



Etudes des topoisomérases de type II par micromanipulation d'ADN

Gilles Charvin

► To cite this version:

Gilles Charvin. Etudes des topoisomérases de type II par micromanipulation d'ADN. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2004. Français. NNT : . tel-00007023

HAL Id: tel-00007023

<https://theses.hal.science/tel-00007023>

Submitted on 3 Oct 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE NORMALE SUPERIEURE - DEPARTEMENT DE PHYSIQUE

Laboratoire de Physique Statistique



THÈSE

présentée devant

l'Université Paris 7

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS 7
Spécialité : INTERFACE PHYSIQUE-BIOLOGIE

par

Gilles CHARVIN

Etudes des topoisomérases de type II par micromanipulation d'ADN

À soutenir publiquement le 22 juin 2004 devant la commission d'examen:

M.	David	BENSIMON	Directeur de thèse
M.	Didier	CHATENAY	
M.	Michel	DUGUET	Invité
M.	François	GALLET	
M.	Olivier	HYRIEN	Invité
M.	John	MARKO	Rapporteur
M.	Jacques	PROST	
M.	Andrzej	STASIAK	Rapporteur

Remerciements

Au cours de cette longue traversée incertaine qu'est la thèse, j'ai appris au contact des uns, partagé des moments intenses avec d'autres. Tous m'ont apporté énormément. Cette page leur est dédiée.

J'ai eu le privilège de côtoyer quotidiennement deux éminents scientifiques, David Bensimon et Vincent Croquette, à la sensibilité très différente mais qui partagent la même gentillesse. Il est des personnalités qui marquent pour toujours. Ces deux-là en font partie.

Je suis très reconnaissant envers David d'avoir accepté que je fasse ma thèse dans son équipe. J'ai beaucoup appris en travaillant avec lui. J'ai apprécié sa curiosité, son ouverture d'esprit, et la grande liberté qu'il m'a accordée pour conduire mon travail. Par ailleurs, sa gentillesse, sa générosité et sa disponibilité m'ont toujours beaucoup touché. Qu'il me pardonne si j'en ai parfois abusé ! Scientifiquement, sa façon d'aborder les problèmes sans inhibition, sans arrière pensée et de manière extrêmement pragmatique est remarquable, et constitue indéniablement une différence majeure entre nous ! J'essaierai de suivre son exemple autant que possible... Je lui suis également redevable des nombreuses opportunités qu'il m'a données d'assister à des conférences à l'étranger : Etats-Unis, Argentine, Allemagne, Italie, Espagne.

Je rends un hommage tout aussi sincère à Vincent Croquette, l'autre tête de notre équipe bicéphale. Vincent allie une approche très intuitive et vivante de la Physique à des compétences techniques extrêmement diversifiées. C'est une "encyclopédie vivante", dont je dois reconnaître que je n'ai finalement assimilé qu'une bien maigre fraction. J'ai largement profité des ressources matérielles et logicielles qu'il a mises en place au fil des années. Grâce à lui, je peux m'enorgueillir de connaître de mémoire toutes les puissances de 2 jusqu'à 2^{18} !

Je remercie chaleureusement Jean-François Allemand qui tout au long de ma thèse a établi un pont entre la [pièce] "D16 d'en haut" des "chefs" et la [pièce] "D16 d'en bas" des étudiants. J'ai beaucoup apprécié ses qualités d'encadrement, ainsi que les discussions informelles que nous avons eues. Techniquement, j'ai bénéficié à plusieurs reprises de ses efforts portés à l'amélioration des dispositifs de micromanipulation, en particulier en ce qui concerne la vitesse de rotation des moteurs. Il m'a aussi permis d'utiliser fréquemment ses constructions d'ADN. Pratiquement, je lui dois également la cuisinière à gaz avec four à chaleur tournante qui m'a permis de varier les menus (?) tout au long de cette thèse. Par ailleurs, une part non négligeable des 100000 litres de Foster que j'ai bus à l'Australien de la rue Saint-Jacques l'a été en sa compagnie et le fait de sa générosité. Enfin, son penchant transmissible pour la cuisine de haut vol m'a permis de faire une expérience culinaire unique en Bretagne et donné l'occasion de participer à des dégustations multiples en D16.

Je remercie Marie-Noëlle Dessinges qui m'a donné des repères quant à la conduite et au déroulement de ma propre thèse. Je dois reconnaître qu'avec Nynke Dekker, elle a également contribué à donner une ambiance de travail studieuse dans l'équipe au cours de mes deux premières années, ce qui est formateur pour le jeune thésard que j'étais alors.

Je remercie évidemment mes collègues Timothée Lionnet et Giuseppe Lia, solidaires de la condition de doctorant de la salle D16, compagnons de lutte contre les capillaires qui collent trop ou pas assez, contre les enzymes qui préfèrent la surface du capillaire à l'ADN (et qui parfois changent d'avis), et enfin contre ceux gloussent en découvrant une courbe de force obtenue dans l'effort : "35

nm de longueur de persistance? mouaiff... de mon temps ... c'est plus ce que c'était....". Bref, si une excellente atmosphère règne dans notre équipe, c'est aussi grâce à eux.

Merci en particulier à Giuseppe, calabrais pur souche, qui démontre que le penchant pour la cuisine (et pour la boisson) ne sont pas que typiquement français ! Plus sérieusement, je lui suis très reconnaissant de m'avoir permis d'utiliser ses constructions d'ADN, et donc de gagner un temps considérable. Quant à Timothée, je dois avouer qu'il a été beau joueur dans sa tentative de conquête de l'espace musical du laboratoire.

Je remercie les post-docs du laboratoire, qui m'ont donné un aperçu du sort qui m'est réservé dans les mois à venir: Omar Saleh , la version "côte est" du post-doc américain et Keir Neuman, son analogue "côte ouest", ainsi que Hiroaki Yokota, de nationalité japonaise. Merci en particulier à Omar d'avoir relu et patiemment corrigé mes baragouinages lors de rédaction d'articles. Merci et bonne chance à Keir qui a choisi de reprendre certaines des expériences que j'ai lancées. Ces trois chercheurs dynamiques m'ont donné l'occasion d'échanger des idées, mais aussi nos cultures. Je leur en suis reconnaissant.

Merci à Pierre Neveu pour ses petits conseils en biologie moléculaire.

Pour finir avec l'équipe, je remercie tous les stagiaires qui sont venus au laboratoire , en particulier Romain Planques, que j'ai encadré en juillet 2003. Ils ont contribué indiscutablement au dynamisme et à la productivité de l'équipe.

Je remercie l'équipe de l'atelier de mécanique du Laboratoire de Physique Statistique que j'ai connue au début de ma thèse, composé de Jacques Kerbourniou et Lucien Brouard. Plus particulièrement, je suis également très reconnaissant et admiratif envers la personne de José Da Silva Quintas. Non seulement il a conçu et réalisé pour moi des pièces de grande qualité, mais il n'a jamais hésité à me dépanner sur-le-champ ou me donner des conseils précieux en cas de besoin. Enfin et surtout, il m'a enseigné le b-a ba du tour, et ces quelques heures passées sur la machine resteront comme autant de souvenirs inoubliables.

Je remercie tous les autres personnels du Laboratoire de Physique Statistique qui ont rendu possible ce travail : Jacques Meunier, en tant que directeur du laboratoire. Nora Sadaoui et Carole Philippe, pour l'administration et la gestion, et dont j'ai toujours apprécié la patience et la disponibilité .

Cette thèse s'est effectuée dans d'excellentes conditions au département de physique de l'Ecole Normale Supérieure. Je remercie tous les services pour leur compétence et leur disponibilité. En particulier , merci à Régine André pour l'administration, et à l'équipe du service informatique. Je remercie également Monique Brouat et l'équipe de la bibliothèque de maintenir en état les archives de la bibliothèque, sans quoi je n'aurais jamais pu obtenu ce fameux article d'Alexander Vologodskii dans Sov. Phys. JETP en 1974 !

Un grand merci à Zaïre Dissi, pour les nombreux services qu'il m'a rendus, son accueil chaleureux et les petites discussions de couloir.

Merci à Monsieur et Madame Guérard pour la qualité de leur accueil et leur souplesse d'esprit.

Je tiens naturellement à remercier les chercheurs qui ont accepté de participer à mon jury : Jacques Prost, Didier Chatenay, François Gallet. Je suis très reconnaissant envers Andrzej Stasiak et John Marko d'avoir accepté la tâche de rapporteur. Une part importante de ce travail a été inspiré par les travaux théoriques de John. En conséquence, je suis très heureux et honoré qu'il ait parcouru ce manuscrit avec autant d'intérêt. Je remercie également Andrzej pour les discussions que nous avons eues par e-mail. Merci également à Michel Duguet et Olivier Hyrien d'avoir accepté mon invitation pour la soutenance. Leurs conseils, remarques et commentaires m'ont permis de mieux comprendre les enjeux biologiques de l'étude des topoisomérases.

Merci aussi à toutes les chercheurs avec qui j'ai pu discuter au cours de cette thèse, qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre, ou qui ont influencé mon travail : Alexander Vologodskii, Sébastien

Neukirch, Claude Bouchiat et surtout Terence Strick, sans qui cette thèse n'aurait évidemment pas vu le jour.

Je remercie Nick Cozzarelli pour le don de la topoisomérase 4, Janet Lindsley pour les topoisomérases II mutantes de levure, James Berger pour la topoisomérase II de levure, Stephen Kowalczykowski pour la topo 3 bactérienne. En particulier, c'est à leurs étudiants qui effectuent le travail difficile de purification de ces protéines que je tire mon chapeau.

J'ai largement profité des services ponctuels de Jérémie "SOS Mathématiques" Szeftel, mercenaire des maths, disponible 24 heures sur 24 pour trouver des solutions à mes problèmes.

Je dois beaucoup à mes parents, qui m'ont donné le goût de l'effort intellectuel, et le besoin de créer, qui traverse les générations.

Je terminerai par une pensée affectueuse envers mes proches (amis, famille Charvin, famille Isnardi) avec qui j'ai passé de très bons moments pendant ces quatre ans. Et surtout à Isabelle, "... qui tous les jours, partage mon cassoulet...". Son soutien sans faille n'a pas d'égal.

Table des matières

Table des matières	ix
Introduction	1
I L'ADN: structure et topologie	3
1 Structure de l'ADN	5
1.1 Introduction	5
1.2 Structure de l'ADN	6
1.2.1 Structure primaire	6
1.2.2 Structure secondaire	6
1.2.3 Structure tertiaire	6
2 Propriétés topologiques de l'ADN	9
2.1 Formalisme topologique	9
2.1.1 Indice d'enlacement	9
2.1.1.1 Vision intuitive	9
2.1.1.2 Intégrale de Gauss	10
2.1.1.3 Super-enroulement	11
2.1.2 La Torsade (ou <i>Twist</i> (Tw))	11
2.1.3 La vrille (ou <i>Writhe</i> (Wr))	11
2.1.4 Théorème de Calugareanu	12
2.1.5 Extension au cas de molécules linéaires	12
2.2 Le super-enroulement de l'ADN	13
2.2.1 Géométrie des molécules super-enroulées	13
2.2.2 Le super-enroulement <i>in vivo</i>	15
2.2.2.1 Compaction de l'ADN	15
2.2.2.2 Transcription	16
2.2.2.3 Réplication	16
2.3 Noeuds et liens	16
2.4 Méthodes usuelles d'études de l'ADN	17
2.4.1 Electrophorèse de l'ADN	17
2.4.2 Microscopie électronique	17
2.4.3 Microscopie à force atomique	18
2.4.4 Intérêt de la micromanipulation de molécule unique	18

II	Micromanipulation d'ADN	21
1	Pincés magnétiques	23
1.1	Dispositifs pour étirer l'ADN	23
1.2	Ordres de grandeur de force	24
1.2.1	Force de rupture de liaison covalente F_{max}	24
1.2.2	Force de rupture de liaisons non-covalente	24
1.2.3	Force entropique	24
1.2.4	Force de Langevin	24
1.3	Dispositif pour tirer et tordre l'ADN	25
1.3.1	Microfibres	25
1.3.2	Piège optique	26
1.3.3	Pince magnétique	26
1.4	Construction d'ADN et accrochage des molécules	26
1.4.1	Construction d'ADN	26
1.4.2	Accrochage bille-ADN et surface-ADN	27
1.4.3	Blocage en rotation	27
1.5	Montage expérimental	27
1.6	Mesure de l'extension de l'ADN	28
1.7	Mesure de force par mouvement brownien	30
1.7.1	Analyse temporelle	30
1.7.2	Analyse fréquentielle	30
2	Propriétés mécaniques d'un ADN	33
2.1	Courbe force-extension de l'ADN	33
2.1.1	Quel modèle pour l'ADN?	34
2.1.1.1	La chaîne gaussienne	34
2.1.1.2	Le modèle de Kratky-Porod	35
2.1.1.3	La chaîne librement jointe (FJC)	35
2.1.1.4	Le modèle du ver (ou <i>worm-like chain</i> (WLC))	36
2.1.2	Simulation Monte-Carlo d'une chaîne semi-flexible	36
2.2	L'ADN étiré sous torsion	37
2.2.1	Modèle simple de l'instabilité de flambage	38
2.2.2	Modèles statistiques pour le super-enroulement de l'ADN	39
2.2.3	Influence de la concentration ionique sur les courbes extension-rotation	40
2.2.3.1	Modification de la torsade spontanée T_{w0}	40
2.2.3.2	Modification de la pente des courbes extension-superenroulement	41
2.2.3.3	Modification du nombre de tours critique de flambage	42
2.2.4	Simulation Monte-Carlo d'une molécule d'ADN super-enroulé	42
2.2.4.1	Estimation de la constante de torsion	44
2.2.4.2	Courbes extension-rotation et force-extension	44
2.2.4.3	Effet du diamètre effectif de l'ADN	44
2.2.5	Transition induite par le couple	46
2.3	Intérêt pour l'étude des topoisomérases	46
3	Caténation de deux molécules d'ADN	49
3.1	Micromanipuler une, deux molécules ou plus	49
3.2	Expériences et modèles préliminaires	50
3.3	Article: "Braiding DNA..."	51

III Etudes des topoisomérases par micromanipulation d'ADN	61
1 Introduction sur les topoisomérases	63
1.1 Réplication d'une molécule circulaire	63
1.2 Les topoisomérases	64
1.2.1 Clivage de l'ADN	65
1.2.2 Classification	65
1.2.2.1 Type I	65
1.2.2.2 Type II	66
1.2.3 topoisomérases procaryotes	66
1.2.3.1 topo 1	67
1.2.3.2 topo 3	67
1.2.3.3 Gyrase	67
1.2.3.4 topo 4	69
1.2.3.5 Résumé	70
1.2.4 topoisomérases eucaryotes	70
1.2.4.1 topo 3	70
1.2.4.2 topo 1B	71
1.2.4.3 topo 2	71
1.2.4.4 Résumé	71
1.3 Questions fondamentales	71
2 Propriétés cinétiques des topo 2	75
2.1 Le cycle enzymatique des topo 2	75
2.2 Relaxation du super-enroulement	77
2.3 Cycles enzymatiques uniques	78
2.4 Article : On the relation between noise spectre and the distribution of time between steps for single molecular motors	79
2.5 Observation des cycles enzymatiques	86
2.6 Influence de la concentration d'ATP	87
2.6.1 Vitesse de réaction l'enzyme en fonction de [ATP]	87
2.6.2 Coopérativité de l'accrochage des molécules d'ATP	87
2.6.3 Modélisation du cycle enzymatique	89
2.6.4 Distribution des temps de cycle et stochasticité	90
2.7 Influence de la force sur l'activité de l'enzyme	92
2.8 Etude d'enzymes mutantes de la topo 2 de <i>S. cerevisiae</i>	94
2.8.1 Activité du double mutant E66Q/E66Q en molécule unique	94
2.8.2 Activité du mutant E66Q/WT en molécule unique	95
3 Chiralité de la topoisomérase 4	99
3.1 Chiralité de la topo 4 sur l'ADN super-enroulé	99
3.1.1 Relaxation du super-enroulement	99
3.1.2 Lien avec la fonction de la topo 4 in vivo	100
3.1.3 Quel(s) modèle(s) pour expliquer la chiralité de la topo 4?	100
3.1.3.1 Reconnaissance globale de la topologie	100
3.1.3.2 Modèle de Klenin-Langowski-Vologodskii (KLV)	101
3.1.3.3 Sensibilité au couple	101
3.1.3.4 Reconnaissance d'un croisement d'ADN	102
3.2 Accrochage de la topoisomérase 4 sur l'ADN	103
3.2.1 Propriétés d'accrochage de la topo 4	103

3.2.2	Article: Bending effect by topoisomerase IV	104
3.3	Décaténation par la topo 4	114
3.3.1	Le "paradoxe" de la topo 4	114
3.3.2	Article: "Single molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases"	114
3.3.3	Données supplémentaires publiées avec l'article	121
3.3.4	Comparaison avec l'article de Stone <i>et al.</i>	121
3.3.5	Expériences complémentaires: 2 molécules, dont une au moins super-enroulable	123
3.4	Etude d'un croisement unique	124
3.4.1	Principe de l'expérience	125
3.4.2	Résultats	126
4	Thermodynamique des topoisomérases	131
4.1	Données expérimentales	131
4.2	Modèles	132
4.2.1	Modèle à trois sites d'accrochage	132
4.2.2	Modèle de Vologodskii	132
4.2.3	Modèle d'amplification cinétique	133
4.3	Principe de l'expérience	135
4.4	Résultats	135
4.4.1	Le signal de décaténation	135
4.4.2	Fréquence de passage de brin	136
4.4.3	Détermination de $P(Ca)$ par simulation numérique	138
4.4.4	Distribution des temps $\tau(Ca)$	139
4.4.5	Nécessité d'un contrôle expérimental: la topo 3 d' <i>E. coli</i> ?	140
4.5	conclusion	141
5	Etude préliminaire de la gyrase d'<i>E. coli</i>	143
5.1	Introduction	143
5.2	Relaxation du super-enroulement (+)	143
5.3	Génération de super-enroulement négatif	144
5.4	Perspectives	144
	Conclusion	147
	A Liste de publications	153
	Annexes	153
B	Protocoles expérimentaux	155
B.1	Constructions d'ADN	155
B.2	Préparation des capillaires	155
B.3	Tampon	155
B.4	topoisomérases	155
B.4.1	topo 2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	156
B.4.2	topo 2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	156
B.4.3	topo 4 de <i>E. coli</i>	156
B.4.4	Gyrase de <i>E. coli</i>	156
B.4.5	topo 3 de <i>E. coli</i>	156

B.5	Analyse de données	156
C	Simulation Monte-Carlo	157
C.1	Description de la chaîne	157
C.2	Energie de courbure	157
C.3	Force	158
C.4	Mouvements de la chaîne	158
C.4.1	Rotation d'un segment de la chaîne	158
C.4.2	Mouvement de Crankshaft	159
C.5	Critère d'acceptation/rejection	159
C.6	Gestion des erreurs numériques	159
C.7	Echantillonnage de la molécule d'ADN	159
C.8	Mesure de vrille et contraintes topologiques	160
C.8.1	Calcul de vrille Wr	160
C.8.2	Indice d'enlacement	160
C.8.3	Noeuds	160
C.9	Contraintes géométriques	160
C.10	Auto-évitement	160
C.10.1	Murs	160
C.10.2	Distance entre molécules	161
C.11	Juxtaposition et calculs d'angles entre segments	161
C.12	Optimisation	162
C.12.1	Complexité des routines	162
C.12.2	Temps de relaxation	162
C.13	Interface et programmation	162
	Bibliographie	171

Introduction

Lors de sa division, la cellule doit impérativement transmettre son matériel génétique pour assurer sa descendance. Les chromosomes doivent ainsi être dupliqués puis séparés. Cependant, la taille extraordinaire de ces molécules d'ADN - quelques centimètres de long chez l'Homme, pour un diamètre de 2 nm - pose des problèmes topologiques majeurs : compte tenu de la structure en double-hélice et du mécanisme de réplication semi-conservatif de l'ADN[79], comment séparer les molécules nouvellement répliquées [142]? Comment éviter l'apparition de noeuds?

Une classe d'enzymes, appelée topoisomérase, est responsable de la régulation de la topologie de l'ADN dans la cellule. Si la première de ces enzymes a été identifiée chez *E. coli* en 1971 [140], il s'est avéré depuis que tous les organismes vivants en possèdent plusieurs. Celles-ci peuvent être classées en deux types distincts suivant leur mécanisme d'action[17]. Les topoisomérases de type I opèrent une coupure simple brin dans la molécule d'ADN ce qui permet la relaxation de la torsion accumulée dans la molécule. Au contraire, les topoisomérases de type II catalysent le passage d'une molécule d'ADN double brin à travers une autre molécule d'ADN double brin, moyennant la consommation d'ATP. Ainsi, certaines enzymes de type II, comme la topo 4, sont responsables de la décaténation des molécules filles d'ADN lors de la réplication, mais peuvent aussi éliminer les structures super-enroulées créées lors de la progression de la fourche de réplication[52, 127]. D'autres, comme la gyrase, génèrent du super-enroulement négatif, essentiel pour la cellule bactérienne, car il permet la compaction du génome et favorise l'initiation de la transcription[92]. Plus généralement, ces enzymes interviennent dans de nombreux processus fondamentaux : la réplication, la transcription, la condensation et la décondensation de la chromatine, et la recombinaison de l'ADN[138]. En conséquence, l'inhibition du fonctionnement de certaines topoisomérases entraîne le blocage de la division de la cellule, et conduit inéluctablement à sa mort.

Bien que l'identification et la caractérisation structurale et biochimique de plusieurs topoisomérases de type II soit désormais achevée, il reste des questions fondamentales concernant leur mécanisme individuel et l'intégration de leur action à l'échelle de la cellule. En particulier, il est difficile de comprendre comment ces moteurs moléculaires, dont l'action est locale, simplifient globalement la topologie de l'ADN. Pourquoi ces enzymes démêlent-elles plus qu'elles n'emmêlent? Ont-elles la capacité d'opérer une reconnaissance de leur substrat? Quel lien entre leurs propriétés biochimiques (consommation d'ATP) et leur capacité à démêler activement l'ADN?

Ces questions de fond ont certainement constitué les motivations principales des biochimistes, enzymologistes, et cristallographes qui ont étudié les topoisomérases depuis bientôt trente ans. Récemment, les expériences de micromanipulation d'ADN par pince magnétique se sont avérées être un outil d'investigation puissant de ces enzymes : initiée au laboratoire depuis presque dix ans, cette technique donne accès aux propriétés élastiques (réponse à une force ou à une contrainte de torsion) d'une molécule isolée d'ADN de quelques microns de longueur. La possibilité d'imposer et de mesurer précisément le degré de super-enroulement d'une molécule unique a permis d'envisager le suivi en temps réel de l'activité d'une molécule de topoisomérase de type II unique sur une molécule super-enroulée. Ces expériences, réalisées lors de sa thèse par TERENCE STRICK[121], ont apporté une confirmation directe du mécanisme de passage d'un brin d'ADN à travers l'autre. En outre, elles

ont donné des informations cruciales tant sur les propriétés cinétiques (vitesse, dépendance vis-à-vis de l'ATP, sensibilité à la force appliquée) que sur le mécanisme d'action (accrochage/décrochage de l'enzyme sur l'ADN, stabilisation de croisements d'ADN). Enfin, l'étude de la topo 4 d' *E. coli* a permis de mettre en évidence une activité très différente de cette enzyme sur l'ADN super-enroulé positivement et négativement.

Le travail présenté ici s'inscrit dans la continuité de la contribution apportée par TERENCE Strick à l'étude des topoisomérases à l'échelle de la molécule unique[121]. L'objectif de cette thèse est double : d'une part, approfondir l'étude des propriétés cinétiques par le développement d'outils d'analyse des signaux enzymatiques, par l'observation de mutants, et par l'élaboration d'un modèle de cycle enzymatique compatible avec les données existantes. D'autre part, décrire et comprendre les différents mécanismes de reconnaissance du substrat par les topoisomérases : expliquer la discrimination entre super-enroulement (+) et (-) chez la topo 4, mais aussi tenter de comprendre la capacité à simplifier la topologie de l'ADN en dessous de l'équilibre thermodynamique.

Le plan de ce manuscrit est donc le suivant : la première partie est consacrée à la description de la structure et des propriétés topologiques de l'ADN. Elle permet en particulier d'introduire le formalisme topologique nécessaire à la bonne compréhension du rôle et du fonctionnement des topoisomérases.

La deuxième partie décrit d'abord brièvement le dispositif de pinces magnétiques utilisé lors de notre étude. Elle rappelle ensuite les propriétés mécaniques d'une molécule unique d'ADN sous torsion, thème qui a fait l'objet d'une étude approfondie au cours des thèses de Jean-François Allemand et TERENCE Strick au laboratoire. Nous avons effectué des simulations Monte-Carlo de molécules d'ADN étirées et sous-torsion pour essayer en particulier de comprendre l'influence du sel sur la pente des courbes extension-rotation. Cette partie présente ensuite les résultats, les modèles et les simulations Monte-Carlo que nous avons obtenus concernant la caténation de deux molécules étirées. Nous montrons que le tressage de deux molécules d'ADN est bien décrit par un modèle géométrique simple d'enroulement de chaque brin autour de l'autre. Outre leur intérêt physique propre, ces expériences constituent un prélude nécessaire à l'étude de la décaténation de l'ADN par les topoisomérases en molécule unique.

La troisième partie relate les expériences réalisées sur les topoisomérases de type II au cours de cette thèse. Après une introduction générale sur les topoisomérases (chapitre 1), nous montrons comment les expériences de molécules uniques, en donnant accès au suivi en temps réel de l'activité de ces enzymes, permettent d'obtenir des informations cruciales sur leur cycle enzymatique (chapitre 2). En particulier, les signaux de relaxation confirment la coopérativité du recrutement de deux molécules d'ATP lors du cycle enzymatique, et permettent, par le calcul du paramètre de stochasticité, de dégager les étapes limitantes du cycle en fonction de la concentration d'ATP. Par ailleurs, l'influence de la force d'étirement et l'étude de mutants de topoisomérases donnent des renseignements sur le mécanisme de ces moteurs. Le chapitre 3 est consacré à l'étude du mécanisme de reconnaissance chirale par la topoisomérase 4. Nous présentons des expériences de décaténation de molécules d'ADN tressées par une topoisomérase eucaryote et une topoisomérase procaryote (la topoisomérase 4). Nous montrons que la discrimination opérée par la topoisomérase 4 entre super-enroulement (+) et super-enroulement (-) est probablement liée à la reconnaissance de l'angle des segments dans un croisement d'ADN. Par ailleurs, des expériences sans ATP montre que la topoisomérase courbe fortement l'ADN lors de son accrochage sur l'ADN super-enroulé, qu'il soit (+) ou (-). Dans le chapitre 4, nous essayons de tester un modèle d'amplification cinétique proposé pour expliquer la capacité des topoisomérases de type II à simplifier la topologie de l'ADN en dessous de l'équilibre thermodynamique. Enfin, nous présentons quelques expériences préliminaires prometteuses concernant l'étude de la gyrase dans le chapitre 5.

Première partie

L'ADN: structure et topologie

Chapitre 1

Structure de l'ADN

1.1 Introduction

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule organique essentielle du vivant: elle porte l'information génétique nécessaire à la constitution et au fonctionnement de tout organisme. Si la découverte de cette molécule remonte à plus d'un siècle (1869), la compréhension de son rôle dans l'hérédité et la caractérisation des mécanismes qui permettent aussi bien sa reproduction que l'expression de l'information qu'elle contient sont bien plus récents: en 1944, l'expérience fondatrice d'Avery montre que l'ADN, et non les protéines (comme c'était le dogme pré-existant), est nécessaire et suffisante pour transformer une souche de *neurospora* en une autre[4]. Huit ans plus tard, Hershey et Chase confirment ce résultat[48]. A cette période, si les constituants élémentaires de l'ADN sont connus (en particulier la nature chimique des bases qui le compose), l'arrangement spatial des différents groupement demeure un mystère. L'ADN s'identifie par des méthodes d'électrophorèse ou de séparation chimique, mais la taille de la molécule reste difficile à évaluer.

En 1953, Watson et Crick[143] proposent, sur la base de clichés de diffraction des rayons X de fibres d'ADN[145, 39], la fameuse structure en hélice droite dont l'exactitude sera vérifiée plus tard. Cette découverte, ou plutôt, cette interprétation brillante de résultats expérimentaux, lance la biologie vers un nouveau stade de la compréhension du vivant: celui de l'étude des mécanismes moléculaires à l'intérieur de la cellule. Par exemple, la découverte de la structure de l'ADN laisse entrevoir de manière immédiate un procédé de réplication, dit semi-conservatif, où chaque brin "parent" vient servir de "moule" à la synthèse du double-brin "fils"[142]. A partir de cette époque, biochimie et génétique fusionnent pour donner naissance à ce qu'on appelle aujourd'hui "biologie moléculaire", dont nous pouvons retenir la définition donnée par Michel Morange[82]: "l'ensemble des techniques et découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction".

Dès lors, l'ADN apparaît petit à petit comme l'élément central autour duquel s'articulent tous les processus de régulation de l'activité cellulaire: l'expression des gènes est contrôlée par des protéines qui interagissent avec l'ADN. La compréhension des mécanismes de régulation passe donc par l'analyse des interactions entre protéines et ADN. Dans ce contexte, à partir des années 1990, les expériences de micromanipulation de molécules uniques d'ADN ont bouleversé le champ d'investigation, en permettant un suivi direct et en temps réel de l'action d'enzymes sur l'ADN.

Dans ce chapitre, nous présentons la structure de l'ADN, de l'organisation des atomes jusqu'à l'arrangement tridimensionnel de la longue chaîne constituée par la séquence des bases.

1.2 Structure de l'ADN

1.2.1 Structure primaire

L'ADN est composé de deux brins anti-parallèles qui s'enroulent l'un autour de l'autre pour former une hélice droite. Chaque brin consiste en un chaîne de polymère de sucres cycliques appelés deoxyribose reliés par des ponts phosphodiester. La liaison s'effectuent sur le carbone 3' d'un sucre et le carbone 5' du suivant (see Fig.1.1a). Il existe quatre groupements chimiques capables d'assurer une liaison entre les deux squelettes sucre-phosphate : l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et la thymine (T). Ces groupements, qui sont reliés au squelette par le carbone 1', interagissent par paires en formant deux (A-T) ou trois (G-C) liaisons hydrogène.

1.2.2 Structure secondaire

L'appariement des bases entre A et T et C et G (par liaisons hydrogène) permet de former une hélice droite très régulière de brins complémentaires et anti-parallèles (voir Fig. 1.1b). Ces deux brins contiennent exactement la même information.

En plus de l'appariement des bases, il y a une forte interaction hydrophobe, dite d'"empilement", entre les paires de bases successives au sein de la double-hélice. Ces interactions contribuent à donner à l'ADN sa grande rigidité de courbure, en comparaison des polymères artificiels comme le polyéthylène.

Les propriétés géométriques de la molécule d'ADN standard (appelée ADN-B, dont le pas vaut ~ 3.4 nm et le diamètre effectif vaut ~ 2 nm)[103] varient beaucoup avec les paramètres environnementaux comme la température, la nature du solvant, sa force ionique et dépendent aussi de la séquence de la molécule. En particulier, le fait que la molécule d'ADN soit chargée négativement (à pH=7) à cause des groupements phosphate entraîne des répulsions électrostatiques importantes dans la molécule. En conséquence le "diamètre électrostatique" est bien supérieur à son diamètre cristallographique [114]. Cependant, ces interactions peuvent être plus ou moins écrantées en fonction de la concentration en sel du solvant [100, 101].

Dans des conditions physiologiques, le pas de la double-hélice vaut environ 10,5 paires de bases, et le diamètre électrostatique vaut environ 5 nm[100, 101].

Le fait que les bases soient placées à l'intérieur de la double hélice confère à la molécule un très faible réactivité et réduit considérablement les interactions du polymère avec lui-même (à la différence de l'ADN simple brin ou de l'ARN, qui peuvent former des structures tertiaires complexes comme des épingles à cheveux).

Cette caractéristique essentielle évite que le code génétique ne soit endommagé ou modifié aisément. Cependant, cela complique aussi le travail des protéines qui régulent, éditent, copient et transcrivent l'ADN. Celles-ci doivent accéder au code génétique et donc pour certaines d'entre elles ouvrir la double-hélice.

1.2.3 Structure tertiaire

La structure primaire et secondaire de l'ADN confère à la molécule une grande rigidité de courbure, de telle sorte que la longueur typique, appelée longueur de persistance, pour laquelle les fluctuations thermiques sont capables de courber l'axe de la molécule dans des conditions physiologiques vaut environ 50 nm.

En d'autres termes, si $\vec{t}(s)$ and $\vec{t}(s')$ sont deux vecteurs indépendants tangents à la double-hélice respectivement aux abscisses curvilignes s et s' , ξ est la longueur typique nécessaire pour décorrélérer l'orientation des vecteurs tangents (voir Fig.1.1c)[27, 16]:

$$\langle \vec{t}(s) \vec{t}(s') \rangle = e^{-|s-s'|/\xi} \quad (1.1)$$

La longueur de persistance de l'ADN est très élevée en comparaison d'autres chaînes de polymère, comme le poly-éthylène ou le PVC : la molécule d'ADN est extrêmement rigide.

L'ADN peut être modélisé comme une corde flexible dont la géométrie en pelote statistique adoptée à grande échelle ($L \gg \xi$) constitue la structure tertiaire de la molécule. Étant donnée la longueur cristallographique L de l'ADN, le modèle de "polymère semi-flexible" donne la distance carrée moyenne entre extrémités R_0^2 (voir la partie II pour plus de détails) [27, 16] :

$$R_0^2 = 2\xi L \quad (1.2)$$

Pour le chromosome d'*E. coli*, $L \approx 1\text{mm}$ donc $R_0 = 10\mu\text{m}$ (à comparer avec la taille typique d'une bactérie $\approx 1\mu\text{m}$), voir Fig.1.1d. De plus, le chemin adopté par l'ADN en solution ne peut pas avoir d'intersection avec lui-même. Il faut ainsi tenir compte d'un effet dit d'"auto-évitement" pour estimer la taille typique d'une molécule en solution[105, 35]. Cet effet, qui devient non-négligeable pour des molécules de plusieurs dizaines de milliers de paires de bases[120], augmente la taille typique de la pelote d'ADN en solution.

En conséquence, le matériel génétique de la bactérie (comme celui des autres organismes) doit être compacté pour tenir dans la cellule. Cette compaction implique des changements topologiques et géométriques majeurs de la molécule d'ADN. Chez les bactéries, l'espace occupé par le chromosome circulaire est minimisé en maintenant la molécule dans un super-enroulé (que nous décrirons au chapitre suivant). Chez les eucaryotes, un complexe protéique octamérique appelé histone enroule l'ADN autour de lui-même pour former une structure plus compacte, appelée nucléosome, qui est à la base de la structure de la chromatine.

Un des grands enjeux de la biologie est de comprendre comment ces structures très compactes sont régulées, copiées, transcrites, démêlées et réparées pour permettre la division de la cellule.

Toutes ces régulations impliquent des modifications géométriques locales mais aussi des changements topologiques globaux de la molécule d'ADN. L'objet du prochain chapitre est de fournir la description précise des propriétés topologiques et géométriques de l'ADN indispensable à la compréhension du rôle et du mécanisme d'action des topoisomérases.

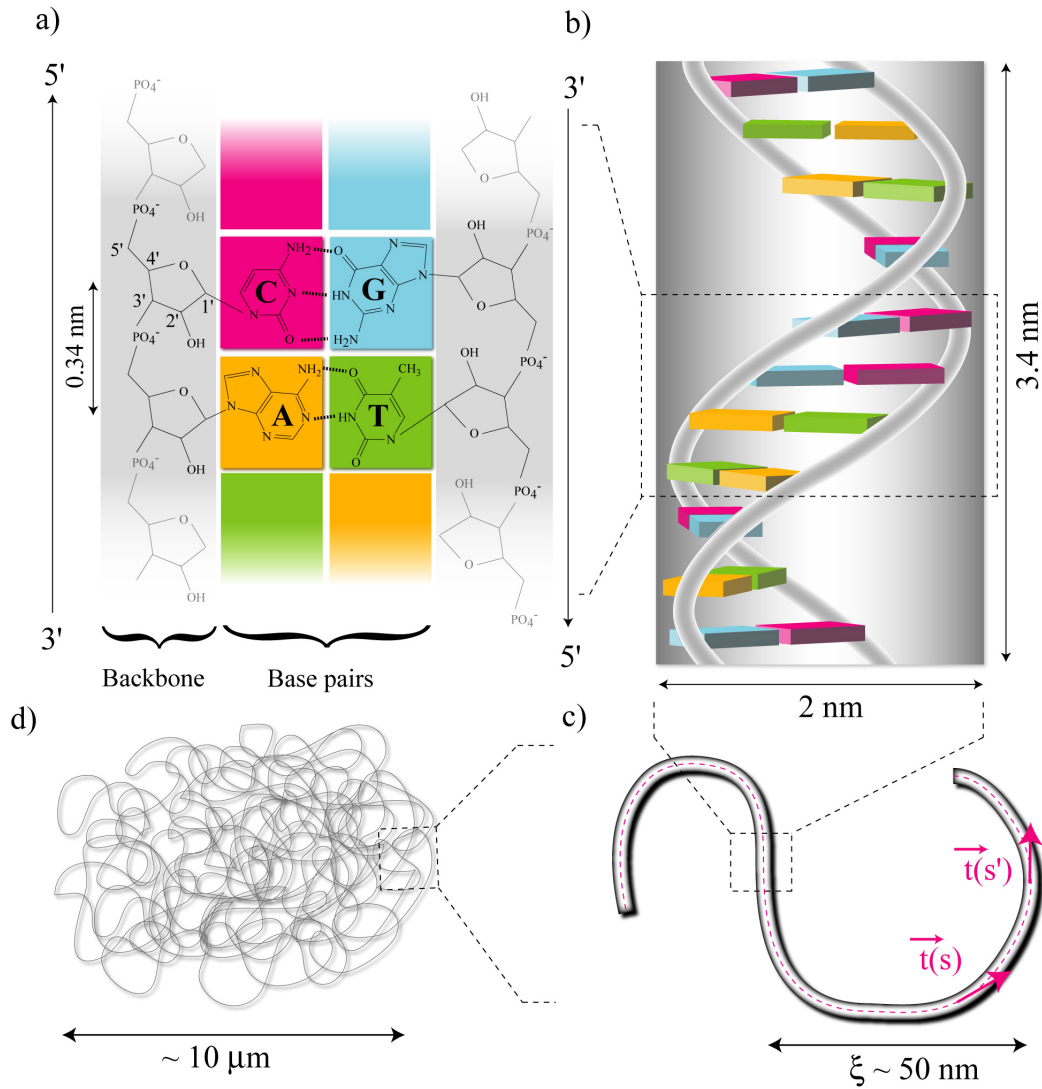


FIG. 1.1 – **Structure de l'ADN**. a) Chaque brin est composé d'un squelette sucre-phosphate. Les groupements chimiques (Adénine (A), Guanine (G), Cytosine (C) and Thymine (T)) sont attachés sur le sucre en position 1'. Pour la forme standard de l'ADN ("ADN-B"), la distance entre paire de base est de 0.34 nm. Les deux brins sont anti-parallèles : L'orientation peut être définie en utilisant les points d'accrochage des bases sur le sucre; b) Structure secondaire de l'ADN : chaque brin s'enroule autour de l'autre en formant une hélice droite. La pas de l'hélice est d'environ 10.5 paires de base, ce qui implique que l'angle de torsade entre bases est d'environ 36°. c) A plus grande échelle, l'ADN se comporte comme une chaîne semi-flexible dont l'orientation se décorrèle sur une distance de $\xi = 50\text{nm}$. d) Les longues molécules d'ADN (longueur $L \gg \xi$) ressemblent à des pelotes statistiques [27, 16] dont la distance carrée moyenne $R_0^2 = 2\xi L \approx 10\mu\text{m}$ dans le cas du chromosome d' *E. coli* (4.6 millions de paires de bases).

Chapitre 2

Propriétés topologiques de l'ADN

La longueur de persistance de l'ADN (environ 50 nm) donne l'échelle de distance sur laquelle les fluctuations thermiques arrivent à modifier notablement l'orientation de l'axe de la double-hélice. Pour de longues molécules d'ADN (c'est-à-dire beaucoup plus longues que la longueur de persistance), le chemin tridimensionnel suivi par l'axe de la double-hélice en solution est complexe. Il peut être caractérisé à l'aide d'une variable géométrique appelé vrille Wr . Par ailleurs, l'état de torsion de l'ADN est définie par une autre variable appelée torsade T_w . La somme de ces deux composantes est reliée à l'état topologique de la molécule à travers son nombre d'enlacement Lk . Dans ce chapitre, nous introduisons la notion de super-enroulement de l'ADN. Puis, nous présentons des topologies plus complexes comme les caténanes ou les noeuds. Enfin, nous exposons brièvement les différentes méthodes qui permettent d'observer et de quantifier les différentes géométries et topologies adoptées par l'ADN.

2.1 Formalisme topologique

2.1.1 Indice d'enlacement

2.1.1.1 Vision intuitive

Le matériel génétique de nombreux organismes, comme *E. coli*, est composé d'une molécule d'ADN circulaire et fermée. La structure en boucle fermée, voir figure 2.1, confère à la molécule des propriétés topologiques particulières : à la différence d'autres polymères dont la séquence des monomères est assurée par une simple liaison covalente, les bases de l'ADN sont accrochées sur deux squelettes sucre-phosphate, qui s'enroulent l'un autour de l'autre.

En conséquence, la topologie des deux simple brins d'ADN est figée : il est impossible de les séparer sans opérer de coupure dans les squelettes sucre-phosphate et d'effectuer le passage d'un simple brin à travers l'autre. L'indice d'enlacement (ou *linking number* Lk) est simplement le nombre de fois qu'il faut couper puis passer un simple brin à travers l'autre pour séparer complètement les deux simples brins d'ADN. L'indice d'enlacement d'une molécule circulaire et fermée est donc un nombre entier.

On dit qu'une molécule d'ADN est relaxée si son indice d'enlacement Lk est égal à l'indice d'enlacement naturel Lk_0 défini par :

$$Lk_0 \equiv \frac{N}{h} \quad (2.1)$$

où N est le nombre de paires de bases de la molécule et h le pas hélical de la molécule ($h = 10.5$ paires de bases). Lk_0 n'est donc pas forcément un nombre entier.

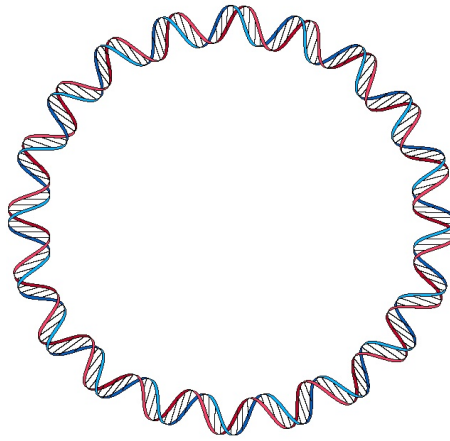


FIG. 2.1 – **Molécule d'ADN circulaire fermée.** Pour séparer les deux brins bleus et rouges, il faut opérer 20 coupures et passages de brins. L'indice d'enlacement vaut ainsi $Lk = 20$. Image tirée de [130]

2.1.1.2 Intégrale de Gauss

Plus généralement, on peut déterminer l'indice d'enlacement Lk de deux courbes de l'espace C_1 et C_2 de la manière suivante: si S est une surface délimitée par C_1 , le nombre (algébrique) d'intersections entre cette surface C_2 est exactement l'indice d'enlacement Lk . La figure 2.2 illustre le cas de deux courbes pour lesquelles $Lk = 1$.

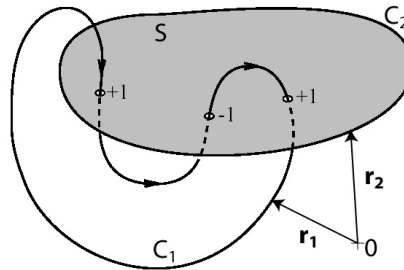


FIG. 2.2 – **Calcul de l'indice d'enlacement Lk de deux courbes C_1 et C_2 .** La somme des intersections de C_1 avec la surface S donne la valeur de l'indice d'enlacement $Lk = 1$.

Mathématiquement, en utilisant le théorème d'Ampère, cette méthode revient à calculer une double intégrale (appelée intégrale de Gauss) le long de C_1 et C_2 (voir [99], [130] et [38] pour plus de détails):

$$Lk = \frac{1}{4\pi} \oint_{C_1} \oint_{C_2} d\mathbf{r}_1 \cdot \left(d\mathbf{r}_2 \times \frac{\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1}{\|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1\|^3} \right) \quad (2.2)$$

Cette formule constitue le plus simple invariant topologique. Il est ainsi possible de calculer explicitement Lk connaissant la trajectoire de chaque courbe.

L'intégrale de Gauss permet le calcul de l'indice d'enlacement des simples brins dans une molécule d'ADN, mais elle peut être également appliquée au calcul du lien entre deux molécules d'ADN double brin. De telles molécules s'appellent des caténanes et font l'objet d'une étude dans la partie suivante de cette thèse. Pour éviter la confusion avec une simple molécule d'ADN, nous appellerons par la suite indice de caténation Ca l'indice d'enlacement de deux molécules d'ADN double-brin. Ce-

pendant, l'intégrale de Gauss devient inexacte pour des liens complexes [99, 130] (voir aussi l'article consacré aux simulations numériques de molécules d'ADN caténées dans la partie suivante).

2.1.1.3 Super-enroulement

L'écart à $Lk0$, $\Delta Lk \equiv Lk - Lk0$, traduit l'état d'enroulement de la molécule. Lorsque $Lk \neq 0$, on dit que la molécule est super-enroulée. On définit la densité de super-enroulement :

$$\sigma = \Delta Lk / Lk0 \quad (2.3)$$

qui permet de comparer des molécules de taille différente. *In vivo*, l'ADN est en général super-enroulé. Par exemple, l'ADN extrait des bactéries possède un σ compris entre -0.03 et -0.09 [7]. On dit qu'il est sous-enroulé.

Les modifications de l'état d'enroulement de l'ADN, qui sont d'ordre topologiques, induisent cependant de profonds changements de la structure secondaire et tertiaire de la molécule. Ces propriétés géométriques sont exposées dans les sections suivantes.

2.1.2 La Torsade (ou *Twist* (Tw))

La torsade (ou *Twist* (Tw)) est une variable géométrique qui représente le nombre de tours qu'effectue un simple brin d'ADN autour de l'autre simple brin.

Dans le cas d'une molécule d'ADN (confinée dans un plan) pour laquelle $Lk = Lk0$:

$$Tw = Tw0 = Lk0 = \frac{N}{h} \quad (2.4)$$

où $Tw0$ s'appelle la torsade spontanée de la molécule d'ADN.

Dans le cas général, si L est la longueur de la molécule :

$$Tw = \int_0^L \frac{ds}{2\pi} \left(\frac{2\pi}{h} + \Omega(s) \right) = Tw0 + \Delta Tw \quad (2.5)$$

où $\Omega(s)$ est l'excès local de rotation des paires de bases par rapport à l'axe de la double-hélice, et h le pas hélical (exprimée en unité de longueur).

Tw mesure l'état de torsion de l'ADN. Pour une conformation donnée, l'énergie de torsion associée vaut :

$$E_{torsion} = \frac{1}{2} C \int_0^L \Omega^2(s) ds \quad (2.6)$$

où C est le module de torsion de l'ADN. Notons que $Tw0$ est une propriété caractéristique de la structure secondaire de l'ADN. L'augmentation de Tw entraîne une augmentation de l'angle entre les bases. Ce modèle élastique de la torsion n'est valable que pour des petites déformations de la structure, et revient à considérer l'ADN comme un pur ressort en torsion. Cependant, lorsque des couples importants sont appliqués sur la molécule d'ADN, il apparaît des non-linéarités puis des modifications de structure de la double-hélice (séparation des brins, désappariement des bases). De tels phénomènes sont décrits dans la partie II.

2.1.3 La vrille (ou *Writhe* (Wr))

La vrille (ou *Writhe* (Wr)) caractérise le chemin tridimensionnel suivi par l'axe du ruban la double-hélice. C'est donc une propriété qui est liée à la structure tertiaire de la molécule d'ADN.

En 1959, Calugareanu [15] démontre que la ville Wr se calcule en appliquant la formule de Gauss pour l'axe C du ruban :

$$Wr = \frac{1}{4\pi} \oint_C \oint_C d\mathbf{r} \cdot \left(d\mathbf{r}' \times \frac{\mathbf{r}' - \mathbf{r}}{\|\mathbf{r}' - \mathbf{r}\|^3} \right) \quad (2.7)$$

En conséquence de cette formule, la vrille de toute courbe plane est nulle.

2.1.4 Théorème de Calugareanu

Le théorème de Calugareanu[15] établit la relation entre l'indice d'enlacement Lk et les propriétés géométriques d'un ruban (la torsade (ou *Twist* Tw) et la vrille (ou *Writhe* Wr)). En 1969, White[144] démontre la relation suivante (voir [38] pour une démonstration simple):

$$Lk = Wr + Tw \quad (2.8)$$

La figure 2.3 b) et c) illustre le cas de courbes C_1 et C_2 ayant la même topologie ($Lk = 2$) mais des propriétés géométriques très différentes: en b), le ruban est torsadé ($Tw = 2$), mais n'est pas vrillé ($Wr = 0$); en c), le ruban n'est pas (ou peu) torsadé ($Tw \approx 0$), mais il est vrillé ($Wr \approx 2$). Ainsi la torsade et la vrille sont des propriétés purement géométriques et ne sont pas caractéristiques de la topologie d'une molécule d'ADN.

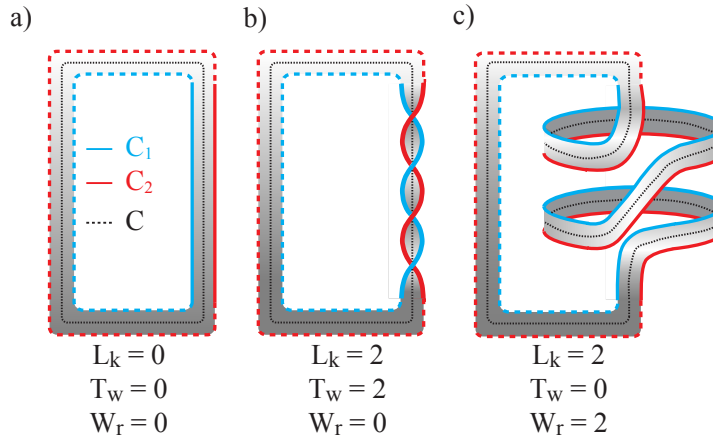


FIG. 2.3 – **torsade (Tw), vrille (Wr) et indice d'enlacement (Lk)**. a) Soit un ruban circulaire dont on appelle C_1 et C_2 les bords. b) L'entortillement du ruban autour de son axe C (qui nécessite la coupure du ruban) de deux tours crée de la torsade: $Tw = 2$. L'indice d'enlacement s'en trouve ainsi changé: $Lk = 2$. c) Pour un indice d'enlacement donné, on peut changer la géométrie de telle sorte d'éliminer la torsade ($Tw = 0$) (C_1 et C_2 ne s'enroulent plus l'une par rapport à l'autre) et de la transformer en vrille $Wr = 2$: cette fois, c'est l'axe du ruban qui se coupe deux fois lui-même.

2.1.5 Extension au cas de molécules linéaires

Les formules précédentes s'appliquent également au cas de molécules d'ADN linéaires, mais dont les extrémités sont bloquées en rotation. Il suffit boucler la molécule en utilisant un chemin plan (qui n'a donc aucune vrille et aucune torsade) pour appliquer la formule de Calugareanu énoncée plus haut, comme le montre la figure 2.4. Il faut faire attention à s'éloigner suffisamment de la molécule pour ne pas introduire de noeud lors du bouclage.

Expérimentalement, comme nous le verrons dans la partie consacrée à la micromanipulation, les molécules d'ADN micromanipulées sont accrochées en de multiples points sur une surface de verre

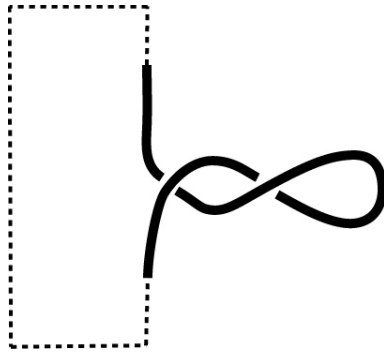


FIG. 2.4 – Bouclage d'une molécule linéaire.

et sur la bille magnétique: elles ne peuvent pas tourner. L'indice d'enlacement est donc parfaitement contrôlé.

In vivo, par contre, il reste très difficile de savoir si les molécules d'ADN chromosomiques eucaryotes sont bloquées en rotation ou non. *A priori*, les molécules linéaires sont libres de relâcher la torsion. Cependant, il a été suggéré (voir [90] pour une revue) qu'il puisse exister des domaines où la topologie de l'ADN soit bloquée.

2.2 Le super-enroulement de l'ADN

2.2.1 Géométrie des molécules super-enroulées

D'après le théorème précédent, molécule d'ADN super-enroulée ($\Delta Lk \neq 0$) vérifie:

$$\Delta Lk = \Delta Tw + Wr \quad (2.9)$$

car, en moyenne, la vrille d'une molécule relaxée est nulle et sa torsade vaut $Tw = Tw_0$.

La répartition entre Wr et ΔTw dépend de plusieurs facteurs : la constante de torsion de l'ADN, la concentration et la nature des sels qui changent le pas hélical de l'ADN, et bien sûr l'état topologique de la molécule Lk . De plus les molécules d'ADN en solution sont soumises à l'agitation thermique, de sorte que leur propriétés géométriques fluctuent. Par ailleurs, nous verrons, lors de la présentation des expériences de micromanipulation, que la force modifie aussi la répartition $\Delta Tw/Wr$ pour un ΔLk donné.

Dans des conditions physiologiques, il n'y a pas de seuil à l'apparition de vrille dans des molécules circulaires fermées, pourvu qu'elles soient suffisamment grandes (de taille bien supérieure à la longueur de persistance). Ainsi, une molécule de quelques milliers de paires de bases avec $\sigma = -0.01$ est déjà vrillée. A partir de clichés de microscopie électronique, on a pu évaluer que le rapport $\Delta Tw/Wr$ vaut environ 1/3[10].

Wr quantifie le caractère tridimensionnel adopté par la double-hélice, mais il ne permet cependant pas de déterminer la structure exacte adoptée par la molécule d'ADN. Les deux structures canoniques vrillées sont les solénoïdes et les plectonèmes. Le solénoïde est constitué d'une super-hélice simple, alors que le plectonème est composé de deux super-hélices qui s'emmêlent l'une autour de l'autre (voir figure 2.5).

Pour ces deux structures, dans le cas d'hélice droite, Füller a montré que la vrille vaut respectivement[33] :

$$Wr = n(1 - \sin \alpha) \quad (2.10)$$

et

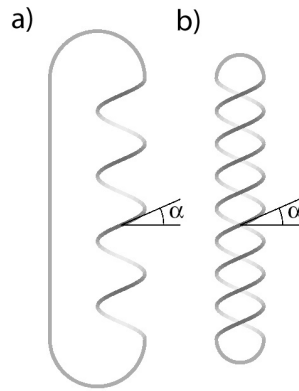


FIG. 2.5 – **Solénoides et plectonèmes.** a) Un solénoïde est constitué d'une simple hélice b) Un plectonème est constitué de deux hélices entremêlées. Image tirée de [130].

$$Wr = -n \sin \alpha \quad (2.11)$$

où n est le nombre total de tours d'hélices (il y a deux fois plus de tours d'hélice dans le cas du plectonème que d'un solénoïde) et α l'angle tel que défini sur la figure 2.5. Il est intéressant de remarquer qu'une structure en hélice droite (pour un α donné) a une vrille négative si c'est un plectonème, mais une vrille positive si c'est un solénoïde. En conséquence, une molécule d'ADN super-enroulée négativement (ou sous-enroulée), c.a.d avec $\Delta Lk < 0$ et $Wr < 0$, peut former un plectonème enroulé à droite ou un solénoïde enroulé à gauche.

Quelle est alors la forme stable pour un polymère semi-flexible comme l'ADN? On remarque que, pour les deux hélices (solénoïde ou plectonème), augmenter l'angle α permet de diminuer la courbure de la molécule et donc l'énergie de courbure associée. Ce faisant, $|Wr|$ diminue pour le solénoïde alors qu'il augmente pour le plectonème. Ainsi, la torsade $|Tw|$ (et donc l'énergie de torsion) est moins grande pour le plectonème que pour le solénoïde. D'un point de vue énergétique, la structure plectonémique est donc favorisée. Les données expérimentales (voir la figure 2.6 pour un exemple) montrent que les molécules d'ADN super-enroulées nues forment des structures plectonémiques [134].

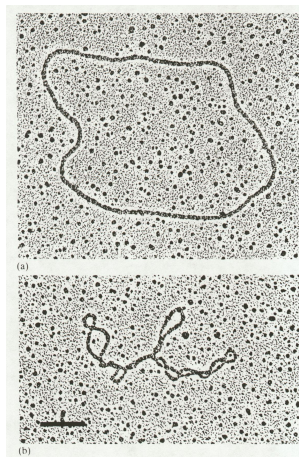


FIG. 2.6 – **Images en microscopie électronique de l'ADN du virus PM2 relaxés (en haut) et super-enroulés ($\sigma < 0$, en bas).** La barre représente $0.2\mu\text{m}$ (Image empruntée à Lesley Coggins).

Cependant, les structures super-enroulées de type solénoïdale existent *in vivo* et jouent en particulier un rôle structural majeur chez les eucaryotes : l'ADN s'enroule autour de protéines appelées histone, formant ainsi une hélice gauche qui réduit l'indice d'enlacement (voir paragraphe suivant).

2.2.2 Le super-enroulement *in vivo*

Le super-enroulement est une composante essentielle du bon fonctionnement des cellules procaryotes et eucaryotes. Il est impliqué dans de nombreux processus biologiques, comme par exemple la compaction de l'ADN, la transcription et la réplication de l'ADN.

2.2.2.1 Compaction de l'ADN

Le super-enroulement permet de compacter très efficacement l'ADN. Chez les procaryotes, le sous-enroulement ($\sigma \approx -5\%$) crée des structures plectonémiques très serrées, qui favorisent en particulier la séparation des molécules d'ADN lors de la réplication[52].

Chez les eucaryotes, L'ADN est compacté grâce par la formation d'une structure mixte d'ADN et de protéines extrêmement hiérarchisée, de sorte que le génôme tout entier (qui fait environ $\simeq 2$ m d'ADN pour les cellules somatiques humaines), tienne dans le noyau de la cellule ($\simeq 10\mu\text{m}$ de rayon). Cette organisation est rendue possible par l'enroulement solénoïdale d'environ cent quarante paires de bases d'ADN autour d'un noyau d'histones, qui sont des protéines globulaires chargées positivement. La structure ainsi obtenue, composée de huit histones, s'appelle un nucléosome (voir figure 2.7). L'ADN fait environ deux tours gauches dans un nucléosome ($Wr \simeq -2$), mais son accrochage entraîne une augmentation de la torsade ($\Delta T_w \simeq 1$). En conséquence, la variation d'enlacement est d'environ un tour pour un nucléosome. La longueur d'ADN entre deux nucléosomes est d'environ 60 paires de bases (appelé ADN "lien"). Ainsi, la modification d'enroulement de l'ADN est d'environ 1 unité chaque 200 paires de bases ($Lk0 \approx 20$), de sorte que $\sigma \approx -1/20 = -5\%$. Cependant, il ne s'agit là que du premier niveau de compaction de l'ADN. Les nucléosomes sont eux-mêmes en interaction pour former la fibre de chromatine, d'un diamètre de 30nm, comme le montre la figure 2.7. Il existe trois niveaux d'empaquetage supérieurs qui donnent sa structure au chromosome.

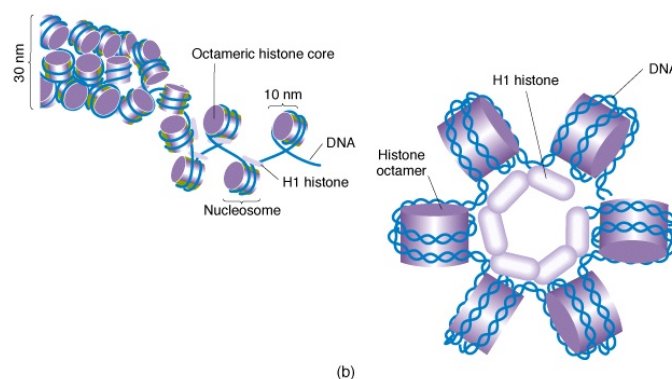


FIG. 2.7 – **Organisation de la chromatine.** L'ADN s'enroule d'un noyau composée de huit protéines appelées histones (en violet), pour former une structure mixte ADN/protéine appelé nucléosome. L'interaction entre nucléosome permet la formation d'une structure hélicoïdale de 30 nm de diamètre appelée fibre de chromatine (à gauche). Image tirée de http://www.bio.miami.edu/dana/104/104F02_9.html

2.2.2.2 Transcription

Le super-enroulement négatif de l'ADN favorise la déstabilisation de la double-hélice, spécialement dans les régions riches en A-T. En conséquence, il facilite la séparation des brins et l'insertion d'un complexe enzymatique qui accompagne l'ARN polymérase.

Par ailleurs, la transcription peut aussi modifier de manière transitoire et locale l'état de super-enroulement de l'ADN. Lors de la progression du complexe enzymatique, il se crée un excès d'enroulement de l'ADN en amont de la fourche de réplication et un déficit en aval.

2.2.2.3 Réplication

Le super-enroulement négatif favorise également l'initiation du processus de réplication de l'ADN. Par contre, la progression de la fourche de réplication entraîne l'apparition d'une contrainte de torsion positive dans la molécule en cours de réplication.

2.3 Noeuds et liens

En solution, une molécule d'ADN linéaire adopte une configuration tridimensionnelle complexe. Si la molécule est suffisamment longue et que l'on joint ses extrémités, la probabilité pour que la molécule forme un noeud est non négligeable. De même, si la concentration d'ADN dans la solution est importante, il est probable d'obtenir des molécules liées entre elles, aussi appelées caténanes.

La figure 2.8 montre schématiquement des cas simples de caténanes et de noeuds : des molécules liées pour lesquelles $Ca = 2$ et le noeud de trèfle, noté 3_1 car il possède trois croisements.

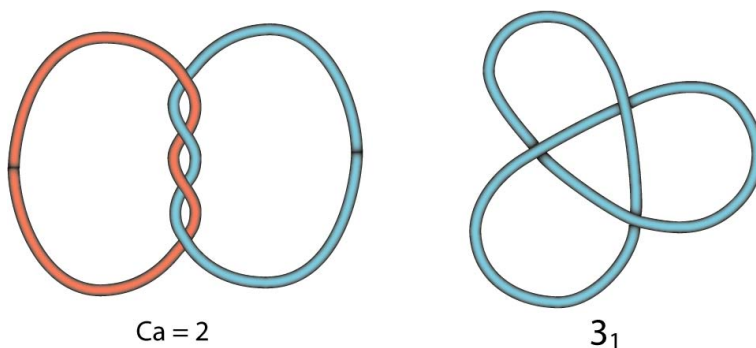


FIG. 2.8 – Caténanes ($Ca = 2$) et noeuds de trèfle (trois croisements, noté 3_1).

D'un point de vue théorique, on peut utiliser des objets mathématiques appelées invariants qui permettent d'identifier de manière univoque chaque type de noeud ou de lien entre molécule[38].

Pour les caténanes, l'intégrale de Gauss permet théoriquement de calculer l'indice de caténation Ca entre les deux molécules. Cependant, comme nous le verrons dans le chapitre dédié aux tresses d'ADN (c'est-à-dire des molécules d'ADN caténées et étirées par une force), cet invariant ne permet pas de distinguer certains liens simples d'autres plus complexes.

Pratiquement, la caténation de molécule d'ADN apparaît lors de la réplication de l'ADN, où les molécules d'ADN nouvellement synthétisées s'enroulent l'une autour de l'autre. Ces caténanes, qui sont liés à la structure en double-hélice de l'ADN, doivent être éliminés pour permettre la séparation

des chromosomes lors de la mitose. Notons également que la décaténation de "cercles" d'ADN caténés est largement utilisée pour étudier les topoisomérases, enzymes responsables de la décaténation.

Les noeuds sont des structures couramment observées lors de la manipulation *in vitro* de molécules d'ADN, mais peuvent également apparaître *in vivo*. Par exemple, la cyclisation de molécules d'ADN de 10 kb conduit à la formation d'environ 3% de noeuds de trèfle[102]. Les noeuds peuvent être caractérisés par des invariants topologiques, comme par exemple les polynômes d'Alexandre (voir Annexe C).

2.4 Méthodes usuelles d'étude des molécules super-enroulées, nouées ou caténées

2.4.1 Electrophorèse de l'ADN

La méthode la plus répandue pour étudier et identifier la topologie de molécules d'ADN circulaires et quantifier leur état de super-enroulement consiste à faire migrer les molécules d'ADN, (chargées négativement) dans un gel en appliquant un champ électrique. Elle peut être utilisée pour séparer les molécules d'ADN selon leur taille, mais elle permet aussi la séparation de différents topoisomères (c'est-à-dire des isomères de topologie) : à cause de leur vrille, les molécules migrent d'autant plus rapidement qu'elles sont davantage super-enroulées (c'est à dire que $|\sigma|$ est grand).

La figure 2.9 montre une image d'un gel d'agarose obtenu après migration de molécule d'ADN circulaires qui ont des topologies différentes. Dans la ligne 1, on distingue deux bandes, qui correspondent à des molécules d'ADN circulaires relaxées (en haut) et des molécules super-enroulées (en bas) (les molécules migrent de haut en bas). Dans les lignes 2 et 3, chaque bande représente des molécules d'ADN dont le nombre d'enlacement diffère d'une unité (appelés topoisomères). Ces molécules sont obtenues par l'action de topoisomérases (voir partie II) sur des molécules initialement super-enroulées. Les lignes 2 et 3 diffèrent par le temps de réaction utilisé.

Ainsi, la séparation sur gel permet d'étudier la cinétique de relaxation de plasmides super-enroulés par les topoisomérases, et donc de quantifier l'activité de ces enzymes. Cependant, comme pour toutes les mesures d'ensemble, cette expérience ne donne qu'une information moyenne sur un grand nombre de molécules d'ADN et d'enzymes, dont la population peut être hétérogène (enzymes actives ou inactives).

L'électrophorèse de l'ADN permet aussi de séparer des topologies plus complexes comme les caténanes et les noeuds. Lorsque l'on circularise une molécule d'ADN en faisant agir la ligase sur des molécules linéaires dont les extrémités sont cohésives, on obtient majoritairement des molécules circulaires. Mais, suivant la concentration et la taille de l'ADN, on trouve également d'autres produits : des dimères circulaires, des molécules caténées et des noeuds (le plus courant étant le noeud de trèfle). Les propriétés de migration de ces molécules sont différentes, comme le montre la figure 2.10, et il est donc possible d'observer comment les topoisomérases décatènent ou dénouent l'ADN[102].

2.4.2 Microscopie électronique

La microscopie électronique permet de visualiser des molécules d'ADN super-enroulées et d'étudier leur conformation en deux dimensions. La cryo-microscopie électronique permet de geler plus rapidement un échantillon et donc de piéger la conformation des molécules[8].

Ces techniques, par leur excellente résolution, permettent de déterminer précisément la topologie des molécules d'ADN : caténanes, noeuds, super-enroulement.

En contrepartie, elles peuvent entraîner des artefacts liés aux traitements successifs nécessaires à la préparation des échantillons. En outre, il est impossible d'obtenir des informations dynamiques.

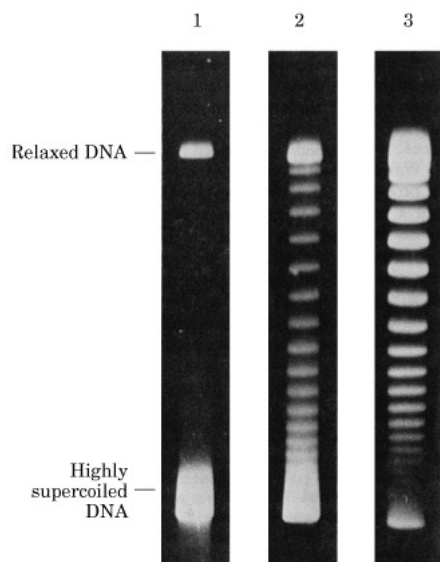


FIG. 2.9 – **Migration de molécules d'ADN super-enroulées.** La ligne 1 montre deux populations de molécules d'ADN circulaires : les unes sont relâchées et les autres sont super-enroulées. Dans les ligne 2 et 3, en plus des deux populations précédentes, la série de bandes isolées marque la présence de topoisomères dans des états de super-enroulement intermédiaires entre les bandes de la ligne 1. Ces topoisomères ont été obtenus après action d'une topoisomérase sur les molécules initialement super-enroulées de la ligne 1. Image empruntée à http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/Stryer/Stryer_F31-18.jpg

2.4.3 Microscopie à force atomique

L'imagerie par microscopie à force atomique (AFM) permet également d'imager des molécules d'ADN isolées accrochées sur une surface, comme le montre la figure 2.11. C'est également une méthode statique. L'avantage, par rapport à la microscopie électronique, est que l'analyse peut s'effectuer en milieu aqueux. La technique est peu invasive, donc les sources d'artefacts sont plus limitées. Cependant, la résolution spatiale n'est pas aussi bonne qu'en microscopie électronique.

2.4.4 Intérêt de la micromanipulation de molécule unique

Dans ce contexte, les expériences de micromanipulation d'ADN, que nous présentons dans la partie suivante, constituent un excellent moyen pour étudier le super-enroulement et la caténation de molécules d'ADN : elles permettent de contrôler précisément la topologie d'une ou deux molécules linéaires d'ADN et de mesurer en temps réel l'extension d'un tel système (voir la partie II). Ainsi, elles donnent accès directement aux propriétés mécaniques de l'ADN, mais constituent aussi un support idéal pour le suivi instantané de l'activité des topoisomérases. Ces méthodes, qui sont expliquées dans la partie III, donnent en effet accès à des mesures dynamiques sur une enzyme unique, s'affranchissant ainsi des problèmes de moyennage rencontrés dans les mesures d'ensemble.

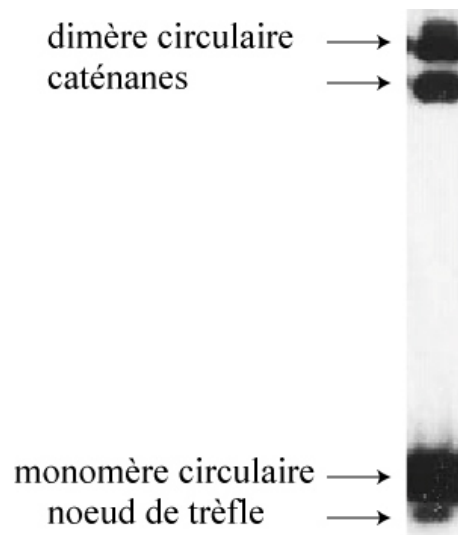


FIG. 2.10 – **Migration de molécules d'ADN nouées et caténées.** *Les propriétés de migration des molécules ayant des topologies différentes ne sont pas les mêmes. Image tirée de [102]*

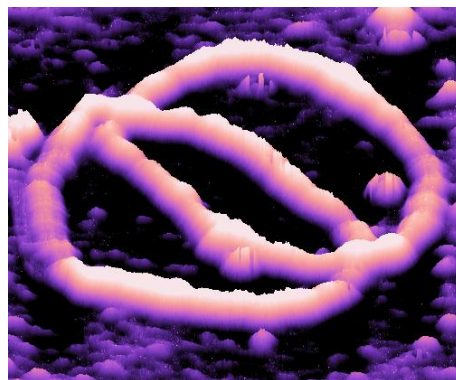


FIG. 2.11 – **Image AFM de molécules d'ADN caténés obtenue dans le laboratoire de Stephen Kowalczykowski.** *Les caténanes ont été obtenus par action simultanée de l'hélicase RecQ et de la topoisomérase III (voir la partie III). L'ADN est recouvert par la protéine RecA pour obtenir un meilleur signal. Image empruntée à <http://www.mcb.ucdavis.edu/chromosomes/Kowalczykowski.htm>*

Deuxième partie

Micromanipulation d'ADN

Chapitre 1

Pinces magnétiques

1.1 Dispositifs pour étirer l'ADN

Au cours des années 1990 sont apparues plusieurs techniques de micromanipulation, qui permettent l'étude d'objets biologiques (ADN, protéines) isolés. Le principe commun de toutes ces techniques est d'accrocher l'objet d'intérêt sur une surface par une extrémité, et d'exercer une force mesurable à l'aide d'un senseur à l'autre extrémité. La mesure conjointe de l'extension et de la force exercée sur l'objet permet d'en déterminer l'élasticité.

D'un point de vue de pratique, un dispositif de micromanipulation peut utiliser différent types de senseurs:

- Le microscope à force atomique utilise (AFM) un petit bras flexible (cantilever) accroché à l'objet d'intérêt dont la mesure de déflexion permet de déduire la force appliquée. Généralement, on impose un déplacement sub-micrométrique de la platine en utilisant une cristal piezoélectrique [34].
- Les dispositifs à microfibres utilisent une fibre optique micrométrique comme bras flexible, ce qui permet une mesure directe de la déflexion [54, 22].
- Les pinces optiques utilisent le piégeage d'une bille micrométrique à haut indice de refraction (par exemple une bille de latex) au point focal d'un faisceau laser. La mesure de la déviation de la bille par rapport à sa position d'équilibre permet de remonter à la force exercée sur l'objet[109]).
- les pinces magnétiques, où l'on vient exercer une force sur une bille super paramagnétique à l'aide d'un aimant (piégeage simple) [110, 117] ou d'électroaimants (piégeage en trois dimensions) [3, 43].

La mesure de force nécessite la connaissance précise de la rigidité du senseur k , qui s'obtient par exemple par calibration du dispositif en présence d'une force d'intensité donnée (exemple: flux hydrodynamique). Ainsi la mesure directe du déplacement du senseur δx permet de remonter à la force $F = k\delta x$.

La rigidité du senseur varie largement d'un dispositif à un autre (de 10^{-7} N/m pour une pince magnétique à 10^{-2} N/m pour les cantilevers d'AFM), de telle sorte que le domaine de force accessible (de quelques dizaines de femtoNewton (fN) pour une pince magnétique à quelques nanoNewton (nN) pour un AFM, permet de sonder toutes les échelles de forces pertinentes pour les molécules biologiques.

Si le concept utilisé est le même dans tous ces dispositifs, ils possèdent des caractéristiques techniques très différentes comme nous le verrons par la suite. En conséquence, le choix de l'un ou l'autre dépend largement du système étudié.

1.2 Ordres de grandeur de force

Dans cette section, nous introduisons les différentes échelles de force auxquelles peuvent être soumises les molécules biologiques en solution. Certaines de ces estimations grossières sont basées sur l'hypothèse qu'une liaison de taille d et d'énergie E peut être rompue en exerçant une force de l'ordre de $F \approx E/d$. En pratique, les fluctuations thermiques favorisent la sortie du puits de potentiel : plus la force est exercée sur un temps important, plus le risque de casser la liaison augmente[31].

1.2.1 Force de rupture de liaison covalente F_{max}

La force nécessaire pour casser une liaison de longueur typique $\approx 0.1\text{nm}$ et d'énergie $\approx 1\text{eV}$ est $F_{max} \sim 1\text{eV}/0.1\text{nm} = 1.6 \times 10^{-9} \text{ N} = 1.6 \text{ nN}$. F_{max} donne la borne supérieure de force pour l'étirement de molécules uniques[94].

1.2.2 Force de rupture de liaisons non-covalente

Les molécules biologiques possèdent énormément de liaisons faibles électrostatiques ou de liaison hydrogène, qui sont à la base de leur structure tridimensionnelle. Ces liaisons se font ressentir sur une échelle de distance de l'ordre du nanomètre. L'énergie mise en jeu est de l'ordre de quelques fois l'énergie thermique $k_B T \approx 4 \cdot 10^{-21} \text{ J} = 4 \text{ pN.nm}$ à température ambiante. Ainsi, la force nécessaire pour rompre une liaison faible est typiquement $\sim 4 \text{ pN}$. Bien sûr, la stabilité de la structure 3D des protéines ou de l'ADN et leur interaction mutuelle implique de nombreuses liaisons faibles coopératives. Des forces entre 10 pN et 100 pN sont donc généralement requises pour dénaturer les protéines et l'ADN, ou pour empêcher leur accrochage mutuel.

Une des plus fortes interaction non-covalentes est celle qui existe entre la biotine (petite molécule organique) et la streptavidine (protéine). La force nécessaire pour casser cette liaison est d'environ 160 pN [34].

1.2.3 Force entropique

Les fluctuations thermiques d'énergie $k_B T$ entraîne la courbure de l'ADN sur une distance appelée longueur de persistance ξ de l'ADN. Dans les conditions physiologiques, cette distance vaut environ $\xi = 50\text{nm}$. Comme nous l'avons vu précédemment, pour des échelles de tailles supérieures à ξ , l'ADN se trouve sous la forme de pelote statistique. Ainsi, la force nécessaire pour étirer notablement une pelote d'ADN vaut : $F_e = k_B T / \xi \approx 0.1 \text{ pN}$.

Ce petit calcul entraîne le commentaire suivant : plus le polymère est "rigide" (grande longueur de persistance), plus F_e est petite, et plus il est aisé d'étirer le polymère. Cette propriété particulière des polymères en solution, que l'on appelle parfois le paradoxe de l'entropie élastique, peut s'expliquer comme suit : la force appliquée a tendance à réduire le nombre de configurations accessibles de la molécule (c'est à dire à réduire son entropie). Pour un polymère de taille donnée, plus il est rigide, moins il a de configurations possibles, donc moins il perd d'entropie lors d'un étirement et moins la force nécessaire pour obtenir un étirement notable du polymère est importante.

1.2.4 Force de Langevin

La plus petite force détectable sur un objet brownien de taille d dans un fluide visqueux est la force de Langevin, qui modélisent les collisions aléatoires sur l'objet par les molécules de solvant environnantes. Pour une bande passante Δf , la force moyenne ressentie par l'objet vaut :

$$F_L = \sqrt{4\pi k_B T \gamma \Delta f} \quad (1.1)$$

où γ caractérise la dissipation (pour un objet sphérique, $\gamma = 3\pi\eta d$). Pour une bille de deux microns, dans de l'eau ($\eta = 10^{-3}$ Pa.s), l'intensité de la force moyenne sur 1 seconde vaut 10 fN.

Dans des conditions de micromanipulation optimales, cette force aléatoire est la source majeure de bruit expérimental. Comme la viscosité de l'eau ne peut pas être diminuée et que l'échelle de temps $\tau \sim 1/\Delta f$ est gouvernée par les processus biologiques étudiés, nous verrons plus bas que le seul moyen d'améliorer le rapport signal sur bruit est de réduire la taille du senseur.

Par la suite, nous verrons que la force typique auxquelles nous observons l'activité des topoisomérases est de l'ordre du piconewton (pN) : c'est une force suffisamment élevée pour obtenir un étirement conséquent de l'ADN et des fluctuations d'extension limitées, mais suffisamment faible pour ne pas (trop) contrarier l'activité des topoisomérases.

1.3 Dispositif pour tirer et tordre l'ADN

Parmi les dispositifs d'étirement de molécules cités plus haut, certains permettent aussi de changer l'état d'enroulement de la molécule d'ADN (voir Figure 1.1). Ceci implique un blocage en rotation des molécules, dont nous parlerons à la section 1.4.

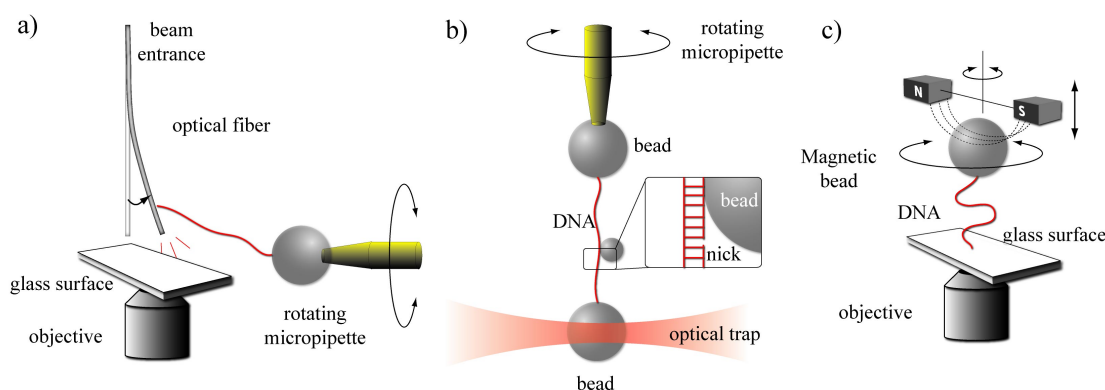


FIG. 1.1 – **Principe des appareils de micromanipulation utilisés pour étirer et tordre des molécules d'ADN.** a) le senseur de force est constitué d'une micro fibre optique dont la déflexion est proportionnelle à la force appliquée sur la molécule en tirant à l'aide d'une micropipette [22, 64]. La rotation de la micropipette par rapport à son axe permet de tordre l'ADN. b) Un dispositif similaire où le senseur de force est remplacé par une bille piégée entre deux lasers de directions opposées. La force appliquée est déduite de la déflexion du faisceau laser consécutive au mouvement de la bille. Une petite bille supplémentaire peut être utilisée pour détecter la rotation de la molécule[13]. c) En utilisant une petite bille magnétique, on peut tirer sur l'ADN en plaçant des petits aimants au voisinage (quelques mm) de la bille[117]. Le moment magnétique de la bille tend à s'aligner avec la direction du champ magnétique, provoquant un couple très élevé. Ainsi, la rotation des aimants induit instantanément la rotation de la bille et la torsion de l'ADN.

1.3.1 Microfibres

Le dispositif décrit par [22] et [64] (voir figure 1.1a), utilise la déflexion d'un micro fibre optique pour mesurer la force appliquée sur une molécule d'ADN étirée à l'aide d'une micropipette. Cet appareil permet aussi la rotation de la micropipette et donc la torsion de la molécule d'ADN. La rigidité typique obtenue est de l'ordre de 10^{-5} N/m [30, 65] et sa résolution spatiale d'environ 10 nm. Cependant, à cause de la dimension importante de la fibre, une large force de Langevin associée à des mesures à bande passante importante (100 Hz) implique que la résolution minimale en force est de l'ordre de quelques pN.

1.3.2 Piège optique

Les pincettes optiques utilisent la différence d'indice de réfraction entre une bille micrométrique (par exemple de latex) et le milieu environnant pour piéger cet objet près du point focal d'un faisceau laser. La différence d'indice induit une modification de l'impulsion des photons réfractés par la bille et produit ainsi une force de rappel dirigée vers le point de focalisation.

La tension sur la molécule accrochée par une extrémité à la bille peut se déduire du déplacement de cette dernière par rapport à sa position d'équilibre, connaissant la raideur du piège optique.

Dans le dispositif de la figure 1.1b [109], une micropipette est utilisée pour tirer et tordre une molécule d'ADN accrochée par l'intermédiaire d'une bille. Une pince optique est utilisée pour mesurer la force exercée.

Enfin, une troisième petite bille (submicrométrique) est parfois utilisée pour mesurer le couple appliquée sur la molécule : il peut être déduit de la force de Stokes exercée sur la bille sous l'action du couple dans la molécule d'ADN.

Avec une bille de $1\mu\text{m}$ dans le piège optique, la densité de force du mouvement brownien est de l'ordre de $\approx 10 fN/Hz^{1/2}$. Pour une mesure typique faite avec une bande passante à 100 Hz, la plus petite force mesurable vaut ~ 0.1 pN.

1.3.3 Pince magnétique

Une troisième façon pour tirer et tordre une molécule d'ADN consiste à attacher l'ADN par une extrémité à une bille magnétique et par l'autre sur la surface d'un petit capillaire en verre (voir Fig.1.1c) [117].

En approchant de forts aimants permanents créant un champ horizontal de 0.5 T, on peut appliquer une force verticale de quelques picoNewton sur la bille et la molécule d'ADN. On peut aussi tordre la molécule d'ADN en tournant les aimants, sachant que le moment magnétique de la bille suit la direction du champ magnétique.

Les pincettes magnétiques utilisant des billes de taille similaires à celles des pincettes optiques ont les mêmes limitations.

Les pincettes optiques et les microfibres imposent l'extension du système étudié. La connaissance de la raideur du capteur permet de déduire la force exercée à partir de la mesure de son déplacement. La course de déplacement du senseur limite en général le domaine accessible de forces à un voire deux ordres de grandeur.

Au contraire, les pincettes magnétiques imposent la force au système : l'intensité du champ magnétique ressentie par la bille dépend de sa distance aux aimants. L'intensité du champ varie sur une échelle de l'ordre du mm, ce qui est bien plus grand que l'échelle des déplacements de l'objet biologique étudié. En conséquence, une position d'aimant donnée impose une force constante, quel que soit le déplacement de l'objet d'étude.

1.4 Construction d'ADN et accrochage des molécules

La micromanipulation d'ADN nécessite l'accrochage spécifique de molécules d'ADN d'une part sur la surface et d'autre part sur une bille magnétique. Au cours de ce travail, nous avons utilisé essentiellement une construction d'environ 11 kb.

1.4.1 Construction d'ADN

La molécule d'ADN utilisée est fabriquée par ligation de trois fragments, comme le montre la figure 1.2.

Le fragment central provient de l'extraction de l'ADN plasmidique d'une souche d'*E. coli* portant soit le plasmide Charomid (pour la construction de 11 kb), soit le plasmide PX Δ 2 (pour la construction de 15 kb).

L'ADN extrait est coupé en utilisant des enzymes de restriction appropriées. (voir Annexe B pour les détails expérimentaux).

Les deux fragments d'extrémité sont synthétisés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur le plasmide pBlueScript en présence d'oligo-nucléotides d'UTP marqués soit à la digoxigénine, soit à la biotine.

Une fois digérés, ces fragments (d'environ 600 paires de bases) sont ligués au fragment central (d'environ 10000 paires de bases).

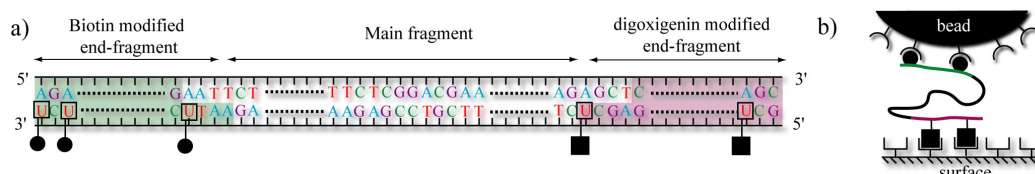


FIG. 1.2 – **Construction d'ADN et accrochage sur la bille et la surface.** a) L'ADN utilisée résulte de la ligation de trois fragments: le fragment principal obtenu par extraction d'ADN plasmidique de bactéries. Les fragments d'extrémité synthétisés par PCR en présence d'oligonucléotides d'UTP marqués à la biotine ou à la digoxigénine. b) Une telle construction permet l'accrochage spécifique d'une extrémité sur la surface d'une bille magnétique recouverte de streptavidine, et de l'autre sur la surface du capillaire, préalablement incubée avec un anticorps anti-digoxigénine.

1.4.2 Accrochage bille-ADN et surface-ADN

L'utilisation des oligonucléotides modifiés permet l'accrochage spécifique de chaque extrémité sur une surface déterminée.

Dans un premier temps, les billes super-paramagnétiques recouvertes de streptavidine sont incubées en présence de l'ADN: la forte affinité entre biotine et streptavidine permet l'accrochage du fragment sur la bille. Puis ce mélange est injecté dans le capillaire préalablement traité avec un anticorps anti-digoxigénine.

Après rinçage du capillaire, seules les billes accrochées par l'ADN sur la surface restent dans le capillaire, exception faite des billes accrochées non spécifiquement.

1.4.3 Blocage en rotation

Pour étudier le comportement d'une molécule d'ADN sous l'effet de la torsion, il est nécessaire que plusieurs (au moins deux) liaisons existent entre l'ADN et les surfaces d'accrochage.

Lorsqu'une molécule d'ADN se trouve insensible à la torsion, cela peut être dû à une cassure dans le squelette sucre-phosphate ("nick"), mais il n'est pas à exclure que ce soit plutôt la conséquence d'un mauvais accrochage sur la surface.

1.5 Montage expérimental

La figure 1.3 montre une vue d'ensemble du dispositif de micromanipulation et d'acquisition d'image. Ce dispositif, développé à partir de 1995, est le même que celui qui sert à réaliser les expériences de TERENCE STRICK lors de sa thèse. Aucune modification matérielle n'y ayant été apportée, nous n'en décrivons que brièvement le principe.

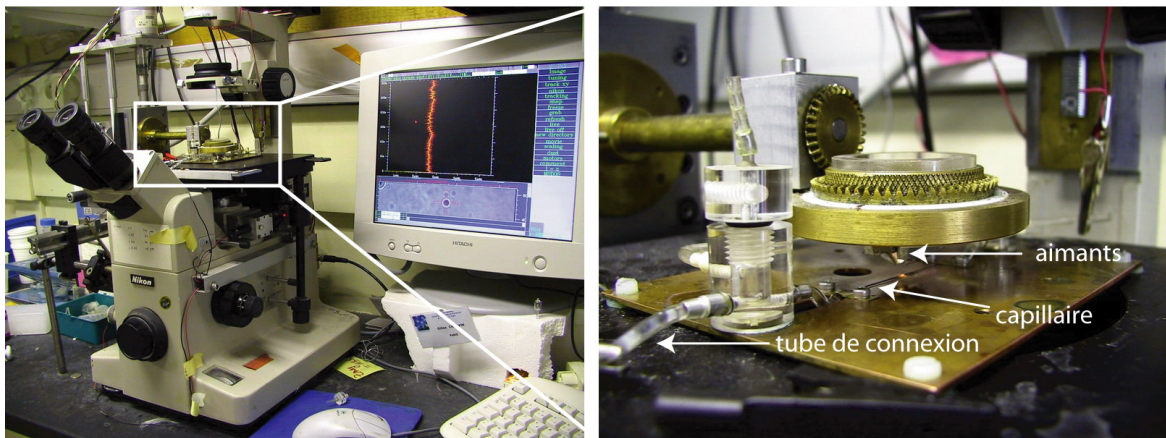


FIG. 1.3 – **Dispositif de micromanipulation.** La photo de gauche montre une vue d'ensemble. La photo de droite détaille la vue de la platine du microscope. On distingue le capillaire, enchâssé dans une plaque de cuivre, et connecté à des tubes par l'intermédiaire de chambres en plexiglas. Ces tubes permettent l'injection du mélange bille-ADN ainsi que des protéines et des tampons. Les aimants portés par une support circulaire mobile, peuvent être approchés au voisinage du capillaire. Un dispositif permet aussi leur rotation par rapport à l'axe de la lumière (axe z).

Le montage se compose d'un microscope inversé. Un faisceau de lumière parallèle vient éclairer la platine qui porte le capillaire. La lumière est collectée par un objectif 100x à immersion d'ouverture 1.4. Une caméra CCD à 25 Hz permet l'acquisition de l'image obtenue. Celle-ci est ensuite digitalisée par une carte d'acquisition vidéo pour être traitée en temps réel.

Le capillaire, qui contient le mélange bille-ADN, est enchâssé dans une plaque en cuivre vissée sur la platine. Il est connecté à des tubes qui permettent l'écoulement de tampons et l'injection du mélange bille-ADN ou des protéines.

La position des aimants placés au-dessus du capillaires est pilotée par deux moteurs pas à pas qui gèrent :

- la distance entre les aimants et le capillaire donc la force d'étirement F .
- la rotation des aimants par rapport à l'axe de la lumière (axe z) donc l'état d'enroulement de la molécule.

Lorsque les aimants sont placés au voisinage du capillaire, les billes accrochées par l'ADN s'éloignent de la surface et fluctuent librement dans la solution.

1.6 Mesure de l'extension de l'ADN

L'acquisition de l'image de la bille permet un suivi direct de mouvement dans le plan xy (plan de la platine), comme le montre la figure 1.4. Par auto-corrélation en temps réel de l'image obtenue à l'instant t avec son symétrique par rapport à l'origine (définie par la position de la bille à l'instant t_0), on déduit le déplacement $\bar{d}$ de la bille 25 fois par seconde. La précision sur la mesure de la position du centre de la bille est de l'ordre de 10 nm sur une mesure faite avec une bande passante de 1 Hz.

Le suivi de la bille dans la direction z (axe de la lumière) repose sur la remarque suivante : lorsque la distance entre la bille et le point de focalisation du microscope varie, les anneaux de diffraction défilent, changeant ainsi le profil d'intensité de la bille. L'acquisition préalable du profil des anneaux à différentes valeurs de la position de l'objectif permet de construire un fichier de calibration. La

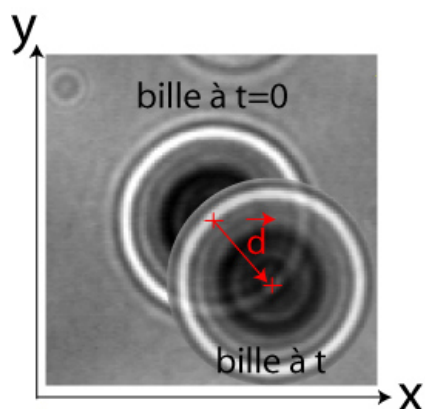


FIG. 1.4 – **Suivi de la bille en x et y.** L'auto-corrélation du profil de la bille permet de déduire le déplacement $\vec{d}$ de la bille en temps réel.

comparaison en temps réel à l'instant t de l'image de la bille à ce fichier de calibration donne la position en z de la bille avec une précision équivalente à celle du suivi en x (voir figure 1.5).

Une référence absolue de la position de la bille est obtenue en laissant tomber la bille sur la surface. Ainsi, on peut mesurer en temps réel la distance entre la bille et la surface, et donc l'extension de la molécule d'ADN, bien que le dispositif soit tel que les molécules sont observées par dessous.

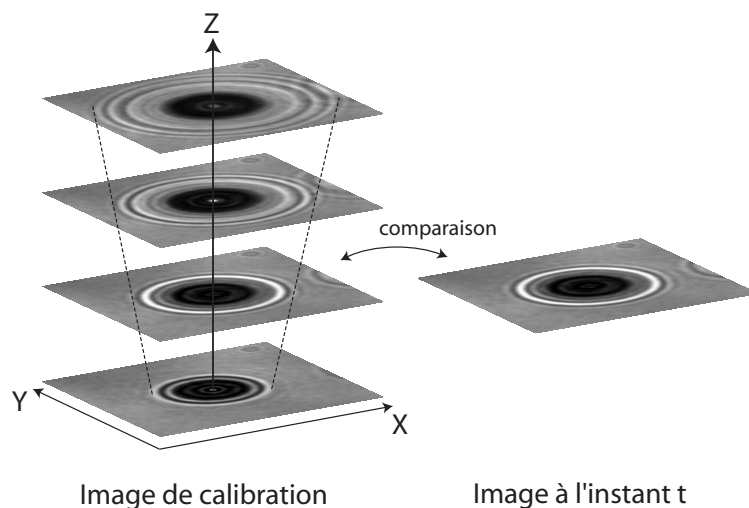


FIG. 1.5 – **Suivi du mouvement de la bille en z .** Une calibration préalable du profil des anneaux de diffraction en fonction du point de focalisation permet ensuite de déterminer la position de la bille à l'instant z , en comparant son profil par rapport au fichier de calibration.

Cependant, la platine du microscope dérive lentement avec le temps ce qui affecte les mesures de position. Pour s'affranchir de cet effet, on utilise une deuxième bille accrochée non spécifiquement sur la surface, que l'on suit également en x, y et z .

La différence de la position entre les deux billes donne une mesure directe du mouvement de la bille mobile, sans les dérives à basse fréquence du microscope. Par contre, ce suivi différentiel introduit un bruit supplémentaire à haute fréquence, lié au suivi de la bille fixe.

1.7 Mesure de force par mouvement brownien

La mesure de force, qui ne nécessite aucune calibration, se déduit de l'enregistrement des fluctuations browniennes de la bille. La bille magnétique accrochée par l'ADN est équivalente à un pendule amorti de longueur $\langle z \rangle$ (l'extension moyenne de l'ADN) pour laquelle la gravité a été remplacée par un gradient de champ magnétique (voir Fig. 1.6a).

La force de Langevin tend à déplacer la bille hors de sa position d'équilibre d'une quantité δx , générant ainsi une force de rappel $\delta F_x \approx F \delta x / \langle z \rangle \equiv k_x \delta x$, où $k_x = F / \langle z \rangle$ est la raideur transverse du système.

1.7.1 Analyse temporelle

Le théorème d'équipartition de l'énergie implique que : $k_x \langle \delta x^2 \rangle / 2 = k_B T / 2$. En conséquence la raideur k_x et donc la force F appliquée par les aimants peuvent être déduits en mesurant les fluctuations transverses $\langle \delta x^2 \rangle$ de la bille et l'extension moyenne $\langle z \rangle$ de la molécule :

$$F = \frac{k_B T \langle z \rangle}{\langle \delta x^2 \rangle} \quad (1.2)$$

Les figures 1.6b et c montrent des enregistrements typiques de z et x fonction du temps. Les histogrammes de position donnent $\langle \delta x^2 \rangle = 170 \text{ nm}$ (de telle sorte que $k_x = k_B T / \langle x^2 \rangle = 1.4 \cdot 10^{-7} \text{ N/m}$) et $\langle z \rangle = 2.75 \mu\text{m}$ donc $F = k_x \cdot \langle z \rangle = 0.38 \text{ pN}$.

L'enregistrement des fluctuations longitudinales $\langle \delta z^2 \rangle$ donne accès à la raideur dans la direction z ($k_z \equiv \partial F / \partial z$) grâce à la relation suivante :

$$\frac{1}{2} k_z \langle \delta z^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (1.3)$$

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, lorsque l'ADN est étiré notablement (par exemple à une force de l'ordre du pN), la courbe force-extension de l'ADN est non linéaire et k_z augmente de manière non linéaire avec la force.

1.7.2 Analyse fréquentielle

Bien que l'analyse des enregistrements dans l'espace réel permette de calculer la force, l'analyse par transformée de Fourier permet une étude plus complète et plus rigoureuse du mouvement de la bille.

Le spectre de puissance des fluctuations de la bille $|\delta x^2(f)|$, lorentzien, est identique à celui d'un oscillateur amorti (pour lequel on néglige le terme inertiel):

$$|\delta x^2(f)| = \frac{12\pi k_B T \eta d}{k_x^2} \frac{1}{1 + (f/f_0)^2} \quad (1.4)$$

où $f_0 = k_x / (6\pi^2 \eta d)$ est la fréquence de coupure (exprimée en Hertz). La mesure de f_0 permet d'effectuer deux tests cruciaux :

- le signal n'est pas sous-échantillonné, c'est-à-dire que la fréquence de Nyquist est bien supérieure à la fréquence de coupure $f_{\text{Nyquist}} = 25/2 \text{ Hz} \gg f_0$
- la durée d'enregistrement T est suffisamment longue pour obtenir une estimation statistiquement robuste de $\langle z \rangle$ mais surtout de $\langle \delta x^2 \rangle$. Ceci est vérifié si $f_0 T_r \gg 1$

f_0 dépend de la taille de la bille d , de la viscosité η et est proportionnelle à la raideur du système (donc à la force appliquée). En conséquence, les mesures à basse force (typiquement en dessous de 1

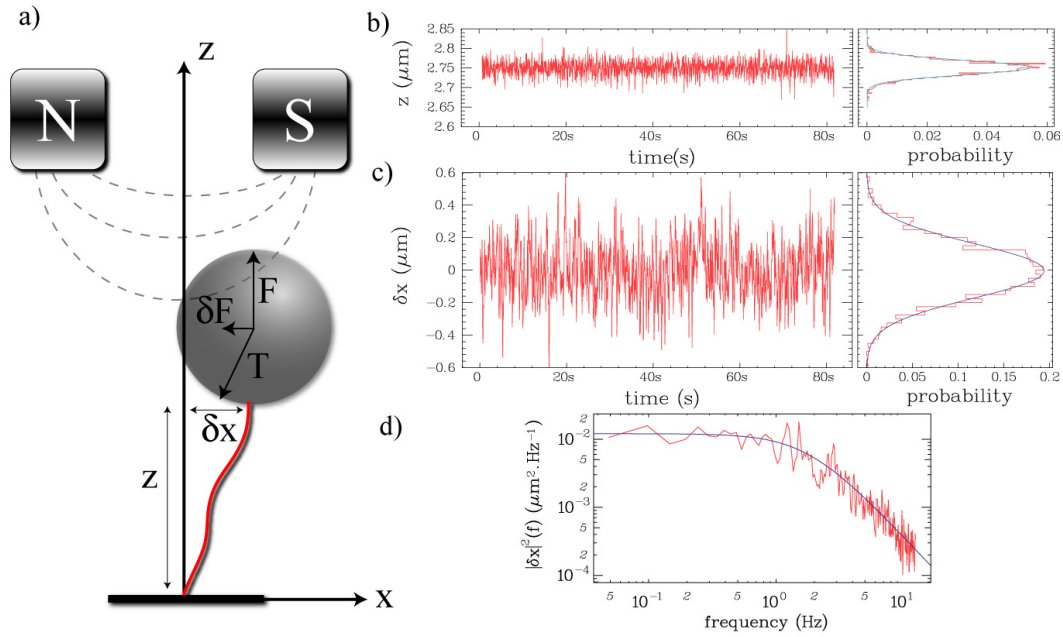


FIG. 1.6 – **Principe de la mesure de force.** a) Les fluctuations thermiques déplacent la bille hors de sa position d'équilibre, de telle sorte qu'une force de rappel $\delta F \approx F\delta x/z$ due à la force magnétique tend à la replacer à sa position initiale. b) et c) Enregistrements typiques des positions x et z de la bille en fonction du temps. Ici, $\langle z \rangle = 2.75\mu\text{m}$ et $\langle \delta x^2 \rangle = 170\text{nm}$ donc $F=0.38\text{ pN}$. d) Spectre de puissance du déplacement suivant x et ajustement par une lorentzienne $|\delta x^2|(f) = A/(f_0^2 + f^2)$. La coupure du spectre est liée à la friction de la bille dans la solution, de viscosité η . Dans le cas présent, $f_0 = 1.8\text{Hz}$. Cette mesure permet de vérifier que le signal n'est pas sous-échantillonné (c'est à dire de vérifier que la fréquence de Nyquist $f_{\text{Nyquist}} = 25/2\text{Hz} \gg f_0$), et que le temps d'enregistrement T est suffisamment long pour donner une moyenne statistiquement pertinente ($f_0 T \gg 1$). En intégrant le spectre des fluctuations, on obtient les fluctuations moyennes totales $\langle \delta x^2 \rangle$, dont on dérive la raideur puis la force appliquée à la molécule.

pN) nécessite une acquisition relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de minutes). *A contrario*, les mesures à hautes forces (au dessus de 1 pN) sont courtes mais sont d'autant plus altérés que f_0 est proche de la fréquence de Nyquist. Dans ce cas, en effet, les fluctuations de hautes fréquences sont sous-estimées par rapport à la réalité et le spectre des fluctuations est affecté par le spectre de réponse de la caméra. Connaissant celui-ci, on peut corriger celui-là et ainsi obtenir une mesure fiable de la force.

Le calcul de k_x se déduit de l'intégrale du spectre de puissance corrigé :

$$\langle \delta x^2 \rangle = 2 \int_0^\infty |\delta x^2(f)| df = 2k_B T / k_x \quad (1.5)$$

Le calcul de f_0 se déduit de l'ajustement d'une lorentzienne sur le spectre de puissance. Connaissant la viscosité η et k_x , ce calcul, outre la possibilité de vérifier les conditions précédemment exposées, permet de mesurer la taille de la bille.

Chapitre 2

Propriétés mécaniques d'une molécule unique d'ADN

Les expériences de micromanipulation de molécules uniques d'ADN (ou de protéines) ont suscité un vif intérêt ces dix dernières années parce qu'elles ont permis une validation directe et un développement considérable des modèles de polymères. Dans ce chapitre nous exposons la réponse mécanique d'une molécule unique d'ADN plus ou moins super-enroulée soumise à une force. Ceci a fait l'objet de plusieurs thèses dans le laboratoire (Térence Strick et Jean-François Allemand) et de nombreux articles depuis une dizaine d'année. Nous passerons donc brièvement en revue les résultats indispensables à la compréhension des expériences qui seront présentées plus loin.

2.1 Courbe force-extension de l'ADN

L'échelle de force pertinente pour étirer une molécule d'ADN, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, se situe entre quelques dizaines de fN et quelques centaines de pN. La combinaison des différents dispositifs décrits plus haut permet de couvrir cette large gamme de force. Cependant, il s'est avéré suffisant pour l'étude des topoisomérases de travailler entre $\simeq 0.1$ pN et $\simeq 5$ pN. La borne inférieure définit la limite acceptable de qualité du signal (rapport signal sur bruit). La limite supérieure est imposée par l'enzyme elle-même (dont l'activité cesse rapidement vers quelques pN). Nous nous contenterons de décrire le comportement de l'ADN dans ce régime limité de force.

L'étirement d'une molécule unique soumise à une force a été pour la première fois observé en 1992[110], en accrochant une molécule sur une surface de verre par une extrémité et par l'autre extrémité à une bille magnétique micrométrique. Ces expériences permettent de tracer la réponse force-extension dans le domaine entropique de l'ADN et furent étendues à des forces plus élevées quelques années après[22, 109, 65].

La figure 2.1 montre une courbe force-extension typique obtenue à l'aide des pinces magnétiques entre 50 fN et 10 pN[116].

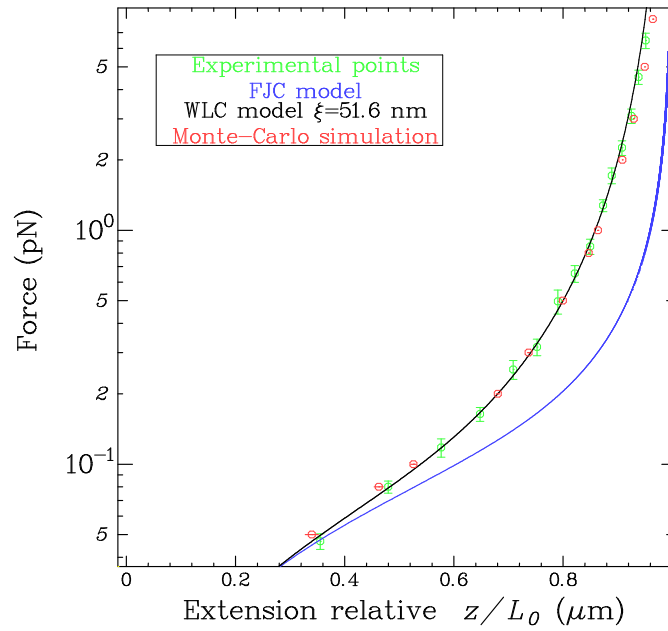


FIG. 2.1 – **Réponse force extension d'une molécule d'ADN dans son régime entropique.** Les points expérimentaux sont en vert. Les barres d'erreur représentent les erreurs statistiques. L'ajustement du modèle du ver permet d'extraire $\xi = 51.6 \pm 2$ nm (courbe en noir). La courbe bleue est le modèle de la chaîne librement jointe en prenant comme taille de segment $a = 2\xi$. Les points rouges sont le résultat d'une simulation Monte-Carlo de chaîne semi-flexible, dont les paramètres sont expliqués dans le texte. L'écart maximal à la courbe théorique est de l'ordre de 2%.

2.1.1 Quel modèle pour l'ADN?

Dans cette partie, nous introduisons les principaux modèles de polymères qui peuvent être envisagés pour décrire l'ADN. On trouvera plus de détail concernant la résolution du modèle du ver dans [120] et la théorie élastique des polymères dans [42] et [16].

2.1.1.1 La chaîne gaussienne

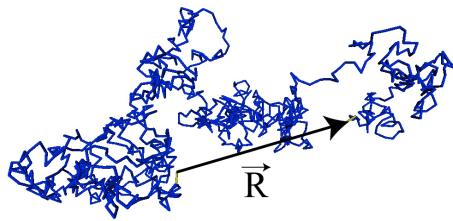


FIG. 2.2 – **Chaîne gaussienne.** Nombre de segments : $N=2000$.

la façon la plus simple de modéliser un polymère consiste à le décrire comme une suite de N segments $\vec{t}_i$ de taille a orientés de manière aléatoire. Si $N \gg 1$, le chemin suivi par le polymère est une marche aléatoire (voir figure 2.2) et la distance carrée moyenne entre extrémités vaut:

$$\langle \vec{R}_0^2 \rangle = \langle \left(\sum \vec{t}_i \right)^2 \rangle = Na^2 \quad (2.1)$$

L'entropie d'un tel système est une fonction quadratique de l'extension $\vec{R}$ (pourvu que celle-ci reste petite : $\vec{R}^2 \ll \vec{R}_0^2$):

$$S = S_0 - 3k_B \frac{\vec{R}^2}{2\langle \vec{R}_0^2 \rangle} \quad (2.2)$$

où k_B est la constante de Boltzmann. En conséquence, l'application d'une force d'étirement $\vec{F}$ entraîne une réponse linéaire de l'extension :

$$\vec{F} = -\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial \vec{R}} = -\frac{3k_B T}{\langle \vec{R}_0^2 \rangle} \vec{R} \quad (2.3)$$

où $\mathcal{F}$ est l'énergie libre du système. La chaîne se comporte donc comme un ressort entropique : l'allonger réduit le nombre de configurations accessibles et entraîne donc une force de rappel.

2.1.1.2 Le modèle de Kratky-Porod

De nombreux polymères biologiques (ADN, actine, microtubules) sont caractérisées par une certaine rigidité de courbure liée à leur structure particulière. Dans l'ADN, c'est l'interaction entre bases ("pairing") et entre paires de bases ("stacking") qui confère à la molécule sa rigidité. Une manière de décrire de telles chaînes consiste à considérer un terme énergétique quadratique lié à l'orientation relative ϕ (définie par $\cos \phi_i = \vec{t}_i \cdot \vec{t}_{i+1}$) de deux segments (de taille b) adjacents[16]:

$$E_i/k_B T = \frac{1}{2} \alpha \phi_i^2 \quad (2.4)$$

où ϕ_i est l'angle entre les deux segments i et $i+1$.

Pour une telle chaîne, l'orientation de deux segments i et j se décroît exponentiellement sur une distance ξ , qui est la longueur de persistance de l'ADN:

$$\langle \vec{t}_i \cdot \vec{t}_j \rangle = e^{-|i-j|b/\xi}$$

Lorsque $L \gg \xi$, la distance carrée moyenne vaut alors :

$$\langle \vec{R}_0^2 \rangle \simeq 2\xi L \quad (2.6)$$

Les clichés de microscopie électronique permettent d'évaluer ξ de l'ordre 50 nm, c'est-à-dire beaucoup plus grand la taille d'un monomère (i.e. une base). En conséquence, dans le modèle de la chaîne gaussienne précédemment décrit, le paramètre a doit être choisi bien plus grand que la taille d'un monomère. Plus précisément, en prenant $a = 2\xi$, on trouve une distance carrée moyenne identique à celle prédite par le modèle de Kratky-Porod.

2.1.1.3 La chaîne librement jointe (FJC)

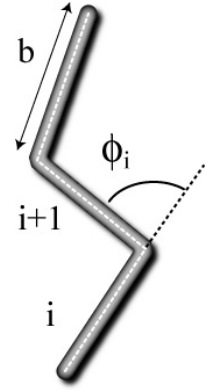


FIG. 2.3 – Chaîne de Kratky-Porod (2.5)

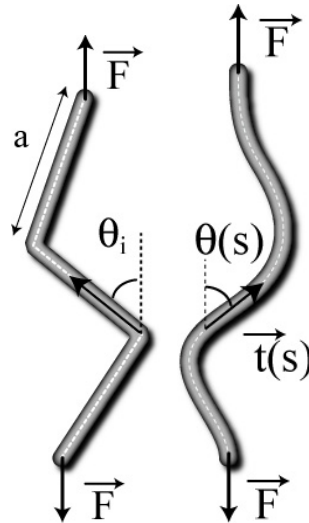


FIG. 2.4 – Description de la chaîne et le modèle FJC (orange) et WLC (bleu)

Pour des extensions importantes z de l'ordre L , le modèle de Kratky-Porod et la chaîne gaussienne ne conviennent plus, mais peuvent être étendus par le modèle de la chaîne librement jointe (FJC). En présence d'une force F dans la direction z , la fonction de partition Z d'un segment i de la chaîne s'écrit:

$$Z = \int_0^{2\pi} \exp \frac{F a_i}{k_B T} \cos \theta_i \sin \theta_i d\theta_i \quad (2.7)$$

Les N segments étant indépendants, l'énergie libre vaut $\mathcal{F} = -k_B T \ln Z^N$, d'où l'on déduit z :

$$z = -\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial F} = L_0 (\coth(x) - 1/x) \quad (2.8)$$

où $x \equiv Fa/(k_B T)$ et $L_0 \equiv Na$ est la longueur cristallographique de l'ADN.

L'accord entre ce modèle (avec $a = 2\xi$) et la courbe expérimentale (voir figure 2.1 et [110]) n'est pas très bon. L'extension prédite par le FJC est toujours plus grande que l'extension réelle. Ceci est lié au fait qu'en modélisant l'ADN par des segments indépendants de longueur 2ξ , on surestime les corrélations d'orientation.

2.1.1.4 Le modèle du ver (ou *worm-like chain* (WLC))

Le modèle du ver (ou *worm-like chain* (WLC)) affine le modèle FJC en tenant compte de la nature semi-flexible du polymère. Il s'agit d'une version continue du modèle de Kratky-Porod avec force. L'énergie de la chaîne s'écrit:

$$E_c/k_B T = \frac{\xi}{2} \int_0^L \left(\frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right)^2 ds - \frac{F}{k_B T} \int_0^L \cos \theta(s) ds \quad (2.9)$$

Marko et Siggia [78, 76] ont proposé une solution analytique du modèle du ver, basée sur une analogie avec un problème de mécanique quantique. Malheureusement, puisqu'il n'existe pas de formule analytique pour l'extension relative de l'ADN en fonction de la force, il ont proposé une formule approchée sous la forme d'une interpolation entre les comportements asymptotiques à basse et haute force. En 1999, Bouchiat *et al.* [12] ont affiné leur expression en ajoutant une correction polynômiale, qui donne une approximation meilleure que 0.1%:

$$F\xi/(k_B T) = x - \frac{1}{4} + \frac{1}{4(1-x)^2} + \sum_{i=2}^7 a_i x^i \quad (2.10)$$

avec $a_2 = -0.5164228$, $a_3 = -2.737418$, $a_4 = -16.07497$, $a_5 = -38.87607$, $a_6 = 39.49944$, $a_7 = -14.17718$ et $x \equiv z > /L$.

Ce modèle donne un bon accord avec les courbes expérimentales, bien meilleur que le FJC (voir figure 2.1). Il permet d'obtenir une estimation très précise de la longueur de persistance $\xi = 51.6 \pm 2$ nm dans des conditions à peu près physiologiques (tampon phosphate 10mM (PB) (pH = 8.0), 100mM NaCl).

2.1.2 Simulation Monte-Carlo d'une chaîne semi-flexible

La courbe force-extension d'une molécule d'ADN peut également être obtenue à partir d'une simulation Monte-Carlo d'une chaîne semi-flexible[135]. La figure 2.1 montre le résultat obtenu à partir d'une chaîne de 10 longueurs de Kuhn $l_K \equiv 2\xi$ (avec $l_K = 102.6$ nm) sans imposer de murs aux extrémités de la molécule. Les détails concernant la simulation se trouvent dans l'annexe C. L'extension est moyennée sur $N_c = 5.10^6$ configurations. L'écart maximal trouvé entre les points numériques et

la courbe théorique du modèle du ver est de l'ordre de 2%. Les écarts les plus importants sont à basse force (≈ 0.1 pN) et à haute force ($> 2 - 3$ pN). L'écart à basse force est due à l'erreur statistique (augmenter le nombre d'itérations N_c réduirait l'erreur). L'écart à haute force est dû à un mauvais échantillonnage de la molécule (pas assez de segments par longueur de Kuhn, voir l'annexe C)[135].

La courbe force-extension d'une molécule unique obtenue par simulation numérique nous permet de tester la validité de notre algorithme sur une situation connue.

2.2 L'ADN étiré sous torsion

Les pinces magnétiques nous permettent de changer la direction du champ magnétique et donc d'imposer une rotation de n tours de la bille. En conséquence, nous pouvons changer l'indice d'enlacement de la molécule d'ADN ($\Delta Lk = n$). Le comportement d'une molécule micromanipulée sous torsion ayant été largement décrit [117, 116], nous ne rappellerons que les idées essentielles. Ces expériences ont permis, entre autres, de découvrir des transitions structurales induites par le couple, et aussi de mesurer précisément le module de torsion $\mathcal{C}$ de la molécule d'ADN (voir l'article de revue en annexe qui y est consacré), dont la valeur précise reste discutée.

La figure 2.5a) montre l'extension d'une molécule unique d'ADN (de 48kb) en fonction du nombre de tours n appliqués (à une force $F = 1.2$ pN). On observe deux régimes : lorsque n est plus petit qu'une certaine valeur n_b (qui augmente avec F), l'extension varie peu. Passé ce seuil, elle varie à peu près linéairement avec n .

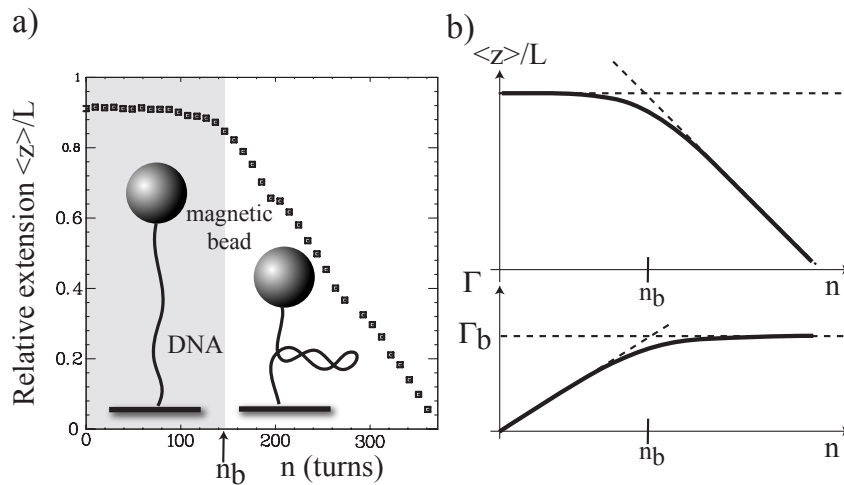


FIG. 2.5 – Extension de l'ADN en fonction du nombre de tours appliqués n pour une molécule d'ADN. a) Les points expérimentaux montrent l'extension normalisée de l'ADN en fonction n pour une molécule de 48kb étiré à 1.2 pN. Pour $n < n_b$, le changement en extension est petit, et la molécule accumule de l'énergie de torsion. Vers $n = n_b \approx 140$, la molécule flambe et commence à former des plectonèmes. Après le flambage, l'extension décroît linéairement avec n . b) Comme pour un tube, le couple augmente linéairement avec le nombre de tour dans un premier temps $n < n_b$. Pour $n = n_b$ former une boucle coûte moins cher que d'augmenter l'énergie de torsion : la molécule flambe et le couple reste constant lors de l'ajout de tours supplémentaires. Figure tirée de [21], d'après les expériences de T.R. Strick et J.-F. Allemand

2.2.1 Modèle simple de l'instabilité de flambage

La courbe de la figure 2.5a) est facile à comprendre en considérant la torsion d'un tube auquel on applique une force F (voir figure 2.5b). Dans un premier temps, l'augmentation du nombre de tours n conduit à une augmentation du couple Γ : $\Gamma = 2\pi nC/L$, mais l'extension z de l'ADN ne change pas. L'énergie de torsion augmente ainsi quadratiquement avec n .

Après un certain nombre de tours n_b , le couple Γ devient si grand qu'il coûte moins cher en énergie de former une boucle de taille R que de continuer à augmenter l'énergie de torsion : le tube flambe.

La formation d'une boucle implique deux termes énergétiques. D'abord, l'énergie de courbure nécessaire pour former une boucle de rayon R et de longueur $2\pi R$: $E_{bending} = 2\pi RB/(2R^2)$. Ensuite, le travail contre la force: $W = 2\pi RF$. En effectuant un bilan énergétique lors de la formation de la boucle, on obtient :

$$2\pi\Gamma_b = 2\pi R \frac{B}{2R^2} + 2\pi RF \quad (2.11)$$

où Γ_b est le couple critique de flambage.

Le rayon qui minimise le terme de droite est donné par $R = \sqrt{B/2F}$, de telle sorte que $\Gamma_b = \sqrt{2BF}$, $n_b = L\sqrt{2BF}/(2\pi C)$.

Ainsi, plus la force est grande, plus le couple critique et n_b augmentent, et plus le rayon de la boucle diminue. Après la transition de flambage, le tube s'enroule autour de lui-même mais le couple reste constant. Dès lors, l'augmentation de n (ou ΔLk) conduit à l'augmentation de la vrille Wr , alors que la torsade Tw ne change plus.

Ce modèle décrit au moins qualitativement le comportement de l'ADN sous torsion. Cependant, il prévoit une transition brutale de flambage lorsque le couple atteint sa valeur critique. En pratique, les fluctuations thermiques, qui ne sont prises en compte dans le modèle, adoucissent la transition, en particulier à basse force.

La figure 2.6 montre comment n_b et la pente moyenne des chapeaux $d\langle z \rangle/dn \approx 2\pi R$ varient avec F pour une molécule de 48kb. L'accord avec le simple modèle de flambage est assez bon.

De la même manière que tirer sur une molécule d'ADN super-enroulée augmente le couple dans la molécule, introduire n_0 tours dans une molécule d'ADN circulaire induit une tension F_0 de la molécule. Cette tension est égale à la force à laquelle les extrémités d'une molécule étirée se rejoignent ($\langle z \rangle = 0$). Dans ce cas, un ADN linéaire super-enroulé est équivalent à un ADN circulaire. Pour une force donnée F_0 , nous avons mesuré le nombre de tours n_0 nécessaire pour amener à zéro l'extension de la molécule (voir figure 2.6). Le modèle décrit plus haut permet d'estimer n_0 . De $z(n_0) = L - 2\pi R(n_0 - n_b) = 0$, on déduit :

$$n_0 = \frac{L}{2\pi} \left(\frac{1}{B} + \frac{1}{C} \right) \sqrt{2BF} \quad (2.12)$$

Il y a un bon accord avec les données expérimentales, comme le montre la figure 2.6b), en faisant l'hypothèse que $C \equiv C/k_B T = 86$ nm (voir [21] pour une revue sur la mesure de C). Nous pouvons ainsi déduire que la force induite par le super-enroulement dans un plasmide ($\sigma = -0.06$) est ≈ 0.6 pN. A ces valeurs de force et de super-enroulement, la molécule peut se dénaturer (voir la section 2.2.5) et permettre ainsi *in vivo* des processus enzymatiques comme la transcription de l'ADN[93].

Ce modèle simple de flambage prédit aussi que le rapport $\Delta Tw/Wr$ dans un plasmide est à peu près indépendant de σ : $\Delta Tw/Wr = n_b/(n_0 - n_b) = B/C \sim 0.5$, ce qui n'est pas loin de la valeur estimée à partir de clichés de microscopie électronique[10].

Si ce modèle décrit qualitativement assez bien le comportement de l'ADN, un traitement statistique est nécessaire pour aborder quantitativement le problème[77, 12].

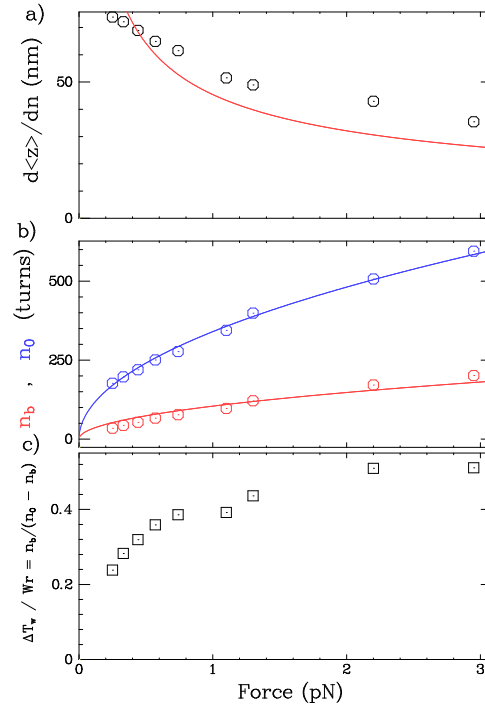


FIG. 2.6 – **Variation avec la force** : du nombre de tours au moment du flambage n_b , de la pente de la courbe extension-rotation: $d\langle z \rangle / dn$ après le flambage, du nombre de tours nécessaire pour amener la molécule au sol n_0 ($\langle z \rangle = 0$) et du rapport $\Delta T_w / W r$. Les courbes ont été obtenues à partir d'une molécule d'ADN de λ -DNA ($Lk_0 = 4360$) à différentes forces. a) La pente $s \equiv d\langle z \rangle / dn$ après l'instabilité de flambage (points noirs) décroît avec la force appliquée F . L'ajustement de la courbe par le modèle du flambage donne un bon accord ($s = AF^{-0.5}$): on obtient $A = 45$, qui est proche de la valeur prédite: $2\pi\sqrt{B/2} \approx 60$ (avec $B = k_B T \xi$ et $\xi = 50\text{nm}$); b) Variation avec la force de n_b (points rouges) et n_0 (points bleus). Le modèle a été ajusté aux données ($n_{b,0} = A_{b,0}F^{0.5}$): $A_0 = 340$ et $A_b = 104$; ce qui est en bon accord avec les valeurs prédites: $A_0 = 380$ et $A_b = 140$. Comme la transition de flambage n'est pas très abrupte, l'estimation de n_b à partir des courbes n'a pas pu être faite à mieux que 20%. Par contre, les erreurs sur n_0 sont plus petites que la taille des symboles. c) Estimation du rapport $\Delta T_w / W r$ à partir des mesures de n_b et n_0 à différentes forces. Figure tirée de [21], après analyse d'expériences de T.R. Strick et J.-F. Allemand

2.2.2 Modèles statistiques pour le super-enroulement de l'ADN

Plusieurs approches ont été employées pour décrire le comportement de l'ADN étiré sous torsion. John Marko [73] a développé un formalisme de mécanique statistique pour calculer l'énergie libre d'une molécule d'ADN composée d'une portion p de chaîne semi-flexible solénoïdal, le reste de la chaîne ($1 - p$) étant une structure super-enroulée (plectonèmes). Une minimisation de l'énergie par rapport à p permet d'obtenir les courbes force-extension pour différentes valeurs de super-enroulement. Un bon accord est trouvé pour une valeur de $C = 75\text{ nm}$.

Une autre approche consiste à étendre le modèle du ver en ajoutant dans l'énergie un terme lié à la torsion (modèle du ruban ou *Rod Like Chain* (ROC)) :

$$E_{RLC} = E_{WLC} + \frac{C}{2} \int_0^L \Omega^2(s) ds \quad (2.13)$$

où $\Omega(s)$ est la torsade locale dans la chaîne. La solution de ce modèle peut être trouvée dans [11, 84]. Un très bon accord est trouvé avec les courbes forces extension-rotation, en prenant $C=86\text{nm}$ pour [11] ou $C=110\text{nm}$ pour [83], qui n'utilisent pas la même méthode de résolution.

Un problème majeur de ces approches est qu'elle néglige l'auto-évitement de la chaîne. Or, comme nous le verrons avec les simulations numériques, c'est un paramètre qui peut influencer pour des structures super-enroulées compactes.

2.2.3 Influence de la concentration ionique sur les courbes extension-rotation

La concentration et la nature ionique de la solution entraîne des modifications importantes de la structure et du comportement élastique de la molécule d'ADN. La concentration totale des cations joue sur la longueur de Debye, c'est-à-dire la distance typique d'écrantage des charges. En dessous d'une concentration de 1mM de cation monovalent, les répulsions électrostatiques dans l'ADN deviennent très importantes, ce qui augmente la longueur de persistance. Au dessus de 1 mM, la longueur de persistance reste à peu près constante $\approx 50nm$.

Si le sel n'influence que très légèrement les propriétés d'élasticité en traction de l'ADN au dessus de 1 mM, il modifie notablement la réponse de l'ADN en torsion. D'une part, il change le pas hélical de l'ADN, et donc sa torsade spontanée $Tw0$. D'autre part, il modifie le "diamètre effectif" et donc le volume exclu de la molécule. Cela a un effet important sur les molécules super-enroulées.

La grande sensibilité des expériences de micromanipulation permet de quantifier ces effets de manière remarquable.

2.2.3.1 Modification de la torsade spontanée $Tw0$

La torsade spontanée $Tw0$ est affectée par la concentration en sel de la solution. En particulier, les ions divalents, comme le magnésium s'intercalent dans le petit sillon de l'ADN et favorisent la diminution du pas hélical. La figure 2.7 montre des courbes extension-super-enroulement réalisées dans deux conditions salines différentes sur une molécule d'ADN de 11 kb: un tampon phosphate à 10 mM et le tampon de réaction de la topo 4: 25 mM Tris HCl (pH = 7.6), 100 mM glutamate de potassium, 10 mM $MgCl_2$. Les deux séries de courbes sont réalisées à 0.1 et 0.25 pN.

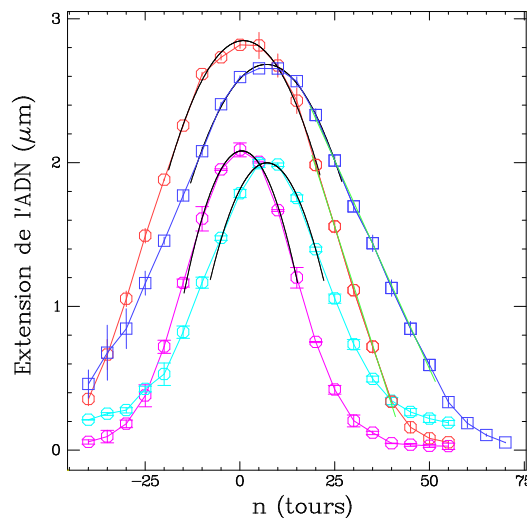


FIG. 2.7 – **Déplacement du zéro de rotation en fonction de la concentration ionique du tampon..** Courbe extension-rotation réalisée à différentes forces et dans deux tampons différents sur des molécule de 11 kb: les points rouges et mauve sont réalisés dans 10 mM de tampon phosphate à pH 8. Les points bleu turquoise et bleu foncé sont faits dans le tampon de réaction de la topo 4 (voir annexe B). Les forces sont de 0.1pN (rouge, bleu) et 0.25 pN (bleu turquoise, magenta). Les courbes sont ajustées par des paraboles pour en déterminer le zéro de rotation. La partie linéaire des courbes est aussi ajustée pour calculer la pente, voir figure 2.8

Le "zéro de rotation" (correspondant à $\Delta Lk = 0$) est estimé en ajustant un morceau de parabole sur la partie supérieure des courbes. Les courbes laissent apparaître une différence appréciable d'état d'enroulement spontané ΔTw_0 entre les deux conditions salines. Ces différences sont mesurées à plusieurs forces et résumées dans le tableau 2.1.

Force (pN)	ΔTw_0
0.05	6.9
0.1	6.6
0.25	6

TAB. 2.1 – Différence de torsade spontanée pour une molécule unique d'ADN de 1 kb entre un tampon phosphate 10 mM et le tampon de réaction de la topo 4 (voir annexe B). Données obtenues à partir de la figure 2.7

On obtient en moyenne une variation $\Delta Tw \approx 6.5$. Cette valeur, facile à mettre en évidence avec notre dispositif, n'en demeure pas moins très faible comparé à la torsade totale d'une molécule de 11 kb, i.e. ≈ 1050 tours. Cette valeur est en très bon accord avec des expériences précédentes dans conditions ioniques comparables[101].

2.2.3.2 Modification de la pente des courbes extension-superenroulement

La figure 2.8 met en évidence le fait que les pentes des courbes extension-rotation est significativement plus faible dans le tampon de la topo 4 par rapport au tampon phosphate à 10 mM.

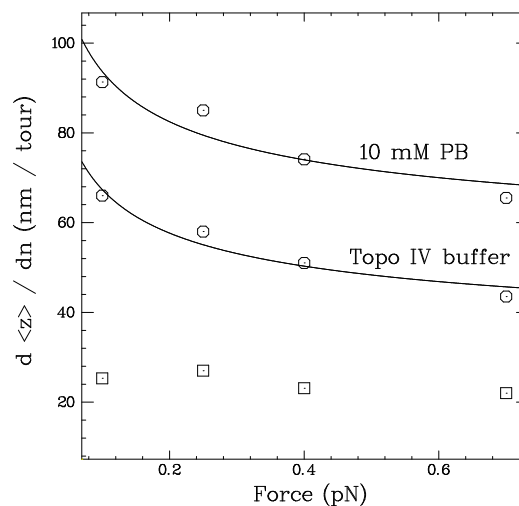


FIG. 2.8 – Pente des courbes extension-rotation en fonction de la force, dans différents tampons, obtenues à partir de l'étude de molécules de 11 kb. En haut, les points expérimentaux représentent les pentes obtenues dans le tampon phosphate à 10 mM ; au milieu, les pentes obtenues dans le tampon de la topo 4 (voir annexe B). Les points en bas représentent la différence entre les deux courbes précédentes. Les deux courbes expérimentales sont ajustées par la fonction : $y = ax^{-0.4} + b$. (Le modèle classique présenté plus haut fait intervenir une puissance -0.5. La puissance -0.4 est obtenue numériquement à partir des courbes du modèle RLC[11]). Notez que la différence entre les deux courbes est quasi-constante (a vaut respectivement 18.3 et 16.0 dans 10 mM PB et dans le tampon de la topo 4). Cette différence est liée à la répulsion électrostatique importante dans 10 mM PB : le diamètre effectif de l'ADN[100, 101] est plus important et la taille des structures superenroulées est plus grande.

La différence entre les courbes obtenues dans les deux tampons est quasiment indépendante de la force. Cette différence, d'environ 20 nm/tour, illustre la différence de répulsion électrostatique entre les deux tampons : celle-ci a un effet important sur la taille moyenne des structures super-enroulées. Ce paramètre n'est pas pris en compte dans le modèle RLC[12, 77], mais il l'est dans les simulations numériques [131] et dans le modèle de Marko[73], comme nous allons le voir dans la section suivante. Cependant, différence importante que nous observons n'est pas due uniquement au changement de concentration. La nature des ions est aussi très importante : la présence d'ion divalent (Mg^{2+}) modifie particulièrement les propriétés d'élasticité en torsion de l'ADN[101].

2.2.3.3 Modification du nombre de tours critique de flambage

La figure 2.9 montre les courbes extension-rotation obtenues dans 10 mM PB (en rouge) et dans le tampon de la topo 4 à 0.7 pN (en bleu). Cette dernière a été décalée de $\Delta Tw = -6$ pour supprimer la variation de torsade précédemment évoquée. Ainsi on peut comparer directement le nombre de tours critique de flambage n_b dans les deux tampons.

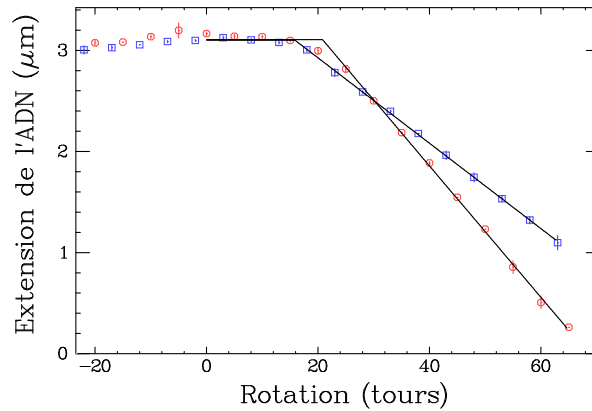


FIG. 2.9 – Courbe extension-rotation à 0.7 pN dans 10 mM PB (points rouges) et dans le tampon de la topo 4 (points bleus) sur une molécule de 11 kb. L'ajustement de morceaux de droite permet d'estimer le nombre de tour critique au flambage n_b .

L'ajustement de deux morceaux de droite sur les courbes extension-rotation permettent d'estimer : $n_b = 20.8$ dans 10 mM PB et $n_b = 15.8$ dans le tampon de la topo 4. Cette observation montre que les répulsions électrostatiques jouent un rôle dans la transition de flambage de l'ADN super-enroulé, en déstabilisant la formation de la première boucle plectonémique.

2.2.4 Simulation Monte-Carlo d'une molécule d'ADN super-enroulé

Les courbes expérimentales force-extension à différentes valeurs de σ peuvent être reproduites par simulation numérique MC[131]. A partir de la simulation de chaîne semi-flexible décrite plus haut, la méthode consiste à ajouter dans l'énergie un terme élastique de torsion :

$$E = E_{semi-flexible} + 2\pi^2 \frac{C}{L} (\Delta Tw)^2 \quad (2.14)$$

Pour un ΔLk fixé, le calcul de la vrille à chaque itération (voir annexe C) permet de déduire la variation de torsade $\Delta Tw = \Delta Lk - Wr$ et donc l'énergie de torsion. Cette méthode, mise au point par Vologodskii et Marko[131] a permis de tracer les courbes force-extension pour différentes valeurs de σ , et de les comparer aux données expérimentales [117]. Notons que, en toute rigueur, le terme

énergétique de torsion introduit plus haut correspond au cas d'une molécule uniformément déformée, ce qui n'est a priori pas le cas d'une molécule d'ADN sous torsion. Cependant, les fluctuations de torsade autour de la valeur moyenne ne dépendent pas de la torsade Tw ; en conséquence, leur contribution énergétique ne dépend pas du degré de super-enroulement. C'est un terme constant que l'on peut omettre dans le calcul de l'énergie[131].

Les interactions électrostatiques dans la molécule d'ADN sont pris en compte en utilisant la notion de diamètre effectif de l'ADN : l'ADN est modélisé comme une suite de cylindre durs impénétrables de diamètre d . Celui-ci reflète le diamètre cristallographique de l'ADN, mais aussi la distance typique d'écrantage des charges[114]. Il varie donc en fonction de la concentration saline (voir annexe C).

Les simulations de Vologodskii *et al.* ont été faites en utilisant un diamètre effectif pour l'ADN $d=11$ nm[101], qui correspond à une concentration saline de 20 mM PB. Outre la description des configurations des molécules d'ADN étirées et contraintes en torsion, cette simulation permet en d'estimer le module de torsion C de l'ADN. La figure 2.10 montre des simulations obtenues par Vologodskii *et al.* pour différentes valeurs : $C = C/(k_bT) = 50, 75$ ou 100 nm, et la courbe force-extension expérimentale obtenue dans 10 mM de sel monovalent[117]. Le meilleur accord est trouvé pour un module de torsion de 75nm lorsque $\sigma = 0.031$. La discordance pour les extensions faibles provient du fait que la molécule est contrainte entre deux "murs" à ses extrémités (voir l'annexe "C"). Pour d'autres valeurs de la densité de super-enroulement, l'accord est moins bon.

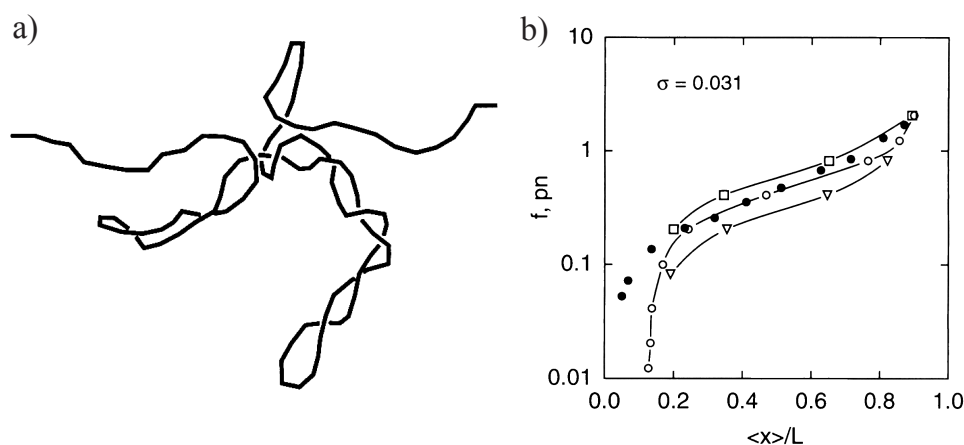


FIG. 2.10 – **Simulations numériques d'ADN étiré sous torsion.** a) Conformation typique d'une molécule de 10 longueurs de Kuhn dans 200mM de sel monovalent. b) Courbes force-extension obtenue à $\sigma = 0.031$. Les symboles noirs sont les points expérimentaux tirés de [117]. Les autres symboles correspondent aux simulations numériques en prenant $C=50$ nm(triangle), 75 nm (cercles), 100 nm (carrés). Figure tirée de [131]

Nous avons refait des simulations de molécules d'ADN étirées et super-enroulées pour les raisons suivantes : d'abord, des expériences plus récentes [116] ont donné des résultats expérimentaux plus précis que la publication originale[117]. Nous avons ainsi à notre disposition un grand nombre de courbes force-extension et extension-rotation. Ces courbes permettent d'obtenir une estimation relativement précise de C .

Ensuite, nous avons voulu tester l'influence du diamètre effectif sur les résultats numériques : Vologodskii et Marko semblent ne pas voir de grande différence entre 20 mM ($d=11$ nm) et 200 mM ($d=5$ nm) pour les faibles valeurs de super-enroulement[131]. Pourtant, expérimentalement, nous avons vu que la concentration saline change notablement les courbes d'élasticité de molécules super-enroulées. Le module de torsion C change-t-il lorsque la concentration saline varie?

Enfin, relevons aussi le fait que les courbes de Strick et al[117] ont été faites dans 10 mM ($d=15$ nm), alors que les simulation de Vologodskii et Marko ont été faite pour une concentration de 20 mM ($d=11$ nm).

2.2.4.1 Estimation de la constante de torsion

Nous avons simulé les courbes extension-rotation obtenues dans 10 mM en utilisant un diamètre effectif de 15nm (voir [100] et l'annexe C). La figure 2.11 compare les expériences (réalisées à $F=0.33$ pN dans 10 mM PB) et les résultats numériques obtenus en prenant trois valeurs de C différentes : 80 nm , 100 nm, et 120 nm. L'extension est moyennée sur 3.10^6 configurations.

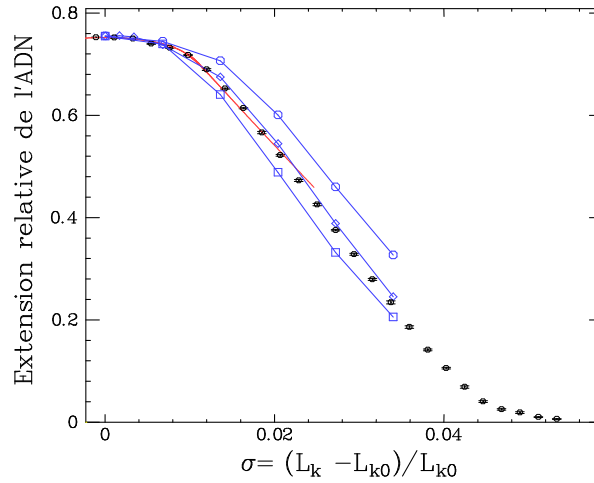


FIG. 2.11 – **Simulation numériques des courbes extension-rotation et comparaison aux résultats expérimentaux.** Les points en noir (et les barres d'erreur) sont les résultats expérimentaux obtenus à $F=0.33$ pN dans 10 mM PB. La ligne rouge est la courbe obtenue par ajustement du modèle RLC avec $C=86$ nm [11]. Les autres points sont obtenus par simulation numériques pour les valeurs de suivantes : $C=80$ nm (cercles bleus), $C=100$ nm (diamants bleus), $C=120$ nm (carrés bleus) en prenant $d = 15$ nm (correspondant à 10 mM PB[100]). L'erreur statistique sur la valeur moyenne de l'extension relative obtenue par simulation est inférieure à 0.005.

Un bon accord est trouvé pour $C = 100$ nm. L'écart à la courbe expérimentale est très sensible à la valeur de C . Dans, la suite, nous avons gardé $C = 100$ nm.

2.2.4.2 Courbes extension-rotation et force-extension

Nous avons testé l'accord entre les courbes expérimentales et les simulations pour différentes conditions de force et de super-enroulement (voir figure 2.12) en prenant $C = 100$ nm. On trouve globalement un bon accord pour des forces $F < 2$ pN et des $\sigma < 0.05$. Au dessus de ces valeurs, l'extension de l'ADN mesurée expérimentalement est systématiquement et significativement plus faible que celle donnée par les simulations. Cela peut-être dû au fait que l'approximation harmonique ne soit plus valable pour l'ADN, ce qui peut-être justifié par l'existence des transitions de phases vers l'ADN-P (voir plus loin).

2.2.4.3 Effet du diamètre effectif de l'ADN

Nous avons effectué des simulations de courbes extension-rotation pour une valeur $d = 5$ nm qui correspond à 200 mM de sel, c'est-à-dire la concentration typique à laquelle nous faisons les réactions

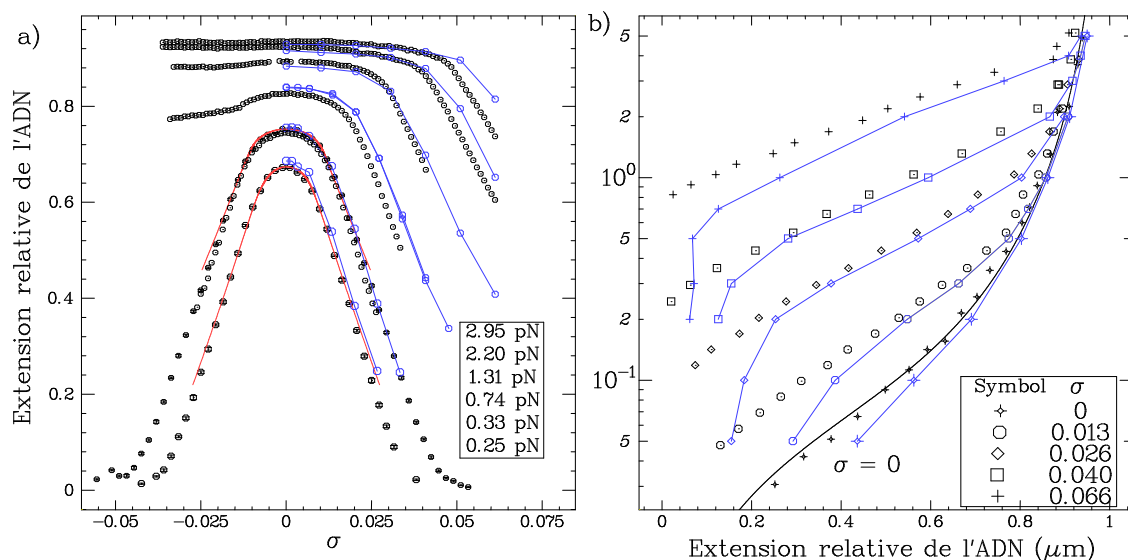


FIG. 2.12 – **Simulation numériques des courbes extension-rotation force-extension et comparaison aux résultats expérimentaux.** a) Courbes extension-rotation. Les points noirs représentent les résultats expérimentaux obtenus à différentes forces (données non publiées du laboratoire). Les points bleus reliés sont les résultats de la simulation numérique en prenant $C = 100$ nm et $d = 15$ nm; Les courbes rouges sont les ajustements du modèle RLC avec $C = 86$ nm. b) Courbes force-extension pour différentes valeurs de σ . Les points blancs sont tirées des expériences de Strick et al.[116]. Les courbes de couleur représentent les résultats de simulations numériques avec les mêmes paramètres que pour les courbes extension-rotation. Les déviations observées par rapport aux courbes expérimentales à basse extension sont dues aux murs imposés de part et d'autre de la molécule.

enzymatiques. La figure 2.13 montre les résultats obtenus à trois forces différentes (en rouge) : 0.2 pN, 0.33 pN, et 1.3 pN, et la comparaison avec les simulations pour $d = 15$ nm (correspondant à 10 mM PB, en bleu) et les données expérimentales dans 10 mM PB.

Les courbes sont quasiment superposables à basse force (0.2 et 0.33 pN). Ceci peut s'expliquer par le fait que les structures plectonémiques sont très lâches dans ce régime. En conséquence, l'effet de volume exclu joue peu. Pourtant, même dans ces gammes de force, les données expérimentales montrent des variations importantes de la pente suivant le tampon utilisé.

A plus haute force ($F > 0.74$ pN), les courbes extension-rotation obtenues par simulation ne sont plus tout-à-fait superposables : l'ADN flambe plus vite lorsque $d = 5$ nm (correspondant à 200 mM de sel) que pour $d = 15$ nm, ce qui est cohérent avec ce qui est observé expérimentalement. Ceci peut s'interpréter par le fait que, pour une force ionique importante les super-hélices d'ADN peuvent être plus compactes, ce qui diminue l'énergie libre de super-enroulement [131]. Ainsi, une force plus importante est nécessaire pour observer la même extension qu'à faible force ionique. Cependant, à nouveau, la pente des courbes extension-rotation pour $d = 5$ nm et $d = 15$ nm ne montrent pas de différence appréciable, ce qui est contraire aux résultats expérimentaux.

Il existe deux explications possibles pour comprendre les différences entre les simulations numériques et les résultats expérimentaux. Premièrement, la présence de l'ion magnésium dans le tampon de la topo 4 affecte les propriétés élastiques de la molécule d'ADN. Il est possible qu'il change le module de torsion de la molécule d'ADN. Pour tester cette hypothèse, il faudrait mesurer les variations de pente en fonction de la concentration saline pour des sels monovalents uniquement. Deuxièmement, il est possible que le fait d'utiliser un modèle de type "cylindre dure" pour décrire la molécule d'ADN soit trop simpliste. Il pourrait être intéressant de calculer les effets électrostatiques en utilisant

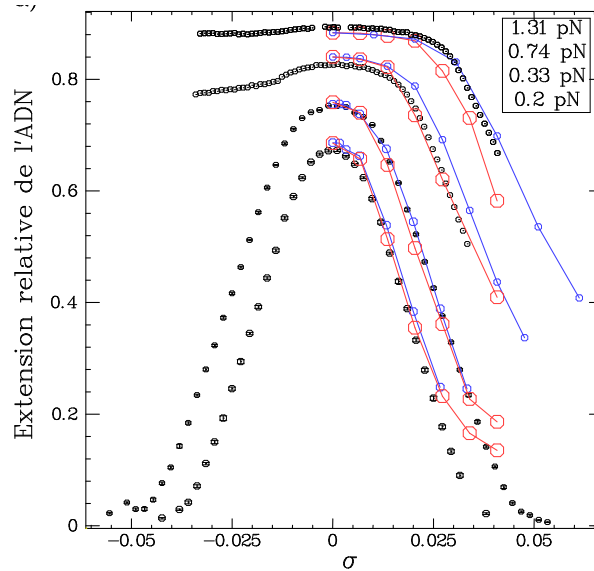


FIG. 2.13 – **Variations des résultats avec d .** Sont représentées les simulations numériques obtenues pour $d = 5\text{ nm}$ (points rouges) et $d = 15\text{ nm}$ (points bleus), superposées aux données expérimentales dans 10 mM PB [116].

un "vrai" potentiel électrostatique.

2.2.5 Transition induite par le couple

La description mécanique du modèle de flambage, qui ne tient pas compte de la structure de l'ADN, est qualitativement correcte dans une domaine de force ($F < 0.5\text{ pN}$) et de couple limité. Dans ce régime, la réponse de l'ADN ne dépend pas du signe de n , comme le montre la courbe rouge sur la figure 2.14.

A des forces plus élevées, on observe une asymétrie du comportement de l'ADN que l'on peut interpréter par la dénaturation locale de la structure en double-hélice. Au dessus de 0.5 pN , le couple d'ouverture de la double hélice $\Gamma_d \sim 9\text{ pN.nm}$ [118, 13] devient inférieur au couple de formation des plectonèmes, Γ_b , qui augmente avec la force (voir plus haut). Ainsi, chaque tour négatif induit le désappariement d'en moyenne 10.5 paires de bases [2, 116]. Des bulles de dénaturation apparaissent dans la molécule, en particulier dans les régions riches en A-T [119].

Un comportement similaire est observé lorsqu'on super-enroule positivement l'ADN à des forces $F > 3\text{ pN}$. Il se produit, pour une valeur du couple $\Gamma_p \sim 34\text{ pN.nm}$ [13], la formation d'une structure locale d'ADN appelé ADN-P [2], caractérisé par un pas beaucoup plus petit que celui de l'ADN-B (environ 2.6 bp par tour). Des simulations numériques de structure [2] ont montré que l'ADN caractérisé par une hélice droite dont le squelette phosphate se trouve au centre, et les bases à l'extérieur de la structure (voir figure 2.14).

2.3 Intérêt pour l'étude des topoisomérases

Ces résultats montrent que la structure et la géométrie de l'ADN sont grandement affectées par la torsion qu'on lui applique. Cependant, dans des conditions physiologiques, il semble qu'il se comporte de manière élastique.

Dans ce régime, l'extension de la molécule d'ADN, à une force donnée, est directement reliée à n ($\equiv \Delta Lk$). Nous pouvons imposer et mesurer en permanence l'état de super-enroulement d'une mo-

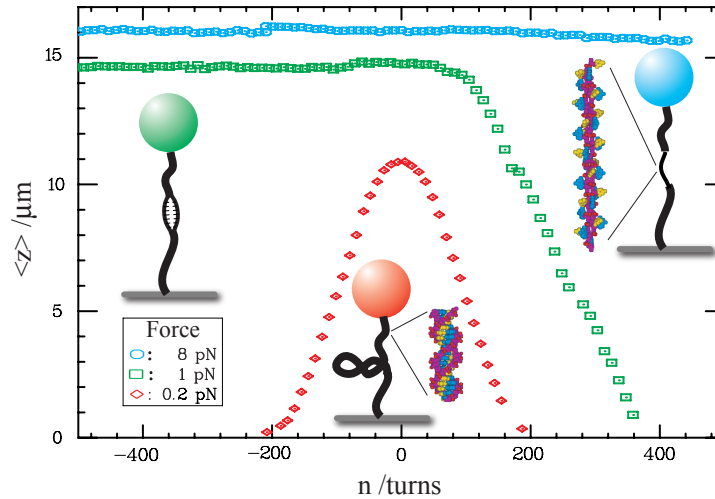


FIG. 2.14 – **Extension en fonction de la densité de super-enroulement à différentes forces (ADN 48 kb).** Points rouges : $F = 0.2 \text{ pN}$. L'extension décroît symétriquement pour $n > 0$ et $n < 0$. La molécule forme des plectonèmes. Points verts : $F = 1.2 \text{ pN}$. L'extension diminue lorsque $n > 0$ mais reste constante pour $n < 0$. De ce côté-ci, l'ADN se dénature localement et forme des bulles simple brin. Points bleus : $F = 8 \text{ pN}$. L'extension de l'ADN ne varie pas beaucoup dans le domaine dessiné. L'ADN forme localement des structures appelés ADN-P[2]. Figure tirée de [21], d'après des expériences de J.-F. Allemand et T.R Strick.

lécule d'ADN. Cela en fait un dispositif idéal pour l'étude en molécule unique des topoisomérases, qui sont les enzymes qui contrôlent la topologie des molécules d'ADN.

Chapitre 3

Caténation de deux molécules d'ADN

L'étude d'une molécule unique d'ADN sous torsion a été largement étudiée au cours des dix dernières années. Le comportement de l'ADN sous l'action d'une force et d'une contrainte de torsion est désormais bien compris. Beaucoup moins de travaux ont été effectués concernant la micromanipulation de deux molécules d'ADN caténées (ou "tresses" d'ADN, *DNA braids* en anglais), c'est-à-dire s'enroulant l'une autour de l'autre : les premières expériences réalisées sur des molécules de 50 kb[116] se sont avérées difficiles à interpréter. Des travaux théoriques de J. Marko[73, 75], ont jeté les bases d'une description analytique des caténanes. Par ailleurs, Vologodskii *et al.*[132] et Marko (non publié) ont réalisé des simulations Monte-Carlo de caténanes.

Etudier des molécules d'ADN caténées présente un intérêt biologique : la réplication génère des molécules d'ADN qui s'enroulent naturellement l'une autour de l'autre. Les caténanes sont un substrat privilégié pour les topoisomérases de type II, au même titre que les supertours. Cependant, des différences existent entre la relaxation des supertours et des tresses d'ADN, comme nous le verrons dans la partie consacrée à l'étude des topoisomérases.

Pour bien interpréter la relaxation des caténanes par les topoisomérases, il est indispensable d'avoir une bonne compréhension de la mécanique de la caténation. Dans ce chapitre, nous étudions la caténation par micromanipulation de deux molécules d'ADN nickées (qui ont une cassure simple-brin). Le tressage des deux molécules entraîne la formation d'une structure hélicoïdale qui fait diminuer l'extension du système. Cette variation de l'extension est bien décrite par un modèle géométrique simple. A haut degré de caténation, la tresse forme à son tour du super-enroulement. Nous avons effectué des simulations Monte-Carlo de tresses qui reproduisent les résultats expérimentaux, sans autre paramètre que le diamètre effectif de la molécule d'ADN.

3.1 Micromanipuler une, deux molécules ou plus

Dans les conditions typiques d'expérience, un mélange de bille et de molécules d'ADN avec un ratio 1:1 est introduit dans le capillaire. Si la cinétique d'accrochage entre bille et ADN est relativement rapide (l'incubation des billes avec l'ADN est en général de 5 minutes), le rendement d'accrochage est pourtant relativement faible, de sorte que chaque bille accrochée à de l'ADN est presque exclusivement accrochée par une seule molécule. Ceci est facilement vérifiable en traçant la courbe force-extension à $\sigma = 0$ qui doit donner une longueur de persistance $\xi \approx 50$ nm.

En utilisant un ratio ADN/bille de 5:1, on commence à observer des systèmes bille-ADN qui ont un comportement étrange : alors que des molécules uniques d'ADN nickées ne répondent pas à une contrainte de torsion, certains systèmes bille-ADN voient leur extension diminuer. Comme le montre la figure 3.1, la courbe force-extension pour ces systèmes montrent que leur rigidité est deux fois plus grande que celle d'une molécule unique : la "longueur de persistance effective" vaut $\xi_{eff} = 22.2$ nm. Ce paramètre n'a aucun sens physique, mais il signifie quand même qu'il faut tirer environ deux fois

fort plus pour atteindre l'extension attendue par le WLC.

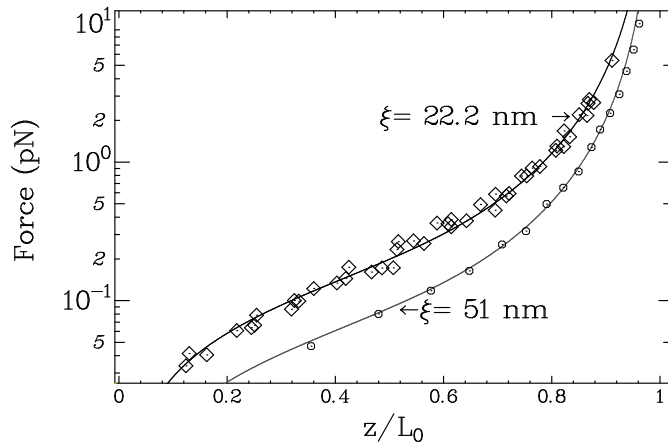


FIG. 3.1 – **Courbe force-extension pour une ($\xi = 51\text{nm}$) et deux molécules ($\xi = 22.2\text{ nm}$) d'ADN.** Les points représentent les mesures expérimentales. Les lignes sont les ajustements par le modèle du ver, qui donne la longueur de persistance ξ .

Tout semble indiquer qu'il y a au moins deux molécules accrochées sur la bille. Si la probabilité d'obtenir ce genre de systèmes reste faible (en gardant une concentration raisonnable d'ADN), on peut s'assurer que la probabilité d'obtenir trois molécules est encore bien plus faible.

3.2 Expériences et modèles préliminaires

Des expériences préliminaires [116] au laboratoire ont permis de tracer la réponse du système (composé de deux molécules de 15 microns) à un nombre de caténation Ca donné (voir figure 3.2) dans 10 mM de tampon phosphate à 4 pN.

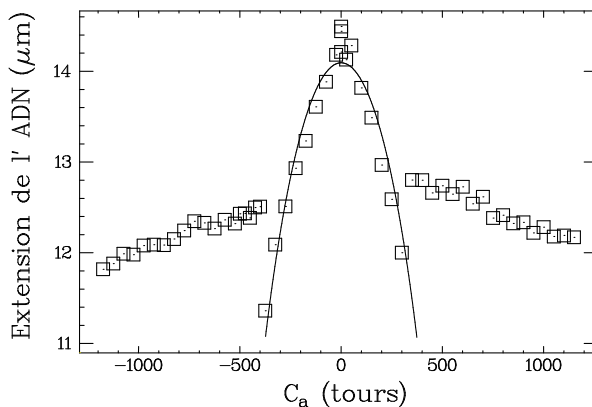


FIG. 3.2 – **Réponse de l'extension de molécules d'ADN à un nombre Ca de caténation dans 10 mM de tampon phosphate.** Les points représentent les mesures expérimentales. Deux régimes sont observés, avec un comportements hystérétiques. La ligne est un ajustement par un modèle géométrique détaillé dans le texte. Les données sont tirées de [116]

Deux régimes distincts sont observés: pour des nombres de tours $Ca < 300$, l'extension diminue rapidement et de plus en plus vite. Puis, après un nombre de caténation critique, il y a une transition

brutale qui conduit à une décroissance moins rapide de l'extension.

Le premier régime peut-être simplement décrit par la formation d'une structure hélicoïdale (chaque brin d'ADN s'enroulant autour de l'autre dans une structure de diamètre D). Si L est la longueur de la molécule à $Ca = 0$, on a simplement :

$$L^2 = z^2 + (\pi D Ca)^2 \quad (3.1)$$

où z est l'extension du système. D'où l'on déduit :

$$z = \sqrt{L^2 - (\pi D Ca)^2} \quad (3.2)$$

Un ajustement de ce modèle à la courbe donne $D = 7.4$ nm. Le diamètre de la tresse correspond à peu près au diamètre effectif de l'ADN. Celui-ci est bien plus grand que le diamètre cristallographique, car il prend en compte les répulsions électrostatiques aussi bien que les fluctuations thermiques de la tresse.

Cependant, l'accord avec les données expérimentales n'est pas très bon dans la partie supérieure de la courbe : celle-ci semble "pointue", alors que le modèle a une tangente horizontale en $Ca = 0$. Ceci est lié au fait que l'on ne maîtrise pas les points d'ancrage des deux molécules sur la surface et sur la bille. L'écartement sur la bille est limité par la taille de la bille : la bille a un rayon $R = 1.4 \mu\text{m}$, donc l'écartement moyen entre les molécules vaut $\langle e \rangle = \sqrt{2}R \approx 2 \mu\text{m}$. Une fois les molécules accrochées sur la bille, elles sont incubées sur la surface du capillaire. La distance moyenne entre les points d'accrochage des molécules sur la surface est réglée par le rayon de gyration des molécules $\sqrt{2\xi L}$ au moment de l'incubation dans le capillaire. Pour une molécule de 11 kb, il vaut environ $0.6 \mu\text{m}$. Les points d'ancrage peuvent donc varier en conséquence. Lorsque les espacements sont très différents, la pente de la courbe extension- Ca à $Ca = 0$ n'est plus horizontale. Dans toute la suite, nous avons utilisé des molécules de 3.5 et $5 \mu\text{m}$. Nous avons sélectionné les configurations le moins trapézoïdales possibles en vérifiant que l'extension à $z = 0$ était proche de l'extension attendue par le modèle WLC.

Le deuxième régime sur la figure 3.2 montre une décroissance nettement plus douce de l'extension avec Ca et une transition brutale avec le premier régime. Cette transition a initialement été interprétée comme un effondrement des deux molécules sur elles-mêmes.

Dans l'article qui suit, nous présentons les résultats expérimentaux obtenus sur la caténation de deux molécules d'ADN de 11 kb. Nous montrons que, dans des conditions de sel de l'ordre de 100 mM, nous pouvons identifier différents régimes de caténation. Le comportement de la tresse est phénoménologiquement bien décrit par le modèle géométrique précédemment exposé, si l'on tient compte de l'espacement entre les molécules. Des simulations numériques Monte-Carlo permettent de décrire correctement la courbe extension-caténation, en particulier à haut de degré de caténation, où il semble se former des superhélices.

3.3 Article : "Braiding DNA : experiments , models and simulations"

(à soumettre à PRE)

Braiding DNA : experiments, models and simulations

G.Charvin^{1*} and A. Vologodskii² D. Bensimon¹, V. Croquette¹

¹ LPS, ENS, UMR 8550 CNRS, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

² Department of Chemistry, NYU, Washington Square, New York, NY 10003

(Dated: June 27, 2004)

We have studied the elastic behavior of two braided DNA molecules using a magnetic trap apparatus. We show that a simple semi-classical model, the twisting of a swing, remarkably describes the elastic response of the molecules as they are intertwined. The data suggest the formation of plectonemes of braids at high catenation number, a hypothesis that we verify in Monte-Carlo simulations of braided DNAs. These experiments allow for a measurement of the effective diameter of DNA and its dependence upon entropic and electrostatic repulsive interactions. At low salt concentrations and for sufficiently large number of braids, the effective diameter of the two intertwined molecules collapse to that of double stranded (ds)DNA. We suggest that this collapse is due to the partial melting and fraying of the two nicked molecules and the subsequent right or left-handed intertwining of the stretched single strands.

INTRODUCTION

The helical structure of double stranded DNA and the semi-conservative mechanism[1] of DNA replication pose significant topological constraints upon DNA[2]: if nothing is done to separate the newly synthesized strands, they remain catenated and the process of cell division is stopped. A class of enzymes, called topoisomerases, are in charge of resolving these constraints. This can be done either by relaxing the positive supercoiling generated ahead of the replication fork or by unlinking the intertwined daughter DNA generated behind. Studying the physical properties of braided DNA molecules is thus relevant to an understanding of the structure of replication intermediates.

Whereas the behavior of a single DNA molecule under torsion has been extensively investigated experimentally[3, 4, 5, 6], numerically[7, 8] and theoretically[9, 10, 11, 12, 13], there are but a few experiments[14, 15, 16] or models[11] dealing with the braiding of two molecules.

In this paper, we report an exhaustive study of the elastic properties of a braid that consists of two intertwined nicked double stranded DNA. We show that the braiding of two molecules is well described by a simple geometric model: a twisted swing. The effective diameter of DNA, which results from both entropic and electrostatic repulsive interactions, can be deduced by fitting the model to the experimental data. Its variation with increasing force (which reduces entropic effects) and ionic strength can thus be investigated. At high catenation number the experiment suggests that the twisted braid undergoes a mechanical instability that leads to the formation of plectonemic structures. Numerical simulations confirm that interpretation of the data. Finally, we describe the sharp transition[14] occurring at low salt in terms of melting of the two DNA molecules, leading to the intertwining of the stretched single strands.

FORCE-EXTENSION CURVES OF TWO BRAIDED MOLECULES

To study the braiding of two DNA molecules, we have anchored two nicked 11kb DNA molecules (crystallographic length $L_0 = 3.56\mu\text{m}$) on the same super paramagnetic bead [14]. This was achieved by incubating streptavidin coated magnetic beads (DYNAL) with biotin end-labelled DNA at an appropriate DNA/bead ratio. The DNA/bead construct was injected in an anti-

digoxigenin coated square capillary tube, to which bottom surface the molecules could bind via their second extremity labelled with digoxigenin (Dig). The DNA/bead ratio was set such that the probability of anchoring by many molecules was much lower than the probability of tethering by a single DNA. This ensures that the few beads anchored by 2 molecules are much more frequent than beads anchored by 3 or more molecules. A force is applied on the bead by using a magnetic trap apparatus, as described by Strick *et al.* [14]. This setup also allows to rotate the magnets and thus to braid the two DNA molecules tethering the bead to the surface. Such doubly anchored beads can be discriminated easily from beads anchored by a single DNA molecule. Since the molecules are nicked, singly anchored beads are insensitive to rotation of the magnets, whereas multiply anchored ones recoil to the surface as their anchoring molecules are braided by rotation of the magnets. Once multiply anchored beads have been identified, we checked that they were bound by two DNA molecules by verifying that the force required to stretch the two molecules to a certain extent was twice the force known to stretch a single one[14], see Fig.1. Notice that in principle the distance between the anchoring points on the beads and on the surface need not be the same. When the molecules are stretched in such a trapezoidal conformation, the distance of the bead to the surface $z(F)$ will be smaller than one single molecule's extension at half the force $L(F/2)$. Such beads are not considered in the following, where we focus our attention on those constructs for which $z(F) \approx L(F/2)$.

GEOMETRICAL MODEL FOR DNA BRAIDING

To provide a phenomenological understanding of the behavior of braided DNA, we have proposed [14] a model that describes the braiding of the molecules anchored a distance $2e$ from each other in analogy with the intertwining by n turns of the two ropes of a swing, see Fig.2. The diameter D of the "ropes" is the effective diameter of the DNA molecule, which results from entropic fluctuations and electrostatic repulsion between the two molecules. The elastic behavior of that twisted swing is characterized by three regimes:

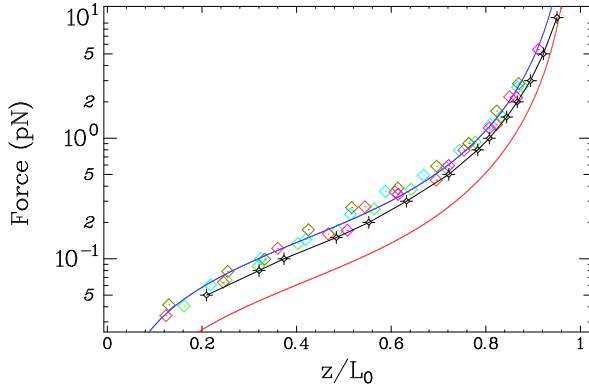


FIG. 1: Force versus extension curve for two DNA molecules tethered to the same bead;

Colored $\diamond$: Experimental points obtained on different sets of molecules; The fit (blue plain line) using Worm-like chain model gave 22.2 nm for the persistence length ξ . The plain red curve is the theoretical curve expected for one single DNA molecule ($\xi = 50$ nm) according to the worm-like chain model. Black cross represent the results obtained using a Monte Carlo simulation of two self-avoiding unbraided molecules of persistence length 50 nm, according to the procedure described in Materials and Methods.

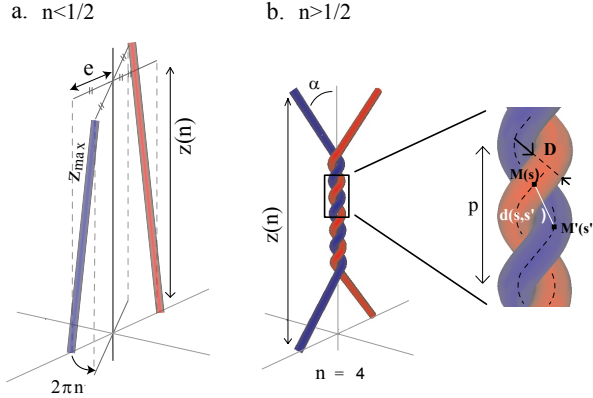


FIG. 2: Geometrical model for DNA braiding;

a) case $|n| < 0.5$: simple geometric considerations lead to derive the extension $z(n)$ as a function of the angle $2\pi n$, the length $z_0 = z(n=0)$, and the distance $2e$ between molecules: $z(n) = \sqrt{z_0^2 - 4e^2 \sin^2 \pi |n|}$; b) case $|n| > 0.5$: further braiding leads to the formation of a helix with an effective diameter D , so that the extension $z(n)$ follows: $z(n) = z_0 \cos \alpha = \sqrt{z_0^2 - (2e + \pi D(|n| - 1/2))^2}$; This model remains valid as long as the molecule are not in close contact; This condition is reached when $d(s, s') \equiv \|M\vec{M}'(s, s')\| = D$, i.e. when the braid angle α reaches $\alpha_c = 45^\circ$.

1) the regime before contact: $|n| < 1/2$

Let us define by $z_0 \equiv z(n=0)$ the extension of the molecules at a $n=0$. The variation of the extension $z(n)$ with the first half turn (i.e. until the "ropes" are in contact) obeys:

$$z(n) = \sqrt{z_0^2 - 4e^2 \sin^2 \pi |n|} \quad (1)$$

2) the regime of braiding ($1/2 < |n| < n_c$)

As the molecules are twisted beyond $n = 1/2$ the intertwining of the stretched molecules results in the formation of a helical structure of diameter D and braid angle α (Fig 2). A simple trigonometric argument, see Fig.2, yields the extension $z(n)$:

$$z(n) = z_0 \cos \alpha = \sqrt{z_0^2 - (2e + \pi D(|n| - 1/2))^2} \quad (2)$$

Notice that the larger n , the larger α .

3) the buckling of braids regime ($n_c < |n|$)

Eq.2 remains valid as long as the molecules are not in close contact, i.e. as long as the distance $d(s, s')$ between any two points $M(s)$ and $M'(s')$ on the molecules' axes is not smaller than D (where s, s' label the curvilinear coordinates along the molecules' axes; see [17] for in-depth considerations about the geometry of braids):

$$M(s) = \begin{pmatrix} D \sin(2\pi s)/2 \\ D \cos(2\pi s)/2 \\ ps \end{pmatrix} \text{ and } M'(s') = \begin{pmatrix} D \sin(2\pi s' + \pi)/2 \\ D \cos(2\pi s' + \pi)/2 \\ ps' \end{pmatrix}$$

where $p = \pi D / \tan \alpha$ is the braid pitch. The condition $d(s, s') > D$ ($\forall(s, s')$) remains valid as long as:

$$\frac{d^2(s, s')}{D^2} - 1 = \left[\left(\frac{\pi(s - s')}{\tan \alpha} \right)^2 - \sin^2 \pi(s - s') \right] \geq 0$$

which implies $\tan \alpha \leq 1$, i.e. $\alpha \leq \alpha_c = 45^\circ$. Beyond that point the torque in the braided molecules increases and yields to their mechanical buckling, i.e. to the formation of plectonemes of braids. The molecules' extension $z(n)$ then decreases by a fixed amount for every added turn.

EXPERIMENTAL EXTENSION VERSUS ROTATION CURVE : $z(n)$

By rotating the magnets above the sample, we are able to braid the molecules by n turns and to monitor the consecutive variations in their extension $z(n)$, see Fig.3.

The three different regimes previously described in our simple model can be discerned in Fig.3:

- $n \leq 1/2$. The first half turn leads to a big decrease in the DNA's extension, which corresponds to the formation of a crossing between the two DNA (see Eq.1 and light gray area). This large decrease is due to the fact that the distance between the molecules' anchoring points is comparable to the molecular length. Previous experiments on braided DNA did not report such an effect because the DNA

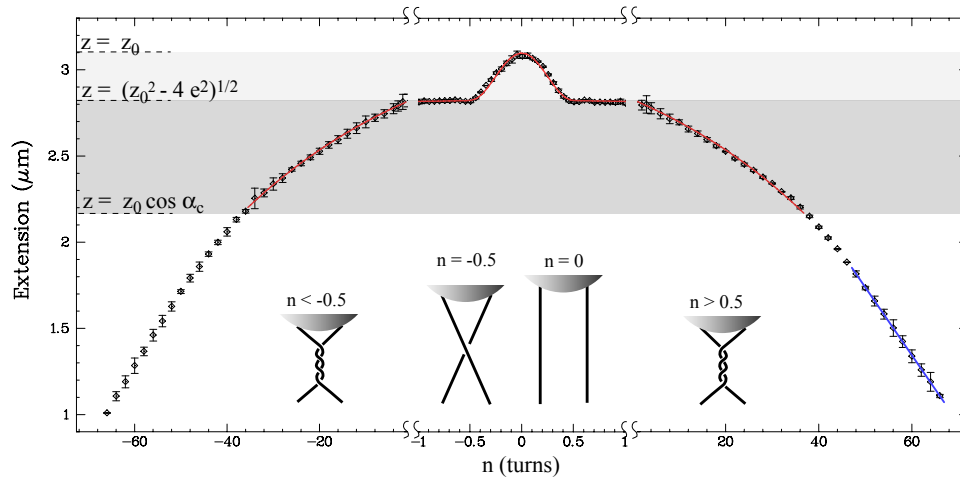


FIG. 3: Extension versus braiding for two DNA molecules;

The $\diamond$ are experimental points, obtained at $F=2\text{pN}$ in 100mM Phosphate buffer. We have distinguished two different ranges of braiding, based on the geometrical model described above : $|n| < 0.5$ (light gray shading), corresponding to the crossing of the two DNA molecules, and $|n| > 0.5$ for further braiding (heavy gray shading); Error bars indicate statistical errors. The fit of the experimental points using the model provided $z_0 = 3.10\mu\text{m}$, $2e = 1.28\mu\text{m}$, $R = 3.9\text{ nm}$ (red plain line). The blue plain line is a linear fit of the last part of the curve. The slope obtained is 39 nm.

used was longer (λ phage of 48kb[14] and 41kb[15]). On the basis of the excellent fit between Eq.1 and our data, we are able to estimate the distance $2e$ between the molecules' anchoring points (for the particular data shown in Fig.3: $e = 0.64\mu\text{m}$).

- $1/2 < n < n_c$. Further rotation of the magnets leads to a smaller decrease in the system's extension per added turn. This regime corresponds to the formation of braids (see Eq.2 and gray area). The very good fit between our geometrical model and the data allows us to extract the DNA's effective diameter D (for the data in Fig.3: $D = 7.8\text{ nm}$). This value which is larger than the crystallographic diameter of DNA (2 nm) results from the entropic and electrostatic repulsive interactions between the braided molecules. Their contributions to D can be studied (see below) as a function of force and ionic strength.
- $n > n_c$. As braids come into close contact a torque rapidly builds up in the braided molecules that counters their forced intertwining [18]. When that torque reaches a certain value, the braided molecules must buckle and form plectonemes. That transition to a different regime of braiding is manifested by a change in the slope of the extension versus n plots. These assumptions were supported by numerical simulations, as described below.

THE TRANSITION TO PLECTONEMES OF BRAIDS AND LONGITUDINAL FLUCTUATIONS

Fig. 4(a) displays the extension measured for one set of molecules as a function of $n > 0$ (upper curve) and $n < 0$ (lower curve) (at $F = 2\text{ pN}$ in 100 mM phosphate buffer containing 5 mM Mg^{2+}). We observe a small but consistent difference in the molecules' extension which suggests that right-handed braids

(with the same chirality as DNA) can be brought into closer contact before they buckle than braids of opposite handedness.

The transition to a regime where braids supercoil has also a clear signature in the amplitude of the fluctuations in extension, δz^2 , see Fig.4(b) : once the critical linking number for buckling is reached, the formation of plectonemes results in a decrease in the system's stiffness and therefore in larger longitudinal fluctuations (as also observed when single DNA molecules supercoil).

EFFECTIVE DIAMETER VERSUS FORCE AND SALT

We have experimentally investigated the influence on the DNA's effective diameter D_{eff} of entropic and electrostatic repulsion interactions. We can modulate the strength of the entropic repulsion between the molecules by varying the stretching force: the larger the force, the smaller the fluctuations of the molecules and thus the smaller their entropic repulsion. By changing the ionic conditions, we modify the electrostatic repulsion range (Debye length) between the molecules in the braid. We can correlate that length with the effective diameter of the molecules in the limit of large forces D_{eff}^∞ , where entropic repulsion is negligible.

Figure 5 a) and b) display the variation of extension with the number of braids obtained in different phosphate buffers and at different forces. Fitting the various curves to the geometrical model previously introduced let us retrieve the effective diameter as a function of force and ionic strength, see Fig.5c. Increasing the tension reduces the entropic fluctuations and decreases the DNA's effective diameter. At any salt conditions and for various forces D_{eff} is well fit, see Fig.5c), by the prediction of Marko [18]:

$$D_{eff} = D_{eff}^\infty + AF^{-3/4}$$

The effective diameter resulting from repulsive electrostatic interactions only, D_{eff}^∞ , increases linearly with the Debye

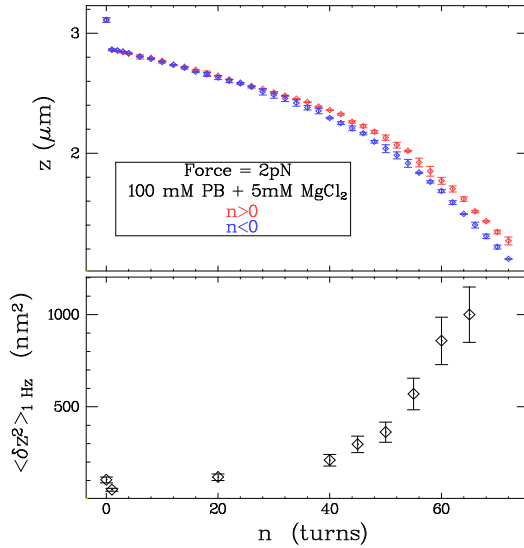


FIG. 4: Characterization of the plectonemic regime of the braid
Upper plot: Extension versus catenation number $|n|$ for $n > 0$ (red line) and $n < 0$ (blue line) at $F=2\text{pN}$ in $100\text{ mM PB} + 5\text{ mM MgCl}_2$; Superposition of both curves exhibits a subtle difference between left- (L) ($n < 0$) and right-handed (R) ($n > 0$) braids at high catenation number; Errors bar indicate the statistical errors; Lower plot: fluctuations in the braid's extension low-pass filtered at 1 Hz as a function of n . Fluctuations increase a lot after $n = 40$, showing that the system becomes more flexible; This phenomenon is compatible with the formation of plectonemic structures in the braid (as confirmed below by Monte-Carlo simulations); It is interesting that the difference between (L) and (R) is visible only in the plectonemic regime; This difference must be due to the chirality of the DNA molecule itself;

length[19], see Fig.5d).

MONTE-CARLO SIMULATION

To confirm the analogy of the braiding of the two DNA molecules with the twisting of a swing, we have performed Monte-Carlo simulations of the braiding of two Worm-Like Chain polymers of persistence length $\xi = 50\text{nm}$ (a faithful description of the elastic behavior of DNA). Each molecule was modeled as a chain consisting of 120 segments, with $k = 10$ segments per Kuhn length (which ensures enough discretization of DNA), so that $L_0 = 1.2\mu\text{m}$. 3.5 kb DNA molecules conformations were thus generated using a Monte-Carlo metropolis algorithm (see Materials and Methods for details).

The intertwining of the chains by n turns was kept constant by calculating the Gauss integral of two circularized chains and rejecting the conformations with the wrong topology. Knotted chains were also discarded by calculating the Alexander polynomials as topological invariants (as described in [20]). The DNA's effective diameter $D_{eff}^\infty = 6\text{ nm}$ was set to take into account the electrostatic repulsion in a solution of monovalent salts at a concentration $C = 100\text{ mM}$ [21].

In order to compare the simulations to the experiments, we set the spacing $2e$ between the simulated chains such that the ratio $2e/L_0 \simeq 0.36$ was the same as in the experiment. Though the

spacing between the chains was kept fixed at the bottom of the braids, we had to permitted small variations of the spacing and orientation at their top, in order to allow for changes in the chains' conformation. This was achieved by introducing a stiff spring (of average extension $2e$) between the top ends of the chains (and therefore an additional elastic energy term in the total energy). Figure 6 displays some typical configurations of braids obtained at $F = 2\text{ pN}$.

In analogy with the supercoiling density σ , we introduce the density of catenation Ca :

$$Ca \equiv n/Lk_0 = nh/L_0$$

where h is the helical pitch of DNA, Lk_0 the natural linking number of the DNA molecule. Ca allows one to normalize the extension versus rotation curves and thus to compare different sizes of molecules (the computing time was too long to generate configurations with the same size as in the experiment).

Extension versus catenation number

At each linking number n , an ensemble of $N = 10^8$ or 2.10^9 configurations (depending on n , as described below) was generated to estimate the averaged extension $\langle z \rangle$ (see Fig.7a)). Extension was averaged every 10000 steps and saved for further analysis. A reliable estimate of $\langle z \rangle$ requires an average over a large number of uncorrelated chain configurations. To estimate the number N_C of Monte-Carlo (MC) steps necessary to obtain decorrelated configurations, we used a method based on the calculation of the error in the extension mean $\langle z \rangle$, as described in [22]. We computed iteratively the error in $\langle z \rangle$ with bins of growing size N_b (corresponding to $10000N_b$ MC steps), as shown in Fig.7b) (for the case $n = 6$). For correlated data, the error in $\langle z \rangle$ increases with the bin size N_b and becomes independent of N_b when the data decorrelate. This method thus yields an estimate of the number of correlated MC steps N_C ($N_C = 1.8.10^6$ for $n = 2$). N_C appears to vary exponentially with n (see Fig. 7c)) : $N_C = A \exp(Bn)$, where $A = 44000$ and $B = 0.46$, thus indicating that braiding the chains restricts the ability of the MC algorithm to effectively explore the phase space and to rapidly reach thermodynamic equilibrium. Consequently, in order to ensure a statistically relevant set of independently relaxed configurations we set the total number of MC steps $N : N > 100N_C$.

Comparison between simulation and experiments (see Fig. 7a)) exhibit a good agreement over the whole range of Ca . In particular, it appears that the simulated braids encounter the same transition to plectonemes of braids at a critical $Ca \approx 0.04$, as also observed experimentally.

COLLAPSE TRANSITION

Tight braiding of DNA molecules in low salt conditions ($\leq 10\text{mM PB}$) led to a surprising transition to a much tighter braided structure, previously reported [14]. Fig.9 a) shows that in low salt once the molecules have adopted the braided plectonemic structure described previously they may undergo a sharp hysteretic transition to a state with a larger extent and a much smaller decrease in extension upon braiding (i.e. a much smaller effective

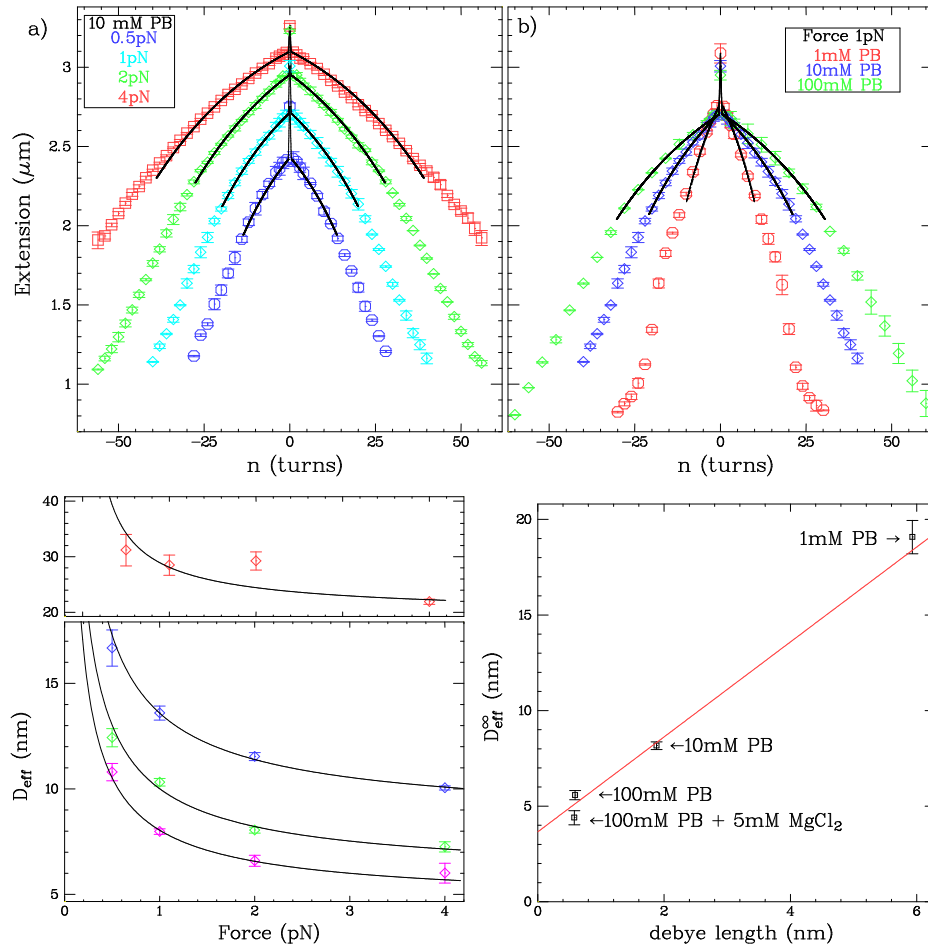


FIG. 5: Dependence of the effective diameter on the force and the salt;

a) Extension vs. n curves in 10 mM PB at different stretching force and fits using the geometrical model (plain black lines); red $\square$: 4 pN, green $\diamond$: 2 pN, lightblue $\diamond$: 1 pN, dark blue $\diamond$: 0.5 pN.

b) Extension vs. n curves at $F = 1$ pN and fits using the geometrical model (plain black lines); red $\diamond$: 1 mM PB, blue $\diamond$: 10 mM PB, dark blue $\diamond$: 100 mM PB.

c) Evolution with the force of the fitted effective diameter of the braids D_{eff} at different ionic concentrations: red $\diamond$: 1 mM Phosphate Buffer (PB), blue $\diamond$: 10 mM PB, green $\diamond$: 100 mM PB, magenta $\diamond$: 100 mM PB + 5 mM MgCl_2 . Error bars indicate the error (determined by bootstrap test) on the diameter fitted using the geometrical model. Following Marko[18] D_{eff} was fitted by: $D_{\text{eff}} = AF^{-3/4} + D_{\text{eff}}^{\infty}$;

d) Evolution of D_{eff}^{∞} (square) with the Debye length (λ_D , calculated by Y.Zhang[19] at the corresponding ionic concentration). Error bars indicate the error on D_{eff}^{∞} , which has been fitted using least square methods. A linear fit yields: $D_{\text{eff}}^{\infty} = 2.5\lambda_D + 3.6$ nm.

braid radius). In this regime, the extension varies much less per added turn ($dz/dn = 4$ nm / turns) than in the plectonemic regime ($(dz/dn) \approx 45$ nm/turns). The smaller decrease in extension with added turns reflects the tighter intertwining of the DNA molecules in this collapsed regime. To estimate how much tighter the new structure is, we shall assume that the decrease in extension is inversely proportional to the distance between the molecules. Since in the regime of plectonemic braids the effective diameter of DNA $D_{\text{eff}} = 25$ nm, see Fig. 5c), we estimate by simple proportionality that the distance between the DNA molecules in the collapse regime is: $D_{\text{coll}} = 25 \cdot 4/45 \approx 2.2$ nm, which is very close to the cristallographic diameter of DNA!

This collapse transition is observed both for right-handed ($n > 0$) and left-handed ($n < 0$) braids, though it appears to happen for

a slightly smaller value of $|n|$ for left-handed turns. Surprisingly, this collapse is observed only in low salt conditions and not at high salt or in presence of Mg^{2+} , where one might have expected electrostatic repulsion to be weaker. The transition is reversible but highly hysteretic. The hysteresis being more pronounced for left than for right handed braids.

Fig. 9 b) is a real-time recording of the transition to the collapsed state of a braid. The collapse occurred about two minutes after the molecules had been braided by $n = -35$ turns. Notice that the transition is very quick (though slower than our acquisition rate (25 Hz)) and that the molecules can be reversibly unbraided from the collapsed regime by simply rotating the magnets back to zero.

Analysis of the longitudinal fluctuations at $n = -26$ (data not

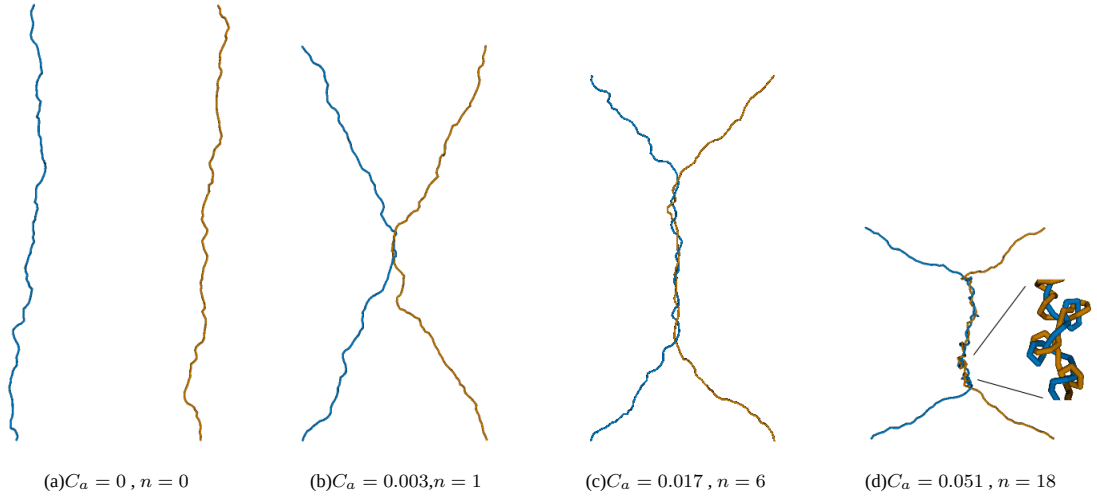


FIG. 6: Examples of configurations of braided DNA by Monte-Carlo simulations; The chains is composed of 120 segments corresponding to 3.5 kb DNA molecule (12 Kuhn lengths). The distance between molecule was set to 4.4 Kuhn length to get the same $2e/L_0$ as in the experiment. The simulation was ran according to the protocol described in Materials and Methods.

shown) before and after the collapse transition showed that the fluctuations were much reduced after the transition, suggesting that the collapsed state is characterized by a stiffer and tighter structure.

DISCUSSION

The braiding of two DNA molecules can be studied to great details using the magnetic trap technique previously described. Until the braids supercoil, the force vs. extension data is well described by the simple geometric model of the braiding of the two ropes of a swing. The length of each molecules is given by the extension of a WLC polymer under half the exerted tension, $F/2$. The effective diameter of the molecule is set by both the repulsive electrostatic and entropic interactions. The variation of the diameter with force is well fit by the predictions of J.Marko [18], namely it decreases as $F^{-3/4}$ due to a reduction in entropic fluctuations at high force. Moreover, the electrostatic repulsion increases the DNA's effective diameter by an amount proportional, as expected, to the interaction range: the Debye length.

Monte-Carlo simulations of two braided WLC polymers fit the experimental data over the whole range of observation and confirm the transition to plectonemes of braids at high braiding number. The force vs. extension behaviour of two braided polymers deduced from these simulations is also well fitted by the geometric model just described.

However, when the persistence length of the chains is comparable to the pitch of the braids, the numerical results show that the braid pitch angle α differs from the predictions of our simple model. It saturates at an angle α_c less than the predicted value of 45° (data not shown). This numerical observation is understood as resulting from the stiffness of the molecule that prevents the molecules from bending as they wind about each other. The molecules thus intertwine with a smaller angle between their axes. This effect due to the finite size of the persistence length appears

not to affect significantly the force vs. extension behaviour of the braided chains, which may partly explain the good agreement between our simple geometric model and both the MC simulations and the experimental data.

At large braiding number and in low salt conditions, we have observed a sudden transition to a structure still affected by the braiding of the molecules but with a decrease in extension per added turn corresponding to the molecules being a distance ~ 2.2 nm apart. It is surprising that such a transition is only observed in low salt conditions (1 mM PB and $F > 2$ pN and 10mM PB and $F > 4$ pN) where electrostatic repulsive interactions have a much larger range ($\lambda_D \approx 6$ nm). It is possible that in these conditions the nicked DNA molecules are frayed, which should allow the single strands under tension to wind about each other in a tight, right- or left-handed, double helical structure, as described on Fig.9. This model explains the sharp transition occurring when increasing n as well as the smooth recovery to the initial structure when going back to $n = 0$.

The results of the present experiments, numerical simulations and modeling shed light on the possible structures adopted by the pre-catenated newly synthesized sister chromosomes in replication intermediates.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

DNA constructs and micromanipulation setup

We labelled a 11-kbps nicked DNA (linking number $Lk_0 \simeq 1100$) at its extremities with biotin and digoxigenin (Dig) as previously described [14]. The molecules were bound at one end to a streptavidin-coated magnetic bead ($2.8\mu\text{m}$ (Dynal)) and at the other to an anti-Dig coated glass surface, previously incubated with BSA (Roche) to reduce non-specific interactions.

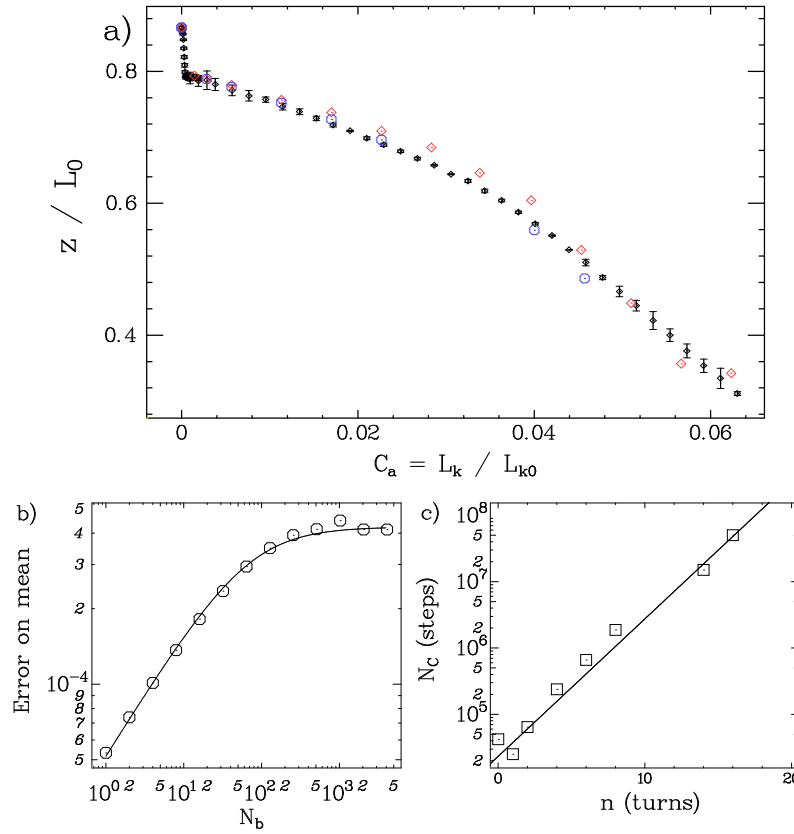


FIG. 7: Simulated extension versus catenation number;

a) The average normalized extension $\langle z \rangle / L_0$ plotted as a function the density of catenation C_a ; red $\diamond$: numerical simulations with $2e/L_0 = 0.4$ ($D_{eff}^\infty = 5\text{nm}$); blue $\circ$: numerical simulations with $2e/L_0 = 0.4$ ($D_{eff}^\infty = 6\text{nm}$); black crosses : experiments in 100mM Phosphate buffer with statistical errors; blue $\circ$: numerical simulations with $2e/L_0 = 0.04$; b) $\circ$: error on mean (ϵ) as a function of bin-size N_b (see text for details) obtained at $n = 6$ (case $d = 6\text{nm}$). Plain line is the curve obtained by fitting the numerical data to: $\epsilon(N_b) = \epsilon_0 / \sqrt{1 + N_C / (10000N_b)}$. N_C yields an estimate of the number of correlated steps. c) Variation of N_C (square) with the number of applied turns n , and exponential: $N_C = A \exp(Bn)$, with $A = 23000$ and $B = 0.47$

To stretch and braid the molecules we used small magnets placed above the sample that could be translated to set the force pulling on the molecules and rotated to braid them. Bead tracking and force measurement were performed on an inverted microscope [3]. The extension z is measured by tracking the three dimensional position of the tethered bead [14] with an error due to Brownian motion of about 10 nm (with 1 second averaging).

The bead's transverse fluctuations $\langle \delta x^2 \rangle$ allow for a determination of the stretching force using the equipartition theorem: $F = k_B T z / \langle \delta x^2 \rangle$, where k_B is Boltzmann constant and T the temperature (at 25°C: $k_B T = 4\text{ pN nm}$). Here F was measured with 10% accuracy.

In plots showing the DNA's extension recordings, the points correspond to the raw data and were obtained at 25 Hz. For all the curve displaying extension versus the catenation number, each point was averaged over 128 measurements of extension. To eliminate microscope drifts, differential tracking with a second bead glued to the surface was performed.

Monte-Carlo calculations

DNA modeling

The two DNA molecules were modeled as discrete worm-like chains of n Kuhn statistical lengths, constituted by kn straight elementary segments with fixed length and harmonic potentials with respect to the angles θ_i between adjacent segments, so that the bending energy E_b of each chain is:

$$E = \alpha k_B T \sum_{i=1}^{kn} \theta_i^2$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, and α is the bending rigidity constant. α is defined so that the Kuhn length correspond to k rigid segments[23]. The Kuhn length for DNA was set to 100nm . We chose $k = 10$, which has been shown to provide accurate enough results for the simulation of a worm-like chain[24]. In this case, $\alpha = 2.409$.

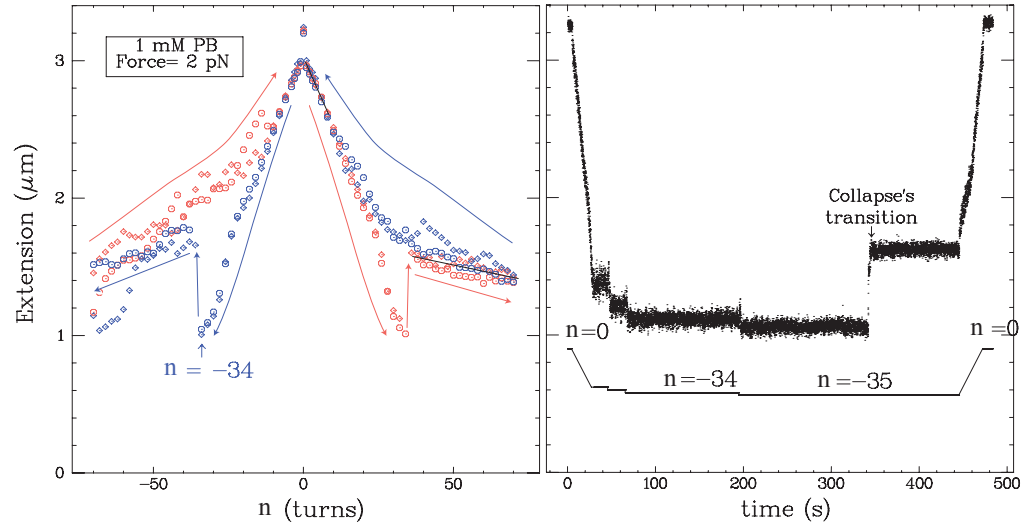


FIG. 8: Collapse of the braid induced by torque;

a) Extension versus catenation number at 1mM PB and 2pN; Red $\odot$: from $n < 0$ to $n > 0$; Blue $\odot$: from $n > 0$ to $n < 0$; At sufficiently high n (in the plectonemic regime), a transition occurs (with a noticeable jump in extension) to a state where the extension decreases slowly with n (as already described in [14]); The transition is highly hysteretic and occurs either at $n > 0$ or at $n < 0$, but the area of multistability was slightly larger for $n < 0$; The slope measured (plain black line) after the transition $\simeq 4$ nm / turn (which is 8 times smaller than the slope (plain black line) measured at small $|n|$), suggests that the structure is very compact.

b) Real-time observation of the braid collapse; Black dots: recording of extension at 25Hz. The plain black line indicates the position of the motors and then the catenation number of the two molecules; At $n = -35$, the transition occurs rapidly and spontaneously. COiling back to $n = 0$ let to reproduce the experiment.

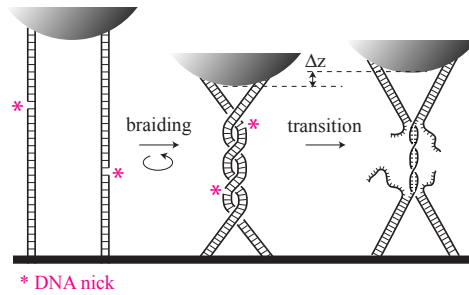


FIG. 9: Scheme of the transition occurring at low salt.

At low linking number, nicked double-stranded DNA wrap around each other, thus reducing the system's extension (center). After a critical linking number, torque induces the melting of the molecules and the extrusion of single strands (right). The remaining single-strands form an helix which is tighter than the double-strand braid helix, thus increasing sharply the system's extension.

Monte-Carlo procedure

We used the Metropolis Monte-Carlo procedure[25] to generate a set of conformations that satisfy the equilibrium, as described in detail[26].

Moves

We applied the deformations of the chain using two different types of moves : first, we uniformly changed the orientation (with respect to the direction of the force) of a randomly chosen segment; second, we made Crankshaft moves[24].

Springs

We added an harmonic potential in the energy of the chains to maintain the orientation and the distance between the uppers ends of the molecules.

Topological constrain

Because of the moves occuring during the Metropolis procedure, the linking number n between the two chains may change. We selected the conformations that had the right linking between chains by calculating the Alexander polynomials for two linked chains[20]. We also used Alexander polynomials to evaluate the knotting in the chain formed by the closing of the two subchains [20] and we rejected all the conformations with the wrong topology.

Excluded volume effect and electrostatic interactions

We took into account of the excluded volume effect and electrostatic interactions by introducing an effective diameter d [21]. d was adjusted to compare numerical results to experiments. At 100 mM of monovalent salt, $d = 6$ nm.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge helpful discussions with J. Marko, J.-F. Allemand, S. Neukirch and Y. Zhang. We also thank G. Lia for DNA constructs. This work was supported by grants from ARC, CNRS, ENS and Universities Paris VII and VI.

* Electronic address: Gilles.Charvin@lps.ens.fr; URL: <http://www.lps.ens.fr/~charvin>

- [1] M. Meselson and F. Stahl. The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 44:671–682, 1958.
- [2] J.D. Watson and F.H.C. Crick. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [3] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271:1835–1837, 1996.
- [4] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA: an extensible molecule. *Science*, 271:792–794, 1996.
- [5] J.-F. Léger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko. RecA binding to a single double-stranded DNA molecule: a possible role of DNA conformational fluctuations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:12295–12296, 1998.
- [6] Z. Bryant, M.D. Stone, J. Gore, S. B. Smith, Nicholas R. Cozzarelli, and C. Bustamante. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*, 424:338–341, 2003.
- [7] O.N. Voloshin, L. Wang, and R. Daniel Camerini-Otero. Homologous DNA pairing promoted by a 20-amino acid peptide derived from RecA. *Science*, 272:868–872, 1996.
- [8] A. Vologodskii and J.F. Marko. Extension of torsionally stressed DNA by external force. *Biophys. J.*, 73:123–132, 1997.
- [9] C. Bouchiat and M. Mézard. Elasticity theory of a supercoiled DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 80:1556–1559, 1998.
- [10] J.F. Marko and E. Siggia. Statistical mechanics of supercoiled DNA. *Phys. Rev. E*, 52(3):2912–2938, 1995.
- [11] J.F. Marko. Supercoiled and braided DNA under tension. *Phys. Rev. E*, 55:1758–1772, 1997.
- [12] J.D. Moroz and P. Nelson. Torsional directed walks, entropic elasticity and DNA twist stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 94:14418–14422, 1998.
- [13] J.D. Moroz and P. Nelson. Entropic elasticity of twist-storing polymers. *Macromolecules*, 31:6333–6347, 1998.
- [14] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74:2016–2028, 1998.
- [15] M. D. Stone, Z. Bryant, N. J. Crisone, S. B. Smith, A. Vologodskii, C. Bustamante, and Nicholas R. Cozzarelli. Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 100:8654–8659, 2003.
- [16] G. Charvin, V. Croquette, and D. Bensimon. Single molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type II topoisomerases. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 100:9820–9825, 2003.
- [17] S. Neukirch and G.H.M. van der Heidjen. Geometry and mechanics of uniform n-plies : from engineering ropes to biological filaments. *Journal of elasticity*, 69:41–72, 2002.
- [18] J.F. Marko. Stretching must twist DNA. *Europhys. Lett.*, 38:183–188, 1997.
- [19] Y. Zhang, H. Zhou, and Z.-C. Ou-Yang. Stretching single-stranded DNA: interplay of electrostatic, base-pairing and base-stacking interactions. *Biophys. J.*, 81:1133–1143, 2001.
- [20] M.D. Frank-Kamenetskii and A.V. Vologodskii. Topological aspects of the physics of polymers: the theory and its biophysical applications. *Sov. Phys. Usp.*, 24:679–696, 1981.
- [21] V.V. Rybenkov, N.R. Cozzarelli, and A.V. Vologodskii. Probability of DNA knotting and the effective diameter of the DNA double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90:5307–5311, 1993.
- [22] H. Flyvbjerg and H. G. Petersen. Error estimates on averages of correlated data. *J. Chem. Phys.*, 91:461–466, 1989.
- [23] M.D. Frank-Kamenetskii, A.V. Lushakin, V.V. Anshelevich, and A.V. Vologodskii. Torsional and bending rigidity of the double helix from data on small DNA rings. *J. of Biomol. Struct. and Dynam.*, 2:1005–1012, 1985.
- [24] A.V. Vologodskii and M.D. Frank-Kamenetskii. Modeling supercoiled DNA. *Meth. Enzymol.*, 211:468–472, 1992.
- [25] N. Metropolis, N. Rosenbluth, A.W. Rosenbluth, M.N. Teller, and E. Teller. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.*, 21:1087–1092, 1953.
- [26] K.V. Klenin, A.V. Vologodskii, V.V. Anshelevich, A.V. Dykhne, and M.D. Frank-Kamenetskii. Computer simulation of DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.*, 2:1005–1012, 1985.

Troisième partie

Etudes des topoisomérases par micromanipulation d'ADN

Chapitre 1

Introduction sur les topoisomérases

L'objectif de ce chapitre est d'introduire les différents acteurs de la régulation de la topologie de l'ADN : les topoisomérases. Tout d'abord, nous expliquons, à travers l'exemple du processus de réplication de molécules d'ADN circulaires fermées, la nécessité d'opérer des modifications topologiques dans la molécule d'ADN. Nous présentons ensuite une vue d'ensemble des différentes enzymes de la classe des topoisomérases, qui sont les acteurs de la régulation de la topologie dans la cellule. Une attention particulière est portée à la description des topoisomérases de type II, qui constitue l'objet exclusif de notre étude. Nous présentons enfin les questions fondamentales qui subsistent quant à la compréhension de leur mécanisme de catalyse et de leur faculté à simplifier la topologie.

1.1 La nécessité d'une régulation de la topologie de l'ADN : exemple de la réplication d'une molécule d'ADN circulaire

A la suite de leur fameux article proposant une structure en double-hélice pour l'ADN[143], Watson et Crick exposent les prémices d'un modèle de réplication semi-conservative de l'ADN[142] : puisque l'information génétique est identique (mais complémentaire) sur chaque simple-brin de la double-hélice, chaque simple brin de la molécule parente pourrait servir de "moule" à la fabrication d'un brin complémentaire. Dans ce cas, la molécule d'ADN parente serait dupliquée de manière fidèle en deux molécules filles rigoureusement identiques possédant un simple brin issu de la mère.

Cependant, ce modèle pose le problème suivant, exposé par Watson et Crick dans leur article[142] : "Since the two chains in our model are intertwined, it is essential for them to untwist if they are to separate.... Although it is difficult at the moment to see how these processes occur without everything getting tangled, we do not feel that this objection will be insuperable."

En 1958, Melselson et Stahl [79] prouvent la validité du modèle de réplication semi-conservatif. Comment les molécules nouvellement synthétisées se séparent-elles ? S'il est possible d'imaginer que, pour des molécules linéaires courtes, la séparation puisse se faire d'elle-même relativement rapidement, il n'en va pas de même pour des chromosomes humains entiers, dont la taille est de l'ordre de la centaine de millions de paires de bases.

En outre, dans les années 1960, on découvre que le génôme de certains organismes (virus) est circulaire et fermé[28, 128]. Dans ce cas, il y a une réelle impossibilité topologique : pour une molécule d'ADN d'indice d'enlacement Lk , les molécules filles issues de la réplication restent liées entre elles, avec un indice de caténation égal à l'indice d'enlacement de la mère. Il faut donc opérer Lk coupures dans les brins nouvellement répliqués pour désenchevêtrer les chromosomes !

Quoique correcte, cette vision purement topologique est un peu simpliste, et nécessite de s'attarder un peu sur le processus de réplication[106]. L'initiation de la réplication requiert que la molécule circulaire soit sous-enroulée pour faciliter la séparation des simples brin à l'origine de réplication. En moyenne, les chromosomes et plasmides bactériens sont sous-enroulés d'environ 5%, ce

qui fait d'ailleurs 5% de liens en moins à enlever entre les molécules filles pour les séparer. L'initiation conduit à l'insertion du complexe de réplication, le réplisome, chargé d'ouvrir et de synthétiser l'ADN en se déplaçant le long de la molécule, formant ainsi deux "fourches" de réplication. Cette phase de translation du complexe enzymatique s'appelle l'élongation. Si la topologie de la molécule mère est fixée (Lk constant), la progression de la fourche, qui nécessite l'ouverture constante de tours d'hélices supplémentaires (donc la diminution locale de la torsade Tw), entraîne l'apparition d'une contrainte de torsion positive ailleurs dans la molécule. Champoux et Been[18] sont les premiers à proposer que cette contrainte de torsion puisse diffuser dans toute la molécule, c'est-à-dire qu'elle se matérialise par du super-enroulement positif en amont de la fourche de réplication, mais aussi par la caténation des brins nouvellement synthétisés. Ce type de structure de l'intermédiaire de réplication, appelé précaténane, a effectivement été observé *in vitro* en microscopie électronique[89], comme le montre la figure 1.1.

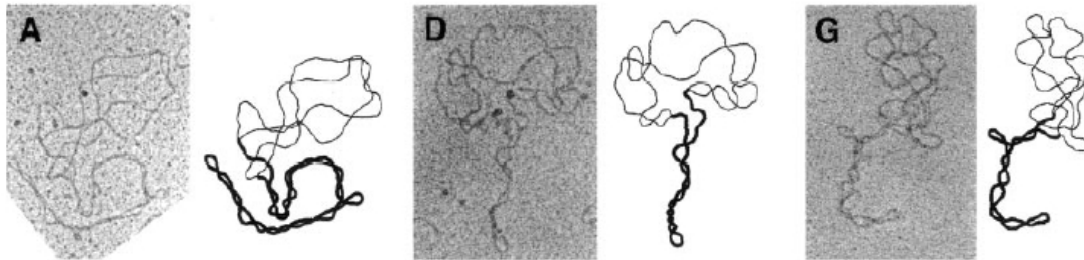


FIG. 1.1 – Images de microscopie électronique d'intermédiaires de réplication . Images tirées de [89]

La caténation des molécules filles correspond au problème évoqué plus haut. Si il n'y a pas de décaténation, le partitionnement des chromosomes est impossible. Le super-enroulement en amont de la fourche de réplication crée des structures vrillées très serrées qui peuvent empêcher la progression du réplisome.

En conséquence, l'indice d'enlacement Lk doit nécessairement diminuer pour séparer les molécules nouvellement synthétisées, mais aussi pour permettre la complétion du processus de réplication. Des changements topologiques majeurs, c'est-à-dire des coupures dans la molécule d'ADN, doivent donc se produire de manière simultanée avec le processus de réplication.

Si la réplication est certainement le processus qui matérialise le plus intuitivement la nécessité d'une régulation de la topologie à l'intérieur de la cellule, d'autres mettent également en lumière la nécessité d'un contrôle actif et fin de l'état d'enroulement de l'ADN : chez les bactéries, la transcription est contrôlée par le degré de super-enroulement de l'ADN (voir [93] pour une étude récente en molécule unique), mais trop de super-enroulement peut aussi s'avérer un désastre[139]. La recombinaison, la condensation et la décondensation de la chromatine sont aussi des processus qui entraînent localement des contraintes de torsion dans l'ADN. La racine commune de tous ces problèmes topologiques est la structure en double-hélice de l'ADN.

1.2 Les topoisomérases

Les acteurs de la régulation de la topologie de l'ADN sont des enzymes appelées topoisomérases (on les notera aussi "topo"). Elles sont capables de catalyser l'interpénétration de simple brins ou de doubles brins d'ADN. Elles peuvent ainsi changer l'indice d'enlacement Lk d'une molécule d'ADN, mais aussi les décaténer et les dénouer. Depuis la mise en évidence de la première topoisomérase en 1971[140], ces enzymes ont été identifiées chez tous les organismes vivants : eubactéries[140], archaebactéries[44], eukaryotes[107] et virus[70]. Elles sont en effet essentielles à la viabilité de la

cellule[40]. Au sein d'un même organisme, l'évolution a fait apparaître des variations de séquence entre différentes topoisomérases entraînant des modifications de la fonction de ces enzymes. L'action simultanée de ces différentes enzymes, dont certaines ont parfois des rôles antagonistes, assure le maintien du degré de super-enroulement, la séparation des chromosomes et empêche la formation des noeuds.

1.2.1 Clivage de l'ADN

Modifier l'état d'enroulement de l'ADN en effectuant le passage d'un simple brin ou d'un double brin à travers un autre nécessite un clivage d'au moins l'un des deux brins dans la molécule. Quelles que soient les topoisomérases, la réaction de cassure s'effectue par une attaque nucléophile d'un oxygène d'une tyrosine de l'enzyme sur un groupement phosphate du squelette de l'ADN[138]. Ainsi, il se forme une liaison phosphodiester covalente temporaire entre l'enzyme et l'ADN. La figure 1.2 montre le principe de la réaction, dans le cas des topoisomérases II ou IA (voir plus bas pour la classification) : un groupement OH est laissé sur du côté 3' sur le squelette (alors qu'il est laissé sur le côté 5' pour les topoisomérases IB).

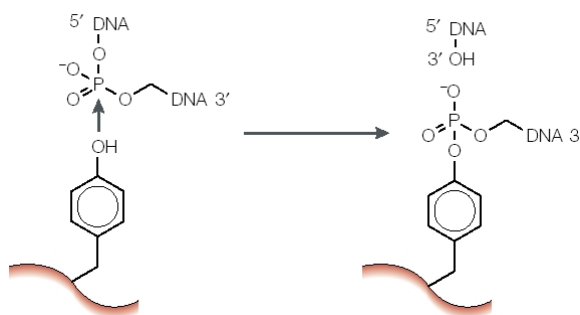


FIG. 1.2 – **Cassure temporaire du squelette de l'ADN par les topoisomérases.** . Schéma tiré de [138]

A l'issue de la réaction d'isomérisation, le sens de cette transestérification est inversée et permet de retrouver l'intégrité du squelette de l'ADN.

1.2.2 Classification

On distingue deux classes de topoisomérases, suivant le mécanisme et la structure de ces enzymes.

1.2.2.1 Type I

Les topoisomérases de Type I, qui sont quasi-exclusivement monomériques, effectuent des coupures simple-brin dans l'ADN, ce qui entraîne soit le passage ATP-indépendant de l'autre brin à travers la coupure simple-brin (pour les enzymes de type IA), soit la libre rotation autour de l'autre simple brin (pour les enzymes de type IB). La variation d'indice d'enlacement vaut $\Delta Lk = \pm 1$ pour les enzymes de type IA, alors qu'elle peut être beaucoup plus importante pour les enzymes de type IB (voir figure 1.3) : $\Delta Lk = \pm n$, avec n entier.

On trouve des topoisomérases de type IA à la fois chez les eucaryotes (par exemple, la topo 3 humaine) et les procaryotes (par exemple, la topo 1 et la topo 3 de *E. coli*). Les alignements de séquence montrent une origine commune de ces enzymes et de grandes similarités de structure[17]. Par contre, les topoisomérases de type IB n'existent que chez les eucaryotes (comme par exemple

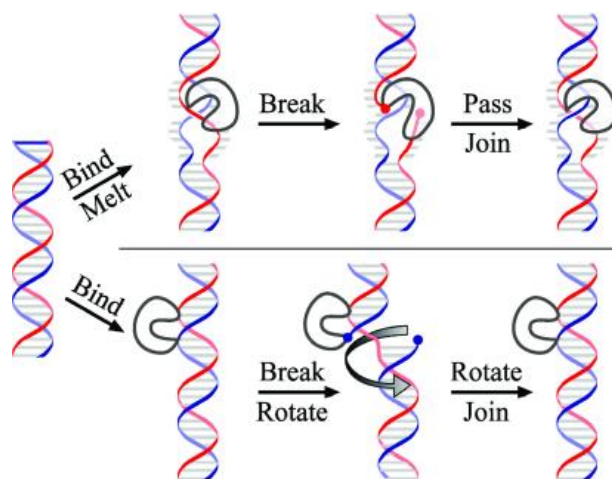


FIG. 1.3 – **Mécanisme proposé pour la relaxation du super-enroulement par les topoisomérases de type I.** En haut : les topoisomérases de type IA s'insèrent dans la double hélice en la faisant fondre localement. Elles opèrent ensuite une coupure simple-brin dans l'ADN, et font passer l'autre brin à travers. L'inversion d'un croisement d'ADN change l'indice d'enlacement d'une unité. Sur le schéma, $\Delta Lk = +1$. En bas : le mécanisme proposé pour les topoisomérases de type IB est basé sur une libre rotation de l'ADN autour du squelette sucre-phosphate, une fois l'autre brin coupé par l'enzyme. Schéma tiré de [25].

la topo 1 humaine) et leur structure est très différente des topoisomérases de type 1A. Bien évidemment, il existe une exception, la topo V, une topo 1B hyperthermophile, que nous ne prendrons pas en considération.

La quasi-totalité des topoisomérases de type I ne nécessitent pas de cofacteur énergétique (ATP) pour effectuer leur cycle enzymatique (à l'exception d'une topoisomérase assez singulière, la reverse gyrase). Ces enzymes travaillent donc à l'équilibre thermodynamique. En conséquence, elles agissent comme des catalyseurs passifs de réactions thermodynamiquement possibles. C'est l'énergie libre de super-enroulement d'une molécule d'ADN super-enroulée qui conduit la réaction.

1.2.2.2 Type II

Les topoisomérases de type II, qui sont toujours des dimères ou des tétramères, effectuent un clivage double-brin dans un segment d'ADN, appelé segment G (pour *Gate*). Cette coupure est opérée par deux groupements tyrosines (appartenant à deux sous-unités identiques de l'enzyme) sur chaque squelette de la molécule d'ADN. Cette coupure permet le passage au travers du segment G de l'autre segment d'ADN, appelé segment T (pour *Transport*), comme le montre la figure 1.4.

Le passage d'un double-brin à travers l'autre entraîne un changement de l'indice d'enlacement d'exactly 2 unités dans une molécule super-enroulée, comme le montre la figure 1.5 : $|\Delta Lk| = 2$. Cependant, ce mécanisme leur permet aussi de décaténer des molécules d'ADN liées. Dans ce cas, la variation d'indice de caténation est d'une unité : $|\Delta Ca| = 1$.

Le fonctionnement de ces enzymes nécessite l'hydrolyse de deux molécules d'ATP. On trouve des topoisomérases de type II chez les eucaryotes (topo 2) comme chez les procaryotes (topo 4 et gyrase).

1.2.3 topoisomérases procaryotes

Il existe (en général) deux topoisomérases de Type I et deux topoisomérases de type II chez les procaryotes. Dans la section qui suit, nous décrirons le cas simple et représentatif d'*E. coli*.

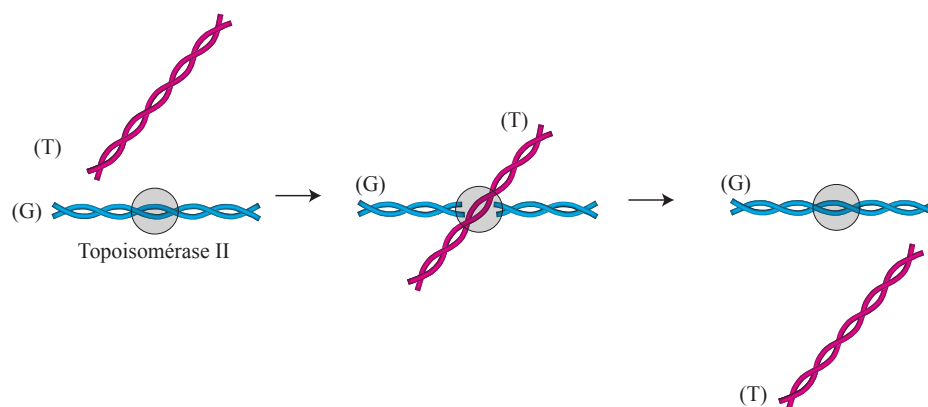


FIG. 1.4 – **Mécanisme schématique des topoisomérases de type II.** En opérant une coupure double-brin dans un segment d'ADN (G), les topoisomérases de type II peuvent faire passer un autre segment (T) à travers, puis resouder le brin (G).

1.2.3.1 topo 1

La topo 1 de *E. coli* (aussi appelé protéine ω) fut la première topoisomérase dont l'activité fut identifiée [140]. C'est une topoisomérase de type IA, monomérique. Son activité *in vivo* consiste essentiellement à relaxer l'excès de super-enroulement négatif généré par la gyrase[17]. Cependant, des études *in vitro* [59, 25] ont montré que l'enzyme est capable de relâcher une contrainte de torsion positive, pourvu qu'il y ait dans la molécule une partie simple brin nécessaire à l'accrochage de l'enzyme. Une étude récente en molécule unique[25] semble appuyer le modèle selon lequel l'enzyme effectue le passage contrôlé d'un segment simple brin à travers une césure dans un segment simple brin. Enfin, cette enzyme est capable de nouer et dénouer des molécules circulaires simple brin[69], et catalyse aussi la fusion de deux cercles d'ADN double-brin, pourvu que l'un d'eux possède un nick (c'est-à-dire une cassure simple-brin).

1.2.3.2 topo 3

La topo 3 [112] est une topoisomérase de type IA très similaire à la topo 1. Pourtant, il semble que son mécanisme et son rôle soient très différents : son activité *in vitro* de décaténation est 10 fois meilleure que son activité de relaxation des supertours : la relaxation du super-enroulement nécessite que le degré de super-enroulement soit très supérieur à celui rencontré dans la cellule[26]. Par contre, la progression de la fourche de réplication est possible en sa seule présence, ce qui n'est pas le cas avec la topo 1[51, 49].

In vivo, il est probable que la topo 3 décatène les précatéanes en agissant à proximité de la fourche de réplication, où les molécules nouvellement synthétisées présentent des régions simple brin.

1.2.3.3 Gyrase

La gyrase fut la première topoisomérase de type II à être identifiée[41]. Sa découverte provoqua un grand intérêt, à cause de sa capacité unique à générer le super-enroulement négatif observé chez les bactéries. Cette enzyme est un hétérotétramère de type A_2B_2 , dont les sous-unités sont codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*[92]. Ces gènes ont une grande homologie avec les gènes codant les autres topoisomérases de type II, comme la topo 2 et la topo 4. Pourtant, leurs mécanismes, mais surtout leurs fonctions biologiques, sont sensiblement différents. La gyrase est capable de relâcher le super-enroulement positif qui se produit lors de la progression de la fourche de réplication (vitesse 0.3

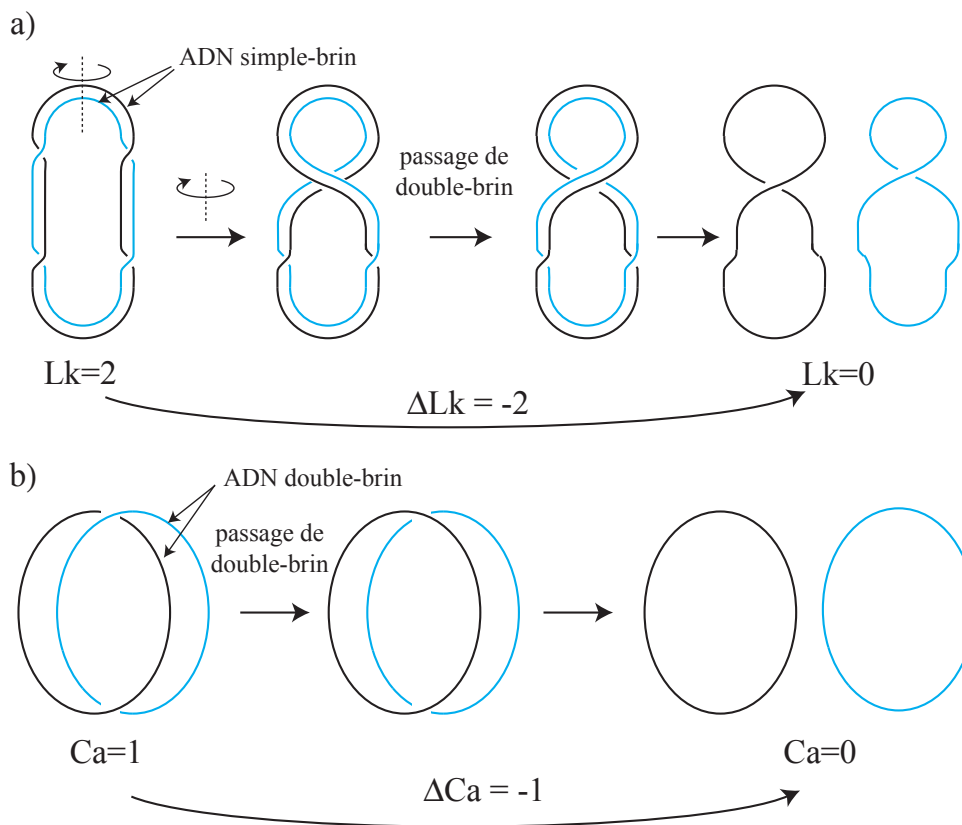


FIG. 1.5 – **Changements topologiques consécutifs à l'action d'une topoisomérase de type II.** a) Considérons une molécule d'ADN circulaire et fermée hypothétique pour laquelle $Lk = 2$. Le passage d'un double-brin au niveau d'un croisement (obtenue en vrillant la molécule) entraîne la possibilité de séparer complètement les deux simple brins : la variation d'indice d'enlacement ΔLk est exactement de deux unités. b) Pour deux molécules double-brin circulaires caténées, le passage d'un double brin à travers l'autre modifie l'indice de caténation Ca d'une unité.

événements/minutes), alors qu'elle a beaucoup plus de mal à décaténer les molécules d'ADN en aval de la fourche de réplication[52]. Elle est également capable de sous-enrouler processivement l'ADN jusqu'à $\sigma \approx -0.11$, chaque cycle entraînant une variation d'indice d'enlacement $\Delta Lk = -2$.

Cette capacité à sous-enrouler l'ADN est liée à un mécanisme particulier d'accrochage sur son substrat. Selon le modèle de Kampranis et al. ([55] voir figure 1.6), l'enzyme enroule l'ADN autour d'elle en formant une hélice (enroulée à droite) de writhe $Wr \approx +1$ et d'environ 140 bp d'ADN[55]. L'accrochage d'ATP, qui entraîne la dimérisation des sous-unités portant l'activité ATPase, permet la capture du segment T, alors qu'une coupure est opérée dans le segment G. Ainsi, le passage de brin et l'inversion du croisement est rendue possible.

L'enroulement solénoïdal chirale impose que la réaction ne se produise que dans le sens du sous-enroulement ($\Delta Lk < 0$). La forte courbure locale appliqué à l'ADN favorise la capture d'un segment T proche du segment G. En conséquence, la génération de sous-enroulement est facile, alors que la décaténation, qui met en jeu des segments G et T qui peuvent être distants, est défavorisée.

Le domaine responsable de l'association solénoïdale de l'enzyme sur l'ADN est la partie C-terminal[92]. Sa déletion[56] entraîne une incapacité de l'enzyme à sous-enrouler l'ADN. Par contre, elle devient alors une excellente décaténase, par exemple capable de compléter les mutations dans la topo 4[56].

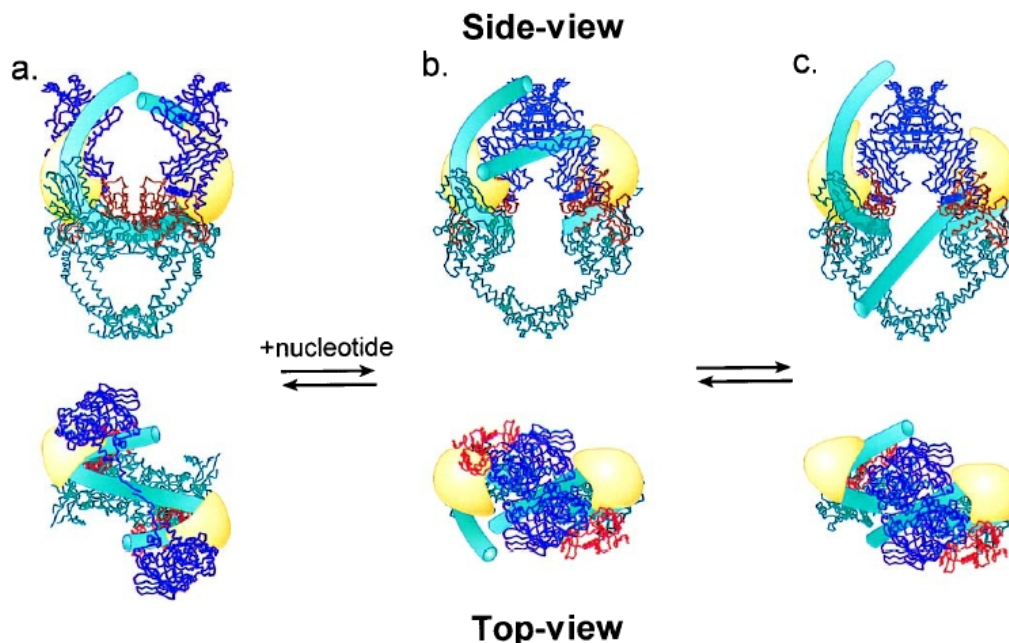


FIG. 1.6 – **Modèle de passage de brin par la gyrase.** Schéma tiré de [55], sur la base de données structurales partielles des sous-unités GyrA (en bleu clair) et GyrB (en violet) de l'enzyme. La partie en rouge est un morceau homologue de la topo 2 de levure, qui n'a pas été cristallisé chez la gyrase.

1.2.3.4 topo 4

La topo 4 est l'autre topoisomérase de type II présente dans les organismes procaryotes. C'est un hétérotétramère, comme la gyrase, composé de deux sous-unités codé par les gènes *parE* et *parC*. Cette dénomination des gènes est due au fait que, historiquement, l'analyse de phénotypes présentant des défauts de partitionnement des chromosomes a montré l'implication de ces gènes[57]. *parE* et *parC* sont homologues de respectivement *gyrB* et *gyrA*, comme le montre la figure 1.7 [17]. Il n'existe pas encore de structure pour les sous-unités de la topo IV.

Bien qu'elle partagent environ 40% d'homologie avec la gyrase, leur mécanisme et leurs fonctions cellulaires semblent être très différentes[52, 127]: la topo 4 semble être une bonne décaténase, comparé à la gyrase (70 fois plus d'activité que la gyrase, environ 5 événements par minutes selon [52]). Elle serait donc impliquée davantage dans la séparation des brins nouvellement répliqués en aval de la fourche de réplication. Au contraire, la gyrase est plus efficace pour relaxer le super-enroulement positif, par rapport à la topo 4 (qui relaxerait à environ 0.15 événements par minute, soit 3 fois moins que la gyrase [52]). Elle serait alors plus à même d'assurer la relaxation du super-enroulement positif généré lors de la progression de la fourche de réplication. Cette différence d'activité est aussi appuyée par un meilleur accrochage de la topo 4 sur des molécules caténées (constante de dissociation $K_d = 4$ nM) que sur des molécules super-enroulées positivement ($K_d = 22$ nM).

En conséquence, le modèle généralement admis pour expliquer la séparation des chromosomes au cours du processus de réplication serait le suivant: au début de la phase de réplication, lorsque la partie non-répliquée du chromosome est importante, la gyrase générerait du sous-enroulement en amont de la fourche. En fin de la phase de réplication, par contre, lorsque la partie non-répliquée devient trop petite, la décaténation des brins nouvellement synthétisés par la topo 4 serait le processus majoritaire de séparation. Des expériences récentes *in vivo* montrent d'ailleurs que l'activité de la topo 4 pourrait être localisée dans le temps vers la fin de la réplication[29]. Des études de la réplication de plasmides (ADN circulaire fermé) dans des extraits cellulaires d'oeufs de Xénope montrent

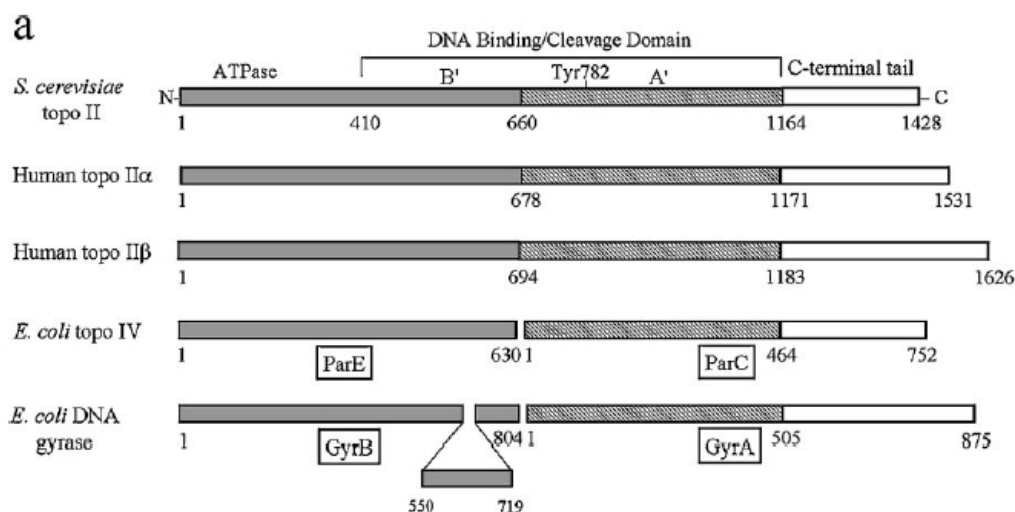


FIG. 1.7 – **Comparaison de séquence entre les topoisomérases de type II.** Les parties grisées indiquent des régions de forte homologie. Schéma tiré de [17].

que la topo 2 (homologue eucaryote de la topo 4) agit exclusivement en aval de la fourche de réplication pour séparer les chromosomes[72]. Cependant, en l'absence de gyrase, la topo 4 est capable d'assurer seule le bon déroulement de la phase d'élongation dans la réplication *in vitro* [50] et partiellement *in vivo* [58]. Pour ce faire, la topo 4 doit être capable d'assurer en partie le rôle de relaxation du super-enroulement positif de la gyrase.

Enfin, d'autres expériences ont montré que la topo 4 était capable, au même titre que la topo 1, de relaxer le super-enroulement négatif de l'ADN à une vitesse d'environ 0.8 cycles/minute [149]. Il fut ainsi proposé que le rôle de la topo 4 ne se limite pas à la décaténation, mais assure aussi un rôle de régulateur du sous-enroulement généré par la gyrase.

1.2.3.5 Résumé

La figure 1.8 résume les différentes topoisomérases et leur rôle cellulaire présumé, en particulier au cours du processus de réplication. Les enzymes testées ou étudiées au cours de cette thèse sont marquées en bleu. Pour une étude du mécanisme en molécule unique des topo 1A procaryotes, se référer aux travaux de Nynke Dekker[25].

1.2.4 topoisomérases eucaryotes

Les eucaryotes possèdent généralement deux topoisomérases de type I et une topoisomérase de type II (certains eucaryotes supérieurs possèdent en fait deux types de topo 2 et de topo 3 que nous n'évoquerons pas).

1.2.4.1 topo 3

Cette topo 3 est une topoisomérase de type IA homologue de la topo 3 procaryote. Chez les levures, la mutation de cet enzyme entraîne des phénotypes plus ou moins affectés[17] par son absence. Par contre, il semble clairement établi qu'elle joue un rôle important lors de la recombinaison et la réplication. En particulier, il semble qu'elle fonctionne de concert avec les hélicases de la famille RecQ[62, 47].

	Enzyme	Structure	ATP	Fonction
Type I	Topo I (type IA)	monomère	non	relaxation de l'excès de supertours (-)
	Topo III (type IA)	monomère	non	décatéation derrière la fourche de réplication
Type II	Gyrase	hétéro-tétramère	oui	Génération de supertours (-) Relaxation des supertours (+)
	Topo IV	hétéro-tétramère	oui	Décatéation Relaxation des supertours (+)

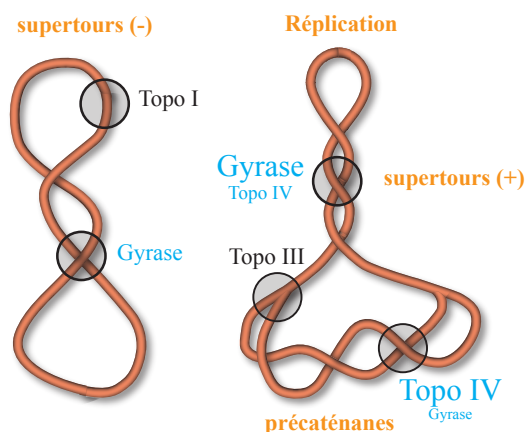


FIG. 1.8 – Résumé de l'action des différentes topoisomérases, en particulier au cours la réplication.

1.2.4.2 topo 1B

Les topoisomères 1B possèdent un mécanisme très différent des topoisomères 1A. La structure atomique d'une topoisomère 1B humaine accrochée à l'ADN[91] a permis de suggérer un mécanisme de rotation libre pour cette enzyme[113], après accrochage de l'enzyme sur l'ADN. La religation de l'ADN met fin à la rotation de la molécule d'ADN. L'enzyme est donc capable de relaxer aussi bien les supertours (+) que les supertours (-). Son rôle serait de relaxer la contrainte de torsion lors de la réplication, mais elle interviendrait également lors de la transcription.[17].

1.2.4.3 topo 2

La topoisomère 2 est la seule enzyme de type II chez les eucaryotes (même si elle se distingue en deux sous-types chez certains eucaryotes supérieurs). Sa structure est composée de deux sous-unités identiques (voir figure 1.7).

Une partie importante de la topoisomère 2 de levure (792 acides aminés) a été cristallographiée avec une résolution de 2.7 [9]. Cette structure (voir figure 1.9) laisse entrevoir une large cavité permettant le passage du segment T, et des similarités évidentes avec la structure partielle de la gyrase.

In vivo, les topoisomères 2 prennent en charge la décatéation de l'ADN lors de la mitose, et leur absence entraîne la mort de la cellule[141]. Elles sont également capables de relaxer le super-enroulement positif ou négatif. Elles pourraient être impliquées activement dans la régulation et le conditionnement de l'état de la chromatine.

La topoisomère 2 de levure a fait l'objet de nombreuses études biochimiques visant à comprendre le mécanisme de leur fonctionnement. Le chapitre 2 est consacré à la description du cycle enzymatique.

1.2.4.4 Résumé

La figure 1.10 résume les différentes topoisomérases et leur rôle cellulaire présumé. Les enzymes testées ou étudiées au cours de cette thèse sont marquées en bleu.

1.3 Questions fondamentales

Nous nous sommes attachés à décrire les différentes topoisomérases pour donner une vue d'ensemble de ces enzymes, mais nous allons maintenant ne considérer que les topoisomérases de type

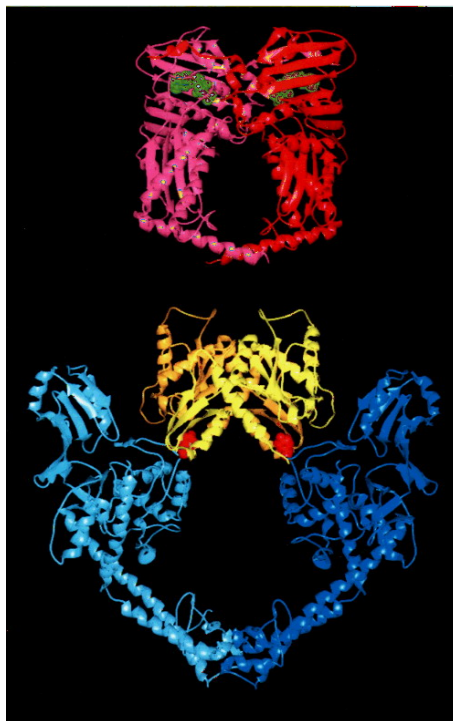


FIG. 1.9 – **Structure de la topo 2 de levure.** Image tirée de [9]

II. Les questions soulevées par celles-ci sont de plusieurs ordres.

D'abord, se posent des problèmes liés au cycle enzymatique de l'enzyme : quel est le rôle de la consommation d'ATP dans le mécanisme ? Quel couplage existe-t-il entre l'hydrolyse de l'ATP et le passage du segment T à travers le segment G ? Quelles sont les étapes élémentaires du cycle et comment les mettre en évidence ? Nous aborderons ces questions au chapitre 2, à travers la description de mutants de la topo 2, l'analyse en Fourier de signaux enzymatiques et la modélisation du cycle.

Ensuite, certaines topoisomérases de type II, comme la topo 4, présentent des comportements tout-à-fait différents suivant la topologie des molécules d'ADN qui leur sont proposés. Le chapitre 3 est ainsi consacré à la mise en évidence de cette activité chirale. Ces enzymes donnent un exemple des capacités de "reconnaissance" dont sont capables les topoisomérases de type II.

Plus généralement, comprendre comment une enzyme qui agit localement peut "appréhender" la topologie globale de l'ADN reste une question majeure non-résolue. La capacité qu'ont les topoisomérases à simplifier la topologie de l'ADN en dessous de l'équilibre thermodynamique en est une illustration flagrante[102]. Ces questions, avec les réponses que nous avons tenté d'apporter, font l'objet du chapitre 4.

Enfin, au cours du chapitre 5, nous montrons quelques expériences préliminaires réalisées avec la gyrase, qui permettent d'établir un parallèle avec le comportement de la topo 4.

	Enzyme	Structure	ATP	Fonction
Type I	Topo I (type IB)	monomère	non	relaxation des supertours (-) et (+)
	Topo III (type IA)	monomère	non	activité en association avec RecQ
Type II	Topo II (levure et drosophile)	homo- dimère	oui	Relaxation des supertours (+) et (-) Décaténation

FIG. 1.10 – Liste des topoisomérases eucaryotiques.

Chapitre 2

Etude des propriétés cinétiques et du mécanisme des topo 2

Des études biochimiques ont permis la caractérisation des différentes étapes cinétiques et mécaniques qui composent le cycle. Cependant, le rôle joué par l'hydrolyse de l'ATP reste mal déterminé. Dans ce contexte, les expériences sur molécules uniques offrent une nouvelle approche pour appréhender le fonctionnement cinétique et mécanique de ces enzymes. A travers le suivi en temps réel de l'action d'une seule topoisomérase, elles permettent de caractériser la dynamique de ces enzymes en s'affranchissant des effets de moyennage. En particulier, elles mettent en lumière le caractère stochastique de ces moteurs moléculaires.

Dans une première partie, nous présentons le cycle enzymatique supposé des topoisomérases de type II. Puis, nous décrivons le principe des expériences de relaxation du super-enroulement par micromanipulation d'ADN. Nous montrons comment l'analyse des signaux de relaxation nous donne des renseignements importants comme la vitesse de l'enzyme. Par ailleurs, l'analyse par transformée de Fourier des traces enzymatiques permet de quantifier le rapport signal/bruit de notre dispositif, mais aussi mesurer la stochasticité du cycle enzymatique. Dans des conditions appropriées, il est possible de suivre en temps réel chaque cycle enzymatique. La mesure de la variation de la vitesse de l'enzyme avec la concentration d'ATP confirme la coopérativité d'accrochage de deux molécules d'ATP par cycle, et valide un modèle cinétique proposé par Harkins *et al.*[46, 45]. D'autre part, nous présentons des expériences réalisées sur un mutant de la topoisomérase II, qui ne peut hydrolyser qu'une seule molécule d'ATP. Enfin, notre dispositif nous permet de regarder l'influence de la force d'étirement sur l'activité de l'enzyme, qui semble très différente entre les topoisomérases procaryotes et eucaryotes.

2.1 Le cycle enzymatique des topo 2

Le cycle enzymatique des topoisomérases de type II est partiellement connu, grâce notamment à la résolution de la structure[9], à des études basées sur l'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP (comme l'AMPPNP), ou la décaténation de cercles d'ADN radiomarqués[96, 97, 95]. Plus récemment, des expériences d'analyse de régime transitoire de l'accrochage et de l'hydrolyse d'ATP par la topo 2 ont donné des informations contradictoires sur le déroulement du cycle[46, 45, 6, 5].

Le fonctionnement de l'enzyme repose sur un mécanisme dit "à deux portes"[95], comme le montre la figure 2.1.

La première étape du cycle correspond à l'accrochage non covalent d'un premier segment d'ADN, qui devient le segment G (en vert) qui sera clivé par la suite (enzyme au sommet de l'image). Ce segment accède au site catalytique de clivage (qui contient les tyrosines) via l'interface N-terminal du dimère (en orange et rouge). Des expériences de digestion par la nucléase ont montré que la topo

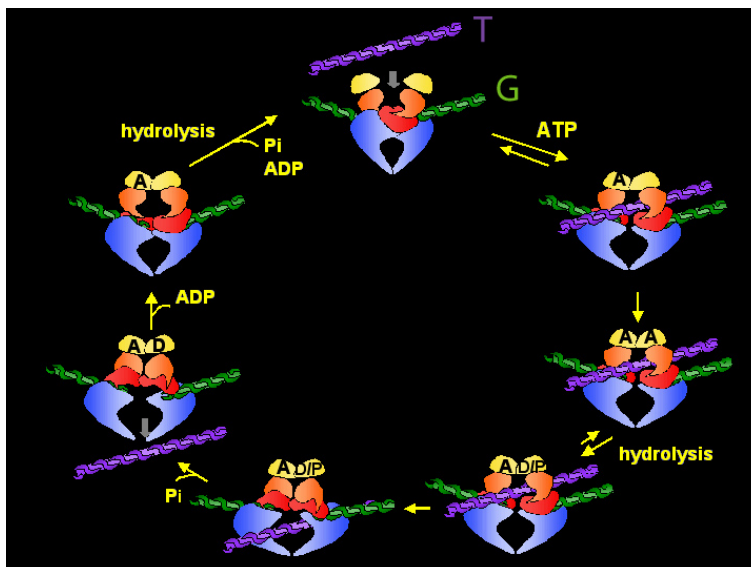


FIG. 2.1 – **Modèle du cycle enzymatique de la topo 2.** Image empruntée à Janet Lindsley.

2 protège une région de l'ordre de douze paires de bases de chaque côté du site de clivage [63]. Ceci laisse penser que l'interaction est locale, contrairement à la gyrase qui protège 140 paires de bases.

Un deuxième segment, le segment T (en violet) doit être fixé par l'enzyme. L'accrochage d'une molécule d'ATP (notée "A" sur le dessin) ou d'un analogue (par exemple, l'AMPPNP) permet la dimérisation des extrémités N-terminal (en jaune) de l'enzyme, bloquant ainsi le départ d'un segment T arrivé par l'extrémité N-terminal[96]. L'utilisation d'analogues non-hydrolysables permet ainsi de bloquer irréversiblement cette porte[96]. Si deux molécules d'ATP doivent être hydrolysées pour obtenir la complétion du cycle, l'accrochage d'une seule molécule d'ATP est suffisant pour observer le changement conformationnel entraînant la dimérisation de l'interface N-terminal[67]. Cependant, l'accrochage de la deuxième molécule d'ATP se fait de manière coopérative[68], et il semble que l'hydrolyse de l'un ou des deux ATP intervienne seulement après ce double accrochage[46].

S'ensuit le clivage du segment G, en deux points distants de quatre bases[71, 63], selon un mécanisme impliquant l'attaque des tyrosines sur le squelette de l'ADN. L'enzyme semble avoir quelques séquences préférentielles[111, 104] de clivage, mais elle est capable d'agir sur tous les sites qui lui sont présentés. L'étape de clivage nécessite la présence de Mg^{2+} dans la solution [86, 88]. Il existe un équilibre entre clivage et ligation qui semble être déplacé dans le sens de la ligation, impliquant que l'ADN ne soit clivé que très transitoirement. Le clivage peut donc se produire en l'absence d'ATP, mais celui-ci stimule d'un facteur 2 cette réaction[104].

Le passage du segment T à travers la coupure dans le segment G peut s'effectuer sans hydrolyse d'ATP : des expériences utilisant des analogues non-hydrolysables de l'ATP montrent que l'enzyme peut effectuer un cycle unique (et ainsi assurer par exemple la décaténation de plasmides[123, 87]). En conséquence, l'hydrolyse des deux molécules d'ATP et le relargage de l'ADP et des phosphates seraient liées uniquement au réamorçage de l'enzyme en vue d'un nouveau cycle (impliquant la réouverture de l'interface N-terminal)[9, 14].

Cependant, d'autres expériences basées sur l'analyse du régime transitoire correspondant à l'hydrolyse de l'ATP par l'enzyme montrent que l'hydrolyse d'une seule molécule se produit rapidement après le début du cycle, l'autre étant plus tardive[46, 45]. Des expériences plus récentes, qui confirment ces résultats, semblent aussi indiquer que l'hydrolyse du premier ATP améliore considérablement la cinétique du transport du segment T à travers le segment G[6] (voir aussi la section 2.8 consacrée aux mutants). Si la réaction est possible en l'absence d'hydrolyse (à une vitesse très

faible), l'hydrolyse constitue quand même une étape normale du mécanisme, et l'utilisation d'analogues non-hydrolysable change peut-être le mécanisme[98]. Cependant, ces observations amènent naturellement à la question suivante : comment une enzyme dont la structure est symétrique peut-elle avoir une mécanisme d'hydrolyse séquentiel de l'ATP? L'accrochage du premier ATP suffit-il à briser la symétrie?

Une fois que le segment T est passé, il est éjecté de la protéine via l'interface C-terminal (en bleu sur le schéma de la figure 2.1). L'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP serait impliquée dans le réamorçage de l'enzyme, qui nécessite la séparation des ses extrémités N-terminal. Une fois l'enzyme revenue dans son état initial, elle peut recommencer un cycle.

2.2 Relaxation du super-enroulement en molécule unique

La micromanipulation d'une molécule unique d'ADN super-enroulée nous permet de suivre en temps réel l'activité d'une topoisomérase. La conception et la mise en oeuvre initiale de cette expérience est due à Terence Strick lors de sa thèse au laboratoire[122]. Après en avoir décrit le principe, nous attachons à démontrer son intérêt pour la compréhension du cycle enzymatique.

Le principe de l'expérience est le suivant (voir figure 2.2 pour un exemple avec la topo 2 sauvage (WT) de *S. cerevisiae*) : nous partons d'une molécule d'ADN relaxée et étirée à une force de l'ordre de 1 pN. En commandant aux aimants une rotation de 50 tours (à une vitesse d'environ 1 tour par seconde), nous super-enroulons l'ADN, ce qui a pour effet de réduire son extension. Après un certain temps d'attente (réglé par la concentration d'enzyme en solution, typiquement quelques dizaines de pM), une enzyme fixée sur l'ADN commence à relaxer le super-enroulement. En conséquence, l'extension de l'ADN augmente jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de plectonèmes dans la molécule.

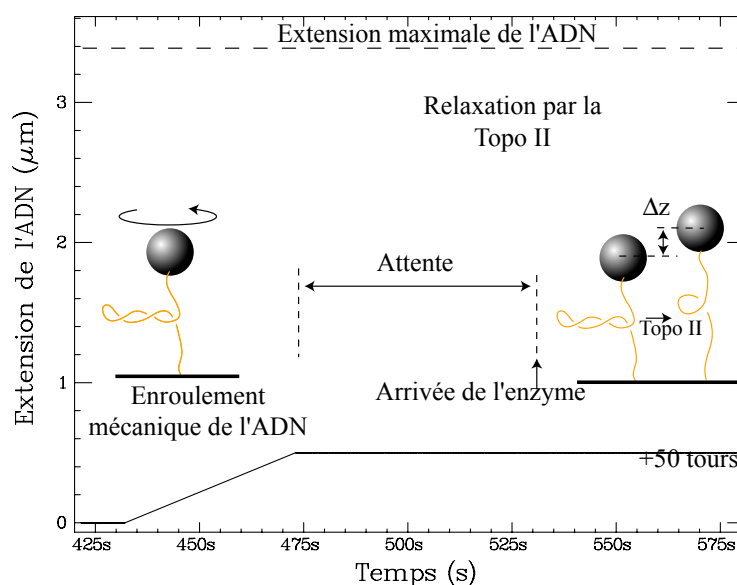


FIG. 2.2 – **Relaxation du super-enroulement par une topoisomérase II unique.** Expérience réalisée sur la topoisomérase sauvage (WT) de levure, de la même manière que dans [122]. La force est de l'ordre de 1 pN; la concentration d'ATP est 1 mM (ATP saturant); L'ADN fait 11 kb.

La phase d'attente doit être bien plus longue que la phase de relaxation pour garantir qu'une seule enzyme à la fois n'agisse sur l'ADN. Dans ce cas, l'expérience permet de déduire la vitesse moyenne de l'enzyme : sur la figure 2.2, 50 tours relâchés en environ 20 secondes par l'enzyme. Puisque l'enzyme est censée relaxer 2 tours à chaque cycle enzymatique, la vitesse est de l'ordre de 1.25 cycles/s.

Cette expérience montre également que l'enzyme agit de manière processive (la processivité ne peut d'ailleurs pas être mesurée dans ces conditions, car le nombre de tours créés mécaniquement semble être systématiquement inférieur à la processivité de l'enzyme). En conséquence, la probabilité pour que l'enzyme se décroche entre deux cycles enzymatiques semble être assez faible. Pour réellement mesurer la processivité, il faut être capable d'enrouler rapidement la molécule au fur et à mesure qu'elle est déroulée par l'enzyme. Des expériences préliminaires de ce type, que nous avons réalisées avec la topo 2 de drosophile, et qui sont basées sur une retroaction entre l'extension de la molécule et la rotation des moteurs (qui doit être rapide ~ 10 tour par secondes), semblent indiquer que la processivité est de l'ordre d'une centaine de cycles. Ceci est compatible avec d'autres expériences de molécules uniques[115].

2.3 Cycles enzymatiques uniques

Dans le cas idéal, compte tenu du mécanisme attendu pour les topo 2, le signal de relaxation devrait être une suite de marches discernables dont la taille correspondrait à deux boucles plectonémiques ($\Delta Lk = 2$). En pratique, bien que l'on observe une augmentation de l'extension de l'ADN, le rapport signal/bruit nous interdit d'observer directement les sauts d'extension (et donc la séquence des cycles enzymatiques). Ceci est dû à la fois au bruit de notre senseur (système bille + ADN) et à la vitesse trop importante de l'enzyme.

Par contre, en se plaçant dans un régime où la concentration d'ATP est faible ($[ATP] = 10\mu M$), on peut réduire la fréquence caractéristique des marches et les faire sortir du bruit expérimental (comme nous le verrons plus loin, certaines étapes du cycle enzymatique sont influencées par la concentration d'ATP). La figure 2.3 montre ainsi une relaxation typique observée dans $10\mu M$ d'ATP par la topo 2 de drosophile (expérience de Strick *et al.*[122]). L'extension d'une molécule d'ADN super-enroulée (11kb) augmente par sauts isolés de 90 nm, ce qui correspond à deux fois la variation de longueur observée lors de l'ajout d'une unité d'enlacement (à 0.7 pN).

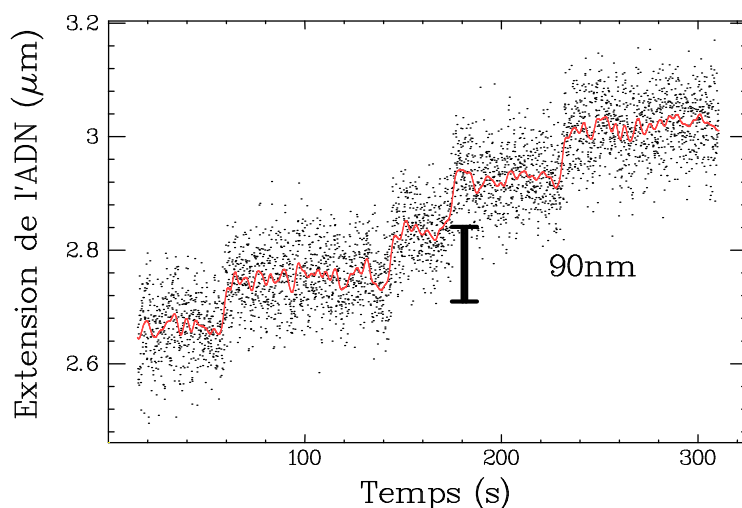


FIG. 2.3 – **Observation de cycles individuels de la topoisomérase II de drosophile.** L'expérience, qui est tirée de [122], est réalisée à 0.7 pN dans $10\mu M$ ATP. La ligne rouge est un filtrage passe-bas du signal brut (25 Hz) à 1 Hz. On distingue clairement des sauts de 90 nm, qui correspondent à deux boucles plectonémiques.

En conséquence, cette expérience est une démonstration directe du mécanisme d'inversion de croisement des les topos 2.

Par ailleurs, le fait de distinguer des marches permet de mesurer la durée des cycles enzymatiques

(durée entre chaque marche). Ainsi, l'observation du signal de relaxation dans l'espace réel peut donner accès à la distribution des durées de cycle. Celle-ci est reliée au mécanisme cinétique par lequel l'enzyme effectue sa catalyse (comme nous le détaillerons plus loin). Par exemple, si c'est une exponentielle, cela signifie qu'il existe une étape cinétique qui limite l'avancée du cycle. Il peut s'avérer être intéressant d'essayer d'identifier les étapes limitantes à différentes concentrations d'ATP. Malheureusement, comme nous l'avons vu, lorsque l'on augmente la concentration d'ATP, le rapport signal sur bruit de notre dispositif noie les sauts enzymatiques dans le bruit, et l'analyse des durées de cycle devient impossible à partir des traces en temps réel.

2.4 Article : On the relation between noise spectre and the distribution of time between steps for single molecular motors

L'article qui suit présente une méthode d'analyse par transformée de Fourier du signal de relaxation bruité. Cette méthode a plusieurs objectifs : d'abord, en utilisant une analogie avec le bruit de grenaille, elle permet de caractériser la signature spectrale d'un signal enzymatique typique qui serait constitué d'une suite de marche de taille donnée additionnée d'un bruit gaussien.

Elle montre que la partie basse fréquence du spectre des fluctuations de vitesse de l'enzyme est dominée par un terme lié à la présence des marches, dont la hauteur peut ainsi être déterminée même si elles sont invisibles dans l'espace réel (sous l'hypothèse que l'enzyme est poissonnienne).

Par ailleurs, connaissant la hauteur des marches (ce qui est le cas pour la topo 2), cette méthode permet de caractériser la distribution des temps de cycles enzymatiques en calculant un paramètre appelé stochasticité (noté r pour *randomness*) [124, 81], qui est directement lié au nombre d'étapes limitantes dans le cycle.

Enfin, elle quantifie le rapport signal/bruit et définit ainsi les conditions nécessaires à l'observation des marches dans l'espace réel.

On the Relation Between Noise Spectra and the Distribution of Time Between Steps for Single Molecular Motors

G. Charvin, D. Bensimon and V. Croquette

Correspondence

Gilles Charvin

LPS, ENS, UMR 8550 CNRS

24 rue Lhomond

75231 Paris Cedex 05

France

phone +33-144-323496

fax +33-144-323433

email Gilles.Charvin@lps.ens.fr

web <http://www.lps.ens.fr/~charvin>

submitted 20 Dec 2001

accepted 25 Jan 2002

published 06 Feb 2002

keywords molecular motors, steps

Abstract

A large class of molecular motors (kinesin, dynein, myosin, RNA-polymerase, helicase, F1-ATPase, etc.) consists of enzymes that proceed by successive steps of fixed size. We hereby address the relation between the statistics of the time between steps and the power spectrum of the enzyme's displacement in the presence of strong instrumental noise. From the recordings of the noisy signal of an enzyme, an algorithm is provided to deduce its step size and to characterize the distribution of its stepping probability.

Introduction

In contrast with bulk measurement where one measures the mean activity of a large population of enzymes, single molecule observations can yield the probability distribution of enzymatic activities [1, 2]. The measurement of that distribution provides one with a wealth of information on the enzymatic mechanism: the number of inner states, the transition rates between those states, the number of ATP molecules consumed per cycle, the step size, etc.. In the context of neurophysiology, the statistical analysis of the ionic currents flowing through a single channel in a membrane, typically in the form of a noisy telegraphic signal, has yielded precious and unique information on the dynamical states of the channels, their sensitivity to drugs and to voltage. This information was blurred or lost when the average current flowing through a large ensemble of channels was measured, as was common until 25 years ago when the patch clamp technique was developed by Neher and Sakman.

The development of new tools to manipulate, visualize and study single molecules and their interactions are enlarging the scope of these studies from single ionic channels to a variety of molecular motors and enzymes. The statistical analysis of the measured signals allows one to learn about the step size of molecular motors, their energy (e.g. ATP) consumption rate, the rate limiting steps in the enzymatic kinetics and in general to test and build better models of how these enzymes function. Thus a great deal has been learned in recent years on the mechano-chemical coupling in the enzymes responsible for muscle contraction (actin/myosin), transport in the cell (kinesin/tubulin), energy generation (F1-ATPase), DNA replication, transcription, unknotting and unwinding (DNA and RNA polymerases, topoisomerases, helicases), etc.

In many of the systems studied the measured signal consists of a series of consecutive noisy steps of fixed size. Thus kinesin proceeds along microtubules by 8 nm steps coupled to the hydrolysis of one ATP molecule [3]. The F1-ATPase system consumes one ATP per rotational step of 120°[4]. Type II topoisomerases (topoII) relax supercoiled DNA by 2 turns per cycle and consume two ATP molecules in the process. Although topoisomerases II are not known to step on DNA, their relaxation of DNA supercoiling results in a quantised increase in the molecule's extension observable as steps. In these experiments, the measured signal (a linear or rotational displacement of a microscopic sensor, usually a small bead) is accompanied by a large amount of white noise due to the brownian motion of the sensor. Except in cases where the signal to noise ratio was very large (or by averaging or filtering), it has been difficult to extract from these experiments the probability distribution of enzymatic activities, i.e. the time between steps. In this paper we would like to propose a very general method to circumvent this problem, namely to relate this kind of data (i.e. successive noisy steps) to the probability distribution of time between steps when the S/N ratio is low and steps are not easily identified. This method is based on the fact that due to their different statistics, signal and noise have different power spectra and they can be identified and characterized in Fourier space. A related analysis in the time domain has been proposed by S.M. Block and coworkers [5,6] They have characterized the enzymatic duty cycle by the randomness parameter, the ratio r between the variance and the mean of the number of steps ($r=1$ for a Poisson process and zero for a periodic one).

A similar statistical approach has in fact been proposed a long time ago in an other physical context. In 1918, W. Schottky showed that the density spectrum of the shot noise associated to a current flowing in a vacuum diode allowed one to measure the electron's charge even though the detector's noise was too large to observe the transit of a single electron [7]. That approach was later used to characterize the statistics of photons emitted from various sources. For that purpose, physicists have introduced the so-called *Fano factor* [8], the ratio between the variance and the mean of the number of photons n :

$$Fn(D) = \frac{Var(n)}{\langle n \rangle} \quad (1)$$

which is nothing but the randomness parameter r defined by Svoboda and Block [6] in a biophysical context. Depending on the light source, photons were found to be bunched or antibunched corresponding to sub-Poisson $r > 1$ or super-Poisson $r < 1$ statistics (for a review see [9]). In the following we will approach this characterization of the statistics of steps (or photons or electrons) from a signal analysis in the frequency domain. We shall exemplify its use in the study of a type II topoisomerase.

Poissonian Stepping Process

Let $x(t)$ be the signal obtained from an enzyme (e.g. kinesin) performing a series of n steps of fixed size ϵ in a time t :

$$x(t) = \epsilon \sum_{i=1}^n \theta(t - t_i) + \xi(t) \quad (2)$$

where $\theta(t)$ is the Heavyside function $\theta(t) = 1$ for t positive, zero otherwise and $\xi(t)$ is a white instrumental noise associated to a measurement of the displacement $x(t)$, see Fig. 1a. The velocity signal, i.e. the derivative of $x(t)$, thus consists of a series of impulses (Dirac δ functions) in a uncorrelated noisy background :

$$v(t) = \frac{dx}{dt} = \epsilon \sum_{i=1}^n \delta(t - t_i) + \frac{d\xi}{dt}(t) \quad (3)$$

This signal is similar to the shot noise generated by a stream of photons (or electrons) impinging randomly at times t_i on a noisy photodetector. In Fourier space the spectrum of the shot noise (our signal) is independent of the frequency f . On the other hand, the spectrum of the sensor's noise (the derivative of its displacement) increases as f^2 . This different behaviour of the signal and noise spectra allows us to separate them. Indeed consider the velocity spectrum (i.e. the Fourier transform of $v(t)$):

$$\tilde{v}(f) = \epsilon \sum_{i=1}^n e^{-2\pi i f t_i} - 2\pi i f \tilde{\xi}_n(f) \quad (4)$$

If the enzymatic stepping mechanism is a purely random (i.e. uncorrelated) Poisson process, then the first term on the right of Eq. 4 represents the sum of n unit vectors pointing at random. As for a random walk the variance of that sum is $\epsilon^2 n$ which is independent of f . Let us introduce the mean number of steps $N = \langle n \rangle$ obtained by ensemble averaging and the mean velocity: $\langle v \rangle = N\epsilon / T = \epsilon / \tau_e$ (τ_e^{-1} is the mean enzymatic duty cycle).

The averaged power spectrum of the velocity signal $\langle w(f) \rangle$ is then given [10]:

$$\langle w(f) \rangle = \frac{2 \langle |\tilde{v}(f)|^2 \rangle}{T} = 2 \frac{\epsilon^2 N}{T} = 2 \langle v \rangle \epsilon \quad (5)$$

considering only positive frequencies $f > 0$. This is the known formula for the shot noise spectrum [7] which as argued above is independent of f . The spectrum of the associated experimental noise however (the last term in Eq. 4) decreases as $f \rightarrow 0$. Hence at low enough frequencies, i.e. if one has a long enough stretch of steps (the lowest frequency being $f_{\min} = 1/T$, the shot noise due to the steps may overcome the

Gilles Charvin et al.

Relation Between Noise Spectra and the Distribution of Time Between Steps for Single Molecular Motors

RESEARCH PAPER

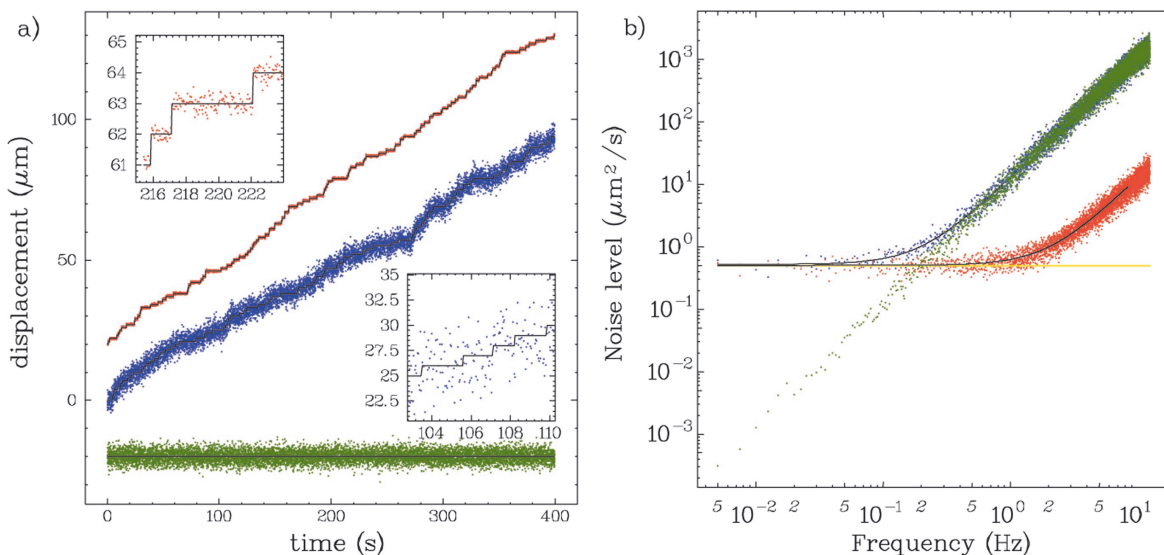
Single
Molecules 45

Fig. 1. a) Numerical simulation of a poissonian motor performing an average of $N = 100$ steps of size $\epsilon = 1\mu\text{m}$ with mean duty cycle $\tau_e = 4\text{s}$ in a noisy background of RMS amplitude: $\sqrt{\langle \xi_n^2 \rangle} = 0.2\mu\text{m}$ and $2\mu\text{m}$ (for the red and blue curves respectively); the green curve has the same parameters as the blue one, except that $\epsilon = 0$ (no steps); **Inset:** details of the stepping signals; the plain line is the signal without noise; the dots represent the signal in presence of a white noise. Steps cannot be distinguished on the blue curve. **b)** The average velocity power spectra of 20 runs at each noise level. At low frequencies, the enzyme's shot noise clearly dominates the background white noise, whereas the later dominates at high frequencies. The green spectrum is that obtained from a signal without steps ($\epsilon = 0$). The level of the plateau corresponds to: $2N\epsilon^2/T = 2\langle v \rangle \epsilon = 0.5\mu\text{m}^2/\text{s}$. Though steps cannot be distinguished in the more noisy time signal (blue curves), one can still determine the stepsize from the amplitude of its low frequency noise spectrum, which was fitted to a parabola ($y = a f^2 + b$). The stepsize obtained was tested using bootstrap tests, in order to get an estimation of this error on the fit. The stepsize thus derived ($\epsilon = b/2\langle v \rangle$) was $1.01\mu\text{m} \pm 0.05$ for the low noise ($Q = 810$) and $1.04\mu\text{m} \pm 0.07$ for the higher noise signal ($Q = 82$).

experimental noise (which is brownian and white in the displacement variable $x(t)$). The velocity spectrum may thus exhibit a plateau due to the stepping noise at low frequencies, followed by an increase as f^2 due to the instrumental noise, see Fig. 1b. From the value of that plateau, $2\epsilon \langle v \rangle$, one can directly extract the step size ϵ (assuming that the stepping process is Poissonian).

Numerical simulation of a noisy poissonian stepping signal is shown in Fig. 1a. In the case where the white noise contamination is important (blue curve), we cannot distinguish steps in the time domain, but in Fourier space the plateau at low frequencies is sufficiently clear that the step size can be estimated following Eq. 5. Of course higher white noise levels lead to a contamination even at low frequencies and eventually to the disappearance of the shot noise plateau.

The Fourier analysis allows one to define a criterium of quality for the signal/noise ratio. If one compares the velocity power spectrum measured during a burst of enzymatic activity of time span T with the spectrum measured when the enzyme is inactive, one might be able to identify a cutoff frequency f_c

below which the stepping shot noise of the active enzyme dominates the system's noise. If the quality factor $Q \equiv f_c T < 1$, the experimental noise level is too high (or the duration T of the run is too short) to extract from the data a reliable value of the step size. On the other hand, if $Q \gg 1$, one can extract the stepsize ϵ from the low frequency $f < f_c$ part of the spectrum and the number of steps $N = \langle v \rangle T / \epsilon$ occurring during the run. If $Q > N$, $f_c > N / T = \tau_e^{-1}$, the signal/noise ratio is good enough to identify steps and the direct analysis of steps in the time domain is reliable. This analysis is consistent with the values $Q = 810 > N = 150$ obtained for the red curve (Fig. 1a and 1b) and $Q = 82 < N = 150$ for the blue curve. Furthermore, f_c also defines the optimal lowpass cutoff frequency to filter the signal and optimize the S/N ratio.

Non-Poissonian Stepping Process

If the stepping process is non-Poissonian, i.e. if the probability distribution of time between steps $P(\tau_i)$ ($\tau_i = t_i - t_{i-1}$) is non-exponential, then the velocity spectrum $\tilde{v}(f)$ depends on

the frequency f and is related to $\tilde{P}(f) = \int d\tau P(\tau) \exp(-2\pi i f \tau)$. Consider the average power spectrum:

$$\begin{aligned}
 \langle |\tilde{v}(f)|^2 \rangle &= \langle \int \prod_k d\tau_k P(\tau_k) \epsilon^2 \left[n + \sum_{l>j=1}^n \prod_{k=j+1}^l e^{-2\pi i f \tau_k} + \text{c.c.} \right] \right. \\
 &\quad \left. + 4\pi^2 f^2 \tilde{\xi}^2 \right\rangle \\
 &= \langle \epsilon^2 \left[n + \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^{n-j} \tilde{P}^k + \text{c.c.} \right] \rangle + 4\pi^2 f^2 \langle \tilde{\xi}^2 \rangle \quad (6) \\
 &= \epsilon^2 \langle n \rangle \left[1 + \frac{\tilde{P}(f)}{1 - \tilde{P}(f)} + \text{c.c.} \right] + 4\pi^2 f^2 \langle \tilde{\xi}^2 \rangle
 \end{aligned}$$

To get the last equation we have used the fact that there is a total of n steps in a time $T = \sum_i \tau_i$. Since $f = m/T$ ($m=1,2,\dots$)

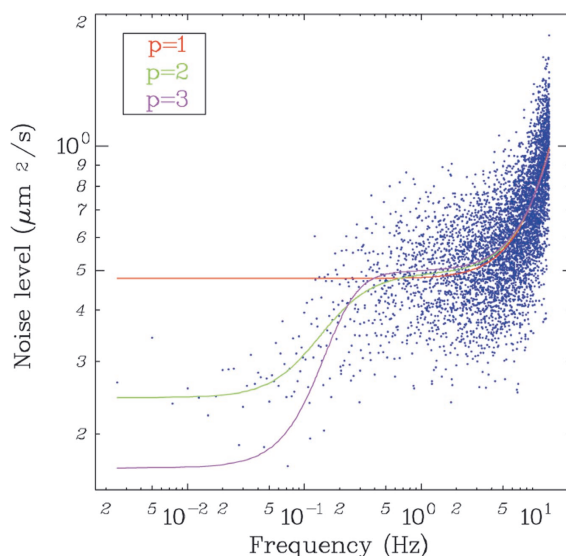


Fig. 2. Velocity power spectrum of the signal generated by a double poissonian stepping process (blue points). At low frequencies, the noise is half that obtained at intermediate frequencies ($0.5 < f < 5$ Hz) so that $r=1/2$. At these frequencies, the noise level equals that for a Poisson process. Experimental noise dominates at high frequencies. Same parameters as in Fig.1, except $\langle \xi_n^2 \rangle = 0.01$. Fit χ^2 minimisation) to a theoretical spectrum (Eq.(6)) computed for different stepping distribution (succession of p poisson processes): $p=1$ (red curve), $p=2$ (green curve) and $p=3$ (magenta curve). The closest distribution was $p=2$. The stepsize obtained was tested using bootstrap tests, in order to get an estimation of this error on the fit. We found $\epsilon = 0.980 \pm 0.005 \mu\text{m}$.

then $\tilde{P}^n(f) = 1$. In Fig.2, we plot the velocity power spectrum expected in presence of low experimental noise ($\sqrt{\langle \xi^2 \rangle} = 0.01 \mu\text{m}$) for a molecular motor whose enzymatic cycle consists of two successive Poisson processes (with probability distribution $P_1(\tau) = 1/\tau_0 \exp(-\tau/\tau_0)$: $P_2(\tau) = \int_0^\tau d\tau_1 P_1(\tau_1) P_1(\tau - \tau_1) = (\tau/\tau_0^2) \exp(-\tau/\tau_0)$). As can be seen in Fig. 2 at intermediate frequencies ($0.2 < f < 2$ Hz) the power spectrum amplitude equals the amplitude expected for shot noise (but is contaminated by the instrumental f^2 -noise at higher frequencies). That is to be expected as the random walk argument used previously to explain the power spectrum of a Poisson process is also correct here when $f\tau_0 \gg 1$. However, at low frequencies, the spectrum differs from that of shot noise. Using the power expansion $\tilde{P}(f) = 1 - 2\pi i f \langle \tau \rangle - 4\pi^2 f^2 \langle \tau^2 \rangle / 2 + O(f^3)$, it is easy to show from Eq. 6 that:

$$\frac{\langle |\tilde{v}(0)|^2 \rangle_0}{\langle |\tilde{v}(\infty)|^2 \rangle_0} = \frac{\langle \tau^2 \rangle - \langle \tau \rangle^2}{\langle \tau \rangle^2} \equiv r \quad (7)$$

The velocity average ($\langle \dots \rangle_0$) entering into Eq. 7 is done in absence of external noise ($\xi = 0$).

The randomness parameter r can be used [6] to estimate the number of rate limiting states in an enzymatic cycle ($\approx 1/r$). For the motor described previously, that undergoes two successive Poisson processes prior to stepping, it is easy to check that $r=1/2$. It thus appears that the velocity spectrum derived from stretches of steps can directly yield the number of rate limiting states in the enzymatic cycle. But it can of course provide much more information as the whole spectrum is linked via Eq. 6 to the probability distribution of time between steps.

How much of that hidden information can be retrieved will depend of course on the level of instrumental noise which dominates at high frequencies. If that noise level is such that $f_c < \tau_e^{-1}$, though steps cannot be observed in the time domain, the stepsize ϵ can be computed if the randomness parameter is known and vice-versa. If $f_c > \tau_e^{-1}$, the S/N ratio is good enough to identify steps in the time domain. In that case, the usefulness of a Fourier space analysis is arguable since the step size and the probability distribution of time between steps can be estimated directly from the time data.

Experimental Results

The method of analysis described above has been applied to data obtained from experiments on the uncoiling of a DNA molecule by a single topoll [11]. That experiment has been described previously. Briefly, an unnicked double-stranded DNA molecule is rigidly anchored at one end to a glass surface

Gilles Charvin et al.

Relation Between Noise Spectra and the Distribution of Time Between Steps for Single Molecular Motors

RESEARCH PAPER

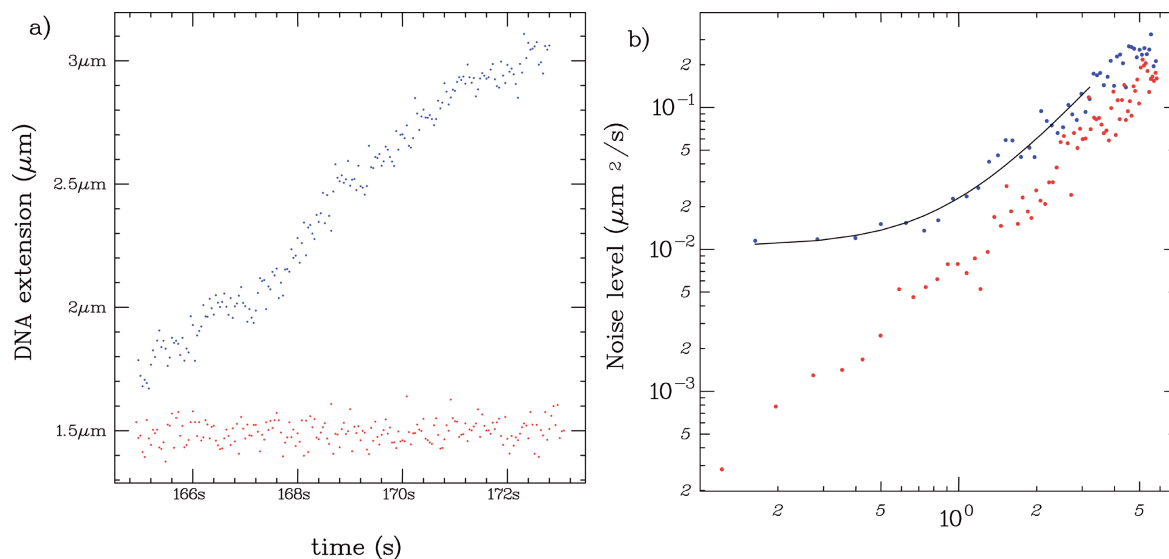
Single
Molecules 47

Fig. 3. a) Typical recording of the uncoiling of a supercoiled DNA (blue curve) by a single topoll molecule at $[ATP] = 200 \mu M$ (and a stretching force of $0.7 pN$). The red curve is the signal obtained when the enzyme doesn't work. **b)** The **average** velocity power spectrum of 18 relaxation runs (blue curve) and 10 experimental noise records (red curve). The blue curve has been fitted to a parabola in order to compute $r = 0.52 \pm 0.09$, knowing that $\epsilon = 86 \text{ nm}$ [11]. The red curve exhibits no plateau as it corresponds to the instrumental noise measured when the enzyme is inactive (i.e. when it does not relax supercoils). The large increase in the low frequency noise level when the enzyme is active as compared to when it is inactive is due to the intrinsic randomness of the enzymatic activity. The cutoff frequency where the system's noise becomes comparable to the enzymatic noise, $f_c \sim 1 \text{ Hz}$, yields an estimate of the quality factor $Q = f_c T = 4.3 < N$ (the average number of steps $N \sim 12.5$).

and the other to a small magnetic bead. It can be stretched with a force F and twisted by a number of turns n by translating and rotating small magnets above the sample [12]. These two mechanical parameters determine the molecule's extension l , monitored by measuring the 3D position of the tethered bead. As one begins to rotate the magnets, the DNA's extension is unchanged and the torque increases linearly with the twist angle [13]. When a critical torque $\Gamma_b \sim \sqrt{F}$ is reached [13-15], the molecule buckles (as would a twisted tube), forming a plectoneme and stabilizing the torque at its critical value. Thereafter it contracts regularly [14] as overwinding generates more supercoils [16]. The measured rate of contraction δ for DNA depends on F (e.g. at $F = 0.7 \text{ pN}$ we find $\delta = 45 \text{ nm/turn}$). Addition of topoll to the system results in an increase of l by an amount $\delta(F)$ for every supercoil relaxed. In $10 \mu M$ ATP, enzyme turnover is slow and relaxation is directly observed as stepwise events of size 2δ . This is expected for type II topoisomerases which are known to remove two DNA supercoils per cycle [17].

Fig. 3 shows the average velocity power spectra obtained from real-time relaxation data by topoll at high ATP concentration ($[ATP] = 200 \mu M$ and $F = 0.7 pN$). Under these conditions, one cannot distinguish steps in the time data (see

Fig. 3a) so that the present analysis can be helpful. As the setsize is known, we can determine the randomness parameter: $r = 0.52 \pm 0.09$ and verify that the quality factor Q ($Q = 4.3$) is smaller than the average number of steps in the analyzed runs ($N = 12.5$), i.e. the signal/noise ratio is poor, but sufficient to reliably compute r ($1 \ll Q < N$). Thus it appears that topoll at high ATP concentrations, behaves as an enzyme with two equivalent rate limiting steps. This could be due to the release of the two ADP molecules the enzyme generates upon hydrolysis of two ATP [18, 19].

Conclusion

Single molecule studies of molecular motors often display a stepping signal buried in experimental noise. The interest of a spectral decomposition of the velocity signal is that whereas the noise associated with the enzymatic activity is constant at low frequencies the experimental noise decreases as $f \rightarrow 0$. This allows for a measurement of the enzyme's noise amplitude that can be used to compute the step size or the randomness parameter. The later is inversely proportional to

the number of rate limiting steps in the enzyme's cycle, a useful information for a mechanistic understanding of its function.

We have analyzed the supercoiling relaxation signal due to the activity of a type II topoisomerase. Though steps could not be identified in the time data, their signature was clearly identifiable in the spectral decomposition. It is in these conditions that the method presented here is most useful. If the step size is known, it yields valuable information on the enzymatic cycle, via the estimation of the randomness parameter [5]. If the enzyme is known to be Poissonian, it allows to estimate its step size. Finally the analysis in Fourier space provides an internal quality check for the reliability of those estimates.

Acknowledgement This work was supported by grants from ARC, CNRS, ENS and universities Paris VI and VII

References

- [1] H.P.Lu, L.X. Xun, and S.Xie. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, **282** 1877-1782, 1998.
- [2] B.Sakmann and E.Neher. Single-channel recording. Plenum, second edition, 1995.
- [3] K.Visscher, M.J. Schnitzer, and S.M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, **400** 184-189, 1999.
- [4] R.Yasuda, H.Noji, K.Kinosita, and M.Yoshida. F1ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* **93** 1117-1124, 1998.
- [5] M.J.Schnitzer and S.M.Block. Statistical kinetics of processive enzymes. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, LX 793-801, 1995.
- [6] K.Svoboda and S.M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23** 247-285, 1994.
- [7] W.Schottky. *Ann. Phys. (Leipzig)* **57** 541, 1918.
- [8] U.Fano. *Phys. Rev.* **72** 26, 1947.
- [9] M.C.Teich and B.E.A.Saleh. Photon bunching and antibunching. *Progress in Optics*, XXVI 1-67, 1988.
- [10] W.B.Davenport Jr. and W.L. Root. An introduction to the theory of random signals and noise. Lincoln Laboratory Publications, New-York, 1958.
- [11] T.Strick, J.-F.Allemand, D.Bensimon, R.Lavery, and V.Croquette. Phase coexistence in a single DNA molecule. *Physica A* **263** 392-404, 1999.
- [12] T.Strick, J.F.Allemand, D.Bensimon, A.Bensimon, and V.Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271** 1835 -1837, 1996.
- [13] L.Landau and E.Lifchitz. *Theory of Elasticity*. Mir Editions, 1967.
- [14] C.Bouchiat and M.Mézard. Elasticity theory of a supercoiled DNA molecules. *Phys. Rev. Lett.* **80** 1556-1559, 1998.
- [15] J.D. Moroz and P.Nelson. Torsional directed walks, entropic elasticity and DNA twist stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **94** 14418-14422, 1998.
- [16] T.Strick, J.-F.Allemand, D.Bensimon, and V.Croquette. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.* **74** 2016-2028, 1998.
- [17] P.O.Brown and N.R.Cozzarelli. A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science* **206** 1081-1083, 1979.
- [18] T.T.Harkins, T.J.Lewis, and J.E.Lindsley. Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry* **37** 7299-7312, 1998.
- [19] T.T. Harkins and J.E. Lindsley. Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 1. A DNA-dependent burst in ATP hydrolysis *Biochemistry* **37** 7292-7298, 1998.

2.5 Conséquences pour l'observation des cycles enzymatiques

L'étude précédente montre que l'observation des pas dans l'espace réel est conditionnée par le fait que la fréquence caractéristique d'action de l'enzyme $f_e \equiv v$ soit inférieure à la fréquence de coupure f_c du dispositif : $f_c = \sqrt{2v\epsilon^2/(4\pi^2\xi^2)}$, où v est la vitesse moyenne de l'enzyme en cycles/seconde, ϵ la taille de la marche, et ξ l'amplitude du bruit.

En conséquence, réduire suffisamment la vitesse v en jouant sur la concentration d'ATP peut permettre de satisfaire la condition $f_e < f_c$, puisque ces deux fréquences n'ont pas la même dépendance vis-à-vis de v . Cela explique pourquoi, sur les signaux présentés plus haut, les marches sont visibles à $10\mu\text{M}$ d'ATP et pas à 1mM .

Cependant, il est également possible d'augmenter la fréquence de coupure en cherchant autant que possible à diminuer le niveau de bruit expérimental. La densité spectrale des fluctuations d'extension $|\delta z(f)^2|$ varie avec le carré de la longueur des molécules d'ADN et linéairement avec la taille des billes utilisées (voir partie II). La figure 2.4 montre une différence flagrante dans le spectre des fluctuations d'extension obtenu avec des molécules de $4.5\mu\text{m}$ (synthétisées par Jean-François Allemand) et de $1\mu\text{m}$ (synthétisées par Giuseppe Lia), accrochées à des billes de $1\mu\text{m}$ de diamètre.

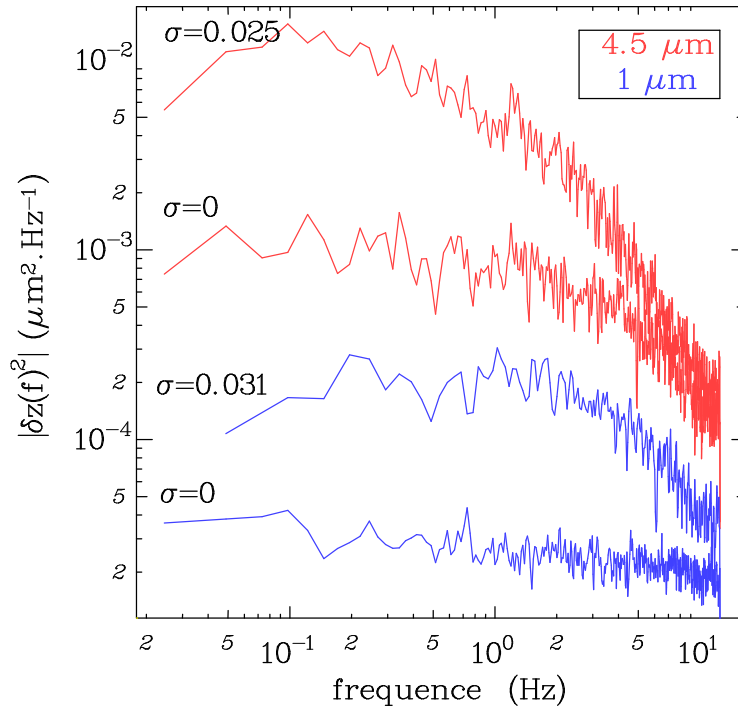


FIG. 2.4 – **Spectre des fluctuations d'extension de molécules d'ADN.** En rouge : molécules de $4.5\mu\text{m}$. En bleu : molécules de $1\mu\text{m}$. Les différentes courbes correspondent à différents degrés de super-enroulement σ .

Notons au passage que le bruit dépend beaucoup de l'état d'enroulement de la molécule. En conséquence, le rapport signal/bruit est d'autant meilleur que la molécule est proche de la transition de flambage (peu de plectonèmes). Mentionnons également que le niveau de bruit varie beaucoup avec la force appliquée sur la molécule.

Compte tenu de cette analyse, nous avons effectué des mesures de relaxation du super-enroulement à différentes concentrations d'ATP en utilisant des molécules de $1\mu\text{m}$ de longueur. La partie suivante présente nos résultats ainsi que ceux précédemment décrits par Strick *et al* [122].

2.6 Influence de la concentration d'ATP

2.6.1 Vitesse de réaction l'enzyme en fonction de [ATP]

La variation de la vitesse de réaction de la topoisomérase II de drosophile en fonction de la concentration d'ATP a été mesurée en molécule unique initialement par Terence Strick sur des molécules de 11kb[122]. La vitesse est calculée en ajustant une droite sur les traces de relaxation du super-enroulement (et en divisant par la taille des marches). La figure 2.5 montre les résultats ainsi obtenus ainsi qu'un ajustement par un modèle simple de type Michaelis-Menten : $V = V_{max}[ATP]/(K_m + [ATP])$.

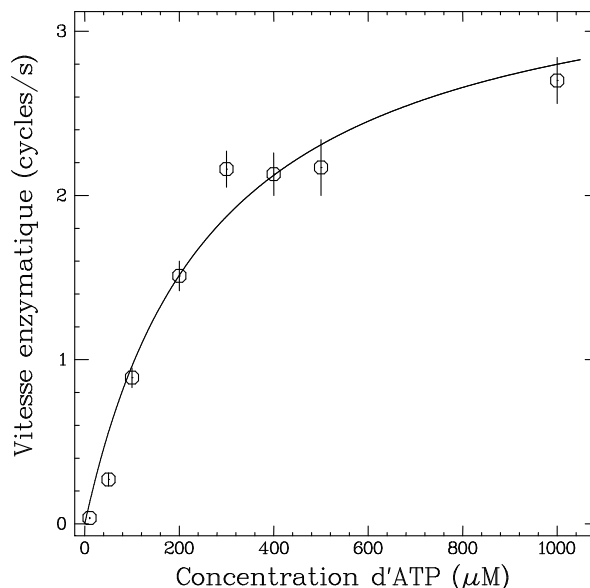


FIG. 2.5 – **Vitesse enzymatique en fonction de la concentration d'ATP.** Les points sont les données expérimentales, tirées de [122]. La courbe est un ajustement utilisant un modèle de Michaelis-Menten.

L'accord avec le modèle semble bon et permet de déduire K_m de l'ordre de $270\mu\text{M}$ et $V_{max} = 3.4$ cycles/s, en accord avec les valeurs obtenues par des mesures d'ensemble sur la même enzyme [87].

2.6.2 Coopérativité de l'accrochage des molécules d'ATP

Cependant, d'autres études biochimiques [68] ont établi la nécessité de l'hydrolyse d'au moins deux molécules d'ATP par cycle enzymatique et suggéré, sur la base de l'observation de l'activité ATPase, qu'il y ait une certaine coopérativité dans le recrutement des deux ATP. Dans ce cas, le comportement de l'enzyme ne devrait pas être michaelien.

Nous nous sommes attachés à tester la coopérativité en observant la relaxation par la topo 2 de drosophile à basse concentration d'ATP ($[ATP] < K_m$), sur des petites molécules d'ADN ($1\mu\text{m}$). Nous avons basé notre analyse sur l'observation et la mesure des durées de cycle à 20, 30, 50 et $100\mu\text{M}$ d'ATP. La figure 2.6 montre des traces typiques ainsi que les histogrammes de la distribution des durées de cycle obtenus en utilisant un algorithme de détection de marches sur le signal filtré (passe-bas).

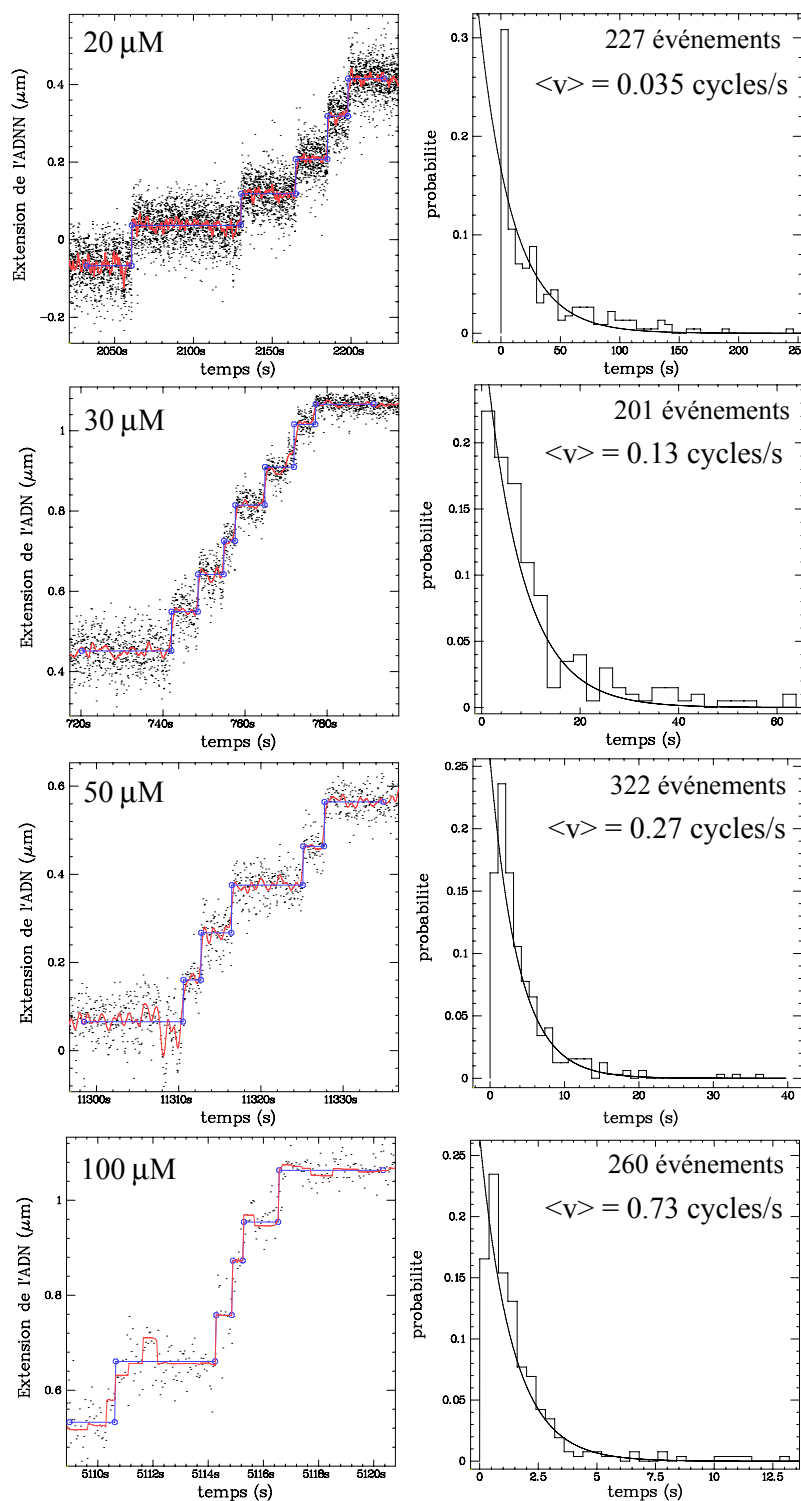


FIG. 2.6 – **Relaxation du super-enroulement à basse concentration d'ATP.** Les graphes sur la gauche représentent des traces typiques obtenus à différentes concentration d'ATP. Le signal après filtrage passe-bas (courbe rouge), est soumis à un algorithme de détection de marche (courbe bleue). Ainsi, on peut construire la distribution des durées de cycles (histogrammes à droite).

A partir de ces expériences, nous avons tracé en échelle logarithmique la courbe $v = f([ATP])$ en

superposant nos résultats (points verts) à ceux obtenus par Strick *et al.*[122] (points bleus) .

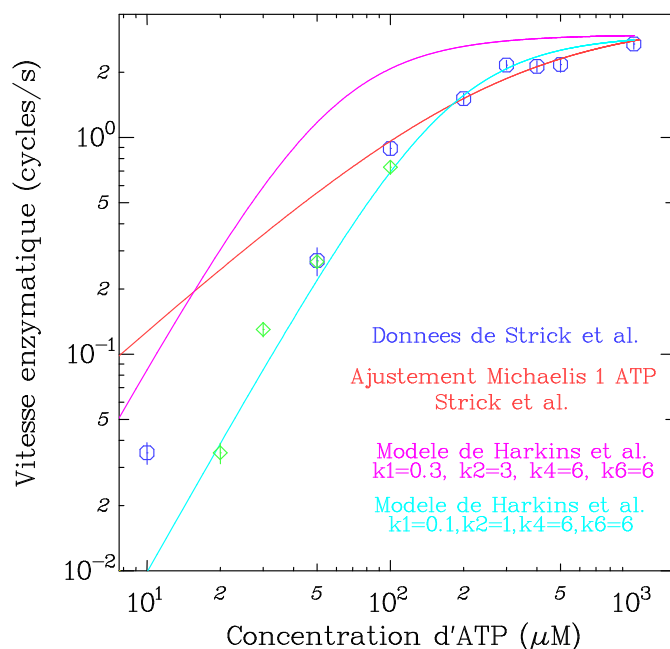


FIG. 2.7 – **Vitesse enzymatique en fonction de la concentration d'ATP en échelle logarithmique.** Les points bleus sont les données expérimentales de Strick *et al.*, tirées de [122]. La courbe rouge est un ajustement utilisant un modèle de Michaelis-Menten. Les points verts sont les vitesses obtenues par analyse des durées de cycles des expériences précédentes. Les barres d'erreur indiquent l'erreur statistique. La courbe mauve est la courbe prédite par le modèle de Harkins *et al.* sans modifier les valeurs des constantes. La courbe bleu clair représente le même modèle, mais avec des valeurs de constantes modifiées.

Il apparaît clairement que, à basse concentration d'ATP, l'enzyme ne suit pas un comportement michaelien : la vitesse semble varier comme le carré de la concentration de [ATP], (et s'éloigne nettement de la courbe représentant le modèle de Michaelis).

2.6.3 Modélisation du cycle enzymatique

Sur la bases d'observations expérimentales, la partie ATPase du cycle enzymatique de la topo 2 de *S. cerevisiae* a été modélisée comme une suite d'étapes élémentaires[46, 45]. Sur le schéma de la figure 2.8 ne sont pas pris en compte les étapes relatives aux changements conformationnels de l'enzyme. Cependant, compte tenu des constantes cinétiques des étapes d'accrochage, d'hydrolyse et de relargage liées à l'ATP (voir tableau 2.1), il est probable que les vitesses liées aux changements conformationnels soient beaucoup plus rapides.

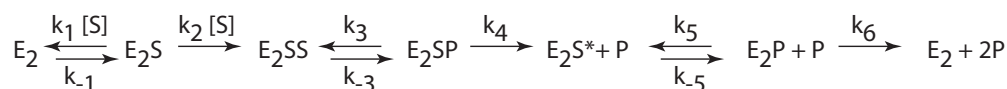


FIG. 2.8 – **Modélisation du cycle cinétique de la topo 2, d'après [45].** *E* désigne une sous-unité d'enzyme, *S* l'ATP, *P* l'ADP et le phosphate. Les valeurs des constantes, déduites de l'expérience, sont reportées dans le tableau 2.1

k_1	$0.3\mu M^{-1}.s^{-1}$
k_{-1}	$1000s^{-1}$
k_2	$3\mu M^{-1}.s^{-1}$
k_3	$40 - 50s^{-1}$
k_{-3}	$< 4s^{-1}$
k_4	$3 - 5s^{-1}$
k_5	$40 - 50s^{-1}$
k_{-5}	$< 4s^{-1}$
k_6	$2 - 7s^{-1}$

TAB. 2.1 – Valeurs numériques des constantes cinétiques du modèle de Harkins *et al.* [45]

Suivant ce modèle, à basse concentration d'ATP, c'est l'accrochage du premier ATP qui limite le cycle, du fait que c'est une étape réversible favorable au décrochage. Par contre, l'accrochage d'une deuxième molécule d'ATP est irréversible. Nous avons tracé (courbe mauve sur la figure) la courbe $v=f([ATP])$ prédite par ce modèle de cycle, en tenant compte des constantes cinétiques (voir tableau 2.1). Nous avons pris $k_4 = k_6 = 6s^{-1}$. Suivant ce modèle, compte tenu que les étapes d'hydrolyse de l'ATP sont rapides et quasiment irréversibles, la vitesse doit théoriquement varier avec la concentration d'ATP comme :

$$V = \frac{[ATP]^2}{\left(\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_6}\right)[ATP]^2 + \left(\frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2}\right)[ATP] + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2}} \quad (2.1)$$

En dehors de la vitesse à saturation, qui a le bon ordre de grandeur, cette courbe s'ajuste mal à nos valeurs expérimentales : elle sature beaucoup trop vite. D'ailleurs, cette courbe s'ajuste également difficilement aux propres données expérimentales de Harkins *et al.* (demi-saturation obtenue pour $[ATP] \approx 130\mu M$). En prenant $k_1 = 0.1$ et $k_2 = 1$ (les autres valeurs de constantes étant identiques), par contre, nous avons obtenu un bien meilleur accord. Nous n'avons pas cherché à obtenir le meilleur accord avec les données expérimentales, compte tenu de la redondance des paramètres (en particulier, il semble que seul le produit $k_1 k_2$ soit important à basse concentration d'ATP). Notons également que nos mesures (ainsi que celles de Strick *et al.*) ont été obtenues sur la topo 2 de drosophile, alors que les constantes données par Harkins *et al.* le sont sur la topo 2 de levure.

Ces expériences confirment la coopérativité d'accrochage des deux molécules d'ATP, et valide ainsi le modèle de Harkins *et al.* dans son principe.

2.6.4 Distribution des temps de cycle et stochasticité

La statistique des durées de cycle enzymatique (c'est-à-dire des temps mesurés entre chaque saut) peut nous renseigner sur les étapes limitantes du cycle enzymatique. Par exemple, pour le cas simple où une étape du cycle est beaucoup plus lente que les autres, la distribution des temps de cycle reflétera essentiellement la présence de cette étape. En conséquence, la distribution sera poissonnienne, si l'étape en question est un acte élémentaire.

La figure 2.6, qui montre les histogrammes des temps de cycles obtenues à basse concentration d'ATP, révèle que les distributions semblent proches d'une exponentielle, avec des temps moyens variables. Dans ce régime de concentration d'ATP ($[ATP] \ll K_M$), l'étape limitante du cycle est liée à l'accrochage de l'ATP. C'est elle qui règle la durée entre sauts au cours de la relaxation.

Plus précisément, le modèle de Harkins *et al.* prévoit que la constante cinétique effective de cette étape vaut $k_{eff} = k_1 k_2 [ATP]^2 / k_{-1}$, compte tenu que, lorsque $[ATP] \ll K_M$, on a : $k_{-1} \gg k_1 [ATP]$, $k_2 [ATP]$. Dans ces conditions, une fois la première molécule d'ATP accrochée, elle se décroche rapidement, à moins qu'une deuxième molécule d'ATP vienne s'accrocher (ce qui est lent à

faible concentration d'ATP).

La réaction est donc essentiellement limitée par la réversibilité de l'étape d'accrochage du premier ATP. C'est également cette propriété qui entraîne que la vitesse de réaction varie comme le carré de la concentration d'ATP, et que la réaction est coopérative vis-à-vis de l'ATP. Si cette étape n'était pas réversible, la vitesse serait alors proportionnelle à $[ATP]$ tant que l'accrochage constitue l'étape limitante.

Nous avons appliqué la méthode d'analyse par transformée de Fourier décrite plus haut pour calculer la stochasticité r du signal de relaxation du super-enroulement (obtenu par Strick *et al.*[122]) par la topo 2 en fonction de la concentration d'ATP (voir figure 2.9), par analogie avec une étude publiée concernant la kinésine[129]. Les points expérimentaux (en bleu) correspondent à l'analyse des données réalisées par Strick *et al.*[122] aux concentrations d'ATP suivantes : 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 et 1000 μM . Même si les résultats sont entachés d'une erreur importante, il semble tout de même que la stochasticité soit différente suivant que l'on est à ATP limitant ou saturant.

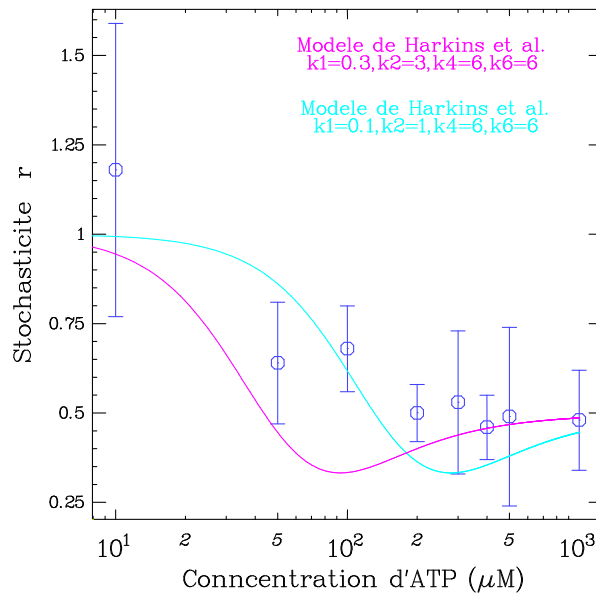


FIG. 2.9 – **Stochasticité r en fonction de la concentration d'ATP**. Les points expérimentaux (en bleu) sont calculés à partir de traces de relaxation du super-enroulement à différentes concentrations d'ATP. Les lignes correspondent à la courbe théorique déduite du modèle de Harkins et al., en prenant deux jeux de constantes cinétiques: $k_1 = 0.1$, $k_2 = 1$, $k_4 = 6$, $k_6 = 6$, $k_{-1} = 1000$ (bleu clair); $k_1 = 0.3$, $k_2 = 3$, $k_4 = 6$, $k_6 = 6$, $k_{-1} = 1000$ (mauve). Ces paramètres sont les mêmes que ceux utilisés à la figure 2.7

A $10\mu M$, la valeur de r que nous trouvons est voisine de 1. Ceci montre la présence d'une unique étape limitante, qui correspond à l'accrochage de l'ATP que nous décrivons le paragraphe précédent. L'analyse en Fourier est difficile à cette concentration d'ATP pour deux raisons : d'abord les bouffées enzymatiques longues (qui donnent des modes basse fréquences nécessaires à l'analyse) sont rares, ce qui diminue la statistique. Par ailleurs les fluctuations de vitesse sont très importante d'une trace à une autre. Or, l'erreur sur la vitesse se retrouve dans l'erreur sur r . Enfin, la valeur trouvée, supérieure à 1, peut s'expliquer par le fait que les longues acquisitions sont sujettes à des dérives à basses fréquences qui augmentent le niveau de bruit. Ce bruit est difficilement dissociable du bruit enzymatique attendu à basse fréquence.

A haut ATP ($[ATP] \gg K_m$), r semble tendre vers environ 0.5. Ceci indique qu'il y a désormais deux étapes limitantes dans le cycle. Ces deux étapes ne peuvent pas être liées à l'accrochage de

l'ATP qui est saturant dans ces conditions. Par contre, il paraît plausible que ce soient les étapes de libération des phosphates après hydrolyse de l'ATP. En effet, d'après les constantes cinétiques établies par Harkins *et al.*[45], ce sont deux étapes lentes du cycles, qui deux surcroît ont des vitesses comparables.

Que se passe-t-il quand la concentration d'ATP est de l'ordre de K_m ? la stochasticité reste faible, de l'ordre de 0.5, ce qui semble indiquer qu'aucune étape ne domine les autres. Il n'est pas à exclure que l'accrochage de l'ATP fasse encore partie des étapes qui limitent la progression du cycle.

Pour tenter de mieux comprendre l'évolution de r avec l'ATP, nous avons calculé la fonction $r([ATP])$ théorique[81] pour le cycle enzymatique à partir du modèle de Harkins *et al.*[45].

$$r = \frac{\left(\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_6}\right) [ATP]^4 + \left(\left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_1}\right) [ATP] + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2}\right)^2 - \frac{2}{k_1 k_2} [ATP]^2}{\left(\left(\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_6}\right) [ATP]^2 + \left(\frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2}\right) [ATP] + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2}\right)^2} \quad (2.2)$$

La figure 2.9 montre les courbes obtenus en prenant les deux jeux de paramètres suivants: $k_1 = 0.1$, $k_2 = 1$, $k_4 = 6$, $k_6 = 6$, $k_{-1} = 1000$ (bleu clair); $k_1 = 0.3$, $k_2 = 3$, $k_4 = 6$, $k_6 = 6$, $k_{-1} = 1000$ (mauve). Compte tenu des barres d'erreur, il serait mal approprié de tenter un ajustement quantitatif de cette courbe. Cependant, les valeurs de constante cinétique utilisées précédemment pour ajuster la courbe $V = f([ATP])$ ne semblent pas aberrantes.

Cette courbe théorique confirme la tendance décrite plus haut: à haut [ATP], les deux étapes de constante k_4 et k_6 limitent le cycle. En choisissant $k_4 = k_6$, on impose que r tende exactement vers 0.5. A très bas ATP, le caractère réversible et non favorable de l'accrochage du premier ATP (matérialisé par k_{-1}) entraîne que cette étape est l'unique limitation du cycle. Enfin, cette courbe montre la stochasticité devrait théoriquement passer par un minimum $r = 0.33$ lorsque $[ATP] = K_m$. Ceci correspond à la situation où trois étapes sont limitantes: le décrochage des phosphates et l'accrochage du premier ATP.

Ainsi, à partir des mesures en molécule unique, le calcul de la stochasticité permet de tirer des informations sur les étapes qui composent le cycle enzymatique des topo 2. En particulier, cela permet d'appréhender les étapes limitantes et de tester des modèles de cycle, comme celui proposé par Harkins *et al.*.

2.7 Influence de la force sur l'activité de l'enzyme

Si la concentration d'ATP est un paramètre clef de ces expériences, car il permet de moduler l'activité enzymatique, il est également intéressant de regarder l'influence de la force sur la relaxation du super-enroulement par une enzyme unique.

La tension dans la molécule d'ADN super-enroulée change également le couple dans la molécule. En conséquence, la tension au niveau des croisements d'ADN est d'autant plus forte que la force est élevée. On pourrait donc s'attendre à ce que le passage de brin soit facilité par la force.

La réalité est différente: les expériences sur la topo 2 de drosophile montre que la vitesse décroît à peu près exponentiellement avec la force, suggérant que l'enzyme doit effectuer un travail contre la force[122] (voir la courbe rouge sur le graphe du bas de la figure 2.10. En ajustant une courbe de la forme $v = v_0 \exp(-F\Delta/k_B T)$, on obtient $\Delta = 1\text{nm}$ et $v_0 = 3.35$ cycles/s. Δ est de l'ordre de grandeur de la distance nécessaire au passage d'un double-brin d'ADN à travers une césure dans le segment G.

Nous avons effectué les mêmes expériences de relaxation du super-enroulement avec la topo 4 de *E. coli*. La courbe rouge sur le haut figure 2.10 montre la vitesse de relaxation du super-enroulement positif en fonction de la force appliquée. A la différence de la topo 2, la topo 4 semble insensible à la force entre 0 et 3 pN. Lorsque la force dépasse 3 pN, par contre, la vitesse décroît brutalement.

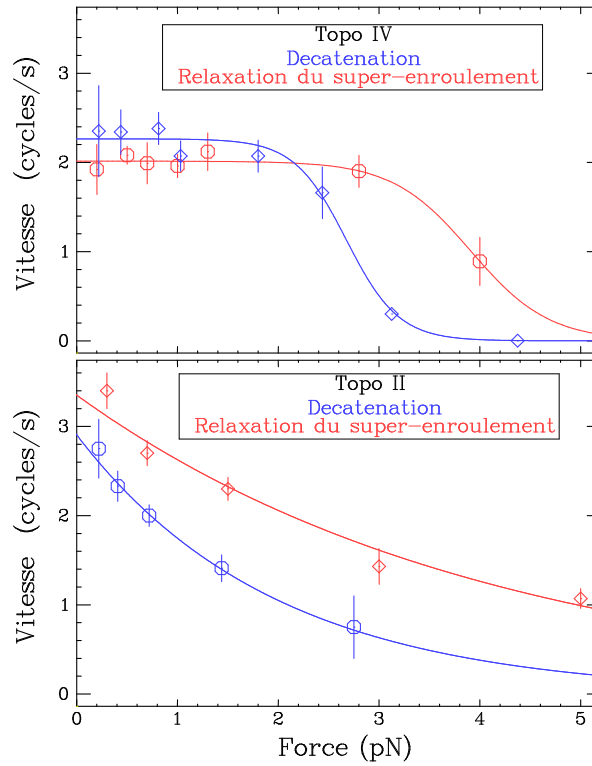


FIG. 2.10 – **Vitesse de relaxation du super-enroulement et de la décaténation par les topoisomérases en fonction de la force appliquée.** Les expériences réalisées avec la topo 4 (en haut) et la topo 2 (en bas) ont été ajustées respectivement par les fonction $v = v_0 \exp(-F\Delta/k_B T)$ et $v = v_0/(1 + k \exp(F\Delta/k_B T))$. Les données de relaxation du super-enroulement par la topo 2 sont tirées de [122]

Une interprétation simple que l'on peut donner de ce comportement est qu'il existe dans le cycle enzymatique une étape influencée par la force qui n'est pas l'étape limitante à force nulle. En conséquence, on peut modéliser le cycle comme une suite de deux étapes irréversibles :



où 1 et 2 matérialisent deux états distincts du cycle, et k_1 et $k_2 = k_2^0 \exp(-F\Delta/k_B T)$ sont les constantes de vitesses associées aux deux étapes, telles que $k_2^0 \gg k_1$. En conséquence, la vitesse s'écrit :

$$v = v_0/(1 + k \exp(F\Delta/k_B T)) \quad (2.4)$$

où $v_0 = k_1$ et $k = k_1/k_2^0$. Nous avons ajusté cette courbe sur les données expérimentales. Nous obtenons : $\Delta = 10\text{nm}$, $k = 4.2 \times 10^{-5}$, et $v_0 = 2.0\text{ cycles/s}$. La valeur de k indique que l'étape qui limite le cycle à haute force est extrêmement rapide par rapport à l'étape limitante à basse force. La variation de la vitesse de la topo 4 vis-à-vis de la force est donc très différente de celle de la topo 2. Ceci est certainement la conséquence d'une différence importante au niveau du mécanisme enzymatique.

En outre, les expériences de décaténation confirment quantitativement ces résultats (voir le chapitre suivant pour l'exposé des expériences) : la vitesse de décaténation de la topo 2 décroît exponentiellement avec la force (voir la courbe bleue sur le graphe du bas de la figure 2.10 : $v = v_0 \exp(-F\Delta/k_B T)$ avec $\Delta = 1.9\text{nm}$ et $v_0 = 2.90\text{ cycles/s}$. Par force, nous entendons ici la tension

dans chaque chaîne d'ADN, et non la force globale appliquée sur la bille magnétique. Notons que la vitesse de décaténation à $F = 0$ est très proche de la vitesse de relaxation du super-enroulement à $F = 0$, ce qui confirme son égale capacité à travailler sur les deux substrats. Par contre, la décroissance est nettement plus rapide.

La vitesse de décaténation par la topo 4 des tresses de même chiralité que les supertours (+) a les mêmes variations que la vitesse de relaxation du super-enroulement. En ajustant la courbe la courbe $v = v_0 / (1 + k \exp(F\Delta/k_B T))$ sur les données expérimentales, nous obtenons : $\Delta = 15.4\text{nm}$, $k = 3 \times 10^{-5}$, et $v_0 = 2.35$ cycles/s. Les vitesses à zéro force coïncident, ce qui montre qu'*a priori* la topo 4 travaille aussi bien sur les supertours que sur les caténanes.

Par contre, la sensibilité à la force est significativement plus grande pour la décaténation que pour la relaxation du super-enroulement. On retrouve là une propriété commune avec la topo 2.

2.8 Etude d'enzymes mutantes de la topo 2 de *S. cerevisiae*

Afin de comprendre le rôle de l'hydrolyse du premier ATP dans le mécanisme de transport du segment T à travers le segment G, Baird *et al.* ont effectué des expériences d'ensemble de décaténation de molécules d'ADN par des topoisomérases natives ou mutantes de *S. cerevisiae*, suivies avec une résolution de quelques dizaines de millisecondes[6]. Il ont pu ainsi mesurer la constante de vitesse de décaténation k_{cat} d'une population d'enzyme en stoechiométrie 2:1 par rapport à l'ADN (en concentration 25 nM).

Les mutants possèdent une mutation ponctuelle d'un glutamate en position 66, qui est remplacé par une glutamine. La position de cette mutation correspond au site d'hydrolyse de l'ATP. En conséquence, le mutant peut accrocher l'ATP mais ne peut pas l'hydrolyser (sa constante de vitesse d'hydrolyse de l'ATP vaut 0.02s^{-1} , contre 40s^{-1} pour le natif).

Plus précisément, deux types d'enzymes mutantes ont été fabriqués : l'une est homodimérique, c'est-à-dire que chaque sous-unité possède la mutation. On le note E66Q/E66Q. L'autre est hétérodimérique, c'est-à-dire qu'elle est constituée d'une unité native (WT) et d'une unité mutante E66Q. On le note E66Q/WT. En conséquence, ce mutant a la particularité de n'avoir qu'un seul site capable d'hydrolyser l'ATP. Par ailleurs, il est stable, c'est-à-dire que la dissociation des sous-unités est très peu probable[6]. Il est à noter qu'un travail similaire portant sur l'étude d'un mutant ne pouvant accrocher qu'une seule molécule d'ATP a été réalisée récemment[108].

Ces expériences d'ensemble montrent que la constante de vitesse apparente de décaténation est de l'ordre de $k_{cat} = 7\text{s}^{-1}$ pour le natif, alors que l'accrochage et l'hydrolyse du premier ATP se font respectivement à des taux de 200s^{-1} et 40s^{-1} . En conséquence, le passage de brin semble être postérieur à l'hydrolyse du premier ATP.

Les mêmes expériences avec le mutant E66Q/E66Q donnent $k_{cat} = 0.3\text{s}^{-1}$, ce qui met en évidence le rôle déterminant de l'hydrolyse. Enfin et surtout, le mutant hétérodimérique E66Q/WT a un $k_{cat} = 4.3\text{s}^{-1}$, ce qui est davantage proche du comportement du natif que du double mutant. Ainsi, il apparaît clairement que c'est le fait d'hydrolyser un ATP qui permet le passage de brin.

Nous avons testé en molécule unique l'activité de relaxation du super-enroulement de ces deux mutants (fournis par Janet Lindsley). Cette expérience a été initiée par Terence Strick à la fin de sa thèse. Son intérêt repose sur le fait que nous pouvons suivre en temps réel plusieurs cycles enzymatiques, alors que les expériences de décaténation exécutées par Lindsley reposent sur l'observation d'un cycle enzymatique unique moyenné sur une population.

2.8.1 Activité du double mutant E66Q/E66Q en molécule unique

Nous avons testé l'activité du double mutant E66Q/E66Q en présence d'ATP (1mM) sur une molécule super-enroulée de 3.5 microns ($n = +60$) étirée à $F = 1$ pN. Comme le montre la figure 2.11, nous n'avons observé aucune activité de l'enzyme, même à une concentration de 15 nM. Cependant, nous

observons que le signal est fortement bruité en présence de l'enzyme, ce qui est confirmé par l'analyse spectrale. Ce signal marque l'interaction entre l'enzyme et l'ADN, ce qui permet de contrôler que l'enzyme n'est pas absorbée non spécifiquement sur la surface du capillaire.

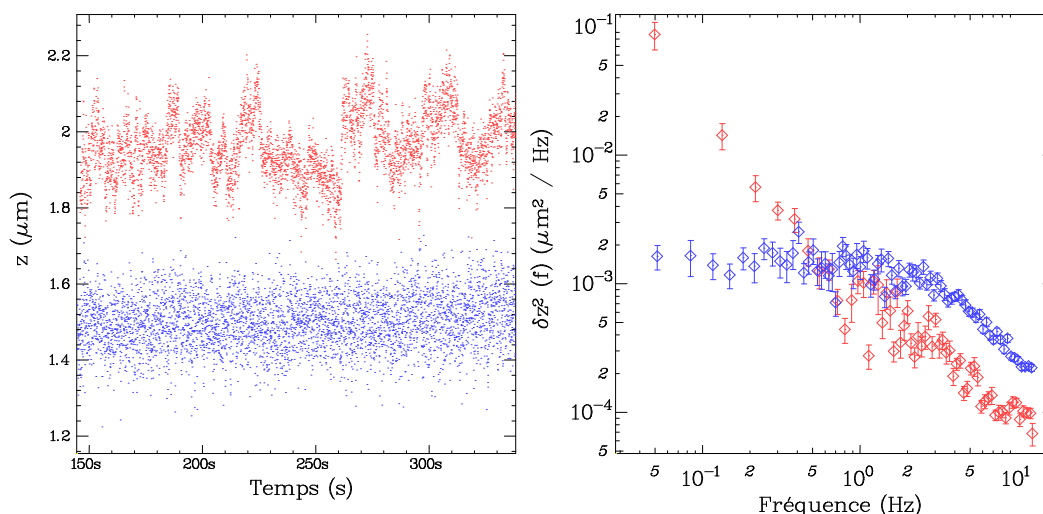


FIG. 2.11 – **Activité de l'enzyme E66Q/E66Q.** A gauche : le signal obtenu en absence (bleu) et en présence (rouge) d'enzyme. A droite : spectre des signaux obtenus en absence (bleu) et présence (rouge) d'enzyme. La concentration d'enzyme introduite dans le capillaire est d'environ 15 nM.

Le double mutant E66Q/E66Q n'a donc aucune activité de relaxation détectable en molécule unique, même s'il semble pouvoir s'accrocher sur l'ADN (tout au moins à haute concentration). Ce résultat est en contradiction avec la petite mais réelle activité de décaténation observée par Baird *et al.*[6].

2.8.2 Activité du mutant E66Q/WT en molécule unique

Nous avons réalisé des expériences avec le mutant hétérodimérique E66Q/WT dans les mêmes conditions de force et d'ATP que précédemment. La figure 2.12 montre à gauche les signaux obtenus en suivant l'extension de molécules super-enroulées de +50 tours.

La relaxation se fait par sauts isolés dont la taille est un multiple de 100 nm (la grille a une échelle de 100 nm), ce qui correspond à la relaxation de deux boucles plectonémiques (c'est-à-dire un cycle enzymatique). Les sauts les plus fréquents correspondent à un cycle enzymatique, mais il n'est pas rare d'observer une séquence rapide de 2 ou plusieurs cycles enzymatiques.

En comparaison, à droite sur la figure 2.12, nous avons reporté des relaxations typiques obtenues avec l'enzyme native WT/WT (fournie par James Berger). La relaxation (d'environ 50 tours) est cette fois très processive, comme dans le cas de la topoisomérase II de drosophile [122]. La vitesse de réaction est d'environ 1.5 cycles par seconde.

L'analyse de la taille des bouffées enzymatiques permet de tracer la distribution de processivité des enzymes E66Q/WT et WT/WT. Pour l'analyse nous avons toléré les pauses jusqu'à 5 secondes à l'intérieur d'une relaxation. La figure 2.13 montre les distributions de processivité intégrées obtenues pour E66Q/WT (300 événements) et WT/WT (une vingtaine de traces).

L'ajustement d'une exponentielle donne les processivités moyennes : 1.9 cycles et 9.8 cycles, respectivement pour le mutant et l'enzyme native. Notons cependant que la processivité de l'enzyme native est certainement sous-estimée par le fait que la taille du substrat limite la relaxation par l'enzyme. Il faudrait offrir à l'enzyme des substrats beaucoup plus grand, ou bien enrouler la molécule au fur et à mesure de la relaxation, pour obtenir une réelle estimation de la processivité.

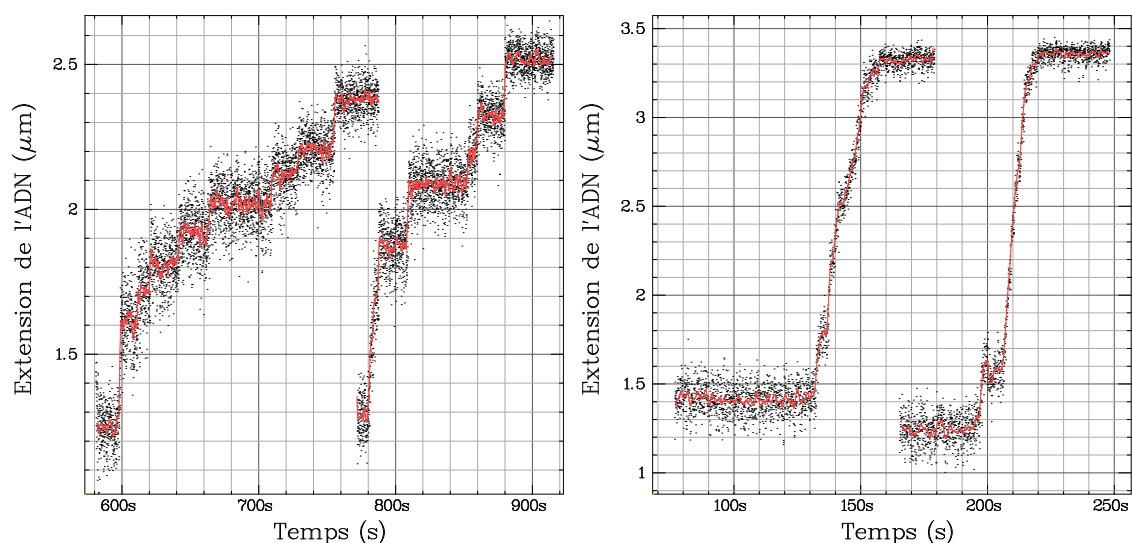


FIG. 2.12 – **Activité de l'enzyme E66Q/WT et comparaison avec l'enzyme WT/WT.** A gauche : relaxation typique par l'enzyme E66Q/WT (concentration 0.4 nM) à 0.7 pN (la pente des courbes extension rotation est alors de 49 nm/tour). L'acquisition est faite à 25 Hz et filtrée passe-bas à 1 Hz (courbes rouges). On distingue clairement des cycles uniques et des événements processifs de deux cycles. Les événements plus longs sont plus rares mais pas inexistantes. A droite : même expérience avec l'enzyme native WT/WT. La relaxation, souvent totale, est beaucoup plus processive.

Ces résultats montrent que l'enzyme E66Q/WT est également capable de relaxation par bouffées, mais avec une probabilité d'arrêt beaucoup plus importante. Il semble clair d'après les expériences de [6] que l'hydrolyse du seul ATP hydrolysable soit utilisé pour le passage de brin. Compte tenu de la constante d'hydrolyse du deuxième ATP, il paraît peu probable que celui-ci ait le temps d'être hydrolysé avant le début d'un autre cycle enzymatique, lors des événements où l'enzyme effectue plusieurs cycles de suite.

Dans ce cas, le fait que le deuxième ATP ne soit pas hydrolysable pourrait entraîner que l'ADP produit par la première hydrolyse doive être libéré pour permettre l'accrochage d'un autre ATP dont l'hydrolyse permettra le réamorçage du cycle. Cependant, Baird *et al.* doutent de la possibilité d'un accrochage d'une tierce molécule au cours du cycle[6]. Il est également possible d'envisager que l'enzyme ait plusieurs chemins réactionnels possibles pour effectuer son cycle, dont l'un nécessite l'hydrolyse d'un ATP unique (pour le passage de brin) et pourrait facilement se réamorcer.

Cependant, dans tous les cas, il est difficile de comprendre que l'enzyme soit capable de réinitier un cycle, alors que l'ATP qui n'a pas été hydrolysé (et qui reste accroché) continue à fermer la porte N-terminal de l'enzyme.

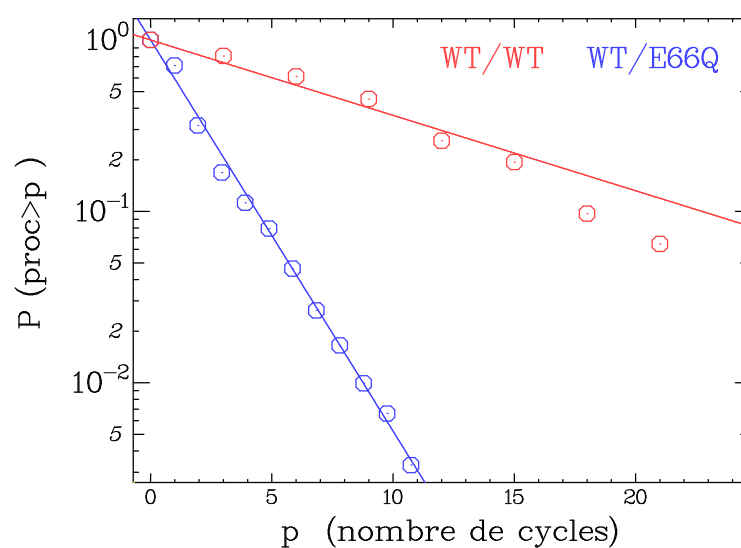


FIG. 2.13 – Distribution de probabilité intégrée de la processivité du mutant E66Q/WT (en bleu) et de l'enzyme native WT/WT (en rouge). Les ajustements exponentiels donnent une processivité moyenne de 1.9 cycles pour le mutant (300 événements) contre 9.8 pour le natif (20 événements) .

Chapitre 3

Reconnaissance chirale de l'ADN par la topoisomérase 4

La topoisomérase 4 se différencie des topoisomérases eucaryotes par sa capacité à reconnaître un substrat spécifique : des expériences d'ensemble et de molécule unique ont montré qu'elle relaxe préférentiellement les supertours (+) par rapport aux supertours (-). Cette apparente chiralité dans le fonctionnement de la topo 4 pose la question cruciale du mécanisme utilisé pour opérer cette reconnaissance. L'objet de ce chapitre est d'abord de présenter les différents modèles qui permettent d'expliquer le comportement asymétrique de l'enzyme. Ensuite, nous nous attachons à tester les différentes hypothèses, pour tenter de démontrer que c'est l'angle entre deux segments d'ADN qui conditionne l'action de l'enzyme.

La section 3.2, qui relate les propriétés d'accrochage de l'enzyme sur l'ADN en absence d'ATP, montre que l'enzyme n'effectue pas (ou peu) de discrimination lors de son accrochage. Ces expériences nous permettent de tirer des informations quantitatives sur l'accrochage de l'enzyme, comme la variation d'énergie libre d'accrochage, et la constante de dissociation. Dans la section 3.3, nous montrons que l'observation de la chiralité de l'enzyme est confirmée par les expériences de décaténation d'ADN, avec certaines différences que nous tentons d'expliquer. Ces expériences confirment également que les caténanes constituent un excellent substrat pour les topoisomérases, au même titre que les plectonèmes. Elles excluent également un modèle de reconnaissance lié à la torsion dans la molécule d'ADN. Enfin, nous proposons, dans la section 3.4, la validation directe du modèle de reconnaissance de l'angle dans un croisement d'ADN par l'enzyme.

3.1 Chiralité de la topo 4 sur l'ADN super-enroulé

3.1.1 Relaxation du super-enroulement par la topo 4

En 2000, Crisona *et al.* montrent par des expériences d'ensemble et des expériences de molécule unique que la topo 4 relaxe les supertours (+) préférentiellement par rapport aux supertours (-)[24]. La figure 3.1 montre des signaux obtenus en molécule unique sur la relaxation du super-enroulement par la topo 4. A gauche, la relaxation des supertours (+) est processive et rapide (environ 2.5 cycles/s) pour une concentration faible d'enzyme (10 ng/ml, i.e environ 30 pM). Cette concentration permet de se placer dans des conditions où les signaux de relaxation (augmentation rapide de l'extension) sont dus à une enzyme unique. En revanche, à droite, la relaxation de supertours (-) est lente (0.1 cycles/s) et distributive, et ce, pour une concentration d'enzyme bien plus importante (200 ng/ml). On distingue des cycles uniques de relaxation sur des échelles de temps importantes.

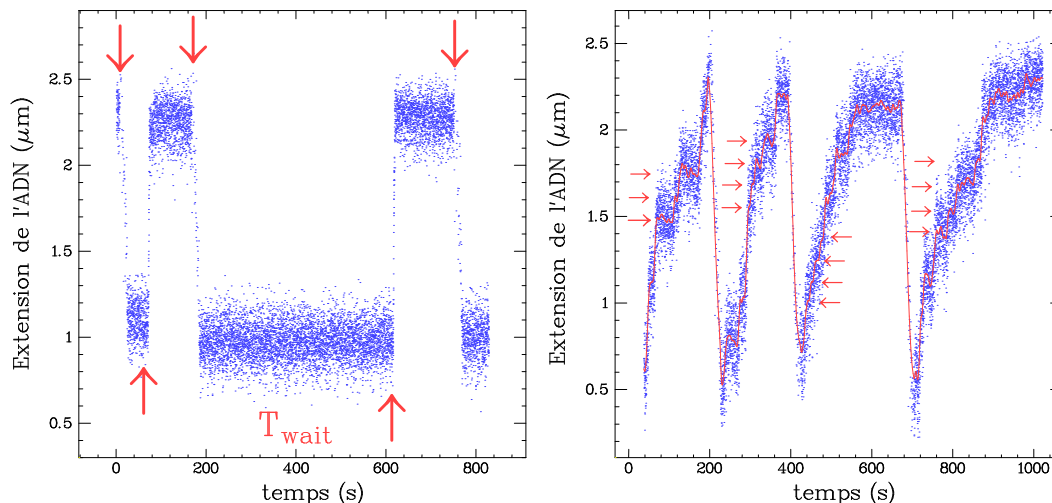


FIG. 3.1 – **Relaxation du super-enroulement par la topo 4 (molécule unique) à 0.2 pN.** A gauche, relaxation d'une molécule super-enroulée positivement : après une longue phase d'attente, la topo 4, faiblement concentrée (10 ng/ml), enlève rapidement (environ 3 cycles/s) et de manière processive (relaxation totale) le super-enroulement accumulée dans la molécule. A droite, relaxation d'une molécule super-enroulée négativement : la topo 4, largement plus concentrée (200 ng/ml), relaxe lentement les supertours (environ 0.1 cycles/s), de telle sorte que l'on peut parfois distinguer un cycle enzymatique individuel (saut brusque du signal). Données tirées de [24].

3.1.2 Lien avec la fonction de la topo 4 in vivo

Cette observation du comportement asymétrique de l'enzyme, quoique surprenante, permet d'échafauder une théorie simple concernant la séparation des rôles des différents acteurs qui contrôlent la topologie de l'ADN *in vivo* : le super-enroulement négatif, qui joue un rôle fondamental chez les procaryotes, en particulier pour l'initiation de la transcription et de la réplication, est généré par la gyrase et équilibré par l'action de la topo 1A. La topo 4 n'interfère pas avec ce processus par son incapacité à relâcher le super-enroulement négatif. Son rôle est de décaténer l'ADN lors de la réplication et de relâcher le super-enroulement positif généré par la progression de la fourche.

3.1.3 Quel(s) modèle(s) pour expliquer la chiralité de la topo 4 ?

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'activité asymétrique de la topo 4.

3.1.3.1 Reconnaissance globale de la topologie

L'idée la plus simple consiste à penser que l'enzyme est capable de reconnaître la géométrie globale de la molécule d'ADN. En d'autres termes, ceci revient à dire que l'enzyme serait capable de "calculer l'intégrale de Calugareanu" sur un contour fermé, c'est-à-dire en parcourant la molécule, et en décidant ensuite d'effectuer un passage de brin ou non !

D'une manière générale, on imagine difficilement comment une topoisomérase, qui agit localement (quelques nm), puisse "sentir" une propriété globale de son substrat (le contour du chromosome d'*E coli* est de environ 1 mm) . Tout modèle basé sur une reconnaissance globale n'est donc pas très réaliste.

3.1.3.2 Modèle de Klenin-Langowski-Vologodskii (KLV)

Plus raisonnablement, Klenin *et al.* [60] ont proposé que l'ADN, en s'enroulant autour de l'enzyme de manière chirale (sous la forme d'une hélice gauche, voir figure 3.2), favorise la juxtaposition du segment T avec le segment G dans le cas d'un supertour (+).

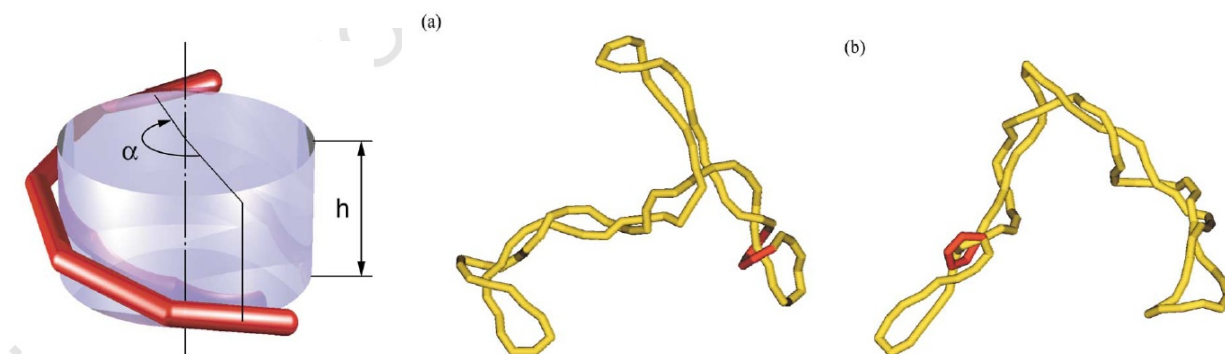


FIG. 3.2 – **Enroulement de l'ADN autour de l'enzyme dans le modèle KLV.** A gauche, le modèle d'enroulement hélicoïdale gauche de l'ADN autour de l'enzyme. Au milieu et à droite, configuration typiques de plasmides super-enroulés respectivement positivement et négativement. La présence (en rouge) de la structure hélicoïdale proche d'un segment T potentiel montre qu'il est plus facile de piéger un segment T dans le cas d'une supertour (+) que d'un supertour (-). Image tirée de [60].

En effet, les supertours (+) sont des structures hélicoïdales enroulées à gauches alors que les supertours (-) sont des structures enroulées à droite. Ainsi, si l'enzyme impose une chiralité gauche (imposant ainsi une rotation locale d'angle α à l'ADN et un pas $h \equiv 10 \text{ nm}$) sur une longueur de 5 segments élémentaires ($= 50 \text{ nm}$), elle augmente la probabilité de contact entre deux brins pour un supertour (+) par rapport à un supertour (-). En faisant des simulations Monte-Carlo sur des plasmides super-enroulés (voir figure 3.2), Klenin *et al.* ont calculé le rapport de ces deux probabilités pour différentes valeurs de α .

Un angle de $\alpha = 240^\circ$ entraîne une différence d'un facteur d'environ 1000 sur la juxtaposition des segments entre un plasmide super-enroulé positivement et un plasmide super-enroulé négativement. En outre, ce modèle prédit une variation d'énergie libre lors de l'accrochage de l'enzyme d'environ $-2.6k_B T$ (pour $\alpha = 240^\circ$).

Il semble assez bien établi que l'enzyme impose à l'ADN une forte courbure à l'endroit où elle s'accroche[133] (voir en particulier la section 3.2), ce qui est un des fondements de ce modèle. Cependant, compte tenu des données expérimentales concernant la taille d'ADN en contact avec l'enzyme (environ 30 bp[63, 125]), la taille du pas ($h \simeq 10 \text{ nm}$) et le rayon de la boucle (entre 12 et 16 nm pour $\alpha = 240^\circ$ et $\alpha = 180^\circ$ respectivement) paraissent nettement sur-évalués, comme l'évoquent d'ailleurs les auteurs. Si l'empreinte ("footprinting") laissée par l'enzyme est réellement de 30 paires de bases, il est difficile d'imaginer que l'enzyme puisse imposer localement un arrangement hélicoïdal de l'ADN sur une distance de 50 nm.

Finalement, le reproche que l'on peut faire à ce modèle est du même ordre qu'au précédent : l'action très localisée de l'enzyme implique que le mécanisme de reconnaissance ne doit pas être lié à une propriété du substrat à moyenne (la dizaine de nanomètres) ou grande échelle.

3.1.3.3 Sensibilité au couple

Un autre modèle consiste à considérer que l'enzyme est sensible à la différence de torsade (et donc de couple) entre un supertour (+) et un supertour (-). Le super-enroulement (+) augmente la torsade

et empêche la séparation des brins de l'ADN, alors que le super-enroulement (-) favorise l'ouverture de la double-hélice et diminue la torsade.

Nous verrons, à la section 3.3, que ce modèle est invalidé par les expériences de décaténation sur molécule d'ADN nickées (pour lesquelles la torsade ne varie pas).

3.1.3.4 Reconnaissance d'un croisement d'ADN

Compte tenu du mécanisme d'action de l'enzyme (nécessité d'accrocher deux brins d'ADN pour effectuer le passage de brin), il a été suggéré que la reconnaissance du substrat ((+) ou (-)) se fasse sur la base de la géométrie locale du croisement d'ADN[24]. Comme le montre la figure 3.3, la structure de l'enzyme pourrait être telle que le segment T ait une orientation convenable dans le cas d'un supertour (+), et puisse être accrochée par la pince N-terminal de l'enzyme. A l'inverse, une mauvaise orientation, dans le cas d'un supertour (-), empêcherait l'accrochage du segment T et donc le passage de brin.

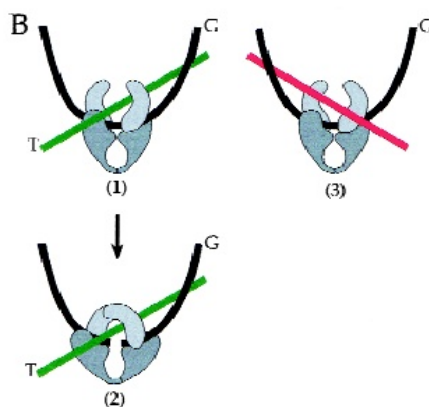


FIG. 3.3 – **Modèle de reconnaissance du croisement d'ADN.** A gauche, le segment T a la bonne orientation, ce qui permet à l'enzyme de l'attraper. A droite, le segment T est mal orienté, et le passage de brin n'est pas possible. Image tirée de [24].

En effet, un croisement d'ADN est un objet chiral si l'angle $\theta = 2\alpha$ entre les croisements est différent de 90° , comme le montre la figure 3.4.

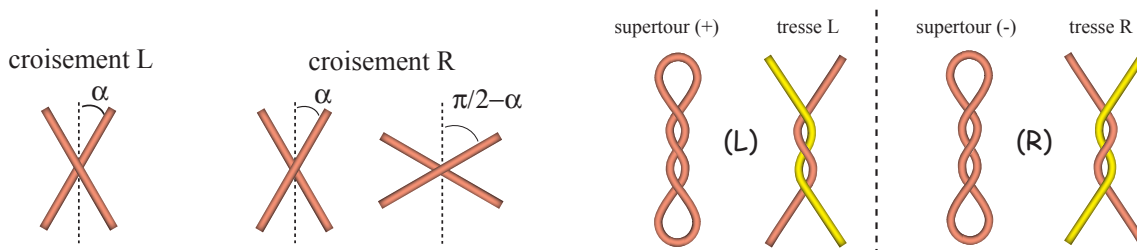


FIG. 3.4 – **Définition des croisements d'ADN.** A gauche : on peut définir deux objets chiraux, notés L et R, à partir d'un croisement (ou noeud) d'ADN en imposant un angle $\theta = 2\alpha$ différent de 90° . Remarquons, qu'un croisement R avec un angle $\pi/2 - \alpha$ a la même chiralité qu'un croisement L avec un angle α . C'est pourquoi un croisement pour lequel $\alpha = 45^\circ$ n'a pas de chiralité. A droite : un supertour (+) a des croisements L, alors qu'un supertour (-) a des croisements R. La même classification peut être appliquée aux tresses d'ADN.

Nous noterons (L) (left) et (R) (right) les deux énantiomères. remarquons cependant qu'un croisement (R) avec un demi-angle $\pi/2 - \alpha$ est entièrement superposable avec un croisement (L) de demi-angle α . Ainsi, dans le cas particulier où $\alpha = 45^\circ$, un croisement n'a plus de chiralité.

Quel est le lien avec les structures plectonémiques? Il a été montré expérimentalement[10] et numériquement[137] que l'angle moyen $\langle \theta \rangle$ entre deux segments juxtaposés dans un plectonème vaut environ 60° , dès lors que $\sigma < -0.03$. Ainsi, on peut distinguer nettement à partir de l'angle entre croisement un supertour (+) d'un supertour (-), mais également des tresses d'ADN dont le sens d'enroulement diffèrent (voir figure 3.4).

Ce modèle, convient particulièrement au mécanisme d'action de l'enzyme, qui est censé interagir très localement avec deux molécules d'ADN. Il suppose que l'enzyme ait une certaine affinité pour la géométrie des croisements de l'ADN attendus dans un plectonème (+).

3.2 Accrochage de la topoisomérase 4 sur l'ADN

3.2.1 Propriétés d'accrochage de la topo 4

Un des modèles suggérés dans la section précédente est que la spécificité d'action de la topo 4 puisse être due à un accrochage particulier de l'enzyme sur son substrat.

En pratiquant des expériences de cyclisation de petites molécules d'ADN (environ 200 bp), Vologodskii *et al.* [133] ont montré que la topo 4 augmente d'environ un facteur 30 la probabilité de cyclisation. Cette probabilité étant liée à la proximité des extrémités des molécules d'ADN, il a été suggéré que l'enzyme impose une courbure d'environ 130° à la molécule lors de son accrochage (angle estimé sur la base de simulations Monte-Carlo). En outre, il apparaît que cet effet est observé également en absence d'ATP.

Par ailleurs, les auteurs ont observé en microscopie électronique des complexes enzymatiques (topo 2 ou topo 4) liés à l'ADN (voir figure 3.5). Dans le cas de la topo 4, l'ADN (super-enroulé négativement) apparaît comme étant fortement courbé au voisinage du complexe. Dans la majorité des cas, des angles de courbure de plus de 90° sont observés. Les complexes enzymatiques liés à l'ADN sont majoritairement localisés à l'apex des structures plectonémiques.

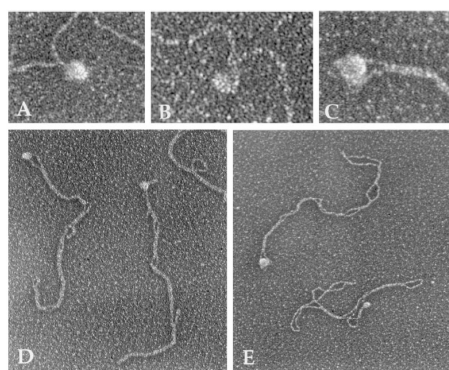


FIG. 3.5 – Image de microscopie électronique de molécules de topoisomérases accrochés à l'ADN. En A,B et D, les images sont celles de la topo 2 de levure. En C et en E, il s'agit de la topo 4 de *E. coli*. En A et B, l'ADN est relaxé, alors qu'il est super-enroulé négativement dans les cas C,D et E. La barre noire représente 330 bases d'ADN. Image tirée de [133].

Des résultats précédents [122] ont montré que la topo 2 de la drosophile avait tendance à stabiliser des croisements plectonémiques. Dans la section suivante, nous présentons un article relatant les expériences d'accrochage de la topo 4 sur molécule unique d'ADN en absence d'ATP.

3.2.2 Article : Bending effect by topoisomerase IV

A soumettre à J. Mol. Biol.

Single molecule assays reveal strong DNA bending by Topoisomerase IV

G.Charvin^{1*} and T.R. Strick², D. Bensimon¹, V. Croquette¹

¹ LPS, ENS, UMR 8550 CNRS,

24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

² Cold Spring Harbor Labs, Beckman Building,

1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA

(Dated: June 27, 2004)

Escherichia coli topoisomerase IV (topo IV) is an essential enzyme that unlinks sister chromosomes during replication. In the presence of ATP, it efficiently removes positive but not negative supercoils. Here we investigate this chiral discrimination at the level of enzyme binding to DNA. Using a single-molecule DNA micromanipulation set-up, we show that, in the absence of ATP, topo IV interacts cooperatively and similarly with both (+) and (-) supercoils, but more weakly with relaxed DNA. We find that the enzyme favors bending and a slight overtwisting of the DNA. We estimate the free energy of binding and the dissociation constant of the enzyme/DNA complex. These experiments shed new light on the mechanism of topo IV binding to DNA, which is different from the mechanism used by eukaryotic topo II. They demonstrate the power of single molecule assays for detailed quantitative investigations of DNA-protein interactions.

INTRODUCTION

Topoisomerases are enzymes responsible for the regulation of DNA topology in the cell [1, 2]. Type II topoisomerases catalyze the ATP-dependent passage of one DNA segment (the transport, or T, segment) through another (the gate, or G, segment). They decatenate sister chromosomes during DNA replication[3] and are known to regulate the level of supercoiling during replication, transcription or recombination[4].

In bacteria, there are two distinct type II topoisomerases : gyrase and topo IV. Gyrases generate negative supercoiling [5], which promotes the compaction of DNA and regulates transcription [6]. Topo IV is known to play a major role during replication, where it removes the positive supercoils generated downstream from the replication complex [7] and may unlink the newly synthesized sister chromosomes [7, 8].

Whereas eukaryotic type II topoisomerases are able to relax both positively ((+)scDNA) and negatively ((-)scDNA) supercoiled DNAs, topo IV has been shown to possess a clear preference for the removal of (+) supercoils [9]. Several models have been proposed to explain this chiral discrimination: it has been suggested that the enzyme could be sensitive to the relative orientation of the T- and G-segments, which is different in (+)scDNA and (-)scDNA supercoils [9]. Klenin et al. [10] have proposed that this discrimination could also be due to a chiral left-handed binding geometry of the enzyme on the G-segment, which would favor the correct juxtaposition of the T-segment in (+) supercoils. The motivation for this model was based on the observation in electron microscopy (EM) pictures of topo IV bound to the apex of (-) supercoiled plasmids. Topo IV-induced bending of DNA has also been seen in DNA cyclization assays [10]. Binding of topo IV to DNA was first investigated by Hiasa and Marians [11] in assays measuring the retention of the binary complex on a nitrocellulose filter. They reported that topo IV binds preferentially to linked DNA dimers rather than to positively supercoiled DNA and to supercoiled DNA rather than to relaxed or linear molecules. Further binding experiments[12] have let to suggest that the chiral discrimination operated by the enzyme is not due to preferential binding onto (+)scDNA.

In this study, we provide a set of quantitative measurements of topo IV/DNA interactions in the absence of ATP, using a single DNA micromanipulation setup based on a magnetic trap [13, 14]. As previously reported, topo IV appears to bend supercoiled DNA, thereby changing the characteristic dimensions of its interwound plectonemic structures (supercoils). In contrast with bulk experiments, however, we find that the binding of topo IV to (+)scDNA and (-)scDNA is asymmetric, suggesting that the topo IV/DNA interaction generates compensatory negative supercoils on the DNA. This interaction implies a slight ($\sim 16\%$) overwinding of the DNA interacting with topo IV (either as increased local twist or through a slight right-handed solenoidal interaction). A simple mechanical model is capable of explaining the observed force- and supercoiling-dependence of the interaction, which is strongly cooperative and saturates at concentrations $[\text{topo IV}] \approx 0.3\text{nM}$. This concentration is much lower than values for the dissociation constant previously estimated from bulk assays. From this model, we can extract the radius of curvature which the enzyme imposes upon the DNA: $R_0 \approx 6.4\text{ nm}$. Since topo IV tends to bend DNA it lowers the buckling threshold of a stretched and twisted molecule. The lower torque at this threshold allows us to estimate the free energy of binding $\Delta G_{\text{binding}}^{\sigma > 0} \approx -13k_B T$ on (+)scDNA and $\Delta G_{\text{binding}}^0 \approx 10k_B T$ on relaxed DNA (at $[\text{topo IV}] = 3\text{ nM}$).

RESULTS

Testing the binding of topoisomerases to DNA crossovers

In the present experiments, a single 11 kbp DNA molecule ($Lk_0 = 1050$) is anchored at one extremity to the surface of a glass capillary, while the other end is tethered to a superparamagnetic bead (see figure 1). The bead, pulled by the magnetic field gradient generated by small magnets, stretches the tethering DNA molecule. Rotating the magnets by n turns allows us to change the supercoiling density $\sigma = n/Lk_0$ of the DNA molecules, provided they are not nicked [13, 14].

To investigate the interaction of topo IV with DNA, we first checked whether, in the absence of ATP, the enzyme was capa-

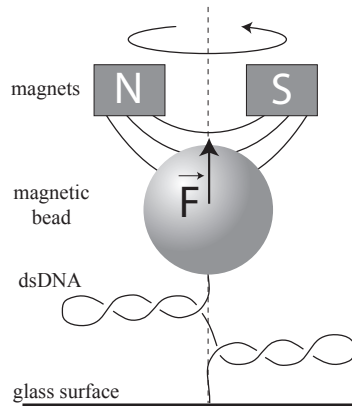


FIG. 1: **Sketch of the experimental setup** A single DNA molecule is tagged at their ends with biotin and digoxigenin, so that it can be attached to a streptavidin-coated superparamagnetic bead and an antidigoxigenin-coated glass surface. Translation and rotation of small magnets close to the DNA molecule (few mm) change respectively the force applied on it and the supercoiling density. The extension of the DNA is measured by tracking the position of the bead using an inverted microscope (see methods for details).

ble of binding to the DNA crossovers present in interwound plectonemic structures. Such a behavior had previously been observed with eukaryotic topo II using EM [15] as well as a single-molecule “clamping” assay [16]. In such a “clamping” assay, a supercoiled DNA is alternatively subjected to a low and then a high stretching force while its extension is monitored. By suddenly increasing the stretching force from, e.g., $F = 1$ pN to $F = 5$ pN, the extension of a bare DNA molecule increases in a rapid, smooth and reproducible fashion as plectonemic supercoils are pulled out (Fig. 2a).

This behavior is changed by the introduction of an enzyme which can bind to two DNA segments and thereby protect downstream supercoils from the rising force. When the force is increased, upstream supercoils are still removed, allowing the extension to grow. Upon reaching the protein clamp, the DNA extension ceases to increase and a plateau is observed. When the protein clamp dissociates, downstream supercoils are suddenly exposed to the force and pulled out, leading to a jump in DNA extension. This characteristic pattern of plateaus and jumps was observed using *Drosophila melanogaster* topo II (Fig. 2b), demonstrating that this enzyme could bind to and stabilize the DNA crossovers which arise in plectonemic supercoils [16].

The same experiment was performed with *E. coli* topo IV ([topo IV] = 3 nM > K_d , see below) on positively ($n=52$) or negatively ($n=-52$) supercoiled DNA, by switching the stretching force between 0.15 pN and, respectively, 6 pN and 2.8 pN. The experiment was ran in the same conditions as the ones used in the assay described in Fig 3b, where strong interaction of Topo IV with DNA was observed. In contrast with the signal observed in presence of *D. melanogaster* topo II, no large clamping events were observed (compare Fig.2b and c) : after raising the force, the DNA usually

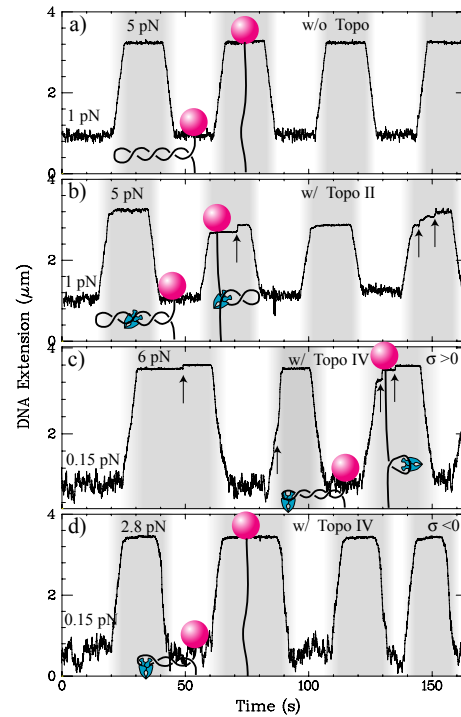


FIG. 2: Force modulation, or “clamping”, experiments in the presence of topoisomerase but in the absence of ATP.

The extension of a supercoiled DNA molecule ($\sigma = +0.03$) is monitored as the force alternates between low and high values (marked as shaded areas). See text for details. Sketches indicate the supercoiled DNA molecule attached to the bead in the different conditions (low or high force, with or without protein) explained below. a) In the absence of *D. melanogaster* topo II, alternating between low (1pN) and high (5pN) forces yields smooth and reproducible changes in the DNA's extension, corresponding to respectively the appearance and the removal of plectonemic structures. b) In the presence of topo II, the changes in extension following an increase in force are neither smooth nor reproducible. Instead, abrupt jumps in DNA extension are observed, presumably a result of the abrupt release of topo II from DNA crossovers (marked by the arrows) [16]. c) Experiments performed with *E. coli* topo IV (3nM) on positively supercoiled DNA ($\sigma = 0.05$). Here the force is modulated between 0.15 and 6 pN for (+) supercoils. Some clamping events are observed, but the maximal extension is usually quickly recovered (which is not the case in b)), indicating the removal of every plectonemic loop. Note that this experiments is ran in the same conditions as the one described in figure 3 b), where a strong interaction with DNA is observed. d) Same experiment as in c) , but with $\sigma = -0.05$. No clamping is observed.

recovers quickly its maximal extension (On (+)scDNA only, we sometimes observed small jumps (< 100 nm) when the molecule was almost fully extended.) This shows that, if topo IV interacts with supercoiled DNA in the absence of ATP, it is probably not much through binding to DNA crossings.

Topoisomerase IV binding on supercoiled DNA

In an attempt to detect binding of topo IV to DNA in the absence of ATP, we examined the extension of a supercoiled DNA molecule before and after addition of a saturating concentration of enzyme.

The response of bare DNA to supercoiling is by now well understood[13]. At low forces ($F < 0.4$ pN) the twisted molecule buckles and forms (+) or (-) plectonemic supercoils which are mirror-images of each other, see Fig.3d) and e). The size of these plectonemes, characterized by the decrease δl_0 in the molecule's extension per added turn, varies inversely with the force: $\delta l_0 \sim F^{-0.4}$, see Fig.3c).

To investigate the effect (if any) of Topo IV binding on the DNA's extension, we begin with a bare DNA stretched at a low, constant force ($F = 0.12$ pN) and overwound by 30 turns ($\sigma = 0.03$); in these conditions the DNA extension is constant at $0.35 \mu\text{m}$. Addition of topo IV (0.3 nM) to the reaction chamber (thus leading to a flow in the chamber) leads to a smooth, gradual (time-scale ≈ 500 s) increase in the DNA's extension (Fig. 3a). This implies that topo IV can interact with supercoiled DNA in the absence of ATP.

To further characterize this interaction we measured the mean steady-state extension of DNA as a function of the degree of supercoiling $\sigma = n/Lk_0$, in the presence of topo IV at constant force ($F = 0.12$ pN). The extension vs. supercoiling curve is typically bell-shaped, with a maximum at $\sigma = 0$ [13, 14]. Figure 3b) shows the DNA extension as a function of the number of turns n in three cases : in the absence of enzyme (blue symbols), in the presence of topo IV (3 nM, red symbols), and after washing out the enzyme with protein-free buffer (green symbols). Overall, the extension of a (+) or (-)scDNA is greater in the presence of topo IV than in its absence. This difference in extension increases with the degree of supercoiling, suggesting that supercoiling promotes enzyme binding to DNA.

We now analyze the slope of these extension vs. supercoiling curves (in their linear regimes). In the absence of protein, the DNA extension decreases by $\delta l_0 = 68 \text{ nm/turn}$ with each additional turn of the magnets (positive or negative). In the presence of excess enzyme ([topo IV] > 0.3 nM, see below) the slope obtained for (+)scDNA $\delta l_p^+ = 32 \text{ nm/turn}$ is different from the slope measured on (-)scDNA $\delta l_p^- = 48 \text{ nm/turn}$. As another point of contrast with bare DNA, we will see further on that these slopes δl_p^+ and δl_p^- vary little with force (see Fig. 3c)). Finally, we observe no significant changes in the DNA's extension at $\sigma = 0$, which is consistent with a weaker interaction of topo IV with relaxed as compared to supercoiled DNA[11].

The interaction of topo IV with supercoiled DNA is reversible and non-hysteretic. Indeed, the protein can easily be detached from its substrate by washing the capillary with an enzyme-free buffer or by untwisting the DNA to remove its plectonemic supercoils (see Fig.3). This observation stands in striking contrast with eukaryotic topo II, where the tight binding of the enzyme to DNA crossovers results in significant hysteretic behaviour upon uncoiling a supercoiled DNA (inset in Fig.3b) or upon pulling on a supercoiled DNA (as discussed above, see Fig.2).

The extension vs. supercoiling data measured in presence of enzyme can be accounted for by a simple mechanical model of

the interaction between topo IV and DNA. In the following we assume that this interaction imposes bending of the DNA with a radius R_0 and a weak over-twisting of DNA, with local change in linking number $0 < \Delta \ll 1$. This local overtwisting has to be compensated by a change in the overall writhe of the molecule by $-\Delta$ per bound enzyme. Thus on (+)scDNA, the amount of writhe is reduced upon binding of the enzyme, whereas it is increased on (-)scDNA (see Fig. 3d) and e)). This qualitatively accounts for the larger contraction rate upon underwinding as compared to overwinding: $\delta l_p^- > \delta l_p^+$. If binding of topo IV onto DNA favors a certain radius of bending R_0 , we can write the energy required to form a loop in the molecule at the onset of buckling[17] as:

$$\mathcal{E}^{prot} = \frac{1}{2}B \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_0} \right)^2 2\pi R + 2\pi R F + \Delta G_{binding}^0 \quad (1)$$

The first term on the right corresponds to the bending energy of a loop of radius R (where $B \equiv k_B T \xi$ is the bending modulus, $\xi = 50 \text{ nm}$ the DNA persistence length and $k_B T = 4 \text{ pN.nm}$ is the thermal energy). The second term is the work done against the force F while forming the loop. The third term is the free energy change upon binding of topo IV to relaxed DNA ($\sigma = 0$) at $F = 0$. Minimization of $\mathcal{E}^{prot}$ yields the radius R of the loop at the onset of buckling:

$$R = \frac{R_0}{\sqrt{1 + \frac{2FR_0^2}{k_B T \xi}}} \quad (2)$$

Past the buckling threshold every extra rotation applied to the DNA changes its extension by typically $\delta \sim 2\pi R$. However, since the interaction of topo IV with DNA absorbs an amount $\Delta > 0$ of linking number, one needs to rotate the bead clockwise by $1 + \Delta$ turns to actually add one (positive) plectonemic supercoil to the DNA (i.e to observe a decrease in extension by δ). Similarly, one needs to rotate the bead counterclockwise by $1 - \Delta$ turns to add one (negative) plectonemic supercoil to DNA. As a result the DNA's rate of contraction upon supercoiling is:

$$\delta l_p^+ = \frac{\delta}{1 + \Delta} \quad (3)$$

$$\delta l_p^- = \frac{\delta}{1 - \Delta} \quad (4)$$

These predictions are in good agreement with the experimental data (for both (+) and (-)scDNA) and yield best-fit values $R_0 = 6.4 \text{ nm}$ and $\Delta = 0.16$, see Fig.3c).

Estimating the dissociation constant of topo IV on supercoiled DNA.

We have seen that binding of topo IV to supercoiled DNA changes its rate of contraction $\delta l_p^{+/-}$ compared to that observed in the absence of protein, δl_0 . These data were obtained at saturating concentrations of protein. Indeed, the dissociation constant itself could be measured by using the decrease in the DNA's extension per added turn at various concentrations of [topo IV],

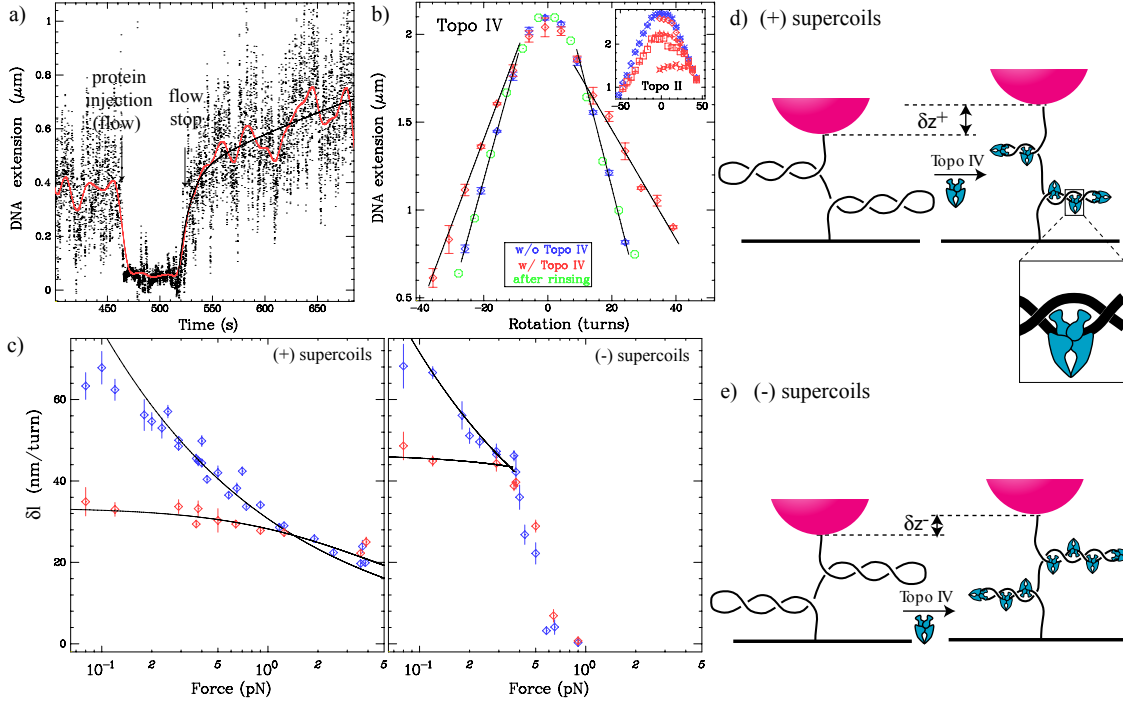


FIG. 3: Topo IV binding on supercoiled DNA.

a) Real-time observation of topo IV interaction with positively supercoiled DNA. Bare DNA is overwound ($\sigma = 0.3$) and stretched ($F = 0.12$ pN); its extension is constant at $0.35 \mu\text{m}$. After addition of topo IV at a concentration of 0.3 nM (leading to a transient flow in the reaction chamber) the extension gradually increases, pointing to an effect of topo IV binding upon the molecule's extension. Black dots indicate raw data and the red line is a low-pass filter at 0.05 Hz. The black line is a double exponential fit, indicating that the order of magnitude of the time-scale for enzyme binding is ≈ 500 s. b) Mean DNA extension measured in the absence and presence of topo IV (3 nM) at various degrees of supercoiling. The extending force is the same as in a). Blue points : control data obtained in the absence of enzyme [13, 14]. Red points : data obtained after injection of 3 nM topo IV. Data in green was obtained after washing the reaction chamber with enzyme buffer. The similarity of the blue and green points shows the reversal of protein binding to DNA. The decrease in extension per added turn was determined using linear fits (black lines) to the appropriate portion of the data. Error bars indicate statistical errors. Inset : same experiment in presence of eukaryotic topo II (≈ 0.15 nM; $F = 0.45$ pN). Blue and red symbols are as in the main panel. Coiling and uncoiling the DNA after addition of protein leads to hysteretic behavior, presumably as plectonemic supercoils are locked by the enzyme at some crossings and can no longer be removed by rotating the bead (see also Fig. 2). c) and d) Decrease in DNA extension δl per added turn of the magnets as a function of the force for scDNA in the absence (blue points) or presence of 3 nM topo IV (red points). The plot on the left display the results obtained with (+) scDNA: δl_0 (blue points) and δl_p^+ (red points). On the right, same experiments with (-) scDNA: δl_0 (blue points) and δl_p^- (red points). Above 0.4 pN, (-)scDNA unwinds. Error bars indicate statistical error. Data obtained in the absence of topo IV were fitted (black line) using a powerlaw function [17]: $\delta l_0 = AF^{-0.4}$ with $A \approx 30$. Data obtained in the presence of topo IV were fitted (black line) using the model described in the text with $2\pi R_0 = 40$ nm and $\Delta = 0.16$. d) and e) Schematics of the binding of Topo IV to respectively (+) and (-)scDNA, showing the decrease (increase) in the number of positive (negative) supercoils, resulting in a net change in extension δz^+ (δz^-).

$\delta l([\text{topoIV}])$, to infer the probability p of topoisomerase binding to DNA. This decrease in extension interpolates between δl_0 (the decrease in absence of enzyme) and δl_p (the decrease in saturating conditions). For (+)scDNA:

$$\delta l([\text{topoIV}]) = p^+ \delta l_p^+ + (1 - p^+) \delta l_0 \quad (5)$$

The probability of topo IV binding to (+)scDNA, p^+ , is thus easily inferred from our measurements:

$$p^+ = \frac{\delta l_0 - \delta l([\text{topoIV}])}{\delta l_0 - \delta l_p^+} \quad (6)$$

The probabilities p^+ and p^- of topo IV binding to, respectively, (+) and (-)scDNA have thus been measured for increasing concentrations of [topo IV], see Fig. 4. Binding of enzyme appears to be cooperative: at a concentration [topo IV] ~ 0.2 nM, p rapidly rises from a very small value to saturation ($p = 1$). We fitted the binding curves obtained for (+) and (-)scDNA using a Hill function :

$$p = \frac{[\text{topoIV}]^\alpha}{K_d^\alpha + [\text{topoIV}]^\alpha} \quad (7)$$

where $\alpha = 4$ yielded the best agreement, and $K_d^+ = 0.15$ nM for (+)scDNA and $K_d^- = 0.23$ nM for (-)scDNA. We note that

the quoted values for K_d constitute an upper limit, as the actual protein concentration in the reaction chamber may be smaller than estimated due to, for instance, adsorption on the walls or the presence of inactive enzymes.

Estimating the binding energy of topo IV onto supercoiled DNA.

As argued previously[17], a stretched DNA must be twisted by a critical number of turns n_c ($n_c = 36$ turns at $F = 1.9$ pN) for the accumulated torque $\Gamma_c = 2\pi C n_c / L$ to be large enough to force it to buckle. Here, $C = 100 k_B \text{ T.nm}$ is the torsional modulus[17] and $L = 3.6 \mu\text{m}$ is the DNA length. At this buckling threshold, the work done on the system to add one turn of DNA twist ($2\pi\Gamma_c$) is balanced by the energy required to bend DNA and work against the stretching force:

$$4\pi^2 C n_c / L = \mathcal{E}_{min}^{no-prot} = \text{Min}_R \left(\frac{B}{2R^2} 2\pi R + 2\pi R F \right)$$

which is minimized for $R_{min} = \sqrt{B/2F} \approx 7.25$ nm and $\mathcal{E}_{min}^{no-prot} = 4\pi R_{min} F \approx 43.3 k_B T$, see Fig.5. Notice that within the accuracy of our simplistic model for buckling, $\mathcal{E}_{min}^{no-prot}$ is indeed balanced at the buckling threshold by the work done by the torque: $4\pi^2 C n_c / L \approx 40 k_B T$.

Interestingly, in the presence of topo IV (3nM), the buckling transition is observed at a much smaller torque, i.e. for a smaller number of turns: $n'_c = 24$ turns. This reflects the tendency of topo IV to bend DNA and thus lower the energy for buckling. From the decrease in the buckling threshold ($n_c - n'_c = 12$ turns at $F = 1.9$ pN) one can deduce the free energy of binding of topo IV to (+)scDNA ($\Delta G_{binding}^{\sigma>0}$) and to torsionally relaxed DNA at zero force ($\Delta G_{binding}^0$, see Eq.1). In the presence of enzyme, the work done by the torque has to be balanced by the minimal cost of interaction between enzyme and DNA :

$$4\pi^2 C n'_c / L = \mathcal{E}_{min}^{prot} = \text{Min}_R \left(\frac{1}{2} B \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_0} \right)^2 2\pi R + 2\pi R F + \Delta G_{binding}^0 \right)$$

The free energy of binding onto supercoiled DNA for [topo IV] = 3 nM is therefore: $\Delta G_{binding}^{\sigma>0} = \mathcal{E}_{min}^{prot} - \mathcal{E}_{min}^{no-prot} = 4\pi^2 C (n'_c - n_c) / L = -13.3 k_B T$. This value agrees with our previous estimate of $K_d^+ = 0.15$ nM (where the free energy is by definition zero) and Hill coefficient $\alpha = 4$:

$$\begin{aligned} \Delta G_{binding}^{\sigma>0} &= -k_B T \ln([topoIV]/K_d^+)^4 \\ &= -k_B T \ln(20^4) \approx -12 k_B T \end{aligned}$$

From the minimization of $\mathcal{E}_{min}^{prot}$ with respect to R , we can compute the radius of the DNA loop in the presence of enzyme:

$R_{min} = 4.8$ nm, see Fig.5. Inserting that value in the right hand side of Eq.8 allows us to deduce the free energy of direct interaction between topo IV and DNA: $\Delta G_{binding}^0 \approx 10 k_B T$ at [topo IV] = 3nM. Due to the simplistic assumptions that underlie Eq.1, in particular the neglect of fluctuations, we estimate the error on $\Delta G_{binding}^0$ to be similar to the discrepancy in the estimate of $\mathcal{E}_{min}^{no-prot}$, i.e. about $3.3 k_B T$. Notice however that $\Delta G_{binding}^0 > 0$, which implies that the topo IV/DNA interaction is not sufficient to induce bending of a relaxed DNA molecule: topo IV interacts better with supercoiled than with relaxed DNA (see Fig.5).

Dynamics of binding and unbinding at the buckling threshold

By twisting the molecule by $n'_c = 15$ turns at $F = 0.7$ pN, i.e. by reaching the buckling threshold in the presence of Topo IV, one can study the dynamics of a single protein binding to and unbinding from DNA[16]. When the protein binds to DNA, the DNA buckles to form a loop which is sufficiently long-lived to be observed as a decrease in the molecule's extension. Upon protein release the DNA reverts to its full, unbuckled length. The binding/unbinding of protein and DNA therefore results in a characteristic telegraphic signal, Fig.6a).

The spatial extent of this signal (~ 53 nm, see inset in Fig.6b)) is comparable to the size of the DNA loop at the buckling threshold ($\approx 2\pi R_{min} = 30$ nm), although a source of difference could be the fact that the DNA segments before and after the loop have to be parallel to each other[18]. The duration τ of the looped state gives information on the stability of the protein-DNA complex formed in the absence of ATP. Interestingly, the cumulative probability histogram of this on-time $P(t > \tau)$ (built with 300 events) displays a double-exponential behaviour characterized by two time-scales: $\sim 90\%$ of events had a lifetime of $\tau_1 \sim 1$ s, and the remaining $\sim 10\%$ had a lifetime of about $\tau_2 \sim 10$ s (see Fig. 6b). A similar behaviour was reported for the binding of *D. melanogaster* topo II to DNA and interpreted as the possible existence of two different conformations for the DNA-bound protein [16]. Although the mechanisms of binding of prokaryotic topo IV and eukaryotic topo II to DNA seem very different (DNA bending for the former, binding to DNA crossings for the latter) both seem to be characterised by two binding configurations with widely different stability. It is tempting to speculate that these two configurations might correspond to the enzymes bound to the gate segment covalently or non-covalently.

DISCUSSION

Our micromanipulation setup allows us to study the elastic response of a single DNA molecule under torsion. Addition of topo IV (in the absence of ATP) leads to observable changes in the elastic behaviour of DNA, allowing us to investigate quantitatively the binding of topo IV to DNA.

From our measurements, we extract the dissociation constant K_d of topo IV/DNA complexes and find that it does not differ significantly between (+) and (-) supercoils: $K_d^+ = 0.15$ nM and $K_d^- = 0.23$ nM. This is in agreement with a previous report that

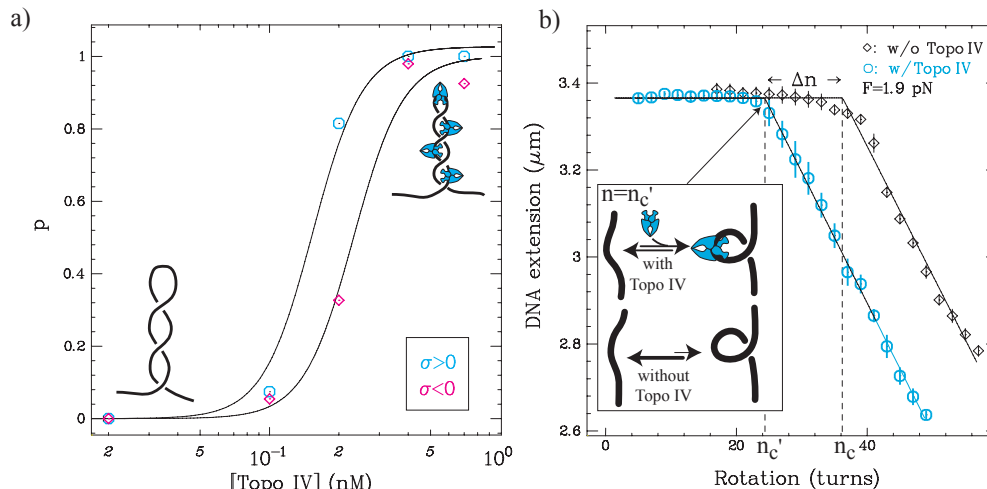


FIG. 4: a) Probability p of topo IV binding to scDNA as a function of enzyme concentration. $\circ$: (+)scDNA; $\diamond$: (-)scDNA. Data was collected at force $F = 0.2$ pN. Points were fitted using a Michaelis-Hill function (see text for details). b) Extension vs. rotation data obtained at $F = 1.9$ pN in the absence ($\diamond$) or presence ($\circ$) of topo IV (3 nM). Error bars indicate statistical error. The buckling thresholds in the absence ($n_c = 36$ turns) or presence ($n'_c = 24$ turns) of topo IV were obtained using best-fitted piecewise linear functions (continuous lines). Inset : the presence of Topo IV shifts the equilibrium between straight and buckled DNA to the buckled state.

topo IV binding does not depend strongly on the sign of supercoiling [12]. This suggests that the observed discrimination operated by topo IV in the preferential relaxation of (+) supercoils is not mediated by preferential binding to (+)scDNA [10]. Instead it is more likely due to the recognition, prior to strand passage, of the different geometry of DNA crossings in (+) and (-)scDNA [9, 12, 19].

In contrast with the eukaryotic topo II which doesn't bend or twist DNA, the interaction of topo IV with DNA favors its bending by a radius $R_0 \approx 6.4$ nm, similar to the Stokes' radius of the enzyme ≈ 6.5 nm [20]. It also induces a slight (16%) overwinding of the molecule (i.e. its binding to negatively supercoiled molecules adds one extra turn for every six turn of unwinding), similar to the small (6%) induction of (+)superhelical turns/topo IV reported in bulk experiments [20]. Note that small changes in twist upon binding are easily detectable with our apparatus. Our observations are consistent with cyclisation experiments that observed bending but no significant chiral interaction of topo IV with DNA [21]. In further contrast with eukaryotic topo II, this bacterial topoisomerase does not bind to DNA crossings in the absence of ATP. These differences are all the more striking given the homology in structure and function of the two enzymes. They could be due to subtle differences in specific interactions. Topo IV may have a more extended (bending and twisting) interaction with the gate segment than topo II, which could interact more strongly with the transported segment. The mechanism of Topo IV binding topo IV could be closer to the one suggested for gyrase. Recent crystallographic and biochemical studies [22] have shown that the C-terminal domain of GyrA (one of the two subunits of gyrase) is responsible for a sharp DNA bending upon binding, and its deletion leads to the conversion of gyrase into a standard Type

II topoisomerase (with decatenase activity, and without generation of supercoiling) [23]. This domain, which is not found in eukaryotic topoisomerases, is highly homologous to the C-terminal domain of parC (one of the two subunits of topo IV), which was also observed to enhance DNA bending [22].

Topo IV exhibits strong cooperative binding onto (+) or (-) scDNA, with a Hill coefficient $\alpha = 4$. This large cooperativity could be due to the fact that topo IV is a tetramer ($\text{ParE}_2\text{ParC}_2$) which might cooperatively assemble onto DNA (in our experiments we used equimolar concentrations of ParE and ParC). Alternatively, there could exist strong cooperative interactions between preassembled enzymes. Until now, there has been no experimental determination of the dissociation constant of the topo IV subunits, but recent *in vivo* experiments suggested that ParE and ParC may colocalize only during the late phases of replication [24].

The dissociation constant we measure is much smaller than previous bulk estimates [11, 12, 20], which vary between 0.6 nM [20] and 22 nM [11]. This discrepancy might be due to differences in the activity of the topo IV preparations but also to the large cooperativity of binding, which in bulk assays might result in the presence of two sub-populations: DNA molecules unsaturated and fully saturated with the enzyme. Filter retention assays will bind the fully saturated molecules and exhibit a continuous increase of that population with increased concentration of topo IV. The deduced dissociation constant will therefore not reflect the intrinsic binding of topo IV to supercoiled DNA. The small value of the measured dissociation constant implies that in bacteria all topoisomerases are associated with DNA (a single unbound topo IV in *E. coli* corresponds to a concentration ~ 1 nM $> K_d$).

An interesting feature of our experiments is that it allows us to estimate the free energy of binding of topo IV onto relaxed DNA:

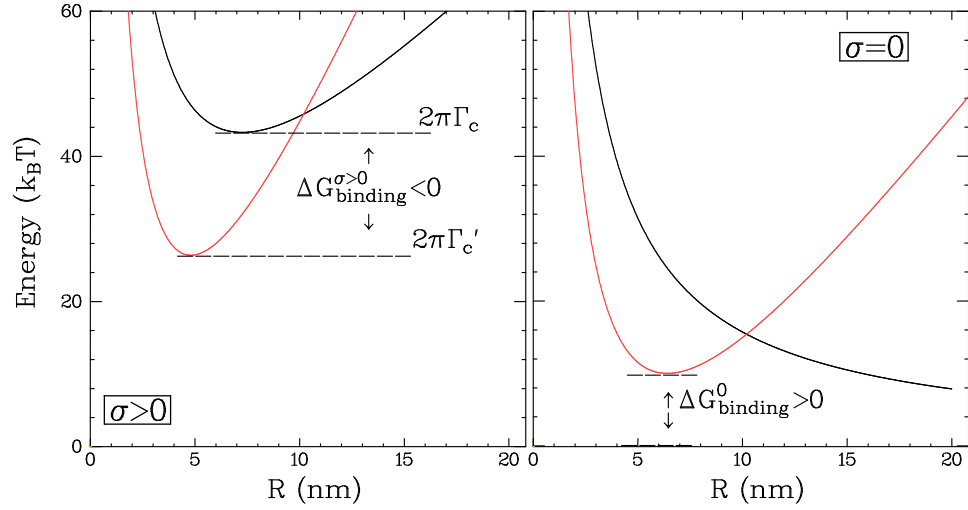


FIG. 5: Variation of the bending energy with the radius of the DNA loop at the onset of buckling with and without topo IV on supercoiled and relaxed DNA (neglecting thermal fluctuations). a) Case $\sigma > 0$, $F > 0$. (Note that this situation also describes the case of a supercoiled circular plasmid, which is always effectively under entropic tension[17].) The relatively large energy of bending at the onset of buckling is balanced by the torsional energy ($2\pi\Gamma_c$). In the presence of 3nM protein (red line), the bending energy is lower than in its absence (black line) by $\Delta G_{binding}^{\sigma>0} \approx -13.3k_B T$ (see text) and thus requires a smaller torque Γ'_c to induce buckling. Notice that the size of the loop (the value of R that minimizes the energy) is different with and without topo IV. b) Case $\sigma = 0$ and $F = 0$: in the absence of protein (black line), the bending energy is minimized for an unbent molecule: $R \rightarrow \infty$. In the presence of 3nM protein (red line) the energy, minimized for a radius R_0 , is larger by $\Delta G_{binding}^0 \approx 10k_B T$ than the energy of the unbent protein free DNA, indicating that enzyme binding on relaxed DNA is not favored.

$\Delta G_{binding}^0 \sim 10k_B T > 0$ (at $[topoIV] = 3 \text{ nM}$) making binding to uncoiled DNA very unlikely. The value of $\Delta G_{binding}^0$ is probably an order of magnitude estimate as it is derived from an elastic model of DNA that, by neglecting thermal fluctuations, allows for simpler though less accurate calculations. While this estimate is consistent with previous observations [12, 20], it nevertheless raises a major issue : how can topo IV be an efficient decatenase during replication if it has to bind to the two relaxed daughter strands? A possible solution to that conundrum is suggested by the intertwining of the two strands, which results in their bending. If the curvature of the braided strands is large enough (radius $R < 15\text{nm}$, see Fig.5 b)) then binding of topo IV on these braids may actually lower their energy.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA constructs and micromanipulation setup

We multiply labelled an 11 kbp DNA (linking number $Lk_0 \approx 1050$) at its extremities with biotin and digoxigenin (Dig) as previously described [14]. The molecule was bound at one end to a streptavidin-coated magnetic bead ($2.8\mu\text{m}$ (Dyna) or $1\mu\text{m}$ (Biolabs)) and at the other to an glass surface coated with anti-dig and passivated with BSA (Roche). We translated small magnets placed above the sample to set the force pulling on the bead and rotated them to apply a torsional stress on the DNA . Bead tracking and force measurement were performed on an inverted micro-

scope [13]. The extension z was measured by tracking the three dimensional position of the tethered bead [14]. The bead's transverse fluctuations $\langle \delta x^2 \rangle$ provide a determination of the stretching force using the equipartition theorem: $F = k_B T z / \langle \delta x^2 \rangle$, where k_B is Boltzmann constant and T the temperature (at 25°C : $k_B T = 4 \text{ pN nm}$). F was measured with 10% accuracy. Notice that the magnetic trap implemented here is a natural force clamp: once the distance of the magnets to the sample (a few mm) is set, the force pulling on the bead is fixed. In plots showing the DNA's extension, the points correspond to the raw data and were obtained at 25 Hz. To eliminate microscope drifts, differential tracking with a second bead glued to the surface was performed.

Clamping analysis

To analyze the clamping events, we use an algorithm based on a fit of a stepwise function using least square minimization[18, 25]. We were then able to construct the distribution of clamping times and also the size of the clamping events. Due to noise, the number of small events ($< 30\text{nm}$) was certainly underestimated.

Binding assays

Binding experiments with topo IV (gift of N. Cozzarelli and N. Crisona) were performed at 25°C in 25 mM Tris buffer (pH=7.6) containing 100 mM potassium glutamate, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM

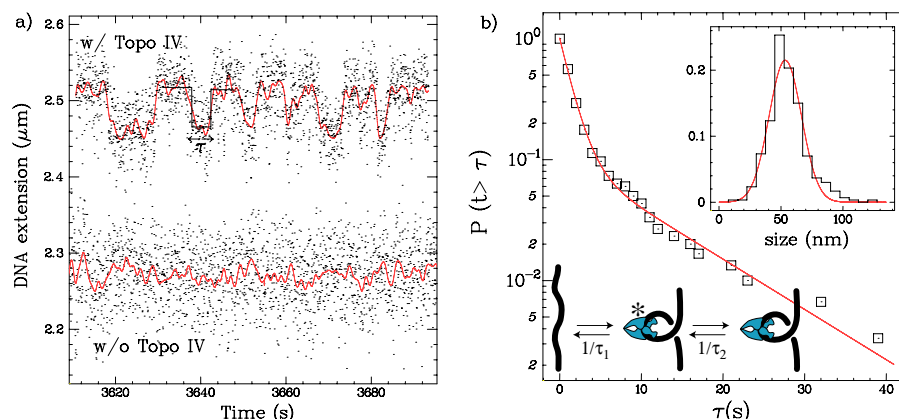


FIG. 6: Topo IV binding at the buckling threshold a) Traces of DNA extension as a function of time in the presence (top) and absence (bottom) of topo IV. Black points depict raw data, which is low-pass filtered (red line) at 1 Hz. Telegraphic signals were fitted using an algorithm described in Material and Methods so as to extract the size and the duration of the each event. b) Integrated distribution of the duration of binding events (black points) (300 binding times were extracted). The red line is a fit using a double exponential (see text for details): $\sim 90\%$ of events had a lifetime $\tau_1 \sim 1$ s, and the remaining $\sim 10\%$ had a lifetime $\tau_2 \sim 10$ s. This indicates that the binding process may involve two successive steps with different off-rates $1/\tau_1$ and $1/\tau_2$, as indicated on the sketch. Inset: distribution of sizes of the clamping events. A gaussian fit gives the average size of the events 53 ± 1 nm. c) Possible models for the interaction of various type II topoisomerases with DNA.

dithiothreitol (DTT), 50 μ g/ml BSA[9].

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge N. Crisona and N.R. Cozzarelli (University of Berkeley) for the gift of the *E. coli* topo IV. We also thank M.-N. Dessinges and G. Lia for DNA constructs. This work was supported by grants from ARC, CNRS, ENS, Universities Paris VII and VI and a CEE MolSwitch grant.

* Electronic address: Gilles.Charvin@lps.ens.fr; URL: <http://www.lps.ens.fr/~charvin>

- [1] J.C. Wang. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.*, 31:107–144, 1998.
- [2] J. J. Champoux. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.*, 70:369–413, 2001.
- [3] J. Roca and J.C. Wang. The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerase. *Cell*, 71:833–840, 1992.
- [4] J. C. Wang. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3(6):430–40, 2002.
- [5] R.J. Reece and A. Maxwell. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, 26:335–375, 1991.
- [6] A. Revyakin, R. H. Ebright, and T. R. Strick. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: Detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004.
- [7] H. Hiasa and K. J. Marians. Topoisomerase IV can support *ori* DNA replication in vitro. *J Biol Chem*, 269(23):16371–5, 1994.
- [8] E.L. Zechiedrich and N.R. Cozzarelli. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *escherichia coli*. *Genes and Development*, 9:2859–2869, 1995.
- [9] N. Crisona, T.R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, and N. Cozzarelli. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E.coli* topoisomerase VI in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & Development*, 14:2881–2892, 2000.
- [10] K. Klenin, J. Langowski, and A. Vologodskii. Computational analysis of the chiral action of type II DNA topoisomerases. *J. Mol. Biol.*, 320:359–367, 2002.
- [11] H. Hiasa and K.J. Marians. Two distinct modes of strand unlinking during θ -type DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 271:21529–21535, 1996.
- [12] M. D. Stone, Z. Bryant, N. J. Crisona, S. B. Smith, A. Vologodskii, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli. Chirality sensing by *escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15):8654–9, 2003.
- [13] T. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271:1835–1837, 1996.
- [14] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74:2016–2028, 1998.
- [15] E.L. Zechiedrich and N. Osheroff. Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO Journal*, 9:4555–4562, 1990.
- [16] T.R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404:901–904, 2000.
- [17] G. Charvin, T.R. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon. Twisting DNA: single molecules studies. in press.
- [18] G. Lia, D. Bensimon, V. Croquette, J. F. Allemand, D. Dunlap, D. E. Lewis, S. Adhya, and L. Finzi. Supercoiling and denaturation in gal repressor/heat unstable nucleoid protein (HU)-mediated DNA looping. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20):11373–7, 2003.
- [19] G. Charvin, V. Croquette, and D. Bensimon. Single molecule study of dna unlinking by eukaryotic and prokaryotic type II topoisomerase.

- merases. *PNAS*, 100(17):9820–9825, 2003.
- [20] H. Peng and K. J. Mariani. The interaction of escherichia coli topoisomerase iv with DNA. *J Biol Chem*, 270(42):25286–90, 1995.
- [21] A. V. Vologodskii, W. Zhang, V. V. Rybenkov, A. A. Podtelezhnikov, D. Subramanian, J. D. Griffith, and N. R. Cozzarelli. Mechanism of topology simplification by type ii DNAtopoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6):3045–9, 2001.
- [22] K. D. Corbett, R. K. Shultzaberger, and J. M. Berger. The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19):7293–8, 2004.
- [23] S.C. Kampranis and A. Maxwell. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93:14416–14421, 1996.
- [24] O. Espeli, C. Levine, H. Hassing, and K. J. Mariani. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *e. coli*. *Mol Cell*, 11(1):189–201, 2003.
- [25] N. H. Dekker, V. V. Rybenkov, M. Duguet, N. J. Crisona, N. R. Cozzarelli, D. Bensimon, and V. Croquette. The mechanism of type ia topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19):12126–31, 2002.

3.3 Décaténation par la topo 4

3.3.1 Le "paradoxe" de la topo 4

Les modèles de reconnaissance chirale du substrat par la topo 4 tentent d'expliquer le comportement asymétrique de la topo 4 sur les supertours (+) et (-). Cependant, comme nous l'avons évoqué, un des rôles majeurs de la topo 4 semble être la séparation des doubles brins fils par décaténation lors de la réplication de l'ADN [1, 150]. Des expériences *in vitro* ont suggéré que la séparation des molécules filles puisse être due soit à la relaxation des supertours (+) sur le brin parent, soit par décaténation des brins fils en aval de la fourche de réplication. La relaxation des supertours (+) en amont de la fourche de réplication semble être (par la gyrase ou par la topo 4) prédominante au début de la réplication, alors que la décaténation l'est plutôt en fin du processus, lorsque le chromosome est presque intégralement répliqué[1, 90].

Les molécules nouvellement synthétisées s'enroulent l'une autour de l'autre avec une hélicité droite (qui est par nature la même chiralité que l'ADN) [1, 90, 52]. Or, c'est précisément la chiralité des supertours (-): les caténanes devraient constituer un mauvais substrat pour la topo 4, qui devrait ainsi être incapable de démêler ces molécules. En conséquence, la séparation des brins fils deviendrait de moins en moins efficace au fur et à mesure que la réplication progresse.

L'article exposé dans la section 3.3.2 tente de résoudre ce paradoxe en proposant un modèle original de décaténation, à partir d'expériences à l'échelle de la molécule unique de décaténation de deux molécules d'ADN. Des expériences de décaténation avec la topo 2 de drosophile y sont également présentées.

3.3.2 Article : "Single molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases"

Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases

G. Charvin*, D. Bensimon, and V. Croquette

Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure, Unité Mixte de Recherche 8550 Centre National de la Recherche Scientifique, 24 Rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France; and Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure, 46 Rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05, France

Edited by Kiyoshi Mizuuchi, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved June 13, 2003 (received for review March 18, 2003)

Type-II topoisomerases are responsible for untangling DNA during replication by removing supercoiled and interlinked DNA structures. Using a single-molecule micromanipulation setup, we follow the real-time decatenation of two mechanically braided DNA molecules by *Drosophila melanogaster* topoisomerase (Topo) II and *Escherichia coli* Topo IV. Although Topo II relaxes left-handed (L) and right-handed (R-) braids similarly at a rate of $\approx 2.9 \text{ s}^{-1}$, Topo IV has a marked preference for L-braids, which it relaxes completely and processively at a rate of $\approx 2.4 \text{ s}^{-1}$. However, Topo IV can unlink R-braids at about half that rate when they supercoil to form L-plectonemes. These results imply that the preferred substrate for unlinking by Topo IV has the symmetry of an L-crossing and shed new light on the decatenation of daughter strands during DNA replication, which are usually assumed to be linked in an R-braid.

DNA replication

Type-II topoisomerases are ubiquitous ATP-dependent enzymes that catalyze the transport of one DNA segment [the transport (T) segment] through a transient double-stranded break in a second [the gate (G) segment] (1, 2). Their role in the cell is to control the supercoiling of DNA and to untangle the catenanes that arise during replication or recombination (3–6); their malfunction at mitosis or meiosis ultimately causes cell death. *In vitro* experiments have shown that these enzymes can decatenate DNA molecules well below the thermodynamic entanglement equilibrium (7). The mechanism by which this local action on DNA results in unknotting and decatenation (a global topological property) is not fully understood.

In contrast with eukaryotic topoisomerases that act similarly on positively and negatively supercoiled DNA, prokaryotes have two type-II topoisomerases: DNA gyrase and topoisomerase (Topo) IV, which act differently on (+) and (–) supercoiled DNA [respectively, left-handed (L-) and right-handed (R-) nodes; see Fig. 1a]. Gyrase removes (+) supercoils and actively generates (–) supercoils, whereas Topo IV preferentially relaxes (+) supercoils (8). The chiral discrimination of Topo IV, which prevents its interference with the winding activity of gyrase, was suggested (8) to result from a preferred interaction of Topo IV with the particular orientation of the G and T segments encountered in (+) supercoils: an L-crossing with acute angle (see Fig. 1b). However, the main role of Topo IV in bacteria is the unlinking of the sister chromosomes during replication (6, 9). Experiments *in vitro* have suggested that the decatenation of the sister strands could occur either by relaxing the (+) supercoils on the mother strand or by unlinking the braided daughter strands (10). Relaxation of the (+) supercoils arising in front of the replication fork (by gyrase and Topo IV) is thought to be the main pathway of unlinking in the early stages of replication, whereas decatenation of the entangled sister chromosomes becomes increasingly important as replication proceeds to the terminal stage (9, 10). But if these so-called precatenanes wrap around each other in a right-handed fashion [like (–) supercoils; see Fig. 1a], as is generally assumed (6, 10, 11), they should present an inefficient substrate for relaxation by Topo IV. Hence unlinking should become less and less efficient as replication

proceeds to termination, a riddle we call the Topo IV decatenation paradox.

Puzzled by these arguments, we decided to study the unbraiding of two DNA molecules by a single type-II topoisomerase (eukaryotic or prokaryotic) by using the single-molecule magnetic manipulation technique we used previously to study DNA uncoiling (8, 12). Our results confirm that, whereas the eukaryotic Topo II relaxes similarly L- and R-braids, the prokaryotic Topo IV preferentially relaxes L-braids [like (+) supercoils]. However, Topo IV can also unlink R-braids when they supercoil to form L-plectonemes. These observations suggest a solution to the aforementioned paradox.

Materials and Methods

DNA Constructs and Micromanipulation Setup. We multiply labeled a 16-kbp DNA (pXΔII, linking number $Lk_0 \approx 1,500$) at its extremities with biotin and digoxigenin (Dig) as described (13). The molecules were bound at one end to a streptavidin-coated magnetic bead [2.8 μm (Dyna, Great Neck, NY) or 1 μm (Biolabs, Northbrook, IL)] and at the other to an anti-Dig coated glass surface, previously incubated with BSA (Hoffmann–La Roche) to reduce nonspecific interactions. We translated small magnets placed above the sample to set the force pulling on the bead and rotated them to braid the two DNA molecules anchoring the bead to the surface. The extension of the vast majority (>99%) of beads tethered by single molecules was not affected by rotation of the magnets. Thus the anchoring DNA could not be supercoiled (see Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site, www.pnas.org). We conclude that most of the molecules in our sample were nicked, probably because of shear stress. Bead tracking and force measurement were performed on an inverted microscope (14). The extension z was measured by tracking the 3D position of the tethered bead (13) with an error due to Brownian motion of $\approx 10 \text{ nm}$ (with 1-s averaging). The bead's transverse fluctuations (δx^2) allow for a determination of the stretching force using the equipartition theorem: $F = k_B T / \langle \delta x^2 \rangle$, where k_B is the Boltzmann constant and T , the temperature (at 25°C: $k_B T = 4 \text{ pN nm}$). F was measured with 10% accuracy. Notice that the magnetic trap implemented here is a natural force clamp: once the distance of the magnets to the sample (a few millimeters) is set, the force pulling on the bead is fixed. In plots showing DNA extension, the points correspond to the raw data and were obtained at 25 Hz. To eliminate microscope drifts, differential tracking with a second bead glued to the surface was performed.

Unbraiding Assays. Unbraiding experiments with *Drosophila melanogaster* topoisomerase II (Amersham Pharmacia; [Topo II] $\approx 12 \text{ ng/ml}$) were performed at 25°C in 10 mM Tris buffer (pH = 7.9) containing 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 15 $\mu\text{g/ml}$ BSA, and 1 mM ATP. Unbraiding experiments

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: Topo, topoisomerase; T, transport; G, gate; L-, left-handed; R-, right-handed.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: gilles.charvin@lps.ens.fr.

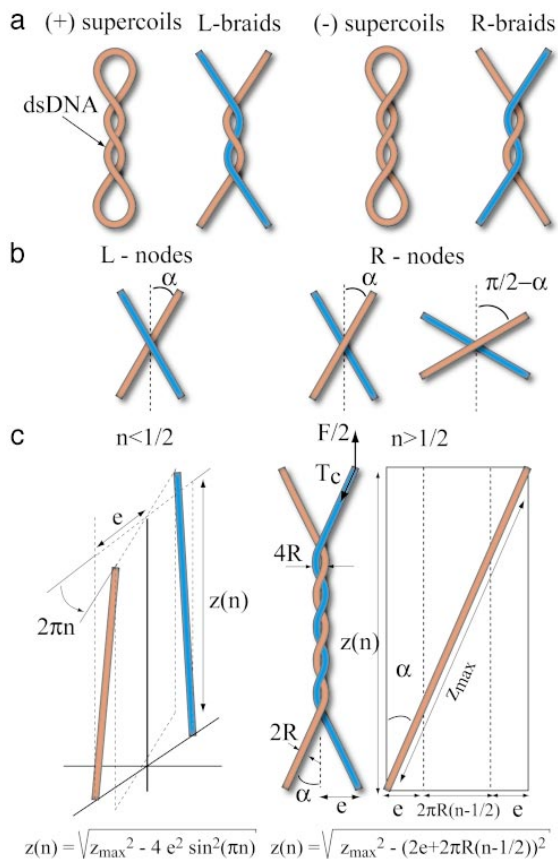


Fig. 1. DNA crossings and geometrical model of DNA braiding. (a) Similarity of the crossings between a positively (negatively) supercoiled plasmid and L-(R-)braids. Note that overtwinning the (R-) double-stranded DNA (dsDNA) molecule generates (+) supercoils that are left-handed. (b) Diagram of the crossing of two DNA strands. 2α denotes the angle between strands; notice that an R-node with an obtuse angle $\pi - 2\alpha$ is identical to an L-node with an acute angle $2\alpha < \pi/2$, which is characteristic of the geometry of crossings in (+) supercoiled DNA. (c) Left) Twisting two molecules by less than half a turn ($0 < n < 1/2$) so they do not cross. $2e$ denotes the distance between the molecules' anchoring points, $z_{\max}$ denotes their length, and $z(n)$ denotes their vertical extension; a direct application of Pythagoras' theorem yields the equation for $z(n)$. (Right) Case $n > 1/2$ when the two molecules are wrapped around each other. The axis of each molecule traces a helicoidal path on an imaginary cylinder of radius R . By describing that path in periodic cylindrical coordinates (schema on the far right), one notices that its azimuthal projection is $2\pi R(n - 1/2) + 2e$. The equation for its vertical projection $z(n)$ is then obtained from Pythagoras' theorem. The tension T_c in each molecule is given by $T_c = F/(2 \cos \alpha)$.

with Topo IV [gift of N. Cozzarelli (University of California, Berkeley) and N. Crisona (University of California, Berkeley)] ([Topo IV] ≈ 20 ng/ml) were performed at 25°C in 25 mM Tris buffer (pH = 7.6) containing 100 mM potassium glutamate, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 50 μ g/ml BSA, and 1 mM ATP (8). Step measurements were performed in the same buffer with 5 μ M ATP with 1- μ m magnetic beads.

Braiding Model. The geometrical model considered here is the twisting of a swing by n turns (see Fig. 1c). Up to the first crossing, $0 < n < 0.5$, we observe a sharp decrease in the vertical extension z of the molecules of radius R , whose extremities are

separated by a distance $2e$ (e can be different for different complexes):

$$z(n) = \sqrt{z_{\max}^2 - 4e^2 \sin^2(\pi n)}, \quad [1]$$

where $z_{\max}$ is the extension at $n = 0$. As the molecules are further braided, $n > 1/2$, their extension z is better understood by describing the braids in periodic cylindrical coordinates as shown in Fig. 1c; this leads to

$$z(n) = z_{\max} \cos \alpha = \sqrt{z_{\max}^2 - \left[2e + 2\pi R \left(n - \frac{1}{2}\right)\right]^2}. \quad [2]$$

Eq. 2 is valid so long as the distance between the axes of the interlinked molecules is larger than their diameter, which implies $\cos \alpha = z(n)/z_{\max} \geq 1/\sqrt{2} = 0.71$ (or $\alpha \leq \alpha_c = 45^\circ$). Notice that for a given force, the number of turns, n uniquely determines the braid angle α (when it is $\leq 45^\circ$). Further braiding increases the torque until it is large enough to induce the braids to supercoil (15). We observe this to happen when $z(n)/z_{\max} \approx z_b/z_{\max} \sim 0.64$.

Results

Braiding Two DNA Molecules: Experiments and Model. We examined the decatenase activity of two different topoisomerases [Topo II from *D. melanogaster* (12) and Topo IV from *Escherichia coli* (8)] by monitoring in real time the increase in extension of the molecules as they were unlinked. The molecules' extension z at a given force F was measured as described in *Materials and Methods*. Because the elastic behavior of a single stretched DNA molecule is well known (16–18), we verified that the bead was tethered by two molecules by comparing the measured extension $z_{\max}$ in absence of braiding with the expected extension for a bead tethered by two molecules (see Fig. 8a, which is published as supporting information on the PNAS web site).

The molecules were then braided around each other n times by rotating the magnets (Fig. 2), resulting in a decrease in z . The variation of z with n is nicely described by the geometric braiding of two ropes of radius R and maximal extension $z_{\max}$ anchored a distance $2e$ apart as in a swing (see *Materials and Methods* and Figs. 1 and 2). This model implies that, in contrast with previous single-molecule (12) (and bulk) supercoiling experiments, the braid angle α is related to the molecules' extension by $\cos \alpha = z/z_{\max}$ (Fig. 2). At any constant force F , the extension z shrinks with n , whereas α increases until the strands are in close contact at $n = n_c$ where $\alpha = \alpha_c = 45^\circ$. As we further twist the molecules and bring them into closer contact, the braiding torque increases until at $n = n_b$, the braids buckle and form plectonemic supercoils. This transition is observed when $z/z_{\max} = z_b/z_{\max} \sim 0.64$ and is characterized by an increase in the fluctuations in extension (data not shown) and by a discontinuity in the slope of $z/z_{\max}$ vs. n (see Fig. 2). That buckling transition was also observed in numerical simulations of the braiding of two stretched DNA molecules (data not shown). On further twisting, the extension z shortened by a constant amount $\delta z \sim 42$ nm per turn (see Fig. 2), as expected for plectonemic braids (15).

At each force F , we determined the values of the intermolecular distance $2e$ (which varies from bead to bead) and the DNA's effective radius R that best fit the data for $\cos \alpha$ to the model when $\alpha < 45^\circ$. That the best-fit values of $2e$ (for a given bead) varied little ($0.8 \pm 0.08 \mu$ m) over a factor 10 variation in F further validates our model. Furthermore, as predicted by Marko (15), at large forces ($F > 0.2$ pN) the braid radius R decreased as $F^{-3/4}$ due to a reduction in entropic confinement (see Fig. 8b). Its value ($R \sim 5$ nm) at $F = 0.3$ pN is compatible with values measured on free plasmids in similar salt conditions (19, 20). The excellent agreement between the braiding data and the simple geometric model just described allows for a detailed understanding of DNA unbraiding by type-II topoisomerases.

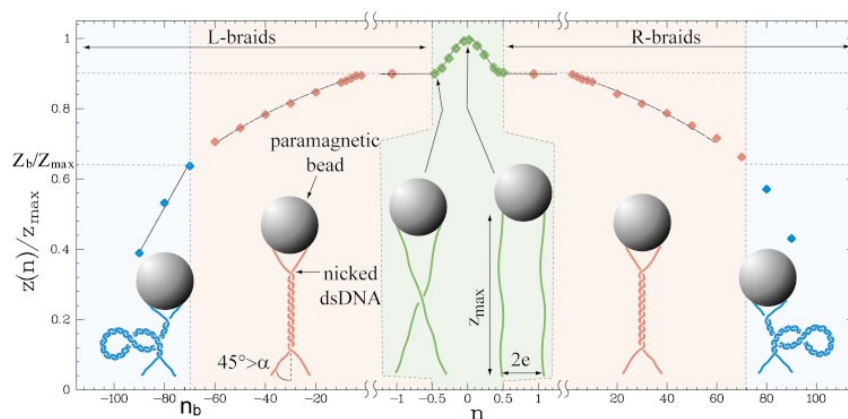


Fig. 2. Braiding of two DNA molecules. Shown are two DNA molecules anchored to a magnetic bead. By rotating the bead by n turns, the molecules are braided around each other, and their extension z decreases from their maximal value $z_{\max}$ at $n = 0$. Plotted: the molecules' relative extension $z/z_{\max}$ vs. n at $F = 1.15$ pN (points). Notice the change in the horizontal scale when $-1 < n < 1$. There is a sharp decrease in extension for the first half turn ($|n| < 1/2$, green shaded area), i.e., until the two molecules cross, followed (for $|n| > 1/2$, red shaded area) by a more gradual decrease as they wrap around each other. The plain black lines are a best fit to the data using the geometrical model (described in Fig. 1c and *Materials and Methods*). For relative extensions $z/z_{\max} < z_b/z_{\max} \sim 0.64$ (blue shaded area), the braids in close contact supercoil leading to a decrease in extension $\delta z \sim 42$ nm per turn (15).

The Eukaryotic Topo Decatenates L- and R-Braids at the Same Rate as It Relaxes Supercoiled DNA. The addition of eukaryotic Topo II in an appropriate reaction buffer (see *Material and Methods*) led to an increase in extension corresponding to decatenation of L- or R-braids (Fig. 3a). To ensure that a single enzyme was monitored, we set the concentration of topoisomerase so that the typical waiting time for an unbraiding event T_w was larger than the relaxation time T_r . The probability that two enzymes acted simultaneously was then negligibly small (12). In these conditions, we observed the enzyme to unlink L- and R-braids at similar rates (see Fig. 3b) and with a high processivity: all of the braids (usually ≈ 40 , but as many as 80) were unlinked in one burst of activity. Knowing the variation of z with n (see Fig. 2), we estimated the average decatenation rate (for both L- and R-braids): $v_d = 2.7 \pm 0.3$ cycles/s at $F = 0.3$ pN. Notice that the tension T_c in each molecule varied slightly with the braiding angle: $T_c = F/(2 \cos \alpha)$, where $0.7 \leq \cos \alpha \leq 0.9$; the lower bound was reached at close contact ($\alpha = 45^\circ$) and the upper one at first contact ($n = 1/2$). As was the case for supercoil removal (12), the decatenation rate was slowed down exponentially with the

averaged molecular tension $\langle T_c \rangle \approx F/1.6$: $v_d = v_d^0 \exp(-\Delta \langle T_c \rangle / k_B T)$ with $\Delta = 1.9$ nm and $v_d^0 = 2.9$ cycles/s; see Fig. 3c.

Topo IV Unlinks L-Braids Completely but R-Braids Only Partially. Whereas eukaryotic Topo II is insensitive to the chirality of the DNA crossing, bacterial Topo IV relaxes (−) supercoils 20 times slower than (+) ones. Furthermore, a 20× higher enzymatic concentration is required to observe those negative uncoiling events (8). A chiral discrimination is also observed in Topo IV unbraiding. As shown in Fig. 4a, Topo IV relaxed L-braids completely and with a high processivity but did not relax R-braids below a final catenation number n_s . However, although uncoiling of (+) and (−) supercoils occurs at widely different rates, Topo IV decatenated L- and R-braids similarly when $n > n_s$: $v_d^L = 2.35$ cycles per s and $v_d^R = 1.05$ cycles per s, respectively, for L- and R-nodes (at the same [TopoIV] ~ 20 ng/ml); see Fig. 4b. These rates, which varied little with the relative extension $z/z_{\max}$, are closer to the rates estimated *in vivo* (≈ 1 cycle/s (9) than to those deduced from bulk *in vitro* data (0.1 cycles/s (21, 22)). The uncoiling rates of Topo IV in single-molecule exper-

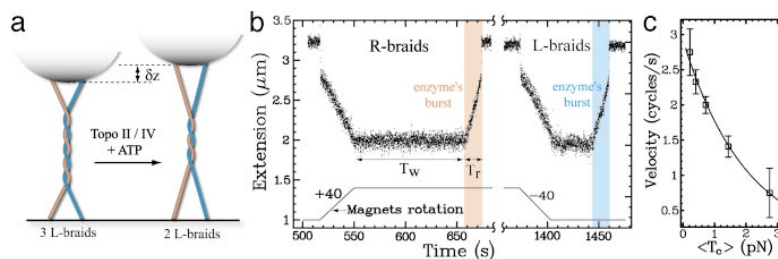


Fig. 3. Decatenation by Topo II. (a) The sketch shows that when braids are decatenated, the distance z of the bead to the surface increases by δz per braid removed. The kinetics of decatenation can thus be monitored in real-time by measuring z . (b) Recording of a decatenation experiment using Topo II (raw extension signal z at 25 Hz). Rotation of the magnets by 40 turns (bottom trace) leads to a decrease in the DNA's extension z ; see Fig. 2. After waiting for a time T_w , the processive decatenation of the two molecules by a single enzyme is observed (shaded time interval) as an increase in extension within a relaxation time $T_r < T_w$. The data shown are time traces of the decatenation by Topo II of R-braids (red shaded area) and L-braids (blue shaded area) starting at $|n| = 40$ ($F = 1.15$ pN). No significant difference was observed between relaxation of R- and L-nodes. Notice the sharp increase in z at the end of the relaxation run resulting from the decatenation of the last braid. (c) Variation with the average tension $\langle T_c \rangle$ of the decatenation velocity v_d . Each point is an average over at least 10 runs at a given force. The data are fit by an exponential curve (plain line): $v_d = v_d^0 \exp(-\langle T_c \rangle \Delta / k_B T)$ with $v_d^0 = 2.9$ cycles/s, $\Delta = 1.9$ nm (12). The error bars here, as in all plots, indicate the statistical error.

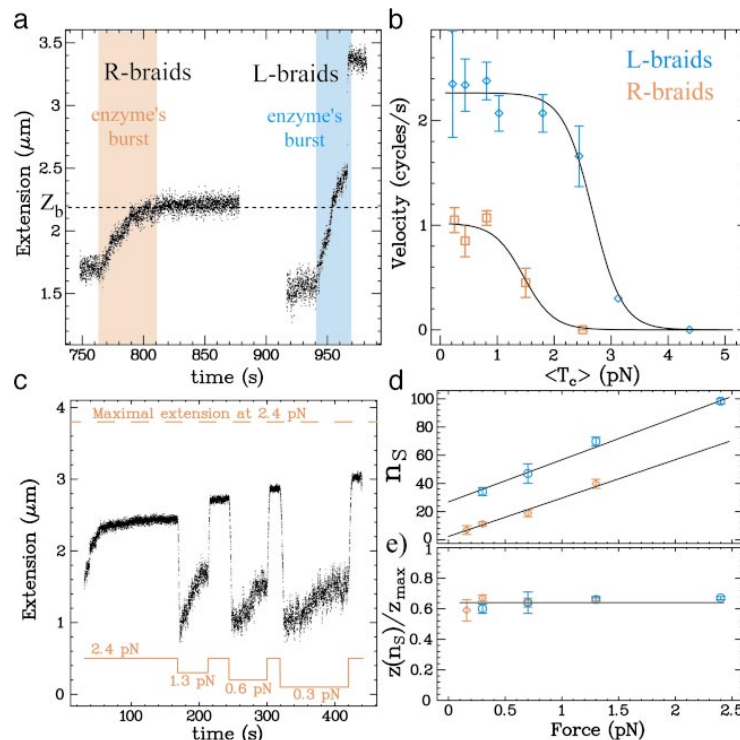


Fig. 4. Decatenation by Topo IV. (a) Time traces of relaxation by Topo IV of R-braids (red shaded area; initial $n = 45$) and L-braids (blue shaded area; initial $n = 55$) at $F = 0.7$ pN. Whereas L-braids are completely relaxed, R-braids are relaxed only partially: the reaction stops at a final $n = n_s = 19$ at which $z(n_s)/z_{\max} = 0.66$. The value of the extension z_b where braids begin to supercoil (see Fig. 2) is shown for comparison. (b) Variation with the averaged tension ($\langle T_c \rangle$) of the decatenation rate v_d (averaged over at least 10 runs at each force) for R-braids (red, $\square$) and L-braids (blue, $\diamond$) and fit (plain line) to a model where the rate-limiting step of the reaction is force-independent (30): $v_d = v_0/(1 + k \exp(\langle T_c \rangle \Delta/k_B T))$; with $v_0^R = 1.05$ cycle/s, $\Delta = 15.4$ nm, $k^R = 3.10^{-3}$ (R-braids) and $v_0^L = 2.35$ cycle/s, $\Delta = 15.4$ nm, $k^L = 3.10^{-5}$ (L-braids). (c) Time trace obtained when varying the force during decatenation of R-braids by Topo IV. After the decatenation stopped at $F = 2.4$ pN, the force was reduced to $F = 1.3$ pN. Decatenation resumed, then stopped again. The force was increased back to $F = 2.4$ pN to allow for comparison of the molecule's initial and final extension. The procedure was repeated at $F = 0.6$ pN and $F = 0.3$ pN. (d) The remaining catenation number at arrest n_s vs. F for two different sets of experiments (different tethered beads, i.e., different anchoring distances $2e$). n_s is proportional to F and increases as e decreases. Red ($\diamond$), $e = 1.1$ μm; blue ($\circ$), $e = 0.8$ μm. (e) The relative extension at arrest $z(n_s)/z_{\max}$ varies little with F or e . Its averaged value is: $z(n_s)/z_{\max} = 0.65 \pm 0.02$, which is about the same as the value where the braids supercoil.

iments were similarly reported to be larger than the bulk measurements (8). This is not surprising, because bulk assays measure a rate averaged over a population of enzymes, only a small fraction of which may be active at any time.

In an effort to understand the relaxation of R-braids by Topo IV, we measured the final catenation number n_s at successively smaller forces F and for two different anchoring distances $2e$; see Fig. 4c. We noticed that n_s is proportional to F and increases as e decreases (Fig. 4d). However, in all cases the molecules' relative extension at arrest $z(n_s)/z_{\max}$ is the same whatever the values of F or e : $z(n_s)/z_{\max} = 0.65 \pm 0.02$ (Fig. 4e). This value is very close to the critical extension $z_b/z_{\max} \approx 0.64$ below which the braided molecules supercoil (Fig. 2). Furthermore, linear extrapolation of n_s to $F = 0$ and $e = 0$ (as expected for catenated plasmids in bulk experiments) yields $n_s^0 = n_s(F = 0, e = 0) \approx 92$, or a catenation number $n_s^0/Lk_0 = 0.06$, close to Marko's estimate for the onset of supercoiled braids in catenated DNAs (15). These considerations imply that R-braids are relaxed by Topo IV when they supercoil to form L-plectonemes.

By reducing the concentration of ATP ($[ATP] = 5$ μM), we slowed down the enzymatic activity and were able to observe the step-by-step unlinking of supercoiled braids (i.e., when $z < z_b$) by a single Topo IV. The slow relaxation dynamics of these plectonemic braids cause an increase in the low-frequency fluctua-

tions in extension, which hinders the direct observation of well defined single relaxation events; see Fig. 5a and b. However, the histograms of the difference in extension at two times $|z(t) - z(t')|$ (Fig. 5a and b Insets) reveals a series of peaks at values corresponding to an integer number of braids. This indicates that Topo IV relaxes both R- and L-braids one at a time.

Discussion

Our results confirm that the eukaryotic topoisomerase is insensitive to the chirality of the DNA braids. The rates of unbraiding and uncoiling measured for the fly Topo II and their variation with force are similar, implying that the different substrates (supercoiled DNA and braided nicked molecules) interact similarly with Topo II. The exponential decrease of the relaxation rates with tension indicates that work is done against the molecular tension during the enzymatic rate limiting step, suggesting that the religation step may be rate limiting (12).

Topo IV was previously reported to relax preferentially (+) rather than (−) supercoiled DNA. This observation could be explained either by a preferential binding and cooperative assembly of Topo IV on positively coiled DNA or by the intrinsic orientation of the T and G segments on the enzyme that is disfavored by (−) supercoiling. Our results on the unbraiding of nicked DNA molecules support the later model: they show that

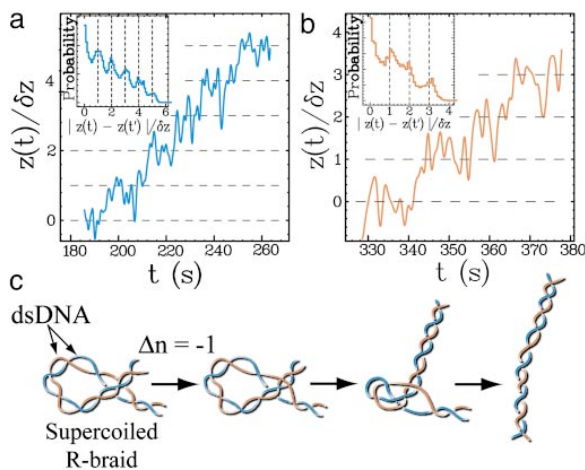


Fig. 5. Step-by-step decatenation by Topo IV. (a and b) Filtered (1-Hz) time traces of relaxation of L- (a) and R-braids (b) by Topo IV obtained at low ATP concentration (5 μ M) in the regime of supercoiled braids ($z/z_{\max} < z_b/z_{\max} \sim 0.64$) at $F = 0.9$ pN. The real-time extension $z(t)$ is normalized by the measured decrease in extension per turn: $\delta z \approx 42$ nm (Fig. 2). The slow relaxation of braided supercoils results in a large increase in the low-frequency fluctuations of extension that hinder the observation of well defined decatenation steps at integer values of $z(t)/\delta z$ (dashed lines). However, the histogram of the normalized distance between two points ($|z(t) - z(t')|/\delta z$) displays peaks at integer values (insets), implying that decatenation occurs by steps of $\Delta n = -1$. (c) Proposed model for the relaxation of R-braids supercoils by Topo IV: two enzymatic reactions are needed to transfer one braid through one DNA and thereby decrease the catenation number by one ($\Delta n = -1$). Thermal fluctuations then drive the relaxation of the loop to an extended topoisomer. The rate of supercoiled R-braid unlinking is thus expected to be half the rate of L-braid unlinking (see Fig. 4b).

Topo IV has a preference for a particular orientation of the T and G segments (8), corresponding to an L-node with acute angle. Numerical simulations have shown that the preferred substrate of Topo IV, (+) supercoiled DNA also forms L-nodes with an acute angle $2\alpha \approx 60^\circ$ (23). Because the supercoiling of R-braids generates L-crossings, their unbraiding by Topo IV may proceed by DNA transport through these crossings. Thus the removal of one R-node implies two enzymatic cycles (the successive transport of two DNA segments through a third one; see Fig. 5c). Supercoiled R-braids should therefore be removed at half the rate of L-braids, as indeed is observed (see Fig. 4b).

Interestingly, the force dependence of the Topo IV unlinking rate differs from that of Topo II. At low forces, the Topo IV rate is constant, suggesting that (in contrast to Topo II) no work is performed against the force during its rate-limiting step. Thus not only does Topo IV differ from Topo II in its chiral discrimination capability, but these enzymes also have different rate-limiting steps.

The results presented here shed new light on the possible mechanisms of sister chromosome decatenation during replication in bacteria. If the replication complex is anchored to the bacterial membrane (22), it will establish a topological barrier preventing the back-diffusion of the (+) supercoils generated downstream from the replication fork and preempting the formation upstream of R-catenanes. The separated sister strands will thus remain unlinked, with the role of Topo IV limited exclusively to removal of the (+) supercoils, which it can do very efficiently (8, 10). In *Salmonella*, a defect in the separation of the daughter chromosomes (a partition defect) is associated with a mutation in a membrane protein, ParF (24). This protein is thought to anchor the replication complex

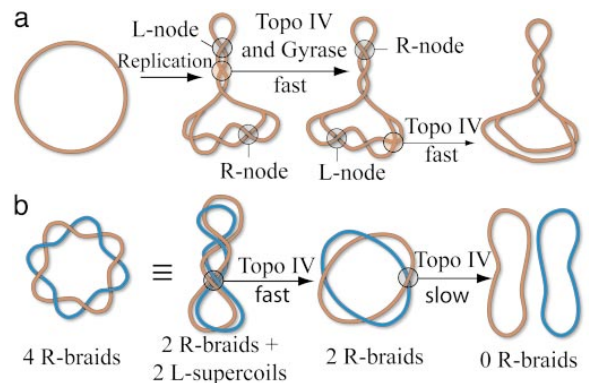


Fig. 6. Configurations of a circular replicating DNA. (a) Model for *in vivo* strand separation: the progression of the replication complex leads to the formation of (+) supercoils (L-nodes) in front of the replication fork and R-precatenanes behind. Topo IV removes (+) supercoils and gyrase generates (−) supercoils so that, under the action of both enzymes, the chirality of the precatenanes is inverted (25). Topo IV may then unlink the molecules by removing the L-catenanes. (b) Model for *in vitro* decatenation by Topo IV: R-catenated plasmids may form L-supercoils that are removed by Topo IV with a high rate [as observed in our experiments and some bulk assays (21)]. However, the removal of the last few links is slow (11, 22), because Topo IV will relax only a rare fluctuation of an R-node to an obtuse angle that is similar to its preferred substrate: an L-node with acute angle (see Fig. 1b).

(22), in agreement with the previous scenario. This model is not contradicted by the observation in partially replicated plasmids of both supercoiling of the mother strand and catenation of the daughter DNAs (25), because any topological barrier would be removed during extraction of the plasmid, allowing equilibration of the torsional stress across the replication fork.

If there is no topological barrier at the replication fork [as might be the case in *E. coli* where mutations of the gene homologous to *parF* (*plsC*) does not result in a partition defect (22)], the joint action of Topo IV and gyrase could be sufficient to unwind the mother strand, allowing its melting (26) in the terminal stage of replication and generating L-catenanes that could efficiently be unlinked by Topo IV (see Fig. 6a). Indeed, the Topo IV rates of relaxation of (+) supercoils and L-nodes measured in the present single molecule experiments (≈ 2.5 cycles per s at 25°C) are compatible with the removal of the extra links generated during replication (9, 11). The observation *in vivo* and *in vitro* of L-precatenanes when both Topo IV and gyrase are present (25) and the partition defect reported in gyrase mutants (27, 28) provides supporting evidence for that scenario. It is also consistent with the role of Topo IV as the primary decatenating enzyme (of L-braids) and of gyrase as the enzyme required for elongation synthesis (11, 21). The observation of R-braids when Topo IV is inhibited is easily explained by the lower rate of (+) supercoil removal by gyrase alone (9). In that situation, removal of the R-precatenanes can be done efficiently by overexpression of Topo III (29).

Although we believe the previous scenario to be the main decatenation pathway *in vivo*, it has nevertheless been shown that Topo IV can unlink R-precatenanes *in vitro* (11, 22). However, the rates of unlinking measured in these bulk experiments ($k_{\text{cat}} = 0.1$ cycles per s) are 30 times smaller than both the rates reported *in vivo* and those measured here for the complete decatenation of L-braids (and the partial unlinking of R-braids). These slow decatenation events may result from the fluctuations

of the R-intertwined molecules that will juxtapose the T and G segments in the correct orientation (an R-node with obtuse angle; see Fig. 1*b*) for Topo IV to act on.

Alternatively, as the present data show, the supercoiling of R-braids can provide an efficient (L-) substrate for decatenation by Topo IV. These L-plectonemic braids are expected if the number of interlinks n is large enough: $n > 0.06Lk_0$ (15); see Fig. 6*b*. Moreover, if the individual plasmids are supercoiled, their interlinks could be localized and concentrated enough to locally induce plectonemic braids. These considerations may explain why the rates of unlinking of supercoiled and multiply linked

plasmids are higher than the unlinking of nicked and singly linked catenanes (21).

We acknowledge helpful discussions with N. Cozzarelli, A. Vologodskii, M. Stone, and Z. Bryant and thank them for sharing their preprint, in which they describe a work similar to that presented here. We also thank N. Cozzarelli and N. Crisona for a gift of Topo IV, G. Lia and J.-F. Allemand for DNA constructs, S. Neukirch for a helpful suggestion, and O. Saleh for careful reading of the manuscript. This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure, and Universités Paris VI and VII.

- Wang, J. (1998) *Q. Rev. Biophys.* **31**, 107–144.
- Wang, J. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430–440.
- Liu, L., Liu, C. & Alberts, B. (1980) *Cell* **19**, 697–707.
- Roca, J. & Wang, J. (1992) *Cell* **71**, 833–840.
- Roca, J. & Wang, J. (1996) *Genes Cells* **1**, 17–27.
- Adams, D., Shekhtman, E., Zechiedrich, E., Schmid, M. & Cozzarelli, N. (1992) *Cell* **71**, 277–288.
- Rybenkov, V., Ullsperger, C., Vologodskii, A. & Cozzarelli, N. (1997) *Science* **277**, 690–693.
- Crisona, N., Strick, T., Bensimon, D., Croquette, V. & Cozzarelli, N. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2881–2892.
- Zechiedrich, E. & Cozzarelli, N. (1995) *Genes Dev.* **9**, 2859–2869.
- Postow, L., Crisona, N., Peter, B., Hardy, C. & Cozzarelli, N. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8219–8226.
- Hiasa, H. & Marians, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21529–21535.
- Strick, T., Croquette, V. & Bensimon, D. (2000) *Nature* **404**, 901–904.
- Strick, T., Allemand, J.-F., Bensimon, D. & Croquette, V. (1998) *Biophys. J.* **74**, 2016–2028.
- Strick, T., Allemand, J., Bensimon, D., Bensimon, A. & Croquette, V. (1996) *Science* **271**, 1835–1837.
- Marko, J. (1997) *Phys. Rev. E* **55**, 1758–1772.
- Smith, S., Finzi, L. & Bustamante, C. (1992) *Science* **258**, 1122–1126.
- Bustamante, C., Marko, J., Siggia, E. & Smith, S. (1994) *Science* **265**, 1599–1600.
- Marko, J. & Siggia, E. (1995) *Macromolecules* **28**, 8759–8770.
- Boles, T., White, J. & Cozzarelli, M. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 931–951.
- Rybenkov, V., Cozzarelli, N. & Vologodskii, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5307–5311.
- Ullsperger, C. & Cozzarelli, N. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31549–31555.
- Levine, C., Hiasa, H. & Marians, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 29–43.
- Vologodskii, A. & Cozzarelli, N. (1996) *Biophys. J.* **70**, 2548–2556.
- Schmid, M. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 5416–5424.
- Peter, B., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K. & Cozzarelli, N. (1998) *Cell* **94**, 819–827.
- Strick, T., Croquette, V. & Bensimon, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10579–10583.
- Orr, E., Fairweather, N., Holland, I. & Pritchard, R. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **177**, 103–112.
- Steck, T. & Drlica, K. (1984) *Cell* **36**, 1081–1088.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H. & Marians, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 8653–8660.
- Wang, M., Schnitzer, M., Yin, H., Landick, R., Gelles, J. & Block, S. (1998) *Science* **282**, 902–907.

3.3.3 Données supplémentaires publiées avec l'article

Les figures 3.6 et 3.7 représentent les figures 7 et 8 de l'article précédent, qui sont publiés à titre d'informations supplémentaires.

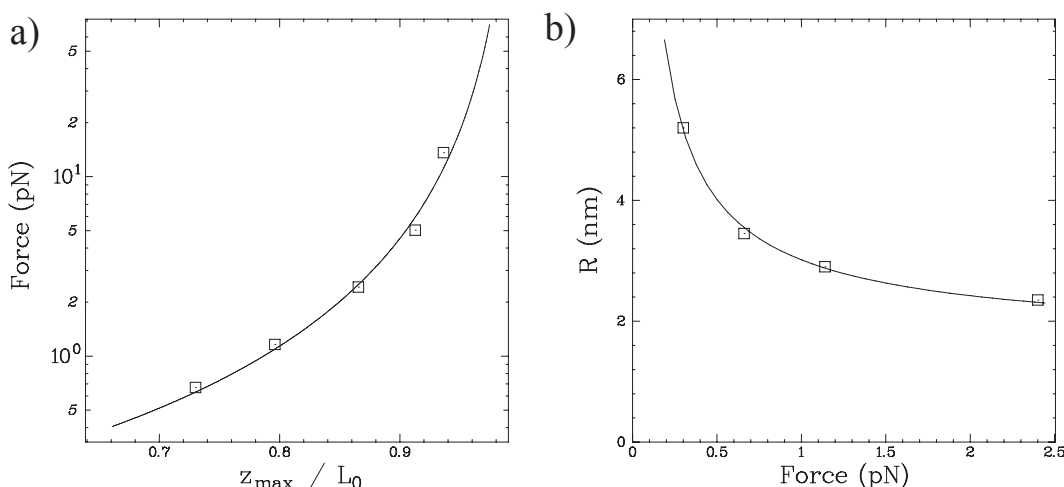


FIG. 3.6 – **a** Force (F) vs. normalized extension ($z_{\max}/L_0$) for data obtained at $n = 0$ and predictions of the Worm-like chain model (plain line) for a bead tethered by two molecules of crystallographic length $L_0 = 5.09\mu\text{m}$ and persistence length $\xi = 47\text{ nm}$. **b** Variation with force of the effective DNA radius R determined from best fits such as shown in (a). As the force increases the entropic repulsion is reduced leading to a smaller effective radius. The continuous line is a fit to $R = R_0 + AF^{-3/4}$, as suggested by [74], with $R_0 = 1.5\text{ nm}$ and $A = 3$.

3.3.4 Comparaison avec l'article de Stone *et al.*

Un travail similaire, utilisant des techniques de molécule unique, visant à comprendre l'origine de la chiralité de la topo 4, a été effectué à Berkeley dans les équipes de N.R. Cozzarelli et C. Bustamante[115].

Stone *et al.* combinent des expériences d'ensemble pour tester l'accrochage de la topo 4 sur différents substrats (ADN relâché, super-enroulé positivement ou négativement), des expériences de molécule unique pour suivre la décaténation de deux molécules d'ADN par la topo 4, et des simulations Monte-Carlo pour connaître la distribution d'angles entre segments dans les tresses d'ADN.

Les mesures d'ensemble d'accrochage de l'enzyme montrent que l'enzyme a une préférence pour les substrats super-enroulés, que ce soit positivement ou négativement. Ceci est en accord avec nos observations d'accrochage sur molécule unique d'ADN (voir la section 3.2).

Les expériences de micromanipulation sont réalisées à l'aide d'un dispositif de piégeage utilisant une pince optique à deux faisceaux et une micropipette. La rotation de la micropipette autour de son axe permet de caténer deux molécules d'ADN (environ 40kb) accrochées en parallèle par leurs extrémités sur des billes micrométriques placées dans les deux pièges.

Dans un régime où les tresses ne forment pas de plectonèmes, les auteurs observent une relaxation rapide des tresses (L) et une activité très réduite (30 fois plus lente que les caténanes (R)) de décaténation sur les tresses (R). Notons que ces expériences sont réalisées à 300 pM, ce qui est au dessus de la constante de dissociation de l'enzyme. Cette activité résiduelle correspond probablement à la petite activité observée sur les supertours (-) à haute concentration[24].

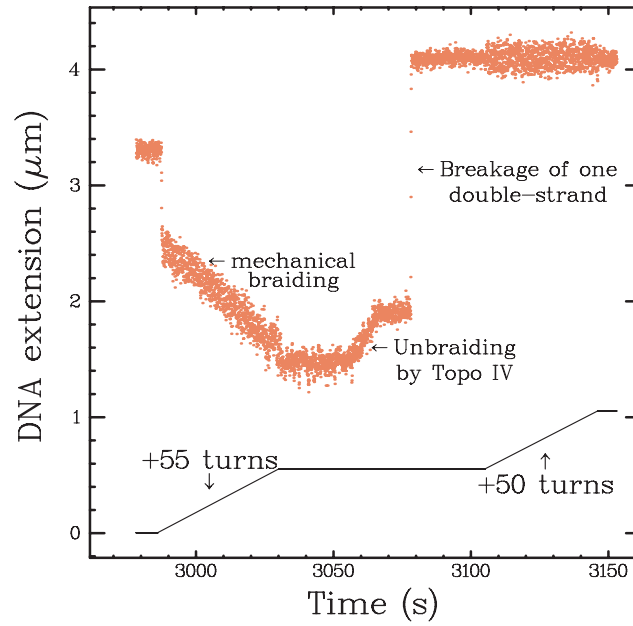


FIG. 3.7 – Braiding, unbraiding and rupture of one of the tethering molecules (dots). Mechanical right-handed braiding of two DNA molecules is achieved through rotation (by +55 turns, bottom trace) of the magnetic bead they anchor. This is followed by a partial relaxation of the R-braids by topo 4 and a sudden rupture of one of the tethering molecules: the extension increases drastically. The single nicked DNA molecule now anchoring the bead cannot be supercoiled (the extension remains constant as the bead is rotated by 50 turns).

Dans le régime où les tresses forment des plectonèmes, la relaxation des tresses (R) est d'environ 0.5 cycles/s (vitesses estimée d'après la figure), alors que la relaxation des tresses (L) est d'environ 5 cycles/s. Comme les auteurs le mentionnent, il est probable que plusieurs enzymes travaillent en même temps sur l'ADN à cette concentration. La vitesse de décaténation sur les tresses (R) est plus faible que la vitesse que nous avons obtenue sur le même substrat en concentration de molécule unique (60 pM topo 4, 1.0 cycle/s), alors que la vitesse de décaténation des tresses (L) est sensiblement la même (en réduisant la concentration à 100 pM, les auteurs trouvent une vitesse de l'ordre de 2.5 cycle/s sur les tresses (L), ce qui est comparable à la nôtre : 2.35 cycles/s).

L'évolution de la vitesse trouvée par Stone *et al.* ne varie pas entre 1 et 4 pN, mais décroît vers 0 entre 5 et 15 pN. De notre côté, nous trouvons que la vitesse est constante jusqu'à 2 pN, mais décroît brutalement entre 2.5 et 4 pN. C'est une autre différence importante au niveau des résultats.

Une différence notable entre les substrats que nous utilisons peut expliquer les variations entre nos résultats : les courbes extension-rotation réalisées par Stone *et al.* montrent que l'espacement entre les molécules est petit devant la taille des molécules. Dans notre cas, au contraire, l'espacement n'est pas du tout négligeable. En conséquence, pour un nombre de tour et une force donnée, nos tresses sont beaucoup plus serrées et le couple dans la tresse plus important dans notre cas que dans les expériences de Stone *et al.* En effet, si nous repartons du modèle géométrique, qui donne l'extension de la tresse en fonction du nombre de tours n :

$$z(n) = \sqrt{L^2 - (2e + 2\pi R(n - 1/2))^2} \quad (3.1)$$

où L est l'extension totale de la molécule, R le rayon de la tresse et le demi-écartement entre les molécules. Le couple $\Gamma(n)$ dans la tresse vaut :

$$\Gamma(n) = \frac{dW}{d\phi} \quad (3.2)$$

où $W \equiv (L - z(n))F$ est le travail qu'il faut fournir pour former une tresse de n tours, et $\phi \equiv n/2\pi$. En conséquence :

$$\Gamma(n) = (2e + 2\pi R(n - 1/2))RF/(2z(n)) \quad (3.3)$$

A force constante, si n est petit, Γ sera d'autant plus grand que e est grand. Il est possible que ce soit ce couple qui affecte le processus de décaténation, et non la force réelle d'étirement des molécules. Il serait peut-être plus judicieux de tracer la vitesse de décaténation en fonction du couple et non de la force.

A l'aide de simulations Monte-Carlo de molécules d'ADN, Stone *et al.* obtiennent la distribution des angles entre croisements juxtaposés pour des molécules circulaires caténées ou super-enroulées, et pour des tresses soumises à une force d'étirement.

Les molécules tressées et les molécules circulaires super-enroulées présentent une distribution d'angle très asymétrique, ce qui permet d'expliquer, en supposant que l'enzyme ait un angle préférentiel de reconnaissance inférieur à 90° , sa relaxation spécifique des supertours (+) des tresses (L) par rapport aux supertours (-) et aux tresses (R). Par contre, ils montrent que la distribution d'angle pour des molécules caténées sans force est quasiment symétrique, pourvu que le degré de caténation $\sigma \approx 0.01$ soit suffisamment faible. En conséquence, les fluctuations d'angle sont suffisantes pour permettre à l'enzyme de décaténer malgré le fait que le substrat ait le mauvais sens d'enroulement.

L'hypothèse que l'enzyme possède un angle préférentiel de relaxation fait l'objet d'une investigation directe dans la section 3.4.

Il serait intéressant de regarder la distribution d'angle en fonction du degré de caténation, en particulier dans la région où se forment les plectonèmes de tresse. En effet, il est possible que la relaxation de la tresse que nous observons à haute degré de caténation ne soit pas la conséquence de la formation des plectonèmes, mais bien plutôt du fait que la distribution d'angle devienne plus large dans ce régime. Des simulations numériques devraient nous permettre de déterminer la distribution d'angle en fonction du degré de caténation.

Dans ce cas, le mécanisme évoqué dans notre article[20] ne serait pas nécessaire. Notons d'ailleurs que ce mécanisme, basé sur l'inversion de chiralité, suppose que la tresse passe par un état noué, qui devrait pouvoir être mis en évidence expérimentalement en tirant brusquement sur la tresse lors de la relaxation par l'enzyme.

3.3.5 Expériences complémentaires : 2 molécules, dont une au moins super-enroulable

Les expériences décrites ci dessus ont été réalisés avec des molécules dont l'immense majorité présentait au moins un nick.

Cependant, il semble que nous ayons réussi à isoler un couple de molécule dont l'une au moins, était sensible à la torsion. Sachant que la probabilité qu'une molécule soit super-enroulable est très faible, la probabilité d'en obtenir deux accrochées sur la même bille est dérisoire.

Plusieurs arguments nous ont conduits à conjecturer que qu'il pouvait y avoir une molécule super-enroulable accroché à la bille.

D'abord, nous avons observé une remarquable asymétrie des courbes extension-nombre de caténation, en particulier dans le régime de basse-force (< 1.5 pN), comme le montre la figure 3.8 : l'extension varie à peu près linéairement avec la rotation n dans le domaine $n < 0$, alors qu'elle a une variation beaucoup plus arrondie pour $n > 0$.

Cependant, il est difficile d'interpréter à partir de ces courbes la structure de la tresse et de mettre en évidence directement la présence de super-enroulement dans au moins l'une des molécules. Par

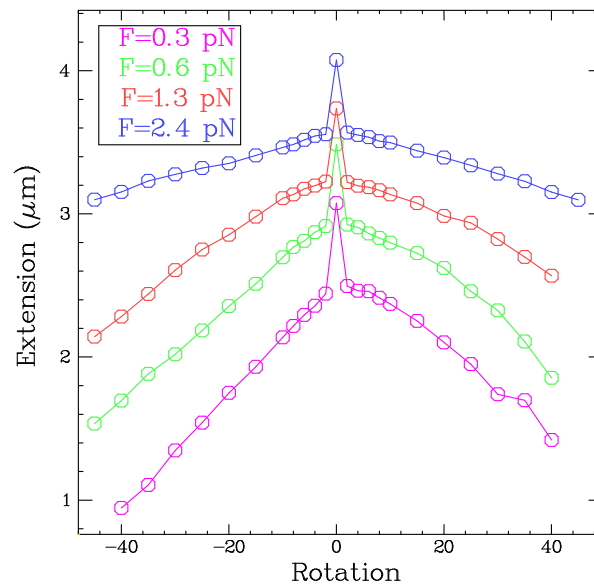


FIG. 3.8 – **Extension vs rotation pour un système de deux molécules dont l’une au moins est super-enroulable.** Remarquer l’asymétrie de la courbe, en particulier à basse force.

contre, si l’on regarde la relaxation de ce système par la topo 4, le résultat est plus clair (voir figure 3.9). L’expérience a été menée à 0.6 pN (ce qui est légèrement inférieur à la limite de dénaturation pour les plectonèmes dans le tampon de la protéine).

Lorsque l’on tourne les aimants vers les $n < 0$, on observe une relaxation du pic (indiquant la décaténation complète des molécules) par la topo 4 sans revenir à l’extension maximale. Après le pic, la relaxation continue, mais très lentement. Inversement, la relaxation de la structure dans les $n > 0$ se termine toujours par la relaxation du pic.

Il semble ainsi que l’enzyme doive à la fois résoudre les liens entre les molécules, mais aussi enlever le super-enroulement dans au moins l’une des deux molécules.

Lorsque $n < 0$, il y a la fois de plectonèmes (-) (difficiles à enlever par la topo 4) et des tresses (L) (faciles à enlever). D’où une relaxation préférentielle des liens entre molécules. Pour $n > 0$, c’est le contraire : les plectonèmes (+) sont enlevés rapidement alors que les tresses (R) sont plus longs à disparaître.

Si cette expérience paraît un peu exotique (elle n’a pas été reproduite, compte tenu de l’improbabilité d’obtenir une telle structure), elle n’en demeure pas moins intéressante dans son principe : comme on le voit dans le cas de la topo 4, elle permet de tester l’activité compétitive d’une topoisomérase sur deux substrats différents (dont, en outre, la chiralité diffère). Ceci est à rapprocher du processus de réplication où deux substrats (plectonèmes et caténanes) sont potentiellement la cible des topoisomérases. Notons au passage que relaxer le super-enroulement ($\Delta Lk = 2$ par cycle enzymatique) est deux fois plus efficace que de décaténer deux molécules ($\Delta Lk = 1$ par cycle enzymatique).

3.4 Etude d’un croisement unique

Nous avons cherché à valider par une expérience directe le modèle de reconnaissance de l’angle entre croisement par la topo 4. Pour cela, nous avons observé la relaxation par l’enzyme d’un lien unique entre deux molécules d’ADN micromanipulées sur une même bille. L’angle moyen entre les segments d’ADN au niveau de la juxtaposition varie avec la distance d’espacement des molécules. Nos résultats indiquent que l’enzyme est capable de discriminer efficacement entre une tresse (L)

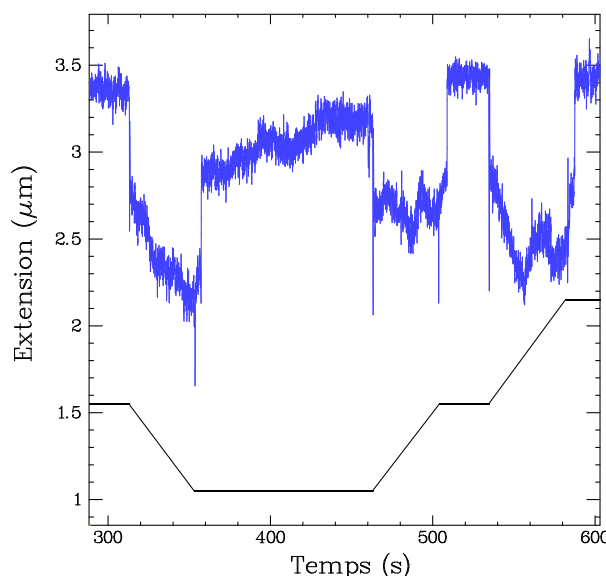


FIG. 3.9 – **Relaxation d’une structure mixte caténane/plectonème par la topo 4.** Extension en fonction du temps pour un système composé de deux molécules dont l’une au moins est super-enroulable (ligne bleue). La position des aimants est indiquée par la ligne continue noire. L’expérience est effectuée à 0.6 pN. La ligne noire indique la position des aimants au cours du temps.

et une tresse (R) lorsque l’angle est faible (ce qui correspond aux expériences de décaténation exposés plus haut). Par contre lorsque l’angle est proche de 90° , l’enzyme n’est plus capable de faire la discrimination et relaxe quasiment également les tresses (L) et les tresses (R).

3.4.1 Principe de l’expérience

L’expérience consiste à créer un croisement d’ADN à partir de deux molécules d’ADN accrochées sur une même bille et caténées d’un tour. D’une expérience à l’autre, en fonction de l’écartement des molécules, nous obtenons des angles moyen de croisements qui diffèrent. Il n’est pas possible de préparer une bille avec deux molécules se croisant avec un angle prédéfini. Par contre, on peut facilement estimer l’angle de croisement et choisir les billes en fonction de cet angle: pratiquement, le croisement des molécules distantes induit une grande variation d’extension entre $Ca = 0$ et $|Ca| = 0.5$ (voir la figure 3.10). Cette variation est directement reliée à l’angle moyen entre croisement θ d’après le modèle géométrique exposé plus haut. La figure 3.10 montre une courbe extension-caténation obtenue pour une molécule de 11kb à 2 pN dans le domaine $-1 < Ca < 1$. La variation de longueur vaut $0.28\mu\text{m}$, d’où l’on déduit l’angle entre croisements $\theta = 2 \cos^{-1} \frac{3.10-0.28}{3.10} = 49^\circ$.

Pour tester l’influence de cet angle sur la relaxation de liens uniques ($Ca = \pm 1$) de chiralité différente, nous mesurons les temps de décaténation τ_L et τ_R par la topo 4 pour les deux chiralités (L) et (R). L’observation de la décaténation d’un croisement unique est rendue possible par le fait que la variation de longueur du système entre $Ca = \pm 1$ et $Ca = 0$ est facilement détectable (parfois plusieurs centaines de nanomètres). L’acquisition peut-être automatisée de telle sorte que, une fois la molécule décaténée, elle est aussitôt enroulée pour former un nouveau croisement.

La concentration d’enzyme utilisée est de l’ordre de quelques centaines de pM, ce qui est bien supérieur aux concentrations utilisées pour obtenir des relaxation processives d’enzyme uniques (environ 60 pM). Pour cette expérience, il n’y a qu’un cycle enzymatique à effectuer, ce qui ne peut-être réalisé que par une molécule unique d’enzyme. La concentration d’enzyme est réglée pour que le temps avant décaténation soit suffisamment rapide pour obtenir une statistique correcte, mais suffi-

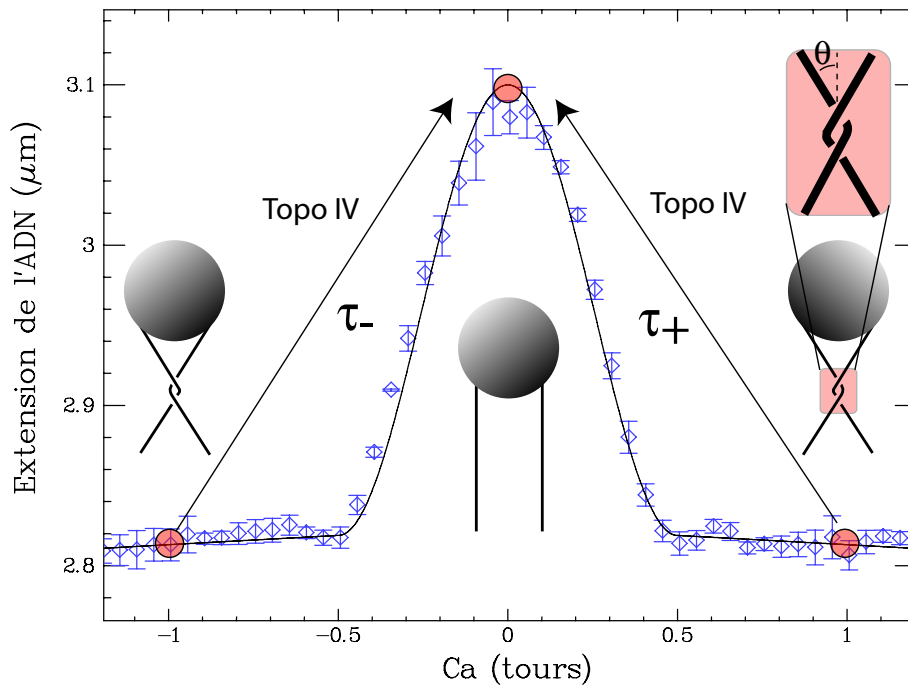


FIG. 3.10 – **Courbe extension-caténation et principe de l'expérience de croisement unique.** La courbe extension-caténation (points bleus) montre une grande variation d'extension au voisinage du zéro de caténation. Cette variation, qui est caractéristique de l'espacement entre les molécules, peut se déduire d'un ajustement par le modèle géométrique (courbe noire). Le principe de l'expérience consiste à observer la relaxation d'une tresse caractérisée par $Ca = \pm 1$ et à comparer les temps τ_R et τ_L nécessaires pour observer la relaxation dans les deux cas : $Ca = 1$ et $Ca = -1$

samment lente pour permettre l'enroulement et la mesure ce du temps de décaténation (à la fréquence d'acquisition de la caméra).

3.4.2 Résultats

La figure 3.11 montre les traces temporelles typiques obtenus à 0.4 pN pour deux configurations de croisements avec des angles différents : 50° (en haut) et 90° (en bas). Les expériences ont été réalisées avec Keir Neuman.

La courbe rouge indique l'extension en fonction du temps, alors que la ligne noire indique le position angulaire des aimants (par saut de ± 1 tour). L'ajout d'un tour positif ou négatif conduit à une diminution de l'extension (Notons d'ailleurs la différence d'amplitude entre les deux situations 50° et 90°). La décaténation par la topo 4 fait revenir l'extension à sa valeur originelle. Pour le cas où $\theta = 50^\circ$, il apparaît que le temps requis pour supprimer un croisement (R) est nettement plus long que pour supprimer un croisement (L). Sur la base de 60 événements du côté (L) et 12 événements du côté (R) à 0.4 pN, nous pouvons estimer le rapport d'asymétrie $r_{50^\circ} \equiv \langle \tau_L \rangle / \langle \tau_R \rangle |_{\theta=50^\circ} = 0.09 \pm 0.03$. Cette asymétrie correspond à la relaxation préférentielles des plectonèmes (+) par la topo 4.

En comparaison, la valeur trouvée pour la configuration $\theta = 90^\circ$ est : $r_{90^\circ} = 0.84 \pm 0.3$ (calculé à partir de 23 événements (L) et 30 événements (R)). En conséquence, la topo 4 semble dans ce cas quasiment incapable de discriminer entre une configuration (L) et (R). Ceci est attendu par le fait qu'un croisement perd sa chiralité lorsque l'angle entre segment est voisin de l'angle droit.

En supposant que l'enzyme ait une configuration d'angle préférentielle $\theta_{pref} < 90^\circ$ de chiralité (L) [24, 20, 115], la relaxation d'un croisement avec un angle donné θ nécessite une fluctuation thermique

de l'angle pour permettre la relaxation. Dans le cas d'un croisement (L) d'angle θ , cette fluctuation d'angle $\theta - \theta_{pref}$ est relativement limitée. Par contre, dans le cas d'un croisement (R), une fluctuation d'angle $180 - \theta - \theta_{pref}$ est nécessaire pour produire la bonne géométrie, ce qui est d'autant plus improbable que θ est petit.

Dans le cas particulier où $\theta = 90^\circ$ ((L) = (R)), la fluctuation d'angle nécessaire $90 - \theta_{pref}$ est la même pour les chiralités (L) et (R), ce qui explique que les deux configurations sont relaxées à peu près avec la même efficacité. Cependant, ce raisonnement ne s'applique théoriquement qu'à force nulle, car la force d'étirement vient briser cette apparente symétrie : pour un croisement (L), une fluctuation d'angle $90 - \theta_{pref}$ est aidée par la force, alors qu'elle est dans le sens contraire pour un croisement (R), comme le montre la figure 3.12. Ceci peut expliquer que r_{90° ne soit pas exactement égal à 1 (la force d'étirement est de 0.4 pN).

Nous avons ainsi regardé l'influence de la force sur le rapport d'asymétrie pour les configurations précédemment étudiées. La figure 3.13 montre les rapports d'asymétrie r obtenus à deux forces différentes pour les deux configurations précédemment évoqués.

r décroît avec la force, ce qui peut s'interpréter par le fait que la force limite l'amplitude des fluctuations. Cependant, remarquons également qu'augmenter la force augmente l'extension de l'ADN et fait donc diminuer l'angle moyen entre segment. Ce changement d'angle peut également être responsable de la diminution de r . Il est difficile, compte tenu du principe de cette expérience, de distinguer la contribution des fluctuations de celle de l'angle pour expliquer l'asymétrie de relaxation entre (L) et (R). Il faudrait pouvoir varier la force en restant à angle constant.

En conclusion, il semble clairement établi que l'angle entre croisement soit un paramètre déterminant de l'activité de la topo IV. Il pourrait être intéressant d'étudier la distribution d'angle entre croisement par simulation numérique pour les différentes configurations expérimentales étudiées. Il serait alors possible d'obtenir une estimation de l'angle préférentiel de l'enzyme. Cette propriété de la topo 4 de reconnaître une géométrie particulière semble être partagée par d'autres classes d'enzymes, comme les resolvases ou les invertases, responsables de la transposition Mu[23].

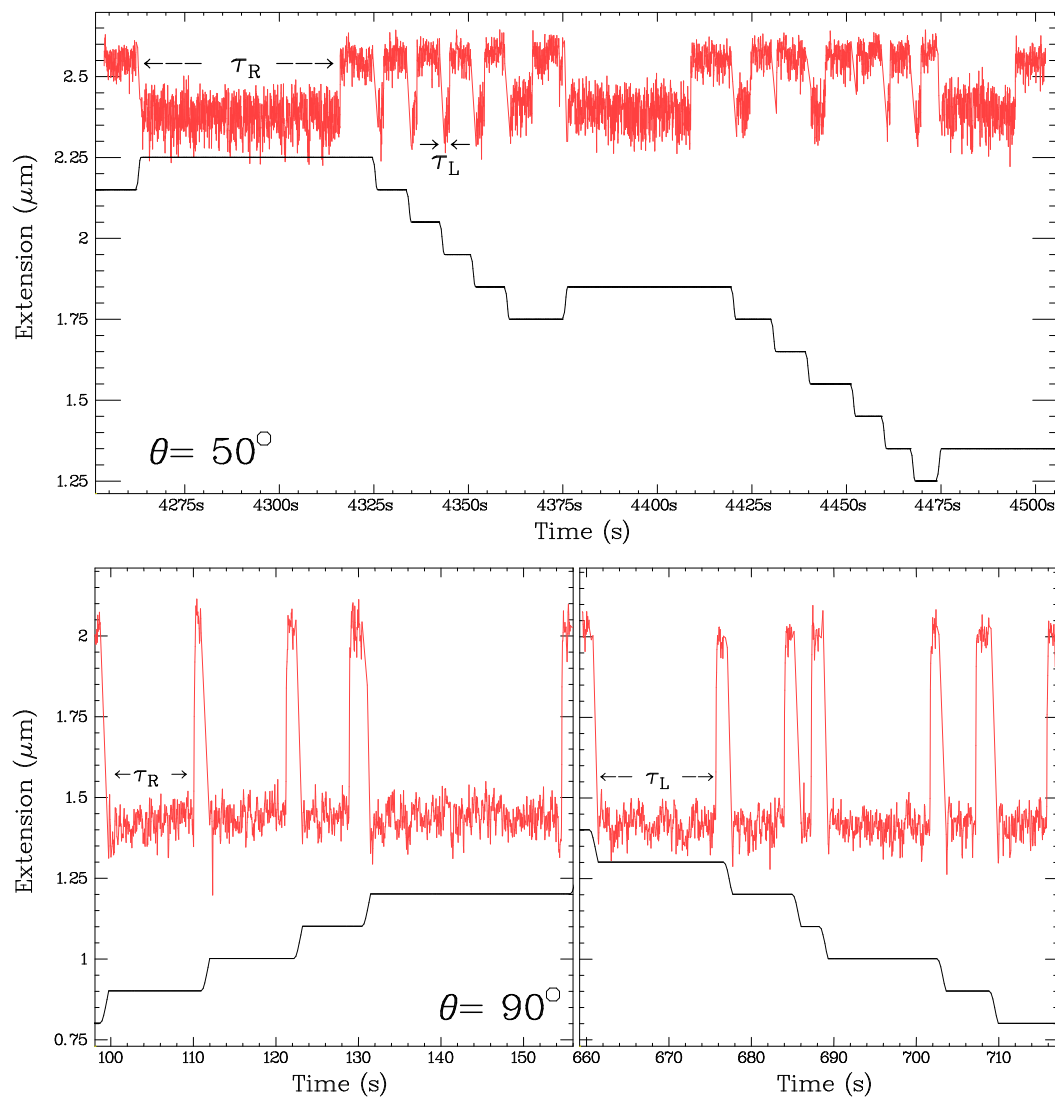


FIG. 3.11 – **Relaxation d'un lien unique par la topoisomérase 4.** En haut : l'angle entre croisement vaut 50° . La courbe rouge représente l'extension en fonction du temps. La ligne noire représente la position des aimants, et permet de déduire si les liens créés sont (R) (déplacement positif des aimants) ou (L) (déplacement négatif des aimants). En bas : même expérience, mais avec un système de molécule dont l'angle vaut environ 90° .

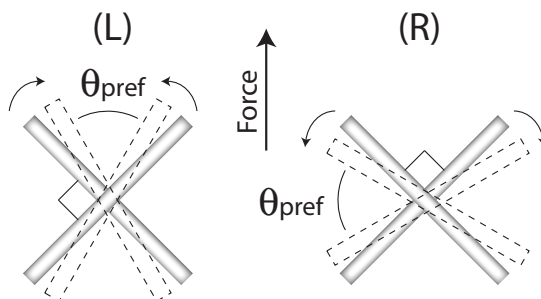


FIG. 3.12 – **Fluctuation d'angle pour des croisements (L) et (R) avec $\theta = 90^\circ$.** Pour les croisements (L), une fluctuation en direction de l'angle préférentiel θ_{pref} est favorisée par la force, alors qu'elle est défavorisée dans le cas d'un croisement (R).

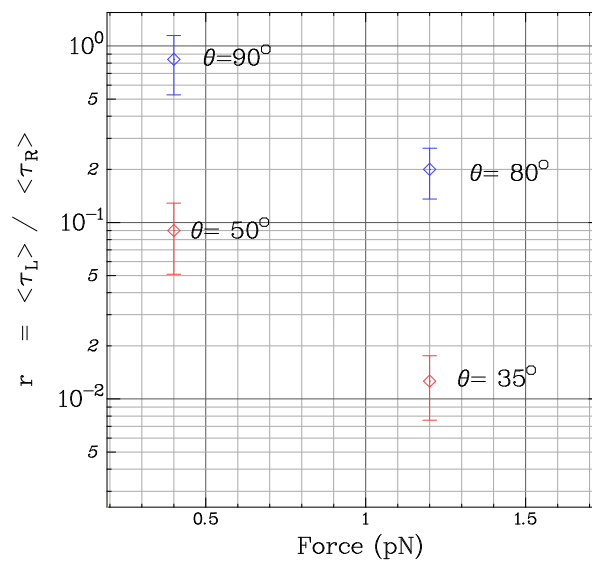


FIG. 3.13 – **Rapport d'asymétrie en fonction de la force pour deux configuration géométriques particulières**

Chapitre 4

Etude des propriétés thermodynamiques des topoisomérases de type II

Le chapitre précédent s'attachait à décrire les propriétés de reconnaissance de la topo 4 vis-à-vis de son substrat : la topo 4 relaxe préférentiellement les supertours (+) (par rapport aux supertours (-)). Cette discrimination est liée à sa capacité à reconnaître localement l'angle d'un croisement d'ADN. Si cette caractéristique est limitée à la topo 4 (et la gyrase, mais avec un autre mécanisme), il semble que les topoisomérases de type II en général possèdent une autre propriété de reconnaissance : une étude *in vitro* a montré que les topoisomérases de type II simplifient la topologie de l'ADN au-dessous des valeurs attendues par l'équilibre thermodynamique[102]. Ce résultat n'est théoriquement possible que dans la mesure où l'enzyme utilise l'énergie de l'ATP pour effectuer sa réaction. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Dans ce chapitre, nous présentons une expérience de molécule unique, dont l'objet est de comparer la capacité de l'enzyme à décaténer deux molécules d'ADN par rapport à la thermodynamique. Nos mesures nous amènent à tester directement un modèle proposé d'amplification cinétique[147].

4.1 Données expérimentales

Lorsque l'on met une molécule linéaire d'ADN dont les extrémités sont cohésives en présence de ligase, on obtient essentiellement des molécules circulaires d'ADN. Mais, si la taille du plasmide est suffisante, la probabilité que cette molécule forme un noeud est non négligeable (de l'ordre de 3% pour une molécule de 10 kb dans le cas du noeud le plus simple, i.e le noeud de trèfle). De plus, si la concentration d'ADN est importante, on observe également l'apparition de caténanes et de multimères circulaires d'ADN. Par ailleurs, ces molécules cyclisées présentent une certaine distribution de super-enroulement.

Toutes ces propriétés topologiques, figées par la cyclisation, sont révélatrices des conformations adoptées par les molécules d'ADN sous l'effet de l'agitation thermique. En conséquence, leurs quantités respectives sont caractéristiques de l'équilibre thermodynamique. Leurs différentes topologies sont faciles à identifier et à quantifier par électrophorèse d'ADN.

Rybenkov *et al.* ont étudié *in vitro* la capacité de plusieurs topoisomérases de type II à décaténer, à dénouer et à relaxer le super-enroulement dans des plasmides préalablement cyclisés par la ligase (ou relaxés par une topoisomérase de type I)[102]. Ils ont observé que les topoisomérases de type II réduisent systématiquement la fraction de plasmides noués et caténés par rapport à la valeur attendue par l'équilibre thermodynamique. De même, ces enzymes réduisent la variance de la distribution de super-enroulement dans une population de plasmides.

Suivant les enzymes observées, le facteur de simplification R de la topologie en dessous de l'équilibre (rapport entre la proportion d'une topologie attendue à l'équilibre et celle obtenue après action

des topoisomérases) atteint une valeur de 5 à 90 pour les noeuds, de 3 à 10 pour les caténanes, et de 1.4 à 1.8 pour le super-enroulement. Ainsi, de manière surprenante, il existe des différences importantes (mais corrélées entre les différentes expériences) suivant les topoisomérases de type II utilisées. La topo 4 d'*E. coli* présente la meilleure capacité à dénouer ($R = 90$) et à décaténer ($R = 10.5$). La topo 2 de drosophile se situe de manière intermédiaire ($R = 20$ pour le dénouage et $R = 10$ pour la décaténation) entre la topo 4 et la topo 2 de *S. cerevisiae* ($R = 5$ pour le dénouage et $R = 3$ pour la décaténation). Les expériences concernant la relaxation du super-enroulement ont été confirmées par d'autres études[126].

Bien que les topoisomérases de type II simplifient la topologie au-dessous de l'équilibre, cette propriété ne viole pas la thermodynamique car ces enzymes consomment de l'énergie (hydrolyse de l'ATP) pour effectuer leur isomérisation, contrairement aux topoisomérases de type I. La topo 3, topoisomérase de type I, est d'ailleurs incapable de maintenir une population de plasmide dans un état dénoué inférieur au niveau de l'équilibre thermodynamique[102]. Cependant, le mécanisme qui couple cette propriété de reconnaissance active des topoisomérases de type II à l'utilisation d'ATP reste incertain. Dans la section suivante, nous décrivons trois modèles proposés.

4.2 Modèles

4.2.1 Modèle à trois sites d'accrochage

Rybenkov *et al.* ont suggéré que les topoisomérases de type II, en s'accrochant en deux points distants sur la molécule d'ADN, puissent faire glisser l'ADN de manière à piéger un éventuel segment T à l'intérieur d'une boucle d'ADN (voir la figure 4.1)[102]. De cette manière elle est capable de décaténer et dénouer efficacement l'ADN. La relaxation du super-enroulement est moins favorisée car le piégeage du segment T est moins évident (ce qui selon les auteurs, est en accord avec l'expérience).

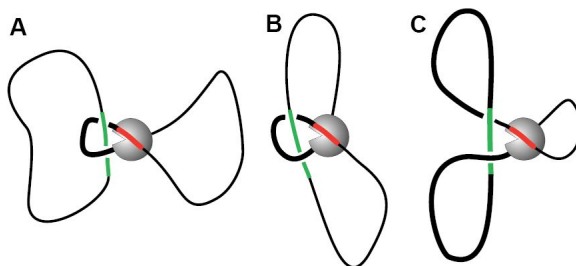


FIG. 4.1 – **Modèle de Rybenkov *et al.*** L'enzyme s'accroche en deux points sur la molécule d'ADN et divise ainsi la molécule en deux régions. En glissant le long d'un brin, elle réduit la taille de la boucle et vient piéger un segment T (en vert). Ainsi, elle dénoue (A), décatène (B) ou supprime activement le super-enroulement (C). Image tirée de [102].

Cependant, il n'existe aucune preuve expérimentale que l'enzyme puisse transloquer le long de l'ADN en maintenant un croisement bloqué. En particulier, ce mécanisme implique la consommation d'une grande quantité d'énergie pour se déplacer, ce qui est en désaccord avec le fait que ces enzymes ont un rendement de décaténation élevé[6].

4.2.2 Modèle de Vologodskii

Vologodskii *et al.* [133] ont proposé un mécanisme basé sur le fait que la topo 4 semble courber l'ADN lors de son accrochage. En conséquence, elle crée localement une structure d'ADN en épingle

à cheveu (voir figure 4.2, et assure un passage unidirectionnel d'un segment T piégé à l'intérieur de l'épingle à cheveu vers l'extérieur.

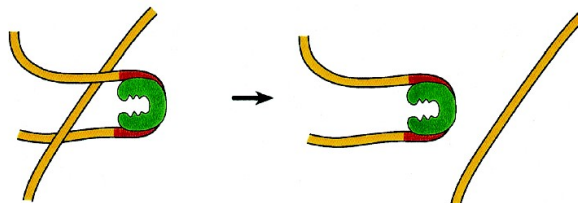


FIG. 4.2 – **Modèle de Vologodskii** . En courbant l'ADN, l'enzyme crée localement une structure qui permet le dénouement mais défavorise la réaction inverse. Image tirée de [133].

Des simulations Monte-Carlo de molécules circulaires montrent que, dans ces conditions, la probabilité qu'une molécule soit nouée diminue d'un facteur 14. L'épingle à cheveu a tendance à défavoriser la réaction qui conduit à la formation d'un noeud. Les simulations montrent, en particulier, que la juxtaposition de segments G et T est réduite par la présence d'une épingle à cheveu dans le cas d'une molécule dénouée. De plus, la probabilité qu'un passage de brin change la topologie est également affecté pour des molécules dénouées présentant une épingle à cheveu [133].

Ce modèle repose sur le fait que le passage de brin se fasse toujours de l'intérieur vers l'extérieur de l'épingle à cheveu. Cette hypothèse est motivée par l'observation que l'enzyme transporte toujours le segment T de son extrémité N-terminal vers son extrémité C-terminal [96, 97]. Selon les auteurs, l'ATP, dont l'hydrolyse sert à garantir l'unidirectionnalité, permet ainsi de simplifier la topologie en dessous de l'équilibre.

4.2.3 Modèle d'amplification cinétique

Yan *et al.* [147, 146] ont proposé un modèle basé sur le principe de l'amplification cinétique [53, 85], originellement utilisé pour expliquer le faible taux d'erreur dans certains processus enzymatiques, comme par exemple la réplication de l'ADN.

Les enzymes catalysent des réactions chimiques plus ou moins complexes, dont le produit a une énergie libre plus basse que le réactif. La proportion de produits et de réactifs est liée, à l'équilibre thermodynamique, à la différence d'énergie libre entre les deux constituants. Si cette différence d'énergie libre est petite (ou s'il existe une réaction concurrente menant à un autre produit), l'efficacité de la réaction enzymatique (en admettant que la fonction de l'enzyme soit de transformer tous les réactifs en produits) est faible. Cependant, si l'enzyme consomme elle-même de l'énergie, elle peut utiliser cette énergie pour modifier la répartition des réactifs et des produits à l'équilibre.

Pour une topoisomérase qui ne consomme pas d'ATP (comme la topo 3) le rapport de la probabilité à l'équilibre d'obtenir une molécule d'ADN nouée P_n^{eq} et de la probabilité d'obtenir une molécule dénouée P_d^{eq} varie comme le rapport des fréquences de collision κ_n et κ_d (ou de juxtaposition) des brins d'ADN :

$$\frac{P_n^{eq}}{P_d^{eq}} = \frac{\kappa_d}{\kappa_n} \quad (4.1)$$

Ceci illustre le cas d'une réaction dans laquelle l'enzyme fait passer un segment à travers l'autre pourvu qu'il y ait juxtaposition entre deux croisements d'ADN.

Les auteurs suggèrent un mécanisme plus complexe de dénouement par les topoisomérases de type II, basée sur le schéma de la figure 4.3. Suivant ce modèle, la réaction s'effectue de la manière

suivante : l'enzyme, une fois accrochée sur un segment d'ADN, attend la juxtaposition du segment T. Une fois cette condition réalisée (état (2)), il n'y a pas de passage de brin, mais l'enzyme passe dans un état activé (état (1*)). En cas de nouvelle juxtaposition (état (2*)), cette fois, le passage de brin est possible et permet le dénouement de la molécule d'ADN. Le même schéma s'applique pour la réaction inverse.

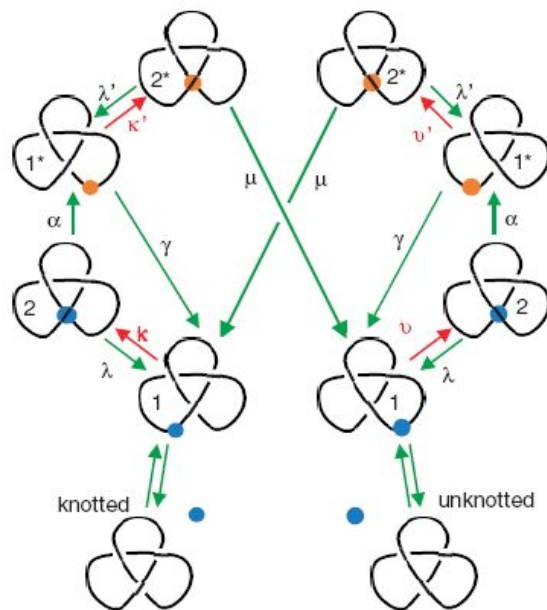


FIG. 4.3 – **Modèle de cycle enzymatique avec amplification cinétique proposé Yan et al.** Image tirée de [147]

Ce modèle est donc fondé sur le fait que deux juxtapositions successives soient nécessaires pour que la réaction soit effective. Dans le cas où les réactions $2 \rightarrow 1^*$ (activation) et $1^* \rightarrow 1$ (désactivation) sont irréversibles, et à condition que l'étape de passage de brin soit lente, la fraction de molécules nouées à l'équilibre varie désormais comme le carré des rapports des fréquences de juxtaposition (en supposant que $1 \rightarrow 2$ et $1^* \rightarrow 2^*$ aient les mêmes constantes cinétiques) et donc comme le carré de la probabilité d'obtenir un noeud:

$$\frac{P_n}{P_d} = \left(\frac{\kappa_d}{\kappa_n} \right)^2 = \left(\frac{P_n^{eq}}{P_d^{eq}} \right) \quad (4.2)$$

ce qui permet de réduire considérablement la proportion des noeuds[147].

Pour concilier ce modèle avec les observations concernant le rôle de l'ATP dans le cycle enzymatique (voir le chapitre 2 de la partie III), les auteurs suggèrent que l'étape $2 \rightarrow 1^*$ soit rendue irréversible par l'accrochage d'une molécule d'ATP suite à la juxtaposition des segments G et T. L'étape $1^* \rightarrow 1$ de désactivation correspondrait à la fermeture de la pince N-terminal de l'enzyme. L'hydrolyse de l'ATP n'interviendrait que dans l'étape de passage de brin.

Plus récemment, Yan *et al.* ont affiné leur modèle pour rendre compte quantitativement des différences entre les capacités des topoisomérases de type II à décaténer, dénouer et relaxer le super-enroulement de l'ADN[146].

4.3 Principe de l'expérience

Nous avons cherché à tester directement le modèle proposé par Yan *et al.*. Pour cela, nous avons besoin d'observer l'activité de l'enzyme dans un régime où la fréquence de collision des segments d'ADN limite la décaténation. Dans ces conditions, l'observation des temps de cycles enzymatiques devait permettre de déterminer le nombre d'étapes limitantes et donc le nombre de étapes nécessaires qui sont liées à la juxtaposition des croisements d'ADN.

Considérons deux molécules d'ADN accrochées sur la même bille et distante de $2e$. Comme nous avons vu précédemment, le fait de tourner les aimants entre $Ca = 0$ et $Ca = 0.5$ rapproche les molécules. La distance moyenne $\langle d \rangle$ entre molécules vaut :

$$\langle d \rangle = 2e \cos(\pi Ca) \quad (4.3)$$

de telle sorte que les molécules sont en contact lorsque $Ca = 0.5$, ce qui constitue un substrat potentiel pour la topoisomérase. Cependant, les fluctuations thermiques entraînent que la probabilité de juxtaposition reste bien inférieure à 1, même lorsque $Ca = 0.5$ (voir plus loin). De plus, il est difficile de suivre l'activité de l'enzyme pour $Ca = 0.5$, puisque le passage de brin entraîne la formation d'une structure pour la quelle $Ca = -0.5$, qui a exactement la même extension.

Par contre, nous avons pu observé la décaténation de liens uniques par la topo 2 de drosophile et la topo 4 d'*E. coli* pour différentes valeurs du nombre de caténation : $1 > |Ca| > 0.6$ (voir figure 4.4).

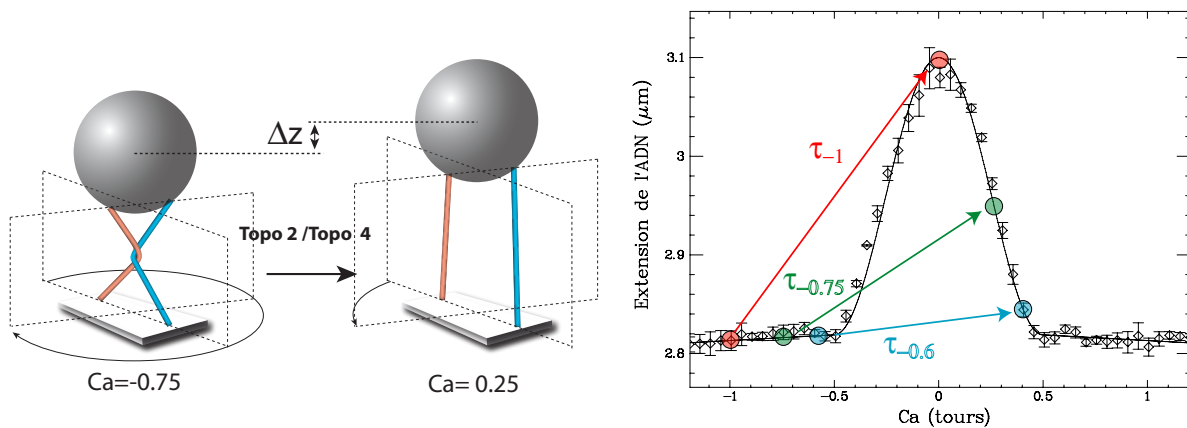


FIG. 4.4 – **Principe de l'expérience de décaténation.** A gauche : la décaténation de deux molécules de nombre de caténation Ca donne une structure d'indice de caténation $-(|Ca| - 1) \times \text{signe}(Ca)$. Cette réaction entraîne une variation d'extension mesurable. A droite : suivant le nombre de caténation initial Ca , nous mesurons le temps τ_{Ca} requis pour obtenir la décaténation. Ce temps est très bien déterminé par la variation de longueur importante qui se produit lors du changement de topologie.

Cette mesure repose sur la variation importante de longueur Δz qui se produit lors du passage de brin. De même que dans le chapitre précédent, nous mesurons la distribution des temps τ_{Ca} requis pour observer la décaténation à différentes valeurs de Ca .

4.4 Résultats

4.4.1 Le signal de décaténation

La figure 4.5 montre un signal de décaténation typique obtenue avec la topo 2 de drosophile à environ 2 pN en partant de $Ca = 1.03$ (à gauche) et $Ca = 0.68$ (à droite). La position des aimants est

matérialisée par la courbe continue en noir. A la suite d'une réaction de passage de brin ($|\Delta Ca| = 1$), l'extension du système augmente brutalement. Cette augmentation est détectée par le programme qui ordonne alors la rotation des aimants pour caténer à nouveau les molécules (ajout d'exactly un tour). L'acquisition, quasi-automatique, permet d'enregistrer un grand nombre de temps τ_{Ca} .

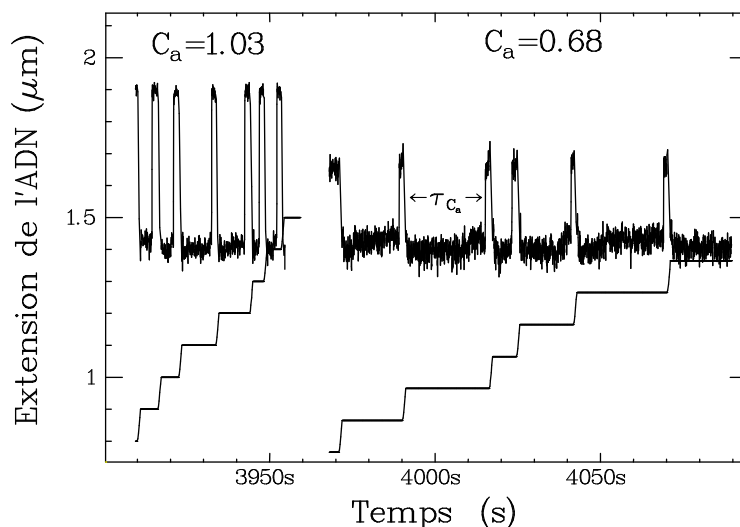


FIG. 4.5 – Enregistrements des temps de passages de brin par la topo 2 de drosophile à $Ca = 1.03$ et $Ca = 0.68$. La ligne noire continue indique la position des aimants.

On observe que le temps moyen de relaxation augmente notablement entre $Ca = 1.03$ et $Ca = 0.68$. Ainsi, l'étape cinétique déterminant la vitesse semble être liée à Ca . Or, il est fort probable que la fréquence de juxtaposition des brins soit très dépendante de Ca . Dans ce cas, observer la relaxation pour des valeurs $0.5 < |Ca| < 1$ permet de se placer dans un régime où la collision des segments d'ADN constitue l'étape limitante de la réaction.

Afin de pouvoir comparer entre eux les temps moyens de décaténation, tous les points doivent être mesurés lors de la même injection d'enzyme dans le capillaire. En effet, d'une injection à l'autre, des petites variations de concentration peuvent modifier les résultats.

Ces acquisitions nécessitent une statistique importante aux différentes valeurs de Ca . La durée de l'expérience est typiquement de l'ordre d'1 heure, ce qui est aussi la durée de vie de l'enzyme. En conséquence, les temps de décaténation augmentent au fur et à mesure que l'expérience avance. Pour limiter cet effet, nous avons renormalisé les temps au fur et à mesure de l'avancée de la réaction. Nous avons aussi expérimenté une injection en continue mais très lente de l'enzyme dans le capillaire, à partir d'un mélange réactionnel maintenu à 4°C .

Les temps de décaténation diminuent nettement lorsque la concentration d'enzyme augmente. Cependant, nous avons vérifié que le rapport entre les temps de décaténation à deux valeurs de Ca différente ne dépend pas de la concentration d'enzyme. Celle-ci semble uniquement introduire un préfacteur multiplicatif. La concentration typique d'enzyme utilisée est de l'ordre de quelques K_d , ce qui permet une relaxation pas trop rapide (pour mesurer aisément le temps) et pas trop lente (pour obtenir suffisamment de statistique).

4.4.2 Fréquence de passage de brin

La figure 4.6 montre la fréquence de passage de brin moyenne obtenue pour différentes valeurs de $|Ca|$ entre 0.6 et 1.05 pour la topo 2 de drosophile et la topo 4 d'*E. coli* à 2 pN. En ce qui concerne la topo 4, compte tenu de sa chiralité, les expériences sont en fait réalisées entre -1.05 et -0.6.

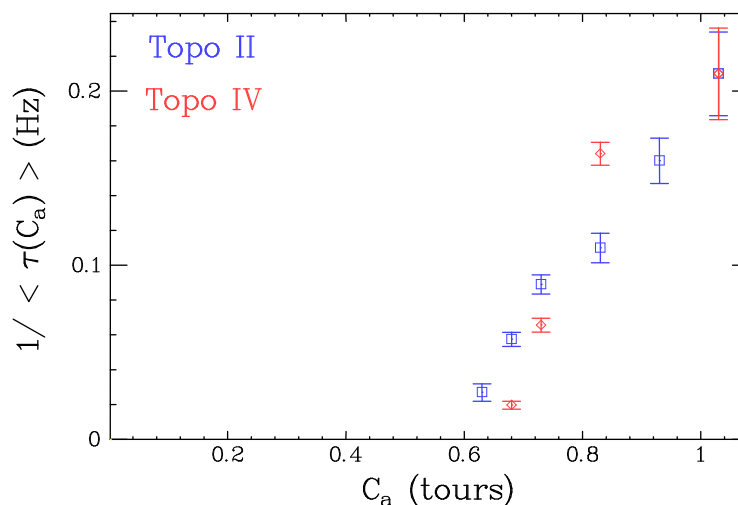


FIG. 4.6 – **Fréquence de décaténation en fonction du degré de C_a .** Les points rouges (topo 4) ont été renormalisés par rapport à la valeur à $C_a = 1.05$ des points bleus.

Afin de comparer les variations entre les deux enzymes les résultats obtenus pour la topo 4 ont été normalisés par rapport aux valeurs trouvées pour la topo 2 à $C_a = 1.05$ (nous avons multiplié par 0.66 la fréquence de passage de la topo 4). Les points montrent que, entre $C_a = 0.65$ et $C_a = 1.05$, la fréquence de passage de brin varie de plus d'un facteur dix. Il est difficile d'obtenir une plus grande dynamique, car cela nécessite de changer la concentration d'enzyme. Dans les conditions utilisées (quelques K_d), aucun événement n'a été observé en dessous de $C_a = 0.55$ pour la topo 2 et $C_a = 0.6$ pour la topo 4. La topo 4 semble d'ailleurs plus sensible à une variation de C_a que la topo 2.

Ces résultats montrent qu'un passage de brin alternatif dans les deux sens à $C_a = 0.5$ est très difficile à observer, tout au moins pour des concentrations d'enzymes raisonnables. Ils confirment qu'il existe une barrière énergétique importante pour la réaction de passage de brin en présence d'enzyme (voir figure 4.7). La hauteur de cette barrière dépend de $|C_a|$ à travers la distance d entre l'état initial et l'état de transition (caractérisé par la juxtaposition des segments).

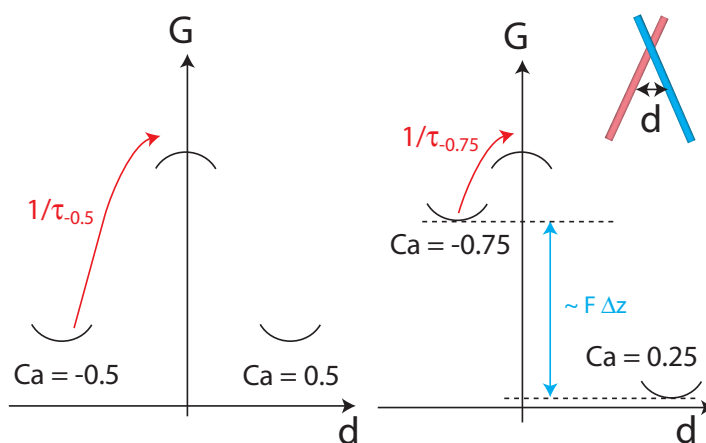


FIG. 4.7 – **Diagramme énergétique de la décaténation.** L'énergie libre du système est représentée en fonction de la coordonnée réactionnelle, à savoir la distance entre les molécules d'ADN. Suivant la valeur de C_a , la barrière énergétique n'est pas la même.

A $|Ca| = 0.5$, aucune configuration n'est favorisée énergétiquement. A cause des fluctuations thermiques, la distance moyenne à l'état de transition est assez grande et la fréquence de transition est faible. A $|Ca| = 0.75$, par contre, l'état initial est plus proche de l'état de transition, parce que la caténation force davantage le contact entre les chaînes. En conséquence, la fréquence de passage de brin est importante. L'état final ($|Ca| = 0.25$) est plus stable énergétiquement, à cause du travail $F\Delta z$ effectué par la force au cours de la réaction. La réaction est rendue irréversible à cause de la différence d'énergie.

La fréquence de passage de brin $f(Ca)$ pour un Ca donné s'écrit :

$$f(Ca) \equiv \frac{1}{\tau(Ca)} = \frac{1}{\tau_0} P^\alpha(Ca) \quad (4.4)$$

où $P(Ca)$ est la probabilité de juxtaposition pour un Ca donné, τ_0 le temps typique de décaténation en cas de juxtaposition (qui dépend de la concentration d'enzyme), et α la constante qu'il nous intéresse de mesurer : si $\alpha = 1$, alors une seule étape de juxtaposition est nécessaire pour observer le passage de brin. Par contre, si $\alpha > 1$, le mécanisme réactionnel inclue un comportement plus complexe de l'enzyme vis-à-vis de la juxtaposition.

Si la mesure de $f(Ca)$ est accessible expérimentalement (comme nous venons de le voir), il est difficile de mesurer directement $P(Ca)$, car il faudrait être capable de détecter la juxtaposition des molécules d'ADN. Dans les deux sections suivantes nous présentons deux méthodes pour obtenir $P(Ca)$: la première est basée sur l'utilisation de simulations numériques de molécules d'ADN. La seconde repose sur l'étude de la décaténation d'une topoisomérase de type I, la topo 3, dont l'absence de cofacteur énergétique interdit tout mécanisme d'amplification cinétique.

4.4.3 Détermination de $P(Ca)$ par simulation numérique

Nous avons effectué une simulation numérique Monte-Carlo pour déterminer la probabilité de contact de deux molécules caténées en fonction du nombre de caténation Ca . Cette simulation est basée sur le même principe que celle exposée dans la partie II de ce travail.

Nous détectons la juxtaposition de deux segments appartenant à chacune des chaînes en mesurant la distance entre chaque paires de segment $i - j$. Si cette distance est plus petite qu'une certaine distance d_0 , alors nous considérons que les segments sont en contact. Dans ce cas, nous nous interdisons de recenser d'autres contacts éventuels à l'intérieur d'une boule de rayon d_0 centrée sur le point de juxtaposition. L'algorithme est optimisé pour n'évaluer que les paires de segments susceptibles d'être en contact. Ce paramètre d_0 symbolise typiquement la taille de l'enzyme qui vient accrocher les deux brins d'ADN. Typiquement, nous avons choisi $d_0 = 10nm$.

La figure 4.8 montre les résultats obtenus à 0.5, 1, et 2 pN en prenant pour l'ADN un diamètre effectif $d = 4.2nm$ (correspondant aux conditions salines des expériences). Le rapport $2e/L$ est choisi pour correspondre à peu près aux expériences. Dans des limites raisonnables, les variations de ce paramètre ne modifient pas notablement les résultats obtenus. La probabilité de contact décolle de 0 à partir de $Ca = 0.4$. A $Ca = 0.5$, elle est de l'ordre de 10%. A $Ca = 1.0$, elle vaut entre 80% et 90% suivant la force.

L'évolution de cette probabilité semble être plus molle que la variation de la fréquence de passage de brin observée lors de la réaction. La figure 4.9 montre la comparaison de la fréquence de passage de brin obtenus à 2 pN et de $P(Ca)$ obtenus par simulation numérique.

Il est difficile d'ajuster $P(Ca)$ sur la courbe expérimentale $f(Ca)$, quel que soit le facteur τ_0 multiplicatif utilisé pour faire la normalisation. La probabilité de juxtaposition augmente trop vite au voisinage de $Ca = 0.5 - 0.6$. Par contre, $f(Ca)$ semble s'ajuster remarquablement par $P^3(Ca)/\tau_0$, ce qui semblerait indiquer que $\alpha = 3$. Dans ce cas, trois étapes de juxtaposition sont nécessaires pour observer un passage de brin.

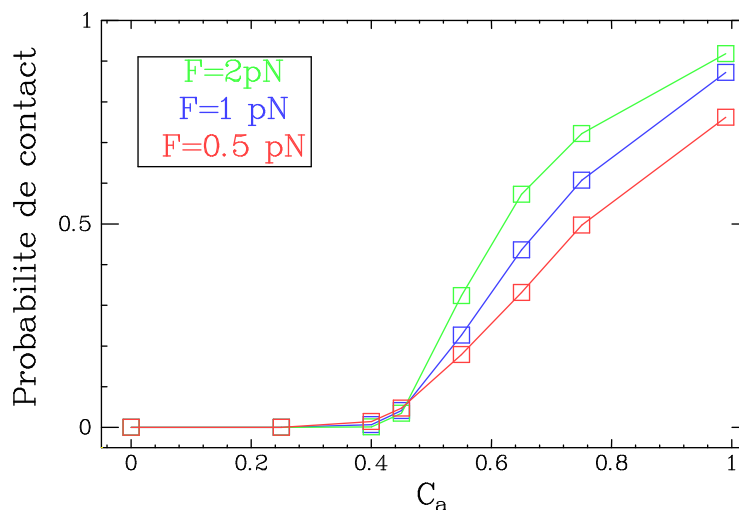


FIG. 4.8 – **Probabilité de juxtaposition $P(C_a)$ obtenue par simulation numérique.** Les simulations ont été faites à 0.5, 1 et 2 pN en prenant un diamètre effectif de 4.2 nm pour l'ADN et $d_0 = 10$ nm.

Si ces trois étapes ont des constantes cinétiques équivalentes, nous pourrions penser *a priori* que la distribution des temps de passage de brin soit une convolution de trois événements poissonniens, ce que nous avons étudié dans la section suivante.

4.4.4 Distribution des temps $\tau(C_a)$

Nous avons regardé la distribution des temps passages dans les conditions où la juxtaposition des segments semble être limitante. Les données exposées précédemment ne nous permettaient pas de trancher concernant la distribution des temps de passage de brin, parce que le nombre typique d'événements, de l'ordre de 50, était insuffisant. Nous avons réalisé une acquisition sur 8000s à $C_a = 0.6$ en présence d'une large quantité de topo 2 de drosophile (≈ 0.3 nM, c'est-à-dire dix fois la concentration utilisée en molécule unique), de sorte que le temps moyen entre événements est de l'ordre de quelques secondes.

La figure 4.10 montre les résultats obtenus. A gauche, en traçant la position des aimants en fonction du temps, nous pouvons observer un lent amortissement de la réaction. En ajustant une courbe exponentielle, nous avons renormalisé les temps de passage de brin obtenus au cours de la cinétique. Ceux-ci n'ont pas varié de plus de 20% au cours de la cinétique. L'encart montre un détail de la courbe, qui fait apparaître les fluctuations de la position par rapport à la courbe moyenne.

A droite, nous avons représenté la distribution des temps de passage de brin (échantillonnée à 0.5 s) obtenue à partir de 1280 événements de décaténation. L'ajustement par une exponentielle avec un temps moyen $\langle \tau \rangle = 2.35$ s donne un excellent accord, à un détail près : les événements de temps < 0.5 s sont largement sous-représentés. Ce problème s'explique facilement par notre méthode de mesure : la rotation des aimants, qui induit des vibrations dans le dispositif de micromanipulation, ajouté à la rotation rapide de la bille, entraînent une perte transitoire du suivi de l'extension du système. Pendant toute la durée de la rotation, nous ne pouvons pas mesurer l'extension. De plus, l'arrêt brutal des moteurs engendrent des vibrations dont la conséquence est d'interdire la mesure en z pendant environ 0.4 secondes après l'arrêt des moteurs. Or, l'analyse des temps de décaténation que nous avons réalisée prend comme origine des temps l'instant où les moteurs s'arrêtent. En conséquence, une décaténation qui se produit avant que le rétablissement du suivi en z est comptabilisée comme ayant un temps de l'ordre de 0.4 s.

En définitive, il existe une fenêtre de temps de l'ordre de 0.5 secondes à laquelle nous n'avons pas

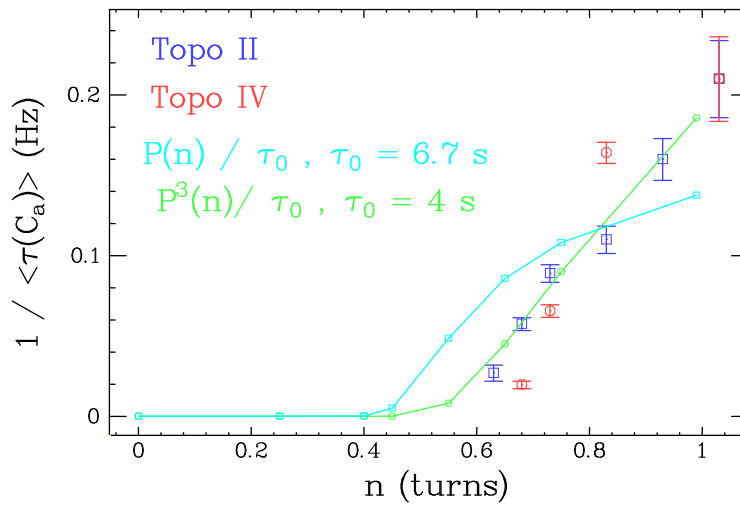


FIG. 4.9 – Comparaison entre la probabilité de juxtaposition obtenue numériquement et la fréquence de passage de brin expérimentale.. $P(Ca)$ est normalisé par un facteur multiplicatif τ_0 pour permettre un ajustement approximatif sur les courbes expérimentales de fréquence de passage de brin.

accès. Par contre aucun événement n'est oublié, de sorte que la distribution n'est pas altérée, pourvu que l'on choisisse un paramètre de *bin* suffisamment grand (de l'ordre d'1 seconde, ce qui n'est pas le cas sur la figure 4.10, afin de montrer l'effet en question).

Comment alors réconcilier la distribution des temps avec les résultats précédents? Si trois étapes de juxtaposition sont nécessaires pour obtenir une décaténation, on pourrait s'attendre à obtenir une distribution non-poissonnienne. Cependant, ce raisonnement ne s'applique que pour une succession d'étapes irréversibles. Dans un modèle du type de celui de Yan *et al.*, les étapes de juxtaposition sont réversibles. A partir de leur modèle cinétique, on peut déduire la constante de vitesse effective k_{eff} de la réaction de passage de brin :

$$k_{eff} = \frac{\mu\alpha\kappa\kappa'}{\gamma(\lambda + \alpha)(\lambda' + \mu)} \quad (4.5)$$

dans le cas où $\gamma(\lambda' + \mu) \gg \kappa'\mu$ [147]. Ainsi, la distribution des temps de passage de brin est poissonnienne selon ce modèle. Par contre, la fréquence de passage varie comme $\kappa\kappa'$, c'est-à-dire comme le carré de la probabilité de juxtaposition. Notons que cette description est similaire à celle du modèle de Harkins *et al.*, en remplaçant le rôle de l'ATP par la juxtaposition des croisements (voir chapitre 2).

En conséquence, ces expériences sont compatibles avec un modèle de cycle enzymatique composé d'une succession de plusieurs étapes de juxtaposition réversibles.

Cependant, une des limitations majeures de notre approche repose sur le fait qu'elle est basée sur la comparaison de données expérimentales et de simulations numériques. Afin d'obtenir un signal expérimental qui reflète directement la probabilité $P(Ca)$, nous avons cherché à effectuer la même expérience en présence de topo 3.

4.4.5 Nécessité d'un contrôle expérimental : la topo 3 d'*E. coli*?

La topo 3 d'*E. coli*, qui nous a été fournie par Stephen Kowalczykowski (UC Davis), est connue pour son activité de décaténation au cours de la réplication (voir chapitre 1). C'est une topoisomérase de type IA, qui ne consomme pas d'ATP. Dans les expériences de Rybenkov *et al.*, elle est utilisée comme contrôle par rapport aux topoisomérases de type II : partant d'une population de plasmides

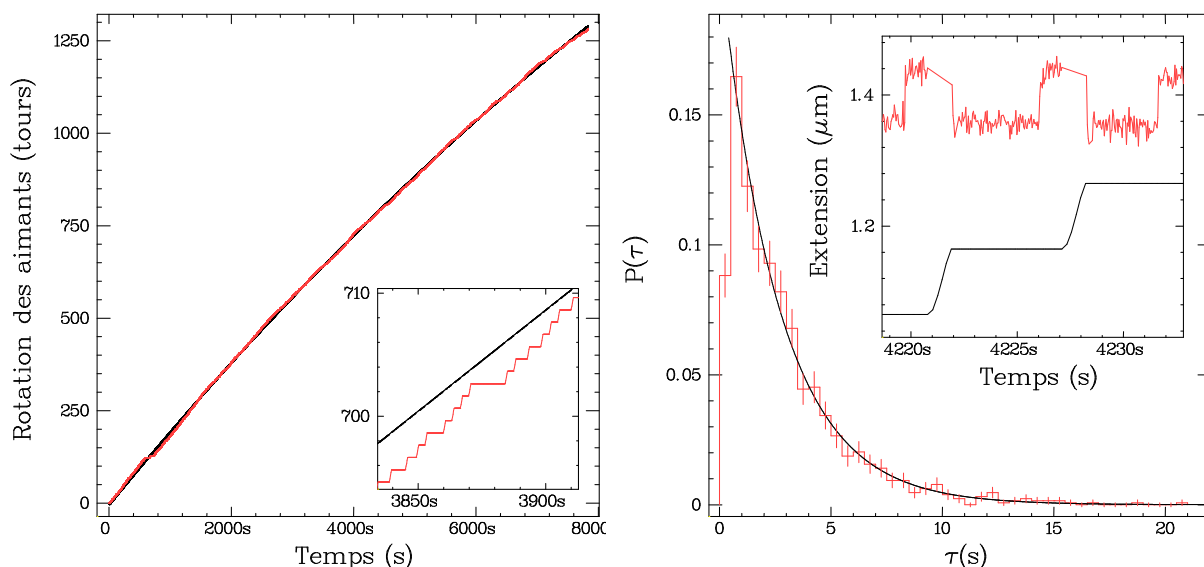


FIG. 4.10 – **Distribution des temps de passage de brin à $Ca = 0.6$.** *A gauche : évolution de la position des moteurs en fonction du temps lors de l'enregistrement des temps de décaténation. Du début à la fin de la cinétique, les temps de décaténation varient d'environ 20%. A droite : distribution des temps de décaténation. Encart : détail de quelques événements de décaténation et de la position des moteurs. Pendant la rotation des moteurs, il nous est impossible d'enregistrer l'extension de la molécule d'ADN.*

non caténés et non noués, la topo 3 ramène la proportions de noeuds et de caténanes à l'équilibre thermodynamique[102].

Pour décaténer l'ADN, cette enzyme nécessite qu'il y ait une coupure simple brin existante dans la molécule d'ADN. En coupant l'autre brin, elle fait passer un double-brin à travers la cassure.

Nous avons testé l'activité de cette enzyme (à 20 nM) sur deux molécules caténées ($Ca \gg 1$) étirées à 1 pN. La figure 4.11 montre les résultats obtenus : l'enzyme démarre la relaxation dès lors que les aimants sont arrêtés, ce qui indique que la concentration d'enzyme est importante. Cependant, l'enzyme ne peut agir qu'au niveau des cassures dans l'ADN, dont nous ignorons le nombre et la disposition.

La vitesse typique de réaction est de l'ordre de 0.2 cycles/s. La relaxation n'est jamais totale : en effet, si la ou les cassures simples brins se trouvent plutôt vers les extrémités de la molécule, alors la fin de la décaténation est rendue impossible.

En conséquence, si nous voulons observer la relaxation de liens uniques, il est nécessaire de faire une construction d'ADN qui possède un certain nombre de cassures dans sa partie centrale. Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas réussi à synthétiser une telle molécule. La biologie moléculaire est souvent une question de patience, et nous ne désespérons pas d'y arriver.

4.5 conclusion

Cette expérience montre la versatilité de notre dispositif de micromanipulation, qui nous permet de suivre en temps réel la décaténation de liens uniques d'ADN par les topoisomérases de type II. S'il semble clairement établi que l'efficacité de décaténation augmente de manière fulgurante avec la probabilité de juxtaposition des molécules, il reste délicat d'affirmer que la validation du modèle d'amplification cinétique est faite. L'étude de la topo 3 devrait permettre de préciser nos résultats. Notons également l'intérêt potentiel de regarder l'activité de la topo 2 de *S. cerevisiae*, qui semble avoir une efficacité de décaténation en dessous de l'équilibre moindre par rapport aux autres enzymes de

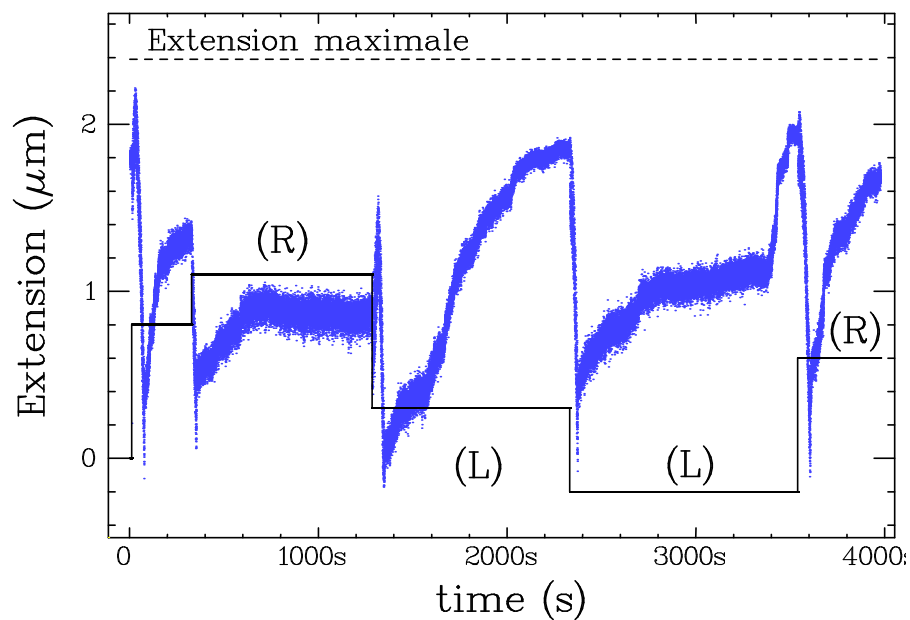


FIG. 4.11 – **Décaténation par la topoisomérase III.** Enregistrement typique de l'extension d'une tresse lors de la décaténation par la topo 3 (20 nM) à 1 pN. La ligne continue noire indique la position des aimants. La relaxation n'est jamais complète.

type II[102]. Remarquons enfin que l'étude du mutant E66Q/WT (voir chapitre 2) s'inscrit pleinement dans ce cadre.

Chapitre 5

Etude préliminaire de la gyrase d'*E. coli*

La topo 4 et la gyrase sont les deux topoisomérases de type II présentes chez les prokaryotes. Si les deux enzymes possèdent une forte homologie de structure, il n'en demeure pas moins que leur mécanismes et leurs fonctions sont très différentes. Après notre étude de la la topo 4, il nous a semblé judicieux de regarder l'activité de la gyrase en molécule unique. Dans ce chapitre, nous exposons brièvement les résultats préliminaires obtenus, dont une part importante est due au travail effectué par Romain Planques lors d'un stage au laboratoire en juillet 2003.

5.1 Introduction

La comparaison entre deux topoisomérases de type II (la topo 2 de drosophile et la topo 4 d'*E. coli*) a permis de mettre en évidence des différences au niveau du mécanisme d'action de ces deux enzymes. La spécificité de substrat en est une, et la sensibilité vis-à-vis de la force en est une autre.

Nous avons débuté l'étude de l'activité de la gyrase en molécule unique pour plusieurs raisons: d'abord, il n'est pas inintéressant de procéder à une comparaison des résultats précédemment obtenus sur les autres enzymes, en particulier la topo 4. Ensuite, la gyrase procède des propriétés uniques: elle enroule l'ADN de manière solénoïdale autour d'elle-même, ce qui lui permet de générer du super-enroulement négatif en présence d'ATP.

5.2 Relaxation du super-enroulement (+)

Nous avons suivi la relaxation du super-enroulement positif par la gyrase à 2.5 pN en diluant par 100 la concentration du stock commercial sur de molécules de 11 kb. La figure 5.1 montre un signal de relaxation typique. L'enzyme fonctionne de manière processive, à une vitesse de l'ordre de 1 cycle/seconde.

Si l'on regarde les signaux de relaxation de près, on s'aperçoit que la relative lenteur de l'enzyme et la force élevée nous permettent de distinguer des pas élémentaires de relaxation, comme le montre la figure 5.2. La statistique de ces pas (sur 33 événements) révèle un pas moyen 55 nm, compatible avec le fait que deux boucles plectonémiques ont une taille moyenne de 48 nm à cette force. Notons la présence de double-pas qui fausse légèrement la statistique.

Des expériences à différentes forces nous ont permis d'estimer la vitesse de relaxation moyenne en fonction de la force appliquée sur la molécule d'ADN. La figure 5.3 consigne les résultats obtenus. Hormis les valeurs obtenues à 1 pN, il semble que l'enzyme ait une vitesse de relaxation d'environ 1 cycle/s indépendante de la force appliquée, tout au moins dans le domaine de force investigué. La vitesse est donc plus faible que la vitesse de la topo 4, mais sa dépendance vis-à-vis de la force semble être la même.

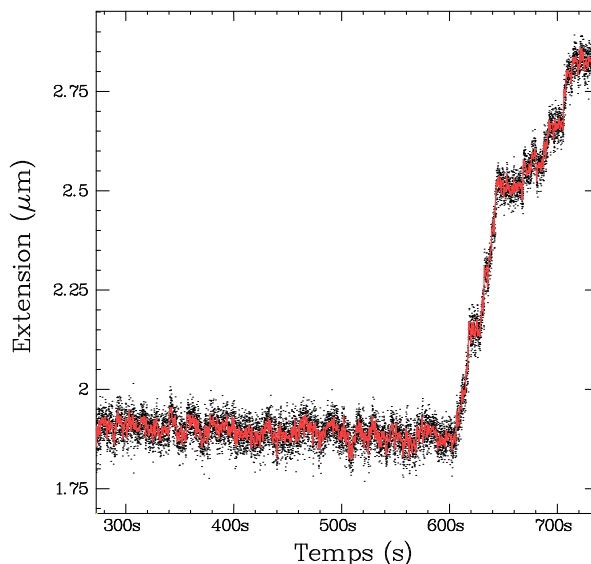


FIG. 5.1 – **Relaxation du super-enroulement positif par la gyrase.** Après une longue phase de pause, la gyrase relaxe environ 50 supertours à 2.5 pN.

5.3 Génération de super-enroulement négatif

A plus basse force, il est possible d'observer la génération de super-enroulement négatif. La figure 5.4 montre un enregistrement obtenu à 0.23 pN. Après la rotation des aimants entraînant la génération de supertour (+) et un temps d'attente, une enzyme relaxe les structures plectonémiques. Ensuite, après un temps plus ou moins long (de l'ordre de quelques dizaines de secondes), on observe un raccourcissement de l'extension dont la vitesse correspond à peu près à la vitesse de relaxation. Ce signal traduit la génération du super-enroulement dans la molécule, dont nous pouvons vérifier en tournant à nouveau les aimants qu'il est effectivement négatif. Au cours de ces expériences préliminaires, nous avons rarement observé d'événements continus de relaxation de supertours (+) suivis par la génération de supertours (-). Cependant, il faut noter que, lorsque σ est proche de zéro, il n'y a pas de grande variation d'extension lorsque l'indice d'enlacement change. En conséquence, l'observation de l'activité de l'enzyme y est impossible.

5.4 Perspectives

A la différence de la relaxation du super-enroulement positif, la génération de super-enroulement (-) se fait contre la force. *A priori*, elle nécessite que l'enzyme fournisse l'énergie $E = 2F\Delta L$, où ΔL est la taille moyenne d'un plectonème. A 0.23 pN, on a : $\Delta L \approx 60$ nm. Donc $E \approx 7k_B T$. Cette énergie pourrait être fournie par l'accrochage de l'enzyme sur l'ADN : en effet, l'enzyme semble réduire la taille des structures plectonémiques lors de son accrochage, en enroulant environ 140 bp d'ADN autour d'elle-même.

Il serait intéressant de continuer l'étude de la génération de super-enroulement négatif, pour évaluer par exemple si l'enzyme est limitée par une certaine valeur de σ , ou si c'est le couple (réglé par la force appliquée sur la molécule) dans la molécule d'ADN qui limite son action. De plus, les propriétés d'accrochage de la gyrase pourraient être étudiées de la même manière que nous l'avons fait pour la topo 4.

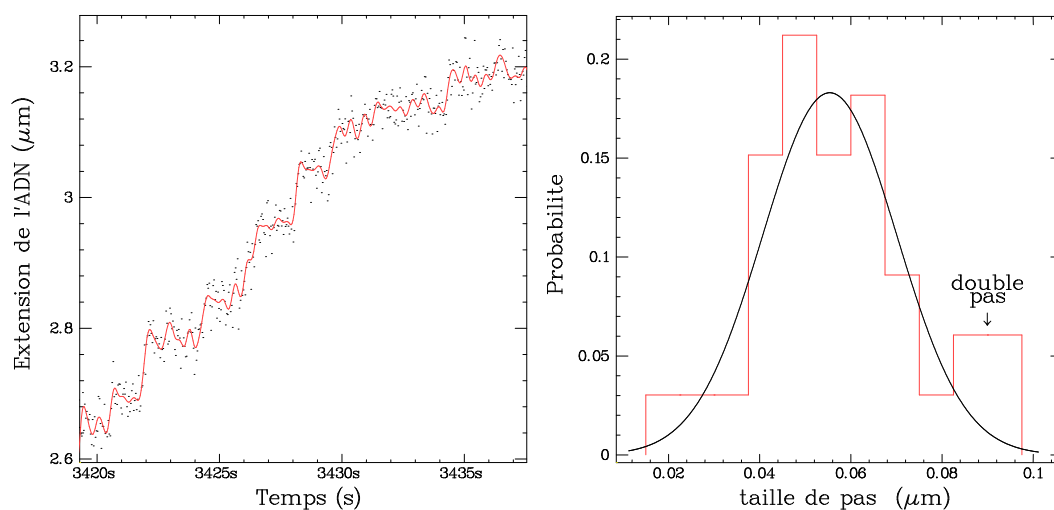


FIG. 5.2 – **Relaxation par pas élémentaires.** La relaxation à 2.5 pN s'effectue par pas identifiables. La statistique des tailles de pas (3 événements) donne un pas moyen de 55 nm, compatible avec la relaxation de double plectonémique à chaque cycle (48 nm). La présence de double pas affecte la statistique.

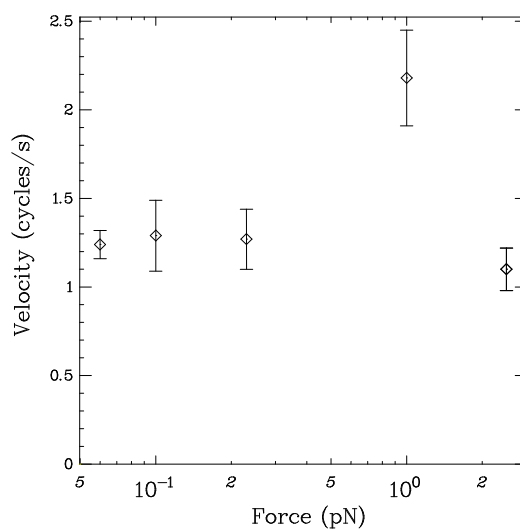


FIG. 5.3 – **Vitesse de relaxation de la gyrase en fonction de la force.**

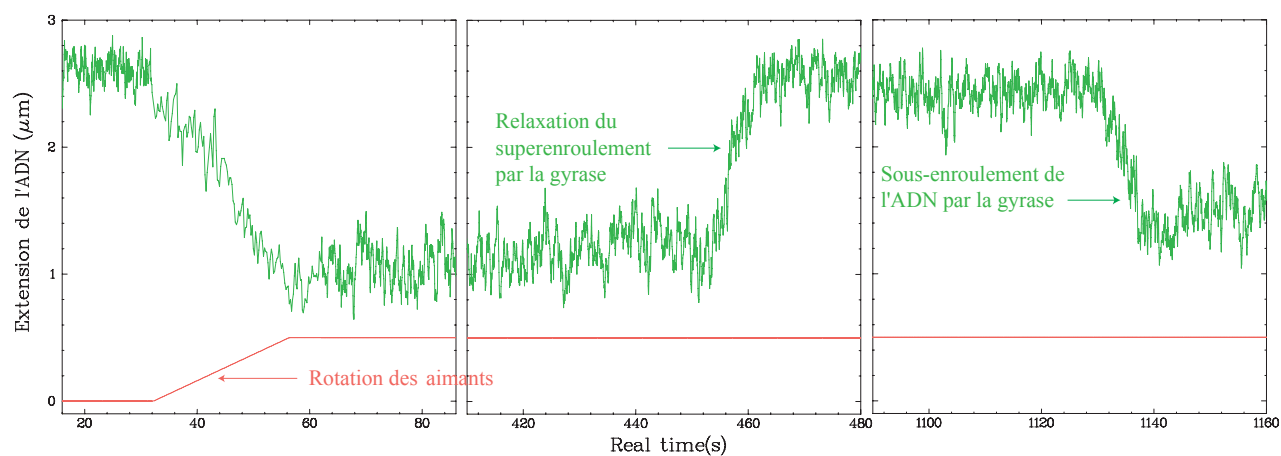


FIG. 5.4 – **Relaxation de super-enroulement (+) et génération de super-enroulement (-) par la gyrase.** Les expériences sont réalisées à 0.23 pN dans 1 mM ATP.

Conclusion

Perspectives pour l'étude des topoisomérases par micromanipulation de molécules unique

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la micromanipulation de molécules uniques d'ADN pour étudier des enzymes de la classe des topoisomérases de type II. Les expériences que nous avons réalisées permettent de caractériser l'action dynamique d'une enzyme unique travaillant sur son substrat, en s'affranchissant des problèmes inhérents aux mesures d'ensemble (effets de moyenne temporelle et de moyenne d'ensemble, populations hétérogènes, etc...).

Grâce à l'analyse statistique des signaux enzymatiques, ces expériences nous ont permis de plonger au coeur du mécanisme des topos et d'appuyer un modèle cinétique de cycle proposé pour cette enzyme. L'analyse par transformée de Fourier permet d'évaluer quantitativement le rapport signal/bruit des traces enzymatiques, et d'estimer la quantité d'information que l'on peut extraire du signal. Dans les cas des topoisomérases de type II, il nous révèle qu'il nous est actuellement impossible d'observer chaque cycle enzymatique à haute concentration d'ATP. Cependant, en réduisant la taille des billes et la longueur des molécules, il n'est pas exclu d'y arriver. Une amélioration du rapport/signal sur bruit permettrait aussi de regarder l'évolution de la stochasticité de l'enzyme avec la force, et ainsi de tenter de comprendre l'origine de la sensibilité des topos 2 vis-à-vis de la force appliquée sur l'ADN.

Par ailleurs, nous avons étudié les propriétés de reconnaissance et de discrimination de la topoisomérases. La micromanipulation d'ADN fournit un cadre idéal pour ce travail, dans la mesure où elle nous permet de créer des substrats (c'est-à-dire des configurations de croisements d'ADN) variées de manière relativement bien contrôlée. Nous avons ainsi pu mettre en évidence directement le rôle joué par l'angle d'un croisement d'ADN pour la reconnaissance du substrat par la topoisomérase 4. Bien évidemment, il serait intéressant de contrôler exactement l'angle entre croisement d'ADN. Nous avons envisagé la construction d'une molécule circulaire, dont deux parties diamétralement opposées seraient fonctionnalisées pour permettre l'accrochage sur la surface et sur la bille. Cependant, l'asymétrie de la bille magnétique (du fait du moment magnétique) est le principal obstacle à un accrochage régulier et équidistant de la molécule.

Nous avons toujours été fascinés par le fait que les topoisomérases soient décrites comme des petits démons de Maxwell[102], à cause de leur capacité à simplifier la topologie en dessous de l'équilibre thermodynamique. Nous avons cherché à tester un modèle d'amplification cinétique basée sur la relecture par l'enzyme de l'étape de juxtaposition des croisements d'ADN. Notre dispositif nous a permis de constater que l'enzyme est très sensible à la probabilité de juxtaposition des segments, ce qui est compatible avec un mécanisme coopératif d'amplification. Pourtant, cette expérience doit être finalisée par la réalisation d'un contrôle expérimental, qui pour l'instant reste difficile à mettre en oeuvre.

D'autres motivations pour étudier les topoisomérases?

Les topoisomérases sont largement étudiées à un niveau clinique parce qu'elles peuvent constituer des cibles dans le cadre de traitements chimiothérapeutiques ou antibiotiques. Si la compréhension du mécanisme pourrait éventuellement servir à améliorer le choix des drogues utilisées, notre étude

ne s'est pas tournée vers l'observation des effets des drogues des topoisomérases. C'est une piste qu'il reste à investiguer à l'échelle de la molécule unique.

Nous avons essayé de caractérisé la topoisomérase en tant que moteur moléculaire, c'est-à-dire un assemblage moléculaire capable de effectuer une travail mécanique. Ce moteur utilise une énergie chimique, la consommation d'ATP, pour réaliser cette tâche. S'il semble établi que l'hydrolyse de l'ATP soit nécessaire pour effectuer le passage de brin, l'énergie est également indispensable pour assurer la reconnaissance active du substrat. La question du couplage entre l'action mécanique, l'hydrolyse de l'ATP, et la reconnaissance du substrat constitue un intérêt majeur.

Cependant, à une échelle plus large et plus physiologique, se pose le problème de l'intégration de l'action des topoisomérases dans la cellule. Plusieurs types de topoisomérases cohabitent dans la cellule. Les réactions qu'elles catalysent sont parfois antagonistes. Comment s'additionne leur contributions individuelles? Par ailleurs, leur substrat, l'ADN, possède une dynamique très complexe aux cours de la vie de la cellule : il se réplique, se condense, et de décondense au cours du cycle cellulaire. De plus, il existe une régulation extrêmement complexe de la transcription de ses gènes. Tous ces événements entraînent des bouleversements de la topologie de l'ADN que les topoisomérases doivent gérer. Il est très probable que leur activité soit elle-même régulée dans l'espace et le temps[29]. Il reste beaucoup à faire dans cette voie. En outre, il semble que certaines d'entre elles fonctionnent en interaction avec d'autres protéines, comme les hélicases[47]. L'intérêt d'étudier les topoisomérases ne se limite donc pas à la question de leur mécanisme, mais soulève des questions fondamentales de biologie pour lesquelles nos expériences réductionnistes de biophysique sont incapables d'apporter de réponse valable.

Vers une enzymologie à l'échelle de la molécule unique

La caractérisation du fonctionnement de moteurs moléculaires individuels, comme la kinésine, la F1-ATPase et la topoisomérase a été rendu possible par un développement accru de techniques de biophysique au cours des quinze dernières années. Ces observations ont été facilitées par le fait que des substrats comme l'ADN ou les microtubules sont faciles à manipuler. En matière de micromanipulation d'ADN, les premières expériences d'interaction ADN-protéines ont été réalisées par Yin *et al.* [148] sur l'ARN polymérase, Finzi *et al.*[32] sur l'opéron Lac, Léger *et al.* [64] sur RecA, puis par Strick *et al.* [122] sur la topoisomérase II. Ces expériences pionnières ont ouvert la voie à l'étude en molécule unique d'un grand nombre de protéines qui travaillent sur l'ADN.

L'étude des enzymes en molécule unique a nécessité, outre le déploiement de nouvelles techniques d'acquisition et de mesures, d'introduire des méthodes d'analyse nouvelles en enzymologie, basées essentiellement sur le traitement du signal numérique. Une enzyme qui travaille sur l'ADN s'observe à travers les sauts, les pauses, les changements d'extension qu'elle impose à la molécule d'ADN, dans un environnement très bruyant. Chaque protéine, à travers les particularités de son comportement (processivité, vitesse, etc ...) nous impose d'adapter nos conditions expérimentales. Néanmoins, il se dégage un certain nombre de méthodes générales qui s'appliquent à l'étude des différentes enzymes : l'analyse des fluctuations de vitesse pour la détermination de la taille du pas enzymatique en est un exemple[19]. Le suivi de l'accrochage et du décrochage des enzymes pour la détermination de l'énergie libre d'accrochage en est un autre[66].

Une nouvelle enzymologie, à l'échelle de la molécule unique, est ainsi en train d'émerger. Au laboratoire, de nombreux projets allant dans cette direction ont vu le jour au cours des dernières années : étude des hélicases, par Marie-Noëlle Dessinges, puis par Timothée Lionnet; étude des topoisomérase de type I, par Nynke Dekker; étude de facteurs de transcription et de facteurs de remodelage de la chromatine, par Giuseppe Lia; étude de FtsK, par Jean-François Allemand et Omar Saleh; étude de la reverse gyrase, par Keir Neuman; étude d'enzyme de restriction, par Jean-François Allemand. Cet engouement, qui ne se limite évidemment pas à notre laboratoire, illustre le succès des approches de molécule unique.

Evolution vers un couplage des techniques de suivi de molécule unique

Forte de ses succès, la micromanipulation d'ADN est en train de passer d'une méthode originale à une méthode systématique pour l'observation du fonctionnement des protéines qui interagissent avec l'ADN. A terme, il n'est pas à exclure qu'un tel dispositif vienne compléter l'arsenal des techniques du biochimiste de l'ADN ou du biologiste moléculaire (D'ailleurs, la question de la commercialisation d'un tel dispositif commence à hanter les esprits des concepteurs des pinces magnétiques). C'est sans doute dans ce cadre-là que l'utilisation de cette technique serait la plus prolifique : en effet, si le biophysicien sait mettre en oeuvre le développement de techniques d'investigation, il ne possède pas en général le recul et la culture nécessaires pour répondre seul à des questions qui intéressent les biologistes.

Par contre, il paraît naturel de chercher à orienter le dispositif vers de nouveaux horizons : le couplage entre micromanipulation d'ADN par pince magnétique et visualisation de molécules unique par microscopie à deux photons ou par réflexion interne totale en est un exemple (Hiroaki Yokota et Jean-François Allemand au laboratoire). Elle permettrait d'observer l'activité d'une enzyme sur l'ADN tout en suivant sa position instantanée sur l'ADN. En ce qui concerne les topoisomérases, la visualisation couplée à la micromanipulation apporterait des informations cruciales et complémentaires sur le fonctionnement de l'enzyme comme sa localisation sur les plectonèmes ou son temps de résidence sur l'ADN.

Annexes

Annexe A

Liste de publications

Single molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type II topoisomerases

G. Charvin , V. Croquette, D. Bensimon

PNAS, 100 (17), 9820-9825 (2003)

Stretching of macromolecules and proteins

T.R. Strick, M.-N. Dessinges, **G. Charvin** , N.H. Dekker, J.-F. Allemand, V. Croquette, D. Bensimon

Reports on progress in Physics, 66, 1-45 (2003)

Tracking enzymatic steps of DNA topoisomerases using single molecule micromanipulation

T.R. Strick, **G. Charvin** , N.H. Dekker, J.-F. Allemand, V. Croquette, D. Bensimon

C. R. Phys., vol. 3, num. 5, 595-618 (2002)

On the relation between noise spectra and the distribution of time between steps for single molecular motors

G. Charvin , D. Bensimon, V. Croquette

Single Molecule, 3, 46-48 (2002)

Twisting DNA : single molecule study

G. Charvin , T.R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, V. Croquette

Contemporary Physics, sous presse

Annexe B

Protocoles expérimentaux

B.1 Constructions d'ADN

La construction d'ADN est réalisée suivant le même protocole que celui utilisé par Térence Strick au cours de sa thèse[121]. Elle consiste en trois parties distinctes : un fragment principal (environ 10-11 kb) obtenu après digestion par KpnI et ApaI du plasmide Charomide extrait de bactéries *E. coli* en phase exponentielle.

Parallèlement, une molécule d'ADN de l'ordre de 1000 paires de bases est synthétisées par PCR à partir du plasmide pKS (pBlueScript) autour du site MCS. Nous utilisons des nucléotides dUTP marquées par la biotine ou la digoxigénine (Roche). Le fragment marqué à la biotine est digéré avec ApaI, alors que le fragment marqué à la digoxigénine est coupé avec KpnI.

Enfin, la ligation de ces trois fragments donne une molécule d'environ 11 kb *a priori* super-enroulable. Cependant une fraction variable des molécules possède généralement au moins une cassure simple-brin.

Notons que nous avons utilisé à maintes reprises des molécules synthétisées par Marie-Noëlle Dessinges, Giuseppe Lia et Jean-François Allemand.

B.2 Préparation des capillaires

Le protocole utilisé pour préparer les chambres réactionnelles (petits capillaires en verre de 50mm x 1mm x 1mm) est identique à celui utilisé par Térence Strick au cours de sa thèse.

La surface du capillaire est rendue hydrophobe par une solution de polystyrène. Elle est ensuite recouverte d'Antidigoxig nine pour permettre l'accrochage des molécules. L'incubation dure environ deux heures. Enfin la surface est passiv e avec une solution d'acide polyglutamique (10 mg/ml) et de BSA (10 mg/ml).

B.3 Tampon

Le tampon standard que nous utilisons est à base de phosphate à pH8. Nous ajoutons dans ce tampon, généralement à 10 mM, 0.1% de Tween 20 et 0.1 mg/ml de BSA. Pour éviter la prolifération des bactéries, nous introduisons de l'azide (10 mM).

B.4 topoisomérases

Nousa vons utilisé plusieurs topoisomérases, d'origine commerciale ou académique.

B.4.1 topo 2 de *Drosophila melanogaster*

L'enzyme provient d'Amersham dont le site se trouve à l'adresse suivante :

<http://www5.amershambiosciences.com/>.

Le tampon réactionnel préconisé par Amersham est : 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM ATP. Nous y ajoutons 1 mg/ml de BSA et 0.1 % de Tween 20.

B.4.2 topo 2 de *Saccharomyces cerevisiae*

Les enzymes (natives, mutantes E66Q , et hétérodimériques E66Q/native) nous ont été donnée par Janet Lindsley (University of Utah).

Le tampon réactionnel utilisé par Janet Lindsley[6] est : 50 mM Hepes, 150 mM KAc, 10 mM Acétate de magnésium, 1 mM ATP. Nous y ajoutons 1 mg/ml de BSA et 0.1 % de Tween 20.

B.4.3 topo 4 de *E. coli*

L'enzyme nous a été donnée par N.R. Cozzarelli (University of Berkeley) après purification par N. Crisona.

Le tampon réactionnel utilisé par Nancy Crisona[24] est : 25 mM Tris HCl pH= 7.6, 150 mM glutamate de potassium, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP. Nous y ajoutons 1 mg/ml de BSA et 0.1 % de Tween 20.

Une particularité de cette enzyme est d'être empoisonnée par les ions chlorures. Utiliser du chlorure de magnésium ne pose pas de problème, mais remplacer le glutamate de potassium par du chlorure de potassium inhibe complètement l'activité de l'enzyme.

B.4.4 Gyrase de *E. coli*

L'enzyme provient de John Innes Enterprises en Angleterre, dont le site est à l'adresse suivante :

<http://www.john-innes.co.uk/gyrase/>.

Le tampon réactionnel est : 35 mM Tris HCl pH=7.5, 24 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM ATP. Nous y ajoutons 1 mg/ml de BSA et 0.1 % de Tween 20.

B.4.5 topo 3 de *E. coli*

L'enzyme nous a été donnée par S.Kowalczykowski (UC Davis).

B.5 Analyse de données

Tous les programmes d'analyse de traces enzymatiques , ainsi que des programmes de traitements (histogrammes, ajustements, bootstrap) ont été écrits en C et intégrés dans XV, le programme d'interface et d'acquisition écrit par Vincent Croquette.

Annexe C

Simulation Monte-Carlo

Ce chapitre détaille les aspects de techniques des simulations Monte-Carlo de molécules d'ADN. Nous utilisons la procédure de Metropolis[80] pour générer une série de configurations caractéristique de l'équilibre thermodynamique, comme décrit dans[61].

C.1 Description de la chaîne

L'ADN est décrit comme une chaîne semi-flexible de N longueurs de Kuhn l_K , constituée de de $N.k$ segments élémentaires (voir figure C.1), de telle sorte que $k \gg 1$.

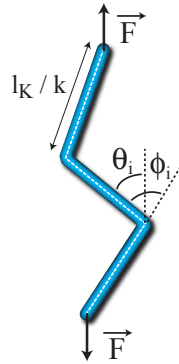


FIG. C.1 – Description de la chaîne

C.2 Energie de courbure

La rigidité de la molécule d'ADN est modélisée par un potentiel harmonique par rapport aux angles ϕ_i entre segments (voir figure C.1) :

$$E_c / (k_B T) = \frac{1}{2} \alpha \sum_{i=0}^{N.k} \phi_i^2 \quad (\text{C.1})$$

où α , la constante de rigidité, dépend de la discrétisation de la molécule[37]. Le cosinus de l'angle moyen entre deux segments est relié à k de la manière suivante [16] :

$$k = \frac{1 + \langle \cos \phi \rangle}{1 - \langle \cos \phi \rangle} \quad (\text{C.2})$$

D'autre part, par définition :

$$\langle \cos \phi \rangle = \frac{\int_0^\pi \cos \phi \sin \phi \exp(-\frac{1}{2}\alpha\phi^2) d\phi}{\int_0^\pi \sin \phi \exp(-\frac{1}{2}\alpha\phi^2) d\phi} \quad (\text{C.3})$$

Une résolution numérique permet ainsi d'obtenir la valeur de α correspondant à un k donné. Le tableau C.1 donne quelques valeurs numériques.

k	α
1	0*
10	2.40294
20	4.90990
50	12.41386

TAB. C.1 – Valeurs numériques de α en fonction de k . * : ce cas correspond au modèle FJC

C.3 Force

L'application d'une force F introduit le terme suivant dans l'énergie :

$$E/(k_B T) = -Fl_K/(k_B T k) \sum_{i=0}^{N.k} \cos \theta_i \quad (\text{C.4})$$

où θ_i est l'angle formé par le segment i avec la direction du champ (voir figure C.1).

C.4 Mouvements de la chaîne

Deux mouvements sont utilisés pour générer la séquence de configurations.

C.4.1 Rotation d'un segment de la chaîne

Ce mouvement, détaillé sur la figure C.2a), permet de changer l'extension de la chaîne: un segment (indice i_k) est choisi aléatoirement dans la chaîne. θ_{i_k} est modifié suivant une loi de probabilité uniforme (qui garantit la micro-réversibilité du mouvement) : $\cos \theta_{i_k}$ est tiré aléatoirement entre -1 et 1. Le reste de la chaîne est inchangé.

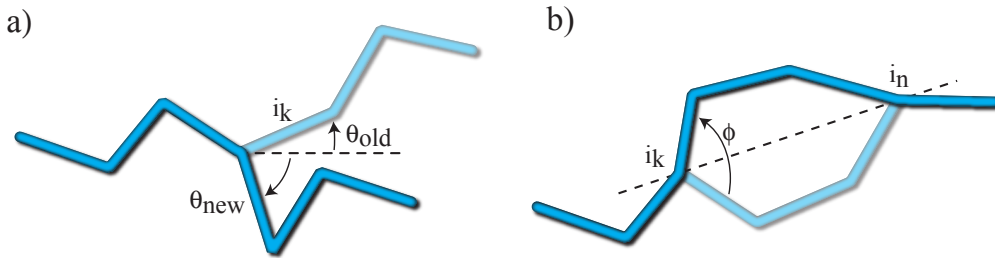


FIG. C.2 – **Déformations de la chaîne** a) Un segment i_k est choisi dans la chaîne. Son orientation θ_{old} par rapport à la direction de la force est modifiée en θ_{old} , le reste de la chaîne restant inchangée. b) Mouvement de Crankshaft : deux noeuds i_k et i_n sont choisis dans la chaîne. Nous opérons une rotation d'un angle ϕ par rapport à l'axe passant par i_k et i_n .

C.4.2 Mouvement de Crankshaft

Ce mouvement classique consiste à faire tourner d'un angle ϕ une partie de la chaîne comprise entre deux noeuds d'indice i_k et i_n autour de l'axe joignant les noeuds i_k et i_n (voir figure C.2b). Ce mouvement ne change pas l'extension la chaîne. ϕ est choisi uniformément dans l'intervalle $[-\delta; \delta]$. δ est réglé pour obtenir un taux d'acceptation de ce mouvement $> 10\%$

C.5 Critère d'acceptation/rejection

Une fois la chaîne modifiée, nous sélectionnons cette configuration avec la probabilité p suivante[80] :

$$p = \min \left(\exp \left(-\frac{(E_{new} - E_{old})}{k_B T} \right), 1 \right) \quad (C.5)$$

où E_{old} et E_{new} sont respectivement les énergies avant et après modification de la chaîne.

C.6 Gestion des erreurs numériques

Périodiquement (toutes les 10000 itérations), nous renormalisons la taille des segments, qui est modifiée par les erreurs numériques lors des mouvements de la chaîne. Nous recalculons alors l'énergie totale de la chaîne.

C.7 Echantillonnage de la molécule d'ADN

La discrétisation de la chaîne entraîne un écart au modèle du ver, qui correspond à la limite $k \rightarrow \infty$. Cependant, comme le montre la figure C.3, l'écart à la courbe force extension n'est vraiment significatif pour $k = 10$ que pour des forces supérieures à quelques piconewtons. Augmenter k réduit l'écart à la courbe théorique.

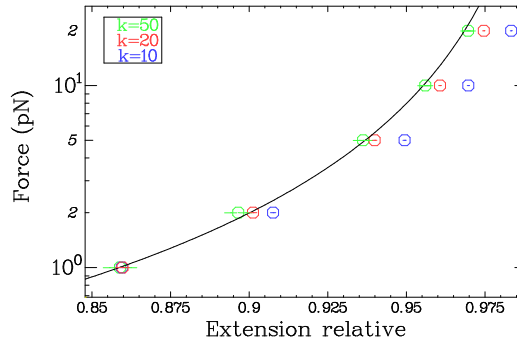


FIG. C.3 – **Effet de la discrétisation sur la précision de la courbe force-extension** Les points représentent les simulations pour différentes valeurs de k . Les barres d'erreur indiquent l'erreur statistique. La courbe noire est le modèle théorique du WLC ($\xi = 51.6\text{nm}$). Le nombre d'itération vaut $N_c = 5.10^6$

Cependant, augmenter k augmente aussi considérablement le temps de calcul (qui croît comme k^2 pour certaines routines que l'on rencontrera par la suite : auto-évitement, calcul de vrille, calcul de l'indice d'enlacement, recherche de noeuds) et le temps de relaxation de la molécule. D'autre part, ces effets sont quasi négligeables pour des forces de l'ordre du piconewtons. En conséquence, nous avons systématiquement utilisé $k = 10$.

C.8 Mesure de vrille et contraintes topologiques

C.8.1 Calcul de vrille W_r

Le calcul de la vrille est fait en utilisant l'algorithme de Vologodskii[136] : celui-ci utilise la formule de Calugareanu appliquée une courbe polygonale.

C.8.2 Indice d'enlacement

L'indice d'enlacement doit être maintenu constant au cours de la simulation de tresses d'ADN. Initialement, il était maintenu en utilisant une implémentation de la formule de Gauss. Cependant, nous nous sommes aperçus que cet invariant n'était pas suffisant pour éviter la formation de noeuds. En conséquence, nous avons utilisé une routine qui calcule le polynôme d'Alexandre pour deux courbes liées[38].

C.8.3 Noeuds

Les polynômes d'Alexandre permettent d'identifier les noeuds qui peuvent se produire au cours de la génération de configurations. Toutes les chaînes qui n'ont pas la bonne topologie sont rejetées[38].

C.9 Contraintes géométriques

C.10 Auto-évitement

Lors de la simulation, la chaîne matérialisant l'ADN ne doit pas être autorisé à s'interpénétrer. A chaque itération, nous testons l'auto-évitement de la chaîne, caractérisé par un paramètre d qui définit le diamètre de la chaîne.

Le diamètre cristallographique de l'ADN est de 2nm. Cependant, la molécule d'ADN est très chargée négativement. Nous tenons compte des interactions électrostatiques en utilisant le concept de diamètre effectif de l'ADN[100, 101]. Celui-ci dépend de la concentration et de la nature des sels présents dans la solution. Le tableau C.2 résume les différentes valeurs utilisées au cours de cette thèse[101].

Concentration saline	diamètre effectif (nm)
10 mM Na+	15
20 mM Na+	11
100 mM Na+	6
200 mM Na+	5
100 mM Na+ 5 mM Mg2+	4.2

TAB. C.2 – *Diamètre effectif en fonction de la nature et de la concentration saline*

Si le test de l'auto-évitement n'est pas nécessaire dans le cas de molécules relâchées de quelques microns[120], il l'est en revanche dans le cas où il y a des structures compactes d'ADN (plectonèmes ou tresses), les effets de volume-exclu n'étant alors plus négligeables. En conséquence, nous l'avons utilisé dans le cas des tresses d'ADN et des molécules super-enroulées.

C.10.1 Murs

L'expérience de micromanipulation implique que la ou les molécules d'ADN restent confinées entre le plan de la surface et le plan de la bille magnétique. Dans la simulation, nous aussi imposons

des "murs" définis par les extrémités de la chaîne :

$$\forall i \quad z_1 \langle z_i \rangle z_{N+1} \quad (\text{C.6})$$

où z_i est la coordonnée associée à la direction de la force. Toute configuration générée qui ne vérifie pas cette condition est rejetée.

Ces murs entraînent une déviation importante de l'extension de la molécule pour les faibles extensions $\langle z \rangle / L < 0.25$, due à une répulsion entropique exercée par la molécule (voir la figure C.4). L'extension typique à zéro force est donnée par la formule de la marche aléatoire, et croît donc comme $L^{0.5}$. En conséquence, $\langle z \rangle / L$ à force nulle diminue comme $L^{-0.5}$ [131]. L'effet de ces murs donc est d'autant plus sensible que les molécules sont courtes.

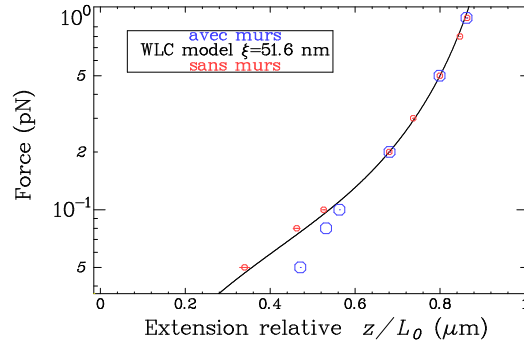


FIG. C.4 – **Effet des murs sur la courbes force-extension** Les points représentent les simulations avec et sans murs (respectivement les points bleus et rouges). Les barres d'erreur indiquent l'erreur statistique. La courbe noire est le modèle théorique du WLC ($\xi = 51.6 \text{ nm}$). Le nombre d'itération vaut $N_c = 5.10^6$

C.10.2 Distance entre molécules

Les mouvements de chaîne, s'ils garantissent la micro-réversibilité, ne permettent de garder la distance entre les extrémités supérieures de la chaîne. C'est pourquoi nous ajoutons dans l'énergie un potentiel harmonique :

$$E = k \left(\vec{V} - \vec{V}_0 \right)^2 \quad (\text{C.7})$$

où $\vec{V}$ et $\vec{V}_0$ sont les vecteurs joignant les extrémités de la chaîne respectivement pour la configuration courante et la configuration initiale. k est choisi de telle sorte que les variations typiques de distance soient plus petites que 5%.

C.11 Juxtaposition et calculs d'angles entre segments

Nous considérons que deux segments sont juxtaposés lorsque deux points de la chaîne sont plus proche qu'une certaine distance d . Lorsque c'est le cas, nous calculons l'angle entre les segments juxtaposés.

C.12 Optimisation

C.12.1 Complexité des routines

Le calcul de writhe, de l'indice d'enlacement, des noeuds, de l'auto-évitement, ou de la juxtaposition sont des routines de complexité n^2 (n étant le nombre de segments dans la chaîne). Ce sont elles qui limitent la vitesse de calcul.

Si l'auto-évitement et le calcul de juxtaposition peuvent être optimisés facilement (de sorte que toutes les paires de segments ne sont pas évaluées), les calculs liés à la topologie le sont difficilement. Par contre, certains tests, comme le calcul des noeuds, n'ont pas besoin d'être effectués à chaque itération, car la fréquence d'apparition d'un noeud est faible. En conséquence, le test des noeuds est fait toutes les 1000 ou 10000 itérations, ce qui accélère la procédure.

Les tests discriminatoires pour les configurations nouvellement générés sont effectués dans l'ordre du plus rapide au plus lent.

C.12.2 Temps de relaxation

Le processus de génération de configurations implique que celles-ci sont très proches dans l'espace des phases. L'extension z et l'énergie sont donc des signaux fortement corrélés.

Pour estimer le nombre N_C nécessaires pour obtenir des configurations décorréliées, nous avons utilisé une méthode basée sur le calcul de l'erreur sur l'extension moyenne $\langle z \rangle$, qui est décrite dans [36]. Nous calculons itérativement l'erreur sur $\langle z \rangle$ en utilisant des *bin* de taille croissante N_b (correspondant à $10000N_b$ itérations). Pour des données corrélées, l'erreur sur $\langle z \rangle$ augmente avec la taille du *bin* et devient indépendant de N_b lorsque les données se décorrèlent. Cette méthode donne ainsi une estimation du nombre d'itérations corrélées N_C .

En conséquence, pour obtenir un ensemble statistiquement représentatif de configurations relaxées indépendantes, nous avons choisi que le nombre total d'itérations N_t vérifie :

$$N_t > 100N_C$$

C.13 Interface et programmation

Le programme, écrit en Fortran, a été interfacé en utilisant une combinaison de Macromedia Flash MX et de SWFKit 1.05 pour suivre l'évolution de la simulation. Les molécules sont exportées en VRML, qui permet une exploration 3D des structures à l'aide d'un plugin pour navigateur internet quelconque.

Les programmes ont tourné sur des PC d'environ 2 GHz. Le temps typique de calcul pour obtenir une collection de configurations est de l'ordre quelques heures.

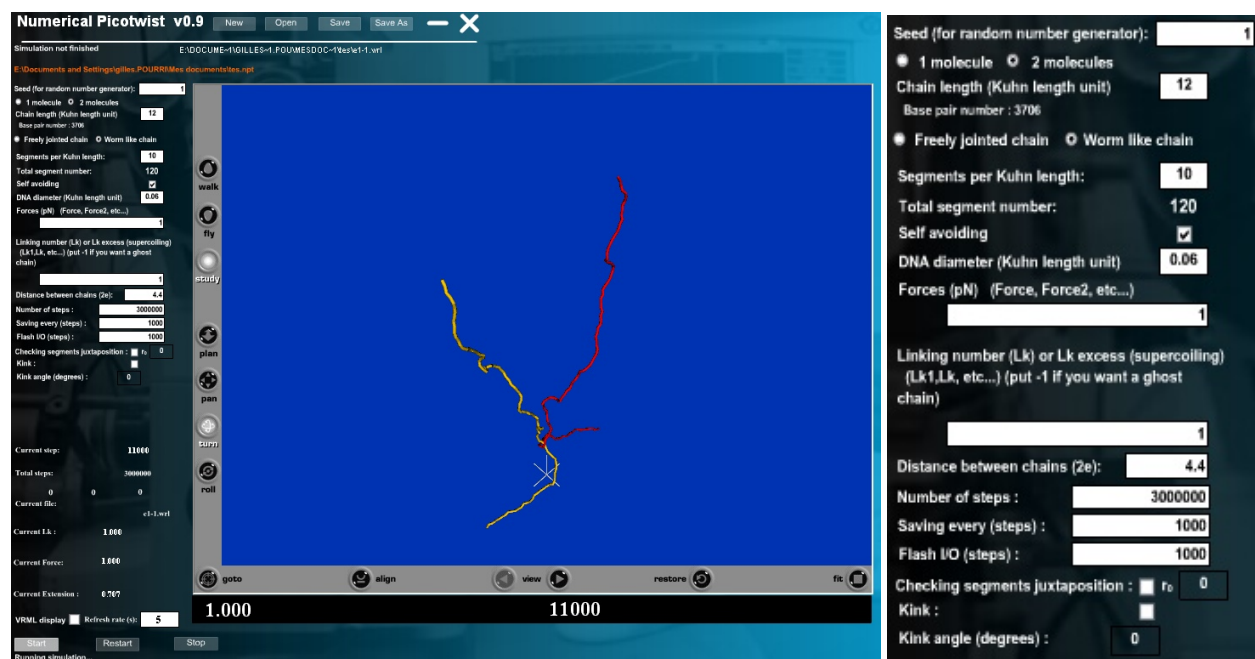


FIG. C.5 – Interface du programme *A gauche, la fenêtre principale. A droite, un détail du menu utilisateur.*



Bibliographie

- [1] D.E. Adams, E.M. Shekhtman, E.L. Zechiedrich, M.B. Schmid, and N.R. Cozzarelli. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, 71:277–288, 1992.
- [2] J.-F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette. Stretched and overwound DNA form a Pauling-like structure with exposed bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:14152–14157, 1998.
- [3] F. Amblard, B. Yurke, A. Pargellis, and S. Leibler. A magnetic manipulator for studying local rheology and micromechanical properties of biological system. *Rev. Sci. Instrum.*, 67(2):1–10, 1996.
- [4] O.T. Avery, C.M. McLeod, and M. McCarty. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the pneumococcal types. *J. Exp. Med.*, 49:137–158, 1944.
- [5] C. L. Baird, M. S. Gordon, D. M. Andrenyak, J. F. Marecek, and J. E. Lindsley. The ATPase reaction cycle of yeast DNA topoisomerase II. slow rates of ATP resynthesis and P(i) release. *J Biol Chem*, 276(30):27893–8, 2001.
- [6] C. L. Baird, T. T. Harkins, S. K. Morris, and J. E. Lindsley. Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24):13685–90, 1999.
- [7] W. Bauer, H. Crick, and J. White. Supercoiled DNA. *Am Sci.*, 243:100–113, 1980.
- [8] J. Bednar, P. Furrer, A. Stasiak, J. Dubochet, E. Egelman, and A. BatetSrich. The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during couterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. *J. Mol. Bio.*, 235:825–847, 1994.
- [9] J.M. Berger, S.J. Gamblin, S.C. Harrison, and J.C. Wang. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, 379:225–232, 1996.
- [10] T.C. Boles, J.H. White, and N.R. Cozzarelli. Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.*, 213:931–951, 1990.
- [11] C. Bouchiat and M. Mézard. Elasticity theory of a supercoiled DNA molecules. *Phys. Rev. Lett.*, 80:1556–1559, 1998.
- [12] C. Bouchiat, M.D. Wang, S. M. Block, J.-F. Allemand, T.R. Strick, and V.Croquette. Estimating the persitence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys. J.*, 76:409–413, 1999.
- [13] Z. Bryant, M. D. Stone, J. Gore, S. B. Smith, N. R. Cozzarelli, and C. Bustamante. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*, 424(6946):338–41, 2003.
- [14] D. A. Burden and N. Osherooff. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1400(1-3):139–54, 1998.
- [15] G. Calugareanu. L'intégrale de gauss et l'analyse des noeuds tridimensionnels. *Rev. Mat. Pur. Appl.*, 4:5–20, 1959.
- [16] C. Cantor and P Schimmel. *Biophysical Chemistry, Part III: The Behaviour of Biological Macromolecules*. San Francisco: W H Freemann, 1980.
- [17] J. J. Champoux. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, 70:369–413, 2001.

- [18] JJ Champoux and MD Been. *Topoisomerases and the swivel problem*. New York: Academic, alberts b edition, 1980.
- [19] G. Charvin, V. Croquette, and D. Bensimon. On the relation between noise spectra and the distribution of time between steps for single molecular motors. *Single Molecule*, 3(1):43–48, 2002.
- [20] G. Charvin, V. Croquette, and D. Bensimon. Single molecule study of dna unlinking by eukaryotic and prokaryotic type II topoisomerases. *PNAS*, 100(17):9820–9825, 2003.
- [21] G. Charvin, T.R. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon. Twisting DNA: single molecules studies. in press.
- [22] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. DNA: an extensible molecule. *Science*, 271:792–794, 1996.
- [23] R. Craigie and K. Mizuuchi. Role of dna topology in mu transposition: mechanism of sensing the relative orientation of two dna segments. *Cell*, 45(6):793–800, 1986.
- [24] N. Crisona, T.R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, and N. Cozzarelli. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E.coli topoisomerase VI in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & Developement*, 14:2881–2892, 2000.
- [25] N. H. Dekker, V. V. Rybenkov, M. Duguet, N. J. Crisona, N. R. Cozzarelli, D. Bensimon, and V. Croquette. The mechanism of type ia topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19):12126–31, 2002.
- [26] R.J. DiGate and K.J. Marians. Identification of a potent decatenating enzyme from *e. coli*. *J. Biol. Chem.*, 263:13366–13373, 1988.
- [27] M. Doi and S.F. Edwards. *The theory of polymer dynamics*. Clarendon Press, Oxford, 1986.
- [28] R. Dulbecco and M. Vogt. Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 50:236–243, 1963.
- [29] O. Espeli, C. Levine, H. Hassing, and K. J. Marians. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *e. coli*. *Mol Cell*, 11(1):189–201, 2003.
- [30] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 94:11935–11940, 1997.
- [31] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal*, 72:1541–1555, 1997.
- [32] L. Finzi and J. Gelles. Measurement of lactose repressor-mediated loop formation and breakdown in single DNA molecules. *Science*, 267:378–380, 1995.
- [33] F.B. Füller. The writhing number of a space curve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:815–819, 1971.
- [34] E.L. Florin, V.T. Moy, and H.E. Gaub. Adhesion force between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264:415–417, 1994.
- [35] P. Flory. *Principles of polymer chemistry*. Cornell Univ. Press, Ithaca, 1975.
- [36] H. Flyvbjerg and H. G. Petersen. Error-estimates on averages of correlated data. *Journal of Chemical Physics*, 91(1):461–466, 1989.
- [37] M.D. Frank-Kamenetskii, A.V. Lukashin, V.V. Anshelevich, and A.V. Vologoskii. Torsional and bending rigidity of the double helix from data on small DNA rings. *J. Biom. Struc. Dyn.*, 2(5):1005–1012, 1985.
- [38] M.D Frank-Kamenetskii and A.V. Vologodskii. Topological aspects of the physics of polymers: the theory and its biological applications. *Sov. Phys. Usp.*, 24(8):679–696, 1981.
- [39] S. E. Franklin and R. G. Gosling. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171(4356):740–1, 1953.
- [40] S.J. Froelich-Ammon and N. Osheroff. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.*, 270:21429–21432, 1995.

- [41] M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(11):3872–6, 1976.
- [42] P.G. de Gennes. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca, new york, cornell university press edition, 1979.
- [43] C. Gosse and V. Croquette. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J*, 82(6):3314–29, 2002.
- [44] O. Guipaud, E. Marguet, K.M. Noll, C. Bouthier de la Tour, and P. Forterre. Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium *thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 94:10606–10611, 1997.
- [45] T.T. Harkins, T.J. Lewis, and J.E. Lindsley. Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry*, 37:7299–7312, 1998.
- [46] T.T. Harkins and J.E. Lindsley. Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 1. A DNA-dependent burst in ATP hydrolysis. *Biochemistry*, 37:7292–7298, 1998.
- [47] F. G. Harmon, J. P. Brockman, and S. C. Kowalczykowski. Recq helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III. *J Biol Chem*, 278(43):42668–78, 2003.
- [48] A. D. Hershey and M. Chase. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*, 36(1):39–56, 1952.
- [49] H. Hiasa, R. J. DiGate, and K. J. Marians. Decatenating activity of escherichia coli dna gyrase and topoisomerases i and iii during oric and pbr322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem*, 269(3):2093–9, 1994.
- [50] H. Hiasa, R.J. DiGate, and K.J. Marians. to find. *J. Biol. Chem.*, 269:2093–2099, 1994.
- [51] H. Hiasa and K. J. Marians. Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type dna replication. *J Biol Chem*, 269(51):32655–9, 1994.
- [52] H. Hiasa and K.J. Marians. Two distinct modes of strand unlinking during θ -type DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 271:21529–21535, 1996.
- [53] J. J. Hopfield. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(10):4135–9, 1974.
- [54] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada, and T. Yanagida. Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro. *Nature*, 352:301–306, 1991.
- [55] S.C. Kampranis, A.D. Bates, and A. Maxwell. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 96:8414–8419, 1999.
- [56] S.C. Kampranis and A. Maxwell. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93:14416–14421, 1996.
- [57] J. Kato, Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *e. coli*. *Cell*, 63:393–404, 1990.
- [58] A. B. Khodursky, B. J. Peter, M. B. Schmid, J. DeRisi, D. Botstein, P. O. Brown, and N. R. Cozzarelli. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of dna microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17):9419–24, 2000.
- [59] K. Kirkegaard and J.C. Wang. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J. Mol. Biol*, 185:625–637, 1985.
- [60] K. Klenin, J. Langowski, and A. Vologodskii. Computational analysis of the chiral action of type II DNA topoisomerases. *J. Mol. Biol.*, 320:359–367, 2002.
- [61] K. V. Klenin, A. V. Vologodskii, V. V. Anshelevich, A. M. Dykhne, and M. D. Frank-Kamenetskii. Computer simulation of DNA supercoiling. *J Mol Biol*, 217(3):413–9, 1991.

- [62] L. V. Laursen, L. Bjergbaek, J. M. Murray, and A. H. Andersen. Recq helicases and topoisomerase iii in cancer and aging. *Biogerontology*, 4(5):275–87, 2003.
- [63] M.P. Lee, M. Sauder, and T. Hsieh. Nuclease protection by *drosophila* DNA topoisomerase II: enzyme/DNA contacts at the strong topoisomerase II cleavage sites. *J. Biol. Chem*, 264:21779–21787, 1989.
- [64] J.F. Léger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko. RecA binding to a single double-stranded DNA molecule: a possible role of DNA conformational fluctuations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:12295–12296, 1998.
- [65] J.F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko. Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule. *Phys. Rev. Lett.*, 83:1066–1069, 1999.
- [66] G. Lia, D. Bensimon, V. Croquette, J. F. Allemand, D. Dunlap, D. E. Lewis, S. Adhya, and L. Finzi. Supercoiling and denaturation in gal repressor/heat unstable nucleoid protein (HU)-mediated DNA looping. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20):11373–7, 2003.
- [67] J. E. Lindsley and J. C. Wang. Study of allosteric communication between protomers by immunotagging. *Nature*, 361(6414):749–50, 1993.
- [68] J.E. Lindsley and J.C. Wang. On the coupling between ATP usage and DNA transport by yeast DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem*, 268:8096–8104, 1993.
- [69] L.F. Liu, R.E. Depew, and J.C. Wang. Knotted single-stranded DNA rings: a novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with *escherichia coli* ω protein. *J. Mol. Biol.*, 106:439–452, 1976.
- [70] L.F. Liu, C.C. Liu, and B.M. Alberts. T4 DNA topoisomerase: a new ATP-dependent enzyme essential for initiation of T4 bacteriophage DNA replication. *Nature*, 281:456–461, 1979.
- [71] L.F. Liu, T.C. Rowe, L. Yang, K.M. Tewey, and G.L. Chen. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.*, 258:15365–15370, 1983.
- [72] I. Lucas, T. Germe, M. Chevrier-Miller, and O. Hyrien. Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *Embo J*, 20(22):6509–19, 2001.
- [73] J.F. Marko. Stretching must twist DNA. *Europhys. Lett.*, 38:183–188, 1997.
- [74] J.F. Marko. Supercoiled and braided DNA under tension. *Phys. Rev. E*, 55:1758–1772, 1997.
- [75] J.F. Marko. Coupling of intramolecular and intermolecular linkage complexity of two DNAs. *Phys. Rev. E*, 59(1):900–912, 1999.
- [76] J.F. Marko and E. Siggia. Statistical mechanics of supercoiled DNA. *Phys. Rev. E*, 52(3):2912–2938, 1995.
- [77] J.F. Marko and E. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.
- [78] J.F. Marko and E.D. Siggia. Fluctuations and supercoiling of DNA. *Science*, 265:506–508, 1994.
- [79] M. Meselson and F. W. Stahl. The replication of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 23:9–12, 1958.
- [80] N. Metropolis, A. Rosenbluth, M. Rosenbluth, and A. Teller. Simulated annealing. *J. Chem. Phys.*, 21:1087–1092, 1953.
- [81] M.J. Schnitzer and S.M. Block. Statistical kinetics of processive enzymes. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology*, LX:793–801, 1995.
- [82] M. Morange. *Histoire de la Biologie Moléculaire*. Paris, 1994.
- [83] J.D. Moroz and P. Nelson. Entropic elasticity of twist-storing polymers. *Macromolecules*, 31:6333–6347, 1998.
- [84] J.D. Moroz and P. Nelson. Torsional directed walks, entropic elasticity and DNA twist stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 94:14418–14422, 1998.
- [85] J. Ninio. Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie*, 57(5):587–95, 1975.

- [86] N. Osheroff. Role of the divalent cation in topoisomerase II mediated reactions. *Biochemistry*, 26:6402–6406, 1987.
- [87] N. Osheroff, E.R. Shelton, and D.L. Brutlag. DNA topoisomerase II from *drosophila melanogaster*: relaxation of supercoiled DNA. *J. Biol. Chem.*, 258:9536–9543, 1983.
- [88] N. Osheroff and E.L. Zechiedrich. Calcium-promoted DNA cleavage by eukaryotic topoisomerase II: trapping the covalent enzyme-DNA complex in an active form. *Biochemistry*, 26:4303–4309, 1987.
- [89] B.J. Peter, C. Ullsperger, H. Hiasa, K.J. Marians, and N.R. Cozzarelli. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell*, 94:819–827, 1998.
- [90] L. Postow, N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy, and N. R. Cozzarelli. Topological challenges to DNA replication: Conformations at the fork. *PNAS*, 98(15):8219–8226, 2001.
- [91] M.R. Redinbo, L. Stewart, P. Kuhn, J.J. Champoux, and W.G.J. Hol. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, 279:1504–1513, 1998.
- [92] R.J. Reece and A. Maxwell. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol.*, 26:335–375, 1991.
- [93] A. Revyakin, R. H. Ebright, and T. R. Strick. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: Detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004.
- [94] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H.E. Gaub. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, 275:1295–1297, 1997.
- [95] J. Roca, J.M. Berger, S.C. Harrison, and J.C. Wang. DNA transport by a type II topoisomerase: Direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93:4057–4062, 1996.
- [96] J. Roca and J.C. Wang. The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerase. *Cell*, 71:833–840, 1992.
- [97] J. Roca and J.C. Wang. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate model. *Cell*, 77:609–616, 1994.
- [98] M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, V. I. Katunin, and W. Wintermeyer. Hydrolysis of gtp by elongation factor g drives trna movement on the ribosome. *Nature*, 385(6611):37–41, 1997.
- [99] M. Rossetto-Giaccherino. *Mécanique statistique des systèmes sous contrainte: topologie de l'ADN et simulations électrostatiques*. PhD thesis, Université Paris VI, 2002.
- [100] V.V. Rybenkov, N.R. Cozzarelli, and A.V. Vologodskii. Probability of DNA knotting and the effective diameter of the DNA double-helix. *PNAS*, 90:5307–5311, 1993.
- [101] V.V. Rybenkov, N.R. Cozzarelli, and A.V. Vologodskii. The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling. *Nucl. Ac. Res.*, 25(7):141–1418, 1997.
- [102] V.V. Rybenkov, C. Ullsperger, A.V. Vologodskii, and N.R. Cozzarelli. Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science*, 277:690–693, 1997.
- [103] W. Saenger. *Principle of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, 1988.
- [104] M. Sander and T. Hsieh. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 258:8421–8428, 1983.
- [105] D. Schaefer, J. Joanny, and P. Pincus. Dynamics of semiflexible polymers in solution. *Macromolecules*, 13:1280–1289, 1980.
- [106] J. B. Schwartzman and A. Stasiak. A topological view of the replicon. *EMBO Rep*, 5(3):256–61, 2004.
- [107] E.R. Shelton, N. Osheroff, and D.L. Brutlag. DNA topoisomerase II from *drosophila melanogaster*: purification and physical characterization. *J. Biol. Chem.*, 258:9530–9535, 1983.

- [108] C. Skouboe, L. Bjergbaek, V. H. Oestergaard, M. K. Larsen, B. R. Knudsen, and A. H. Andersen. A human topoisomerase II alpha heterodimer with only one ATP binding site can go through successive catalytic cycles. *J Biol Chem*, 278(8):5768–74, 2003.
- [109] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 271:795–799, 1996.
- [110] S.B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258:1122–1126, 1992.
- [111] J.R. Spitzer and M.T. Muller. A consensus esquence for cleavage by vertebrate topoisomerase II. *Nucleic Acids Res.*, 16:5533–5556, 1988.
- [112] K.S. Srivenugopal, D. Lockshon, and D.R. Morris. *E. coli* DNA Topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry*, 23:1899–1906, 1984.
- [113] L. Stewart, M.R. Redinbo, X. Qiu, and W.G.J. Hol. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, 279:1534–1541, 1998.
- [114] D. Stigter. Interactions of highly charged colloidal cylinders with applications to double-stranded DNA. *Biopolymers*, 16(7):1435–48, 1977.
- [115] M. D. Stone, Z. Bryant, N. J. Crisona, S. B. Smith, A. Vologodskii, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli. Chirality sensing by escherichia coli topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15):8654–9, 2003.
- [116] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette. The behavior of supercoiled DNA. *Biophys. J.*, 74:2016–2028, 1998.
- [117] T. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271:1835 –1837, 1996.
- [118] T. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. Micro-mechanical measurement of the torsional modulus of DNA. *Genetica, proceedings of NATO ARW on "Structural Biology and Functional Genomics"*, (1998), 106:57–62, 1999.
- [119] T. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Homologous pairing in streched supercoiled DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 95:10579–10583, 1998.
- [120] T R Strick, M-N, Dessinges, G Charvin, N H Dekker, J-F Allemand, D Bensimon, and V Croquette. Stretching of macromolecules and proteins. *Rep. Prog. Phys.*, 66:1–45, 2003.
- [121] T.R Strick. *Enroulement mécanique de l'ADN et relaxation par les topoisomérases*. PhD thesis, Université Paris 6, 1999.
- [122] T.R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404:901–904, 2000.
- [123] A. Sugino, N. P. Higgins, P. O. Brown, C. L. Peebles, and N. R. Cozzarelli. Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(10):4838–42, 1978.
- [124] K. Svoboda and S. Block. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:247–285, 1994.
- [125] B. Thomsen. Characterization of the interaction between topoisomerase II and DNA by transcriptional footprinting. *J. Mol. Biol.*, 215:237–244, 1990.
- [126] S. Trigueros, J. Salceda, I. Bermudez, X. Fernandez, and J. Roca. Asymmetric removal of supercoils suggests how topoisomerase II simplifies DNA topology. *J Mol Biol*, 335(3):723–31, 2004.
- [127] C. Ullsperger and N.R. Cozzarelli. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 271:31549–31555, 1996.
- [128] J. Vinograd, J. Lebowitz, R. Radloff, R. Watson, and P. Laipis. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53:1104–1111, 1965.

- [129] K. Visscher, M.J. Schnitzer, and S.M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, 400:184–189, 1999.
- [130] A. Vologodskii. Circular DNA. *OnLine Biophysical Chemistry Textbook*, pages 1–34, 1999.
- [131] A. Vologodskii and J.F. Marko. Extension of torsionally stressed DNA by external force. *Biophys. J.*, 73:123–132, 1997.
- [132] A. V. Vologodskii and N. R. Cozzarelli. Monte carlo analysis of the conformation of DNA catenanes. *J Mol Biol*, 232(4):1130–40, 1993.
- [133] A. V. Vologodskii, W. Zhang, V. V. Rybenkov, A. A. Podtelezhnikov, D. Subramanian, J. D. Griffith, and N. R. Cozzarelli. Mechanism of topology simplification by type ii DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6):3045–9, 2001.
- [134] A.V. Vologodskii and N.R. Cozzarelli. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Ann. Rev. Biop. Biomol. Struct.*, 23:609–643, 1994.
- [135] A.V. Vologodskii and N.R. Cozzarelli. DNA something. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4:372–378, 1994.
- [136] A.V. Vologodskii, A.V. Lukashin, V.V. Anshelevich, and M.D. Frank-Kamenetskii. Fluctuations in superhelical DNA. *Nucleic Acids Research*, 6:967–982, 1979.
- [137] O.N. Voloshin, L. Wang, and R. Daniel Camerini-Otero. Homologous DNA pairing promoted by a 20-amino acid peptide derived from RecA. *Science*, 272:868–872, 1996.
- [138] J. C. Wang. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(6):430–40, 2002.
- [139] J. C. Wang, P. R. Caron, and R. A. Kim. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell*, 62(3):403–6, 1990.
- [140] J.C. Wang. Interaction between DNA and an *escherichia coli* protein ω . *J. Mol. Biol.*, 55:523–533, 1971.
- [141] J.C. Wang. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.*, 31:107–144, 1998.
- [142] J.D. Watson and F.H.C. Crick. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171:964–967, 1953.
- [143] J.D. Watson and F.H.C. Crick. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [144] J.H. White. Self-linking and the gauss integral in higher dimensions. *Am. J. Math.*, 91:693–728, 1969.
- [145] M. H. Wilkins, A. R. Stokes, and H. R. Wilson. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature*, 171(4356):738–40, 1953.
- [146] J. Yan, M. O. Magnasco, and J. F. Marko. Kinetic proofreading can explain the suppression of supercoiling of circular dna molecules by type-ii topoisomerases. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 63(3 Pt 1):031909, 2001.
- [147] J. Yan, M.O. Magnasco, and J.F. Marko. Kinetic proofreading mechanism for disentanglement of DNA by topoisomerases. *Nature*, 401:932–935, 1999.
- [148] H. Yin, M.D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. Block, and J. Gelles. Transcription against an applied force. *Science*, 270:1653–1657, 1995.
- [149] E. L. Zechiedrich, A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley, and N. R. Cozzarelli. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state dna supercoiling in *escherichia coli*. *J Biol Chem*, 275(11):8103–13, 2000.
- [150] E.L. Zechiedrich and N.R. Cozzarelli. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *escherichia coli*. *Genes and Development*, 9:2859–2869, 1995.

Résumé

Au cours de cette thèse, nous avons étudié le fonctionnement des topoisomérases de type II en utilisant un dispositif de micromanipulation de molécules uniques d'ADN. Les topoisomérases sont des enzymes responsables de la régulation de la topologie de l'ADN *in vivo*, en particulier lors de la réplication, la transcription et la condensation des chromosomes.

Dans une première partie, nous introduisons le formalisme topologique nécessaire à la compréhension de la structure adoptée à grande échelle par la molécule d'ADN, puis nous présentons les techniques usuelles qui permettent d'étudier la topologie de ces molécules.

Dans une seconde partie, nous présentons le dispositif de micromanipulation d'ADN que nous avons utilisé. Celui-ci, basé sur l'utilisation de pinces magnétiques, permet de sonder directement les propriétés élastiques en tension et en torsion d'une molécule unique d'ADN, mais aussi d'étudier la caténation ou le tressage de molécules d'ADN. Ainsi, il offre la possibilité d'étudier en temps réel l'activité d'enzymes appelées topoisomérases qui décatènent ou modifient l'état de super-enroulement de l'ADN.

Dans la troisième partie, nous présentons les résultats que nous avons obtenus sur différentes enzymes de la classe des topoisomérases de type II. Nous montrons que les expériences de molécule unique permettent une étude très fine du cycle enzymatique des topoisomérases. Par ailleurs, nous mettons en évidence le fait que la topoisomérase 4 opère une reconnaissance de son substrat, basée sur l'angle entre segments dans un croisement d'ADN. Enfin, nous présentons des expériences qui visent à comprendre les propriétés thermodynamiques particulières de ces enzymes.

Mots clés : ADN, réplication, topoisomérase, molécule unique, pinces magnétiques, mécanisme de correction d'erreur, super-enroulement, cycle enzymatique.

Abstract

We have studied the behaviour of type II topoisomerases using a single DNA molecule micromanipulation setup. topoisomerases are enzymes responsible for regulating DNA topology in the cell, especially during replication, transcription, and chromosome condensation. In the first part of this thesis, we introduce the topological formalism required to understand the structure adopted by DNA molecules in solution. Next, we present the standard techniques used to investigate DNA topology.

In the second part, we present the micromanipulation setup used to conduct experiments. The apparatus is based on a magnetic trap, which allows measurement of the elastic properties (stretching and twisting) of a single DNA molecule. It also permits braiding two DNA molecules around each other. Therefore, it is well suited to study decatenation or relaxation of DNA supercoiling by type II topoisomerases.

In the third part, we relate the results we obtained on different topoisomerase enzymes. We show that single molecule experiments allow detailed analysis of the kinetic cycle of topoisomerases. Furthermore, we investigate and explain the basis of substrate recognition by topoisomerase IV. Finally, we present experiments describing the thermodynamic properties of these enzymes.

Key words: DNA, replication, topoisomerase, single molecule, magnetic trap, proofreading mechanism, supercoiling, enzymatic cycle.