

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

MÉMOIRE DE M2

PRÉPARATION À L'AGRÉGATION

Manipulation d'un brin d'ADN par le dispositif de pinces magnétiques

Auteur :
Hugo ROUSSILLE

8 avril 2019



Introduction

La manipulation des brins d'ADN est un enjeu majeur de la recherche en biophysique. En effet, l'étude du comportement individuel d'un brin et des protéines sur ce brin permet d'obtenir de nombreuses informations sur les mécanismes qui permettent aux cancers de se développer, ou aux bactéries de se multiplier. La manipulation individuelle de brins d'ADN est réalisée à l'aide de nombreuses méthodes différentes : pièges électromagnétiques, optiques, magnétiques...

Dans ce mémoire, nous développerons les aspects théoriques et expérimentaux de la manipulation de brins d'ADN individuels par la méthode des « pinces magnétiques », développée par l'équipe de Vincent Croquette en 2002 [1]. Nous présenterons enfin les résultats auxquels cette technique a mené.

Table des matières

1	Description de l'expérience	2
1.1	Difficulté de manipuler des brins d'ADN	2
1.2	Principe général	2
1.3	Partie magnétique	3
1.4	Dispositif optique	3
2	Échantillonnage de la force appliquée	3
2.1	Modèle de physique statistique	3
2.2	Acquisition numérique	5
2.3	Mesure de la longueur des brins	5
3	Corrections d'ouverture des hairpins	7
4	Application : vitesse d'ouverture du brin d'ADN	8
4.1	Expérience réalisée	8
4.2	Résultats expérimentaux	9

1 Description de l'expérience

1.1 Difficulté de manipuler des brins d'ADN

Il est difficile d'étudier des molécules uniques de par leur très petite taille (inférieure à $1\ \mu\text{m}$). En effet, pour un brin d'ADN d'environ 1000 bases (donc de masse de l'ordre de $10^{-21}\ \text{kg}$), la vitesse quadratique moyenne est de l'ordre de $1\ \text{m s}^{-1}$. Ainsi ces molécules sont très mobiles. De plus, le brin d'ADN est très long et se replie beaucoup sur lui-même : on ne peut pas l'observer directement.

C'est pourquoi la méthode couramment utilisée lors de l'étude de molécules uniques agissant sur l'ADN est l'ajout d'une tension au brin d'ADN : on tire aux deux extrémités et ainsi le brin se linéarise, permettant une observation bien plus simple. Plusieurs techniques sont utilisées dans les laboratoires travaillant dans le domaine : pièges optiques [2], pièges électromagnétiques [3], et enfin la méthode que nous présentons ici, le piège magnétique [1].

1.2 Principe général

Le principe des pinces magnétiques est assez simple : on accroche une bille superparamagnétique au bout de la molécule d'ADN, et on fixe l'autre extrémité de la molécule sur une plaque. On place ensuite un aimant à distance variable de la bille, et la distance entre la bille et l'aimant détermine la force avec laquelle on tire sur le brin d'ADN. L'altitude des billes est donc la longueur du brin d'ADN. Cette altitude est déterminée par diffraction : on éclaire les billes de façon à réaliser des taches d'Airy (diffraction par une pupille circulaire), et on remonte à l'altitude par ajustement numérique sur le profil diffracté.

Le dispositif complet est montré sur la figure 1. La partie inférieure est constituée d'une caméra rapide (80 images par seconde) et d'un microscope, focalisé sur la cellule microfluidique qui constitue la partie centrale, contenant les brins d'ADN et les billes. Cette cellule est faite de deux plaques entre lesquelles du fluide peut passer. Ce fluide est injecté à gauche et est pompé par une seringue couplée à un moteur. Au-dessus du dispositif, on trouve deux aimants montés sur un moteur servant à faire varier la force appliquée sur les brins. Enfin la lumière nécessaire à l'observation par le microscope est fournie par un dispositif LED-lentille en haut de l'appareil.

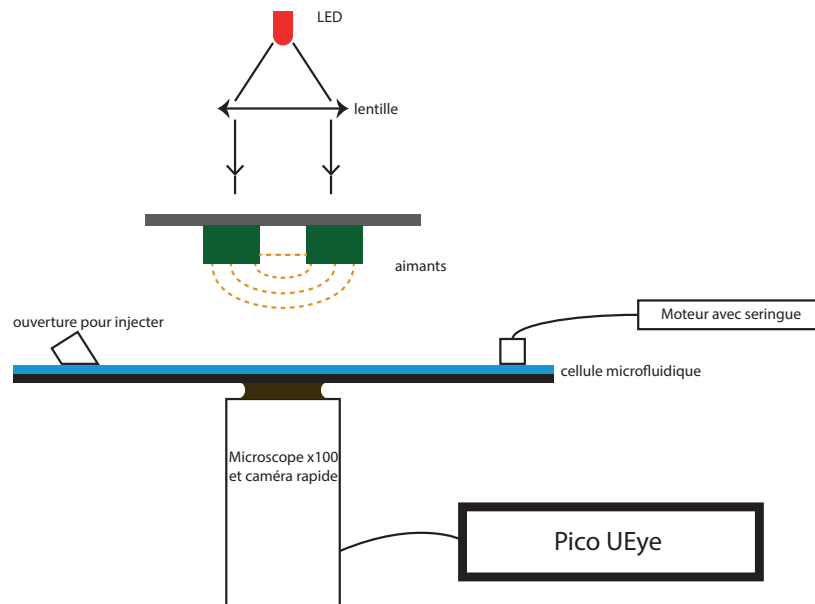


Figure 1 – Schéma global de l'expérience : les billes sont placées dans la cellule microfluidique, et les rayons du dispositif optique interfèrent au niveau de celles-ci. Une ouverture a été faite dans la cellule afin qu'il soit possible d'y injecter des solutions. Une caméra rapide couplée à un microscope $\times 100$ filme le contenu de la cellule. Les images sont envoyées au logiciel d'acquisition Pico UEye. Les aimants peuvent être tournés et déplacés selon la verticale, permettant ainsi de faire varier le champ magnétique au niveau de la cellule.

1.3 Partie magnétique

Afin de pouvoir mettre en place ce dispositif, il faut des molécules d'ADN particulières, qui puissent s'accrocher aux billes et à la plaque. On utilise des brins d'ADN en forme d'épingles appelés « hairpins », qui sont des simples brins dont la première moitié est complémentaire de la seconde moitié ; ces brins peuvent donc se replier sur eux-mêmes. Ces brins sont placés en solution sur la « cellule micro-fluidique » contenant les composés nécessaires à l'accrochage. Ils s'accrochent à la plaque par leur site 3' et à la bille par leur site 5' (voir figure 2).

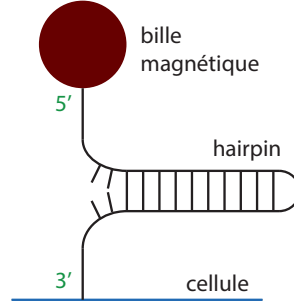


Figure 2 – Schéma d'un hairpin : il est fixé par le bas (site 3') à la cellule microfluidique et est attaché par le haut (site 5') à la bille superparamagnétique.

Le moteur des aimants peut atteindre une vitesse de 10 mm s^{-1} . Ces derniers sont en néodyme fer bore, et permettent d'atteindre des forces de 0.01 pN à 30 pN . Les billes superparamagnétiques utilisées ont un diamètre de $1 \mu\text{m}$.

1.4 Dispositif optique

Le principe optique est assez simple : les rayons issus de la LED sont rendus parallèles par la lentille. Lorsqu'ils rencontrent une bille, ils interfèrent entre eux et font apparaître le profil de tache que l'on observe figure 3b (voir un schéma figure 3a). Le rayon des anneaux observés dépend de la distance entre les billes et le microscope, et on peut donc directement relier le rayon mesuré à l'altitude des billes et ainsi la configuration du hairpin : si les billes sont à altitude 0, le hairpin est fermé ; plus elles sont hautes, plus elles sont ouvertes (voir figure 4). En mesurant le rayon des anneaux, on peut donc suivre en temps réel les ouvertures de plusieurs dizaines de hairpins.

2 Échantillonnage de la force appliquée

2.1 Modèle de physique statistique

La calibration des aimants est réalisée afin de faire le lien entre l'altitude des aimants (z_{mag}) et la force appliquée sur les billes. Elle repose sur la physique statistique : le bruit thermique étant lié à la force, on mesure le bruit thermique à un z_{mag} donné pour en déduire la force.

On modélise donc le système {bille + brin} par un pendule amorti de masse m et d'altitude u (Figure 5) forcé par une force de Langevin et on lui applique le principe fondamental de la dynamique (à partir de [1]) :

$$\underbrace{m \frac{d^2 u}{dt^2}}_{\substack{\text{terme d'inertie négligé} \\ \text{car mouvement apériodique}}} + \underbrace{\Gamma \eta r \frac{du}{dt}}_{\text{frottements visqueux}} + \underbrace{k_u u}_{\substack{\text{force de rappel} \\ \text{horizontale}}} = \underbrace{F_L}_{\text{force de Langevin}} \quad (1)$$

où r est le rayon de la bille, k_u est la constante de raideur, η est la viscosité dynamique et $\Gamma = 6\pi$ (car $Re \ll 1$ ici)

Par théorème de fluctuation-dissipation, on a $\langle F_L(t) \rangle = 0$ et $\langle F_L(t) \cdot F_L(t') \rangle = 2k_B T \times 6\pi \eta r \times \delta(t-t')$. Cela donne dans l'espace de Fourier :

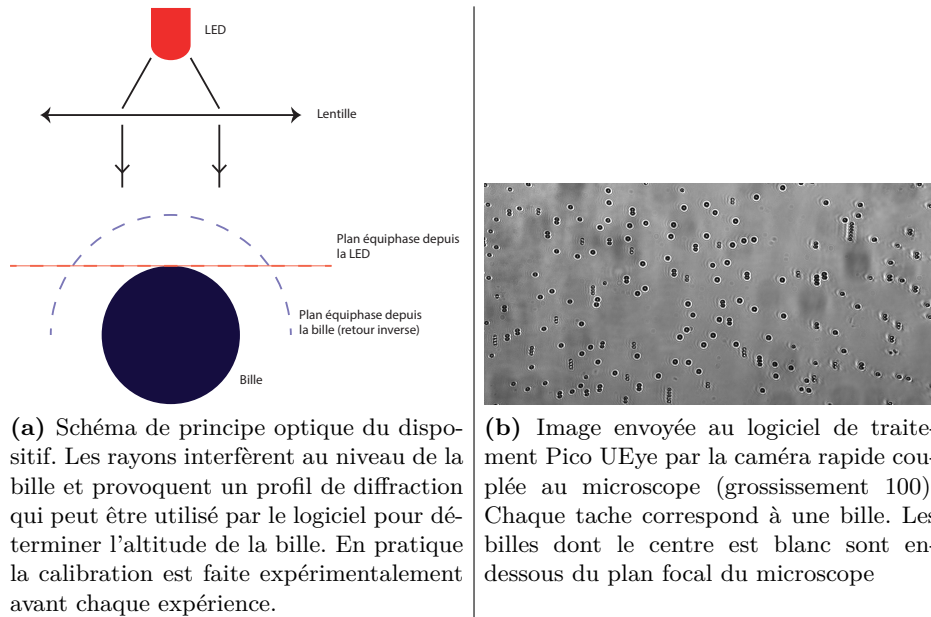


Figure 3 – Optique du dispositif schématisée et image vue par la caméra

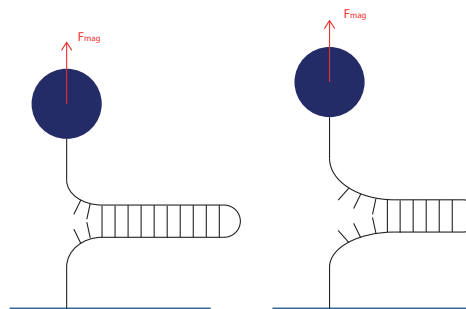


Figure 4 – Schéma représentant l'altitude de la bille pour différents degrés d'ouverture du hairpin. La force reste constante, mais si le brin est plus ouvert alors la bille est plus haute.

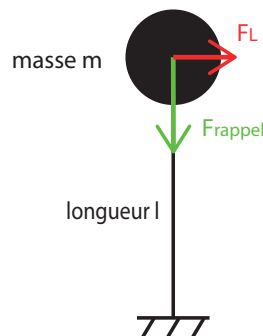


Figure 5 – Schéma du système considéré, ainsi que les forces s'appliquant sur celui-ci. La force de rappel F_{rappel} est ici selon z mais a aussi des composantes selon x et y en général. La force de Langevin F_L est aléatoire.

$$|F_L(f)|^2 = 4k_B T \times 6\pi\eta r \tag{2}$$

ce qui correspond à du bruit blanc. On peut ensuite calculer la fonction de transfert du système et relier le spectre de u à celui de F_L :

$$|u(f)|^2 = 4k_B T \frac{6\pi\eta r}{|k_u + 6i\pi\eta r 2\pi f|^2} = 4k_B T \frac{6\pi\eta r}{k_u^2} \frac{1}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2} \text{ avec } f_c = \frac{k_u}{12\pi^2\eta r} \quad (3)$$

On a ainsi dans l'espace de Fourier une lorentzienne : le système se comporte comme un filtre passe-bas de fréquence de coupure f_c . En mesurant expérimentalement $|u(t)|^2$, on peut obtenir $|u(f)|^2$ puis par ajustement remonter aux rapports $\frac{r}{k_u^2}$ et $\frac{k_u}{r}$. Ainsi, on en déduit les valeurs de r et de k_u . Enfin, on a

$$F_{mag} = k_u l \quad (4)$$

(avec l la longueur du brin) et on peut donc mesurer la valeur de la force afin d'obtenir F_{mag} en fonction de z_{mag} .

2.2 Acquisition numérique

Les mesures réalisées étant numériques, il est important de respecter le critère de Nyquist-Shannon : il faut que la fréquence d'échantillonnage f_e soit supérieure au double de la fréquence du signal. Ici, on peut prendre pour fréquence caractéristique f_c : il faut donc $f_e > 2f_c$. On remarque donc que plus les mesures sont réalisées à forte force, plus la fréquence d'échantillonnage doit être élevée. Cela pose plusieurs problèmes expérimentaux : tout d'abord, il est impossible de faire beaucoup de mesures à haute force, car la fréquence d'acquisition de la caméra est limitée ; ensuite, un hairpin trop court aura une fréquence de coupure trop faible et on a donc une limite inférieure sur la longueur.

Sur la figure 6 on trace la position des billes en fonction du temps lors de l'expérience, et sur la figure 7a le résultat numérique obtenu pour la raideur et le rayon à partir de ces données de position. Enfin, sur la figure 7b, on donne la raideur en fonction de z_{mag} .

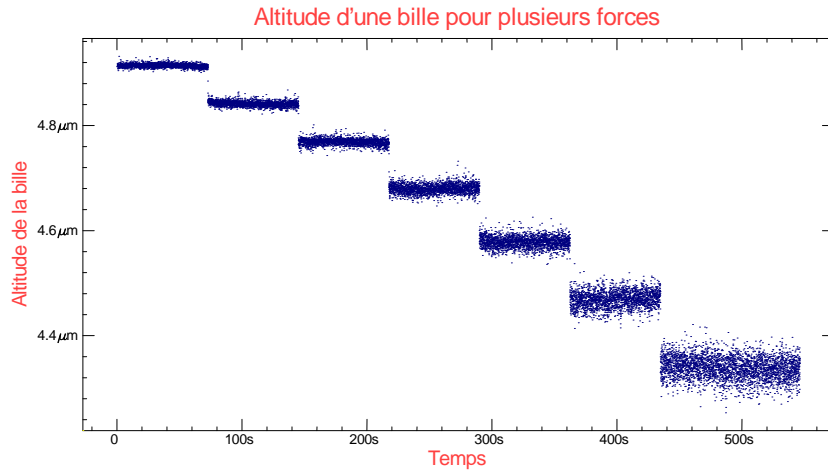


Figure 6 – Altitude d'une bille pour différentes positions des aimants lors de la calibration. On observe un fort bruit, issu des fluctuations thermiques, qui augmente quand la force diminue.

2.3 Mesure de la longueur des brins

On souhaiterait alors obtenir F_{mag} , et l'on a $F_{mag} = k_u l$. Il faut donc mesurer la longueur du brin. On dispose de l'altitude z_{max} de la bille à différentes forces ; il faut donc calibrer la position du zéro. Pour cela, on utilise le surenroulement de l'ADN [4] : si l'on fait tourner la bille sur elle-même, le double brin s'enroule autour de lui-même, formant des plectonèmes. Sa longueur totale diminue alors jusqu'à atteindre 0 ; on a donc la valeur de la nouvelle origine z_{min} , et on peut en déduire la longueur totale du brin : $l = z_{max} - z_{min}$. On peut remarquer qu'un tel processus ne peut pas fonctionner avec un simple brin, car celui-ci ne ferait que tourner sans former de plectonèmes.

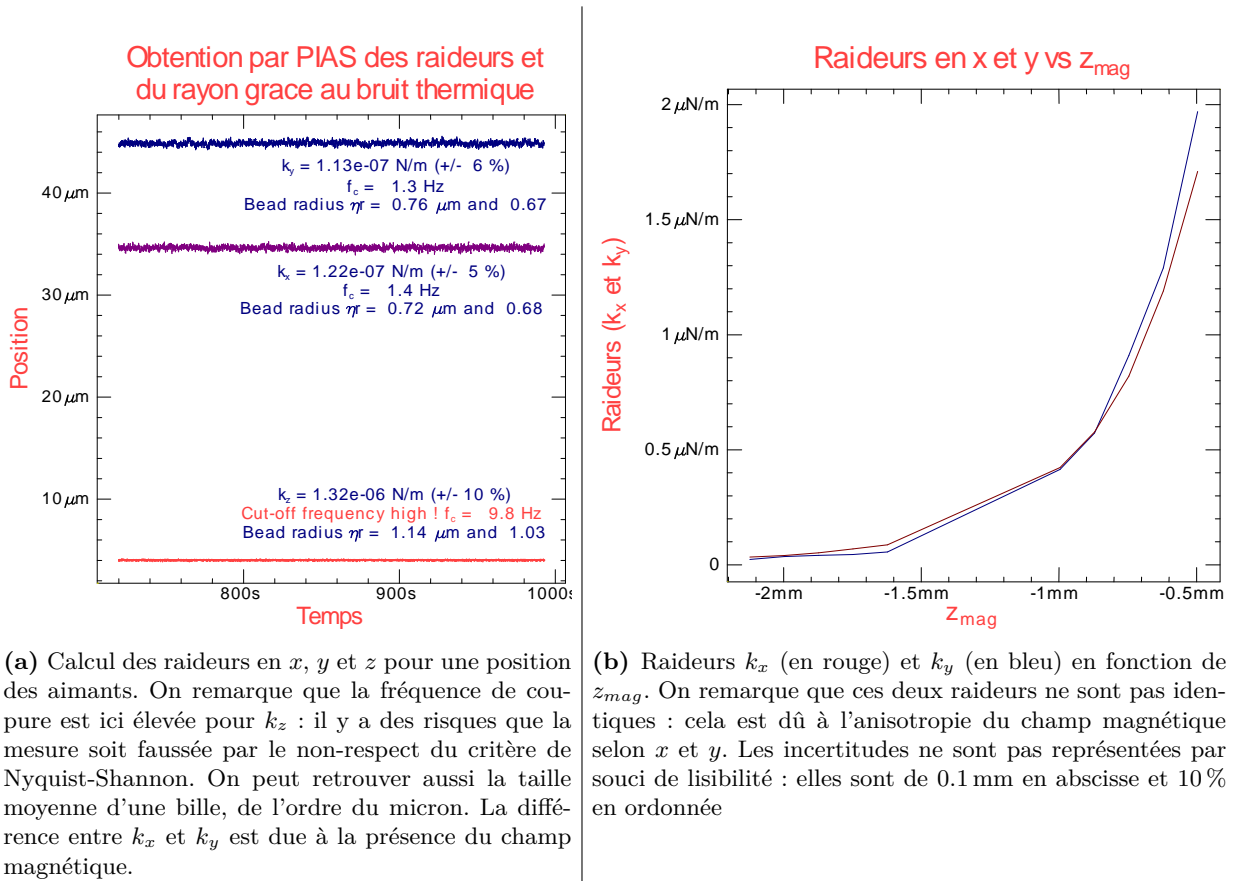


Figure 7 – Obtention des raideurs associées à la force de Langevin

La figure 8 donne l'extension du brin en fonction du nombre de tours effectués pour plusieurs forces : on observe plusieurs phases sur le graphique. À basse force (0.5 pN environ), l'extension est maximale quand on ne réalise pas de rotation ; sinon, le brin s'enroule très facilement et atteint rapidement z_{min} . À plus haute force, on perd la symétrie de la courbe : si l'on déroule la double hélice, le brin reste tendu tandis que si l'on enroule davantage, des plectonèmes se forment.

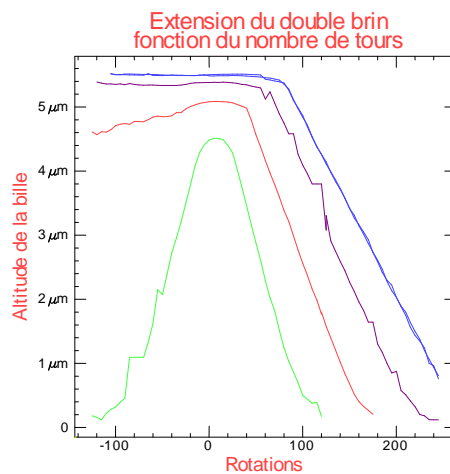


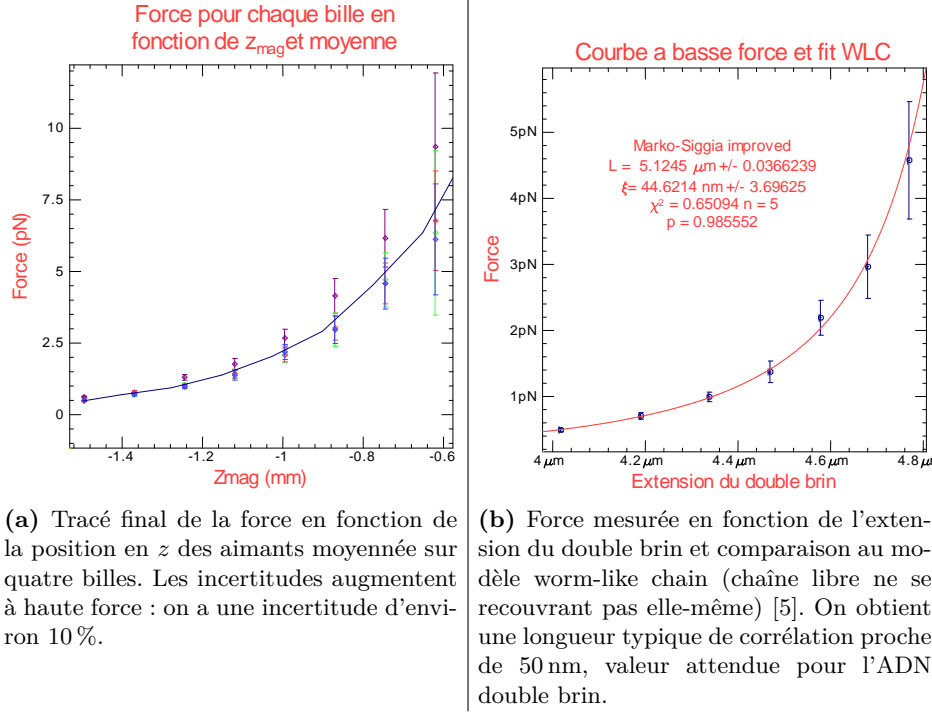
Figure 8 – Tracé de l'extension en fonction de la rotation pour différentes forces. On remarque un comportement différent à haute et basse force : à haute force le double brin reste tendu si l'on défait l'hélice (rotation négative) ; à basse force son extension diminue directement. Le facteur de correction des longueurs ici est donc de 0.12 μm

En effectuant les corrections nécessaires, on peut alors obtenir la courbe de la force en fonction de

l'altitude z_{mag} des aimants ou de l'extension du double brin d'ADN utilisé (figure 9). On modélise la courbe obtenue par

$$F(z_{mag}) = F_0 \exp\left(a_1 z_{mag} + a_2 z_{mag}^2\right) \quad (5)$$

où F est la force, $F_0 = 49.9 \text{ pN}$, $a_1 = 3.20 \text{ mm}^{-1}$ et $a_2 = 7.94 \times 10^{-2} \text{ mm}^{-1}$.



(a) Tracé final de la force en fonction de la position en z des aimants moyennée sur quatre billes. Les incertitudes augmentent à haute force : on a une incertitude d'environ 10%.

(b) Force mesurée en fonction de l'extension du double brin et comparaison au modèle worm-like chain (chaîne libre ne se recouvrant pas elle-même) [5]. On obtient une longueur typique de corrélation proche de 50 nm, valeur attendue pour l'ADN double brin.

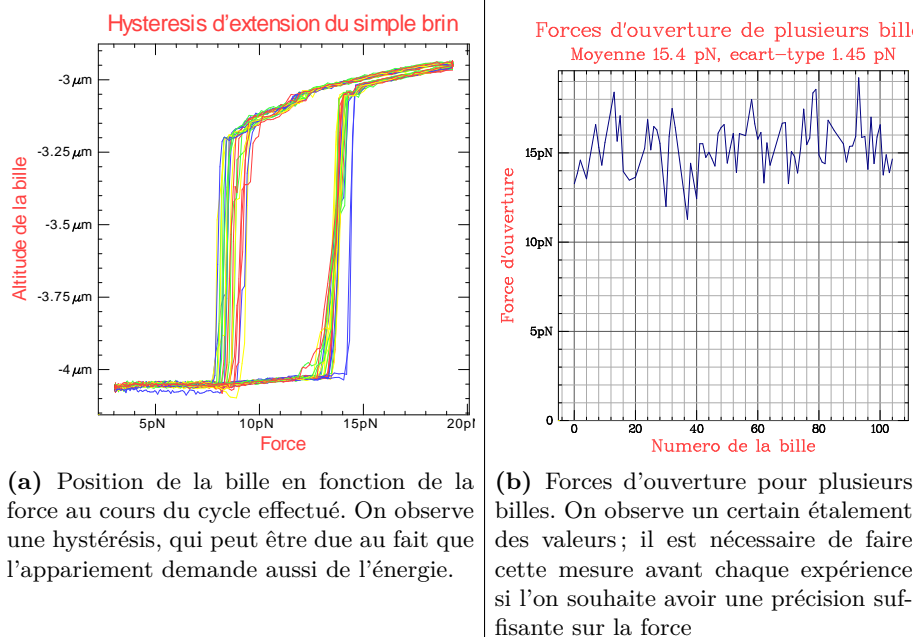
Figure 9 – Force mesurée en fonction de z_{mag} et de l'extension, et modélisation à l'aide du modèle worm-like chain

3 Corrections d'ouverture des hairpins

La plupart des hairpins s'ouvrent en deux quand la force appliquée sur leurs extrémités est de 15.6 pN. Cette valeur est liée à la rupture des liaisons hydrogène entre les deux bases d'une paire : une liaison A-T en possède 2, une liaison G-C en possède 3. Pour ouvrir le brin, il suffit de fournir une énergie suffisante pour ouvrir une liaison G-C. Selon [6], l'énergie d'une telle liaison est de $1.46 \times 10^{-20} \text{ J}$. Le diamètre de l'ADN étant de 2.0 nm environ, on retrouve une ouverture pour une force de 15 pN.

Cependant les billes ne sont pas parfaitement identiques, elles perçoivent donc des forces légèrement différentes. On observe expérimentalement une dispersion des forces d'ouverture de 1.45 pN. Ainsi, lors d'une expérience, il faut au préalable mesurer les forces auxquelles chaque bille s'ouvre afin de pouvoir réaliser des corrections ultérieurement. Ceci est très simple : il suffit de partir d'une force faible (3 pN) puis d'augmenter jusqu'à ce que tous les hairpins soient ouverts (20 pN) et enfin de revenir à basse force. On peut alors tracer l'altitude de la bille en fonction de la force, et l'on obtient un graphique tel que celui de la figure 10a. On peut en déduire les forces d'ouverture de chaque bille (figure 10b) et ainsi réaliser plus tard des corrections.

Sur le graphique de la figure 10a, on observe un cycle d'hystérésis : la force d'ouverture et celle de fermeture sont différentes. Cela est dû au fait que la formation de liaison demande aussi de l'énergie.



4 Application : vitesse d'ouverture du brin d'ADN

Le dispositif de pinces magnétiques permet notamment de mesurer la vitesse d'ouverture d'un double brin d'ADN par des protéines appelées hélicases. Celles-ci se fixent sur une zone déjà ouverte du brin, puis se déplacent en ouvrant toutes les paires sur leur chemin.

4.1 Expérience réalisée

On s'intéresse ici à l'hélicase Rep G373T374T6. Afin d'étudier sa vitesse d'ouverture du brin, on la met en solution avec plusieurs composés et notamment de l'ATP, le « carburant » des protéines. On applique plusieurs forces sur les brins d'ADN selon un cycle commençant à une force élevée (19 pN) : ainsi les brins s'ouvrent presque entièrement et l'hélicase a une forte chance de s'accrocher. On diminue ensuite la force jusqu'à 4 pN afin de refermer les brins : l'hélicase peut alors réaliser son travail d'ouverture du brin. Le cycle complet peut être observé sur la figure 10, avec des paliers à 6 pN pour faciliter les ouvertures.

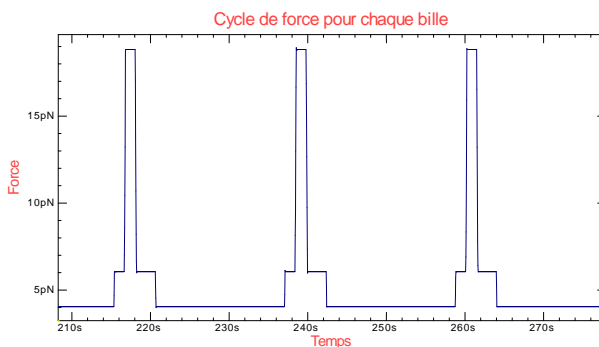


Figure 10 – Le cycle de force utilisé pour les mesures à basse force (5 pN ou moins). Le palier à 6 pN est utilisé pour faciliter l'accrochage de l'enzyme au double brin

Lorsqu'une hélicase agit sur le hairpin, on observe un profil d'altitude tel que celui de la figure 11a. Les variations d'altitude dans la zone à basse force sont dues à l'ouverture par l'hélicase. Afin de mesurer la vitesse, on relève les pentes descendantes et montantes, puis on un histogramme des

vitesse mesurées. La vitesse présentée dans les résultats est obtenue par modélisation gaussienne dudit histogramme.

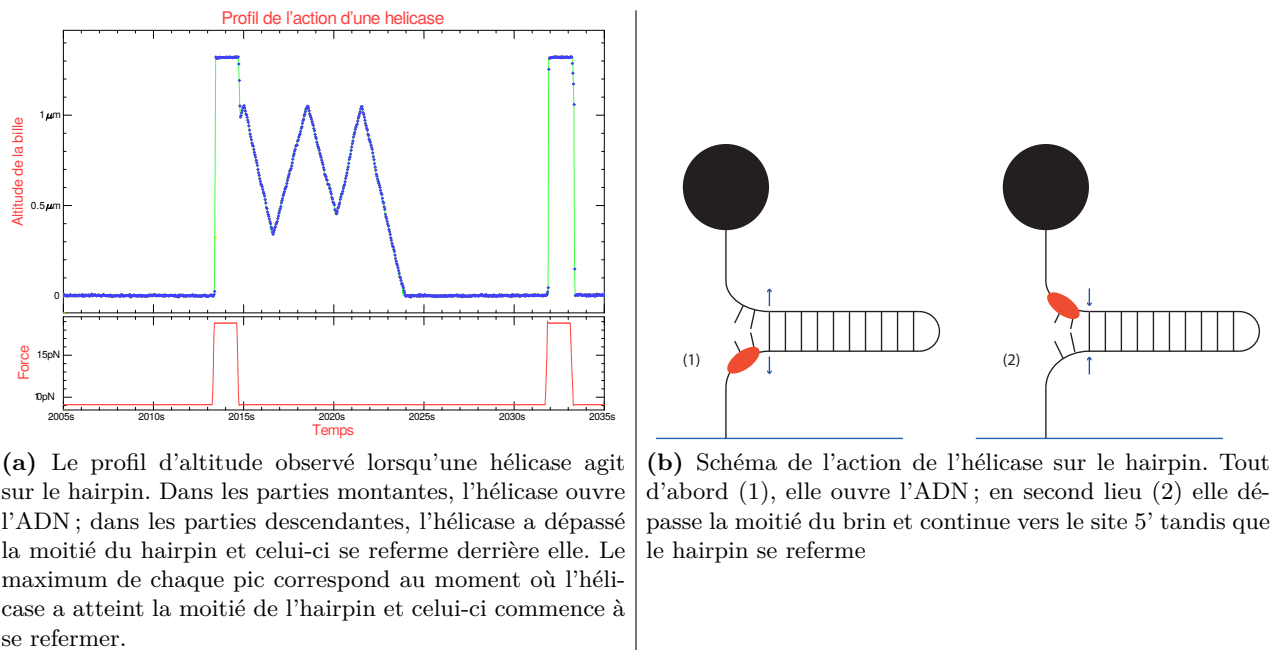


Figure 11 – Représentations de l'action d'une hélicase

4.2 Résultats expérimentaux

Avec le raisonnement précédent, on obtient la vitesse en nanomètres par seconde en fonction de la force. Pour obtenir la vitesse en paires de bases par seconde, on doit avoir l'extension d'une paire de base en fonction de la force appliquée. Celle-ci s'obtient en mesurant la longueur du brin, comme dans la figure 10a, mais en bloquant cette fois-ci la fermeture afin d'avoir un simple brin quelle que soit la force appliquée. Les courbes de vitesse en nanomètres par paire de bases pour l'ouverture et la fermeture du brin sont données en figure 12.

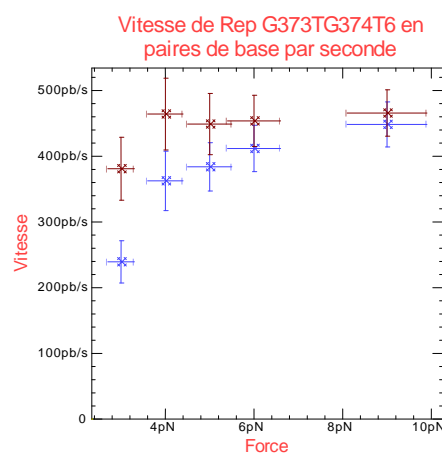


Figure 12 – Vitesses d'ouverture et de fermeture en paires de bases par seconde de l'enzyme Rep G373T374T6.

Conclusion

Dans ce mémoire, nous avons étudié une méthode magnétique permettant de manipuler des brins d'ADN individuels. Les objets considérés étant microscopiques, une approche par la physique statistique est nécessaire afin d'étudier quantitativement les résultats obtenus. La méthode développée a permis de mesurer de nombreuses propriétés de l'ADN et des protéines : nous avons présenté la mesure de la vitesse d'ouverture par une protéine ; il serait possible d'étudier l'influence du milieu sur cette vitesse. On pourrait aussi utiliser les données sur la vitesse pour caractériser le mécanisme d'ouverture par l'hélicase [7]. Pour aller plus loin, cette méthode expérimentale a aussi été utilisée pour contrôler l'efficacité de principes actifs se fixant à l'ADN [8]. Elle est aussi utile pour séquencer efficacement et rapidement un brin d'ADN [9]. Pour conclure, il s'agit d'une méthode au cur de la recherche actuelle.

Références

- [1] C. GOSSE et V. CROQUETTE, « Magnetic Tweezers : Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level », *Biophysical Journal*, t. 82, n° 6, p. 3314-3329, juin 2002. DOI : 10.1016/s0006-3495(02)75672-5. adresse : [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75672-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75672-5).
- [2] B. D. BROWER-TOLAND, C. L. SMITH, R. C. YEH, J. T. LIS, C. L. PETERSON et M. D. WANG, « Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 99, n° 4, p. 1960-1965, fév. 2002. DOI : 10.1073/pnas.022638399. adresse : <https://doi.org/10.1073/pnas.022638399>.
- [3] R. LIU, S. GARCIA-MANYES, A. SARKAR, C. L. BADILLA et J. M. FERNÁNDEZ, « Mechanical Characterization of Protein L in the Low-Force Regime by Electromagnetic Tweezers/Evanescence Nanometry », *Biophysical Journal*, t. 96, n° 9, p. 3810-3821, mai 2009. DOI : 10.1016/j.bpj.2009.01.043. adresse : <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.043>.
- [4] R. N. IROBALIEVA, J. M. FOGG, D. J. CATANESE, T. SUTTHIBUTPONG, M. CHEN, A. K. BARKER, S. J. LUDTKE, S. A. HARRIS, M. F. SCHMID, W. CHIU et L. ZECHIEDRICH, « Structural diversity of supercoiled DNA », *Nature Communications*, t. 6, n° 1, oct. 2015. DOI : 10.1038/ncomms9440. adresse : <https://doi.org/10.1038/ncomms9440>.
- [5] C. BOUCHIAT, M. WANG, J.-F. ALLEMAND, T. STRICK, S. BLOCK et V. CROQUETTE, « Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements », *Biophysical Journal*, t. 76, n° 1, p. 409-413, jan. 1999. DOI : 10.1016/s0006-3495(99)77207-3. adresse : [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(99\)77207-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(99)77207-3).
- [6] C. F. GUERRA, F. M. BICKELHAUPT, J. G. SNIJDERS et E. J. BAERENDS, « Hydrogen Bonding in DNA Base Pairs : Reconciliation of Theory and Experiment », *Journal of the American Chemical Society*, t. 122, n° 17, p. 4117-4128, mai 2000. DOI : 10.1021/ja993262d. adresse : <https://doi.org/10.1021/ja993262d>.
- [7] M. MANOSAS, X. G. XI, D. BENSIMON et V. CROQUETTE, « Active and passive mechanisms of helicases », *Nucleic Acids Research*, t. 38, n° 16, p. 5518-5526, avr. 2010. DOI : 10.1093/nar/gkq273. adresse : <https://doi.org/10.1093/nar/gkq273>.
- [8] M. MANOSAS, J. CAMUNAS-SOLER, V. CROQUETTE et F. RITORT, « Single molecule high-throughput footprinting of small and large DNA ligands », *Nature Communications*, t. 8, n° 1, août 2017. DOI : 10.1038/s41467-017-00379-w. adresse : <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00379-w>.
- [9] F. DING, M. MANOSAS, M. M. SPIERING, S. J. BENKOVIC, D. BENSIMON, J.-F. ALLEMAND et V. CROQUETTE, « Single-molecule mechanical identification and sequencing », *Nature Methods*, t. 9, n° 4, p. 367-372, mar. 2012. DOI : 10.1038/nmeth.1925. adresse : <https://doi.org/10.1038/nmeth.1925>.