



**HAL**  
open science

# Biophysique des macromolécules uniques et des réseaux d'expression génétiques bactériens

Jerome Robert

► **To cite this version:**

Jerome Robert. Biophysique des macromolécules uniques et des réseaux d'expression génétiques bactériens. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. tel-00265865

**HAL Id: tel-00265865**

**<https://theses.hal.science/tel-00265865>**

Submitted on 20 Mar 2008

**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.

**Jérôme ROBERT**

né le 4-4-1967 à Strasbourg.

adresse professionnelle :

L.P.S.-ENS

24 rue de Lhomond

75005 Paris

Tel. : 0144323590, Fax: 0144323433

Courriel: jerome.robert@lps.ens.fr

**Etudes poursuivies**

•**1995** : *Thèse de Doctorat* effectuée sous la codirection de Pierre Petit et Jean- Jacques André à l'Institut Charles Sadron à Strasbourg, soutenue le 29 septembre 1995.

*Sujet* : Magnétisme des Fullérènes Intercalés : Etude par RPE en Ondes Continue et Pulsée.

•**1992** : *D. E. A.* Physique et Chimie de la Matière Condensée et des Matériaux, option Surfaces et Interfaces, ULP, Strasbourg.

•**1991** : *Maîtrise* de Physique, ULP, Strasbourg.

•**1990** : *Licence* de Physique, ULP, Strasbourg.

•**1989** : *B. T. S* Cinématographie, option Son, mention anglais, Ecole Nationale Louis Lumière, Paris.

•**1987** : *D. E. U. G.* Sciences de la Matière, option Physique, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

**Stages et emplois**

• **Emploi actuel: MC UFR de Physique 925, Université Pierre et Marie Curie Paris VI**

• 2003-2004: *Congé pour reconversion thématique et de recherche*, Rowland Institute at Harvard, Cambridge, Etats Unis d'Amérique chez le Prof. Howard C. Berg.

• 1996-2004 : *MC*, UFR de Sciences Physiques, Université Louis Pasteur I Strasbourg, titularisé en septembre 1997.

•1995-1996: *ATER*, UFR de Sciences Physiques et Institut Charles Sadron, Strasbourg.

•1992-1995: *Moniteur de l'Enseignement Supérieur*.

## Activité d'enseignement

J'ai été Maître de conférences à l'UFR de Sciences Physiques de l'Université Louis Pasteur (ULP) de 1996 à 2004. Mon service d'enseignement a été complet (sauf en 2002/2004) et s'est partagé de la manière suivante:

<b>Année universitaire</b>	<b>Intitulée du service</b>	<b>Commentaires</b>
1996/1997	- <b>TD de Mécanique</b> DEUG 1 <sup>ère</sup> année Bio-Physico-Chimie (3 groupes). - <b>TD de Physique Statistique</b> Licence de Physique et 1 <sup>ère</sup> année Ecole Nationale Supérieure de Physique de Strasbourg (2 groupes). - <b>TP d'Optique</b> en Maîtrise de Physique (12 montages).	-TD de mécanique et TP d'optique déjà assurés en tant qu'ATER. -1 <sup>ère</sup> année de prise en charge des TD de Physique Statistique.
1997/1998	Service idem année précédente.	
1998/1999	Service idem années précédentes.	
1999/2000	- <b>TD de Thermodynamique</b> DEUG 2 <sup>ème</sup> année Chimie et Bio-Physico-Chimie (2 groupes). - <b>TD de Physique Statistique</b> Licence de Physique (1 groupe). - <b>TP d'Optique</b> Maîtrise de Physique.	-1 <sup>ère</sup> année de prise en charge des TD de Thermodynamique. -Arrêt de la prise en charge des TD de mécanique en DEUG 1 <sup>ère</sup> année Chimie, Bio-Physico-Chimie.
2000/2001	- <b>TD de Thermodynamique</b> DEUG (2 groupes). - <b>TP d'Optique</b> en Licence et Maîtrise de Physique.	-Les TP d'optique sont déplacées de la Maîtrise vers la Licence en cours d'année. - Arrêt de la prise en charge des TD de Physique Statistique.
2001/2002	- <b>TD de Thermodynamique</b> DEUG (3 groupes). - <b>TD et TP d'électronique</b> en 1 <sup>ère</sup> année de DEUG Sciences de la matière (1 groupe). - <b>TD physique de la Matière</b> en Maîtrise de Physique (1 groupe). - <b>TP d'Optique</b> . - <b>TP matériaux</b> à l'Ecole Chimie et Polymères de Strasbourg (2 montages).	-Participation à la rénovation des TP électronique DEUG Sciences de la Matière avec 4 enseignants (10 montages). -1 <sup>ère</sup> année de prise en charge des TD de physique de la matière.
2002/2003	<b>TD physique de la Matière</b> (1 groupe).	Année de délégation CNRS.
2003/2004		Congé pour Reconversion Thématique et de Recherche

La politique de l'UFR de Strasbourg incite les enseignants-chercheurs à changer de service d'enseignement tous les 3-5 ans. J'ai suivi cette règle, à l'exception du cas des TP d'Optique de la Maîtrise car il n'y avait pas de remplaçant avant la rentrée 2002.

Suite à ma demande de mutation, j'ai été affecté à l'UFR de Physique 925 de l'UFR de Physique de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI à la rentrée 2004. Je résume dans le tableau suivant mon service d'enseignement depuis cette date.

<b>Année universitaire</b>	<b>Intitulée du service</b>	<b>Commentaires</b>
2004/2005	- <b>TD/TP LP101</b> (Mécanique) L1 - <b>TP LP202</b> (Thermodynamique) L2 - <b>TD LP534</b> (Physique des milieux continus) M1 - <b>TD LP316</b> (Physique Statistique) L3 - <b>Cours/TD/TP LP103</b> (électrocinétique) L1	Première année d'affectation Paris VI
2005/2006	Service idem année précédente.	
2006/2007	Service idem années précédentes	

Par ailleurs, j'ai participé à l'encadrement de stagiaire au laboratoire (hors thèse):

1998: Pierre Gelade, stage de DEA de Physique des Liquides Paris VI, étude de la réponse électrique d'un microtubule.

2000: Thomas Andlauer, stage de 2<sup>ème</sup> année de BTS de Biotechnologie Strasbourg, pratique de la Biologie Moléculaire (6 semaines).

2000: Christian Rick, stage de DEA Physique et Matière Condensée Strasbourg, micromanipulation d'une molécule d'ADN.

2001: Guillaume Duveau, stage de Maîtrise de Physique Strasbourg, initiation à la microscopie en onde évanescente (12 séances).

2002: Nicole Schwender, stage de DEA Physique et Matière Condensée Strasbourg, étude du repliement d'un ARN en cours de transcription.

2003: Jasmine Simon, Pio Jesudoss et Olivier Santin, stage de Maîtrise de Physique Strasbourg, initiation aux pinces optiques et à la microscopie en onde évanescente (12 séances).

2003: Rosa Poetes: stage d'été, initiation à la microscopie en onde évanescente

2004: Juliette Ben Arous: stage de DEA Physique des Liquides Paris VI; Variabilité phénotypiques au sein de populations de bactéries

#### **Participation à l'encadrement de thèse:** (Directeur de thèse Didier Chatenay)

1998-2001: Thierry Marchal, Micromanipulation d'un ARN unique, soutenance Octobre 2003. (Thierry a trouvé un emploi dans l'industrie juste avant la fin de sa thèse, il a entrepris la rédaction d'un manuscrit par la suite.)

1999-2002: Sébastien Harlepp, Etude des structures secondaires de molécules uniques d'ARN post et en cours de transcription, soutenance Juillet 2003.

2002-2003: (Novembre-Mars) Giovanni Romano, Techniques de micro-manipulation pour l'étude des propriétés des molécules uniques d'ADN in vitro, Thèse label européen en co-tutelle Florence/Strasbourg.

2004-: Jérôme Wong, Variabilité du nombre de copie de plasmide dans une population de bactérie *E. Coli*.

#### **Activités Administratives**

De 1997 à 2003, j'ai été membre de la commission de spécialiste 28<sup>ème</sup> section locale à Strasbourg et membre du bureau de cette commission.

De septembre 1998 à septembre 2003, j'ai été membre élu du conseil d'UFR de Sciences Physiques à Strasbourg. J'ai également été membre du bureau du conseil d'UFR au titre de responsable des locaux. Ma responsabilité d'entretien des locaux consistait à faire intervenir des entreprises de rénovation sur les bâtiments gérés par l'UFR (Institut de Physique, Institut de Mécanique des Fluides, deux étages à l'Institut Lebel). En plus de l'entretien courant (Fluides, peinture...), j'ai été chargé de

faire établir des devis par les entreprises titulaires du marché ULP pour la rénovation complète de locaux à l'UFR (Gros œuvres, électricité, réseaux, eau, peinture, sol). Je résume les principaux chantiers mis en œuvre:

Année universitaire	Type de salle	Budget approximatif (TTC)
1998/1999	Deux salles de ressource informatique (rénovation complète)	76 keuros
1999/2000	Salle de cours DESS Système Electronique Intégrés (rénovation complète)	15 keuros
2000/2001	Trois salles de cours + deux salles de TP (peinture uniquement)	11 keuros
2001/2002	-Salle de cours DESS Technique des Matériaux (rénovation complète) + peinture cage d'escalier	19 keuros
	-3 salles d'expériences pour Laurent Bourdieu et Jean-François Léger, chercheurs au laboratoire (rénovation complète aux normes sanitaires pour l'expérimentation animale)	45 keuros
2002/2003	-Vestiaire/douche techniciens (rénovation complète)	7 keuros
	-Salle de cours Informatique (électricité, réseau)	9 keuros

Depuis le mois d'avril 2005, je suis membre du comité éditorial de la revue du CNRS "Les Images de la Physique".

Depuis le mois de juin 2007, je suis membre de la commission de spécialiste 28<sup>ème</sup> section de l'Université Paris VI

## **Activités de Recherche**

### **I. Thèse de Doctorat**

Mon travail de thèse a été dirigé par Jean-Jacques André et Pierre Petit, ICS Strasbourg. Il avait pour sujet l'Etude par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) en ondes continue et pulsée des composés d'intercalation du  $C_{60}$ .

L'intercalation du  $C_{60}$  avec des alcalins conduit à des propriétés diverses de transport électronique. Les composés peuvent être conducteurs, supraconducteurs, semi-conducteurs ou bien isolants en fonction de la stœchiométrie  $C_{60}$ /Alcalin. Le fait que les échantillons sont sous forme de poudre cristallite sensible à l'oxygène rend difficile l'étude directe des propriétés de transport. La RPE est une spectrométrie "sans contact". Elle renseigne (Intensité intégrée et largeur de raie du spectre RPE en onde continue, mesure directe des temps de relaxation spin-spin et spin-réseau en RPE à impulsion) sur les propriétés magnétiques. On peut remonter aux propriétés de transport dans ces composés, notamment en associant les temps de relaxation de spin aux temps de relaxation électronique.

### **II. Biophysique expérimentale**

J'ai effectué un changement de thématique en arrivant au Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes (LDFC), Strasbourg, avec Didier Chatenay et Laurent Bourdieu. A mon arrivée dans ce laboratoire, une première étape de ma reconversion thématique consiste à me familiariser avec la biologie et les techniques expérimentales de biophysique. J'ai participé à 2 thèmes de recherche en cours dans l'équipe (rhéologie de vésicules lipidiques avec Emmanuèle Helfer et micromanipulation d'ADN avec Jean-François Léger) et j'ai démarré une étude exploratoire sur la conductivité des microtubules. De plus, j'ai participé à la réalisation de masques pour la photolithographie utilisés dans la croissance de réseaux de neurones par Laurent Bourdieu. Le but est de réaliser des masques présentant des motifs facilement modifiables mais reproductibles pour la lithographie. Le principe est d'exposer avec des U.V. par le port d'épifluorescence d'un microscope une lamelle recouverte de résine photoresist tout en la déplaçant suivant un motif défini grâce à une platine motorisée contrôlée par ordinateur. Après révélation, la lamelle est recouverte d'une couche de chrome par évaporation sous vide. Elle constitue alors le "négatif" qui permet la production de lamelles traitées pour la culture des neurones.

Ces 2 premières années ont été très riches d'un point de vue de la formation aux techniques de la biophysique, notamment en ce qui concerne les montages de micromanipulation de molécules uniques, et m'ont donné l'occasion de participer à l'ensemble des travaux de l'équipe.

## **1. Participation à l'étude des filaments du cytosquelette.**

### **1.1 Projet de mesure de la conductivité d'un microtubule**

D'un point de vue mesure physique, ce dernier sujet était le plus proche de mes activités antérieures. Ce projet m'a permis de me familiariser avec les protocoles biochimiques de purification et de polymérisation de tubuline, ainsi qu'avec les techniques de microscopie optique de visualisation pour l'observation par vidéomicroscopie en contraste différentiel interférentiel de la tubuline polymérisée sous forme de microtubules. Les essais de mesures électriques ont été réalisés en utilisant un amplificateur de patch-clamp. Ce projet n'a pas été mené au delà du stage de DEA de Pierre Gelade, mais il a permis une première approche des techniques de la biophysique.

### **1.2 Micro-rhéologie de vésicules recouvertes d'actine.**

En parallèle, j'ai travaillé avec Laurent Bourdieu et Emmanuèle Helfer sur les membranes recouvertes d'actine ; l'objectif de ce travail consistait à comprendre comment l'association d'un réseau quasi-2D de filaments biologiques semi-flexibles (F-actine) à des membranes de lipides modifie leur propriété mécanique, au moyen d'une expérience de micromanipulation et de microrhéologie par pinces optiques. Dans un premier temps, ma participation a consisté à construire un banc de mesure de la tension de membrane par aspiration dans un capillaire. Cette technique ne s'est pas révélée efficace pour mesurer les modifications de la rigidité de la membrane lipidique quand elle est recouverte d'actine, essentiellement du fait que le filet d'actine restait collé au capillaire. Par la suite j'ai participé avec Emmanuèle au développement d'un montage de pinces optiques ; ce montage nous a permis de mettre en évidence une importante modification des propriétés mécaniques des membranes lipidiques en présence d'un filet d'actine :

- apparition d'un module de cisaillement  $\sim 10^{-6}$  N/m,
- une forte augmentation du module de courbure ( $\sim 100 k_B T$ ).

En outre, nous avons pu étudier la dépendance en fréquence de ces deux modules ; ils croissent rapidement avec la fréquence, selon des lois de puissance indépendantes du détail microscopique du réseau, démontrant la viscoélasticité de la membrane composite. Enfin pour des déformations de plus grande amplitude, nous avons mis en évidence une instabilité de flambage, qui a pour origine le couplage entre déformations parallèle et perpendiculaire au plan de la membrane.

## **2. Micromanipulation d'une molécule unique d'ADN**

Dans une troisième thématique, j'ai participé avec Didier Chatenay et Jean-François Léger aux expériences de micromanipulation sur une molécule unique d'ADN.

Au cours des cinq à six dernières années, le développement de techniques de mesure de forces et de micromanipulation a permis l'étude de molécules biologiques à l'échelle de la molécule unique. Dans tous ces travaux, en exerçant une force sur une seule molécule, on peut avoir accès à certaines propriétés structurales de ces molécules (dans le cas de l'ADN ou, comme on le verra plus tard, de l'ARN) ou à des propriétés enzymatiques caractérisant un enzyme unique (comme cela est le cas dans l'étude des moteurs moléculaires, tels que la myosine, la kinésine ou la dynéine). On peut moyenner un grand nombre de mesures effectuées sur une molécule et aboutir à l'enveloppe du signal que l'on obtiendrait en faisant une mesure sur un grand nombre de molécules. Mais on ne peut pas faire le chemin inverse, c'est-à-dire qu'il n'est pas possible de revenir au résultat d'une mesure sur une molécule unique à partir du résultat d'une mesure sur un grand nombre de molécules. Par exemple, en moyennant les mesures de force de dénaturation d'une molécule unique d'ARN, on doit obtenir une courbe qui s'apparente au résultat d'une expérience classique de fusion thermique d'une solution millimolaire d'ARN, cette dernière ne permettant jamais de remonter aux détails des structures qui se dénaturent et se renaturent.

Dans tous ces systèmes (molécules d'ADN, d'ARN, interaction enzyme/ADN), les énergies élémentaires en jeu sont typiquement de l'ordre de quelques  $k_B T$  sur des échelles moléculaires autour du nanomètre. Ceci correspond à des forces d'interactions de quelques piconewtons (pN) entre biomolécules. Dans le but de sonder cette gamme de force et de distance, nous avons développé un appareil de mesure basé sur l'utilisation d'une fibre optique comme capteur de force. L'expérience consiste à exercer des déplacements à l'extrémité d'une molécule unique d'acide désoxyribonucléique (ADN) du phage  $\lambda$  par l'intermédiaire d'une bille de latex micrométrique et de mesurer la force résultante engendrée par l'ADN en utilisant une fibre optique amincie à son extrémité. L'ADN est ancré entre la bille et la fibre grâce à des liaisons biochimiques (couple streptavidine/biotine et digoxygénine/antidigoxygénine). Le déplacement imposé est directement mesuré par une cale piezoélectrique dont la résolution en déplacement est subnanométrique. La force est déterminée par la flexion de la fibre optique, en formant l'image de son extrémité sur une photodiode à quadrants grâce à un faisceau laser injecté à l'autre extrémité de la fibre. Suivant l'épaisseur de la fibre, la gamme de force est de l'ordre de  $10^{-12}$ - $10^{-10}$  Newton. Le montage permet de plus d'imposer des contraintes de torsion sur l'ADN (surenroulement). Nous avons pu étudier le comportement élastique de cette molécule en traçant des diagrammes force-extension pour diverses contraintes de surenroulement.

L'ADN est une molécule double brins. L'entité élémentaire d'un brin est un sucre pentose sur lequel est greffé une des quatre bases Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine. Les sucres sont liés par des liaisons covalentes phosphodiester pour former un brin d'ADN. L'ADN adopte sa conformation en double hélice révélée par Watson et Crick grâce aux liaisons hydrogènes qui appairient l'adénine et la thymine (deux liaisons hydrogènes) ou bien la guanine et la cytosine (trois liaisons hydrogènes). L'ancrage des extrémités d'une molécule à la fibre et à la bille de latex est réalisé de manière à ce que les 2 brins soient maintenus. Dans cette configuration, la molécule est contrainte en torsion. Lors des



étapes biochimiques de préparation, des contraintes de cisaillement dues à la manipulation des échantillons peuvent briser une des liaisons covalentes phosphodiester le long d'un des brins de la molécule: malgré le maintien des 2 brins à chaque extrémité, la molécule devient libre en rotation le long de son axe principal.

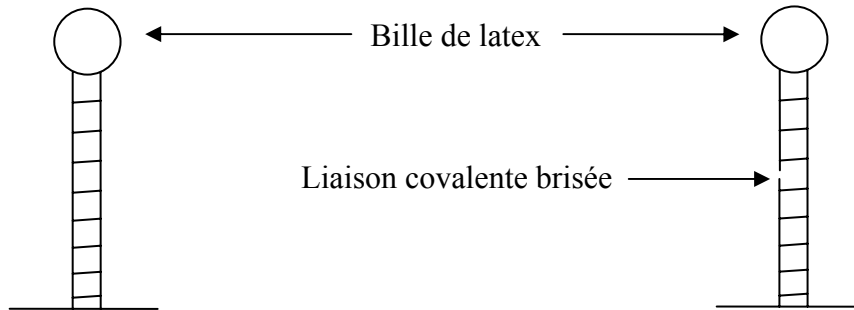


Figure 2.1: Schéma d'une molécule d'ADN contrainte en torsion (gauche) et libre en rotation (droite).

En absence de contrainte de torsion et dans le régime des faibles forces, l'ADN se comporte comme un polymère modèle qui tend à se ramasser en pelote statistique. Aux environs de 70 pN, les premières expériences ont révélé l'existence d'une transition structurale de l'ADN. Elle se manifeste par une surextension, à force constante, d'un facteur 1.7 de la molécule, dont la structure évolue de la forme canonique B-DNA (10.5 bases/tour) vers une forme non résolue surétirée S-DNA. Cette transition est observée dans un premier temps avec des molécules chimiquement libres de tourner autour de l'axe de la double hélice. A la manière d'un ressort en spirale, le B-DNA s'allonge progressivement et se déroule pour aboutir au S-DNA dont le pas de l'hélice est changé. Lorsqu'une molécule d'ADN est bloquée en rotation par des liaisons chimiques, elle présente une transition structurale analogue mais à une force plus élevée (110 pN). En pré-déroulant mécaniquement d'un nombre de tour donné une molécule d'ADN bloquée en rotation, il y a coexistence entre la fraction de la molécule qui transite à basse et à haute force au cours d'une expérience de traction. Il est possible de mesurer le nombre de tour nécessaire à imposer pour que la molécule bloquée en rotation adopte le même diagramme force-extension que celui de la transition B-DNA/S-DNA (figure 2.2). Cette méthode nous a permis de mesurer expérimentalement le pas de l'hélice de la forme S-DNA (21.4 nm soit 36.7 bases/tour).

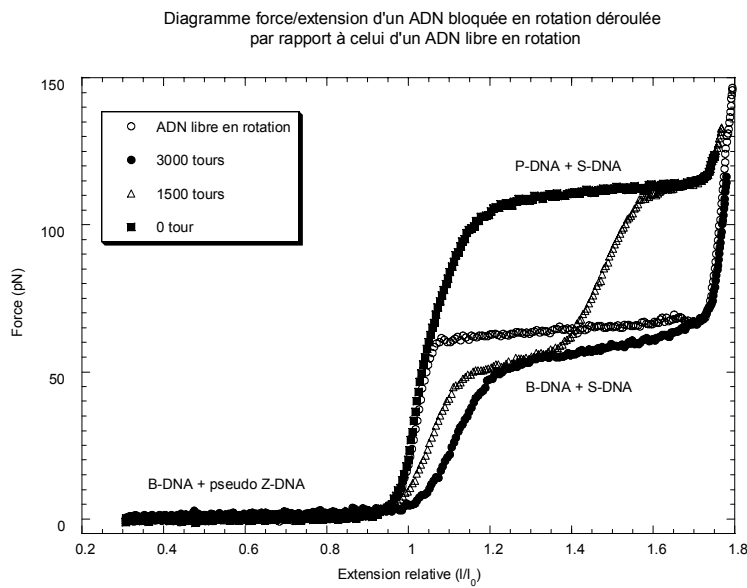


Figure 2.2: Diagramme force/extension d'un ADN bloqué en rotation pré-déroulé de 0, 1500, 3000 tours.

L'étude conjointe des élasticités d'allongement et de rotation de l'ADN a aussi révélé que d'autres structures de l'ADN, hormis le B-DNA et le S-DNA, pouvaient se former tout en nécessitant d'assez faibles apports d'énergie (typiquement quelques  $k_B T$  par paire de bases). Nos résultats ont confirmé l'existence d'une forme d'ADN fortement enroulée avec les bases exposées vers l'extérieur (appelé le P-DNA) déjà étudiée par une équipe de l'ENS. Nous avons suggéré l'existence d'une forme d'ADN enroulée dans le sens inverse de celui du B-DNA, dont la structure s'apparente au Z-DNA. Une description complète des changements de phase impose en plus une structure de P-DNA surenroulée.

En collaboration avec l'équipe de J. Marko à l'Université de Chicago, nous avons proposé une modélisation de ces 4 changements de structure de l'ADN à partir du B-DNA. Dans le cadre du modèle théorique de l'élasticité continue, l'énergie libre de chacune des 5 phases calculée à l'aide de potentiels Gaussiens est représentée dans un plan dont les axes principaux sont l'angle de torsion et la distance interbase de la molécule d'ADN. Les paramètres calculés rendent parfaitement compte des courbes expérimentales de rotation/force-extension.

Le facteur de surextension mesuré lors des expériences de micromanipulation sur le B-DNA bloqué en rotation est très proche de celui induit par la polymérisation in vivo de la protéine RecA autour de la double hélice. Cela suggère un rôle biologique de la forme étirée de l'ADN. Dans le cas de l'interaction RecA/ADN, le but de l'étirement de l'ADN est de faciliter la formation d'ADN triplex, qui est une étape intermédiaire nécessaire à la recombinaison. La recombinaison est une étape où plusieurs molécules d'ADN sont amenées à échanger des tronçons entiers de leur séquence. Nous

avons étudié l'interaction ADN/Protéine RecA à l'aide du montage expérimental de mesure de force décrit ci-dessus.

Des mesures de cinétique de polymérisation de la protéine RecA autour de l'ADN ont été effectuées sur un ADN  $\lambda$  unique. Puisque la polymérisation de RecA allonge l'ADN, une boucle de rétroaction est appliquée sur le montage de micromanipulation pour réaliser les mesures à force constante : en maintenant la force constante (i.e. la déflexion de l'extrémité de la fibre optique) la polymérisation de RecA le long de l'ADN se traduit par un déplacement progressif de l'extrémité de l'ADN liée au système de déplacement piézoélectrique, qui compense ainsi l'allongement de l'ADN. La vitesse de polymérisation croît avec la force appliquée jusqu'à environ 50 pN. De façon plus étonnante nous avons observé que RecA polymérise également sur le S-DNA (i.e. pour des forces appliquées à l'ADN au dessus de 60 pN). Dans cette gamme de force (60-110 pN), la protéine raccourcit l'ADN. Le rôle de la flexibilité de l'ADN est démontré dans l'accroissement des cinétiques avec des molécules dont la séquence est riche en base A et T. En effet les 2 liaisons hydrogènes qui lient les bases A=T entraînent un module d'Young globalement plus faible pour ces molécules que pour celles dont la composition est en proportion égale en liaison A=T et G=C. Elles nécessitent une force plus faible à étirement égale. A l'aide de la collaboration sur le plan théorique de J. Marko, un modèle d'interaction basé uniquement sur les fluctuations thermiques de conformation de l'ADN est proposé pour expliquer l'accrochage et la polymérisation de RecA. Ce modèle est issu du constat expérimental suivant: d'après l'observation du plateau de surextension de l'ADN en l'absence de protéine (figure 2.2) la transition structurale de la forme B-ADN vers S-ADN nécessite quelques  $k_B T$  par paire de bases. On déduit que les fluctuations thermiques suffisent à faire transiter des portions locales de la molécule de la forme B-ADN vers la forme S-ADN. La protéine RecA interagit avec la portion surétendue de manière thermique de la molécule d'ADN et bloque la structure allongée de cette dernière.

Ce mécanisme d'interaction peut être généralisé et peut expliquer comment la reconnaissance d'une séquence précise sur l'ADN peut se faire en exploitant les propriétés dynamiques locales de la séquence sans recourir à l'ouverture de la double hélice pour avoir un accès direct à la séquence des bases.

## Structural Transitions of a Twisted and Stretched DNA Molecule

J. F. Léger,<sup>1</sup> G. Romano,<sup>1</sup> A. Sarkar,<sup>2</sup> J. Robert,<sup>1</sup> L. Bourdieu,<sup>1</sup> D. Chatenay,<sup>1</sup> and J. F. Marko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*L.D.F.C., UMR CNRS 7506 and Université Louis Pasteur, Institut de Physique, 3 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France*

<sup>2</sup>*Department of Physics, MC 273, University of Illinois, 845 West Taylor Street, Chicago, Illinois 60607-7059*

(Received 10 December 1998)

We report results of a micromanipulation study of single double-helical DNA molecules at forces up to 150 pN. Depending on whether the DNA winding is allowed to relax, or held fixed, qualitatively different structural transitions are observed. By studying the transitions as a function of winding the different DNA structures underlying them are characterized; this allows us to report the first estimate of *S*-DNA helicity. A model is introduced to describe these transitions; in addition to *B*-DNA, we find that four DNA states are needed to describe the experiments.

PACS numbers: 87.14.Gg, 36.20.Ey, 64.90.+b

Development of techniques to apply picoNewton forces to single biomolecules has led to study of the elasticity of single double-stranded DNAs (dsDNA). DNA is remarkably flexible: it can be stretched in excess of 1.7 times its (Watson-Crick) *B*-form length [1,2]. The twisting of a dsDNA may also be controlled, and it has been shown that DNA may be undertwisted or overtwisted by several times its natural helicity of one turn per 10.5 base pairs (bp) [3–5]. As DNA is stretched and/or twisted, it can transform to new states, some of which are relevant to specific DNA-protein interactions [6].

The first new state discovered by micromanipulation experiments, *S*-form, was obtained by stretching DNA to 1.7 times its *B*-form length [1,2]. Another new state of DNA (*P*-form) was later discovered in stretching-twisting experiments [5]; *P* is supposed to have exposed bases outside of a double phosphodiester backbone. Many questions concerning these transitions remain unanswered. Is *S*-DNA completely untwisted (like a ladder) or helical? What is the phase diagram of a single dsDNA subjected to both stretching and twisting? Our aim here is to address these questions with experimental results interpreted with the help of a simple statistical-mechanical model.

In our experimental setup, a  $\lambda$ -EMBL3 dsDNA (44 kb; *B*-form length  $L_0 \approx 15.1 \mu\text{m}$ ) is linked at one end to a small dsDNA fragment (700 bp), each strand of which has  $\approx 25$  biotin labeled bases. The other end is linked to a similar dsDNA fragment containing digoxigenin labeled bases (details of dsDNA preparation are published elsewhere [6]). With these functionalized ends, the molecule can be attached with its biotinylated end on a Streptavidin coated bead (3  $\mu\text{m}$  diameter), and with its other end, on an antidigoxigenin-coated optical fiber acting as a force transducer. This is all immersed in 100 mM phosphate buffer at pH 7.4 with 500 mM of added NaCl. Force-extension measurements are done with a previously described setup [6]: a micropipette mounted on a piezoelectric translator holds the bead by suction and imposes fixed extension to the molecule; the stretched molecule exerts a force on the optical fiber and deflects it. A laser beam going through

the fiber, focused on a two-quadrant detector with a 40 $\times$  microscope objective, allows the deflection (proportional to the tension in the molecule) to be recorded. Rotating the micropipette around the micropipette-dsDNA molecule common axis changes DNA winding. Since both strands at each end of the molecule are attached to either optical fiber or bead, the DNA is torsionally constrained.

Torsional constraint of the molecule ends constrains the linking number *Lk* of the two strands of the DNA. *Lk* is the sum of the twist (*Tw*, the number of times one phosphodiester backbone wraps locally about the other) and the writhe (*Wr*, the average number of nonlocal self-crossings of the double helix) [7]:

$$Lk = Tw + Wr.$$

An experiment begins with capture of a bead, on which a single dsDNA is grafted with *Lk* close to its natural number of helical turns,  $Lk = Lk_0 = Tw_0 \approx 4200$ . Each micropipette turn changes *Lk* by  $\pm 1$ . We may describe linkage in terms of fraction of turns added or removed:

$$\sigma = \frac{Lk - Lk_0}{Lk_0}.$$

Rotation of the micropipette at zero extension selects  $\sigma$ ; then a force-extension measurement is done. Many of the excess turns are stored as *Wr* when the molecule is unextended (e.g., as plectonemic supercoils); as the molecule is stretched, *Wr* is converted into *Tw*. For high extension, the *Tw* of an extended (and thus unwrithe) dsDNA) is essentially under experimental control.

Some molecules had broken covalent bonds in their backbones (“nicks”); such molecules are not under torsional constraint. Nicked molecules behave qualitatively differently from unnicked molecules since they may torsionally relax as they are stretched. Figure 1 shows the force versus extension for a nicked DNA. As previously observed [1], there are four elastic regimes: first, up to extension  $\approx 15 \mu\text{m}$ , only small forces ( $< 10$  pN) are necessary to remove thermal bending from the random coil. Once these bends are removed, the force rises linearly for

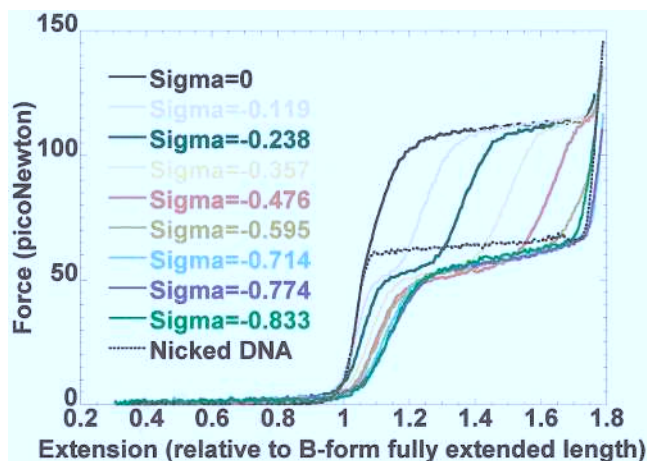


FIG. 1 (color). Force versus extension for underwound dsDNA ( $\sigma$  from 0 to  $-0.833$  according to the color code given in inset), in comparison with force extension diagram of a nicked molecule (dotted black line).

extensions 15 to 16.5  $\mu\text{m}$ , and a linear stretching elastic constant can be measured ( $\gamma = 220 \text{ kT/nm} = 900 \text{ pN}$ ) [8]. Near 16.5  $\mu\text{m}$  and 65 pN a force “plateau” occurs, as the dsDNA abruptly stretches to 1.7 times its *B*-form contour length. Beyond 26  $\mu\text{m}$ , force increases again quickly with further extension. The 65 pN plateau has been interpreted as a cooperative transition from usual *B*-DNA to a new stretched *S*-form [1]. *S*-DNA is 1.7 times longer than *B*-DNA, but its precise structure is unknown; although a ladderlike form has been proposed [2,9], *S*-DNA is less than the 2 times *B*-form length expected for complete unwinding of the double helix. This suggests that *S*-DNA has nonzero helicity, and we will present in the following a rather direct way to determine this important parameter.

Figure 1 also shows force versus extension for an unnicked dsDNA with  $\sigma = 0$ ; a plateau occurs at 110 pN, at nearly double the force as for nicked molecules. Both elastic responses are reversible on a one minute time scale. The next question is how dsDNA elasticity changes with  $\sigma$  (e.g., is there a continuous evolution from one type of curve to another as the dsDNA is progressively unwound?), and whether one can measure the unwinding needed for a fixed-twist molecule to exhibit an elastic behavior similar to the one of a free twist.

For  $\sigma = 0$  to  $\sigma = -0.8$ , the force-extension curves of Fig. 1 are obtained. At  $\sigma \approx -0.1$ , a  $\approx 50 \text{ pN}$  plateau appears, increasing from zero width as more negative turns are made; a second plateau follows at 110 pN. For  $\sigma = -0.72 \pm 0.05$ , the 110 pN plateau disappears. Our interpretation is that when we underwind to, e.g.,  $\sigma = -0.24$ , the turns are first stored in an untwisted double helix. Upon application of force, the molecule partially transforms to the *S*-form once a force of 50 pN is applied. When the underwinding is consumed by

*S*-DNA, the remainder of the molecule will be *B*-DNA with  $\sigma = 0$ , and will display a transition at  $\approx 110 \text{ pN}$ . Further unwinding progressively narrows the 110 pN plateau while widening the one at 50 pN; a progressively larger fraction of the molecule can transform to *S*-form at 50 pN. The length increase of the first plateau is proportional to  $|\sigma|$  until  $\sigma = 0.72$ . Combined with the observation that the elasticities of nicked DNA and unnicked DNA with  $\sigma = -0.72$  are the same beyond the end of their plateaus, we conclude that the DNA in both situations is in the same state, i.e., entirely in *S*-form. Thus we are able to give the first estimate of *S*-DNA helicity: *S*-DNA has  $\sigma = -0.72 \pm 0.05$ , and is a helix with a pitch of 22 nm and 37.5 base pairs per turn.

Our  $\sigma > 0$  data (Fig. 2) reproduces observations by Allemand *et al.* of a new plateau near 25 pN, proposed to be due to straightening of plectonemically supercoiled *P*-DNA [5]. Overwinding from  $\sigma = 0$  to  $\sigma = +1.07$ , the molecule fraction which must transform to unwritten *P*-DNA increases, widening the 25 pN plateau (from initially zero width) while narrowing the 110 pN plateau. Extrapolating our high-force results to  $\sigma \approx +3$ , the 110 pN plateau should disappear since the whole molecule would be *P*-DNA via overwinding, and there would be no need for creation of *P* by force. The end of the 25 pN plateau should likewise be located near extension 1.6 for  $\sigma \approx +3$ . We therefore predict *P*-DNA to have  $\sim 2.62 \text{ bp/turn}$  (close to an estimate of 2.4 bp/turn from Allemand *et al.*) and an extension 1.6 times that of *B*-DNA (slightly smaller than the factor 1.75 determined by Allemand *et al.*; these differences may be due to the differing buffers used).

We argue the 110 pN plateau of unnicked  $\sigma = 0$  DNA to involve creation of coexisting *S*- and *P*-DNA, as follows. Beyond 50 pN, *B*-DNA cannot transform to

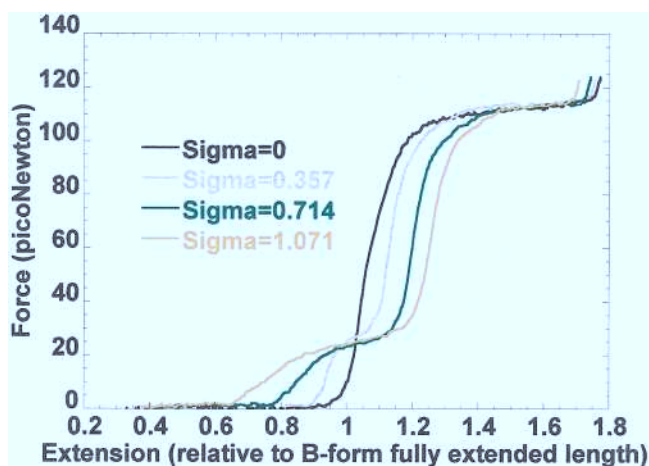


FIG. 2 (color). Force versus extension diagram for positively supercoiled dsDNA ( $\sigma$  from 0 to 1.071). Helicity of *P*-DNA of  $\sigma \approx +3$  is determined from where extension at low force is extrapolated to vanish.

*S*-DNA without unwinding. However, if a compensating amount of *P*-DNA is created along with *S*, the molecule may lengthen while keeping its net linkage at zero. The proportion of each structure is fixed by this compensation ( $\frac{1}{5}$  *P*-DNA to  $\frac{4}{5}$  *S*-DNA at  $\sigma = 0$ ). This is in accord with the observed overextension of 1.66 times the  $\lambda$ -EMBL3 *B*-length, the appropriately weighted average of the *S*- and *P*-form extensions.

To justify this interpretation we present a model of the transitions. Position along our molecule is described using *B*-form contour length  $s$  ( $\Delta s = 0.34$  nm corresponds to 1 bp). Linkage density is described by  $\Omega(s)$  (in excess of the *B*-form twist) in rads/nm, and stretching is described using the local strain  $u(s)$  [8]. For relaxed *B*-DNA,  $u = \Omega = 0$ ; if doubled in length,  $u = 1$ , and if entirely untwisted to form a ladder  $\Omega = -1.85$  rad/nm ( $-2\pi/3.4$  nm). Linkage is added up using  $d\sigma = [\Omega(s)/2\pi]ds$ .

As a function of contour length  $s$  we consider the coarse-grained energy

$$\frac{E}{k_B T} = \int_0^L ds \left[ \frac{w}{2} \left( \frac{du}{ds} \right)^2 + \frac{d}{2} \left( \frac{d\Omega}{ds} \right)^2 - \sum_{i=0}^4 A_i \exp\left( -\frac{(u - \langle u_i \rangle)^2}{2\delta_i^2} \right) \times \exp\left( -\frac{(\Omega - \langle \Omega_i \rangle)^2}{2\varepsilon_i^2} \right) \right],$$

which describes five distinct DNA states which can be slightly deformed (parameters for the five Gaussian wells are in Table I). Large deformations lead to a large free energy cost (the zero-energy level from which all the wells hang). Domain-wall stiffnesses ( $w = 10$  nm as in Ref. [8]; also  $d = 10$  nm<sup>-3</sup>) define a minimum length to droplets of the various states. We consider equilibrium statistical mechanics of this model, but before we describe the results, we describe how the many parameters are constrained and fit.

The five states are *B*-DNA ( $\Omega = 0, u = 0$ ), *S*-DNA ( $\Omega = -1.33, u = 0.7$ ), *P*-DNA ( $\Omega = 5.6, u = 0.6$ ), *Z*-like DNA ( $\Omega = -3.9, u = 0.13$ ), and *sc-P* DNA

TABLE I. Parameters for the five-state DNA elasticity model of the text. Each state (*B*, *S*, *P*, *Z*, and *sc-P*) is described by a free energy amplitude  $A$ , an average stretching  $\langle u \rangle$ , an average twist  $\langle \Omega \rangle$ , and stretching and twisting fluctuation widths  $\delta$  and  $\varepsilon$ .

	<i>B</i> -DNA	<i>S</i> -DNA	<i>P</i> -DNA	<i>Z</i> -DNA	<i>sc-P</i> DNA
$A_i$ (nm <sup>-1</sup> )	50	44	9.0	41	45
$\langle u_i \rangle$	0	0.70	0.60	0.13	-1.0
$\delta_i$	0.40	0.27	0.15	0.32	0.24
$\langle \Omega_i \rangle$ (nm <sup>-1</sup> )	0	-1.33	5.55	-3.85	6.0
$\varepsilon_i$ (nm <sup>-2</sup> )	0.67	0.28	0.20	0.52	0.31

( $\Omega = 6.0, u = -1.0$ ). The *B*, *S*, and *P* states have been previously observed; our *Z* state represents the known *Z*-DNA structure which is a left-handed double helix of helix repeat and length similar to *B*-form. Since the *B*, *S*, *P*, and *Z* states are considered to be fully extended and unwritten, the  $(u, \Omega)$  locations of these wells are fixed by known extensions and twists. *sc-P* DNA is a simple model of plectonemically supercoiled (therefore zero extension, or  $u = -1$ ) *P*-DNA; *sc-P* DNA has already been proposed to explain the behavior of overtwisted DNA for  $< 50$  pN [5]. *Z*-like (undertwisted and near-*B* length) and *sc-P*-like (overtwisted and collapsed) states are essential to avoid creating *S*- and *P*-DNA at forces  $< 20$  pN by unwinding and overwinding, and thus are needed to allow double plateaus as in Figs. 1 and 2.

In each well, the extensional elastic constants are  $A_i/\delta_i^2$  and the torsional rigidities are  $A_i/\varepsilon_i^2$ ; for the DNA case ( $i = 0$ ) our choice of parameters for the  $i = 0$  well gives the rigidities  $\gamma = 320$  nm<sup>-1</sup> and  $C = 110$  nm<sup>-1</sup> known for *B*-DNA [8]. The remaining states have extensional elasticities which we have fit using the high-force slopes of Figs. 1 and 2; the twisting elasticities were chosen to be comparable to *B*-DNA. Further constraint is put on the amplitudes and widths of the wells by the requirement that the transitions occur at the experimentally observed forces.

We treat the statistical mechanics of our model exactly with continuum transfer matrix techniques [8], with forces and torques added conjugate to  $u$  and  $\Omega$ . Note that our model does not include the double helix entropic elasticity [8]; we describe only the DNA configurations expected for large forces ( $> 10$  pN), either straightened out, or tightly plectonemically supercoiled. Figure 3 shows the results. For nicked DNA (zero applied torque) a single plateau occurs near 60 pN, as *B*-DNA converts to *S*-DNA. For fixed

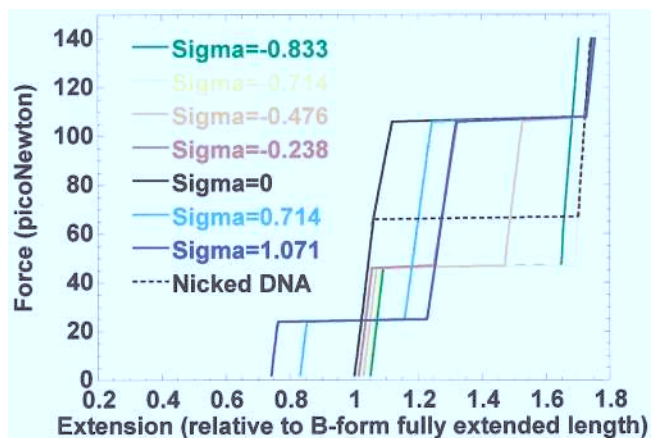


FIG. 3 (color). Theoretical force versus extension for overwound ( $\sigma > 0$ ), underwound ( $\sigma < 0$ ), and nicked (dashed line) DNA for the five-state model discussed in the text (parameters in Table I). The model shows four distinct transitions, and the double-step force curves, observed experimentally.

$\sigma = 0$ , such a transition is not possible; instead a mixed  $S + P$  state is created at 110 pN, with zero net linkage. For  $\sigma < 0$ , at low forces  $Z$ -DNA appears; then as force is increased,  $Z + B$  transforms to  $S + B$  near 50 pN, and finally  $S + P$  appears at 110 pN. For  $\sigma = -0.72$  (i.e., that of  $S$ ) no  $P$  is needed, and a single transition to  $S$  occurs at 50 pN. For larger underwindings, the high-force state involves coexisting  $Z + S$ , and is slightly shorter than pure  $S$ -DNA.

Overwinding leads to a similar sequence of transitions: at low force,  $sc\text{-}P + B$  appears, transforming first to  $B + P$  at 25 pN and then to  $S + P$  at 110 pN. For overwinding compatible with that of  $P$ -DNA ( $\sigma = +3$ ), a single transition from  $B + sc\text{-}P$  to  $P$  occurs at 25 pN. The model is in accord with experimental data over a large extension and linkage range, justifying our experimental interpretation.

The model fails to reproduce some experimental results: there is no “softening” of  $B$ -DNA extensional modulus with underwinding as is apparent in Fig. 1; also, the broadening of the transitions from  $Z + B$  to  $S + B$  in the theory are slightly different from those seen experimentally. In addition, our model does not describe DNA elasticity for forces  $< 10$  pN. These shortcomings follow from the lack of any accounting for bending fluctuations of the extended states, and our use of simple symmetrical shapes for the wells defining the different states (note our model omits the microscopic twist-stretch coupling expected from the chirality of  $B$ -DNA, although there is an effective coupling of this type due to the asymmetry of where the different potential wells are placed). Finally, the present model ignores the sequence inhomogeneity of the molecules, which can be expected to broaden the transitions.

Our model shows that the rather abrupt and multiple-step force-distance curves can occur in a one-dimensional system, and also establishes that the 110 pN plateau seen for  $\sigma = 0$  DNA can occur via simultaneous creation of  $S$ - and  $P$ -DNA. Although the many parameters cannot

all be considered as fully determined by comparison with experiment, the basic “phase diagram” of DNA states in this model is robust to changes in the potential.

In conclusion, we have explored the mechanical response of twist-constrained DNA to large forces, which allows us to give an overall picture of dsDNA conformations. We find that  $B$ -DNA transforms to a mixture of  $S$ -DNA and  $P$ -DNA at a force near 110 pN if stretched with  $\sigma = 0$ . We find that two more states are required to explain the data at all  $\sigma$ , plausibly supercoiled  $P$ -DNA, and an unwound ( $Z$ -like) double helix. This overall picture of dsDNA conformations allows us to determine that  $S$ -DNA has  $\approx 38$  bases per right-handed turn and a helical pitch of 22 nm.

The work at LDFC was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, the DRET-Ministère des Armées, the CNRS-MPCV, the University Louis Pasteur in Strasbourg, and NATO; the work at UIC was supported by the Petroleum Research Foundation, the NSF through Grant No. DMR-9734178, by Research Corporation, and by The Whitaker Foundation.

- 
- [1] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron, *Science* **271**, 792 (1996).
  - [2] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante, *Science* **271**, 795 (1996).
  - [3] T.R. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, *Biophys. J.* **74**, 2016 (1998).
  - [4] T.R. Strick, J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, *Science* **271**, 1835 (1996).
  - [5] J.F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, and V. Croquette, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14 152 (1998).
  - [6] J.F. Léger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J.F. Marko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12 295 (1998).
  - [7] F.B. Fuller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 815 (1971).
  - [8] J.F. Marko, *Phys. Rev. E* **57**, 2134 (1998).
  - [9] A. Lebrun and R. Lavery, *Nucl. Acid. Res.* **24**, 2260 (1996).

# RecA binding to a single double-stranded DNA molecule: A possible role of DNA conformational fluctuations

J. F. LEGER\*, J. ROBERT\*, L. BOURDIEU\*, D. CHATENAY\*<sup>†‡</sup>, AND J. F. MARKO<sup>†</sup>

\*Laboratoire de Dynamique des Fleules Complexes-UMR 7506 Centre National de la Recherche Scientifique Université Louis Pasteur, Institut de Physique, 3 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France; and <sup>†</sup>Department of Physics, MC 273, University of Illinois, 845 West Taylor Street, Chicago, IL 60607-7059

Communicated by Nicholas R. Cozzarelli, University of California, Berkeley, CA, August 3, 1998 (received for review April 15, 1998)

**ABSTRACT** Most genetic regulatory mechanisms involve protein–DNA interactions. In these processes, the classical Watson–Crick DNA structure sometimes is distorted severely, which in turn enables the precise recognition of the specific sites by the protein. Despite its key importance, very little is known about such deformation processes. To address this general question, we have studied a model system, namely, RecA binding to double-stranded DNA. Results from micromanipulation experiments indicate that RecA binds strongly to stretched DNA; based on this observation, we propose that spontaneous thermal stretching fluctuations may play a role in the binding of RecA to DNA. This has fundamental implications for the protein–DNA binding mechanism, which must therefore rely in part on a combination of flexibility and thermal fluctuations of the DNA structure. We also show that this mechanism is sequence sensitive. Theoretical simulations support this interpretation of our experimental results, and it is argued that this is of broad relevance to DNA–protein interactions.

In many protein–DNA complexes, the double helix is deformed severely from the classical Watson–Crick B-form by being bent, stretched, and untwisted (1–6). Although it is often presumed that protein binding can induce such deformations, the mechanisms by which this occurs are understood poorly (7, 8). To address this question, we have performed micromanipulation studies of the binding kinetics of RecA, a bacterial protein involved in homologous recombination (9, 10), to a single double-stranded DNA (dsDNA). This particular protein was chosen because of its nonspecific binding to dsDNA, which lengthens the dsDNA by a factor of 1.5. It is possible with this model system to monitor the binding kinetics by measuring this lengthening in a micromanipulation experiment and to use force to probe the mechanism by which dsDNA is deformed on protein binding.

The double helix under external tension exhibits a transition to an overstretched state (S-DNA) 1.7 times longer than its B-DNA length (11, 12). It is also known that, in specific conditions (involving the presence of a nonhydrolysable analog of ATP:ATP- $\gamma$ S), RecA polymerizes along and lengthens dsDNA by a factor of 1.5 (13). Thus, RecA-dsDNA complexes present a situation in which DNA conformational changes caused by protein binding can be coupled to an external force. Using this idea, we studied the rate of RecA polymerization onto a single dsDNA under fixed tension, grafted between an optical fiber, acting as a force transducer, and a latex bead manipulated with a micropipette mounted on piezoelectric transducers.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

© 1998 by The National Academy of Sciences 0027-8424/98/9512295-5\$2.00/0  
PNAS is available online at www.pnas.org.

## MATERIALS AND METHODS

**Experimental Setup for Force Measurements.** Force–extension and kinetics measurements used a microscope built on carbon-epoxy composite structure board (Newport, Fountain Valley, CA) and Invar mounts to reduce thermal expansion. To measure forces in the piconewton range, the diameter of the optical fiber had to be reduced down to  $\approx 5$  to  $15 \mu\text{m}$ . This was achieved through chemical etching in 40% hydrofluoric acid at  $60^\circ\text{C}$  for 15 to 20 min. Experiments were performed in plastic cuvettes into which the optical fiber was introduced horizontally; a vertical micropipette mounted on a PZT stage (Physik Instrument, Waldbronn, Germany) was used for bead manipulation. A laser diode ( $\lambda = 670 \text{ nm}$ ) was coupled through an optical isolator (made with a polarizer and a quarter-wave plate) into the optical fiber, the tip of which was imaged through a  $40\times$  objective (Zeiss) onto a two-quadrant photodiode (Hamamatsu, Middlesex, NJ) used as a position detector. The currents delivered by the two quadrants were converted into voltages; these voltages were amplified differentially with a low noise voltage amplifier (SR560, Stanford Research, Sunnyvale, CA), which fed a digital data acquisition board (AT-MIO16X, National Instruments, Austin, TX) plugged into a personal computer. Fiber deflection was calibrated by positioning the micropipette on the fiber and recording a voltage–position curve; experimental data were corrected for nonlinearities of the position detector. The fiber stiffness was determined by using the equipartition theorem applied to measurements of thermal displacements of its end. The experiment was computer-controlled by using LABVIEW software (National Instruments). Force–extension data acquisition was done at 300 Hz for, typically, 60 sec. For kinetic measurements, force was fixed by using a feedback loop programmed under LABVIEW. Drifts ( $\approx 1 \mu\text{m/h}$  from distortion of fiber position with respect to detector) were eliminated by relaxing the DNA molecule back to a random coil conformation every  $\approx 200$  sec and taking the measured voltage in this position as a new zero for force measurements. By doing this, force was maintained constant to within 5 pN during the 2–3 h of a typical kinetic run.

**Preparation of DNA Molecules.**  $\lambda$ -EMBL3 phage DNA was purified by using standard techniques (Qiagen Lambda Kit). An adenonine- and thymidine-rich (AT-rich) dsDNA (156Gmac) was obtained from a pUXI3 plasmid (pUXI3 was derived from pUC19 by the insertion of a macronuclear DNA sequence, 156Gmac, from *Paramecium primaurelia* at the *Bam*HI site of the polylinker) and was purified (Qiagen Plasmid Kit). Our labeling procedure was based on the ligation of two short dsDNA fragment (732 bp) containing labeled nucleotides at multiple positions to the ends of the DNA molecule. These fragments were obtained in the following way.

Abbreviation: dsDNA, double-stranded DNA; AT-rich, adenonine- and thymidine-rich.

<sup>‡</sup>To whom reprint requests should be addressed. e-mail: chatenay@ldfc.u-strasbg.fr, jmarko@uic.edu



PCR synthesis of a biotin or digoxigenin labeled fragment (732 bp in length) was performed in the presence of biotin or digoxigenin-dUTP in the reaction mixture. PCR was performed by using pUXI3 plasmid as a template. One of the primers was chosen so as to contain an *EcoRI* restriction site, and the second one was chosen so that this *EcoRI* site was unique in the amplified sequence that was part of 156Gmac. This particular sequence (156Gmac), had been chosen because of its high AT content (70%), which allowed maximization of the number of incorporated labels. The molar ratio of biotin (or digoxigenin)-dUTP to dTTP is 1/9. For a 700-bp DNA segment, the expected number of labels per molecule was 50 on the average. After PCR synthesis, the fragment was purified from the primers and nucleotides by using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and then was concentrated by ethanol precipitation. The PCR fragment then was cut with the restriction enzyme *EcoRI*, was purified by using a QIAquick PCR purification kit, and was concentrated by ethanol precipitation. The label (biotin, but more frequently dig) may have caused the inhibition of some enzymes, especially if the labeled nucleotide dUTP was present in the recognition site. This effect was diminished strongly because the *EcoRI* site was chosen in the primer. Indeed, in this case, only one strand of the recognition site was labeled because the other was part of the primer itself (and therefore unlabeled).

In the case of  $\lambda$ -EMBL3, an adapter consisting of two oligonucleotides (Genset) that hybridize over part of their length was ligated by the *EcoRI* end to one of the two PCR labeled fragments (dig- or biotin-labeled). The adapter-ligated PCR fragment was purified from the adapter (QIAquick PCR purification kit), was concentrated by ethanol precipitation, and was ligated to the left end of  $\lambda$ -DNA. The final product was purified from a low melting point agarose gel by using standard agarose treatment. An analogous procedure was used to multilabel the right end with the other labeled fragment.

In the case of 156Gmac, the procedure was somewhat different. First, 156Gmac was excised from the pUXI3 plasmid by *Bam*HI restriction, followed by a low melting point agarose gel purification. A labeled *EcoRI*-digested PCR fragment similar to those described above then was ligated to the two *Bam*HI extremities of the 156Gmac with the use of linker oligonucleotides and then was purified from a low melting point agarose gel. One of the two labeled fragments was removed by a *Pf*IM1 restriction; this enzyme had a unique restriction site in the 156Gmac close to the *Bam*HI site. Again, this was followed by low melting point agarose gel purification. The second labeled PCR fragment then was ligated to this free end of the 156Gmac with the use of linker oligonucleotides and finally was purified from a low melting point agarose gel.

**Grafting of DNA to Bead and Optical Fiber.** Amino-coated 3- $\mu$ m-diameter latex beads (Polysciences) were coated with streptavidin (Boehringer Mannheim) by using covalent coupling by glutaraldehyde (Electron Microscopy Grade, Sigma). The fiber was coated with aminosilane (Sigma) in 90% ethanol and finally was coated with antidigoxigenin (Boehringer Mannheim) by the same coupling method used for the beads.

Streptavidin-coated beads and dsDNA with digoxigenin- and biotin-labeled ends were incubated for 1 h to allow attachment of some dsDNA to the beads; after this incubation, the stoichiometry was approximately three dsDNA per bead as determined by agarose gel. The DNA-covered beads were injected into the measurement cell, where some of them became tethered to the antidigoxigenin-coated optical fiber via a single dsDNA. All experiments were performed at 26 ( $\pm 1$ ) $^{\circ}$ C. After 1 h of incubation, the cell was washed with RecA polymerization buffer (50 mM Tris-HCl/10 mM MgCl<sub>2</sub>/20 mM NaCl/100  $\mu$ M EDTA, pH 7.5) and a force-extension curve was obtained to ensure that a single DNA molecule was anchored between the fiber and the bead (Fig. 1A, solid line).

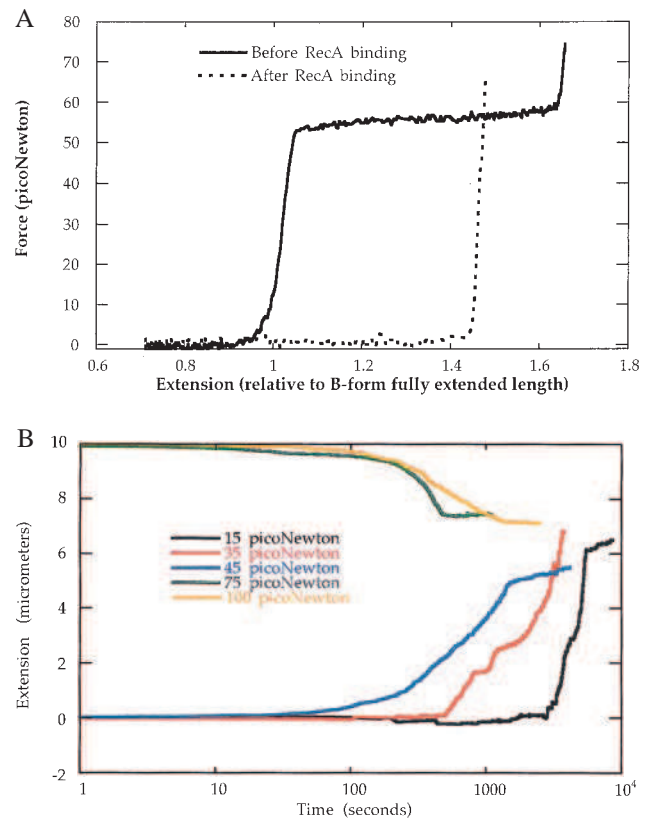


FIG. 1. (A) Force vs. extension for  $\lambda$ -EMBL3, both before (solid line) and after (dashed line) complete RecA polymerization, showing elongation of the dsDNA. The difference in low-force behaviors ( $< 10$  pN) of the two curves shows that the nucleofilament has a larger persistence length than the initial dsDNA molecule. In the case of the nucleofilament, such force-extension curves are independent of the force applied during RecA polymerization. (B) Time dependence of elongation of a single  $\lambda$ -EMBL3 during RecA binding for various fixed forces in presence of 1 mM ATP- $\gamma$ S. The initial time dependence of the elongation is highly reproducible, but the late time behavior (i.e., beyond 80% of the full elongation caused by RecA binding) is much more variable from one experiment to another. This might be because of nicks that, as RecA binds, become covered, making progressively more of the dsDNA twist-blocked and thereby limiting the rate of the final stages of polymerization.

RecA (New England Biolabs) and ATP- $\gamma$ S (final concentrations, 40 ng/ $\mu$ l RecA and 1 mM ATP- $\gamma$ S) then were injected into the cell while the DNA molecule was relaxed. Immediately after RecA injection, the dsDNA was subjected to a fixed force through a feedback loop (acting on the micropipette displacement), which kept the fiber deflection constant. RecA polymerization was monitored through measurement of the displacement of the micropipette necessary to maintain the force constant. Once polymerization was complete, another force-extension curve was obtained that characterized the elastic behavior of the complete RecA-dsDNA complex (Fig. 1A, dashed line).

## RESULTS AND DISCUSSION

**RecA Binding to  $\lambda$ -EMBL3 DNA.** Experiments performed on  $\lambda$ -EMBL3 (48,502 bp, 16.5- $\mu$ m B-form contour length) showed RecA binding kinetics (followed by measuring DNA extension) to be affected strongly by the force applied (Fig. 1B): At 75 pN, the reaction was 20 $\times$  faster than at 15 pN. Below 55 pN, RecA polymerization elongated B-DNA whereas above 55 pN, RecA polymerization shortened the initial S-DNA. In this latter case RecA does work against the

external force. For each force, 10 different molecules were used to study RecA binding kinetics, and for extension <80% of that of the final RecA-dsDNA product, the kinetics were reproducible (see legend of Fig. 1B).

These results deserve several comments. First of all, one should note that RecA polymerization is affected by the supercoiling state of dsDNA and unnicked circular dsDNA plasmids are not fully covered by RecA (14). In our experiments, care was taken to work only with nicked linear dsDNA. Unnicked molecules with multiple grafting sites on both strands at each end do not exhibit a sharp overstretching transition near 50–60 pN (15). Experiments described here were performed only on molecules exhibiting the sharp overstretching transition (Fig. 1A), which is a signature of the presence of nicks along the molecule. Though our force–extension data prove the existence of at least one nick along the molecule used for kinetic studies, the possibility that the initiation of RecA polymerization occurs predominantly at nicks can be ruled out by two arguments. First, RecA is known to polymerize along unnicked, closed circular plasmids (14); therefore, nicks are not needed for nucleation of RecA polymerization along dsDNA. Second, the reproducibility of our experiments is not compatible with such a hypothesis: In the case of predominant nucleation at nicks, because there is no reason for each investigated molecule to have the same number of nicks, the kinetics would be strongly nonreproducible, at least in their initial behaviors.

Finally, it is interesting to note that force–extension curves (Fig. 1A) show that the dsDNA-RecA filament has a much larger persistence length ( $L_P$ ) than the bare dsDNA. It was very difficult with our setup (force resolution of  $\approx 1$  pN) to give a precise estimate of this persistence length in the case of the RecA-dsDNA complex. Attempts to fit our force–extension data to a continuum elasticity model (17), taking into account the Young modulus of the molecule, gave  $L_P = 75$  nm for  $\lambda$ -EMBL3 and a crude estimate of 800 nm for the dsDNA-RecA complex; this latter value is consistent with previous measurement by electron microscopy ( $L_P = 600$  nm) (16).

It is difficult to compare the kinetics under controlled extension to the kinetics in the absence of force. The kinetics at zero force could be monitored by measuring, at various time intervals, the force–extension curves of the complex, but, as shown here, as soon as we stretch the dsDNA, we speed up the binding kinetics, and this is not a true zero-force kinetic measurement. We should mention that, in the course of our kinetic experiments, we found tethered DNA molecules with no RecA bound even after 12 h of incubation in the RecA polymerization buffer at 26°C. It is then possible to infer that, in our conditions, the zero-force polymerization rate is much slower than the one determined under tension.

**Thermal Conformation Fluctuations of dsDNA Play a Role in RecA Binding.** Understanding the phenomena described above starts with the recognition that dsDNA is a flexible molecule. Force–extension data (Fig. 1A) show the free-energy difference between B and S-DNA to be only  $3k_B T$  per bp. One may therefore expect dsDNA to exhibit thermal fluctuations of its structure. These fluctuations are characterized by a probability distribution  $P(u)$  for local stretching,  $u$ , of DNA under tension [Fig. 2; obtained from fitting a continuum elasticity model (17) to the force–extension curve of bare DNA given in Fig. 1A]. For B-DNA, the mean local stretching is  $\langle u \rangle = 0$ , and, for S-DNA,  $\langle u \rangle = 0.7$ . The probability of the state with stretching comparable to that in the RecA-dsDNA complexes,  $P(u = 0.5)$ , increases with increasing force and reaches its maximum for forces above the overstretching transition (17). We propose that RecA binds to thermally stretched dsDNA; therefore, its binding and polymerization rely on coupling of DNA conformational fluctuations to protein–DNA and protein–protein interactions. This explains how external force accelerates RecA binding and polymeriza-

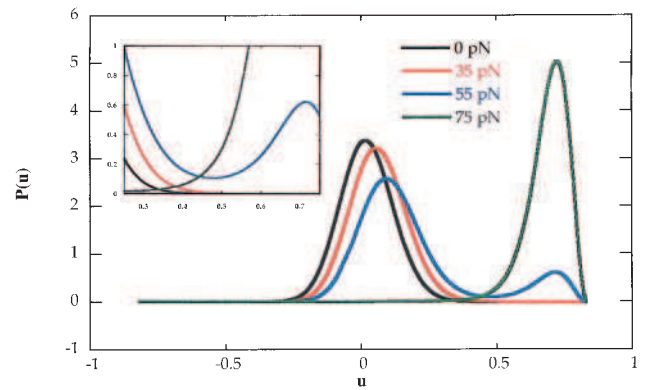


Fig. 2. Probability distribution  $P(u)$  for local stretching,  $u$ , of a dsDNA molecule for various applied forces. The bimodal behavior observed for 55 pN is caused by the coexistence of B-DNA and S-DNA on the transition plateau (see force–extension data in Fig. 1A). The asymmetry in  $P(u)$  for 75 pN arises because of the steric limit,  $u \approx 0.9$ , where the dsDNA phosphodiester backbones are stretched fully. *Inset* shows  $P(u)$  close to  $u = 0.5$ .

tion, as well as the lengthening of B-DNA and the shortening of S-DNA on RecA binding.

**Monte Carlo Simulations of RecA Polymerization Controlled by Conformation Fluctuations of dsDNA.** This mechanism can be illustrated by using a simple kinetic model in which DNA stretching is described by using a one-dimensional Ising model with interactions chosen to reproduce the overstretching plateau. A string of integers,  $d_i$ , represents the DNA state ( $d_i = 0$  for B-DNA;  $d_i = 1$  for S-DNA). Each integer “site” represents three bp of DNA and therefore one RecA monomer-binding site. Force is coupled to DNA length, to which each site contributes 1.0 or 1.7 nm for  $d_i = 0$  or  $d_i = 1$  for bare DNA. RecA binding is described by additional integers  $n_i$  ( $n_i = 0$  for bare DNA;  $n_i = 1$  for RecA bound); a DNA site with bound RecA is taken to be 1.5 nm in length. The energy of the DNA-RecA degrees of freedom is:

$$\frac{E}{k_B T} = \sum_i \left\{ w[1 - \delta(d_i, d_{i+1})] + \nu d_i - \frac{f}{k_B T} [D - r n_i] d_i + u[1 - \delta(n_i, n_{i+1})] + [h - m d_i] n_i \right\}.$$

The first three terms describe DNA overstretching; the parameters for cooperativity of the B-DNA to S-DNA transition ( $w = 2.0$ ), free energy difference (in units of  $k_B T$ ) between B and S-DNA ( $\nu = 11.5$ ), length increase per site during overstretching ( $D = 0.7$  nm), and reduction of this length increase by RecA binding ( $r = 0.2$  nm) are determined by bare dsDNA force extension curves (Fig. 1A). The final three terms describe RecA binding cooperativity (13) ( $u = 3.0$ ), RecA binding free energy (including translational entropy loss) in the absence of DNA stretching ( $h = 3.0$ ), and a strong shift in binding energy when DNA is stretched ( $m = 20.0$ ). Precise estimates of the net binding free energy of RecA-dsDNA binding are not available, but our interactions are compatible with available data for enthalpy of RecA-ssDNA binding (18, 19). At zero force, a two-site (6 bp), RecA-stretched DNA region has a binding energy of  $-k_B T$  and is therefore stable whereas an isolated RecA on stretched DNA has positive energy and is not thermodynamically stable.

Metropolis Monte Carlo dynamics with random choices for site updates were used (20). DNA structural fluctuations occurred on a timescale (nanoseconds) short compared with the time between successive DNA-RecA monomer encounters (microseconds to milliseconds); thus the  $d_i$ s were updated  $10^4$  times more often than the  $n_i$ s. Apart from this separation of

timescales, details of the dynamics are unimportant as long as they are local and satisfy detailed balance.

Fig. 3 shows simulation results for RecA binding to DNA for this model, which includes only thermal fluctuations and attractive protein-DNA and protein-protein interactions. According to these simulations, polymerization begins at nucleation islands, which form when thermally stretched regions of DNA bind RecA and which then grow as additional RecAs bind to thermally stretched DNA at the island ends as observed in previous electron microscopy experiments (13). Above 40 pN, the increase in probability for local DNA stretching enhances both the nucleation and growth processes. This enhancement with increasing force continues up to 100 pN. Above 70 pN, there is no thermal barrier for DNA stretching in the model (the DNA is already stretched by the applied force), and polymerization occurs at a rate limited only by access of RecA to DNA (in the high force regime, other processes, such as DNA unwinding, not included in the present model are likely to become rate-limiting). By only taking into account variations of thermally activated DNA structural fluctuation with the applied force, this simple model qualitatively reproduces experimental results both below and above the transition to S-DNA.

**Enhancement of the Kinetics of RecA Binding by Sequence Dependence of dsDNA Elasticity.** To further test this picture of protein-dsDNA interactions mediated via DNA conformational fluctuations, we performed the same experiments on a different DNA molecule (156Gmac, 15,742-bp dsDNA, 5.35- $\mu\text{m}$  contour length in B-form). This dsDNA is 70% AT ( $\lambda$ -EMBL3 is  $\approx 50\%$  AT). Bare DNA force-extension curves (Fig. 4A) show that 156Gmac is "softer" than  $\lambda$ -EMBL3 (see legend of Fig. 4A for an explanation of this "softness"). This softness of 156Gmac means that this molecule is easier to deform than  $\lambda$ -EMBL3; therefore, there will be larger thermally activated deviations from B-form and consequently accelerated RecA binding, as evidenced by comparison of the RecA binding kinetics for 156Gmac to those for single and dimer  $\lambda$ -EMBL3 (Fig. 4B). This sequence-dependence is in agreement with our theoretical picture; also, the fact that single and dimer  $\lambda$ -EMBL3 undergo the same reaction time course agrees with what is to be expected for homogeneous nucleation of RecA-dsDNA, that is, existence of a characteristic distance between nuclei and therefore a characteristic reaction time independent of DNA length. Such a sequence-dependent elasticity can be included in our model, and we anticipate that this will lead to nucleation of dsDNA-RecA complexes at soft AT-rich regions of the molecule.

## CONCLUSION

The mechanism proposed here for RecA polymerization is extremely simple, yet it captures all of the essential features of

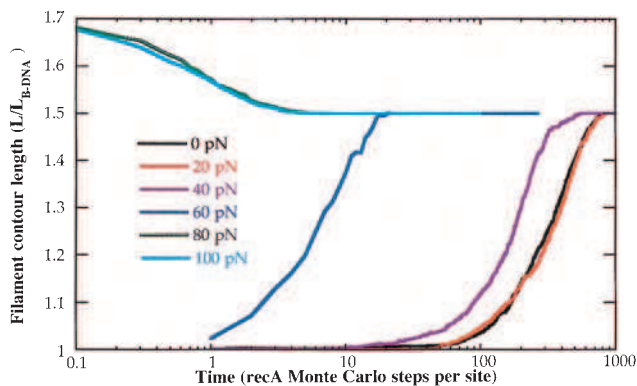


FIG. 3. Time dependence of elongation of a dsDNA molecule obtained from an Ising-type model for various applied forces.

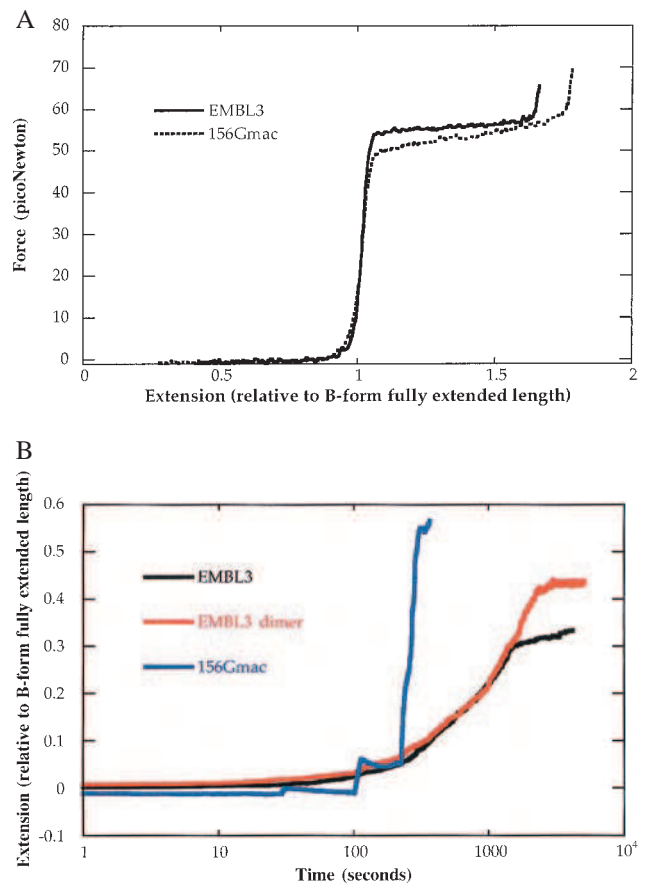


FIG. 4. (A) Force vs. extension data for  $\lambda$ -EMBL3 (solid line) and 156Gmac (dotted line). These two curves were obtained from a single preparation by using a single fiber, thus avoiding any complication of comparison caused by slight changes in calibration of fiber displacement and/or stiffness. Two sets of beads (each one carrying either  $\lambda$ -EMBL3 or 156Gmac) were injected in the cuvette. Thus, two different types of beads became grafted to the fiber via either  $\lambda$ -EMBL3 or 156Gmac. Force-extension diagrams shown here result from successive experiments performed on the two different sets of beads. Extensions are given as fractions of B-form fully extended length to allow comparison of the two different molecules. A fit to the extensible worm-like-chain model (21) gives the persistence length  $A$  and the stretching modulus  $\gamma$  for the two molecules. For 156Gmac,  $A = 55 \text{ nm}$  and  $\gamma = 270 \text{ nm}^{-1}$ ; for  $\lambda$ -EMBL3,  $A = 75 \text{ nm}$  and  $\gamma = 450 \text{ nm}^{-1}$ . The transition to S-DNA starts at 50 pN for 156Gmac instead of 55 pN for  $\lambda$ -EMBL3, and the transition width (in terms of force) is larger for 156Gmac than for  $\lambda$ -EMBL3. Finally, the overstretching of 156Gmac ( $u = 0.75$ ) is larger than the overstretching of  $\lambda$ -EMBL3 ( $u = 0.65$ ). According to these data, 156Gmac should exhibit stronger local structural thermal fluctuations than  $\lambda$ -EMBL3. (B) Comparison of RecA binding kinetics to  $\lambda$ -EMBL3,  $\lambda$ -EMBL3 dimer, and 156Gmac for a constant externally applied force of 45 pN. Extension is plotted as a fraction of B-form length to allow comparison of the three different molecules. Comparison of  $\lambda$ -EMBL3 and  $\lambda$ -EMBL3 dimer shows that the faster RecA binding in the case of 156Gmac is caused by the differing base content and is not an artifact of differing molecule lengths.

experimental kinetics measurements. In particular, it explains very simply how RecA can bind and polymerize along S-DNA as well (and even faster) as along B-DNA. Other mechanisms can be proposed to describe our observations: RecA first could bind to dsDNA and then stretch it, or RecA could bind dsDNA via induced-fit interactions. Although such mechanisms may seem plausible *a priori*, they are not fully satisfying for various reasons. In the first alternative mechanism, one has to assume that RecA binds at least as well to B-DNA as to S-DNA, though their conformation is likely very different (21). For

both alternative mechanisms, it is difficult to explain with simple energetic considerations how RecA binds S-DNA faster than B-DNA because we have no precise knowledge of the energy landscape of the various dsDNA conformations involved in this problem; indeed, the final structure of dsDNA in the dsDNA-RecA complex is neither B- nor S-DNA, and studies of bp orientations even suggest that it could be closer to B form than to S form (7, 21). On the contrary, in our proposed mechanism, we only assume that dsDNA conformation suitable for RecA binding arises naturally because of thermal fluctuations, and we immediately infer from this the main trends of our kinetic experiments. Needless to say, we do not pretend that our description is complete; indeed, one may imagine that, in the final stages of RecA-dsDNA binding, further fine tuning (different from the ones arising from spontaneous thermal fluctuations) of the structures of both RecA and dsDNA may occur.

The nonspecificity of RecA binding to DNA, resulting in macroscopic DNA stretching, makes it an excellent candidate for single-molecule study of the fluctuation–selection binding mechanism. However, our results suggest what might be an important intrinsic property of dsDNA for its interaction with proteins: its flexibility and structural fluctuations. In the formation of other protein–DNA complexes, DNA fluctuations might play a key role, and those fluctuations might help to understand how deformed DNA structures arise in protein–DNA complexes (1–6).

This work is dedicated to the memory of the late François Caron. We acknowledge fruitful discussions with K. Adzuma, R. Lavery, T. Duke, G. V. Shivashankar, T. Ebbesen, and all of the members of the “Groupe Paramécie” at Laboratoire de Génétique Moléculaire de l’ENS. Acknowledgement is made to the Fondation pour la Recherche Médicale, to Direction des Recherches Etudes et Techniques–Ministère des Armées, to Centre National de la Recherche Scientifique Mission pour la Physique et de Chimie du Vivant, to North Atlantic Treaty Organization, to the Donors of The Petroleum Research Fund administered by the American Chemical Society for

partial support of this research, to The Whitaker Foundation for partial support through a Biomedical Engineering Research Grant, and to the Research Corporation for partial support through a Research Innovation Award.

1. Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S. & Sigler, P. B. (1993) *Nature (London)* **365**, 512–520.
2. Juo, Z. S., Chiu, T. K., Leiberman, P. M., Baikalov, I. Berk, A. J. & Dickerson, R. E. (1996) *J. Mol. Biol.* **261**, 239–254.
3. Love, J. L., Li, X., Case, D. A., Giese, K., Grosschedl, R. & Wright, P. E. (1995) *Nature (London)* **376**, 791–795.
4. Schumacher, M. A., Choi, K. Y., Zalkin, H. & Brennan, R. G. (1994) *Science* **266**, 763–770.
5. Werner, M. H., Gronenborg, A. M. & Clore, G. M. (1996) *Science* **271**, 778–784.
6. Werner, M. H., Huth, J. R., Gronenborg, A. M. & Clore, G. M. (1995) *Cell* **81**, 5, 705–714.
7. Takahashi, M. & Norden, B. (1994) *Adv. Biophys.* **30**, 1–35.
8. Lebrun, A., Shakked, Z. & Lavery, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2993–2998.
9. Clark, A. J. & Margulies, A. D. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 451–459.
10. Travers, A. A. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 71–77.
11. Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.-L., Chatenay, D. & Caron, F. (1996) *Science* **271**, 792–794.
12. Smith, S. B., Cui, Y. & Bustamante, C. (1996) *Science* **271**, 795–799.
13. Stasiak, A., Di Capua, E. & Koller, T. (1981) *J. Mol. Biol.* **151**, 557–564.
14. Stasiak, A. & Di Capua, E. (1982) *Nature (London)* **299**, 185–186.
15. Cluzel, P. (1996) Ph.D. thesis (Université Paris 6).
16. Egelman, E. H. & Stasiak, A. (1986) *J. Mol. Biol.* **191**, 677–697.
17. Marko, J. F. (1998) *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Top.* **57**, 2134–2149.
18. Takahashi, M., (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 288–295.
19. Wittung, P., Ellouze, C., Maraboeuf, F., Takahashi, M. & Norden, B. (1997) *Eur. J. Biochem.* **245**, 715–719.
20. Binder, K. (1987) in *Application of the Monte-Carlo Method in Statistical Physics*, (Springer, Berlin), pp. 1–36.
21. Lebrun, A. (1997) Ph.D. thesis (Université Paris 6).

### **3. Etude du repliement secondaire post et en cours de transcription d'une molécule d'ARN**

Au mois de septembre 1998, j'ai débuté avec Didier Chatenay une étude sur le repliement de l'acide ribonucléique (ARN). Ce thème central de mon activité de recherche pendant 5 ans a conduit à la soutenance de 2 thèses de doctorat dans l'équipe (Thierry Marchal, Sébastien Harlepp). Nous avons travaillé en collaboration avec Hervé Isambert, théoricien au laboratoire.

La molécule d'acide ribonucléique (ARN) est transcrite à partir de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à l'aide d'une enzyme : l'ARN-polymérase. Lors de la transcription de l'ADN par l'ARN-polymérase, la base Uracile (U) remplace, sur l'ARN, la base Thymine (T) de l'ADN. A ce détail près, la seule différence majeure entre ces deux molécules est que l'ARN est une molécule simple brin qui, faute de brin complémentaire, se replie sur elle-même en formant des petites portions d'hélice connectées entre elles par des régions restées non-appariées (voir par exemple figure 3.1). On appelle structure primaire la chaîne unidimensionnelle constituée par la succession des bases d'une séquence d'ARN. La structure secondaire correspond à la formation des bouts d'hélice ARN grâce aux appariements Watson-Crick  $G \equiv C$  et  $A = U$  (et aussi aux paires de bases  $G = U$ , autre spécificité de l'ARN). Enfin, on distingue une structure tertiaire qui correspond à l'agencement tridimensionnel des hélices et des régions non-appariées, grâce notamment aux interactions électrostatiques spécifiques dues aux ions  $Mg^{2+}$ . En plus de la richesse structurale des ARN, l'attrait pour ces molécules réside dans la catalyse par certaines d'entre elles de réactions biochimiques (maturation d'ARN de transfert par l'ARN de la RnaseP, activité peptidyl transférase de l'ARN 23S du ribosome). Compte tenu des relations étroites entre les structures des ARN et leurs fonctions catalytiques, nous avons étudié leur processus de repliement à partir de techniques de mesures micromécaniques et optiques sur molécule unique. En dénaturant de manière mécanique une molécule d'ARN, nous enregistrons les forces critiques de rupture des bases appariées qui composent les structures secondaire. L'interprétation de ces signaux de force à l'aide de simulations numériques permet de remonter à une information structurale. Ce type d'étude peut être une alternative des mesures classiques de diffraction de rayons X.

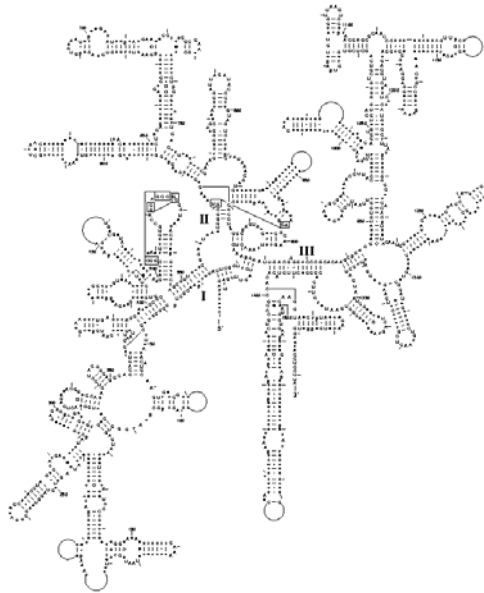


Figure 3.1: Structure secondaire de l'ARN 16S

### 3.1 Etude des structures secondaires d'un ARN par dénaturation mécanique

Nous avons conçu des séquences d'ARN en tige-boucle "idéale" longues d'une centaine de nucléotides, ne contenant que des motifs de structures secondaires (figure 3.2). Les molécules sont synthétisées par transcription *in vitro* au laboratoire. Les séquences se replient suivant une succession de deux tiges-boucles, les portions tiges résultant de l'appariement d'une seule sorte de paires de bases (A=U ou bien G≡C). Nous avons également étudié une molécule d'ARN d'intérêt plus biologique. Il s'agit de l'ARN ribosomal 16S d'*Escherichia Coli* qui se trouve dans la petite sous unité du ribosome. Le ribosome est l'usine de production des protéines dans la cellule. L'ARN 16S intervient dans la reconnaissance sélective entre l'ARN messager détenteur de l'information génétique et l'ARN de transfert qui porte l'acide aminé. La structure secondaire native de l'ARN 16S est représentée sur la figure 3.1. Cette molécule contient 1540 nucléotides repliés en une soixantaine d'hélices qui définissent quatre domaines. Elle peut être considérée comme une succession des motifs élémentaires M1, M2 et M3 de la figure 3.2.

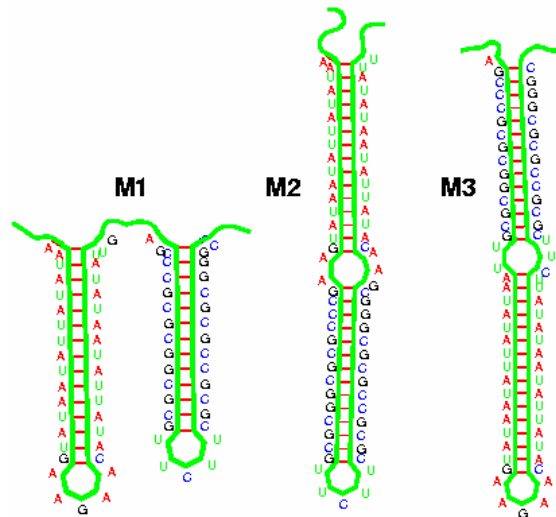


Figure 3.2: Motifs élémentaires ARN

Un premier axe expérimental est l'étude de l'ARN post transcrit. Les expériences consistent à imposer un déplacement à l'aide d'une cale piézoélectrique sur une extrémité de la molécule d'ARN et à mesurer la force exercée sur l'autre extrémité. Pour effectuer les mesures, nous avons reconstruit avec Thierry Marchal et Sébastien Harlepp une expérience de pinces optiques (figure 3.4). Le choix d'un montage picodynamométrique basé sur les pinces optiques plutôt que sur la déflexion d'une fibre est dicté par un bruit plus petit dans le cas du premier. En comparant l'allure des spectres des fluctuations (Figure 3.3 ) pour une raideur identique de pince optique et de raideur fibre, nous avons choisi de construire un montage de pinces optiques puisque à basse fréquence l'amplitude du bruit est plus faible dans le cas des pinces optiques. Ceci est lié au fait que, pour une constante de raideur donnée, l'aire sous la courbe est constante et déterminée par l'amplitude quadratique moyenne des fluctuations de position, régie par la friction à faible fréquence. Or la friction exercée sur une fibre est supérieure à celle exercée sur une bille. La fibre est un cylindre de 1 mm de longueur et de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre alors que la bille sphérique a un diamètre de 1  $\mu\text{m}$ . De ce fait l'amplitude du bruit aux basses fréquences est supérieure dans le cas de la fibre. Ces fréquences correspondent aux temps d'acquisitions des courbes forces extensions.

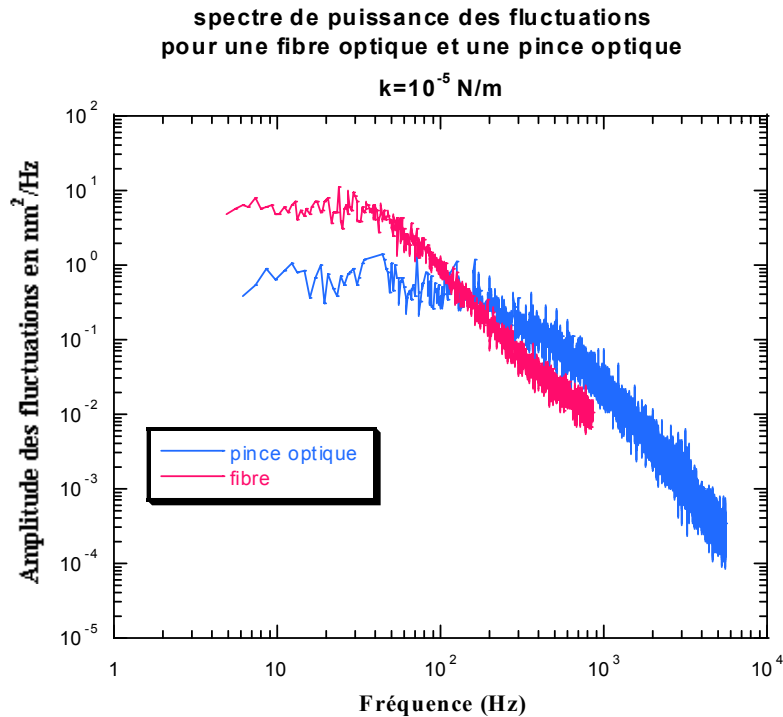


Figure 3.3: comparaison du spectre de fluctuations de puissance pour une fibre ( $L=1\text{mm}$ ,  $D=5\ \mu\text{m}$ ) et d'une bille ( $D=1\ \mu\text{m}$ ) piégée dans une pince optique de même raideur.

Lors d'une traction imposée aux molécules M1, M2 ou M3, on observe une ou deux chutes de force autour de 10 et 20 picoNewton (pN) (figure 3.5). Ces événements traduisent l'ouverture des structures secondaires de l'ARN. La comparaison des courbes obtenues avec les molécules M1 et M2 permet d'attribuer sans ambiguïté la chute de force aux alentours de 10 pN à l'ouverture des 15 paires de bases A-U et de relier la chute de force aux alentours de 20 pN à l'ouverture des paires de bases G=C. Dans le cas de la molécule M3, la force critique de 20 pN entraîne l'ouverture complète de la molécule et une seule rupture de pente est enregistrée dans le diagramme force/extension. Lors de la phase de relaxation, les courbes présentent toutes une hystérésis de plus ou moins grande amplitude. Cette variabilité d'amplitude est la trace du caractère stochastique du passage d'une conformation de la molécule d'ARN à une l'autre. Pour les molécules d'ARN que nous avons étudiés, du fait des temps d'acquisition expérimentaux de l'ordre de la minute, le caractère stochastique se manifeste. Ce point est très bien expliqué par les simulations numériques d'Hervé Isambert, dont on note l'accord avec les courbes expérimentales (figure 3.5).



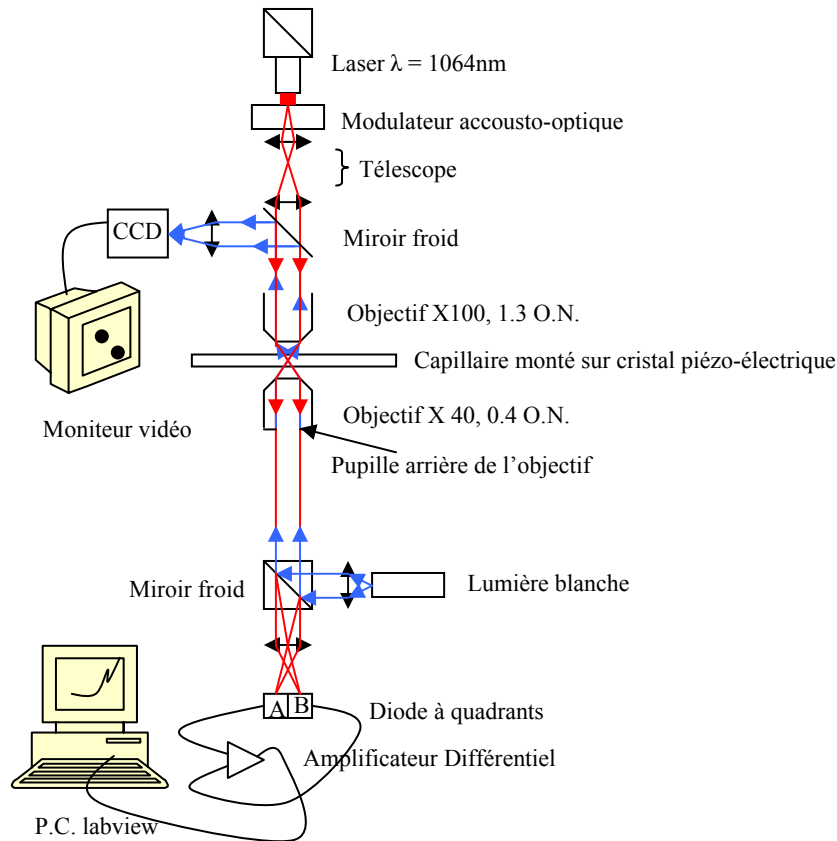


Figure 3.4: Schéma du montage de pince optique

Les expériences de traction réalisées avec l'ARN 16S montrent deux résultats principaux (figure 3.6): les signaux de force sont constitués d'un plateau aux environs de 12 pN avec une modulation de l'amplitude de la force de 20% (Figure 3.6). Les variations de force autour de 12 pN sont la signature de l'ouverture de la molécule. Les courbes sont très reproductibles entre deux tractions successives sur une molécule. Cela prouve qu'un certain nombre d'hélices dont les séquences sont quasi identiques s'ouvrent dans le même ordre. Cela implique également que lors de la phase de relaxation, la molécule se re-nature dans un état très proche de la structure originale. Ce résultat n'était pas prévisible a priori. De plus 60% des molécules étirées présentent des signaux de force très ressemblants. Nous sondons un état de repliement initial majoritairement identique dans notre échantillon. L'interprétation des courbes expérimentales a également fait appel aux simulations numériques. Le point fondamental est l'aspect dynamique du processus de dénaturation. En plus des hélices présentes dans la structure originale, il faut prendre en compte dans les simulations un grand nombre d'hélices qui se forment sous tension. Ces structures métastables ont des temps de vie suffisamment longs pour être détectées expérimentalement.

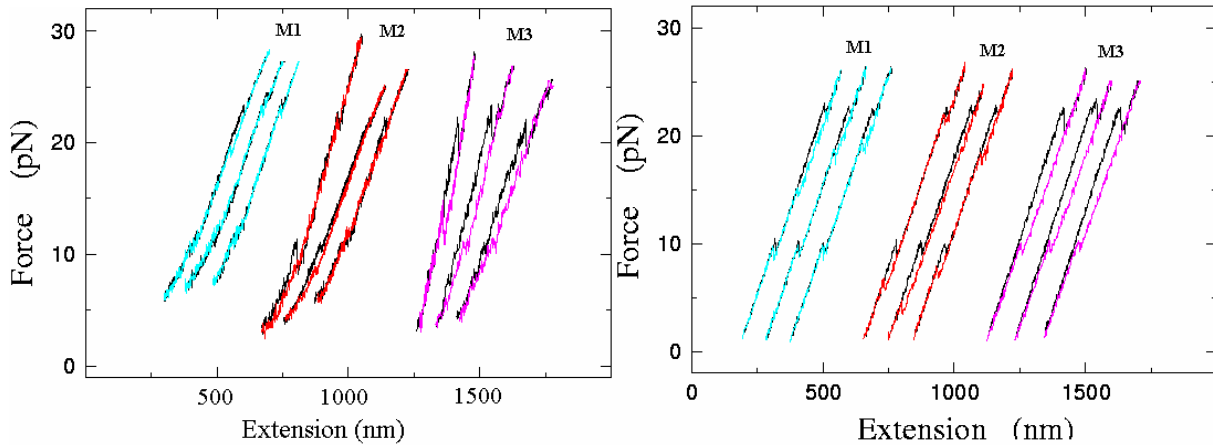


Figure 3.5: Trois courbes force/extension pour chaque molécule M1, M2, M3. Noir : extension, couleur : relaxation. A gauche : courbes expérimentales, à droite : simulations numériques.

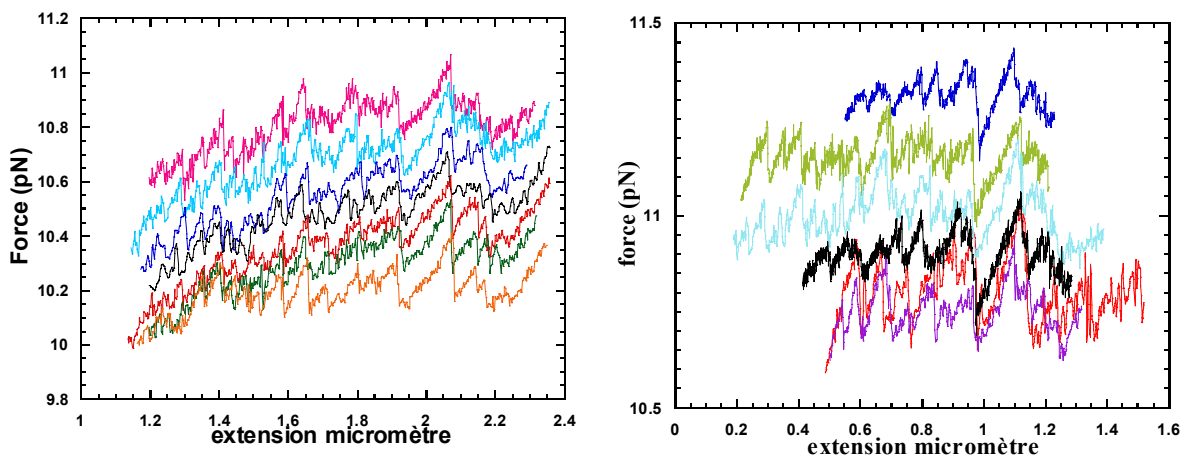


Figure 3.6: (droite) 7 tractions successives sur une molécule d'ARN 16S, (gauche) 6 tractions sur 6 molécules d'ARN 16S.

### 3.2 Repliement de l'ARN en cours de transcription

Parallèlement aux mesures de forces, nous utilisons avec Sébastien Harlepp la microscopie en onde évanescente pour mesurer les distances caractéristiques et les temps caractéristiques de repliement des structures secondaires de l'ARN. Cette expérience permet de suivre l'évolution du repliement secondaire d'une molécule d'ARN au cours de la transcription de l'ADN par l'enzyme T7 ARN-polymérase. La question est de comprendre si l'ARN se replie en fin de transcription, quand la molécule est complètement synthétisée ou bien au contraire en cours de synthèse.

### a) Microscopie en onde évanescente

Le principe du montage de microscopie en onde évanescente est le suivant: un faisceau laser à 488 nanomètres arrive sur une face d'un prisme avec une incidence tel qu'il y a propagation d'une onde évanescente le long de la face adjacente (condition de réflexion totale à l'intérieur du prisme) (Figure 3.6). L'intensité lumineuse décroît exponentiellement dans une direction perpendiculaire à cette face l'argument de l'exponentiel étant appelé la profondeur de pénétration. Nous recueillons l'intensité diffusée par un objet (bille micrométrique) ou bien celle émise par un fluorophore accroché à l'extrémité native de la molécule d'ARN dans le champ de l'onde évanescente. Avec la longueur d'onde qui est utilisée (488 nm), la profondeur de pénétration de l'onde évanescente est d'environ une centaine de nanomètres. Cela signifie qu'une variation lumineuse de 1% correspond à une variation de distance de l'objet diffusant ou du fluorophore par rapport à la surface du prisme de 1 nanomètre, soit l'appariement de deux paires de bases à partir de quatre bases simple brin. Au vu de la longueur moyenne des portions en double hélice contenue dans les ARN que nous utilisons (dizaine de paires de bases, 10 nm), cette résolution est satisfaisante.

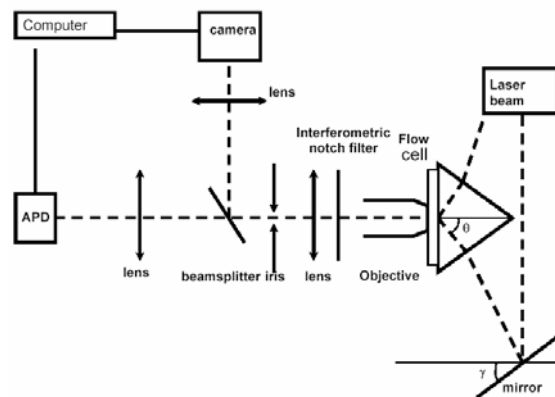


Figure 1.

Figure 3.7: Schéma du montage de microscopie en onde évanescente

### b) Spectroscopie de corrélation de fluorescence

Préalablement aux mesures du repliement de l'ARN en cours de transcription, nous avons mis au point une méthode pour mesurer la profondeur de pénétration de l'onde évanescente. Cette quantité doit être connue de manière précise pour interpréter correctement les mesures. Elle intervient dans la conversion en nanomètres de la mesure des intensités lumineuses diffusées. Sa connaissance permet une bonne reproductibilité des mesures en fonction des paramètres expérimentaux (angle du miroir de renvoi).

Une solution de molécules de fluorescéine est placée sur le prisme dans le champ d'excitation du faisceau laser et dans le champ d'observation de la diode à avalanche (figure 3.7). En traçant la courbe d'autocorrélation de l'intensité de fluorescence au cours du temps, on détermine le temps de diffusion de ces fluorophores. Ce temps de diffusion est proportionnel au volume dans lequel ces fluorophores sont excités. Dans le cas de la microscopie en onde évanescente ce volume est représenté par un cylindre avec une base large mais avec une hauteur limitée. Cette limitation en hauteur va régir, en majorité, le temps de résidence du fluorophore dans le champ d'observation. Il est donc possible de corréler ce temps de diffusion à la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

A l'équilibre chimique, des molécules de fluorescéine diffusent dans le champ d'observation créant des fluctuations temporelles d'intensité de fluorescence. Les fluctuations temporelles de fluorescences sont définies comme la différence entre la fluorescence instantanée et la fluorescence moyenne, soit:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$$

Où  $\langle F(t) \rangle$  représente la moyenne de fluorescence.

La fonction de corrélation normalisée s'écrit:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t+\tau) \cdot \delta F(t) \rangle}{\langle F \rangle^2}$$

Compte tenu de l'excitation de la fluorescence par une onde évanescente, cette expression devient:

$$G(\tau) = \frac{1}{2N} \left\{ (1 - 2 \operatorname{Re} \tau) * \omega \left[ i (\operatorname{Re} \tau)^{0.5} \right] + 2 \left( \frac{\operatorname{Re} \tau}{\pi} \right)^{0.5} \right\}$$

Où  $\operatorname{Re} = D/d^2$  et  $\omega(\xi) = \exp(-\xi^2) * \operatorname{erfc}(-i\xi)$ . Le nombre N de fluorophores contenu dans le champ d'excitation est mesuré directement à l'origine des courbes G( $\tau$ ). Le coefficient de diffusion D de la fluorescéine est connu par ailleurs. Le seul paramètre ajustable est la profondeur de pénétration d, qui est déduit des courbes expérimentales à l'aide d'un ajustement (figure 3.8).

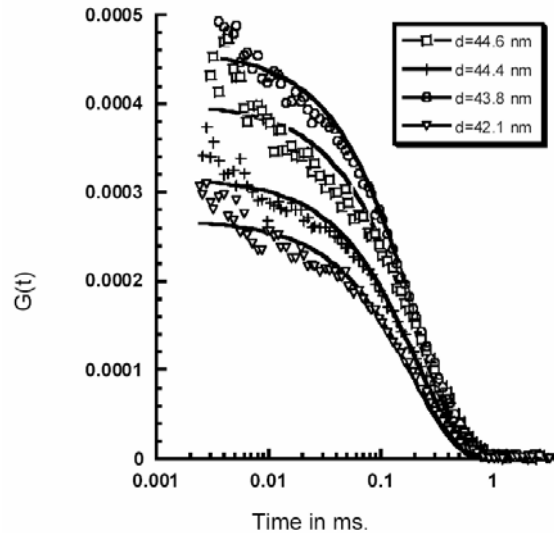


Figure 3.8: Mesure de la fonction d'autocorrélation et calcul de la profondeur de pénétration pour divers valeurs de l'angle du miroir de renvoi.

### c) Mesure du repliement de l'ARN en cours de transcription

Nous avons utilisé le montage de microscopie en onde évanescente pour mesurer les variations de distance bout à bout d'une molécule d'ARN au cours de sa synthèse par l'enzyme T7 ARN polymérase. Pratiquement, le complexe ternaire ADN/ARN-polymérase/ARN est bloqué au début du processus de transcription. La molécule d'ARN est marquée à son extrémité 5' par une bille en or (diamètre : 5 nm). Le complexe arrêté est adsorbé sur la surface d'un prisme éclairé par un laser en condition de réflexion interne totale (figure 3.9). La transcription est démarrée en ajoutant une solution tamponnée à pH 7.5 de nucléotides triphosphates et de magnésium dans la cellule de mesure. L'enzyme ARN-polymérase synthétise l'ARN dont l'évolution de la longueur bout à bout est suivie au cours du temps grâce à l'intensité diffusée par la bille. La lumière diffusée par la bille dans le champ de l'onde évanescente est recueillie par une caméra digitale intensifiée. La profondeur de pénétration est choisie à une valeur d'environ 50 nm.

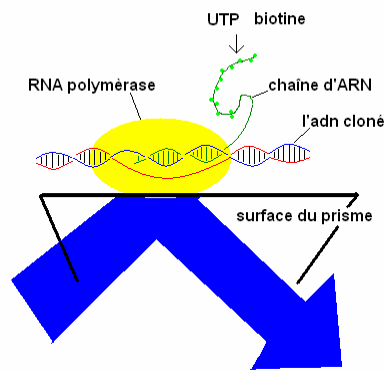


Figure 3.9 Schéma de principe du suivi de repliement de l'ARN en cours de synthèse.

Nous avons étudié l'ARN 16S avec ce montage. La vitesse de transcription est évaluée à 4 nucléotides/sec. On identifie une dizaine d'événements de repliement dont l'amplitude traduit la formation d'hélices de cinq bases environ (Figure 3.10). Nous concluons que le repliement de l'ARN a lieu simultanément avec la transcription. De la même manière que pour les expériences de dénaturation mécanique de l'ARN, l'identification précise des structures formées vient d'une collaboration avec Hervé Isambert.

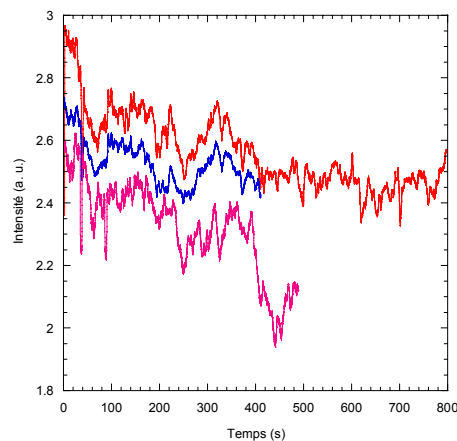


Figure 3.10: Evolution temporelle de l'intensité diffusée par une bille d'or attachée à l'extrémité d'une molécule d'ARN 16S (3 expériences différentes)

Les simulations numériques d'Hervé Isambert sont limitées au repliement en cours de transcription de 600 nucléotides. Cette longueur d'ARN correspond aux 150 premières secondes des courbes expérimentales. Le détail des courbes expérimentales et des simulations numériques n'est pas rigoureusement reproductible. Les hélices intermédiaires qui se forment ne sont pas identiques en nombre et en composition en comparant différentes expériences/simulations. Par contre, la

comparaison des simulations numériques et des expériences permet d'attribuer les 3 importants raccourcissements observés sur les courbes expérimentales à la formation des 3 boucles principales du domaine 5' de l'ARN 16S (points a, b et c sur la figure 3.11). Entre ces évènements principaux, la molécule croît (point d sur la figure 3.11).

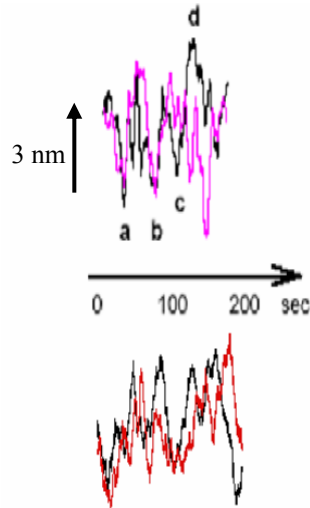


Figure 3.11: Comparaison des simulations numériques (en haut) et des courbes expérimentales (en bas) sur les variations de la longueur bout à bout des 600 premières bases de la molécule d'ARN 16S

Les expériences mécaniques et optiques, à l'aide des simulations numériques, montrent le caractère dynamique et l'importance des structures secondaires métastables qui mènent à l'état fondamental replié de la molécule d'ARN. Le couplage expérience/simulation numérique permet de discriminer et d'identifier la structure la plus probable adoptée par une molécule d'ARN à partir d'un jeu de structures repliées initialement possibles.

## Probing complex RNA structures by mechanical force

S. Harlepp<sup>1</sup>, T. Marchal<sup>1</sup>, J. Robert<sup>1,a</sup>, J-F. Léger<sup>1</sup>, A. Xayaphoummine<sup>1</sup>, H. Isambert<sup>1,2,b</sup>, and D. Chatenay<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, CNRS-ULP, Institut de Physique, 3 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Physico-Chimie Curie, CNRS UMR168, Section de Recherche, Institut Curie, 11 rue P. & M. Curie, 75005 Paris, France

Received 15 September 2003

Published online 5 February 2004 – © EDP Sciences, Società Italiana di Fisica, Springer-Verlag 2004

**Abstract.** RNA secondary structures of increasing complexity are probed combining single molecule stretching experiments and stochastic unfolding/refolding simulations. We find that force-induced unfolding pathways cannot usually be interpreted by solely invoking successive openings of native helices. Indeed, typical force-extension responses of complex RNA molecules are largely shaped by stretching-induced, long-lived intermediates including non-native helices. This is first shown for a set of generic structural motifs found in larger RNA structures, and then for *Escherichia coli*'s 1540-base long 16S ribosomal RNA, which exhibits a surprisingly well-structured and reproducible unfolding pathway under mechanical stretching. Using out-of-equilibrium stochastic simulations, we demonstrate that these experimental results reflect the slow relaxation of RNA structural rearrangements. Hence, micromanipulations of single RNA molecules probe both their native structures and long-lived intermediates, so-called “kinetic traps”, thereby capturing –at the single molecular level– the hallmark of RNA folding/unfolding dynamics.

**PACS.** 87.15.-v Biomolecules: structure and physical properties – 82.37.Rs Single molecule manipulation of proteins and other biological molecules – 87.15.Aa Theory and modeling; computer simulation

### Introduction

Recent developments of micromechanical experiments on single biomolecules have provided structural insights into alternative structures of DNA [1–4] and mechanical properties of proteins [5–7]. In principle, such techniques could also provide new tools to probe RNA structures which remain by and large refractory to many crystallization schemes. However, this prospect requires one to relate mechanically induced unfolding pathways to RNA structural features. Although it could be done successfully for small RNA structures by solely invoking successive openings of native helices [8], probing more complex RNA structures by mechanical force is expected to involve non-native structural rearrangements of the initial secondary structure upon stretching [9–11]. Local rearrangements, such as the formation of simple stem-loops, occur quite fast ( $< 1$  ms) under low pulling force (or in the absence of force) and the number of possible hairpins (with small loop) is proportional to the length of stretched region of the RNA molecule. Thus, alternative hairpins, not present on the initial structure, should inevitably form under partial stretching of long RNA molecules (e.g.,  $> 1000$  nucleotides). Conversely, more global rearrangements, which

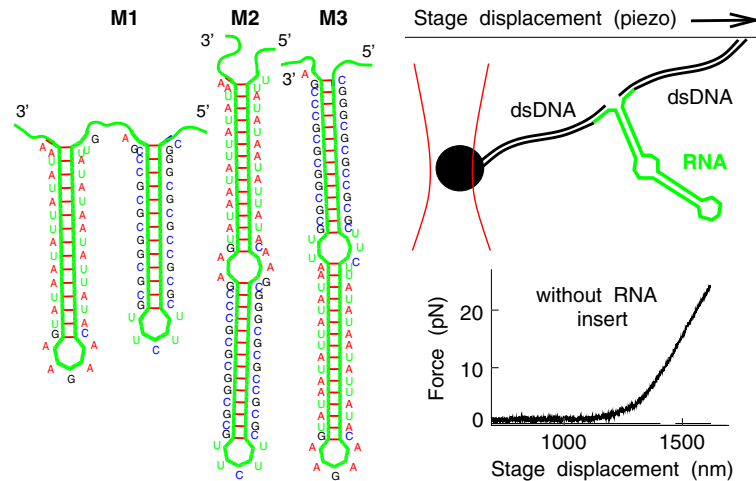
involve the coordinated removal and formation of different sets of helices, might occur much more slowly (e.g., after a few minutes) [12,13]. Hence, under typical pulling rates (i.e., full extension within a few seconds), most stretching experiments likely occur under out-of-equilibrium conditions and should exhibit unfolding/refolding hysteresis curves.

To study the full potential and limitations of these micromechanical techniques so as to probe complex RNA structures, we have combined single RNA molecule stretching experiments and out-of-equilibrium stochastic simulations. Three small artificial structures, M1, M2 and M3 (Fig 1), representing prototypes for the main structural modules of larger RNA secondary structures, were first designed and studied in details. The mechanical response of *E. coli*'s 1540-base long 16S ribosomal RNA was then studied using the same experimental setup and a somewhat simplified numerical approach. The generic structural motifs M1, M2 and M3, correspond to three different arrangements of two 15 base pair long helices consisting almost exclusively of either GC or AU base pairs, Figure 1. M1 corresponds to two adjacent stem-loops with respect to the external single strand joining the molecule ends. By contrast, M2 and M3 present the same nested organization with either the strong (GC) helix or the weaker (AU) helix connected to the external single strand.

<sup>a</sup> e-mail: jerome.robert@ldfc.u-strasbg.fr

<sup>b</sup> e-mail: herve.isambert@curie.fr





**Fig. 1.** The three structural motifs with the schematic setup (see Materials and Methods) and a force-extension curve of two ligated pUC19 in the absence of RNA insert.

The 5' and 3' ends of either these small RNA motifs or *E. coli*'s 16S rRNA were hybridized to two pUC19 dsDNA extensions labelled, respectively, with biotin and digoxigenin (see Materials and Methods). The force-extension experiments were then done by grafting the ends of these extended molecular constructs between the antidigoxigenin coated glass surface of a capillary and a micrometer size silica bead coated with streptavidin. The capillary was moved by a piezo-electric stage (50 to 300 nm/s) and the resulting force exerted by the molecule on to the bead was measured with an optical tweezer.

## Results

### Single molecule stretching experiments of small RNA motifs

When structural motifs M1, M2 or M3 are inserted in the molecular construct, one or two force drops occur on the force-extension curve, Figure 2. A histogram of the rupture force and a set of unfolding and refolding force-extension curves are shown for each motif in Figures 2A and B. For each set, variations between force-extension curves correspond to stochastic fluctuations between either successive stretchings on the same molecule or different experiments on equivalent molecules.

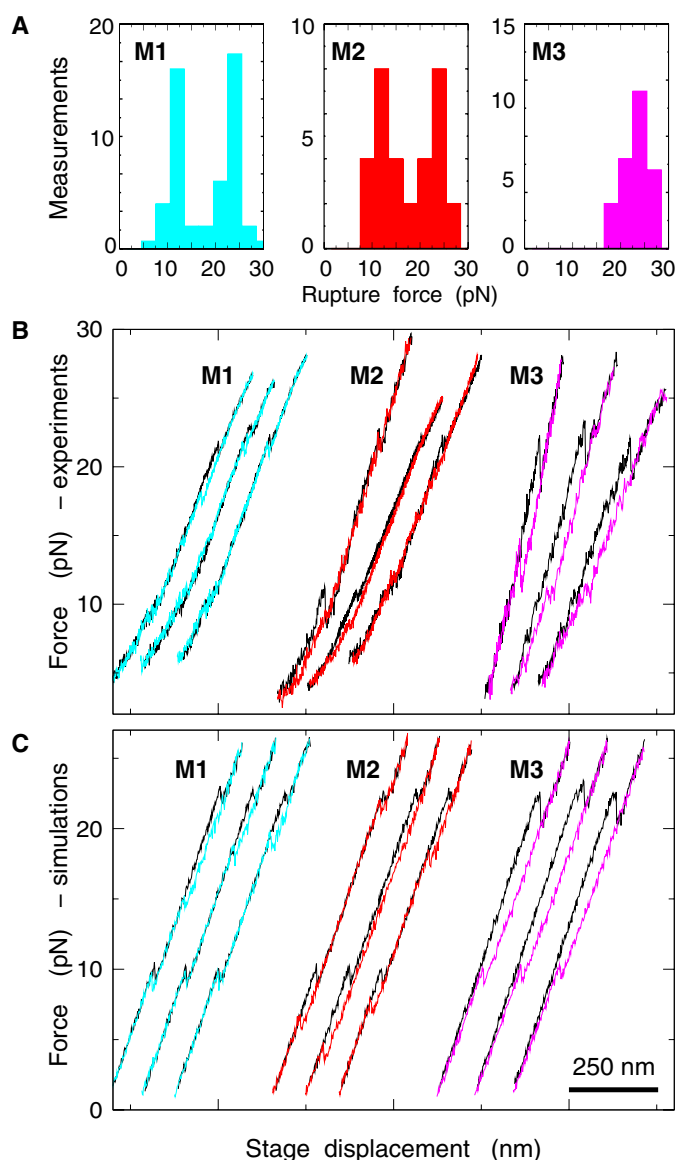
A comparison of the different rupture force histograms and the corresponding unfolding curves (black in Fig. 2B) shows that M1 and M2 present very similar unfolding responses with two sequential drops or inflexion regions around  $11 \pm 3$  pN and  $22 \pm 3$  pN, whereas M3 presents a single and larger force drop at about  $22 \pm 3$  pN. These values are in very good agreement with reference [14] although these latter experiments concern the opening of DNA hairpins. For M1 and M2, these results can be simply attributed to the first opening of the weak (AU) helix followed by the stronger (GC) helix at a higher applied force. Indeed, the applied tension being uniformly distributed along the external single strand joining the

molecules ends, the weaker (AU) helix is expected to break first on M2, while it should certainly do so by construction on M1. Besides, by calibrating the stiffness of the optical trap, both force drops on these curves can be converted into a distance released by the molecule, taking into account the angular inclination of the setup ( $30^\circ$  to  $40^\circ$ ). This corresponds to the expected 20 nm in both cases. Subtracting the net free-energy contribution stored in the stretched single strand [15], we find in term of pairing energy, around 1.7 kT/bp for AU and 3 kT/bp for GC, in good agreement with known parameters [16]. By contrast for M3, the strong (GC) helix shields the weaker (AU) stem from the applied force and no significant unzipping is observed until the whole molecule suddenly unfolds at the critical force to break GC stacking base pairs.

The refolding curves for M1 (blue) and M2 (red) show most often a small hysteresis below the force drop associated with the strong (GC) stem's opening. For M2, a second small refolding hysteresis occurs also usually below the force drop associated with the weaker (AU) stem's opening. By contrast, a much stronger hysteresis is systematically observed for M3 (magenta), even at the lowest loading rate achieved, 3 pN/s. Moreover, in this case, the refolding event around 10 pN does not usually fold back onto the initial stretching curve. This suggests that the stretching of M3 involves long-lived intermediate structures including non-native helices (see Fig. 3 and next section on stochastic simulations of small RNA motifs). Still, all three molecules eventually fold back in their initial native structure after a few seconds, as shown by the reproducibility of force extension curves in successive pulls on the same molecule.

### Stochastic unfolding/refolding simulations of small RNA motifs

We have performed stochastic simulations of these out-of-equilibrium unfolding/refolding experiments for the short M1, M2 and M3 structural motifs. The heart of



**Fig. 2.** A: Histogram of the measured rupture forces for the three structural motifs (3pN bins). B: Experimental force-extension curves of the three structural motifs. Note hysteresis between unfolding (black) and refolding curves (color). C: Corresponding stochastic simulations. The mechanical stiffness of the optical tweezer and the wormlike chain elasticity of the pUC19 dsDNA extensions (which curves the experimental force-extension slope at low stretching force) are combined for simplicity into an effective stiffness with a slope fitted on the experimental curves (0.1 pN/nm).

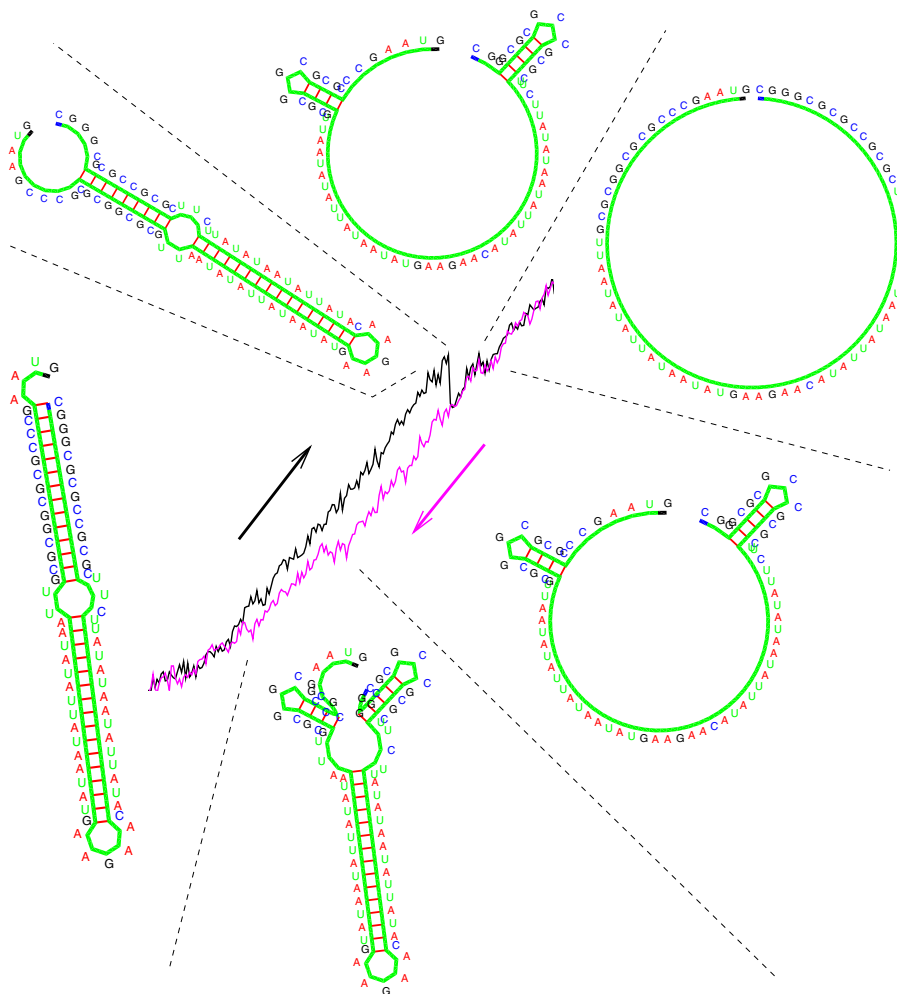
the numerical method, following the approach detailed in [17, 18], consists in simulating the stochastic unfolding and refolding of helices not only present on the initial RNA structure but also for *all other helices* which can possibly pair on the RNA sequence of interest (see also RNA *Kinefold* server at <http://kinefold.u-strasbg.fr>). Common pseudoknots (i.e., helices interior to loops) are also allowed following the structural modeling approach proposed in [17, 18]. In addition, the region of the RNA structure under *direct* mechanical tension (corresponding to the

“on-net” backbone in [17, 18]) is modelled as an inextensible wormlike chain with a 1.5 nm persistence length [2] and 0.7 nm/base contour length [19]. Stretching is induced by a slowly varying rigid constraint on the end-to-end distance of the RNA-dsDNA-tweezer construct (rate  $\pm 300$  nm/s in  $\pm 2$  nm steps). It is also important to take into account the acquisition rate (300 Hz) and to model the statics and dynamics of the optical tweezer trap, although time scale separation allows to consider that the micromechanical setup responds to a slow time average of the fast RNA dynamics, which corresponds to stochastic closing and opening of single helices [17, 18]. To avoid overfitting with non essential parameters, we have simply modelled the trapped bead and the two dsDNA extensions of the construct as an ideal spring with a slow viscous relaxation time (1 ms) and an effective stiffness (typically 0.1 pN/nm) fitted on the individual force extension curves.

The simulated force-extension responses for the M1, M2 and M3 motifs (Fig. 2C) are in good agreement with the unfolding and refolding experimental results (Fig. 2B). In particular, they allow for the identification of likely intermediate structures involved in the refolding hysteresis, which primarily correspond to the formation of two non-native helices originating from each strand of the strong (GC) helix, Figure 3. The transition from these alternative helices back to the strong initial (GC) stem is facilitated under high external force, hence the small hysteresis for M1 and M2. By contrast for M3, the transition can only occur at a lower force after the weak (AU) stem has refolded and is, therefore, slower, as observed experimentally. Note, the small experimental differences in the hysteresis responses of M1 and M2 are well reproduced on their simulated force-extension curves, suggesting that elementary unfolding/refolding events are reliably captured by these stochastic simulations devised to probe RNA molecular dynamics on second to minute time scales. It should be emphasized that such long time scale simulations could not be achieved for other molecules, such as proteins, for which elementary unfolding/refolding transitions are not so easily defined and also much more frequent. For instance, the best molecular dynamic simulations of proteins are currently limited to around 100 ns [21].

The force-induced unfolding of these three generic structural motifs M1, M2 and M3, reveals the potential and limitations of single molecule experiments to probe the main folded features of more complex RNA structures. The comparison between M2 and M3’s force-extension responses illustrates that the order of helix stability along a single secondary structure branch can be readily identified, while the bifurcation arrangements of helices or the presence of multibranch loops are not so easily distinguished from single branches with increasing helix stability (as in M1 versus M2). Moreover, the formation of non-native rearrangements under stretching likely affects the force-extension responses of most RNA structures (as for M3).

In this context, combining experimental and numerical approaches to study RNA mechanical unfolding pathways seems promising insofar as transient structural



**Fig. 3.** Interpretation of the experimental unfolding/refolding hysteresis for the structural motif M3 (see text). Regions under tension are drawn on a circle for convenience [20].

rearrangements (under stretching) are difficult to probe with traditional chemical or enzymatic techniques.

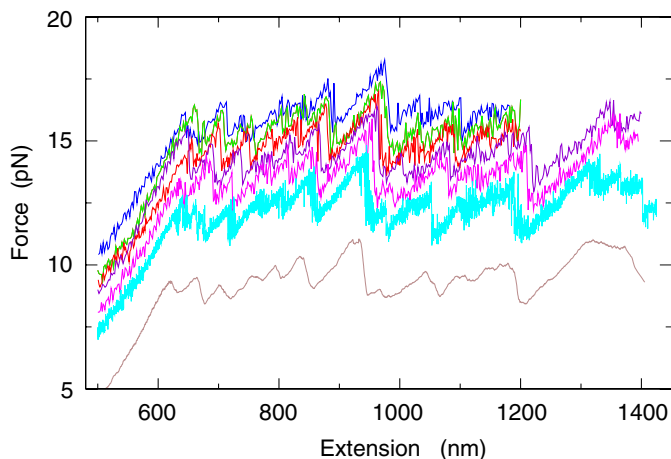
On the other hand, for long RNA molecules (e.g., >1000 bases), it has been argued [9–11] that such structural rearrangements under stretching should ultimately smooth out the observed characteristics completely by continuous adjustments to the applied constraint, assuming that quasi-equilibrium stretching is achieved.

To investigate this issue and test whether large structures of biologically relevant RNA molecules are also amenable to convergent studies in both single molecule experiments and stochastic simulations, we decided to study the mechanical unfolding of *Escherichia coli*'s 1540-base long 16S ribosomal RNA.

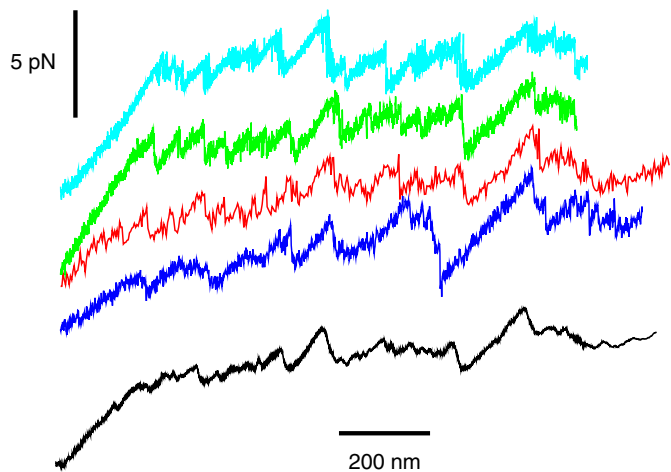
### Single molecule stretching experiments of *E. coli* 16S rRNA

The force-induced stretching of *E. coli* 16S ribosomal RNA was studied using a similar molecular construct and micromechanical setup as for the stretching of the small

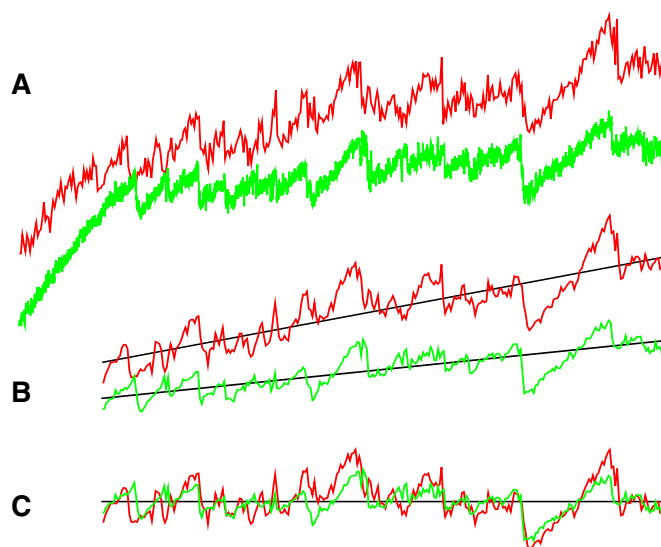
structural modules M1, M2 and M3 (see Materials and Methods). No ribosomal proteins which associate to 16S rRNA to form the 30S subunit [22] of the ribosome [23] were included for these stretching experiments. As the piezo stage is displaced, the force begins to rise due to the elastic response of the DNA handles. The results in Figures 4–5 show a well-structured and reproducible unfolding pathway under mechanical stretching, in about 50% of the tested constructs for which more than two unfolding/refolding rounds could be performed before molecular breakage. In these cases (total 44 stretching curves), a  $\sim 1 \mu\text{m}$ -long quasi plateau is observed around 11–15 pN, with force fluctuation amplitude of about 20%. This signal is the signature of 16S rRNA unfolding by mechanical force. Other stretching curves exhibit somewhat more erratic behaviors, presumably due to non-specific interactions of the construct with the glass surface of the capillary (data not shown) Extension beyond the unfolding plateau corresponds to the combined elastic response of the dsDNA handles and the opened ssRNA molecule. Most refolding curves exhibit strong hysteresis depending on stage velocity (50–300 nm/s).



**Fig. 4.** Experimental unfolding of *Escherichia coli*'s 1540-base long 16S ribosomal RNA by mechanical stretching (rate 300 nm/s). Colors correspond to successive stretching rounds of the *same* molecule (refolding hysteresis are not shown for clarity). An increasing maximum extension was applied at successive stretching/refolding rounds to avoid early breakage by overstretching. As a result, the RNA molecule was not entirely unfolded until the sixth stretching/refolding round. Force-extension curves are slightly shifted vertically and horizontally to best display the overall reproducibility between successive extensions. The mechanical unfolding over the full extension range of the molecule presents a characteristic unfolding plateau between 11 and 15 pN. This is the mechanical unfolding signature of *E. coli*'s 16S rRNA. The brown curve (bottom) corresponds to the average of the colored curves above.



**Fig. 5.** Reproducibility of the experimental unfolding of *E. coli* 16S ribosomal RNA under mechanical stretching (rate 50–300 nm/s). Colors correspond to stretching responses of *different* 16S molecules taken from *independent* sample preparations and *independent* micromechanical experiments (refolding hysteresis are not shown for clarity). The force-extension curves have been shifted vertically and horizontally to best display the overall reproducibility between these independent measurements. The black curve (bottom) corresponds to the average of the four colored curves above.



**Fig. 6.** Statistical comparison of stretching responses. A: Two *independent* unfolding curves of 16S rRNA with different sampling rates (green and red curves from Fig. 5). B: Extraction of unfolding plateau signals from the overall non-specific stretching curves and uniform smoothing ( $N = 300$  regularly sampled points). This enhances correlation sensitivity to the specific unfolding signatures around the median line fits (i.e., line minimizing absolute deviations [24]). C: Deviations from the median line fits are used to calculate the *relative* Spearman correlation coefficient  $r_s$  [24] between unfolding curves (see text). In the example shown,  $r_s = 60.5\%$  which corresponds to a very good correlation between the two experimental deviations relative to the median line fits. Evaluating, instead, *absolute* correlations between actual unfolding responses (above curves) yields an even larger, *yet less discriminating*, Spearman coefficient  $r_s = 90\%$ , due to the small positive slopes of both unfolding plateaux.

We have quantitatively evaluated the statistical reproducibility of unfolding curves between successive stretchings of the *same* 16S molecule (Fig. 4) and between *independent* unfolding curves from *different* 16S molecules (Fig. 5) (i.e., *different* sample preparations and *different* micromechanical experiments). The analysis is based on the calculation of Spearman nonparametric correlation coefficient  $r_s$  [24]:  $r_s = \Sigma_i^N (R_i - \bar{R})(S_i - \bar{S}) / (\Sigma_i^N (R_i - \bar{R})^2 \Sigma_i^N (S_i - \bar{S})^2)^{1/2}$ , where  $R_i$ ,  $\bar{R}$  and  $S_i$ ,  $\bar{S}$  are chosen as the rank-ordered *deviations* and averages from the *median line fits* of the unfolding plateaux (Fig. 6). Such *relative* Spearman correlation coefficient is much more sensitive to the specific unfolding signals, as compared to the *absolute* Spearman correlation of the actual unfolding curves which yields higher, yet less discriminating correlation coefficients (see Fig. 6 for details).

In the context of comparing 16S unfolding curves, we found that this relative Spearman correlation coefficients correspond to good correlations above 50% and excellent ones above 70%, while  $|r_s| < 15\%$  reflects little or no correlation between unfolding pathways irrespective of the overall inclination of their unfolding plateaux.

Stochastic reproducibility between successive stretchings of the *same* molecule is remarkably high ( $r_s = 75 \pm 4.6\%$ , Fig. 4) and still quite good between unfolding curves of *different* 16S rRNA ( $r_s = 53 \pm 9.1\%$ , Fig. 5) despite inherent variations between *different* sample preparations and *different* micromechanical experiments. For instance, correlation between *independent* green and red unfolding curves in Figure 6 is:  $r_s = 60.5\%$ , while the correlation distributions of all *independent* curves of Figure 5 (colors) with their *average* unfolding response (black) is even higher:  $r_s = 70 \pm 4.7\%$ . See Table 1 for further correlation data and quantitative comparison with stochastic simulations.

Before discussing the stochastic unfolding/refolding simulations of 16S rRNA, we want to emphasize that force fluctuations from the plateau median line cannot be attributed to dehybridization of the DNA handles for the following reasons: i) we never recorded such signals on simple pUC19 dimer without RNA insert (see Fig. 1 inset). ii) experiments done by other groups with the same infrared laser power have preserved nucleic acids' integrity [2, 25]. iii) recalling that we pull on opposite DNA strands, the average force magnitude at which the plateau appears is too low to originate from DNA denaturation [1–3]. Moreover, no torque is applied on the molecules using our optical tweezer [4]. In addition, experimental force fluctuations cannot correspond to the unzipping of a long structureless double stranded RNA molecules; an analysis based on G+C contents as in reference [26] does not account for the experimental signal, nor does a thermal equilibrium energy calculations.

### Stochastic unfolding/refolding simulations of 16S ribosomal RNA

The unrestricted stochastic simulations discussed above to model the mechanical unfolding and refolding of small structural motifs are numerically unpractical in the case of much larger RNA structures like those of ribosomal RNAs. Hence, we have made the following three additional assumptions to study the force-induced stretching of *E. coli's* 1540-base long 16S ribosomal RNA: i) the *initial* structure before mechanical stretching is assumed known from independent sources; ii) Unfolding and (re)folding dynamics is restricted to the formed helices under *direct* mechanical tension *and* to all potential helices that would be under *direct* tension once formed. Hence, large scale structural rearrangements can only originate and propagate from helices directly coupled to the applied mechanical tension, as expected under strong stretching conditions; iii) For each intermediate structure along the unfolding pathway, the actual base pair extent of each helix under direct tension is *not globally optimized* to best fit the end-to-end molecular extension imposed by the mechanical setup (this would become exponentially difficult in the number of such helices). Instead, a local heuristics extending the most stable base pair stacks and shrinking the weakest helix ends is used iteratively to minimize free energy. This approach, which yields a linear optimization

in the number of helices under direct tension, is usually very good as long as there are few mutually incompatible helices competing for the same bases, a typical situation under strong mechanical stretching. Overall, we found that these restricted stochastic simulations give virtually identical results for the small M1, M2 and M3 motifs (results not shown).

Adopting this heuristic numerical approach for the bare *E. coli* 16S rRNA, we simulated the force-induced unfolding pathway starting either from the known native secondary structure inside the ribosome [22, 23] or from a low free-energy structure predicted by mfold, referred at, hereafter, as the “control structure” (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>). The comparison between the force-extension responses of these two structures was primarily intended to probe the stochastic simulation's sensitivity to the initial structure. In both cases, the role of helices not initially formed on the starting structure was studied, by allowing a variable number of helices to form and break during different stochastic simulations. The results in Figure 7 and Table 1 show that a reasonable agreement exists between the experimental measurements (black and brown curves) and the simulated force-extension responses starting from the known native structure, when *all helices longer than 3bp and more stable than 10kT* (i.e., 6 kcal/mol) are included *a priori* in the simulations (red curves). This demonstrates that some of these 18,000 different non-native helices play a significant structural role along the unfolding pathway. More quantitatively, cross-correlations amongst 4 independent simulated stretching curves (i.e., about 3 weeks of CPU on a 1.2GHz PC) reveal a good stochastic reproducibility in these simulations starting from the native structure and including about 18,000 possible helices:  $r_s = 57 \pm 3.8\%$ . This is comparable to observed variations between experimental unfolding curves (see Tab. 1). Then comparing these individual simulations with the experiment average curve (black curve in Figure 5 from 4 independent experiments), we obtain a significant correlation coefficient:  $r_s = 47 \pm 8.8\%$ , while correlating the experiment average (black) directly to the simulation average clearly reflects common features between the experimental response and the simulated unfolding pathway curve starting from the native structure:  $r_s = 55\%$ . In addition, restricting simulations to the 6,500 possible helices longer than 3bp and stronger than 15 kT (magenta curves) or including even fewer helices (blue and green curves), produces marked differences on the simulated stretching curves (Tab. 1 shows lower averages and larger standard deviations for the simulation stochastic reproducibility and for the correlations with experimental response). By contrast, equivalent stochastic simulations starting from the control structure (Fig. 7) present clearly distinct results from experimental observations, i.e.,  $|r_s| < 15\%$  (even for a large number of possible helices included in the simulations). The fact that the stochastic reproducibility of these control simulations happens to decrease with the number of possible helices taken into account (Tab. 1) reflects the concomitant decrease of

**Table 1.** Statistical correlations between 16S rRNA mechanical responses under stretching. Spearman correlation coefficients  $r_s$  [24] are given between the deviations from the median line fits of the unfolding plateaux (see text and Fig. 6). Statistics are made from: 4 to 10 unfolding curves for each of the 4 stochastic simulation conditions (A, see text and Fig. 7); *independent* experiments on 4 *different* 16S rRNA molecules (B, from Fig. 5); and 6 successive stretchings from the *same* 16S molecule (C, from Fig. 4). Curves are compared both between each other within each set (to evaluate “stochastic reproducibility”) and with the experiment average response (black curve on Fig. 7).

16S rRNA unfolding response		Stochastic reproducibility		Comparison with experiment average ( <i>black</i> )	
Deviation from median line		Ensemble cross-correlation (mean $\pm$ std dev.)		Correlation distribution (mean $\pm$ std dev.)	
<b>A</b>	<b>Simulations</b> including:	Native structure	Control structure	Native structure	Control structure
$\sim 80$ initial helices	( <i>green</i> )	20 $\pm$ 21%	20 $\pm$ 20%	23 $\pm$ 32%	12 $\pm$ 12%
1,500 helices <i>incl.</i> 5'GC/GC3'	( <i>blue</i> )	22 $\pm$ 28%	48 $\pm$ 21%	31 $\pm$ 30%	-1.7 $\pm$ 8.5%
6,500 helices >15 kT, 3bp	( <i>magenta</i> )	12 $\pm$ 22%	27 $\pm$ 12%	21 $\pm$ 17%	14 $\pm$ 8.6%
18,000 helices >10 kT, 3bp	( <i>red</i> )	<b>57 <math>\pm</math> 3.8%</b>	15 $\pm$ 10%	<b>47 <math>\pm</math> 8.8%</b>	<b>-7.2 <math>\pm</math> 12%</b>
simulation average	( <i>red</i> )	NA	NA	<b>55%</b>	<b>-1.1%</b>
<b>B</b>	<b>Experiments</b> on <i>different</i> molecules	<b>53 <math>\pm</math> 9.1%</b>		<b>70 <math>\pm</math> 4.7%</b>	
experiment average	( <i>black</i> )	NA		100% (reference)	
<b>C</b>	<b>Experiments</b> on the <i>same</i> molecule	<b>75 <math>\pm</math> 4.6%</b>		<b>71 <math>\pm</math> 4.7%</b>	
experiment average	( <i>brown</i> )	NA		<b>75%</b>	

specific unfolding signal relative to the median line fit of the plateau (Fig. 7). A decreasing signal over noise ratio naturally leads to a lower reproducibility of the simulated curves. The same trend is also visible between blue and magenta curves for simulations starting from the native structure.

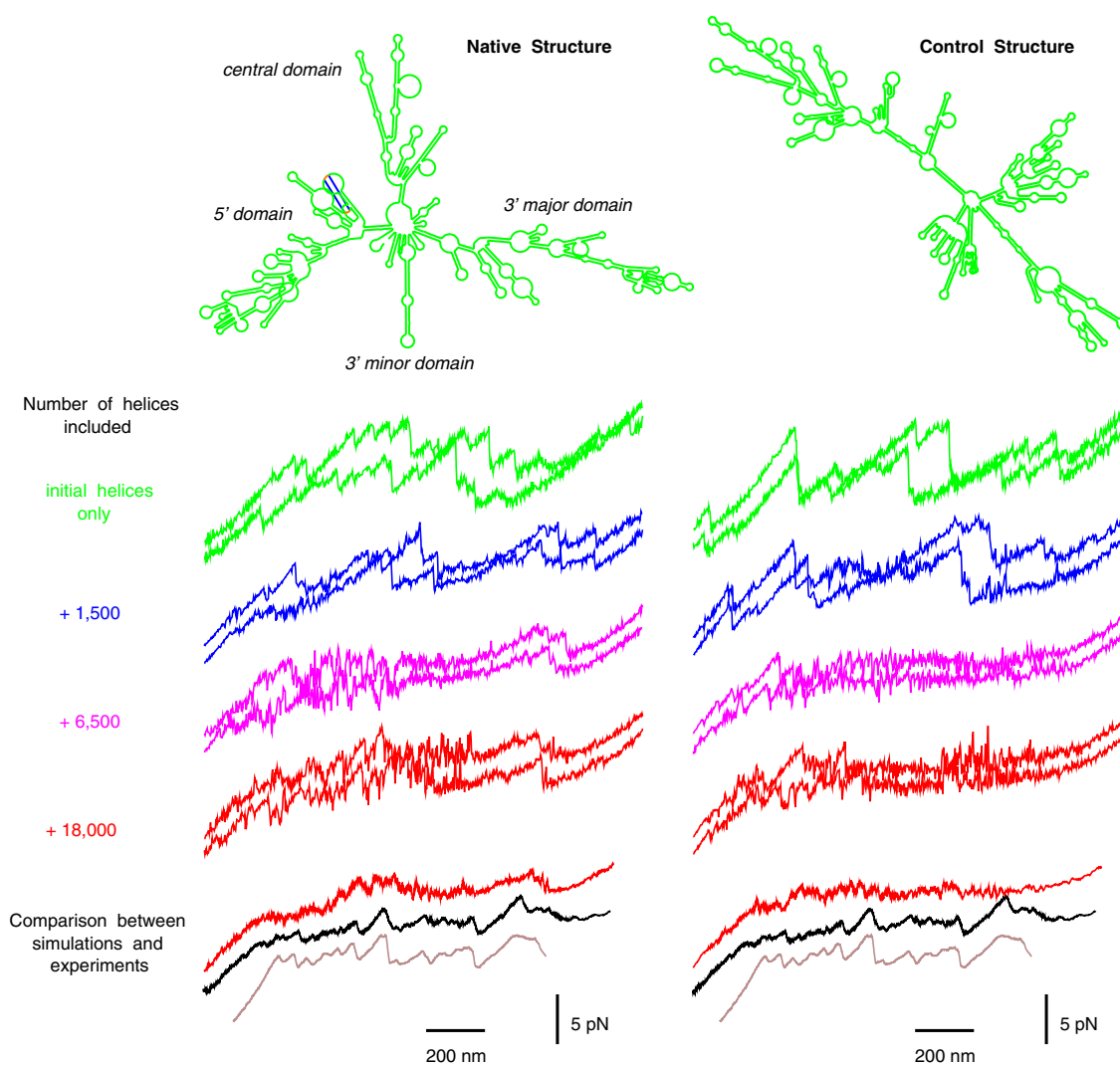
Figure 8 compares more closely a simulated force-extension response of the known native structure (red) and an experimental stretching curve (black). Again, both simple visual comparison and calculation of their correlation coefficient as above (here  $r_s = 61\%$ ) strongly suggest that the experimentally probed structure shares, indeed, more structural features with the actual native structure than with the control structure (Fig. 7), in spite of the absence of ribosomal proteins in these single molecule stretching experiments of *E. coli*'s 16S rRNA. Analysing the unfolding pathway during the simulated force-extension response reveals that the main predicted unfolding events (corresponding to abrupt force drops on the red curve) are either related to the *cooperative opening of several native helices* (as in the unfolding of M3) or to the *simultaneous rearrangements of mainly non-native helices* leading to a step-wise increase of the predicted extension of the molecule along the direction of pulling (violet curve). This is illustrated with 12 successive snapshots of intermediate structures along the stretching-induced unfolding pathway. In particular, the 3' major (*III*) and 3' minor (*IV*) domains are shown to break and partially rearrange at the start of the stretching plateau (intermediates 2 to 4) while the 5' domain (*I*), partially unfolded between intermediates 4 and 5, remains then largely intact until most other native and non-native helices have been opened under stretching (intermediate 11). Finally, the central domain (*II*) exhibits a more distributed unfolding fate which extends from intermediates 1 to 10. Hence, mechanical breaking of the native structure does *not* occur through successive openings of entire native domains. Instead, native helices contribute to a more complex (yet largely reproducible) se-

quence of force drops, reflecting also the rearrangements of non-native helices. For instance, this is the case for the recorded signal between intermediates 8 and 10 which is largely caused by successive rearrangements of weak non-native helices between 10 kT and 15 kT (compare magenta and red curves for the native structure in Figure 7 and experimental and simulated curves in Fig. 8). In retrospect and more generally, these results underline the possible pitfalls in attempting to assign specific structural features of large RNA molecules by studying the mechanical unfolding of their independently folded domains separately.

## Discussion

We have measured the force range to unfold RNA secondary structures by mechanical stretching experiments. It extends from 10 pN for AU rich to 25 pN for GC rich regions in agreement with intermediate values reported for intermediate G+C contents. We also showed that non-native rearrangements have a large influence on force-extension measurements of complex RNA structures, as in the case of *E. coli*'s 16S rRNA presented here.

Interestingly, this force-induced unfolding process of the bare 16S rRNA's domains seems to mirror, only in reverse order, the predominant 5' to 3' polarity of the *in vitro* assembly of 16S rRNA into 30S ribosomal subunits [28]. From a more general perspective, the high reproducibility of the mechanical unfolding curves shown here (e.g., Figs. 4–5) sharply contrasts with the multiple folding and misfolding pathways usually experienced by RNA molecules of this size during thermal renaturation. This reflects the fact that unfolding/refolding pathways under mechanical constraint solely explore a restricted number of possible intermediate structures, as compared to unconstrained denaturation/renaturation folding experiments. In other words, single molecule unfolding and

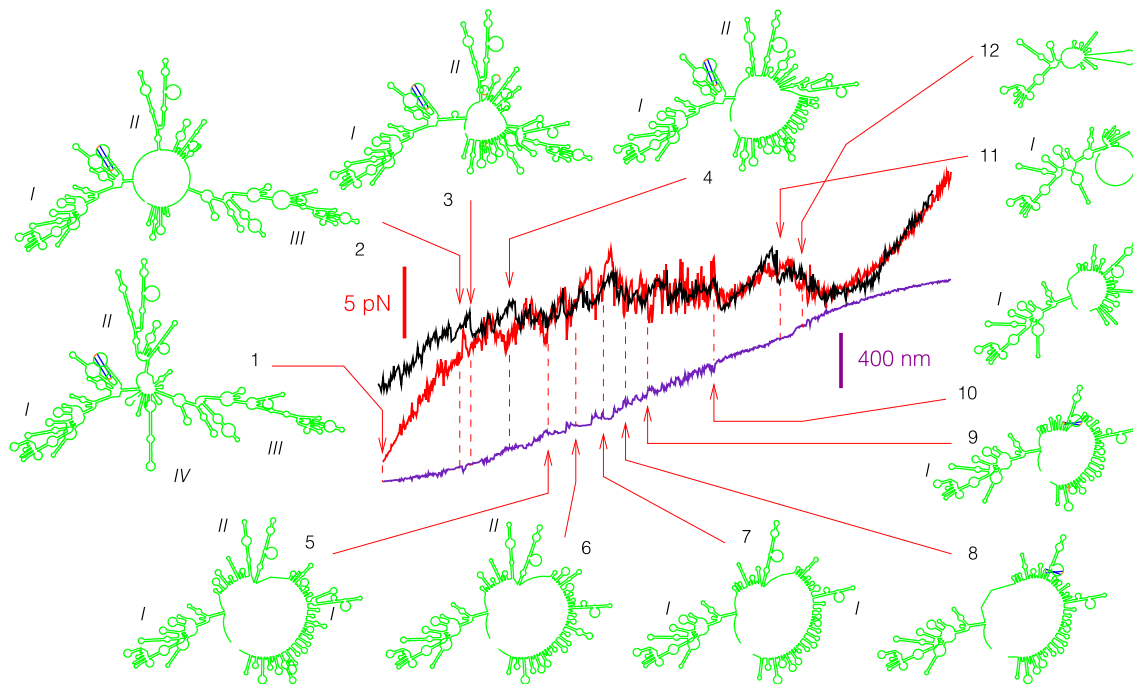


**Fig. 7.** Simulated force-extension responses of *E. coli*'s 16S rRNA starting from the known native structure [22,27] (left) and from a low energy control structure (right). Two stretching curves are plotted for each simulation conditions (various colors) to illustrate reproducibility. Cross-correlations between unfolding curves in each simulation conditions and quantitative comparison with experiments are presented in Table 1. Red curves (see below) for the native structure (left) resemble most closely the experimental curves (brown from Fig. 4 and black from Fig. 5) also plotted for comparison. (Green): the stochastic simulation is restricted to the sole helices formed on the initial structure assuming, in addition, that those cannot refold once broken (78 helices for the native structure; 86 helices for the control structure). (Blue): the initial helices and some 1,500 additional stems longer than 3bp and containing the most stable stack (5'-GC/GC-3') can form and break stochastically during stretching. (Magenta): all additional helices longer than 3bp and stronger than 15 kT are also included; total: 6,500 helices. (Red): all additional helices longer than 3bp and stronger than 10 kT are also considered; total: 18,000 helices. The lowest red curve corresponds to the average of four independent stretching simulations starting either from the native structure (left) or the control structure (right).

refolding experiments under mechanical control probe particular, well-defined pathways due to the slowly varying external constraint applied onto the ends of the RNA molecule. In addition, we found that the overall unfolding curves did not critically depend on the rate of pulling used (typically 300 nm/s); for instance, imposing an extension rate twice as fast or twice as slow did not significantly modify the force-extension curves (data not shown). In retrospect, this restricted set of unfolding pathways and their relative insensitivity to the precise values of external parameters also explain why we could simulate these

force-induced unfolding pathways starting from a given secondary structure, while predicting such 1540-nucleotide initial structure *a priori* is still beyond the current limitations of secondary structure prediction algorithms.

Despite clear similarities, the agreement between simulated and experimental force-extension responses in Figure 8 is uneven. In fact, variations between predicted (red) and measured (black) curves might reflect real differences between the probed structure and the actual native secondary structure inside the ribosome [22,23] used here as



**Fig. 8.** Comparison between simulated force-extension response from the known native structure [22,27] (red) and an experimental stretching curve (black) of *E. coli*'s 1540-base long 16S ribosomal RNA. Spearman correlation coefficient on this example:  $r_s = 61\%$ . The simulated end-to-end molecular extension of the 16S rRNA is also plotted (violet). Twelve intermediates on the simulated unfolding pathway are drawn starting with the known native structure. Single stranded regions under tension are not drawn for convenience, hence the overall decreasing size of the structure under stretching.

the initial structure in the simulations. In particular, deviations at the beginning of the stretching plateau might originate from alternative base pair (re)folding of the 3' major domain (*III*) due to the absence of essential ribosomal proteins (e.g., as s7 [29]) and  $Mg^{2+}$  ions. Moreover, the relatively short time scales (few seconds) of these stretching-induced unfolding/refolding experiments might not be sufficiently long to let 16S rRNA find its lowest free energy structure between successive pulls.

These results illustrate what should be expected, in general, when RNA secondary structures are probed by mechanical force. Strong helices resist until their breaking exposes weaker regions, which are unable to withstand such high forces. This leads to the unfolding of a significant domain with a concomitant force drop. A fraction of the unpaired bases then typically reform different helices, which compensate, *in part*, for the sudden relaxation of the mechanical tension. Yet, force-extension responses are *not completely* smoothed out, as initially suspected [9–11], by these local rearrangements. Instead, they reveal the slow dynamics of large scale cooperative changes in complex RNA structures. Tertiary interactions, likely marginal here due to the absence of  $Mg^{2+}$  ions, are expected to strengthen the unfolding cooperativity between interacting domains and, concomitantly, increase the reformation of non-native helices upon stretching.

Local rearrangements of RNA molecules, similar to those reported here, likely occur *in vivo* as well, in particular, during translation when large domains of messenger RNAs become unfolded upstream of the ribosome. In

fact, the influence of long-lived intermediate structures is likely ubiquitous to the RNA folding problem itself, as slow structural rearrangements are known to occur in the context of both *in vitro* and *in vivo* RNA folding processes [12,13]. New experimental tools are needed to better understand the strategies of RNA molecules in circumventing such kinetic traps (for instance through specific interactions with ions or proteins [30], through RNA chaperones [13] or co-transcriptional encoded folding pathways [17,18]).

By exploring RNA structure energy landscapes [31], micromanipulations combined with appropriate stochastic simulations can help address such questions, reflecting both structural and metastability features of single RNA molecules.

#### Added note:

Onoa et al. [32] have recently reported experimental results on the mechanical unfolding of the L-21 derivative of *Tetrahymena thermophila* ribozyme, a 390-nucleotide catalytic RNA. By contrast with the present study which strictly focuses on the RNA secondary structure level (no  $Mg^{2+}$  added), Onoa et al. primarily investigate the tertiary fold of this selfsplicing ribozyme in the presence of  $Mg^{2+}$ . A variety of hysteresis responses to the applied force is presented for various parts of the molecule or in the presence of specific antisense oligos. A direct correlation between  $Mg^{2+}$ -dependent unfolding events and the opening of specific native helices is proposed.



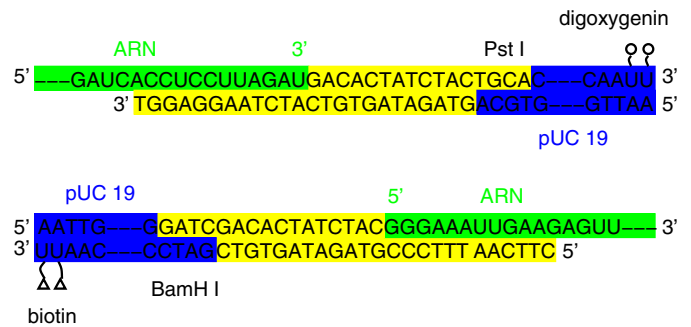
## Materials and methods

**Sample displacement:** Sample displacement is driven and monitored by a nanometer resolution piezoelectric stage with capacitive position sensor (P530-3, Physik Instrument). The piezoelectric stage position is controlled and monitored by a 0–10 V voltage.

**Optical tweezer:** The optical tweezer consists of a Nd:Yag infra-red laser beam (TOPAZ, Spectra Physics) focused inside the capillary by a 1.3 N.A.  $\times 100$  objective (Zeiss). The laser is always set at full power (2.5 W) and the stiffness of the trap is controlled by the amplitude of an acoustic wave generated by an acousto-optic modulator (A-A) placed right after the laser head. The experiments described here were performed with a 50% attenuation of the laser intensity, which sets the optical trap stiffness around  $7 \times 10^{-5}$  N/m. The bead displacement from the laser beam focus point is measured as follows: after passing through the sample, the bead diffused light is collected by a 0.6 N.A.  $\times 40$  objective (Zeiss). The objective back focal plane is imaged by a lense of 40 mm focal length onto a two-quadrant photodetector (S5980, Hamamatsu). The whole experiment setup is mounted on an Invar table so as to minimize thermal position drift. The photodiode electric currents  $I_A$  and  $I_B$  are converted into voltage and amplified by a home made amplifier. The voltage difference  $V_A - V_B$  which is proportional to the distance of the bead away from the trap center is further amplified and filtered at 300 Hz by low noise amplifier (SR-50, Stanford Research Instrument). The total light intensity that is collected by the  $\times 40$  objective measured by the voltage sum  $V_A + V_B$  is also amplified.

**Data acquisition:** The monitoring voltage coming out of the piezoelectric driver, the voltage difference  $V_A - V_B$  and the voltage sum  $V_A + V_B$  coming out of the low noise amplifier are each directed into a separate channel of an acquisition board (ATMIO-16X, National Instrument). The driving voltage of the piezoelectric stage is generated by the same board. The acquisition rate is 300 Hz which sets the duration of the stretching/relaxing experiment around 10–20 seconds.

**Calibration:** The fourier power spectrum of a free bead inside the trap follows a Lorentzian law as expected for Brownian fluctuations. Fitting this curve with two parameters provides both the trap stiffness and the voltage/distance conversion factor. In the case of a pulling experiment, these two parameters are used to convert the ratio  $(V_A - V_B)/(V_A + V_B)$  directly into piconewtons. The maximum force that can be measured with our setup is 60 pN. The bead position resolution inside the trap is  $\pm 5$  nm which sets the force resolution at  $\pm 0.4$  pN. The bead is captured at about 500–1000 nm from the capillary interior surface. The pUC19 dimer contour length is 1742 nm (0.33 nm/pb). The geometry imposes to displace the piezo stage by 48.8–56 nm and 985–1108 nm to completely unfolded the small RNA motifs and 16S rRNA, respectively.



**Fig. 9.** Detailed molecular junctions between RNA 3' end and digoxigenin labelled pUC 19 (top) and between RNA 5' end and biotin labelled pUC 19 (bottom). Blue: pUC 19 DNA; Yellow: ssDNA oligos; Green: RNA insert.

**Molecule synthesis and functionalization:** RNA molecules were synthesized by *in vitro* "run off" transcription of EcorV linearized DNA plasmids. These plasmids were constructed by inserting DNA oligomers (IBA GmBh) starting with a T7 promoter region inside the BamHI-PstI region of pUC19. The RNA sequence was flanked by 12 nucleotides at both extremities to allow for the ligation with the double-stranded DNA arm extensions. In the case of 16S rRNA, the gene was isolated by PCR from pKK3535 plasmid (courtesy of K. Lieberman and H.F. Noller). It was cut by BstEII-BclI and then inserted in pUC19 together with oligomers carrying a T7 promoter with the DNA arm extensions and the complementary ends of the 16S sequence. The reconstructed plasmids were produced in competent DH5 alpha bacteria and were extracted and purified using Jetstar purification kit. They were further sequenced. Due to the small length of RNA molecules, there were extended with digoxigenin or biotin labelled dsDNA at, respectively, the 3' and 5' ends to enable grafting between the capillary glass surface and the silica bead. In practice, DNA oligomers (Fig. 9) were first ligated to Pst I restricted digoxigenin labelled pUC19 to yield a 12-nucleotide 3' extension complementary to the RNA 3' end. Then, the DNA/RNA hybridization and ligation protocol was the following: RNA was heated to 90 °C for 5 minutes then quenched on ice. It was incubated with the former prepared pUC19 (molar ratio 100/1) at 70 °C for 20 minutes and then slowly cooled ( $\ll 0.6$  °C/min) to 16 °C. At this temperature, T4 DNA ligase and buffer were added and the ligation reaction was carried over 4 hours at 16 °C. The band corresponding to the pUC19 molecular weight on a 0.7% agarose gel was purified using Qiaquick (Qiagen). The whole procedure was repeated with the RNA 5' end using a BamH I restricted biotin labelled pUC19 DNA (Fig. 9). The band corresponding to a pUC19 dimer molecular weight on a 0.7% agarose gel was purified using Qiaquick (Qiagen). In the case of the 16S RNA, the functionalization protocol was slightly modified. The oligomers were first hybridized with the RNA 3' end following the heat-cooling protocol described above. The excess oligomers were washed away by 2 consecutive centrifugations at  $4000 \times g$  and 16 °C

using GS-200 microspin column. The Pst I restricted digoxigenin labelled pUC19 DNA, T4 DNA ligase and buffer were added and the ligation reaction was carried over 4 hours at 16 °C. The same procedure was repeated with the 5' end and the molecule was purified on an 0.7% agarose gel by cutting the band corresponding to a pUC dimer molecular weight. Prior to the experiment, the molecules are incubated with the streptavidin coated beads (Bangs Laboratories) for 30 minutes. The solution is introduced in the rectangular capillary by a peristaltic pump which allows buffer circulation. All experiments were performed at room temperature and in Tris 10 mM pH 7 NaCl 250 mM buffer.

We thank K. Lieberman and H.F. Noller for kindly providing us with the pKK3535 plasmid, D. Evers and R. Giegerich for the use of their "RNAMovies" software, and L. Bourdieu, C. Ehresmann, S. Lodmell, T. Pan, M. Poirier and E. Westhof for discussions and suggestions. This work was supported in part by an ACI "Jeunes Chercheurs" grant from Ministère de la Recherche (France), an NOI grant from the CNRS, and by the "Physique et Chimie du Vivant" program of the CNRS.

## References

1. P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, F. Caron, *Science* **271**, 792 (1996)
2. S.B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, *Science* **271**, 795 (1996)
3. J.-F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, J.F. Marko, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 1066 (1999)
4. J.-F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery, V. Croquette, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14152 (1998)
5. M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, H.E. Gaub, *Science* **276**, 1109 (1997)
6. M.S.Z. Kellermayer, S.B. Smith, H.L. Granzier, C. Bustamante, *Science* **276**, 1112 (1997)
7. M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, H.E. Gaub, *J. Mol. Biol.* **286**, 553, (1999)
8. J. Liphardt, B. Onoa, S.B. Smith, I. Tinoco Jr., C. Bustamante, *Science* **292**, 5517 (2001)
9. A. Montanari, M. Mézard, *Phys. Rev. Lett.* **86**, 2178 (2001)
10. U. Gerland, R. Bundschuh, T. Hwa, *Biophys. J.* **81**, 1324 (2001)
11. D.K. Lubensky, D.R. Nelson, *Phys. Rev. E* **65**, 031947 (2002)
12. D.K. Treiber, J.R. Williamson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 339 (1999)
13. S.A. Woodson, *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 796 (2000)
14. M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H.E. Gaub, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 346 (1999)
15. S. Cocco, R. Monasson, J.F. Marko, *Phys. Rev. E* **65**, 041907 (2002)
16. D.H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D.H. Turner, *J. Mol. Biol.* **288**, 911 (1999)
17. H. Isambert, E.D. Siggia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6515 (2000)
18. A. Xayaphoummine, T. Bucher, F. Thalmann, H. Isambert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 15310 (2003)
19. W. Saenger, in *Principles of nucleic acid structure*, (Springer-Verlag, New York, 1984).
20. D. Evers, R. Giegerich, *Bioinformatics* **15**, 32 (1999)
21. A.R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14122 (2002)
22. B.T. Wimberly, D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr, R.J. Morgan-Warren, A.P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature* **407**, 327 (2000)
23. M.M. Yusupov, G.Zh. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T.N. Earnest, J.H.D. Cates, H.F. Noller, *Science* **292**, 883 (2001)
24. W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery, *Numerical recipes*, 2nd edn. (University Press, Cambridge, 1992)
25. K. Svoboda, S.M. Block, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247 (1994)
26. B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, F. Heslot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11935 (1997)
27. R.R. Gutell, J.C. Lee, J. Cannone, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 301 (2002)
28. T. Powers, G. Daubresse, H.F. Noller, *J. Mol. Biol.* **232**, 362 (1993)
29. V. Nowotny, K.H. Nierhaus, *Biochemistry* **27**, 7051 (1988)
30. D.K. Treiber, J.R. Williamson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 309 (2001)
31. W. Fontana, P.F. Stadler, E.G. Bornberg-Bauer, T. Griesmacher, I.L. Hofacker, M. Tacker, P. Tarazona, E.D. Weinberger, P. Schuster, *Phys. Rev. E* **47**, 2083 (1993)
32. B. Onoa, S. Dumont, J. Liphardt, S.B. Smith, I. Tinoco Jr., C. Bustamante, *Science* **299**, 1892 (2003)

## Subnanometric measurements of evanescent wave penetration depth using total internal reflection microscopy combined with fluorescent correlation spectroscopy

S. Harlepp

*Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, CNRS-ULP, 3 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France and The Institute for Biophysical Dynamics and the James Franck Institute, The University of Chicago, 5640 S. Ellis Avenue, Chicago, Illinois 60637*

J. Robert<sup>a)</sup> and N. C. Darnton

*Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, CNRS-ULP, 3 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France and Rowland Institute at Harvard, 100 Edwin Land Boulevard, Cambridge, Massachusetts 02142*

D. Chatenay

*Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, CNRS-ULP, 3 rue de l'Université, 67000 Strasbourg, France*

(Received 1 March 2004; accepted 11 August 2004)

In total internal reflection microscopy (TIRM), quantitative interpretation of results often requires a precise knowledge of the penetration depth of the evanescent wave. Standard TIRM practice is to calculate this depth from the microscope's geometry, but this can introduce significant errors. We show how to calibrate the penetration depth of an evanescent wave in TIRM. An evanescent wave is obtained by illuminating a surface at an incident angle greater than the critical angle. Its penetration depth generally depends on the wavelength and the incident angle of the illumination, and on the indices of refraction on either side of the reflecting surface, but cannot be larger than the field of view. By introducing a fluorescent species (such as fluorescein) and measuring its diffusion time, it is possible to measure very precisely the penetration depth of the evanescent wave. © 2004 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.1802374]

Total internal reflection microscopy (TIRM) is widely used in the physical and natural sciences.<sup>1-3</sup> In biology, this technique is primarily used to visualize interactions between molecules [via Förster resonance energy transfer (FRET)] and to follow the folding/unfolding dynamics of proteins or ribonucleic acids (RNA).<sup>4-6</sup> TIRM is well suited to single-molecule microscopy since it produces very low background light levels.

In TIRM, a laser is totally internally reflected at a prism/solution interface (Fig. 1) creating an evanescent wave that extends a small distance into the solution. There is no light propagation toward the direction of observation unless fluorophores or scattering objects are present in the evanescent field; therefore TIRM is a "dark field microscopy" and thus has the advantage of a very good signal-to-noise ratio. Signal is produced only when a fluorescent molecule or a scattering object is excited by the evanescent field, producing a secondary wave that propagates to the detector. Since the intensity of the evanescent field decays exponentially with distance, the signal produced by a source of fluorescence or of scattering will fall off exponentially with the source's distance from the reflecting surface. Although this property makes TIRM a powerful technique to measure distances, it is seldom used for quantitative distance measurements; in the literature, the TIRM application most similar to our own was a measurement of steps of denaturation of Bovine Serum Albumin in 1996.<sup>7</sup> In this letter, we describe how TIRM can be combined with fluorescent correlation spectroscopy (FCS) to

measure the evanescent wave penetration depth without relying on prior knowledge of geometric parameters.

The intensity of the evanescent field  $I$  decays exponentially with the distance  $z$  from the interface according to

$$I(z) = I(0) \times e^{-z/d}, \quad (1)$$

where  $I(0)$  is the intensity at the interface. The penetration depth  $d$  is given by

$$d = \frac{\lambda}{4\pi} [n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2]^{-1/2}, \quad (2)$$

where  $\lambda$  is the light wavelength,  $n_1$  and  $n_2$  are the media index of refraction and  $\theta$  is the angle of incidence (Fig. 1). In our case, the interface is between the prism and an aqueous solvent that contains fluorophores. Of these parameters, only the angle  $\theta$  can be easily adjusted, by changing the angle of the mirror  $M1$  during the course of an experiment.

In a typical RNA folding experiment, one measures the scattering by a reporter (a nanometer-sized gold bead grafted onto the 5' end of the RNA molecule) as the RNA grows through the transcription of its DNA template. The observed scattered intensity will vary due to Brownian motion of this 5' end as well as due to actual RNA folding events. In RNA folding events, the typical length change is around 10 nm. From Eq. (1), the largest change in signal is obtained by minimizing  $d$ . From a practical standpoint, however, one generally wants the signal amplitude to remain within a single decade or so during a single experiment; so  $d$  should not be smaller than  $\delta z_{\max}$ , where  $\delta z_{\max}$  is the total expected change in length during the experiment. For our purposes,

<sup>a)</sup>Electronic mail: robert@rowland.harvard.edu

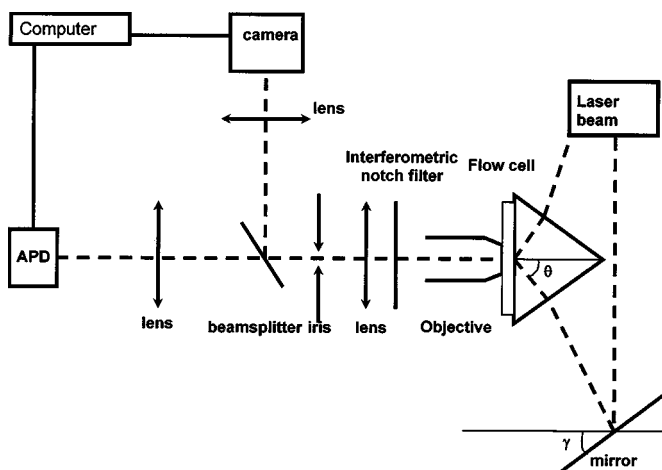


FIG. 1. Experimental setup: a 50 mW argon laser (Spectra Physics) is bounced off the adjustable mirror M1. The mirror angle  $\gamma$  is defined relative to a vertical axis. The beam is further directed to an equilateral BK7 prism (Fichou Optique Paris, index of refraction  $n_1=1.87$  at 480 nm). In this geometry, the theoretical relationship between  $\theta$  and the angle of the mirror  $\gamma$  is:

$$\theta = \pi/3 + \arcsin\left(\frac{\sin(\pi/6 - 2\gamma)}{n_1}\right).$$

Light intensity fluctuations from diffusing object inside the flow cell are captured by a  $63\times$  NA 0.9 objective and imaged onto a  $650\ \mu\text{m}$  diameter iris by a tube lens (fl.170 mm). The iris is further imaged with a diminishing ratio as to cover the avalanche photodiode detector (APD, EG&G Princeton Instruments). The signal coming out of the APD is fed to a correlator board (ALV-5000). The digital CCD camera (not used in this calibration) is used during RNA folding measurement.

$\delta z_{\text{max}}$  is the hypothetical RNA folding induced length variation of 50 nm, so we should arrange  $d$  to be 50 nm. Once the penetration depth is set and measured, we must calibrate  $d$  versus the mirror angle  $\gamma$  in order to reproduce experimental conditions during subsequent folding/unfolding experiments.

In a “classical” FCS experiment, the statistic properties of the time-varying fluorescence emanating from a small volume of sample is used to calculate a diffusion coefficient. Depending on the experimental setup, this “small volume” may be defined by a confocal pinhole or by using two-photon spectroscopy to restrict the effective excitation volume.<sup>7</sup> In either case, the observed sample volume is roughly a cubic micrometer. The fluorescence  $F(t)$  is measured as a function of time, and its fluctuation  $\delta F(t)$  is computed as difference from the time-averaged fluorescence  $\langle F \rangle$ :

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle. \quad (3)$$

The normalized autocorrelation function  $G(\tau)$  of temporal fluctuations in the measured fluorescence  $F(t)$  is given by

$$G(\tau) = \langle \delta F(t+\tau)\delta F(t) \rangle / \langle F(t) \rangle^2. \quad (4)$$

Calculation of the time correlation function  $G(\tau)$  relies on knowledge of the fluorescence function  $F(t)$ , which can be written as

$$F(t) = \alpha \int W(\mathbf{r})C(\mathbf{r},t)dV, \quad (5)$$

where  $C(\mathbf{r},t)$  is the fluorescent molecules’ concentration at position  $\mathbf{r}$  and time  $t$ ,  $dV$  is the volume element,  $\alpha$  is a constant of proportionality, and the integral extends over all space. The function  $W(\mathbf{r})$  describes the spatial intensity pro-

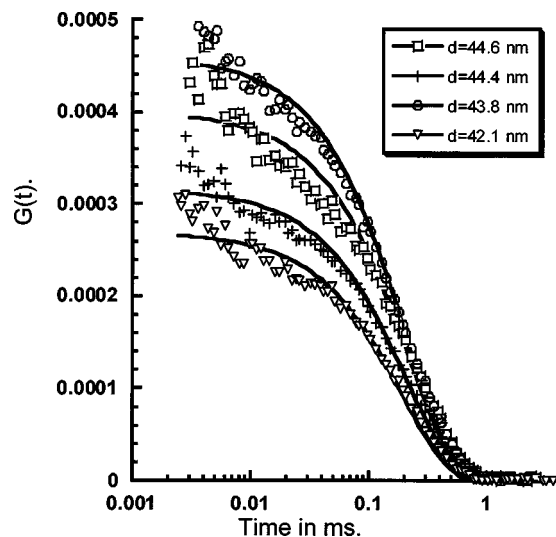


FIG. 2. Theoretical fit and experimental data of the correlation function at various angles  $\gamma$ . Fit according to Eq. (7) allows the determination of  $d$ . Triangle, open circles, cross, and open squares correspond to  $\gamma$  equals to  $15^\circ 12'$ ,  $16^\circ 12'$ ,  $16^\circ 30'$ , and  $16^\circ 42'$ .

file of the excitation light. In “classical” FCS with laser illumination,  $W(\mathbf{r})$  is a simple Gaussian; in this case, with a freely diffusing fluorophore,  $G(\tau)$  can be calculated straightforwardly.<sup>8–12</sup> It contains a diffusive term that provides a direct measurement of the diffusion constant  $D$  of the fluorophore.

We use a TIRM setup (Fig. 1) to perform FCS on a micromolar solution of standard fluorescein. TIRM-FCS has two important differences from “classical” FCS: (1) the prism constitutes a rigid wall through which fluorescent molecules cannot diffuse, and (2) the evanescent-wave excitation decays exponentially along the  $z$  axis. The excitation volume is roughly a semi-infinite cylinder with diameter 1 given by the size of the confocal aperture. In such a geometry, the fluorescence function can be written<sup>11</sup>

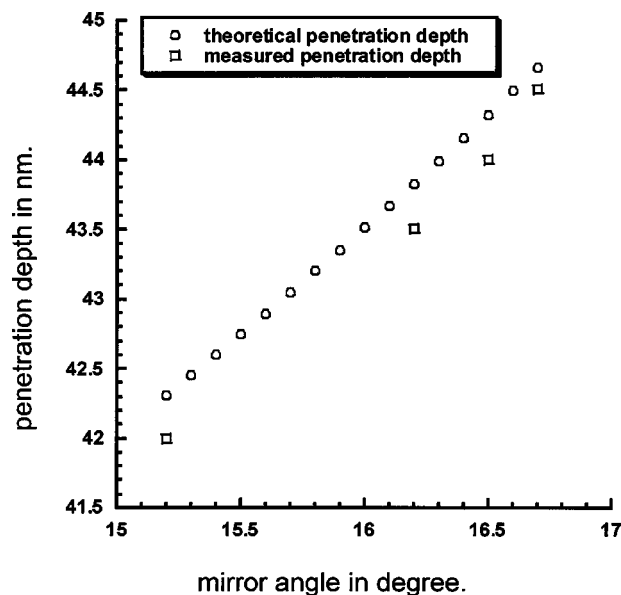
$$F(t) = \alpha I(0) \int_{x^2+y^2 < l^2} dx dy \int_0^\infty dz \exp(-z/d)C(\mathbf{r},t), \quad (6)$$

where  $\alpha$ ,  $C(\mathbf{r},t)$  and  $I(0)$  are defined as above. Performing the integral leads to an expression for  $G(\tau)$ <sup>13</sup>:

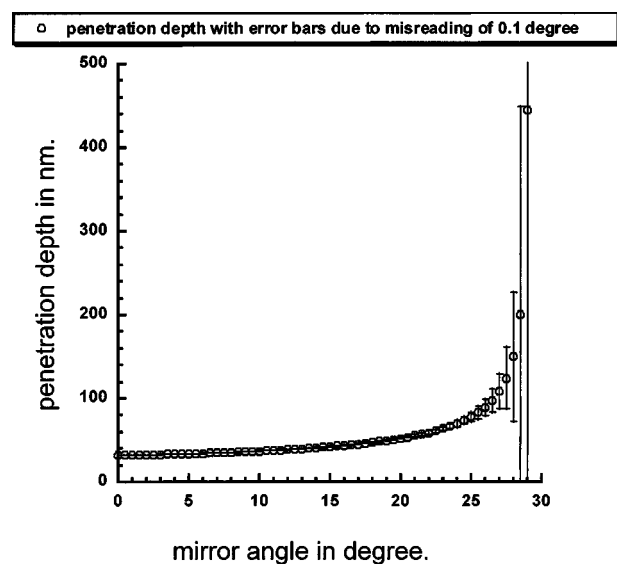
$$G(\tau) = \frac{1}{2N} \left[ (1 - 2 \text{Re } \tau) \exp(\text{Re } \tau) \text{erfc}[(\text{Re } \tau)^{1/2}] + 2 \left( \frac{\text{Re } \tau}{\pi} \right)^{1/2} \right], \quad (7)$$

where  $\text{Re} \equiv D/d^2$ ,  $N$  is the number of fluorescein molecules in the focal volume, and  $D$  (the fluorescein diffusion constant) is taken to be  $4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . The only fitted parameter in this expression is the penetration depth  $d$ . In particular, Eq. (7) is free of other potentially problematic experimental parameters such as the indices of refraction and the incident angle.

In our experimental setup, emitted light is imaged on an iris which defines the diameter of the observation volume; the iris is then imaged on an avalanche photodiode (APD) (Fig. 1). Only one APD is used for two reasons:



(a)



(b)

FIG. 3. (a) Penetration depth as a function of mirror angle. Expected values using Eq. (2), open circles. Experimental values (squares) are extracted from the fit according to Eq. (7). (b) Open circles represent the penetration depth calculated from Eq. (2), error bars are obtained by introducing  $0.1^\circ$  error value on the expected value read on the mirror. These error bars are obtained by computing the derivative of Eq. (2).

- (1) We are working in bulk at high fluorophore concentration. The number of fluorescent molecules available is not the limiting factor. As we are not limited by photobleaching, we can accumulate data over a long time (typically 10 min) and average out the dark current noise of the detector.
- (2) In our excitation geometry, the characteristic time of the black current noise is well separated from the fluorescein diffusion time. The observed diffusion time is typi-

cally  $100\ \mu\text{s}$ , while the black current time is around  $1\ \mu\text{s}$ .

Experimental results and theoretical fit are shown together in Fig. 2. The initial mirror angle had been calculated [through Eq. (2)] to set  $d$  to 50 nm. A fit to the data showed that  $d$  was actually closer to 42 nm. We swept  $d$  from 42 to 47 nm by tuning the mirror angle  $\gamma$ , giving a calibration curve of the penetration depth  $d$  versus  $\gamma$  [Fig. 3(a)]. This calibration curve differs from the “classical” formula [Eq. (2)] by about  $0.3^\circ$  (0.7%). This difference is due either to a misalignment of the laser or to a deviation of laser or prism from the horizontal plane. This calibration procedure ensures reproducible experimental conditions during subsequent measurements, even if the laser or the prism has been moved.

We present an experiment to calibrate the penetration depth of a TIRM setup by adding a photodiode coupled with a correlator. Precise calibration is not necessary if TIRM is merely used to discriminate between two conformations of a protein, RNA or ligand/receptor attachment, but it is crucial for quantitative length variation measurements during multiple-state folding events.<sup>6</sup> In the latter case, contrary to common practice one *cannot* reliably calculate the penetration depth from the reading of a mirror tilt micrometer screw, as any misalignment or imperfection in the optical path geometry can alter the result. This error can be over 100% when the penetration depth is large [i.e., the angle at the interface is close to the critical angle: Fig. 3(b)]. The error decreases with the angle of incidence, becoming 2% when the angle at the interface is close to  $\pi/2$ . Since this method is independent of all geometric parameters of the experimental setup, it allows the intrinsic measurement of the penetration depth. Unlike penetration depth measurement by scanning microscopy, which monitors total intensity while scanning along the  $z$  direction, our method does not require any change in the depth of the focal plane. Since fluctuations inside a single focal spot give all the data needed to determine both diffusion time and the penetration depth, our method required no  $z$ -scanning and no data analysis to get the right profile.

<sup>1</sup>D. C. Prieve, *Adv. Colloid Interface Sci.* **82**, 93 (1999).

<sup>2</sup>K. Stock, R. Sailer, W. S. L. Strauss, M. Lyttek, R. Steiner, and H. Schneckenburger, *J. Microsc.* (Oxford) **211**, 19 (2003).

<sup>3</sup>N. L. Thompson and D. Axelrod, *Biophys. J.* **37**, A355 (1982).

<sup>4</sup>X. Zhuang, L. Bartley, H. Babcock, R. Russell, T. Ha, D. Herschlag, and S. Chu, *FASEB J.* **14**, A1587 (2000).

<sup>5</sup>L. E. Bartley, H. P. Babcock, R. Russell, T. Ha, D. Herschlag, and S. Chu, *Science* **288**, 2048 (2000).

<sup>6</sup>S. Harlepp, J. Robert, H. Isambert, and D. Chatenay (unpublished).

<sup>7</sup>G. Zocchi, *Europhys. Lett.* **35**, 633 (1996).

<sup>8</sup>W. W. Webb, *Appl. Opt.* **40**, 3969 (2001).

<sup>9</sup>R. Rigler and E. S. Elson, *Fluorescence Correlation Spectroscopy Theory and Application*, Springer series.

<sup>10</sup>S. T. Hess and W. W. Webb, *Biophys. J.* **83**, 2300 (2002).

<sup>11</sup>P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb, *Biophys. J.* **77**, 2251 (1999).

<sup>12</sup>P. Schwille, J. Korlach, and W. W. Webb, *Cytometry* **36**, 176 (1999).

<sup>13</sup>T. E. Starr and N. L. Thompson, *Biophys. J.* **80**, 1575 (2001).

#### 4. Motilité bactérienne et polymorphisme.

Au laboratoire, notre activité s'écarte du thème biophysique de la molécule unique pour se diriger vers les systèmes intégrés tel qu'un organisme bactérien dans son ensemble. J'ai sollicité un Congé pour Reconversion Thématique et de Recherche pour travailler dans le laboratoire du Professeur Howard Berg au Rowland Institute à Harvard. Un des buts de ce séjour est d'accroître mes connaissances en microbiologie afin d'accompagner efficacement le changement de thématique de recherche dans l'équipe Biophysique. De manière concrète dans le laboratoire Berg, j'ai participé à l'étude des transformations polymorphiques des flagelles d'*Escherichia Coli*.

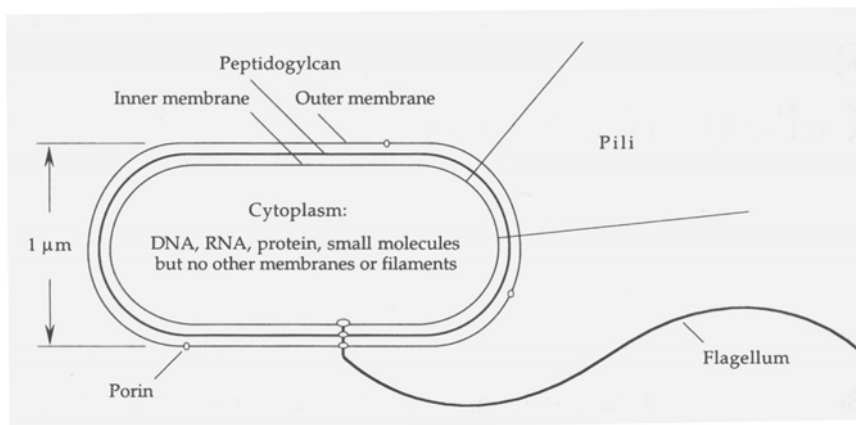


Figure 4.1: Représentation schématique d'une bactérie *E. Coli* (H.C. Berg, *E. Coli In Motion*, Springer Verlag)

La plupart des souches sauvages d'*Escherichia coli* sont motiles. Elles se déplacent rapidement en milieu liquide en ligne droite (période de nage) et alternativement elles marquent des changements brusques de direction (période de bascule). Ces observations sont possibles en microscopie classique. Une bactérie se présente comme un cylindre d'un micromètre de diamètre et de deux micromètres de longueur. Plusieurs filaments (entre 5 et 15) appelés flagelles d'une dizaine de micromètres de long sont visibles en microscopie de fond noir et plus nettement en microscopie de fluorescence. Ils sont attachés sur le corps de la bactérie et constituent l'élément passif de la motricité. D'un point de vue mécanique, la locomotion est assurée par trois éléments: le flagelle, un moteur et le crochet, identifiés en microscopie électronique. À l'intérieur de la membrane bactérienne, le moteur rotatif entraîne le mouvement du flagelle. Un crochet lie le moteur et le flagelle. Le moteur et le crochet sont composés d'un assemblage complexe de protéines.

Le flagelle est le résultat de la polymérisation d'une seule sous unité protéique appelée flagelline. La base de l'assemblage d'un flagelle est un cercle de 20 nanomètres de diamètre défini par 11 sous unités. Sur chacune des sous unités croît un protofilament. Si toutes les sous unités avaient la même conformation, le flagelle serait un cylindre creux. En fait, suivant sa position sur le cercle basale, la flagelline qui compose un protofilament adopte une conformation comprimée ou expansée. Cela entraîne une forme hélicoïdale du flagelle, dont le pas et le diamètre sont variables en fonction de

l'environnement (pH, salinité) de la bactérie. C'est ce qu'on appelle le polymorphisme. Le polymorphisme se manifeste en particulier lors de la motilité bactérienne.

A priori, un sens de rotation du moteur couplé à une hélice permet uniquement un déplacement dans une seule direction de l'espace. Or les bactéries sont sensibles aux stimuli chimiques. Ce phénomène est appelé chimiotactisme: elles se dirigent vers les zones nutritives et s'écartent des régions contenant des substances néfastes à leur développement. Le chimiotactisme impose une possibilité de changement de direction. Ce changement de direction est dû à une période de bascule qui alterne avec les périodes de nage.

La période de nage de la bactérie dure environ une seconde. La vitesse typique est de 25 $\mu$ m/sec en milieu liquide, à température ambiante (environ dix fois la taille du corps de la bactérie/sec). Le moteur tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre avec une fréquence d'environ 100 Hz. Durant cette phase, chaque flagelle se présente comme une hélice gauche avec un pas de 2.5 micromètre et un diamètre de 0.5 micromètre. De plus, les flagelles s'assemblent pour former un faisceau, ce qui accroît l'efficacité propulsive.

La période de bascule dure environ 0.1 seconde. Le moteur tourne dans le sens des aiguilles d'une montre. Les flagelles sont alors séparés les uns des autres. Leur conformation est celle d'une hélice droite dont le pas est de 0.9 micromètre et le diamètre est de 0.3 micromètre. Chacun exerce une traction sur le corps de la bactérie dans une direction différente. La résultante des forces n'entraîne pas de mouvement de translation (la position dans l'espace du centre de masse de la bactérie reste fixe) mais la bactérie pivote sur elle-même. A la fin de la période de bascule, la bactérie possède une direction aléatoirement différente vers laquelle elle reprend son déplacement. Le rapport cyclique entre le temps de "nage" et le temps de bascule est à l'origine du chimiotactisme.

La transition de conformation des hélices des flagelles peut être induite par des modifications de pH ou de force ionique du milieu de la bactérie. *In vivo*, lorsque les conditions du milieu sont stables, l'hypothèse a été émise qu'une force mécanique pourrait également engendrer des changements de structure des flagelles. En effet, lorsque le moteur change de sens de rotation, la force locale d'origine visqueuse qui s'exerce sur le flagelle bloque son extrémité et le couple exercé par le moteur induit un changement des caractéristiques de l'hélice des flagelles. L'équipe du Professeur Berg cherche à mesurer le couple critique nécessaire pour observer le polymorphisme sur un flagelle unique. Ma participation à ce projet a consisté à mettre au point un protocole d'extraction, de purification et de repolymérisation des flagelles. Les bactéries sont cultivées en condition d'anaérobie car nous avons constaté que les flagelles étaient plus longs dans ce cas. Les flagelles sont extraits en cisillant dans une seringue les bactéries en phase de croissance exponentielle. Les flagelles sont triés du corps bactérien par centrifugation. Le désavantage du cisaillement est la production de flagelles courts. Nous avons mis au point un processus de repolymérisation de la flagelline pour obtenir des flagelles d'environ 10-15 micromètre (environ 4-7 pas d'hélice). Dans la suite, Nicholas Darnton, post-doctorant dans l'équipe de H. Berg a commencé les mesures du couple nécessaire aux

transformations polymorphiques. Une des difficultés principales qu'il a rencontrées provient du greffage de la bille et de la lamelle de microscope aux extrémités du flagelle.

### **III. Projet de Recherche**

Depuis septembre 2004, j'ai repris avec Didier Chatenay et Jérôme Wong une étude sur les variations phénotypiques dans une population isogénique. Plus précisément, nous voulons mesurer le nombre de copie de plasmide dans un grand nombre de bactérie *E. Coli* en cultivant un clone sur une boîte de pétri. Ce problème est un exemple type d'un système symbiotique entre le plasmide et la bactérie *E. Coli*. La compétition se situe entre le gain pour la bactérie apporté par la présence d'un plasmide codant pour la résistance à un antibiotique et le coût métabolique de maintien du plasmide dans son organisme.

#### **I. Introduction: généralités sur les plasmides.**

Dans les bactéries, l'acide désoxyribonucléique (ADN) constitue le chromosome et le(s) plasmide(s). Le chromosome contient toute l'information génétique nécessaire aux métabolismes essentiels pour la cellule dans un environnement normal (croissance, division). Il est présent en copie unique dans la cellule, sauf au moment qui précède la division cellulaire pendant lequel il est dupliqué. Un plasmide est un fragment d'ADN extrachromosomal circulaire, beaucoup plus court que le chromosome ( $10^2$ - $10^3$  fois plus petit), et qui se duplique de façon autonome dans les bactéries. Les plasmides portent une partie de l'information qui régule leur nombre de copie au sein d'une bactérie. Une séquence de quelques centaines de bases appelée réplicon contient l'origine de réplication de l'ADN et codent pour les divers éléments associés à son contrôle. Suivant le type de réplicon, le nombre de copie est variable de 1 à plusieurs centaines. Pour un même réplicon, c'est la combinaison de la régulation de la réplication de l'ADN et du partitionnement des plasmides dans les cellules filles qui déterminent le nombre moyen de copie de plasmide dans une bactérie. Par ailleurs, la grande majorité des plasmides codent en particulier pour la synthèse de protéines qui permettent la survie des bactéries dans des milieux contenant des antibiotiques.

Dans un premier temps, nous souhaitons mettre au point une manière de mesurer le nombre de copie de plasmide dans une bactérie. Ce caractère phénotypique (nombre de copie de plasmide) est mesuré sur une population isogénique, c'est-à-dire cultivée à partir d'un clone. En plus du marqueur antibiotique présent sur le plasmide, une séquence codant pour la protéine fluorescente mOrange est incorporé à l'aide des techniques classiques de la biologie moléculaire. On fait l'hypothèse que la concentration en protéines fluorescentes exprimées dans la bactérie est proportionnelle au nombre de



copie du plasmide. Ce dernier est déduit de manière indirecte de l'intensité de fluorescence mesurée sur une bactérie.

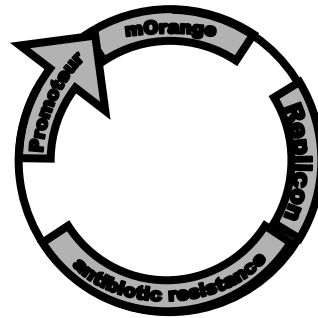


Figure 1: Représentation des éléments communs (promoteur inductible+mOrange, marqueur antibiotique) et différents (réplicon) à chacun des 3 plasmides construits et mesurés au laboratoire.

Trois plasmides ont été construits et mesurés au laboratoire: la séquence codant pour l'expression de la protéine fluorescente mOrange (excitation 548 nm, émission 562 nm) est identique pour tous les plasmides que nous étudions. Cette séquence est placée sous contrôle d'un promoteur de transcription fort du type *tac* inductible à l'IPTG. Le marqueur antibiotique est l'ampicilline. Les 3 plasmides ne diffèrent que par leur réplicon. Le premier plasmide est basé sur le miniF pZC320 (Shi et Biek, 1995). Du fait de son origine de répllication et d'un système de partitionnement strict, sa principale caractéristique est d'être présent en moyenne en copie unique dans la bactérie. Le deuxième plasmide est dérivé du plasmide R1 (plasmide pOU82 Gerdes et al. 1985). Le nombre moyen de copie de plasmide est de 1 quand les bactéries sont cultivées à 30°C. Il est déplacé vers 20 quand les bactéries sont cultivées à 40°C. Le dernier plasmide est également dérivé du plasmide R1 (plasmide pOAR64 Yarmolinsky et al. 2001) et il contient en plus un système de partition des plasmides composé de 3 protéines.

## II. Méthodes expérimentales.

Les mesures sont faites sur un microscope inversé. La cellule de mesure est un dispositif microfluidique. Elle consiste en 2 réservoirs (diamètre 5 mm, volume 100  $\mu$ l) reliés par un microcanal de largeur 5  $\mu$ m moulé dans une résine en PDMS. Ce moule est collé sur une lamelle en quartz, préalablement traitée par un plasma d'eau. Les bactéries sont introduites dans un des réservoirs et sont entraînées dans le microcanal par le flux du solvant. Elles défilent devant l'objectif du microscope. L'excitation de la fluorescence est obtenue par le port d'épifluorescence du microscope par un laser solide émettant à 488 nm. La surface de la zone éclairée sur l'échantillon est de l'ordre de 10<sup>2</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>. Un façonneur de faisceau à cristaux liquide est incorporé sur le trajet optique. Ce type de dispositif permet une illumination homogène de la zone de passage des bactéries sur une surface de côté égal à la

largeur d'un canal. La lumière de fluorescence est collectée par un objectif de grande ouverture numérique. Un portion du canal est imagée sur une diode à avalanche. La diode à avalanche est connectée sur une carte d'acquisition. Le programme de comptage est écrit en langage Labview. L'acquisition est cadencée à 1 kHz et peut durer plusieurs dizaines de minutes. La principale limitation de la durée de l'acquisition est due à l'augmentation du flux des bactéries dans les canaux microfluidiques qui entraîne une saturation du signal de détection. Quand le flux bactérien est régulier, le montage permet la mesure d'environ 4000 bactéries en 1 heure.

Les bactéries sont prélevées à partir d'une colonie isolée sur une boîte de pétri. Elles sont cultivées pendant 12 heures à la température désirée en milieu liquide. A ce stade, on estime qu'elles sont éloignées d'une quarantaine de générations du clone initial. De ce fait, on néglige les mutations spontanées dont le taux est de l'ordre de 3‰ par génome et par division. Les bactéries sont lavées en liquide physiologique non fluorescent et introduites dans la cellule de mesure. Le flux de bactéries est essentiellement dicté par la différence de niveau entre les réservoirs, il est modulable en appliquant une différence de potentielle d'une dizaine de volts entre les réservoirs. Le temps de passage des bactéries dans la zone éclairée est de 200 ms. Suivant le nombre de bactéries initiales dans les réservoirs, le taux de passage est de l'ordre de 1 Hz.

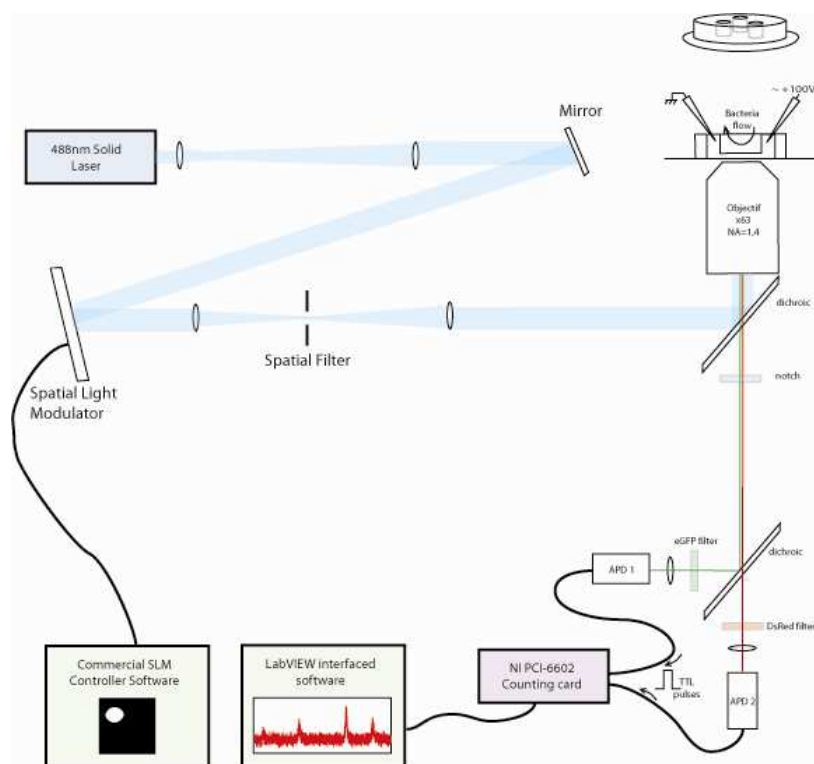


Figure2: Schéma du montage de mesure de la fluorescence.

Des études ont montré que les variations de fluorescence étaient dominées par les variations d'expression génétique (Elowitz et al. 2002). De ce fait le nombre de copies de plasmides dans la

bactérie ne peut pas être simplement relié aux concentrations en protéines fluorescentes. Pour traiter ce problème, il faut mesurer la variation d'expression génétique de bactérie à bactérie.

Nous avons modifié le génome d'une souche TOP10 d'*E. Coli*: une séquence en tout point analogue à celle située sur le plasmide mais codant pour la protéine fluorescente eGFP (excitation 488 nm, émission: 505 nm) est introduit sur le chromosome. Elle est nécessairement présente en copie unique dans chaque bactérie. La mesure de l'intensité de fluorescence verte quantifie la variation d'expression génétique de la bactérie. En présence saturée de l'inducteur de transcription, on peut considérer que les variations d'expression du gène de la mOrange et celui de la eGFP seront minimales à l'intérieur d'une même bactérie (Elowitz et al. 2002). La mesure simultanée de l'intensité de fluorescence orange et verte pour chaque bactérie est une manière de renormaliser les distributions et de corrélérer l'intensité de fluorescence orange avec le nombre de copie de plasmide.

### **III. Perspectives**

A l'aide de notre système bien caractérisé de mesure du nombre de copie de plasmide dans une bactérie, nous aborderons le problème de la compétition au sein d'une population bactérienne entre le coût métabolique de maintien d'un plasmide et la pression de sélection du milieu de culture.

Dans une première série d'expérience, on peut se demander très simplement quelle va être la réaction de la bactérie si elle est cultivée en absence d'antibiotique. La littérature prédit une perte du plasmide par la bactérie au bout de quelques générations, nous souhaitons étudier ce processus.

#### **Etude en fonction d'une concentration variable d'antibiotique.**

Les protocoles de bactériologie fournissent des indications sur la concentration en antibiotiques à ajouter dans le milieu de culture en fonction du réplicon du plasmide géré par une bactérie. Ces indications sont importantes lorsque les plasmides sont utilisés pour faire produire par des bactéries de l'ADN ou des protéines en vue d'extraction par exemple. Ces concentrations sont de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes par microlitre et varient environ d'un facteur 5 en fonction du réplicon. Une première étude sera de quantifier précisément l'effet d'une concentration en antibiotique sur le nombre de copie de plasmide. Des expériences seront menées en variant la concentration en antibiotique pour un réplicon donné. Nous commencerons avec les 2 réplicons que nous utilisons jusqu'à présent, à savoir le dérivé du mini-F et du plasmide R1. On peut supposer que le nombre de copie de plasmide dérivé du R1 augmentera avec la concentration en antibiotique. En effet, le gène des plasmides que nous utilisons codent pour la résistance à l'ampicilline. La traduction du gène est une enzyme (la  $\beta$ -lactamase) qui dégrade l'antibiotique. On fait l'hypothèse que cette dégradation est d'autant plus efficace dans une bactérie que sa concentration en  $\beta$ -lactamase est grande. On suppose que les bactéries qui se développeront en présence d'une concentration élevée en antibiotique dans le milieu de culture seront celles qui contiennent un nombre plus élevé que la

moyenne de plasmide leur assurant une production et donc une concentration plus élevée en  $\beta$ -lactamase. L'étude sera poursuivie en travaillant avec un dérivé du plasmide pBR322 dont le réplicon maintient une trentaine de copie de plasmide dans la bactérie. Ce deuxième type de plasmide permet une plus large amplitude de variation du nombre de copie. On tentera d'affiner la relation entre la concentration en antibiotique et le nombre de copie qui aura été mise en évidence à l'aide des plasmides dérivés du mini-F et de R1.

### Dispositif de tri bactérien

Nous souhaitons trier les bactéries d'une population selon une procédure de mesure d'un trait phénotypique du même type que ceux exposés ci-dessus. A cette fin nous construirons des microcanaux en forme de Y à l'aide des techniques de lithographie douce. (figure 3) Ce dispositif sera basé sur l'utilisation du déplacement des bactéries par flux électro-osmotique et le tri sera effectué en appliquant le potentiel électrique entre le bras du Y relié au réservoir et l'un ou l'autre des 2 autres bras du Y. La commutation vers l'un ou l'autre des réservoirs se fera en fonction de l'intensité de fluorescence détectée lors du passage de la bactérie en amont de la jonction.

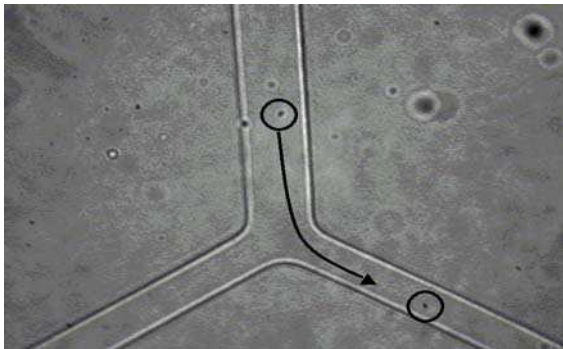


Figure 3. Image en champ clair d'un micro-canal et de deux bactéries. Les cercles indiquent les positions des bactéries et la flèche le chemin que cette bactérie va emprunter. La tension appliquée est telle que la bactérie se dirige vers le

Pour réaliser ces expériences nous commencerons par caractériser la distribution d'expression comme nous l'avons déjà décrit par un dispositif à canaux multiples, puis nous sélectionnerons un sous-ensemble de la population présentant un taux d'expression différent du taux moyen par un écart au moins par exemple. Par la suite cette sous population sera remise en culture avec une concentration fixe en antibiotique et nous mesurerons l'évolution au cours du temps du niveau d'expression. Le retour ou non vers la distribution d'équilibre traduira de manière originale la compétition entre le coût métabolique de conservation d'un plasmide et la pression de sélection due à un antibiotique dans le milieu de culture.

### Références:

- Brooke J. B. et Glick B. S., Rapidly maturing variant of *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed), Nat. Biotech., **20**, 83-6, (2002).
- Gerdes K, Larsen JE, Molin S. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. J Bacteriol.;**161**, 292-8 (1985).

- M. Elowitz, A. Levine, E. Siggia, P. Swain, Stochastic Gene Expression in a Single Cell, *Science* **297**, 1183-6 (2002).
- Ozbudak EM, Thattai M, Kurtser I, Grossman AD, van Oudenaarden A. Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nat Genet.*; **31**, 69-73 (2002).
- Rick C., Poirier M. et Chatenay D., Determining Gene Expression Distribution for E. Coli population with microfluidics, soumis (2005).
- Shi J, Biek DP. A versatile low-copy-number cloning vector derived from plasmid F. *Gene*, **161**, 55-8 (1995).
- Yarmolinsky MB. A pot-pourri of plasmid paradoxes: effects of a second copy. *Mol Microbiol*, **38**, 1-7 (2000).

### **Contrats de Recherche:**

Ces activités de recherche m'ont conduit à la rédaction et co-rédaction de contrat de recherche:

- 1999: ACI Jeunes Chercheurs, Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, "*Biophysique Moléculaire et Cellulaire*". (Laurent Bourdieu et Jérôme Robert)
- 1999: Programme Nanoobjet Individuel, CNRS, "*Repliement dynamique d'une molécule d'ARN unique*". (Hervé Isambert et Jérôme Robert)
- 2000: Programme Physique et Chimie du Vivant, CNRS, "*Paysage énergétique de l'ARN: micromanipulation et simulation*". (Eric Westhof et Didier Chatenay)
- 2001: Appel d'offre du Conseil Scientifique de l'ULP, "*Photolithographie et Biophysique*". (Laurent Bourdieu et Jérôme Robert)
- 2001: Programme Nanoobjet Individuel, CNRS, "*Dynamique de repliement d'une molécule d'ARN en cours de transcription*". (Jérôme Robert)
- 2004: ANR blanche (Didier Chatenay et Jérôme Robert)

## Liste des publications et des participations à des congrès.

### 1. Publications

- (1) *"ESR of unusually long life time electronic spins"*  
J. Robert, P. Petit, D. Reibel and C. Mathis, J. Chim. Phys., **91**, 735, (1994).
- (2) *"Electron spin resonance study of the dimer state of  $KC_{60}$  and its transformation"*  
P. Petit, J. Robert et J. E. Fischer, Phys. Rev. **B 51**, 11924, (1995).
- (3) *"Evidence of a metal-insulator transition in orthorhombic  $RbC_{60}$ : a pulsed ESR study"*  
J. Robert, P. Petit, J. -J. André et J. E. Fischer, Solid State Commun. **96**, 143, (1995).
- (4) *"Phase instabilities in  $KC_{60}$ "*  
J. Robert, P. Petit, et J. E. Fischer, Synth. Met. **77**, 119, (1996).
- (5) *"Fulleride Superconductors : Dependence of  $T_C$  on Average Molecular Valence in  $Na_2Cs_xC_{60}$ ,  $0 < x < 1$ "*  
T. Yildirim, L. Barbedette, J. E. Fischer, C. L. Lin, J. Robert et P. Petit, Synth. Met. **77**, 195, (1996).
- (6) *"Phase Transformations and Kinetics Studies of Phase Instabilities in  $KC_{60}$ "*  
J. Robert, P. Petit, and J. E. Fischer, Physica C **262**, 27, (1996).
- (7) *"Magnetic Properties of Alkali-intercalated  $C_{60}$  Compounds Probed by Electron Spin Resonance"*  
P. Petit et J. Robert, Applied Mag. Res. **11**, 183, (1996).
- (8) *" $T_c$  vs Carrier Concentration in Cubic Fullerides Superconductors"*  
T. Yildirim, L. Barbedette, J. E. Fischer, C. L. Lin, J. Robert, P. Petit and T. T. M. Palstra, Phys. Rev. Lett. **77**, 167 (1996).
- (9) *"Synthesis and Properties of Mixed Alkali-Alkaline Earth Fullerides"*  
T. Yildirim, L. Barbedette, J. E. Fischer, G. Bendele, P. W. Stephens, C. L. Lin, C. Goze, F. Rachdi, J. Robert, P. Petit and T. T. M. Palstra, Phys. Rev. B. **54**, 11981, (1996).
- (10) *"ESR Evidence for Phonon-Mediated Resistivity in Alkali-Metal-Doped Fullerides"*  
P. Petit, J. Robert, T. Yildirim and J. E. Fischer, Phys. Rev. B **54**, R3764, (1996).
- (11) *"Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes"*  
A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, S. G. Kim, D. T. Colbert, G. Seuseria, D. Tomanek, J. E. Fischer and R. E. Smalley, Science, **273**, 483, (1996).
- (12) *"Electronic Properties of Ortho-Polymer  $A_1C_60$  ( $A=K, Rb$ ) and Related Phases"*  
P. Petit, J. Robert and J. E. Fischer, Appl. Phys. A **64**, 283, (1997).
- (13) *"Experimental Lattice Dependence of the Density of States in Alkali Fullerides"*  
J. Robert, P. Petit, T. Yildirim and J. E. Fischer, Phys. Rev. B **57**, 1226, (1998).
- (14) *"RecA binding to a single double-strand DNA molecule: a possible role of DNA conformational fluctuations"*  
J. F. Léger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay and J. F. Marko, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 12295, (1998)
- (15) *"Structural transitions of a twisted and stretched DNA molecule"*  
J. F. Léger, G. Romano, A. Sarkar, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, J. Marko, Phys. Rev. Lett. **83**, 1066, (1999)

- (16) *"Microrheology of biopolymer-membrane complexes"*  
E. Helfer, S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F. C. MacKintosh, D. Chatenay. Phys. Rev. Lett. **85**, 457 (2000)
- (17) *"Viscoelastic properties of actin coated membranes"*  
Helfer E., Harlepp S., Bourdieu L., Robert J., MacKintosh F. C., Chatenay D. Phys. Rev. E, **63**, 021904, (2001)
- (18) *"Buckling of actin-coated membranes under application of a local force"*  
Helfer E., Harlepp S., Bourdieu L., Robert J., MacKintosh F. C., Chatenay D. Phys. Rev. Lett. **87**, 088103 (2001)
- (19) *"Probing complex RNA structures by mechanical force"*  
S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J-F. Léger, A. Xayaphoumine, H. Isambert, D. Chatenay, Euro. Phys. J. E **12**, 605 (2003).
- (20) *"Manipuler et Simuler des molécules d'ARN uniques"*  
J. Robert et H. Isambert, Images de la Physique 2004, Edition du CNRS
- (21) *"Subnanometric measurements of evanescent wave penetration depth using total internal reflection microscopy combined with fluorescent correlation spectroscopy"*  
S. Harlepp, J. Robert, D. Chatenay, Appl. Phys. Lett., **85** 3917 (2004)

## 2. Publication sans comité de lecture

- (1) *"Magnetic properties of Na<sub>2</sub>C<sub>60</sub> and K<sub>4</sub>C<sub>60</sub>"*  
P. Petit, J. Robert, J. -J. André, T. Yildirim et J. E. Fischer, Proceedings of the International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials-Progress in Fullerene Research, World Scientific ed., 478, (1994).
- (2) *"Metallic property as a function of the molecular valence in alkali and alkali-alkaline earth cubic C<sub>60</sub> studied by ESR"*  
J. Robert, P. Petit, T. Yildirim and J. E. Fischer, Proceedings of the International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials-Progress in Fullerene Research, World Scientific eds., 421, (1996).
- (3) *"Electronic properties of alkali fullerides: evidence for phonon-mediated resistivity"*  
P. Petit, J. Robert, T. Yildirim and J. E. Fischer, Proceedings of the International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials-Progress in Fullerene Research, World Scientific eds., 415, (1996).
- (4) *"ESR Study of the Normal State Properties of A<sub>3</sub>C<sub>60</sub>"*  
P. Petit and J. Robert, in "Recent Advances in the Physics and Chemistry of Fullerenes and Related Materials", vol. 3, K. M. Kadish and R. S. Ruoff eds., The Electrochemical Society, Inc., 1029-1034, (1996).
- (5) *"Synthesis and Properties of Mixed Alkali-Alkaline Earth Fullerides"*  
T. Yildirim, L. Barbedette, J. E. Fischer, G. Bendele, P. W. Stephens, C. L. Lin, J. Robert, P. Petit and T. M. Palstra, International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials- Fullerenes and Fullerene Nanostructures, World Scientific, p. 409, (1996).

## 3. Participation à des congrès sous forme d'affiche; Ecoles

- (1) *"Etude du polyacétylène PA(ex PPVS) par RPE pulsée et continue"*  
J. Robert, P. Petit, D. Reibel et C. Mathis.

Poster présenté à la XIII<sup>ème</sup> réunion du Groupe d'Etude sur la Résonance Magnétique à la presqu'île de Giens du 28 mars au 2 avril 1993.

- (2) *"FT-EPR training courses"*  
Participation au stage de RPE à impulsion chez Brüker Analytische Messtechnik GMBH, Rheinstetten du 25 au 27 août 1993.
- (3) *"La physique autour des polymères conducteurs"*  
Participation à l'école thématique d'été organisée par F. Chao, M. Costa, M. Nechtschein et M. Schott à Luminy du 19 au 24 septembre 1993.
- (4) *"Transition métal-isolant dans Na<sub>x</sub>C<sub>60</sub>"*  
J. Robert, J. -J. André et P. Petit.  
Poster présenté au Groupe de Recherche sur le C<sub>60</sub> à Bierville les 3 et 4 février 1994.
- (5) *"Electron Spin Resonance on Na<sub>x</sub>C<sub>60</sub>"*  
P. Petit, J. Robert, J. -J. André, T. Yildirim and J. E. Fischer .  
Poster présenté à l'école d'hiver "International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials-Progress in Fullerene Research" à Kirchberg, Tirol du 5 au 12 mars 1994.
- (6) *"Phase instabilities in KC<sub>60</sub>"*  
J. Robert, P. Petit et J. E. Fischer.  
Poster présenté à l'école d'hiver "International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials-Progress in Fullerene Research" à Kirchberg, Tirol du 5 au 12 mars 1995.
- (7) *"Metallic property as a function of the molecular valence in alkali and alkali-alkali earth cubic C<sub>60</sub> studied by ESR"*  
J. Robert, P. Petit, T. Yildirim and J. E. Fischer  
Poster présentée à l'école d'hiver "International Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials-Progress in Fullerene Research" à Kirchberg, Tirol du 2 au 9 mars 1996.
- (8) *"Single Molecule Biophysics"*  
Participation à l'International EMBO workshop, Tours, du 8 au 15 Juillet 1999.
- (9) *"Nano-Objet Individuel"*,  
Participation au colloque NOI, Bordeaux, 19-20 Mai 2000.
- (10) *"Formation de la personne compétente en radioprotection domaine industriel, enseignement commun et enseignement optionnel B sources non scellées"*, stage de formation CNRS validé du 12 au 20 Novembre 2001.

#### 4. Conférences orales

- (1) *"Pulsed and Continuous wave EPR on Na<sub>3</sub>C<sub>60</sub>"*  
J. Robert, P. Petit et J. -J. André.  
Intervention orale au II<sup>ème</sup> rencontre de thésards franco-allemands à Munster les 10 et 11 février 1994.
- (2) *"Etude par RPE continue et à impulsion du Rb<sub>1</sub>C<sub>60</sub>"*  
J. Robert  
Intervention orale aux Journées de l'Institut Charles Sadron au Mont Saint Odile les 5 et 6 avril 1994.
- (3) *"Kinetics of phase transformation in KC<sub>60</sub>"*  
J. Robert, P. Petit, et J. E. Fischer.  
European Material Research Society, Strasbourg du 22 au 26 mai 1995.
- (4) *"Les composés d'intercalation du C<sub>60</sub>: Apport de l'étude par RPE"*  
J. Robert  
Laboratoire d'Ultrasons et de Dynamique des Fluides Complexes, Strasbourg, 15 mars 1996, (Séminaire invité par L. Bourdieu).



- (5) *"Etude du repliement de l'ARN par des expériences de micromanipulation"*  
J. Robert, T. Marchal, S. Harlepp, L. Bourdieu, D. Chatenay  
Conférence invitée par J.-M. Lhoste et A. Sentenac dans le cadre d'un séminaire consacré aux "Molécules Isolées et Moteurs Moléculaires", Académie des Sciences, Paris, 26 mars 2001.
- (6) *"Micromanipulation de molécule unique d'ARN"*  
J. Robert, T. Marchal, S. Harlepp, L. Bourdieu, D. Chatenay  
Conférence invitée par la Société Française de Physique, Strasbourg, 9-13 Juillet 2001
- (7) *"Micromanipulation experiments on single RNA molecule"*  
J. Robert, T. Marchal, S. Harlepp, L. Bourdieu, D. Chatenay  
Conférence invitée au CECAM dans le cadre d'un workshop "Single Molecule Studies : From the Experiments to their Analysis" organisé par M. Peyrard et A. Giansanti, Lyon, 24-27 septembre 2001.
- (8) *"Etude du repliement de l'ARN Expériences et Théorie"*  
J. Robert et H. Isambert, Journée de la Fédération Matière Condensée Strasbourg, 21 Mai 2002
- (9) *"Etude du repliement de l'ARN par des expériences de micromanipulation"*  
J. Robert, S. Harlepp, H. Isambert, D. Chatenay  
Séminaire invité à l'Institut Curie Paris (P. Nassoy), 22 Janvier 2003.
- (10) *" Etude du repliement de l'ARN par des expériences de micromanipulation "*  
J. Robert, S. Harlepp, H. Isambert, D. Chatenay  
Séminaire Matière Molle et Biologie invité au Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-Chimique Paris(B. Ladoux), 24 Janvier 2003.
- (11) *"Probing complex RNA structure by mechanical force"*  
S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J-F Léger, A. Xayaphoumine, H. Isambert et D. Chatenay,  
Biophysical annual meeting, Baltimore Etats Unis d'Amérique, 14-18 fev. 2004.
- (12) *"Probing complex RNA structure by mechanical force and evanescent wave microscopy"*  
S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J-F Léger, A. Xayaphoumine, H. Isambert et D. Chatenay  
Séminaire au Molecular and Cellular Biology, Berg Lab., 10 mars 2004.
- (13) *" Etude du repliement de l'ARN par des expériences de micromanipulation "*  
S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J-F Léger, A. Xayaphoumine, H. Isambert et D. Chatenay  
Séminaire au Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure, Paris 17 fev 2005