

Expériences antérieures et modèles d'ouverture de l'ADN à travers un nanopore

3.1 Expériences antérieures de dézippage d'ADN à travers le nanopore d'alpha hémolysine

3.1.1 Les courts hairpins (3 à 8 pb), sans poignée simple brin, s'ouvrent en une étape correspondant à un saut d'énergie égal à l'enthalpie libre d'appariement de l'ADN en solution

L'ADN double brin est trop large pour rentrer dans le canal transmembranaire de l'alpha hémolysine. Toutefois, deux études publiées en 2001 ont permis de montrer que l'ADN double brin peut passer au travers du nanopore s'il est dénaturé [129, 54]. Dans ces études, de courtes molécules d'ADN double brin (hairpins de 3 à 8 paires de bases, totalement hybridées sans partie simple brin) sont transloquées à travers l'hémolysine. La translocation de ces molécules s'effectue en deux étapes (voir figure 3.1) :

- Dans un premier temps, une molécule diffusant à proximité du pore est piégée dans le vestibule de l'alpha hémolysine. Le niveau de courant bloqué dépend de la taille de la molécule : plus la molécule est grosse, plus le courant est faible.
- Après une durée variable, de quelques millisecondes à quelques secondes, un court pic de diminution de courant est observé avant que le courant électrique ne retrouve son niveau initial. Cette étape est interprétée comme la dénaturation de l'ADN suivie de la translocation de la molécule sous forme simple brin à travers le canal transmembranaire de l'alpha hémolysine.

Le temps de résidence de l'ADN dans le vestibule augmente avec la longueur d'appariement de l'ADN. Ce temps est d'une milliseconde en moyenne pour les duplex de 3 paires de bases, et de quelques secondes pour les duplex de sept paires de bases. Cette cinétique de dissociation de courtes molécules d'ADN peut être décrite par une réaction à une étape, où le temps de résidence correspond au saut à travers une barrière ΔG^0 égale à l'enthalpie libre d'appariement

des molécules d'ADN en solution.

Dans ces expériences, les molécules ne pénètrent pas dans le canal de l'alpha hémolysine, elles restent dans la partie vestibulaire de l'alpha hémolysine (cf figure 3.1). Le courant électrique permet de sonder le passage de la molécule, mais la différence de potentiel n'exerce pas ou peu de force sur la molécule. L'accord entre les temps de dissociation calculés dans les expériences et en solution [115, 133] suggère de plus qu'il n'y a pas d'interaction majeure entre l'ADN et l'alpha hémolysine.

Il est difficile d'ouvrir des molécules de ce type plus longues que 8 paires de bases : le temps moyen de dézippage devient trop grand. En effet, ces ADN sont "coupés nets", c'est-à-dire qu'ils n'ont pas d'extrémité simple brin qui dépasse contrairement à ce qui est montré figure 2.1. Le potentiel appliqué n'est pas traduit en terme de force appliquée sur l'ADN. Dans les expériences suivantes, une "poignée" simple brin dépasse des molécules d'ADN, ce qui permet d'ouvrir des molécules plus longues et de contrôler en partie la force à l'origine de la dénaturation de l'ADN.

3.1.2 La présence d'une poignée simple brin sur les hairpins permet d'exercer une force électrophorétique qui facilite le dézippage de la molécule

Si l'on ajoute une poignée simple brin le long des duplex d'ADN, il est possible d'ouvrir de plus longs duplex d'ADN [86, 117, 93]. La partie double brin de la molécule est coincée dans le vestibule tandis que la poignée, généralement un complexe poly A de 30 paires de bases, s'insère dans le canal transmembranaire de l'alpha hémolysine, là où le champ électrique est le plus intense (voir figure 2.1). Une force mécanique est alors exercée sur le duplex via la force électrophorétique exercée sur la poignée, comme montré sur la figure 2.1 en introduction.

Les cinétiques d'ouverture des duplex d'ADN peuvent être interprétées selon un modèle de Kramers dont la barrière énergétique effective de dézippage ΔG_{eff} est biaisée par la différence de potentiel appliquée de part et d'autre de la membrane. Il est nécessaire d'introduire un coefficient Q_{eff} , qui représente la charge effective de la portion d'ADN "tirée" par la différence de potentiel. Cette charge effective est de l'ordre de l'électron (1.13e, cf [86]). Si l'on suppose que la force est appliquée uniquement sur les 12 paires de bases de la poignée simple brin d'ADN située dans la partie transmembranaire du pore, là où le champ électrique est le plus intense, nous trouvons une charge effective par paire de base de 0.1e. Cette valeur relativement faible montre que la charge négative de l'ADN dans le canal est contrebalancée par des contre-ions positifs et par les groupements polaires de l'alpha hémolysine.

3.2 Ouverture de courts duplex d'ADN : modèle de Kramers

La distribution des temps de passage est approximativement exponentielle dans toutes ces expériences. Finalement, elles peuvent s'intégrer dans un modèle de Kramers modifié, où le temps de dézippage est le temps de passage d'une barrière d'énergie ΔG . Cette barrière est réduite par le voltage U , proportionnellement à la charge effective Q_{eff} de l'ADN dans la partie transmembranaire du pore d'alpha hémolysine. Le temps de dézippage moyen, $\langle \tau_{unzip} \rangle$,

16 Expériences antérieures et modèles d'ouverture de l'ADN à travers un nanopore

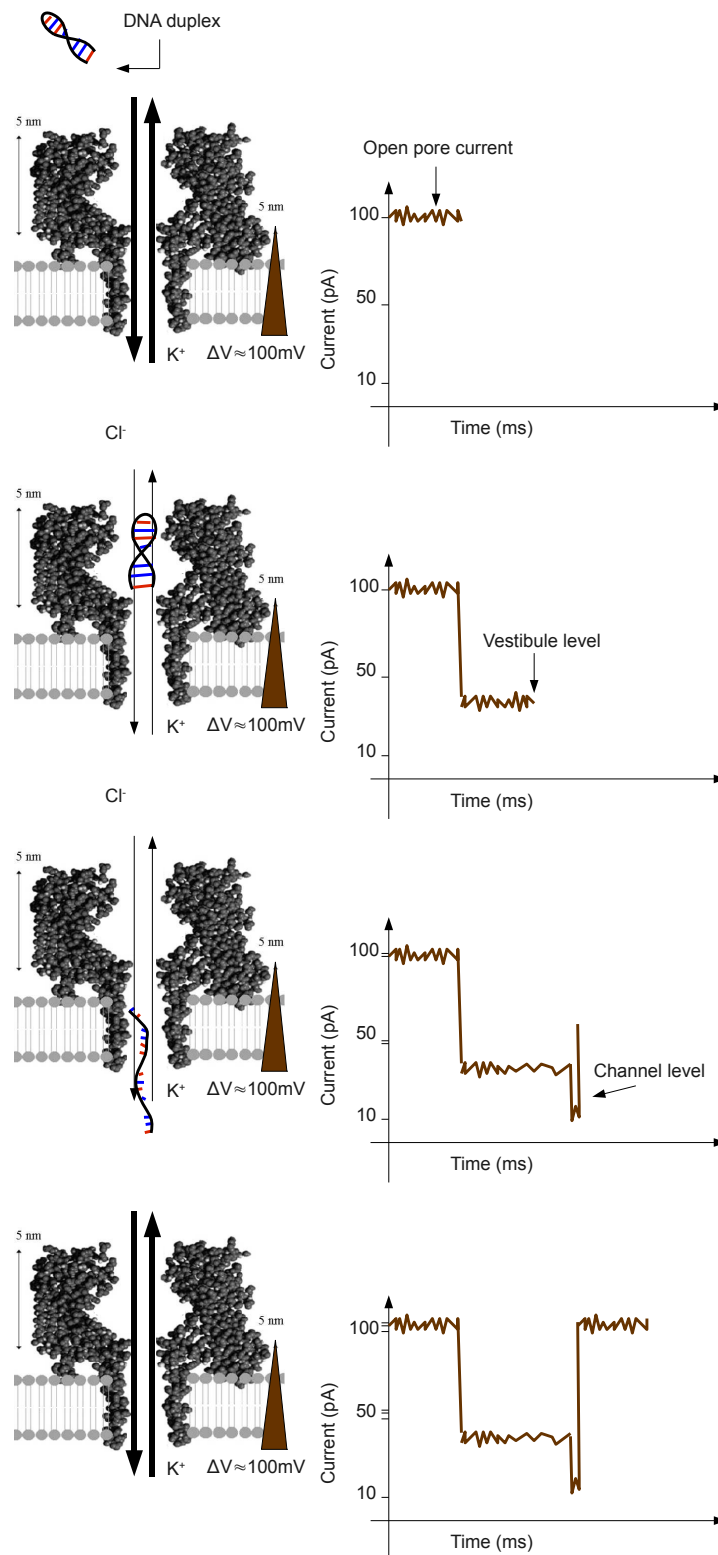


Figure 3.1 – Signal de translocation typique observé dans [129] pour des molécules d'ADN sans poignée simple brin. La molécule d'ADN est piégée dans le vestibule pendant une durée variable. Si la molécule se dénature, elle passe à travers le nanopore sous forme d'ADN simple brin, ce qui se traduit par une chute de courant rapide avant la remontée à son niveau ouvert.

s'écrit alors :

$$\langle \tau_{unzip} \rangle = \frac{1}{\nu_0} \exp\left(\frac{E - Q_{eff} U}{k_b T}\right)$$

Avec :

- $\langle \tau_{unzip} \rangle$ temps moyen de dézippage de la molécule
- U différence de potentiel appliquée de part et d'autre de la membrane
- E qui est une énergie est égale à l'enthalpie libre d'appariement du duplex d'ADN ΔG^0 , lorsque la molécule n'a pas de poignée simple brin. En présence de poignée simple brin, cette énergie est une énergie effective de dézippage de l'ADN.
- Q_{eff} charge effective de l'ADN dans le canal d'alpha hémolysine; elle vaut $\approx 1e$ avec une poignée simple brin. Elle est quasiment nulle sinon.
- ν_0 fréquence d'essai moléculaire

Le processus décrit étant un processus en une étape, la distribution des temps de passage est une simple exponentielle.

3.3 Ouverture de longs duplex d'ADN

Le modèle et les expériences précédentes suggèrent que l'ouverture de l'ADN s'effectue en une seule étape. Les molécules d'ADN plus longues (> 15 paires de base) ne s'ouvrent probablement pas en une seule étape. On s'attend à ce que la séquence influe localement sur le processus de dézippage, de la même manière que les expériences de dénaturation mécanique montrent des points de blocage ou des zones de faible stabilité le long de l'ADN.

Pour décrire ce phénomène, nous avons quantifié les temps de premier passage à travers l'alpha hémolysine de long duplex d'ADN (> 45 pb) munis d'une poignée simple brin. Nous avons modélisé ce processus par la diffusion biaisée à force constante, d'une fourche d'ouverture le long de la molécule d'ADN. Je présente succinctement le modèle de diffusion de la fourche avant de présenter l'article dans lequel nous étudions le dézippage de deux molécules ayant une stabilité globale identique, mais dont le paysage énergétique parcouru par la fourche d'ouverture est très différent (cf figure 5 de l'article du chapitre 4).

3.3.1 Un modèle d'ouverture séquentielle de l'ADN à travers un nanopore

Notre groupe a décrit un modèle théorique [10] du processus d'ouverture pour de longues molécules d'ADN à travers un nanopore.

Le dézippage est décrit dans le modèle par un processus de diffusion d'une fourche de translocation (cf figure 3.2) dans un paysage énergétique 1D déterminé par la séquence de l'ADN. Le paysage énergétique est biaisé par le voltage appliqué. La distribution des temps de translocation peut alors être calculée numériquement en fonction de la température et du voltage pour un paysage énergétique donné, c'est-à-dire pour une séquence donnée.

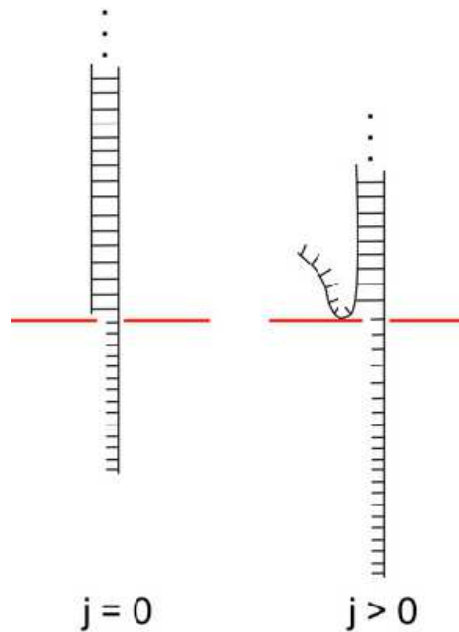


Figure 3.2 – Représentation schématique de l'ouverture d'ADN utilisée dans le modèle d'ouverture séquentielle. Le fourche de translocation est située au niveau du pore. Elle délimite l'ADN double brin du côté du compartiment cis ainsi que les j bases simple brin de la partie de molécule deshybridée, des j autres paires de bases situées dans le compartiment trans.

Pour calculer le paysage d'énergie, il faut d'abord calculer E_{duplex}^j , fonction égale au travail à fournir pour séparer les deux brins d'ADN de la paire de bases 1, première paire de bases double brin, à la paire de bases j , dernière paire de bases ouverte et qui représente la position de la fourche d'ADN. Dans le modèle, cette énergie est calculée à partir de la description théorique de la différence d'enthalpie et d'entropie (ΔH_i et ΔS_i) correspondant à la formation des différentes paires de bases. Cette description inclut l'influence des paires de bases voisines et est basée sur des mesures expérimentales [115, 133].

$$E_j^{duplex} = \sum_{i=1}^j (\Delta H_i - T \Delta S_i)$$

Le biais énergétique lié à la différence de potentiel est pris en compte en introduisant le paramètre W , qui représente la différence d'énergie électrostatique entre deux bases liées du côté cis de la membrane et deux paires de bases non liées, chacune d'un côté de la membrane. Le paysage énergétique vaut alors :

$$E_j = E_j^{duplex} - Wj$$

W est le paramètre qui dépend de la différence de potentiel U appliquée à travers la membrane. Le plus simple est de supposer que W soit proportionnel à U , la constante de proportionnalité étant la charge effective q_{eff} d'une paire de bases¹.

1. D'après Mathé et coll.[86], $q_{eff} \approx 0.1e$.

$$W = q_{eff} U \quad (3.1)$$

Cette simplification est discutée en détail dans le deuxième article.

3.3.2 Une ouverture séquentielle des longues molécules d'ADN ? Conception de l'expérience.

En prenant en compte explicitement la séquence de l'ADN, il devrait être possible de mettre en évidence le fait que l'ouverture de longues molécules d'ADN ne se fait pas en une étape. Notamment, deux molécules de stabilité globale identique ayant un paysage énergétique différent, devraient s'ouvrir différemment si l'ouverture est séquentielle et de manière identique sinon.

Nous montrons un tel effet dans l'article qui suit. Nous avons produit deux molécules d'ADN, appelées λ -SLS et λ -RLS, qui ont une région double brin de 45 paires de bases et une poignée polyA simple brin de 30 paires de bases. Ces séquences ont été choisies de manière à obtenir une stabilité globale identique entre les deux molécules et un paysage énergétique très différent :

- λ -SLS présente un paysage énergétique relativement homogène
- λ -RLS a un paysage "escarpé". Notamment, une région riche en A-T précède une région riche en G-C qui induit une bosse et un blocage probable de la fourche de translocation à ce niveau.
- pour éviter un effet dû à une différence lors de l'initiation de l'ouverture, les 8 premières paires de bases du duplex sont identiques entre les deux molécules.

L'article qui suit décrit les résultats qui montrent qu'effectivement, si les données de stabilité globale sont identiques, comme le montrent les données numériques obtenues par le serveur mfold [133] et les courbes de fusion en solution, leur temps de dézippage à travers l'alpha hé-molysine varie d'un facteur 3, en accord qualitatif avec le modèle d'ouverture séquentiel.

NOM	SEQUENCE	
λ -RLS	5'-CCTGAACAGTGAGCGAAGCCCGCGCGGACAAAATGCCGCAGCCTA ₃₀ -3'	75pb
	3'-GGACTTGTCACCTCGCTTCGGGCCGCGCCTGTTTTACGGCGTCGGA-5'	45pb
λ -SLS	5'-CGTAGTTCGTGCGTGGAGATCTGCCTCCGTGGCCTCGCGCAGCCTA ₃₀ -3'	75pb
	3'-GCATCAAGCACGCACCTCTAGACGGAGGCAACGGAGCGCGTCGGA-5'	45pb