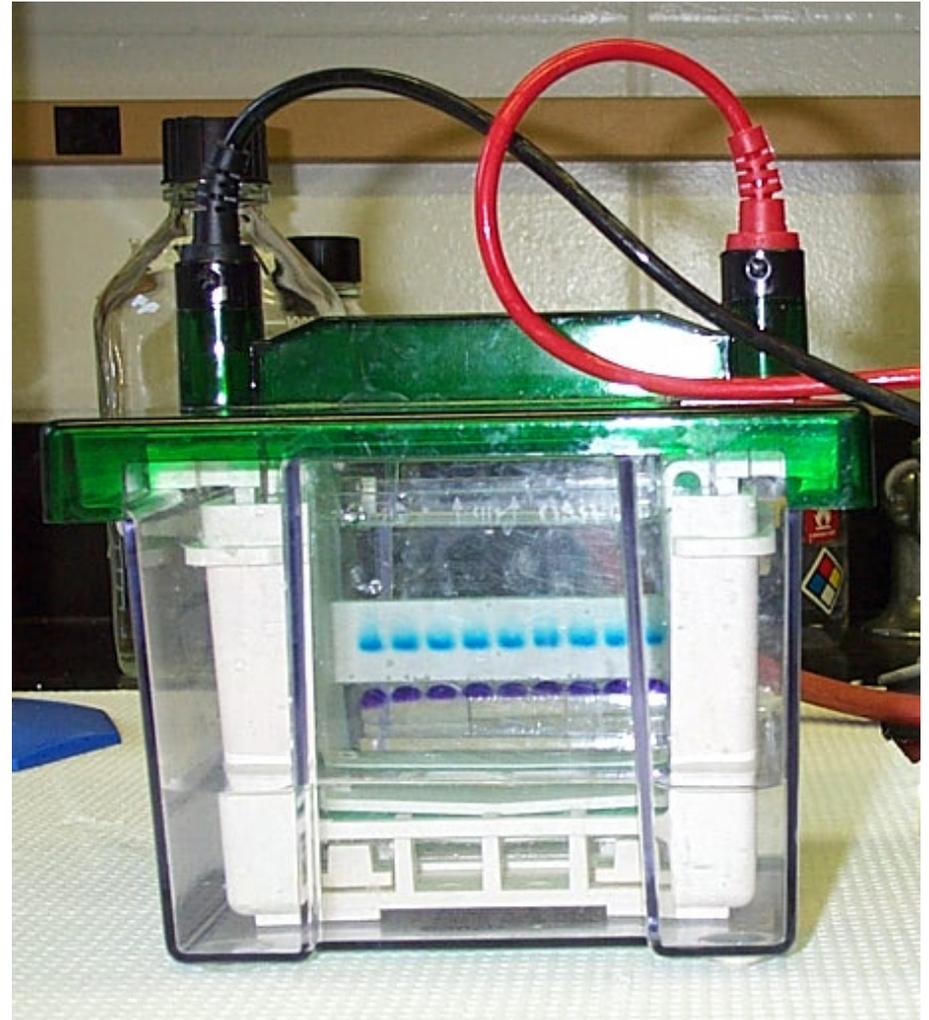
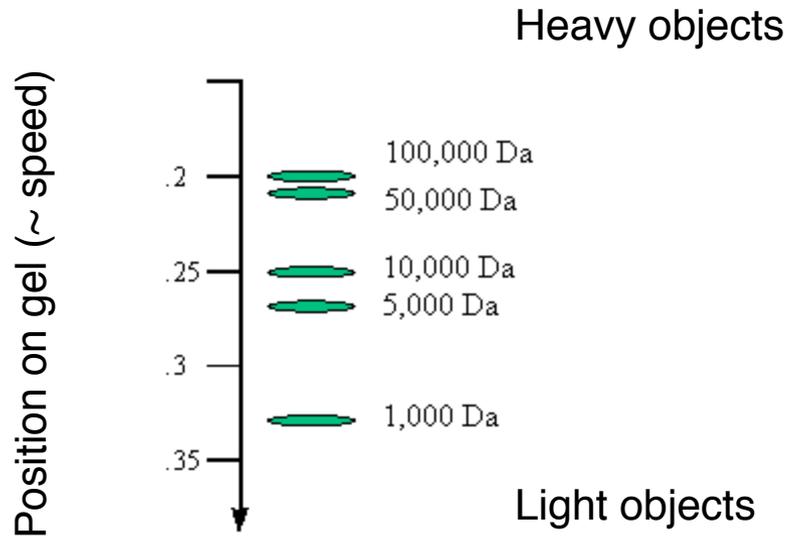
$$\Delta G = \ln 10^{-10} \approx - 23 \text{ kT}$$

## Mesure de $K_{eq}$ par électrophorèse

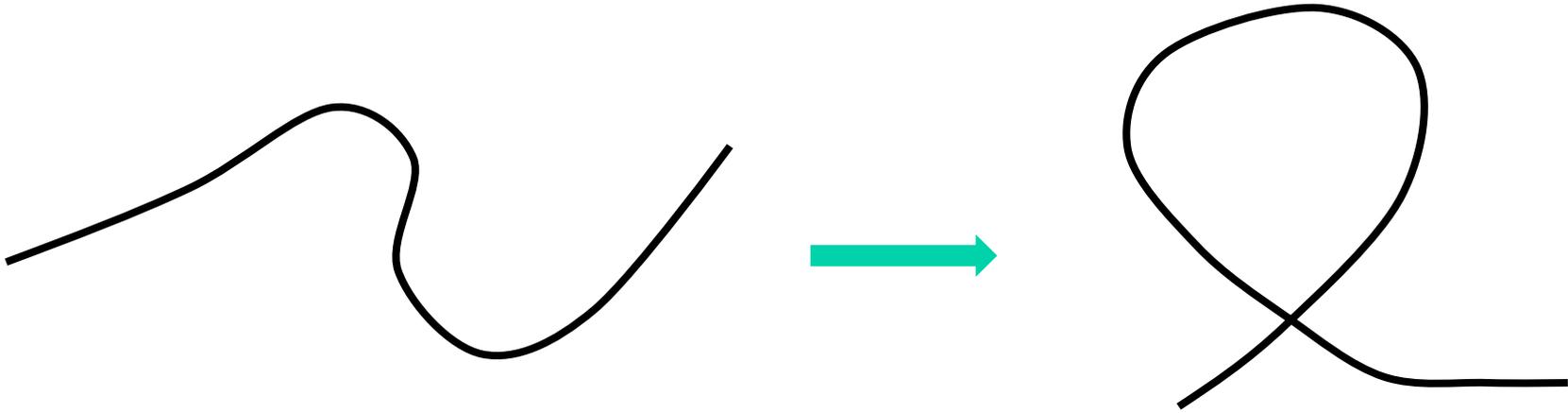
Déposer un mélange d' ADN et de répresseurs sur gel et faire migrer rapidement.

L'état d' équilibre est conservé, les mailles du gel empêchent la dissociation des complexes.

# Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

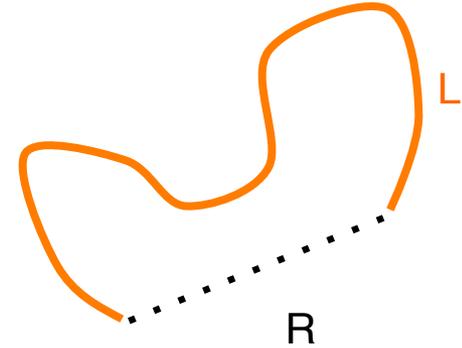


## Coût(s) d'une boucle d'ADN



- Coût énergétique : énergie élastique élevée si la boucle est de longueur  $< L_p$
- Coût entropique : perte en entropie si la boucle est longue par rapport à  $L_p$

## Coût(s) d'une boucle d'ADN



- Théorie gaussienne (valide pour  $L > l_p$ ) :

$$\langle R^2 \rangle \sim \left( \frac{L}{l_p} \right) l_p^2 \Rightarrow \rho(\vec{R} | L) \sim C \times \exp\left(-3R^2 / (2Ll_p)\right)$$

Densité de probabilité de  $R=0$  :

$$C \sim \frac{1}{(Ll_p)^{3/2}}$$

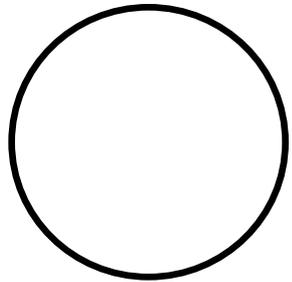
Probabilité d'une boucle :

$$V \times C \sim \frac{V}{(Ll_p)^{3/2}}$$

avec  $V = \text{volume région de contact} \sim 1 \text{ nm}^3 \sim 1.6 \text{ mol/l} = 1.6 \text{ M}$

## Coût(s) d'une boucle d'ADN

- Théorie élastique (valable pour  $L \ll l_p$ ) :



$$E(L) = l_p \times \frac{L}{R^2} = 4\pi^2 \frac{l_p}{L} \approx 39.5 \frac{l_p}{L}$$

avec  $L = 2\pi R$

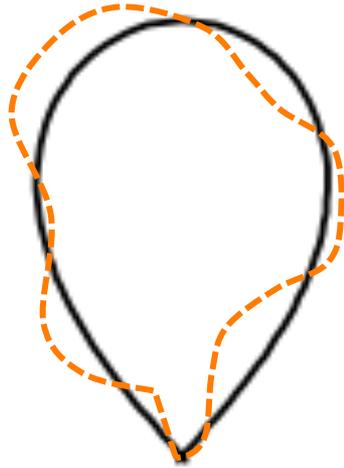
Mais la forme optimale (minimisant l'énergie élastique) n'est pas un cercle !



$$E(L) \approx 14.06 \frac{l_p}{L}$$

(cas  $L=0.7 l_p$ )

## Et les fluctuations?



Courbe optimale (température nulle)

Fluctuations de la molécule (température finie)

Calcul compliqué, non exact, fait par Shimada et Yamakawa en 1984 :

Probabilité d'une boucle :

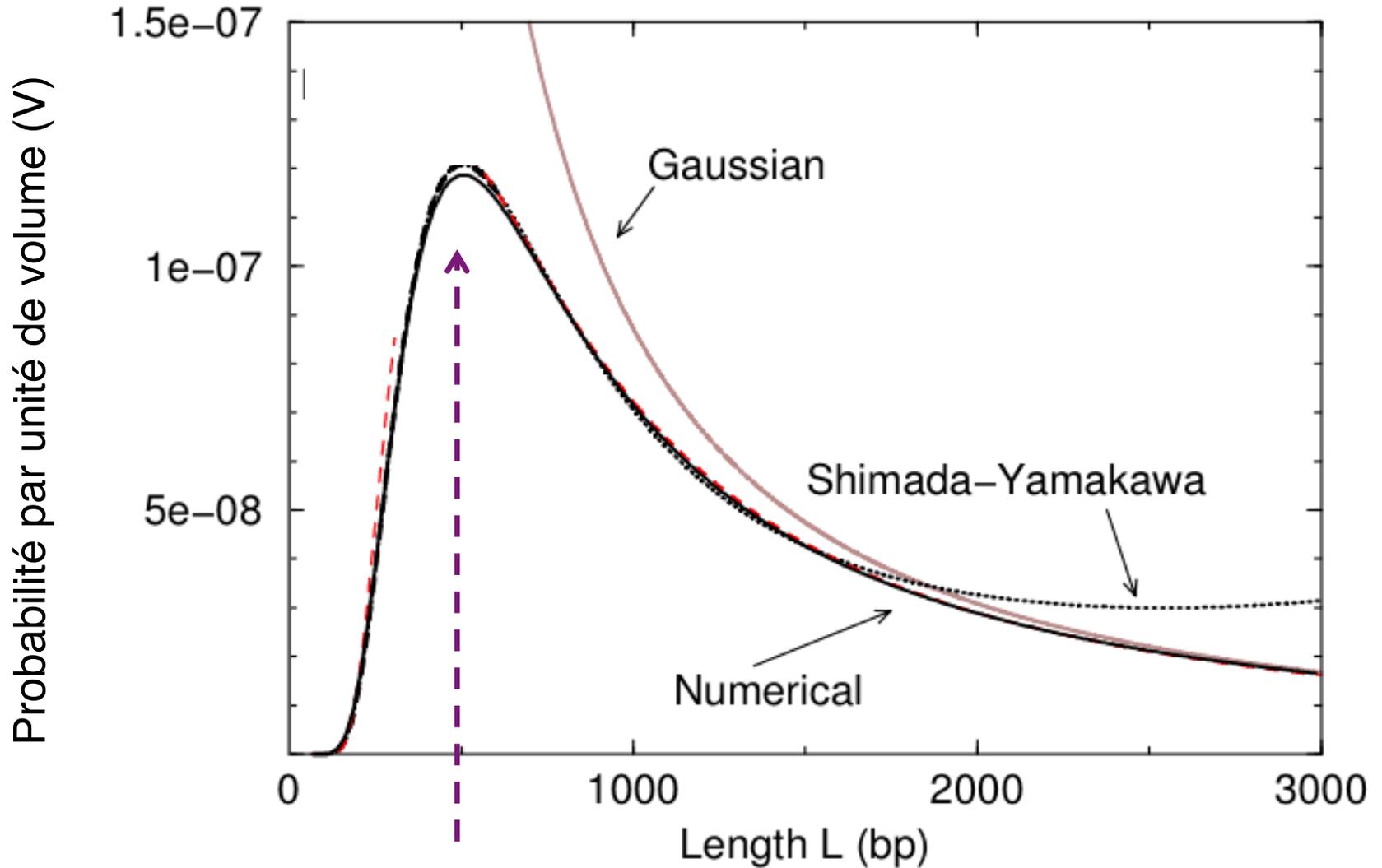
$$V \times e^{-14.06l_p/L} \times 112.04 \frac{l_p^2}{L^5} e^{0.246L/l_p}$$

↑  
Coût énergétique

↑  
Fluctuations

# Résultats

Allemand & Cocco, 2006



Longueur L optimale !!

# Interactions non-spécifiques entre répresseur et ADN

$$K_{eq} = 10^{-4} \text{ M}$$

Six ordres de grandeur plus faible que l'interaction spécifique

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \ln 10^{-4} = - 9.2 \text{ kT}$$

Cette interaction est d'origine électrostatique et a un caractère dominant entropique.

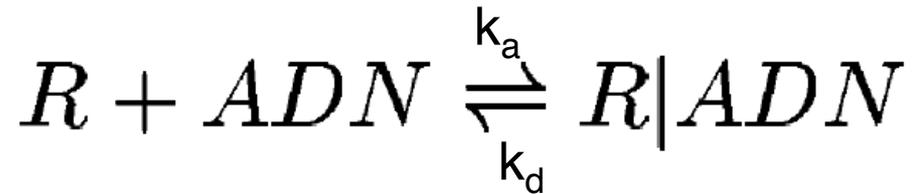
La fixation de la protéine chasse des contre-ions.

**MAIS POURQUOI CETTE INTERACTION NON-SPECIFIQUE ?**

## Partie 5

### La course vers l'opérateur

# Cinétique



$$K_{eq} = k_d/k_a = 10^{-10} \text{ M}$$

Mesure de  $k_{\text{accrochage}}$  pour l'interaction spécifique :

Mélanger répresseur et ADN-opérateur- $^{32}\text{P}$  à  $t=0$ .

Prélever plusieurs échantillons à différents temps  $t$ .

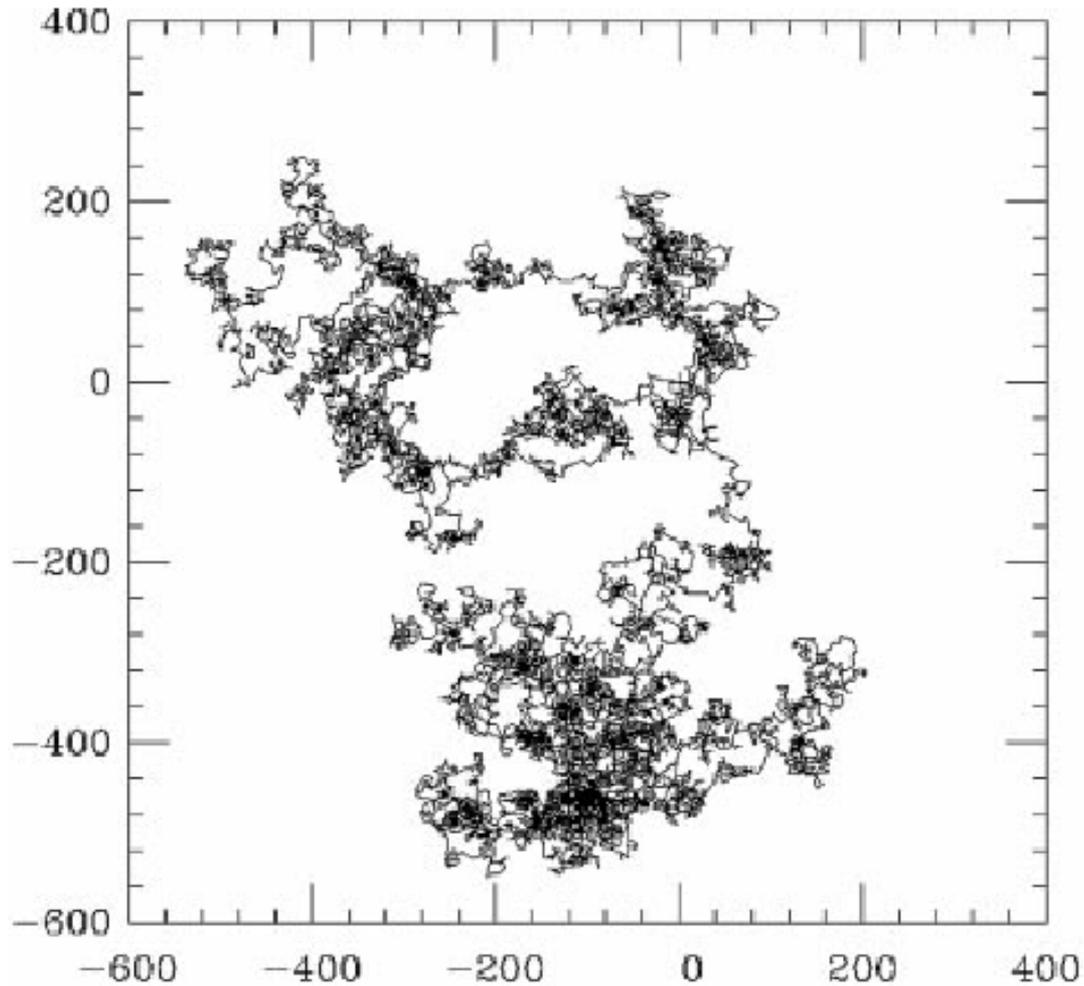
Adsorption du complexe par le répresseur sur filtre de nitrocellulose.

Mesurer la radioactivité.

$$k_a = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad \rightarrow \quad k_d = K_{eq} k_a = 1 \text{ s}^{-1}$$

Comment le répresseur peut-il trouver rapidement l'opérateur ?  
(temps typique: quelques secondes)

## Rechercher l'opérateur par diffusion 3D



Une marche aléatoire 3D de  $10^6$  pas.

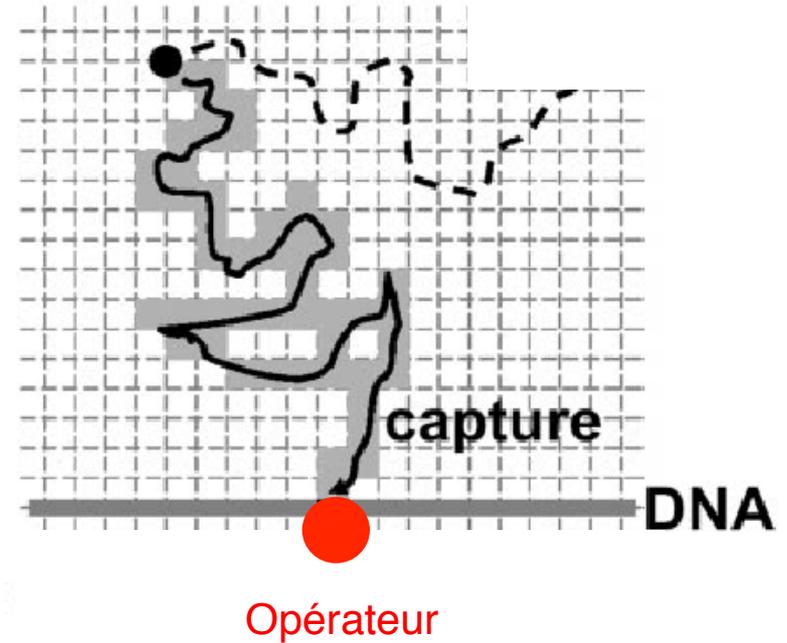
Longueur de pas=1.

Projection sur un plan.

Taille totale moyenne  $\sim 1000$  pas.

Beaucoup de trous.

## Limite de Debye-Smoluchowsky

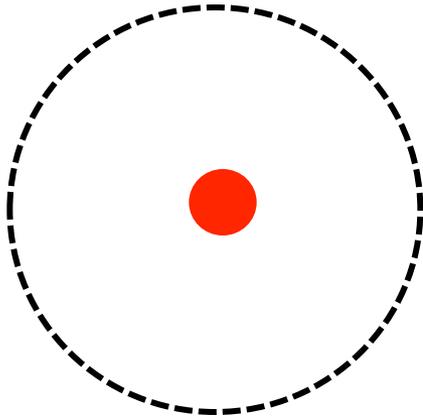


Approche théorique pour trouver une borne sur le taux d'accrochage  $k_a$

Equation de diffusion 3D en régime stationnaire

Site opérateur fixe au centre d'une sphère

Répresseur = sphère de rayon  $b$  ( $\sim$  qqs nm), pas d'interaction non-spécifique avec l'ADN (un seul site d'accrochage)



## Limite de Debye-Smoluchowsky

Concentration en répresseurs libres  $c(r)$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\Delta c$$

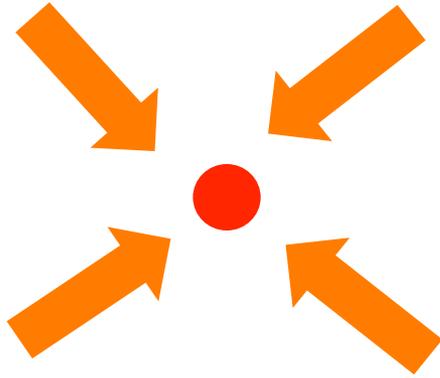
Régime stationnaire (flux I de répresseurs adsorbés, on considère que l'opérateur ne relâche pas les répresseurs)

$$\frac{\partial c}{\partial t} = 0 \Rightarrow \Delta c = 0 \Rightarrow c(r) = c_0 \times \left(1 - \frac{b}{r}\right)$$

où  $c_0$  = concentration de répresseurs à l'infini.

**NB** : équation de Laplace : solution stationnaire = Potentiel de Coulomb!

$$\Delta V = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r^2} (rV) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 V}{\partial \varphi^2} + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial V}{\partial \theta} \right)$$



## Limite de Debye-Smoluchowsky

Le flux diffusif  $I$  vaut

$$I = 4\pi b^2 \times D \frac{dc}{dr}(b) = \underline{4\pi b D} \times c_0$$

Donc le taux d'accrochage est :

$$k_a = \underline{4\pi D b} = \frac{2}{3} \frac{kT}{\eta} = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$\frac{kT}{6\pi\eta b} \cong 40 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{s}$$

Représente une limite supérieure → le mécanisme de **diffusion 3D est trop lent**

( car temps d'alignement répresseur-ADN négligé,  
D plus faible dans le cytoplasme que dans l'eau, ...)

## Interaction non-spécifique entre répresseur et ADN

$$K_{eq} = 10^{-4} \text{ M}$$

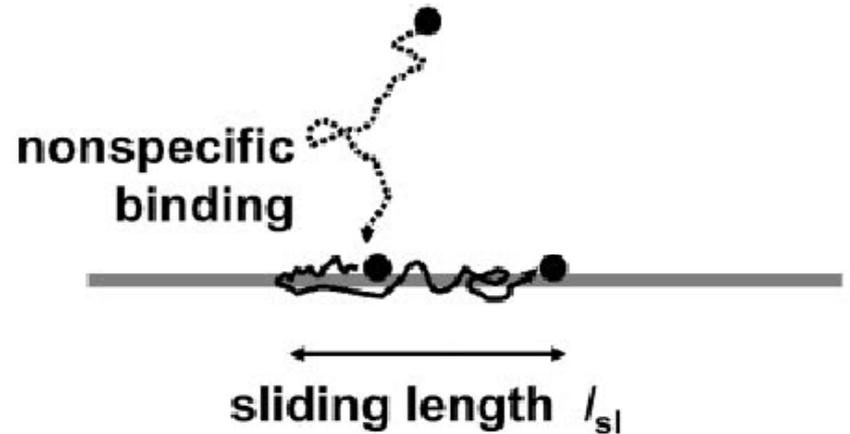
Six ordres de grandeurs plus faible que l'interaction spécifique

Néanmoins important car le nombre de sites est très grand:

$N_{bp} = 4.5 \cdot 10^6$  pour le chromosome de *E. Coli*.

→ Probabilité pour un répresseur de se trouver sur l'ADN = 99%

## Recherche par diffusion 1D



La constante de diffusion 1D est  $\sim 100$  plus petite que la constante de diffusion 3D.

Problème majeure:  $l_{sl} \propto t^{1/2}$

→ Le temps nécessaire augmente vite avec la longueur de l'ADN:  $t \propto l_{sl}^2$

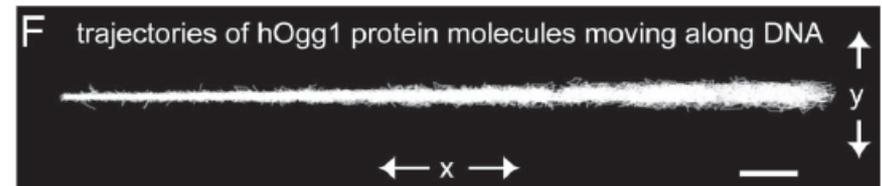
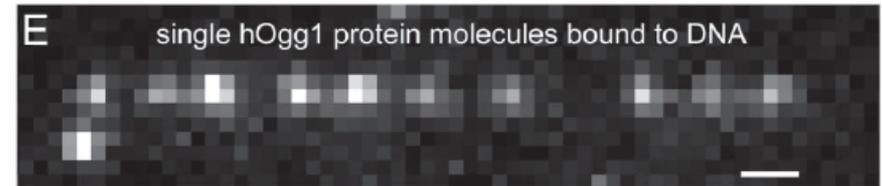
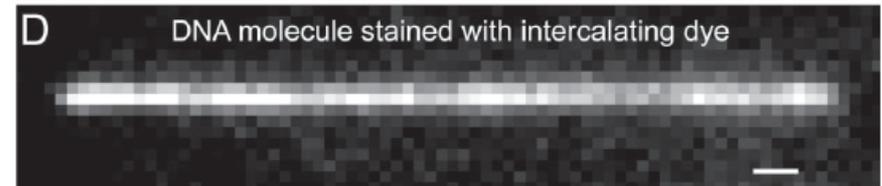
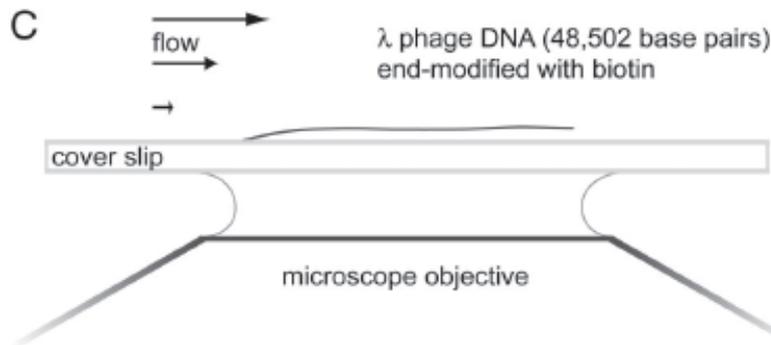
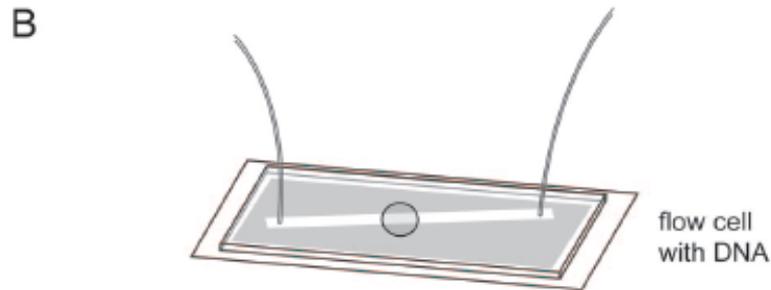
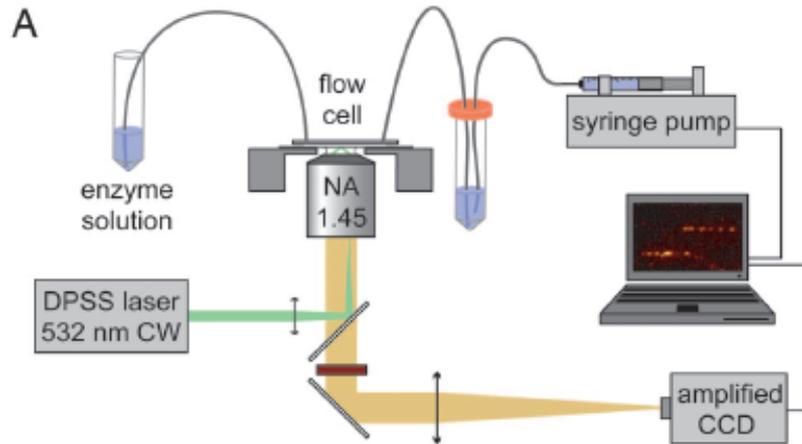
Pour  $l_{sl}=10 \mu\text{m}$  (33kb) et  $D_{1D}=0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  →  $t = l_{sl}^2/D_{1D} \approx 200 \text{ s}$

*E. Coli* : 100 répresseurs bien distribués mettraient  $\sim 200 \text{ s}$  pour bloquer la transcription

↑  
valeur typique

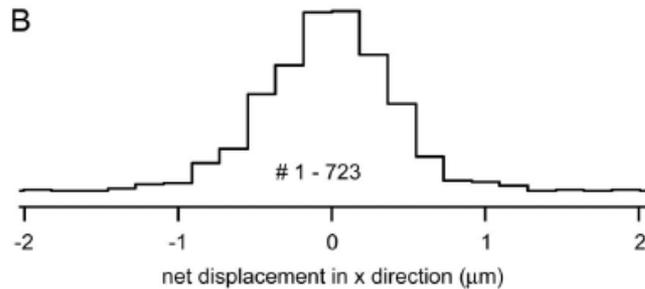
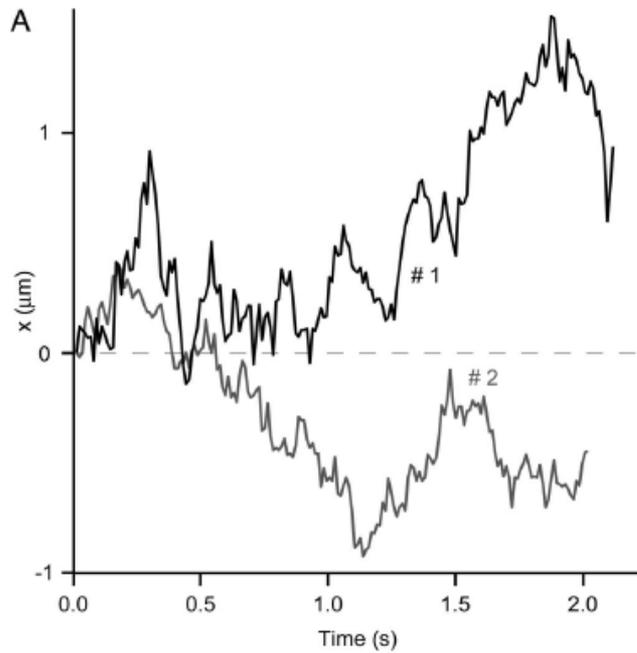
↑  
**Trop long**

# Diffusion of proteins on DNA: single molecule fluorescence

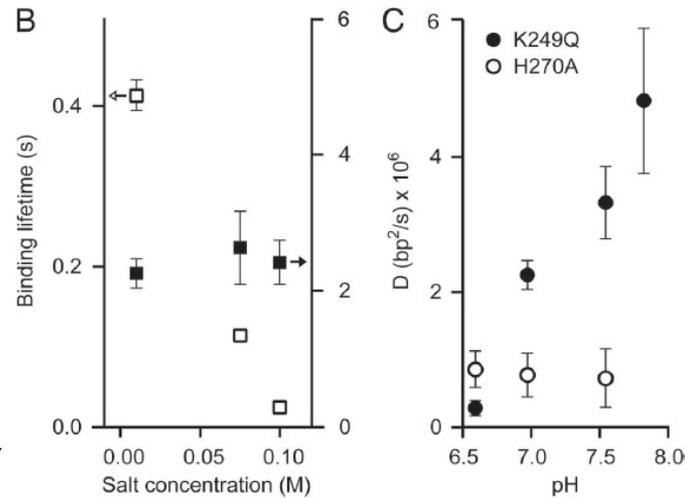
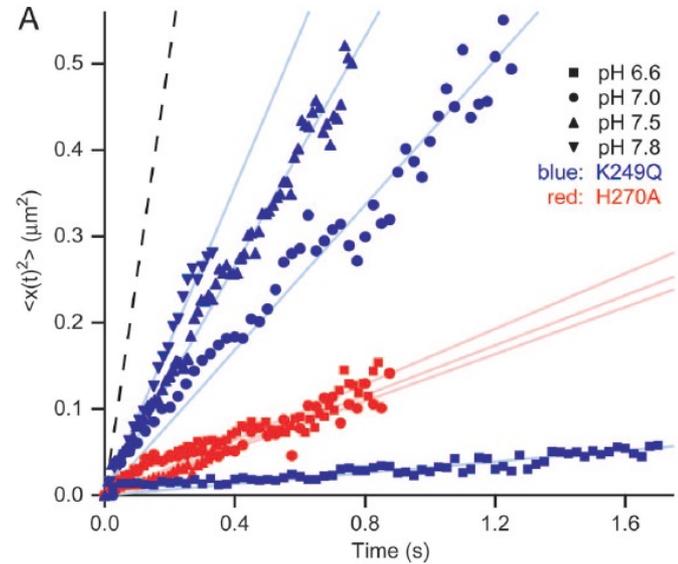


hOgg1 = protéine impliquée dans l'excision de bases endommagées (réparation de l'ADN)

## Trajectories of two hOgg1 proteins



## Mean-square displacements

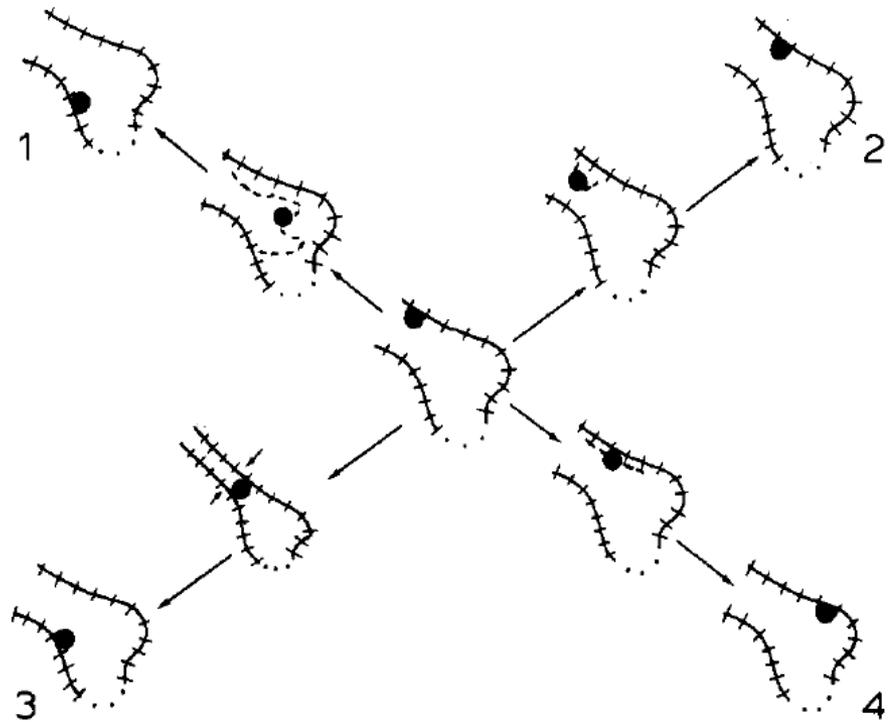
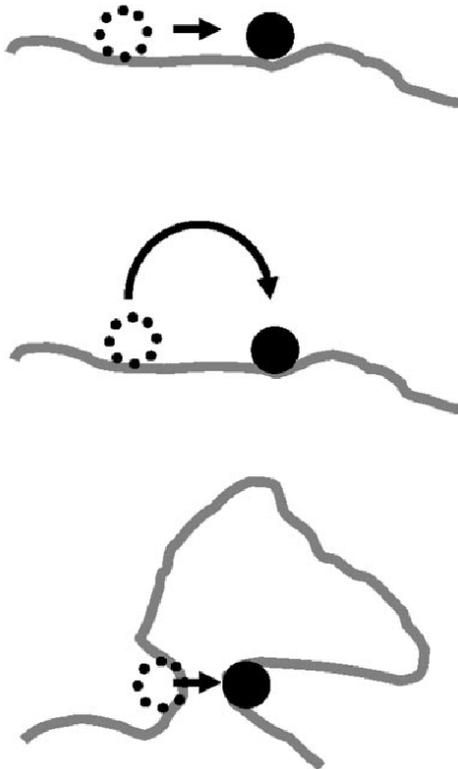


Binding lifetime depends on salt, while  $D$  is constant.

A conserved histidine at position 270 causes the pH dependence.

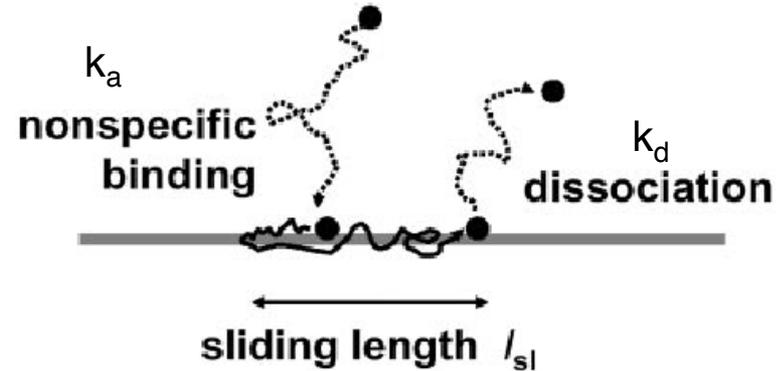
# Recherche par une combinaison de diffusion 3D et 1D

Berg, Winter et van Hippel (BWH), Biochemistry 20, 6929 (1981)



# Théorie de BWH

## Diffusion mixte 1D et 3D



### Une marche aléatoire 1D:

Durée typique :  $k_{d,ns}^{-1} \approx 100$  ms

(valeur mesurée)

Longueur d'ADN explorée :  $l_{sl} = (D_{1D} / k_{d,ns})^{1/2} = 200$  nm =  $4 l_p$

( $D_{1D} = 0.5 \mu m^2/s$ )

### Après un temps $T \gg k_{d,ns}^{-1}$ :

Il y a de l'ordre de  $k_{d,ns} T$  marches aléatoires 1D

Longueur d'ADN explorée :  $L(T) \approx T (D_{1D} k_{d,ns})^{1/2}$

linéaire dans le temps !

### Temps de recherche

$T(L) = L / (D_{1D} k_{d,ns})^{1/2}$ , pour  $L = 10 \mu m$  (33kb) on trouve  $T \approx 5$  s

(alors que la diffusion 1D pure donne  $T \approx 200$  s)

Cette stratégie est utilisée par de nombreuses protéines pour localiser un site spécifique dans l'ADN ou l'ARN

« moteur de recherche pour la base de données génomique »

# 6 BILAN

Récapitulation de différents sujets enseignés dans notre cours et application à un système biologique avec plusieurs éléments en interaction dynamique à l'échelle moléculaire et cellulaire.

L'opéron Lac dans *E.coli*, un réseau de régulation modèle qui représente la complexité, quelques concepts importants et les ordres de grandeurs.

Régulation de la transcription.

Modélisation d'un réseau de régulation.

Interaction ADN protéine.

Interaction électrostatique et entropie.

Structure et spécificité. Importance de l'élasticité (boucle de régulation)

Couplage entre diffusion et la cinétique des réactions intermoléculaires.

Mécanisme de Berg, Winter et van Hippel pour la recherche d'un site.