



HAL
open science

Comprehension des mécanismes électrostatiques impliqués dans la plasticité structurale de la chromatine eucaryote

Aurélie Bertin

► **To cite this version:**

Aurélie Bertin. Comprehension des mécanismes électrostatiques impliqués dans la plasticité structurale de la chromatine eucaryote. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. Français. NNT: . tel-00089037

HAL Id: tel-00089037

<https://theses.hal.science/tel-00089037v1>

Submitted on 9 Aug 2006

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.

UNIVERSITÉ PARIS XI

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHEMIE

ANNÉE 2005 - 2006

SÉRIE DOCTORAT N° 896

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE

DE CHATENAY MALABRY

UNIVERSITÉ PARIS XI

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par

Aurélié BERTIN

**COMPREHENSION DES MECANISMES ELECTROSTATIQUES IMPLIQUES DANS LA
PLASTICITE STRUCTURALE DE LA CHROMATINE EUCARYOTE.**

soutenue le : 16 Juin 2006

JURY :

M. Jan Bednar

M. Didier Chatenay, Rapporteur

Mme Dominique Durand

Mme Françoise Livolant, Directrice de thèse

Mme Brigitte Pansu, Présidente

M. Jonathan Widom, Rapporteur

Ces années de thèse et de présence dans le groupe "ADN" du Laboratoire de Physique des Solides ont été pour moi enrichissantes tant scientifiquement qu'humainement. Je dois énormément aux différentes personnes que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de ces quatre dernières années. Malgré les difficultés expérimentales, je me suis toujours sentie soutenue et épaulée. Je me réjouis de pouvoir les remercier, à cette occasion, et j'espère y parvenir de mon mieux.

Tout d'abord, j'aimerais remercier l'ensemble des **membres du jury** pour avoir accepté, avec enthousiasme, de juger mon travail, de se déplacer, pour certains, de loin et de lire un manuscrit quelque peu conséquent...Particulièrement, je remercie les rapporteurs, **Didier Chatenay** et **Jonathan Widom**.

Je remercie également **Jean-Paul Pouget**, le directeur du laboratoire pour son accueil et sa disponibilité envers la représentante thésarde que j'ai été.

Un grand merci à **Françoise Livolant**, qui a dirigé cette thèse, m'a encouragée et remotivée, pendant les moments difficiles, au cours de ces années. Vous avez su me faire confiance et m'avez accordée une attention constante, toujours avec la même gentillesse.

Je ne pourrais jamais assez remercier **Dominique Durand** qui a contribué de manière plus que significative aux résultats de rayons X qui sont présentés ci-après. Merci pour ta rigueur mais surtout pour tes encouragements et ta gentillesse. Je pense que sans ton aide et ta contribution, le résultat final aurait été tout autre...

Je voudrais remercier l'ensemble des membres du groupe "ADN" pour les pauses "pommes" et la bonne humeur ambiante. Vous allez tous me manquer.

- Merci à **Madalena Renouard**. Merci pour ton aide précieuse dans la "cuisine biochimique" (3 étoiles). Je pense que sans ton arrivée au sein du groupe, je ne serais jamais parvenue à reconstituer ces NCPs et que cette thèse n'aurait finalement pas abouti. Merci pour le café matinal, à huit heures et pour tes fameux gâteaux (surtout au chocolat!).
- Merci à **Stéphanie Mangenot**. Merci beaucoup pour ton implication dans toutes ces manips de fins de thèse, pour ton dynamisme et ta bonne humeur. Bon ben "bisous bisous"...
- Merci à **Marta de Frutos**. Même si nous n'avons pas eu l'occasion de travailler ensemble, nous avons néanmoins beaucoup partagé dans les différents bureaux où nous avons migré...Nos discussions vont me manquer et je pense que je ne retrouverai pas d'ici longtemps une copine de bureau qui me soutienne autant.
- Merci à **Eric Raspaud**. J'espère qu'un jour, malgré le poids des ans (!!), tu finiras ces manips sur l'ATP qui faisaient déjà partie de mon projet de DEA. Je reste toujours admirative devant ta maîtrise dans l'art d'économiser les mots...
- Merci à **Amélie Leforestier** qui m'a initiée aux techniques de cryomicroscopie électronique.
- Merci à **Monique da Conceição** qui m'a beaucoup aidé au début de cette thèse.
- Merci aux deux nouveaux thésards du groupe **Adriana toma** et **Alex Rapp**, je leur souhaite beaucoup de réussite dans leurs projets respectifs.

- Je remercie également les trois stagiaires avec qui j'ai pu travailler : **Gabriel Buffin**, **Sofiane Gouendouzen** et **Fabien Allot** mais aussi **Thomas Forth** et son humour très anglais.

Je remercie également **Brigitte Pansu** qui a accompli son rôle de marraine de thèse de manière exemplaire, jusqu'à la fin, puisqu'elle a accepté de faire partie de mon jury et même de le présider.

Je remercie également **Karolin Luger** et le "Luger lab" pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé au sein de leur laboratoire. Je pense plus particulièrement à **Karolin**, **Pam Dyer** et à **Raji Edayathumangalam** qui ont consacré un mois de leur temps à me former aux techniques de reconstitution de NCPs et qui ont constamment répondu à mes multiples questions lors de mon retour en France.

Je tiens à remercier **Gérard Péhau-Arnaudet** pour son accueil, sa gentillesse et sa patience à la plate-forme de cryo-microscopie électronique de l'institut Pasteur. J'admire son calme olympien devant les facéties du M...DS et du M...doscope ou même des utilisatrices...

Je remercie également **Jan Skov Pedersen** qui nous a permis d'utiliser son montage expérimental pour que nous continuions les expériences de SAXS après la fermeture du LURE, et également **Patrice Vachette** au LURE et **Stéphanie Finet** à l'ESRF pour tous les réglages délicats.

Je remercie les membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer, notamment ceux du couloir vert du deuxième étage, aile Est pour leur sympathie (Claudie, Odile, Mathieu, Nathalie, Katia, etc...) mais aussi Dominique et son rire peu discret, Andres, Mériem, Katarina, Sylvette, Jean-Pierre pour ses recettes et son aide au cours de nos déménagements de bureau, Marc pour son accueil dans le couloir rose, etc...

Je remercie aussi les étudiants de la Fac d'Orsay qui ont suivi les TP et TD et qui, pendant quelques heures, m'ont permis d'oublier quelques difficultés expérimentales...

Je remercie mes amis et plus particulièrement Aurélie, Alex, Ophélie, Laetitia et Victor, Bertrand, Emilie, Claire, Aude, Marion, Mathieu, Flore et Nicolas, Etienne et France, Jérémie et Mathilde, Philippe, JC et Sandrine, Anne et Antoine, Pierre, Manue, Charlotte, Jocelyne, Gaudeline etc... pour tous ces bons moments...

Je remercie ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont soutenue et encouragée non seulement pendant la thèse mais aussi au cours de toutes ces années d'études (angoissantes pour des parents) qui ont précédées. Je remercie mon frère ,Yannick, Cassine et leurs deux adorables petits, Siloé et Youna.

J'ai une pensée toute particulière pour Willy qui m'a vaillamment soutenue et constamment remontée le moral au cours de tous les moments difficiles et à qui je dédie ce travail.

SOMMAIRE

Chapitre I

Des particules cœur de nucléosome à la plasticité structurale de la chromatine eucaryote

A. La chromatine eucaryote : une organisation dense	3
1. Le noyau : un milieu dense et hétérogène	3
a. Description du noyau	3
b. Concentrations ioniques et densité en ADN dans le noyau	4
2. Différents niveaux de compaction de la chromatine	6
a. Premier niveau d'organisation : la particule cœur de nucléosome	6
b. Organisation structurale supramoléculaire de la chromatine eucaryote	10
B. La particule cœur de nucléosome : un colloïde chargé	15
1. Répartition hétérogène des charges	15
2. Stabilité des NCPs en fonction de la concentration saline et de la concentration en particules	16
3. Interaction ADN-histones, positionnement de l'ADN par rapport à l'octamère d'histones	17
a. Interaction ADN-histones.	17
b. Positionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones	17
c. Repositionnement de l'octamère d'histones relativement à l'ADN par chauffage	18
d. Modèles de repositionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones.	18
C. La chromatine eucaryote : une organisation dynamique	18
1. Ouverture spontanée de l'ADN nucléosomal : "respiration" de l'ADN	19
2. Remodelage de la chromatine	19
3. Variants des histones et modulation de l'organisation de la chromatine	20
a. Description des principaux variants d'histones	20
b. Modulation de la compaction de la chromatine par la présence de variants d'histones	21
4. Modifications post-traductionnelles des queues des histones	22
a. Description des modifications post-traductionnelles	22
b. Effet des modifications post-traductionnelles sur la structure et la fonction de la chromatine	24
c. Mimer l'acétylation par élimination des queues d'histones	25
Conclusions	27

Chapitre II

Particules colloïdales chargées en solution : Interactions et agrégation.

A. Interactions entre particules colloïdales chargées en solution	28
1. Interactions	28
a. Répulsions électrostatiques. Approximation de champ moyen	28
b. Répulsions sphères dures	31
c. Interactions attractives de Van der Waals.	32
d. Théorie DLVO	33
e. Interaction attractive de déplétion	33
2. Interactions et coefficients du viriel	34

a. Développement du viriel.	34
b. Méthodes de mesure du second coefficient du viriel	35
B. Interactions attractives entre particules de même charge	36
1. Exemples d'objets biologiques précipités par des agents multivalents	36
a. ADN précipités par des ions multivalents	37
b. Condensation de la F-actine	38
c. Condensation des NCPs isolées par des cations multivalents	38
2. Interprétations théoriques	39
a. Corrélations dynamiques entre contre-ions condensés	40
b. Corrélations statiques entre contre-ions condensés	41
C. Interactions et condensation de particules cœur de nucléosome	43
1. Interactions et conformation en solution diluée	43
a. Queues d'histones et interactions attractives	43
b. Modèles théoriques et simulations des interactions entre NCPs	45
2. Phases denses de NCPs	47
a. Cristaux de NCPs	47
b. Condensation de NCPs en présence d'ions monovalents	49
c. Phases denses de NCPs agrégées par de la spermidine ³⁺	52
Conclusions	53
Objectifs de la thèse	54

Chapitre III

Préparation de Particules Cœur de Nucléosome natives ou recombinantes: Caractérisation et stabilité des particules

A. Préparation et Caractérisation des particules cœur de nucléosome	55
1. Purification à partir de chromatine de thymus de veau	55
a. Préparation	55
b. Caractérisation	56
2. Reconstitution de particules cœur de nucléosome à partir d'histones et d'ADN recombinants	59
a. Production et purification d'ADN 5S	61
b. Production et purification d'histones intactes ou globulaires recombinantes	63
c. Reconstitution d'octamères d'histones et de nucléosomes.	64
B. Rôle des queues d'histone dans la reconstitution et la stabilité des NCPs.	67
1. Rôle des queues H2A-H2B dans la reconstitution en particules cœur de nucléosome.	67
2. Stabilité des particules cœur de nucléosome trypsinisées.	79
Conclusions	80

Chapitre IV

Interactions et conformation de NCPs en solution

A. Rôle des queues d'histones dans la conformation et les interactions de particules cœur de nucléosome	81
1. Article 1	81
2. Article 2	90

B. Etude préliminaire de la conformation des NCPs par cryomicroscopie électronique.	106
1. Mode de préparation d'échantillons vitrifiés en films minces	106
a. Préservation de l'environnement aqueux par vitrification des échantillons	106
b. Principe de vitrification d'échantillons en films minces	106
2. Détermination des conditions optimales pour l'imagerie de NCPs isolées.	107
a. Intérêt de la chambre à environnement contrôlé	107
b. Conditions d'imagerie optimale pour l'obtention de contraste	108
c. NCPs intactes isolées en présence de 10mM de sels monovalents	109
d. Résultats préliminaires de reconstruction d'images	110
e. Déstabilisation de NCPs gH2AgH2B par vitrification en films minces	112
Conclusions	114

Chapitre V

Rôle des ions multivalents dans les interactions entre NCPs

A. Agrégation des NCPs par des cations multivalents	116
I. Diagrammes de phase de précipitation des NCPs par des cations multivalents	116
1. Etablissement des courbes de précipitation et des diagrammes de phase de précipitation	116
2. Agrégation des NCPs par le magnésium	118
a. Allure des courbes de précipitation de NCPs précipitées par le magnésium	118
b. Diagramme de phase des NCPs agrégées par le Mg ²⁺	119
c. Effet des ions monovalents	120
3. Agrégation des NCPs par la spermidine	121
a. Allure des courbes de précipitation de NCPs précipitées par la Spd ³⁺	121
b. Diagramme de phase des NCPs agrégées par la Spd ³⁺	122
4. Discussion	123
a. Allure générale des diagrammes de phase	123
b. Comparaison Mg ²⁺ et Spd ³⁺	124
c. Effet de l'EDTA dans la précipitation des NCPs par des cations multivalents	126
d. Particules Cœur de Nucléosome isolées et chromatine : comparaison	128
II. Structure des phases denses de NCPs obtenues après précipitation induite par des ions multivalents	129
1. Organisation des NCPs précipitées par du Magnésium²⁺	130
a. Description macroscopique du précipité	131
b. Organisation locale des NCPs dans les agrégats précipités au Mg ²⁺	132
2. Organisation des NCPs précipitées par de la spermidine³⁺	136
a. Nature des phases denses déterminée par diffraction des rayons X	136
b. Description par microscopie optique des phases denses de NCPs précipitées par la spermidine	143
c. Conclusions et discussion	146
B. Formation d'agrégats de NCPs en présence d'ATP	150

1. Résultats	151
a. Evaluation des interactions entre NCPs pour des concentrations salines variables	151
b. Evaluation des interactions en présence d'ATP	153
c. Courbe de précipitation	155
d. Stabilité et dissociation des NCPs en présence de concentrations variables en ATP	156
2. Discussion, Perspectives	157
Conclusions	160

Chapitre VI

Phases denses de NCPs recombinantes obtenues par stress osmotique

A. Préparation des phases denses par stress osmotique et méthode d'analyse	161
B. Phases denses de NCPs natives analysées en capillaires plats	162
1. Description des structures obtenues.	162
a. Concentrations ioniques élevées	163
b. Faibles concentrations salines	164
2. Effet de l'EDTA	169
a. observations	169
b. Interprétation	170
C. Effet des queues d'histones dans la formation de phases denses de NCPs recombinantes	171
1. Phases denses obtenues avec des NCPs recombinantes intactes	171
2. Phases denses obtenues avec des NCPs recombinantes gH3gH4	172
a. Effet de la concentration en PEG	173
b. Effet de la concentration saline	174
3. Comparaison de NCPs intactes et gH3gH4	175
a. Textures macroscopiques des phases denses de NCPs intactes et gH3gH4	175
b. Variation du taux de compaction des phases denses analysée par diffraction des rayons X	177
Conclusion	178
Conclusion générale	179

Annexes

Annexe II.1. Préparation de NCPs à partir de thymus de veau	182
Annexe II.2. Production et purification d'ADN 5S 146pb	186
Annexe II.3. Production et purification d'histones recombinantes	190
Annexe II.4. Spectres de masses des histones produites	194
Annexe IV.1. Notions de microscopie et de cryomicroscopie électronique	195
Annexe V.1. Observations en microscopie optique	199
Annexe V.2. cryofracture	200
Annexe V.3. Diffraction des rayons X	201
Annexe V.4. Calcul du second coefficient du viriel A_2 par diffusion Rayleigh statique de la lumière	203

Bibliographie	205
----------------------	------------

Abbréviations utilisées

a.a. : acide aminé
 A_2 : Second coefficient du viriel
ADN : Acide Désoxyribonucléique
 a_H : paramètre hexagonal
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BET : Bromure d'éthidium
 βme : β -mercaptoéthanol.
 β_T : compressibilité isotherme
 C_{ap} : Concentration apparente de charges négatives pour des NCPs.
 C_s : coefficient d'aberration sphérique
 C_c : coefficient d'aberration chromatique
CTF : Fonction de transfert de corrélation
 d_c : distance entre NCPs successives dans une colonne
 D_{max} : Extension maximale des particules
DTT : dithiothreitol
 ϵ : constante diélectrique du milieu
 ϵ_0 : permittivité diélectrique du vide
EDTA : acide éthylène diamino-tétra-acétique
EGTA : acide éthylène glycol-bis(beta-aminoethylether)-N, N, N', N' tétra-acétique.
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
 $g(r)$: fonction de distribution de paires
IPTG : isopropyl- β ,D-thiogalactopyranoside
 $I(q)$: intensité diffusée/diffractée.
 k_B : constante de Boltzmann
KCl : Chlorure de potassium
kV : kiloVolts
LB : "Lennox L broth"
 λ_B : longueur de Bjerrum
M : molaire
mM : millimolaire
 Mg^{2+} : magnésium²⁺
 N_A : nombre d'Avogadro
NaCl : Chlorure de sodium
NCPs : Particules Cœur de Nucléosomes
 Π : pression osmotique
pb : paires de bases
Pa : pascals
PEG : Polyéthylène glycol
PMSF : Phényl Methyl Sulfonyl Fluoride
 $P(r)$: fonction de distribution des distances
 q : vecteur de diffusion (\AA^{-1})
RB : Refolding Buffer
 R_g : rayon de gyration des particules
SAXS : Small Angle X-rays Scattering
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
 Spd^{3+} : spermidine³⁺
 $S(q)$: facteur de structure

TB : "Terrific Broth"
TE : tampon Tris EDTA
u.e. : unite d'enzymes
V(r) : potentiel d'interaction entre particules
Z_{eff} : Charge effective
Z_{str} : Charge structurale

Chapitre I

Des particules cœur de
nucléosome à la
plasticité structurale de
la chromatine
eucaryote.

A. La chromatine eucaryote : une organisation dense et hétérogène

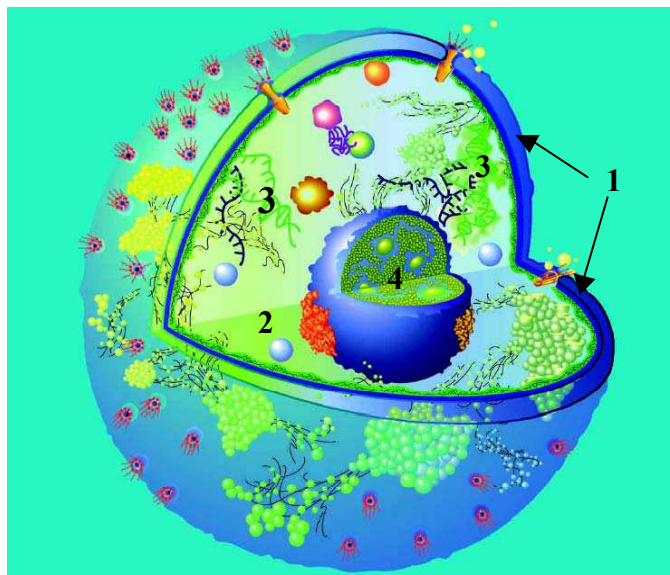
Chaque cellule eucaryote doit stocker des quantités colossales d'informations génétiques portées par des molécules d'ADN. Le génome humain comporte trois milliards de paires de base d'ADN qui mises bout à bout, s'assemblent sur deux mètres de long. Les deux mètres d'ADN humain, répartis en 46 chromosomes, sont confinés dans un noyau de dimensions micrométriques (5 micromètres environ). Chaque molécule d'ADN, en bon solvant, formerait une pelote de 100µm de diamètre dont les dimensions seraient largement supérieures à celles du noyau. L'ADN des cellules eucaryotes doit donc être fortement compacté. Un premier niveau de condensation est celui de la particule cœur de nucléosome (NCP) décrite extensivement dans la suite du chapitre. Ces NCPs, liées par un ADN de liaison, sont constituées par l'enroulement de 146 paires de base d'ADN autour d'un octamère de protéines, les histones. Les NCPs doivent ensuite être condensées pour atteindre un niveau de compaction suffisant. Jusqu'à présent, l'organisation supramoléculaire de la chromatine reste très controversée.

1. Le noyau : un milieu dense et hétérogène

a. Description du noyau

Une représentation schématique du noyau et de ses constituants est présentée sur la figure I.1. Le noyau occupe en moyenne 10% du volume cellulaire. Son diamètre atteint quelques micromètres. Il est délimité par une double membrane nucléaire (notée 1 sur la figure I.1). A l'intérieur du noyau, le nucléoplasme (2 sur la figure I.1) forme une matrice gélatineuse et visqueuse composée de macromolécules (protéines et d'ADN) (3 sur la figure I.1). Un nucléole (4 sur la figure I.1), lieu des synthèse de l'ARN (5) est visualisé (Figure I.1).

Dans le noyau, les macromolécules sont compartimentées. Chaque chaîne d'ADN est localisée dans un territoire chromosomique (Cremer et al., 2004, Spector et al., 2001). Des échanges rapides et dynamiques de protéines s'opèrent entre les différents compartiments et le nucléoplasme (Misteli, 2001).



DL. Spector (2001)

Figure I.1 Représentation schématique du noyau cellulaire (Spector, 2001).

b. Concentrations ioniques et densité en ADN dans le noyau

Concentrations ioniques

Les concentrations ioniques dans la cellule sont difficiles à évaluer. D'une part, elles peuvent être variables localement au sein d'une même cellule ou d'un type cellulaire à un autre. D'autre part, les concentrations ioniques sont susceptibles d'évoluer au cours du cycle cellulaire et sont régulées par la présence de canaux et de pompes ioniques.

Pour des cellules entières, les mesures de concentration et distribution de cations sont principalement effectuées par perte d'énergies d'électrons (EELS, cf. Leapman et Ornberg (1988)) ou cartographie par spectroscopie dispersive des rayons X (EDXS, cf. Fiori et al., 1988). Les concentrations cellulaires en éléments calcium mesurées sont de l'ordre de 1mM. Les échantillons dans lesquels les concentrations ioniques cellulaires sont évaluées, sont cryosectionnés puis déshydratés préalablement aux mesures. Il est possible que la déshydratation de ces échantillons induise des biais dans la répartition des concentrations ioniques mesurées. Par une méthode de microanalyse aux rayons X (EDXS), Cameron et al.(1979) ont montré que les éléments calcium, soufre et chlorure sont plus abondants au cours de la mitose alors que magnésium, phosphore et potassium sont majoritaires pendant l'interphase, dans des noyaux de cellules du duodénum de souris. Au cours du cycle cellulaire, les concentrations en cations monovalents augmentent pendant les phases S, G2 et M à cause, principalement, d'une élévation du taux de sodium (Warley & Stephen, 1983).

Plus récemment, Strick et al (2001) ont effectué des mesures par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) sur des cellules de mammifères cryo-facturées mitotiques ou à l'interphase. Ils donnent des concentrations en magnésium et calcium particulièrement élevées, localement, au niveau des chromosomes mitotiques (26mM Ca^{2+} , 17mM Mg^{2+}). Au cours de l'interphase, les concentrations de cations divalents liés à la chromatine sont plus faibles (5mM Ca^{2+} et 3mM Mg^{2+}).

Les polyamines (spermidine³⁺, putrescine²⁺ et spermine⁴⁺) sont des polycations de faible poids moléculaire impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire (Tabor et Tabor, 1984). Les concentrations intracellulaires en polyamines atteignent quelques millimolaires (0.1-2mM dans les cellules de mammifères, 7mM dans les cellules de champignons (*Neurospora crassa*)). La spermidine³⁺ présente une plus forte concentration *in vivo* que la putrescine²⁺ et la spermine⁴⁺, chez les eucaryotes (Davis et al., 1992). Les polyamines sont liées aux constituants cellulaires chargés négativement (ADN, ARN, protéines acides...) et seule une fraction (7 à 15%) serait libre en solution (Watanabe et al, 1991).

Le tableau I.1 récapitule différentes données regroupées par Bloomfield (1996) et Lodish et al. (2000), cohérentes entre elles. Les données reportées ne discriminent pas les ions liés aux macromolécules des ions libres.

Ions (mM)	Plasma sanguin humain Bloomfield (1996)	Muscle squelettique Bloomfield (1996)	Cellule animale en culture Bloomfield (1996)	Cytoplasme de <i>E.Coli.</i> Bloomfield (1996)	axone du calamar Lodish et al.(2000)		mammifère Lodish et al.(2000)	
					Cellule	Plasma sanguin	Cellule	Plasma sanguin
Na ⁺	150	14		290-930	50	440	12	145
K ⁺	5	150		23	400	20	139	4
Mg ²⁺	0.9	8					0.8	1.5
Ca ²⁺	2.5	1			0.0003	10	<0.0002	1.8
Putrescine ²⁺			0.2-2.5					
Spermidine ³⁺			1-2	21				
Spermine ⁴⁺			1-2	6				
Cl ⁻	105	16		faible	40-50	560	4	116
HCO ³⁻	27	10					12	29
glutamate				30-260				
protéines	17	50			300-400	5-10	138	9

Tableau I.1 Concentrations ioniques cellulaires exprimées en millimolaires

Communément, on désigne comme "physiologique" des concentrations en ions monovalents de l'ordre de 150mM, en ions divalents de 10mM et en ions de valence plus élevée de quelques mM. Néanmoins, localement, on ne dispose pas de données relatives aux variations de ces concentrations.

Compaction et concentration de l'ADN dans le noyau

La molécule d'ADN peut atteindre, localement des concentrations très élevées. Différents groupes ont évalué les concentrations locales en ADN notamment par reconstruction de volumes chromosomaux par microscopie électronique à partir de coupes de cellules fixées (Benett et al, 1983). Bohrmann et al. (1993) ont évalué les concentrations en ADN dans la chromatine eucaryote condensée. Certaines de ces valeurs sont reprises par Daban (2000 et 2003) et sont regroupées dans le tableau I.2. Les concentrations en ADN dans le noyau semblent donc supérieures à 100mg.mL⁻¹.

Objet biologique	Concentration en ADN (mg.mL ⁻¹)	
Nucléotide bactérien	20	
Noyau en interphase	100	
Chromosomes mitotiques	Fibroblastes humains	160
	Lymphocytes humains	120
	Dicotylédon (plante)	180

Tableau I.2. Concentrations locales en ADN pour différents objets biologiques (Daban 2000)

Par des mesures de spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS) Weidemann et al. (2003) évaluent une concentration moyenne en ADN pour des cellules en interphase de 14mg.mL^{-1} . Localement, ces mesures indiquent une concentration maximum égale à 25mg.mL^{-1} en ADN. Ces dernières valeurs sont particulièrement faibles par rapport aux données regroupées par Daban (2000, 2003). Il est raisonnable de considérer que les concentrations en ADN nucléaires varient de quelques dizaines de mg.mL^{-1} à environ 250mg.mL^{-1} suivant son état de compaction.

2. Différents niveaux de compaction de la chromatine

a. Premier niveau d'organisation : la particule cœur de nucléosome

La molécule d'ADN : description

L'ADN (Acide Désoxyribonucléique) est le support de l'information génétique. Il est formé par l'association antiparallèle de deux brins polymériques de nucléotides (Figure I.2.a). Chaque nucléotide est constitué par un sucre, un phosphate et une base (purines : adénine (A) et guanine (G), pyrimidines : thymine (T) et cytosine (C)). Ces deux brins polymériques s'agencent en double hélice droite via des liaisons hydrogènes entre bases complémentaires A-T et C-G. L'ADN comporte deux sillons, un grand et un petit. (Figure I.2.b et I.2.c).

L'ADN double brin sous la forme B canonique comporte 10.5 pb par tour et a un diamètre de 20Å . L'espacement entre deux paires de bases consécutives est de 3.4Å . La présence de phosphates en fait un polymère chargé, un polyélectrolyte dont la densité linéique de charge est de 1 charge négative par 1.7Å . Ce polymère est semi flexible. Dans des conditions salines "physiologiques", la longueur de persistance de l'ADN est de l'ordre de 50nm (150pb). Cette longueur de persistance a été évaluée expérimentalement, notamment par des mesures et manipulations sur des molécules d'ADN uniques. (Bustamante et al., 2003, Wang et al., 1997).

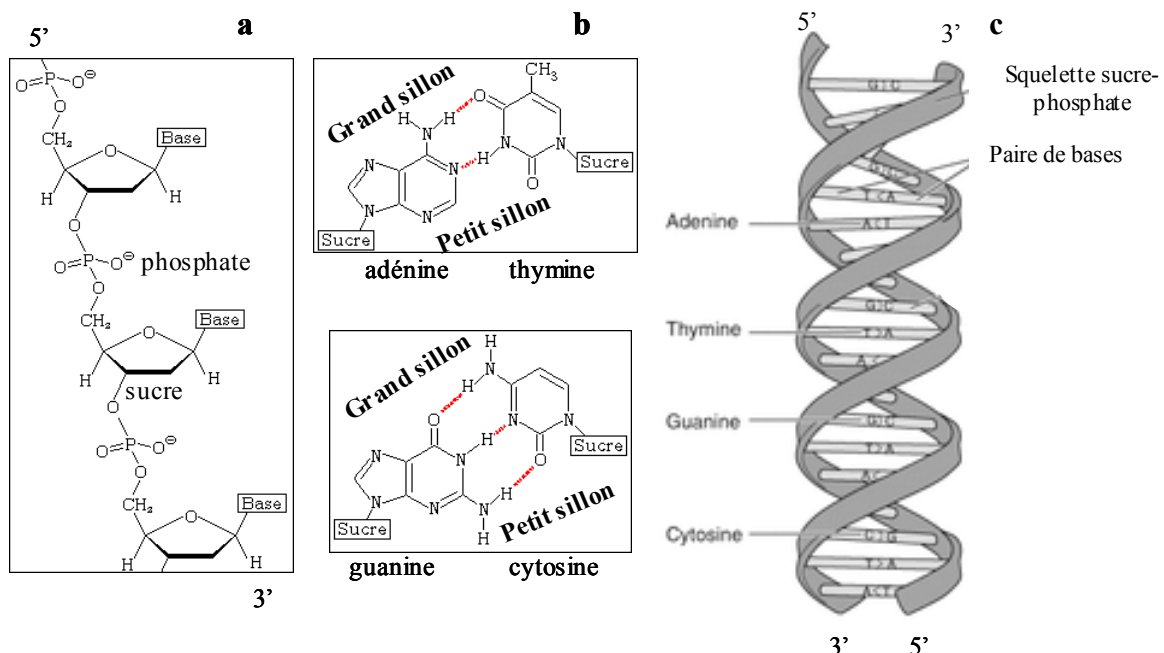


Figure I.2 Structure de l'ADN. a : Simple brin d'ADN : polymère de nucléotides (phosphate, sucre et base). b : Liaisons hydrogène entre bases complémentaires (A-T et C-G). c : Double hélice droite d'ADN.

Les histones

L'ADN est associé à des protéines basiques appelées histones pour former la chromatine eucaryote. Les histones sont globalement chargées positivement par la présence de nombreux acides aminés (a.a.) arginine et lysine. On distingue 2 catégories distinctes d'histones. Les histones de cœur H2A, H2B, H3 et H4 sont associées à l'ADN pour former les particules cœur de nucléosome. Les histones de liaison (H1 ou H5) interviennent dans des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine. Les histones de cœur ont une masse moléculaire d'environ 10 à 15kDa, plus faible que celle des histones de liaison (21kDa).

La séquence en acides aminés des histones H2A, H2B, H3 et H4 a été remarquablement bien conservée au cours de l'évolution. La séquence d'histone H4 de thymus de veau ne diffère par exemple que de deux acides aminés de celle du petit pois (DeLange et al., 1969).

Dans des conditions ioniques physiologiques, les histones H3 et H4 s'associent en tétramères (H3-H4)₂ alors que les histones H2A H2B forment des dimères. A forte concentration en sels monovalents (>1.2M), les histones s'associent en octamères dans une organisation tripartite : un tétramère (H3-H4)₂ ainsi que deux dimères H2A-H2B. (Thoma et Butler, 1977; Ruiz-Carillo et al, 1979).

Leur structure cristallographique a été résolue à 3.1Å de résolution par Arents et al. (1991) (fichier PDB 1HQ3). L'octamère d'histones y est décrit comme un disque plat d'épaisseur 55Å et de diamètre 70Å, constitué d'un tétramère (H3-H4)₂ entouré de deux dimères H2A-H2B. Les chaînes polypeptidiques des quatre histones sont repliées de manière similaire. Ce repliement comporte une hélice α centrale (≈ 27 a.a.) comportant de part et d'autre une boucle ainsi qu'une hélice α plus courte (≈ 10 a.a.). Les dimères H3-H4 et H2A-H2B sont associés suivant un motif en "poignée de mains".

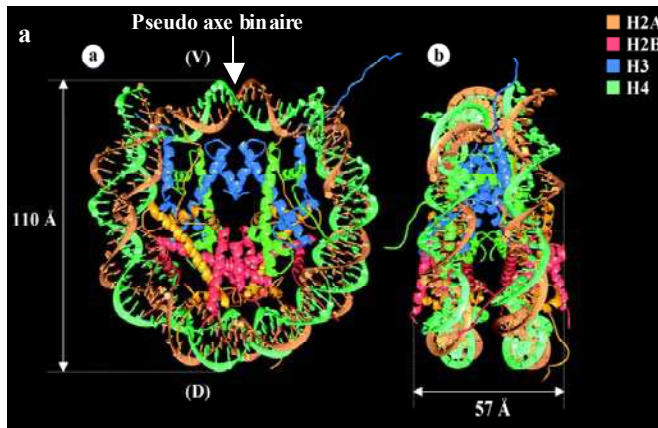
Particules cœur de nucléosome

Antérieurement à 1970, les histones étaient considérées comme liées uniformément à l'ADN sans organisation particulière dans un modèle de surenroulement (Pardon & Wilkins, 1972). En 1973, Hewish et Burgoyne, montrent que l'ADN de noyaux de foie de rat traité à la nucléase est digéré en unités de taille égale. En 1974, Kornberg démontre la structure périodique d'un complexe nucléoprotéique. En janvier 1974, Olins & Olins publient pour la première fois des images de microscopie électronique où une structure en "collier de perles" représentative de chromatine est mise en évidence. Chaque perle constitue une particule cœur de nucléosome. Ce complexe nucléoprotéique a une masse moléculaire d'environ 205kDa, ADN et histones contribuant chacun pour moitié à la masse moléculaire totale.

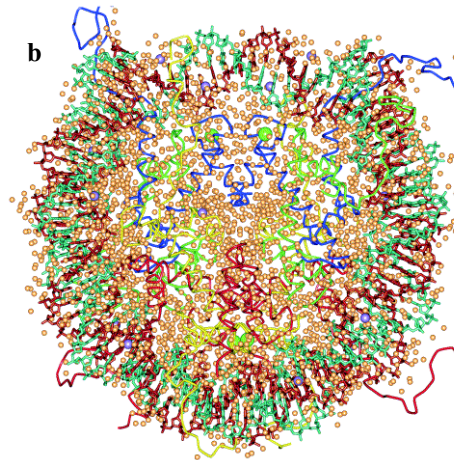
Une première structure cristallographique de NCPs a été obtenue à 7Å de résolution à partir de NCPs natives dont la longueur d'ADN associé aux histones s'élevait à 146 \pm 2pb (Richmond et al. en 1984). Ces 146 \pm 2 paires de bases d'ADN s'enroulent autour de l'octamère d'histones sur un tour trois quart.

L'utilisation d'ADN et d'histones recombinants ont permis d'obtenir des particules absolument identiques. De plus, l'élaboration par biologie moléculaire d'une séquence d'ADN palindromique tend à symétriser les particules. Une structure cristallographique des NCPs a ainsi été déterminée il y a presque dix ans à 2.8Å de résolution (Luger et al., 1997). Les particules

possèdent un pseudo-axe de symétrie binaire ou axe dyade. Les NCPs ainsi cristallisés ne sont pas complètement symétriques. Une moitié comporte 73pb alors que la moitié complémentaire n'en comprend que 72, l'axe de symétrie traversant une base. En moyenne, l'ADN des nucléosomes cristallisés comporte 10.2pb par tours, ce qui est inférieur de 0.3pb à un ADN B canonique. L'ADN subit donc un surenroulement global qui est particulièrement remarquable au sein de la moitié qui ne comptabilise que 72pb où sont dénombrées 9.4pb par tour d'ADN.



Lüger et al., *Nature*, 1997



Davey et al., *JMB* 2002

Figure I.3 Structures cristallographiques des NCPs

La longueur d'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones correspond exactement à la longueur de persistance de l'ADN. Des interactions privilégiées doivent donc être mises en œuvre entre octamère d'histones et ADN afin de parvenir à courber la molécule d'ADN et à maintenir la conformation des NCPs. La position de l'ADN nucléosomal était prévue par la structure du cœur protéique (Arents et al., 1991). ADN et histones interagissent en 14 positions, toutes les dix paires de bases environ. Au niveau des douze positions les plus centrales, une chaîne latérale d'arginine interagit avec un petit sillon d'ADN par des liaisons hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques et des interactions de Van de Waals. Une structure cristallographique plus récente a été déterminée à 1.9Å de résolution et met clairement en évidence les modes d'interactions ADN-protéines ainsi que la localisation de molécules d'eau (Davey et al., 2002, Figure I.3.b). L'utilisation d'un ADN de 147pb a permis d'augmenter la résolution à 1.9Å. Cette paire de bases supplémentaire permet de mieux symétriser la particule, l'axe binaire traversant la paire de base centrale et séparant l'ADN nucléosomal en deux moitiés de 73pb chacune. Cette structure (1KX5 dans la banque PDB) localise plus de 3000 molécules d'eau ainsi que certains ions manganèse et chlorure (Figure I.3.b). Les molécules d'eau semblent intervenir pour former des ponts entre ADN et protéines via des liaisons hydrogènes.

Différentes structures cristallographiques de NCPs comportant soit des histones d'origines différentes (poulet, levure, humain) soit des variants d'histones, dont les séquences et fonctions sont plus divergentes, ont été établies. La structure globale des NCPs reste similaire (Harp et al. 2000, White et al. 2001, Suto et al. 2000, Tsunaka et al, 2005). Le mode de fonctionnement global des NCPs est donc certainement universel. Les sites d'interaction histones-histones sont

éventuellement modifiés. Par exemple, dans la structure des NCPs de levure (White et al., 2001) un site d'interaction entre les deux dimères H2A-H2B est absent.

Les "queues" des histones

La plupart des structures cristallographiques de particules cœurs de nucléosome ne positionnent pas les acides aminés des extrémités N et C terminales des histones. En effet, ces extensions ou "queues" ne sont pas structurées. Elles sont mobiles et libres de s'étendre au-delà du cœur des particules (Figure I.4). Elles représentent 28% de la masse totale des histones. Dans la structure établie par Luger et al. en 1997, seulement 30% des acides aminés des "queues" sont positionnés. Dans la structure de K. Davey (2002) à 1.9Å de résolution, les a.a. des "queues" sont tous positionnés. Néanmoins, pour les a.a. les plus terminaux, les facteurs de température ("facteurs B"), indicateurs de désordre n'y sont pas précisés et sont donc certainement élevés.

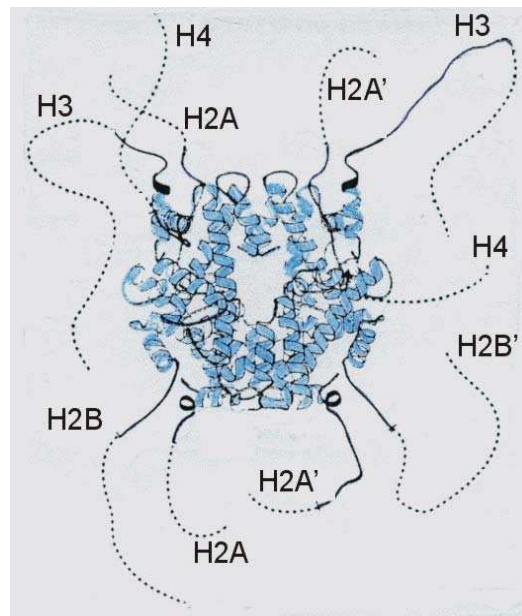
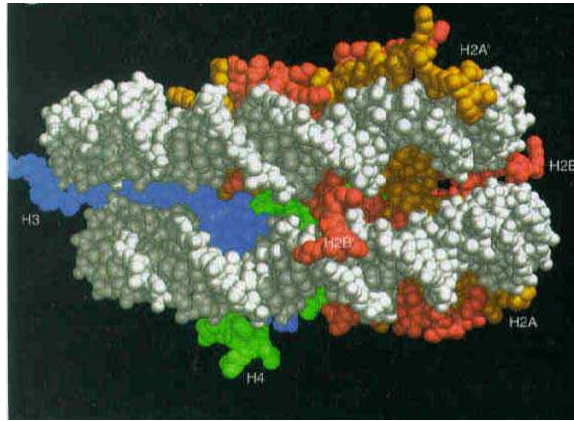


Figure I.4 Queues des histones. Les extrémités N et C terminales non structurées sont représentées en pointillés.

Les extrémités N-terminales des histones H3 et H2B se glissent entre les deux tours de la super hélice d'ADN, entre deux petits sillons (Figure I.5). La "queue" N-terminale de H3 interagit ainsi avec l'ADN au niveau terminal entrant et sortant et semble participer au maintien des 13pb terminales de l'ADN sur le nucléosome. La portion N-terminale de H2A interagit avec l'extérieur de la super hélice d'ADN, au niveau d'un petit sillon. Dans les cristaux, les "queues" des histones, contactent d'autres histones soit de la même particule soit d'une NCP adjacente. Par exemple, l'extrémité N-terminale de H4 interagit avec un domaine acide (négativement chargé) d'un dimère H2A-H2B d'une NCP voisine (Davey et al, 2002).



Luger et al., 1997

Figure I.5 Localisation des queues des histones dans la NCPs. Le nucléosome est représenté de profil. H2A, H2B, H3 et H4 sont respectivement représentées en orange, rouge, bleu et vert.

Pour chaque histone, environ un tiers des charges positives sont réparties dans les "queues" dont la proportion en acides aminés est au plus de un cinquième. Les "queues" subissent des modifications *in vivo* (acétylation, phosphorylation) qui modulent les charges et seront détaillées plus loin dans le paragraphe C.

b Organisation structurale supramoléculaire de la chromatine eucaryote.

Organisation in vitro de fibres de chromatine extraites.

In vitro et extraite du milieu nucléaire, la chromatine est soit sous forme décondensée en une fibre de 10nm à faible concentration saline, soit très condensée à plus forte concentration en sel en une fibre de 30nm (figure I.6). Plusieurs modèles de fibre dense de nucléosomes ont été proposés principalement à partir de données de diffraction des rayons X et de microscopie électronique.

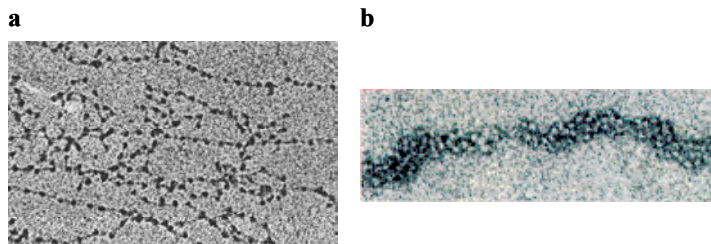


Figure I.6 Fibres de chromatine observées par microscopie électronique.

a. fibre de 10nm, structure en "collier de perles" à faible concentration saline. b Fibre de 30nm à forte concentration ionique. Les images sont tirées du site web : http://www.umanitoba.ca/afs/plant_science/COURSES/CYTO/109/109.3.html

Deux principaux modèles de fibre de 30nm émergent des travaux effectués ces dernières années.

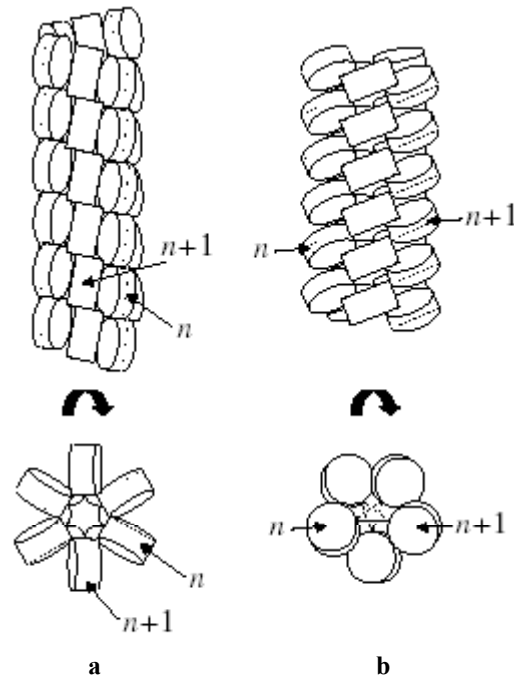
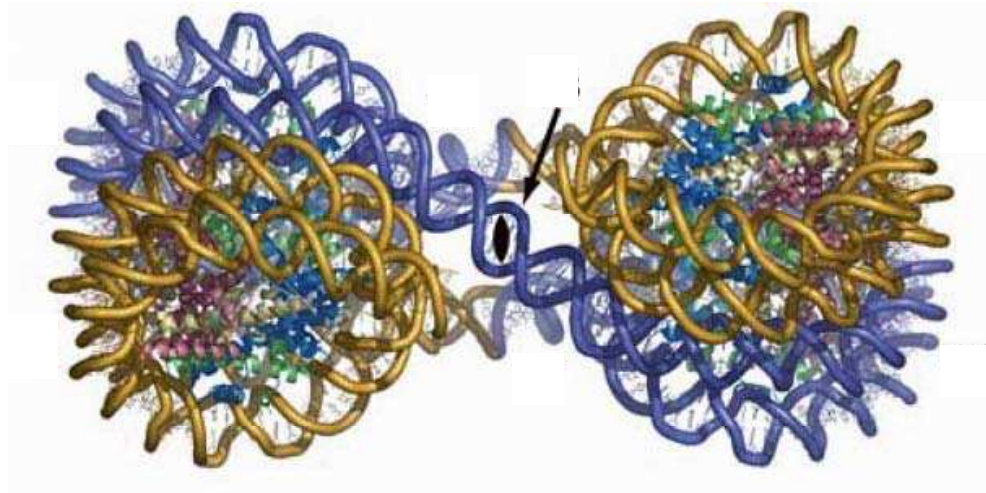


Figure I.7 a modèle de fibre de chromatine solénoïdale. **b** Modèle de fibre en "zig-zag". Le schéma est tiré de Schiessel (2003).

Dans le modèle solénoïdal (Figure I.7.a), les nucléosomes consécutifs forment une hélice simple et l'ADN de liaison est fortement courbé pour connecter deux NCPs consécutives. Les axes des superhélices des nucléosomes individuels restent perpendiculaires à l'axe du solénoïde. Les ADN entrants et sortants sont tournés vers l'intérieur du solénoïde. On trouve 6 nucléosomes par tour de solénoïde. Des expériences de microscopie électronique (Finch et Klug, 1976, Thoma et al., 1979) et de diffraction des rayons X sur des fibres de chromatine étirées (Widom et Klug, 1985) sont à l'origine de ce modèle.

Dans une structure en "zig-zag" (Figure I.7.b), les ADN de liaison ne sont pas courbés et connectent des nucléosomes situés de part et d'autre de la fibre. Woodcock et al. (1984), à partir d'observations en microscopie électronique, proposent un modèle de ruban surenroulé en hélice où les nucléosomes sont disposées en "zig-zag". Il semblerait que les travaux les plus récents favorisent le modèle d'organisation des nucléosomes en "zig-zag". Des observations en cryo-microscopie électronique privilégient un modèle en "zig-zag" irrégulier (Bednar et al, 1998). Schiessel et al. (2001 b) utilisent un modèle géométrique qui ne fait intervenir que deux angles et une distance pour déterminer les possibilités d'agencement des nucléosomes. A partir d'un modèle en "zig-zag", ils retrouvent les propriétés mécaniques déterminées par Cui et Bustamante (1997) par mesures d'étirement et de relaxation sur des fibres de chromatine uniques maintenues par des pinces optiques. L'analyse de fibres de chromatine compactées et stabilisées par des pontages covalents est en accord avec un modèle de fibre en "zig-zag" (Dorigo et al., 2004). Une structure cristallographique d'une chaîne de quatre nucléosomes consécutifs (tétranucléosome) a été obtenue à 9Å de résolution (Schalch et al., 2005). Dans cette structure (cf. Figure I.8), on observe deux empilements de deux NCPs dont les faces interagissent par les octamères d'histones. On passe d'un empilement à un autre par une rotation de 71.3° et une translation de

141.6Å. Les NCPs sont connectés par trois fragments d'ADN de liaison de 20pb dans un motif en "zig-zag".



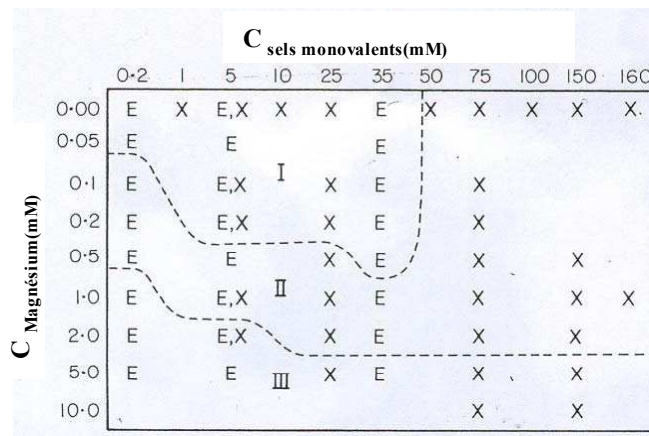
Schalch et al., 2005

Figure I.8 Structure cristallographique d'un tétranucléosome

Condensation de la chromatine en présence d'ions multivalents

In vitro, la fibre de chromatine peut être fortement condensée par des cations multivalents. Plusieurs études se sont portées sur des chaînes de chromatine de longueur bien déterminée, de la chromatine extraite ou même sur des chromosomes entiers.

Plusieurs travaux sont consacrés à l'étude *in vitro* des conditions ioniques nécessaires au repliement de la chromatine en fibres de 30nm. Widom (1986) fait varier les concentrations en ions monovalents et en ions divalents pour établir une sorte de diagramme de phase de repliement de la chromatine *in vitro* (Figure I.9), à partir d'observations en diffraction des rayons X et en microscopie électronique.



Widom, 1986

Figure I.9 "Diagramme de phase" de repliement de la chromatine native en présence d'ions monovalents et de magnésium²⁺ (Widom, 1986). Les lettres E et X indiquent le type d'expérience effectuée (X : diffraction des rayons X et E : microscopie électronique). Zone I : la chromatine est dépliée., zone II : la chromatine est repliée en fibre de 30nm. Zone III : Les fibres de 30nm sont fortement compactées et agrégées.

Sans ions divalents, la chromatine (en présence d'histones de liaison H1) forme des fibres de 30nm pour des concentrations ioniques supérieures à 50mM. A très faible concentration en ions monovalents (0.2mM), 0.1mM, seulement, de divalents sont nécessaires pour condenser la chromatine. Plus la concentration en ions monovalents croît plus il faut ajouter de divalents pour observer des fibres condensées. Les ions monovalents ont un double effet : à relativement forte concentration (45-65mM), ils condensent la chromatine mais à plus faible concentration, lorsque des divalents sont présents, les cations monovalents entrent en compétition avec les divalents pour déstabiliser la fibre.

La condensation de fibres de chromatine reconstituées et de longueur précisément calibrée en présence d'ions divalents a été également considérée (Schwarz et al., 1996). Ces fibres ne comportent pas d'histones de liaison et renferment 12 nucléosomes. En présence de sels monovalents concentrés à 10mM, les fibres se condensent pour des concentrations en magnésium supérieures à 2mM. Au-delà de 60mM, en Mg^{2+} , les fibres ne sont plus condensées. L'efficacité de différents cations pour la précipitation a été testée et les auteurs trouvent , dans un ordre décroissant d'efficacité : $Mn^{++}=Zn^{++}>>Ba^{++}>Mg^{++}>Co^{++}>>Cd^{++}$.

Les ions multivalents sont également capables de contrôler le degré de compaction des chromosomes mitotiques. Poirier et al. (2002), en particulier, ont étudié l'effet d'ions divalents (magnésium) et trivalents ($Co(NH_3)_6^{3+}$) sur la cohésion mécanique de chromosomes mitotiques de triton. L'ajout de magnésium et de manganèse à 10mM induit une compaction des chromosomes caractérisée par une réduction de leur taille. L'amplitude de la force mesurée croît également. Un effet similaire est remarqué en présence de cations trivalents ($Co(NH_3)_6^{3+}$). Pour des concentrations en cations multivalents élevées (200mM pour le magnésium) les chromosomes mitotiques sont décondensés.

L'influence des ions divalents sur l'organisation de la chromatine à l'échelle de la cellule est également abordée. Chegini et al. (1981) incubent des noyaux d'érythrocyte de poulet dans différents milieux ioniques, les fixent au glutaraldéhyde et les observent au microscope électronique. Ils constatent que la distribution et le niveau de compaction de la chromatine varient en fonctions des conditions ioniques. Notamment, l'obtention de chromatine condensée dans le noyau ne semble possible qu'en présence d'ions divalents magnésium et manganèse.

Existence de la fibre de 30nm in vivo?

Des méthodes d'imagerie de cellules et noyaux par microscopie électronique sont utilisées pour tenter d'élucider les niveaux d'organisation de la chromatine supérieurs à celui du nucléosome (Horowitz-Scherer et Woodcock, 2006). Jusqu'à présent, assez peu d'informations ont été extraites de ces images. Des structures en fibres ne sont visibles que pour des chromatines bien spécifiques où l'ADN de liaison est particulièrement long (Woodcock, 1994). Pour cela des coupes de cellules congelées puis cryosubstituées sont effectuées. Cette méthode peut introduire des artefacts dans la structure de la chromatine à cause des étapes de fixation et d'exposition à des solvants non aqueux. Des méthodes moins destructives sur des échantillons plus homogènes doivent être employées. L'observation et l'analyse de cryocoupes de noyaux vitrifiés, comportant moins d'artefacts, est également peu aisée à cause du contraste peu élevé des images (Mc Dowall et al., 1986). Par ces méthodes moins destructives la fibre de chromatine de 30nm

systématiquement observée *in vitro* n'est pas distinguée *in situ*. Dans ces conditions, Mac Dowall et al. (1986) observent uniquement des chromosomes de texture granulaire et homogène constitués de filaments de 11nm de diamètre. La reconstruction d'images de microscopie électronique en trois dimensions par tomographie sur des coupes de noyaux semble offrir plus de possibilités (Horowitz et al., 1994).

De plus, la plupart du temps, la fibre est étudiée dans un milieu extra-nucléaire, *in vitro*. Giannasca et al. (1993) ont effectivement mis en évidence des modifications morphologiques de la fibre de chromatine consécutives à son extraction du noyau. L'organisation supramoléculaire de la chromatine n'a toujours pas été résolue. La question de l'existence *in vivo* d'une structure secondaire en fibre de 30nm et de sa structure, reste donc ouverte.

Niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine

L'organisation supramoléculaire des chromosomes mitotiques reste aussi discutée. Un modèle où la chromatine forme des boucles de 50 à 100kpb dans un "échaffaudage" ("scaffold" en anglais) de protéines est proposé par Earnshaw & Laemmli en 1983. Des expériences récentes de résistance mécanique de chromosome étiré par des micropipettes démontreraient néanmoins qu'il n'existe pas de réseau de protéines continu qui maintiendrait la cohésion des chromosomes (Poirier & Marko, 2002). D'autres auteurs (Sedat & Manuelidis, 1978) suggèrent un modèle sans boucles avec deux niveaux d'enroulement hélicoïdaux qui structurent les chromosomes. Dans un tel modèle, une superhélice de 200 à 400nm de diamètre est enroulée pour constituer les chromatides. Belmont & Bruce (1994) proposent un modèle plus irréguliers où trois niveaux d'organisations sont présents (fibres de 30nm, fibres de 60-80nm et fibres de 100-130nm) et visualisés dans des coupes de noyau déshydratées.

Euchromatine et hétérochromatine

Deux types de chromatine sont distingués essentiellement suivant leur degré de compaction et leur fonction : l'hétérochromatine et l'euchromatine.

L'euchromatine est la fraction de la chromatine qui se décondense lorsque la cellule passe de la métaphase à l'interphase. Sa séquence est particulièrement riche en gènes et au sein de l'euchromatine l'ADN est activement transcrit en ARN.

A l'inverse, l'hétérochromatine reste dense et compacte au cours du cycle cellulaire. L'accessibilité aux enzymes de restriction et à la Dnase y est réduite. L'hétérochromatine est principalement localisée près des centromères et des télomères des chromosomes et est distribuée à la périphérie des noyaux. Certains gènes non exprimés y sont spécifiquement localisés.

Une des caractéristiques de l'hétérochromatine est la présence de séquences de répétition. La longueur de ces séquences de répétition varie suivant les espèces. Pour l'homme, une séquence de répétition α -satellite de 171 pb est observée au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique. En outre, les nucléosomes de l'hétérochromatine semblent mieux organisés et plus régulièrement espacés que ceux de l'euchromatine.

L'hétérochromatine est hypoacétylée au niveau de la plupart des sites d'acétylation, des lysines des queues des histones. De plus, la formation d'hétérochromatine est liée à la méthylation des queues des histones H3 et plus spécifiquement de la lysine 9 de H3. Cette lysine recrute

spécifiquement HP1 ("Heterochromatin Protein 1") qui engendre la formation de structures plus organisées (Dillon & Festenstein, 2002, Huisinga et al., 2006).

B. La particule cœur de nucléosome : un colloïde chargé

L'association de l'ADN, polyélectrolyte anionique, et d'un octamère d'histones positivement chargé fait des NCPs des particules colloïdales où la répartition de charge est hétérogène. La stabilité, le mode de formation et les interactions inter particules résultent en partie de ces charges.

1. Répartition hétérogène des charges

Avec deux charges négatives par paire de base, l'ADN apporte 292 charges négatives pour une particule comportant 146pb d'ADN.

Les octamères d'histones sont globalement basiques. Le décompte des charges reporté dans le tableau I.3 indique que l'octamère d'histones de *Xenopus laevis* porte globalement 142 charges positives. La charge structurale globale des NCPs est donc de -150. Ces charges positives ne sont pas distribuées aléatoirement au sein de la séquence protéique. Les lysines et arginines basiques sont particulièrement abondantes au niveau des extrémités terminales des histones. Pour les histones de *Xenopus laevis*, des séquences d'histones tronquées correspondant à la portion globulaire et structurée des histones ont été construites. Le tableau I.3 répertorie l'ensembles des charges positives et négatives des histones recombinantes de *Xenopus laevis* en précisant leur localisation, globulaire ou terminale.

Histones	Acides aminés positivement chargés	Acides aminés négativement chargés	Charge globale	Charges positives localisées dans les queues	Charges négatives localisées dans les queues
H2A (128aa)	24	9	+15	N-ter : 4 C-ter : 3	C-ter : 1
H2B (122 aa)	28	9	+19	N-ter : 8	N-ter : 1
H3 (135aa)	30	11	+19	N-ter : 9	0
H4 (102 aa)	25	7	+18	N-ter : 7	0
gH2A (aa 13-117)	17	8	+9		
gH2B (aa 24-122)	20	8	+12		
gH3 (aa 27-135)	21	11	+10		
gH4 (aa 20-102)	18	7	+11		

Tableau I.3. Répartition des charges positives et négatives des histones. Le décompte des charges a été effectué à partir des séquences protéiques détaillées dans le chapitre II.

La répartition des charges au sein des NCPs est donc très hétérogène. Le pourtour du cylindre que forme une NCP est négativement chargé par l'ADN. Ses faces comportent des zones plus ou moins étendues, positivement ou négativement chargées. Les "queues" d'histones

basiques constituent des extensions cationiques susceptibles de s'étendre au-delà des limites de ce cylindre.

2 Stabilité des NCPs en fonction de la concentration saline et de la concentration en particules.

La stabilité des NCPs est sensible à l'environnement ionique puisqu'elle est fortement dépendante des interactions électrostatiques entre ADN anionique et histones cationiques. A partir de données provenant de différents groupes, Yager et al (1989) ont établi un diagramme de phase de la stabilité des particules cœur de nucléosome en tenant compte des concentrations en nucléosomes et des concentrations en sels monovalents (figure I.9). Une large gamme de concentrations salines et de concentrations en particules ont été considérées. Cinq principales régions sont distinguées (cf. figure I.9). La région 1 correspond à la zone où la conformation native canonique des NCPs est préservée. A très faible concentration ionique (région 1E), les NCPs sont déformées. Les fortes répulsions électrostatiques entre paires de bases adjacentes d'ADN ne seraient plus écrantées par la présence de sels. Dans la zone notée 2 où les concentrations en particules sont faibles et la force ionique relativement élevée ($\sim 0.1M$), des nucléosomes sont en équilibre avec des histones et de l'ADN libres en solution. Au-delà de $0.75M$ en sel, ADN et histones sont partiellement ou totalement dissociés. En particulier, dans la zone 3 on trouve des NCPs privés d'histones H2A et H2B. La particule est alors un "tétrasome" et l'ADN n'est associé qu'à un tétramère d'histones H3-H4. Pour des forces ioniques encore plus élevées (supérieures à $1.5M$), ADN et histones sont complètement dissociés et n'interagissent plus. Les auteurs font également remarquer que le passage d'une région du diagramme à une autre est réversible. Ainsi, d'une configuration où l'ADN et les histones sont totalement dissociés, des nucléosomes peuvent être obtenus en modifiant les concentrations salines.

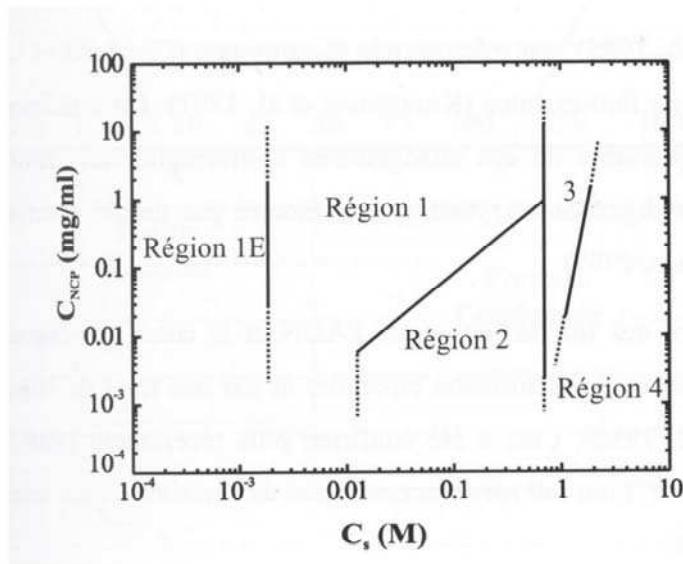


Figure I.10 Diagramme de stabilité des particules cœur de nucléosome. Les concentrations en nucléosomes sont reportées en fonction des concentrations en sels monovalents. Cinq zones sont distinguées.

La particule est stable pour des concentrations salines intermédiaires. Pour des concentrations en nucléosomes égales à $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, les particules restent stables entre 2 et 750mM en sels monovalents. En particulier, les NCPs sont stables dans des conditions ioniques dites "physiologiques" (§ A.1.b).

3. Interaction ADN-histones, positionnement de l'ADN par rapport à l'octamère d'histones

a. Interaction ADN-histones.

L'affinité de l'ADN nucléosomal avec l'octamère d'histones dépend de la séquence en ADN. Certaines séquences ont été particulièrement étudiées et utilisées pour la reconstitution de NCPs isolées ou de chaînes de nucléosomes. La séquence du gène de l'ARN 5S de l'oursin de mer (*Lychenatus variegatus*) a une plus grande affinité pour les octamères d'histones que des séquences d'ADN quelconques. L'énergie libre d'interaction entre ADN et octamère d'histones peut être mesurée (Thaström et al., 2003; Gottesfeld and Luger, 2001). La différence de stabilité entre NCPs natives quelconques et NCPs reconstituées à partir d'ADN 5S est d'environ $2\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($3.5\text{ k}_B\text{T}$ par nucléosome) (Gottesfeld et Luger, 2001). Des séquences non natives ont été sélectionnées parmi $5\cdot 10^{12}$ séquences aléatoires pour leur affinité particulière avec les histones suivant une méthode de sélection "SELEX" mise au point par Lowary et Widom (1998). Ces séquences non naturelles présentent une affinité avec les histones encore plus importante que l'ADN 5S. La séquence notée "601" présente une énergie d'interaction avec les histones supérieure à l'ensemble des autres séquences. Pour cette séquence, l'affinité ADN-histones s'améliore de $2.8\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($4.9\text{ k}_B\text{T}$ par nucléosome) par rapport à la particule reconstituée avec la séquence 5S.

b. Positionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones.

In vivo, les nucléosomes ne sont pas positionnés aléatoirement. Yuan et al. (2005) ont montré que les motifs de fixation de facteurs de transcription dans l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae* sont majoritairement dépourvus de nucléosomes.

In vitro, les NCPs sont reconstituées à partir d'ADN libre et d'octamères d'histones dans un rapport stoechiométrique. La méthode de reconstitution sera détaillée dans le chapitre II. Après reconstitution, les nucléosomes sont inhomogènes en terme de positionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones. Dong et al (1990) et Pennings et al. (1991) ont montré, pour la séquence d'ADN 5S, à partir de reconstitutions de chaînes de nucléosomes suivies de digestions par des enzymes de restriction, qu'il existe une position majoritaire et des positions minoritaires espacées de dix paires de bases (un tour d'hélice d'ADN). Ces positions multiples sont en équilibre. Une amélioration dans l'affinité ADN-histones s'accompagne d'un meilleur positionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones. Pour le clone "601" une unique population de particules est obtenue après reconstitution dans un rapport ADN / octamère d'histones stoechiométrique.

c. Repositionnement de l'octamère d'histones relativement à l'ADN par chauffage

Pennings et al (1991) ainsi que Meersseman et al. (1992) ont noté une dépendance en température pour le positionnement de l'ADN 5S autour des histones sur des chaînes de nucléosomes. En effet, par des analyses sur gels d'électrophorèse à deux dimensions, ils constatent une redistribution dans le positionnement de l'ADN consécutivement à un chauffage à 37°C. Ce repositionnement n'est pas spécifique à la séquence 5S. Il est susceptible de se produire pour des nucléosomes natifs (Meersseman et al., 1992).

d. Modèles de repositionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones

Les différents modèles de repositionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histones sont discutés par Schiessel et al.(2003).

La mobilité des nucléosomes pourrait résulter de la dissociation transitoire et rapide de l'ADN par rapport à l'octamère d'histones. Consécutivement à cette ouverture, l'ADN s'enroulerait de nouveau autour de l'octamère d'histones en formant des "protubérances" ("bulges" en anglais) d'ADN. Ces boucles seraient ensuite susceptibles de diffuser et se propageraient autour du nucléosome pour translater l'ADN autour de l'octamère d'histones (Widom, 1999, Schiessel 2001, Kulić et Schiessel 2003). Les calculs menés par Kulić et Schiessel (2003) suggèrent la formation de deux types de boucles énergétiquement favorables. Une première catégorie de petites boucles de 10 paires de bases expliquerait l'espacement de dix paires de bases observé par Dong et al. (1990) ainsi que Pennings et al. (1991) entre les différentes populations de nucléosomes obtenus. De larges boucles sont également susceptibles de se former lorsque l'ADN associé aux histones est long.

A partir des expériences de Flaus et Richmond (1998) qui mettent en évidence des translations non multiples de 10 paires de bases, Mohammad-Rafiee et al (2004) suggèrent que la mobilité de l'ADN pourrait également résulter de défauts de torsion dans l'enroulement d'une paire de bases d'ADN autour de l'octamère d'histones. Ces défauts pourraient également diffuser d'une paire de bases à une autre par rotation de l'octamère d'histones de 36° autour de l'axe de l'ADN, dans un mouvement en "tire-bouchon". Ce type de distorsion est par exemple remarquable dans la structure cristallographique établie par Luger et al (1997a) où l'ADN comporte 146 paires de bases. L'ADN ne s'y enroule pas de manière symétrique de part et d'autre de l'axe dyade. Une paire de base est manquante dans une moitié de l'ADN nucléosomal et introduit un défaut de torsion localisé à 10 paires de bases de l'axe dyade.

C. La chromatine eucaryote : une organisation dynamique

L'ADN est condensé dans le noyau et peut, localement, ne pas être accessible. Notamment, l'organisation du matériel génétique en NCPs réprime l'activité transcriptionnelle de la chromatine. Un mode d'organisation dynamique de la chromatine est assuré par plusieurs facteurs (Luger, 2006) : la "respiration" spontanée de l'ADN, le glissement de l'ADN autour des histones par des facteurs de remodelage, les modifications post-traductionnelles des queues des histones, l'incorporation de variants d'histones dans les nucléosomes. Ces vecteurs de plasticité ne

sont pas indépendants les uns des autres. Leur activation est liée et peut éventuellement s'avérer synergique.

1. Ouverture spontanée de l'ADN nucléosomal : "respiration" de l'ADN

Des études récentes montrent que la structure des NCPs n'est pas figée et qu'il est possible d'observer notamment *in vitro* des mouvements rapides d'ouverture et de fermeture de l'ADN nucléosomal par FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer") ou FCS ("Fluorescence Correlation Spectroscopy") (Polach et Widom, 1995, Tomschick et al., 2005; Li et al., 2005). Les nucléosomes restent bien enroulés pendant 250ms puis l'ADN s'ouvre pendant des intervalles de temps variant de 10 à 50ms, assez long pour rendre accessible l'ADN à des protéines et enzymes (Li et al., 2005). Les nucléosomes où l'ADN est bien enroulé sont en équilibre avec des nucléosomes dans un état transitoire où l'ADN se déroule pour qu'une protéine puisse éventuellement se fixer à une portion spécifique d'ADN libre (figure I.11).



Luger, 2006

Figure I.11 Equilibre dynamique entre des nucléosomes bien enroulés et des nucléosomes partiellement ouverts. L'ouverture, la "respiration" de l'ADN permet à des protéines de se fixer temporairement sur des sites de fixation spécifique de l'ADN.

2. Remodelage de la chromatine.

Le remodelage de la chromatine est assuré par des complexes protéiques constitués de 2 à 12 sous-unités (Becker & Hörtz, 2002). Ces complexes facilitent le glissement de l'ADN vis à vis de l'octamère d'histones. Ils possèdent tous une sous-unité ATPase qui hydrolyse l'ATP. On les regroupe par familles. Ils jouent un rôle au niveau de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN.

La première famille de facteurs de remodelage est la famille **Swi/Snf**. Ces facteurs sont utiles dans la transcription de l'ADN. Ils sont utilisés plutôt au moment de la mitose où la chromatine est plus dense qu'à l'interphase et n'expriment pas les gènes de manière exhaustive. Leur action peut être redondante avec l'acétylation des histones.

Un autre sous groupe est celui dont les facteurs de remodelage contiennent l'ATPase ISWI. Le rôle d'ISWI semble être de faire "glisser" les histones sur l'ADN plutôt que d'être impliqué dans la transcription. Des complexes tels que NURF, ACF et CHRAC comportent l'ATPase ISWI. ACF et CHRAC jouent un rôle dans l'établissement d'un espacement régulier des nucléosomes alors que NURF a l'effet contraire.

Une troisième famille est celle des complexes NURD dont l'unité ATPase est Mi-2. NURD est impliqué à la fois dans le remodelage et la déacétylation des histones. Mi-2 utilisé seul, *in vitro*, perturbe les interactions ADN-histones et induit le glissement des nucléosomes.

Différents mécanismes pour le glissement des nucléosomes ont été proposés. Dans un premier temps, les facteurs de remodelage viendraient désolidariser une extrémité d'ADN des

histones, puis on obtiendrait différents types d'intermédiaires stables ou non. On pourrait voir la formation d'un dimère, le glissement cis (formation d'une protubérance d'ADN sur le NCP) ou trans.

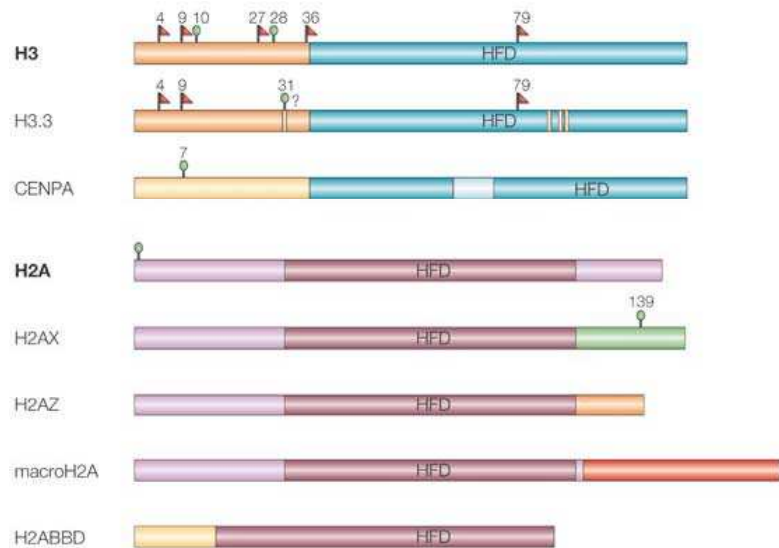
L'action des facteurs de remodelage est spécifique. Ils reconnaissent des promoteurs, des séquences protéines spécifiques, de l'ADN méthylé. Il pourrait y avoir une synergie entre les facteurs de remodelage et l'acétylation des histones. Plus particulièrement, la queue d'histone H4 est nécessaire pour induire l'activité ATPase de NURF et de ISWI (Clapier et al., 2001; Hamiche et al., 1998).

3 Variants des histones et modulation de l'organisation de la chromatine

a. Description des principaux variants d'histones

Des variants d'histones, dont la séquence est significativement différente des histones canoniques, peuvent substituer ces dernières. Les conséquences de telles modifications seront examinées à l'échelle du nucléosome et au sein de la chromatine.

Des variants d'histones, présentant des particularités de séquences par rapport aux histones usuelles introduites en A.2, peuvent remplacer les histones natives au sein des nucléosomes. Jusqu'à présent, des variants des histones H3 et H2A, essentiellement, ont été étudiés et mis en évidence. Les divergences de séquences entre histones canoniques et variants d'histones sont représentées sur la figure I.12 extraite de Sarma & Reinberg, 2005. Ces variations de séquences, décrites ci-dessous, affectent principalement les "queues" des histones.



Sarma & Reinberg, 2005

Figure I.12 Représentation schématique des différences de séquences entre histones natives et variants d'histones de H3 et H2A. Les initiales HFD ("Histone Fold Domain") localisent la portion structurée des histones.

Variants de H3

Quatre différents variants de H3 ont été distingués : H3.1, H3.2, H3.3 et CENPA aussi appelé CenH3 suivant les auteurs. H3.3 et CenH3 ont été les plus étudiés. H3.3 diffère de H3 par quatre acides aminés uniquement repérés par des bandes jaunes sur la figure I.12. L'histone CenH3 humaine reste assez similaire à H3 dans la région C terminale (62% d'identité) mais est très dissemblable dans la partie N terminale.

Variants de H2A

Les variants de H2A sont plus nombreux et diffèrent de H2A essentiellement par la longueur et la séquence de la queue C terminale.

Les premiers variants identifiés ont été H2A.X et H2A.Z. Dans la séquence de H2A.X, la distance entre la région globulaire et l'extrémité C terminale est plus grande que pour H2A. H2A.Z semble conférer aux dimères H2A-H2B une plus grande affinité avec ADN et tétramères (H3-H4)₂ dans le nucléosome (Li et al., 1993). Le dimère H2A.Z-H2B est moins stable que le dimère H2AH2B (Placek et al., 2005). Alors que les séquences entre H2A et H2A.Z ne présentent que 60% d'identité, la structure cristallographique des nucléosomes reconstitués à partir des deux types de H2A est très peu différente (Suto et al., 2000).

MacroH2A a une séquence particulièrement différente. A l'extrémité C terminale, macroH2A comporte un fragment protéique additionnel de 25kDa (en rouge, sur la figure I.12). Ce "macrodomaine" comporte une courte région hautement basique (aa. 132-159) ainsi qu'un domaine organisé en "glissière leucine" (aa. 181-208).

H2A.Bbd ("bar body deficient") présente une séquence particulièrement courte. Sa queue C terminale est intégralement tronquée et la portion N terminale comporte 6 arginines basiques consécutives. En outre, les acides aminés impliqués dans le site d'interaction entre dimères H2A.Bbd-H2B et tétramères (H3-H4)₂ diffèrent. La substitution de H2A par H2A.Bbd donne au nucléosome une structure relâchée dont seulement 118 pb d'ADN sont protégés après digestion à la nucléase (Bao et al., 2004; Gautier et al., 2004).

b. Modulation de la compaction de la chromatine par la présence de variants d'histones

Certains variants sont localisés dans des domaines bien déterminés des chromosomes ou de la chromatine pour induire ou réprimer l'expression génétique spécifiquement. Ces variants n'ont pas tous été systématiquement conservés au cours de l'évolution et certains peuvent être spécifiques aux vertébrés et mammifères (macro H2A, H2ABbd). Dans le tableau I.4, sont reportés quelques exemples de variants d'histones, leurs spécificités de séquence, localisation dans la chromatine et fonctions. Ce tableau s'inspire de plusieurs articles de revue (Kamakaka et al 2005, Pusaria et al. 2005, Sarma et al. 2005 et Wolffe 1995).

Variant	Espèce	Localisation	Effet sur la chromatine	Fonction
H2A.Z	Ubiquitaire	Pas de spécificité	Condensation ou décondensation	Répression ou activation transcriptionnelle
MacroH2A	Vertébrés	Chromosome X inactif	Condensation	Répression transcriptionnelle
H2ABbd "bar-body-deficient"	Vertébrés	Euchromatine Chromosome X actif	Décondensation	Déstabilisation des nucléosomes.
H2AX	Ubiquitaire	Pas de spécificité	Condensation	Réparation et recombinaison de l'ADN. Répression transcriptionnelle
H3.3	Ubiquitaire	Pas de spécificité	Décondensation	Activation de la transcription
CenH3	Ubiquitaire	Centromères		Formation des kinétochores

Tableau I.4 Localisation et fonctions de différents variants d'histones.

4. Modifications post-traductionnelles des queues des histones

a. Description des modification post-traductionnelles

De manière spécifique, certains acides aminés des queues des histones font l'objet de modifications covalentes. Les modifications post-traductionnelles les plus étudiées sont l'acétylation de lysines, la méthylation de lysines et d'arginines, la phosphorylation de sérines et thréonines et l'ubiquitination de lysines. La plupart de ces modifications affectent particulièrement les extrémités N-terminales des histones H3 et H4. La figure I.13 localise ces modifications dans ces "queues" (Rice & Allis 2001, Strahl & Allis 2000, Nowak & Corces .2004).

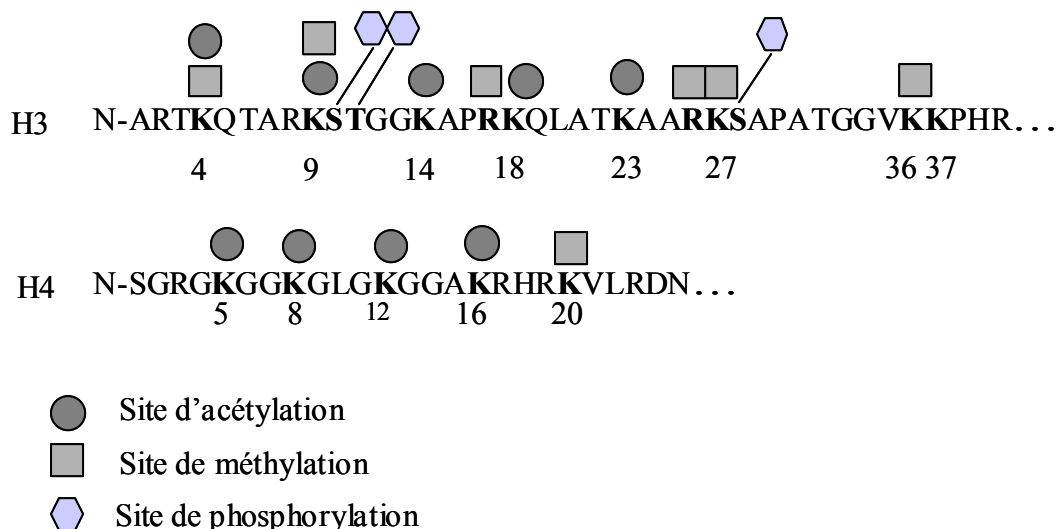
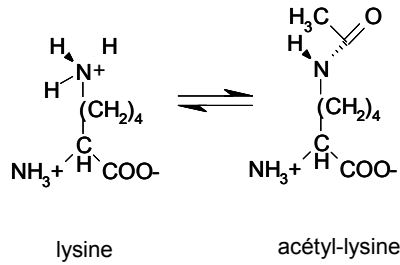


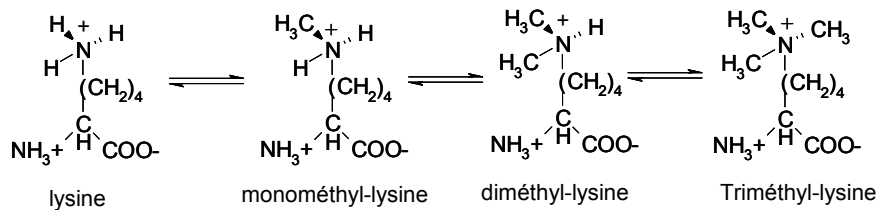
Figure I.13 Localisation des modifications post-traductionnelles au niveau des extrémités N-terminales des histones H3 et H4.

La figure I.14 décrit les modifications chimiques résultantes.

a : acétylation de la lysine



b : moni, di, et tri méthylation de la lysine



c : phosphorylation de la sérine

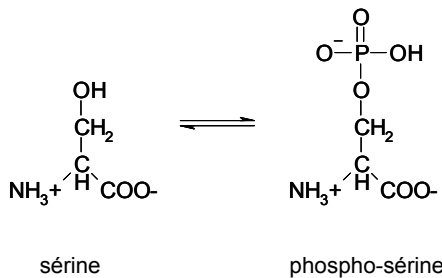


Figure I.14 Description chimique des modifications post-traductionnelles. a : mono, di et tri méthylation, b : acétylation, c : phosphorylation.

Acétylation de lysines

La formation d'une liaison covalente entre un groupement acétate et une lysine (Figure I.14.a) conduit à neutraliser la charge positive des lysines. Cinq lysines appartenant aux queues H3 et quatre lysines situées sur les queues de H4 sont susceptibles d'être acétylées (Figure I.13). *In vivo*, l'acétylation est induite en présence d'acétyl-coA par des enzymes appelées acétyltransférases qui semblent également impliquées dans les mécanismes de réplication, de réparation et de recombinaison de l'ADN (Chen et al, 2001). L'acétylation est réversible. Les lysines acétylées peuvent être déacétylées par des déacétylases.

Méthylation de lysines et arginines

Lysines et arginines peuvent être mono, bi et tri méthylées (Figure I.14.b) sans que cela ne modifie la charge positive du groupement amine. Les méthyltransférases utilisent la S-adenosylméthionine comme cofacteur pour méthyler les acides aminés basiques. Pour l'instant, la réversibilité du processus de méthylation n'a pas été mise en évidence de manière concluante.

La méthylation des lysines, en particulier semble particulièrement stable alors que récemment une enzyme capable de démétyler des arginines a été découverte (Cheung & Lau, 2005).

Nous ne développerons pas ici la notion de méthylation des cytosine et guanine de l'ADN, liée à la répression transcriptionnelle.

Phosphorylation

Des sites de phosphorylation ont été mis en évidence au niveau de sites spécifiques de la portion N-terminale de H3 (Figure I.13). La phosphorylation ajoute une charge négative aux histones (Figure 1.13.c).

Ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine dont la séquence comporte 76 aa. Elle se lie à la lysine 119 (au niveau C terminal) de H2A par une liaison isopeptidique (Jason et al., 2002). L'ubiquitination concerne principalement les histones H2A et H2B. Alors que 10 à 15% des histones H2A des organismes eucaryotes sont ubiquitinés, l'ubiquitination est l'une des modifications post-traductionnelles la moins étudiée. L'ubiquitination semble affaiblir les interactions entre dimères H2A-H2B et tétramères d'histones (H3-H4)₂ (Li et al., 1993).

b. Effet des modifications post-traductionnelles sur la structure et la fonction de la chromatine

L'effet des principales modifications post-traductionnelles est reporté dans le tableau I.5. Sont distingués le rôle de ces modifications dans des contextes *in vitro* et *in vivo*. Ce tableau donne une vision très simplifiée des conséquences de ces modifications post-traductionnelles. La complexité des mécanismes qui mènent à ces modifications et qui induisent des fonctions particulières au sein de la chromatine dépasse le cadre de cette thèse et ne peut être explicitée, ici, en détail. De plus, ces différentes modifications ne sont souvent pas activées indépendamment les unes des autres et leur mode de fonctionnement peut être synergique. Par exemple, l'acétylation de la lysine 16 de H4 en concomitance avec la phosphorylation de la sérine 10 de H3 amplifient l'activité transcriptionnelle du chromosome X masculin (Strahl et al., 2000). De même, H3 et H4 sont des cibles privilégiées pour la méthylation lorsqu'elles sont acétylées (Annunzioto et al., 1995). Enfin, des modifications post-traductionnelles de même nature peuvent entraîner des effets opposés.

	Acétylation	Méthylation	Phosphorylation	ubiquitination
Effets à l'échelle de NCPs <i>in vitro</i>.	<ul style="list-style-type: none"> • Conformation très similaire (Ausio et al., 1986) • Accessibilité aux enzymes facilitée (Siino et al., 2003, Anderson et al., 2001) • Stabilité thermique réduite 			
Effets à l'échelle de la fibre de chromatine <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la stabilité mécanique (Brower-Toland et al., 2005) • Fibre hyperacétylée moins compacte. (Pollard et al. 1999, Tse et al, 1998, Annunzioto et al., 1988, Garcia-Ramirez et al, 1995) 			<ul style="list-style-type: none"> • Compaction accrue des fibres de chromatine (Jason et al., 2001)
Fonctions <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Acétylation : activation de la transcription. • Déacétylation : répression de la transcription. (Cheung et al., 2000) 	Fonctions multiples (Rice et al., 2001, Shilatifard, 2006) : <ul style="list-style-type: none"> • Formation d'hétérochromatine inactive. • Inactivation du chromosome X. • Activation de la transcription. 	Fonctions multiples (Strahl et al., 200) <ul style="list-style-type: none"> • Condensation des chromosomes au cours de la mitose. • Induction de l'expression génétique par phosphorylation de la sérine 10 de H3. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitination de H2A indispensable à la Spermatogénèse. • Rôle controversé pour l'activité transcriptionnelle. (Jason et al., 2002)

Tableau I.5 Effets de modifications post-traductionnelles.

c. Mimer l'acétylation par élimination des queues d'histones

Acétyler les queues d'histones permet de neutraliser leurs charges positives. Ces charges peuvent être également éliminées en supprimant les extrémités N et C terminales des histones. De nombreux travaux miment les conséquences globales électrostatiques de l'hyperacétylation en supprimant les queues d'histones par voies enzymatiques ou en reconstituant des nucléosomes à l'aide d'histones recombinantes tronquées. Ces NCPs sans queues ont été caractérisées suivant diverses méthodes.

La conformation globale (Dumuis-Kervabon et al., 1986) et la stabilité thermodynamique (Karantza et al., 2001) des NCPs est peu modifiée par suppression des queues d'histone. Par contre, les NCPs privées de queues sont plus sensibles à la dénaturation thermique (Ausio et al., 1989; Dumuis-Kervabon et al., 1986). Par ailleurs; Gottesfeld & Luger ont montré que les énergies libres d'interaction de l'ADN avec l'octamère d'histones augmente de 1kcal/mol lorsque les queues sont absentes. La stabilité mécanique de NCPs sans queues est de même réduite (Brower Toland et al., 2004). En outre, l'accessibilité de l'ADN des NCPs est amplifiée de 1.5 à 14 fois lorsque les queues d'histones sont absentes (Polach et al., 2000). L'élimination des queues d'histones est plus déstabilisante pour les NCPs que leur hyperacétylation (Widlund et al., 2000). Privés de queues d'histones, les oligomères de NCPs ne se condensent plus que partiellement (Garcia-Ramirez et al., 1992, Tse & Hansen, 1997, Fletcher and Hansen, 1995). Les queues d'histone H3 et H4 semblent plus impliqués dans le processus de compaction de la chromatine (Krajewski and Ausio, 1996, Tse and Hansen, 1997, Dorigo et al., 2003). On montre que l'ensemble des queues d'histones participent au processus de compaction de manière indépendante et additive (Gordon et al., 2005).

Conclusions du chapitre I

- Les différents niveaux de compaction de la chromatine ont été présentés : de la particule cœur de nucléosome à l'organisation de la chromatine dans le noyau. La structure du premier niveau d'organisation de la chromatine, la NCP, a été déterminée sans ambiguïté. Par contre, la question de l'organisation des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine reste ouverte. Les méthodes d'investigation *in situ* se sont montrées jusqu'à présent peu fructueuses. De plus, *in vitro*, la chromatine est extraite du milieu nucléaire et on peut se demander si sa structure est préservée.
- Les NCPs sont des particules colloïdales chargées dont la répartition de charges est très hétérogène. Les conditions de stabilité de cette particule ainsi que le positionnement de l'ADN relativement aux histones ont été présentés.
- Enfin, l'organisation de la chromatine est dynamique et régulée par de nombreux facteurs pour que l'ADN soit accessible et la chromatine fonctionnelle. Notamment, des modifications post traductionnelles des histones altèrent les charges de leurs queues et sont susceptibles de réguler le degré de compaction de la chromatine.

Chapitre II

Particules colloïdales
chargées en solution :
Interaction et
agrégation.

Un exemple : les NCPs

Introduction

Les particules cœur de nucléosome ont été décrites dans le chapitre I comme des particules colloïdales fortement chargées, de charge structurale d'environ -150. Les colloïdes sont, en effet, communément définis comme des objets dont la taille est comprise entre 10nm et 1µm. En solution, dans des conditions ioniques variables, les NCPs sont soumises à différents types d'interactions qui sont susceptibles d'induire leur agrégation ou de maintenir leur stabilité en solution.

Dans un premier temps, les interactions entre particules colloïdales en présence de sels monovalents seront explicitées d'un point de vue théorique. Nous verrons également que le potentiel d'interaction entre particules est directement lié à une grandeur thermodynamique appelée coefficient du viriel, mesurable expérimentalement.

Deux objets colloïdaux de même charge, en présence d'ions multivalents peuvent être soumis à des interactions attractives et s'agréger. D'un point de vue théorique, ce phénomène contre intuitif a été largement étudié ces dernières années et appliqué à des objets biologiques tels que l'ADN et l'actine. Les théories développées seront brièvement et simplement présentées.

Enfin, nous présenterons les données expérimentales disponibles au début de cette thèse relatives aux interactions entre nucléosomes et à leur agrégation ou leur condensation dans diverses conditions ioniques.

A. Interactions entre particules colloïdales chargées en solution

Cette partie est consacrée à la description des différents types d'interaction que subissent des particules colloïdales chargées en solution. Les interactions électrostatiques sont d'abord évoquées. Elles sont décrites par une équation de Poisson-Boltzmann linéaire ou non linéaire. Brièvement, les interactions répulsives de types sphères dures et les forces de dispersion attractive de Van der Waals sont ensuite décrites. Ces interactions sont regroupées dans le cadre d'une théorie DLVO. Le second paragraphe présente le second coefficient du viriel, lié directement aux interactions.

1. Interactions

a. Répulsion électrostatiques. Approximation de champ moyen

Les colloïdes considérés ici sont des macro-ions sphériques de rayon a . Avec r , la distance à un colloïde de charge surfacique $-\sigma$ dans une solution ionique dont la densité de charges libres est $\rho(\vec{r})$, un potentiel électrostatique $\Phi(\vec{r})$ est induit et vérifie l'équation de Poisson :

$$\Delta\Phi(\vec{r}) = -\frac{\rho(\vec{r})}{\epsilon_0\epsilon_r} = -\frac{1}{\epsilon_r\epsilon_0} \sum_i e z_i c_i(\vec{r}) \quad (\text{II.1})$$

ϵ_0 est la permittivité diélectrique dans le vide, ϵ_r est la constante diélectrique du solvant (égale à 80 pour l'eau), z_i est la valence des ions et c_i correspond à la concentration ionique volumique en solution. La résolution de l'équation de Poisson permet de déterminer le potentiel électrostatique en solution en fonction de la distance au macro-ion.

Théorie de Gouy-Chapman. Résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann non linéaire

Le modèle de Gouy-Chapman a été développé indépendamment par Gouy en 1910 et Chapman en 1913, pour l'étude de surfaces planes chargées.

Puisque la taille des macro-ions considérés ici (les NCPs) est très grande devant la taille des ions qui sont considérés comme des charges ponctuelles, on peut simplifier le problème à une dimension. Une surface infinie, chargée uniformément, dont une des faces est exposée à un électrolyte est considérée (cf. figure II.1). L'invariance par rapport aux deux directions parallèles à la surface (y, z) implique une dépendance des concentrations ioniques et du potentiel électrostatique uniquement suivant la direction perpendiculaire à la surface (x).

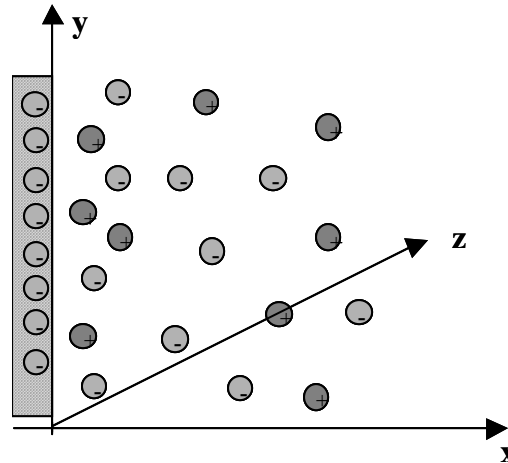


Figure II.1 Géométrie du système macro-ions électrolyte dans le modèle de Gouy-Chapman.

La densité de charge est décrite par une distribution de Poisson-Boltzmann :

$$c_i(x) = c_i(\vec{r}) = c_{i0} \exp\left(\frac{-z_i e \Phi}{k_B T}\right) \quad (\text{II.2})$$

T est la température et k_B est la constante de Boltzmann. En exprimant ainsi la distribution ionique, une approximation dite de champ moyen est effectuée.

En remplaçant l'équation II.2 dans II.1, on obtient l'équation de Poisson Boltzmann :

$$\Delta \Phi(\vec{r}) = -\frac{e}{\epsilon_r \epsilon_0} \sum_i z_i c_i \exp\left(\frac{-z_i e \Phi}{k_B T}\right) \quad (\text{II.3})$$

En symétrie sphérique, cette équation de Poisson-Boltzmann non linéaire n'a pas de solution analytique. A une dimension, l'équation de Poisson-Boltzmann devient :

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial x^2} = -\frac{e}{\epsilon_r \epsilon_0} \sum_i z_i c_i \exp\left(\frac{-z_i e \Phi}{k_B T}\right) \quad (\text{II.4})$$

Il s'agit d'une équation non linéaire. Sa résolution nécessite l'introduction de deux conditions aux limites, en plus d'un point de référence pour le potentiel.

A une assez grande distance de la surface, le potentiel Φ ainsi que sa dérivée sont nuls :

$$\Phi(x=\infty) = 0 \text{ et } \frac{d\Phi}{dx}(x=\infty) = 0 \quad (\text{II.5})$$

Si le champ est nul pour $x < 0$, on peut utiliser la loi de Gauss et obtenir une seconde condition aux limites pour $x = 0$:

$$\frac{d\Phi}{dx}(x=0) = -\frac{\sigma}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (\text{II.6})$$

Ainsi, la résolution de l'équation III.4 donne une expression pour le potentiel Φ , de la forme :

$$\Phi(x) = \frac{2k_B T}{xe} \ln\left(\frac{1 + \Gamma_0 \exp(-\kappa x)}{1 - \Gamma_0 \exp(-\kappa x)}\right) \quad (\text{II.7})$$

κ^{-1} est la longueur d'écrantage de Debye et caractérise la décroissance du potentiel avec la distance à la surface.

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{\sqrt{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}}{\sqrt{\sum_i (z_i e)^2 c_i}} \quad (\text{II.8})$$

Pour une solution aqueuse, à 25°C et pour une concentration en ions monovalents de 0.1M, κ^{-1} est égale à 1nm. κ^{-1} vaut 10nm pour une solution aqueuse concentrée à 1mM en ions monovalents.

Γ_0 est lié au potentiel de surface Φ_0 par la relation suivante :

$$\Gamma_0 = \tanh\left(\frac{xe\Phi_0}{4k_B T}\right) \quad (\text{II.9})$$

Théorie de Debye-Hückel. Linéarisation de l'équation de Poisson-Boltzmann

L'équation de Poisson-Boltzmann (II.3) peut être simplifiée si on se place dans des conditions où le potentiel électrostatique est faible devant l'énergie d'agitation thermique $k_B T$. L'approximation de Debye-Hückel est applicable pour les systèmes faiblement chargés ou fortement écrantés. L'équation II.3 est linéarisée en :

$$\Delta\Phi \cong -\frac{e}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i z_i c_i \left(1 - \frac{z_i e \Phi}{k_B T}\right) = -\frac{\Phi e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \sum_i c_i z_i^2 = \Phi \kappa^2 \quad (\text{II.10})$$

Cette équation différentielle du second ordre peut être résolue dans différentes symétries. Dans le cas où on considère un plan chargé, on obtient :

$$\Phi(x) = \Phi_0 \exp(-\kappa x) \quad (\text{II.11})$$

Une symétrie sphérique est ici plus appropriée. Pour un macro-ion sphérique de rayon a , et de charge Z , les conditions aux limites deviennent :

$$\Phi(r=\infty)=0, \quad \frac{d\Phi}{dr}(r=\infty)=0 \quad \text{et} \quad \frac{d\Phi}{dr}(r=a) = -\frac{Ze}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r a^2} \quad (\text{II.12})$$

La solution de l'équation III.10 s'écrit :

$$\Phi(r) = \frac{Ze}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{\exp[-\kappa(r-a)]}{r(1+\kappa a)} \quad (\text{II.13})$$

On dispose ainsi d'une expression simple du potentiel électrostatique en symétrie sphérique.

Potentiel d'interaction électrostatique entre deux sphères de même charge

A partir du potentiel électrostatique créé par un macro-ion sphérique, on peut en déduire un potentiel d'interaction électrostatique répulsif entre deux macro-ions identiques séparés d'une distance r :

$$V(r) = \frac{k_B T e Z^2 \exp(-\kappa(r-2a))}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r(1+\kappa a)^2} \quad (\text{II.14})$$

L'allure du potentiel en fonction de r est représenté sur la figure II.2.a. Pour des distances supérieures à la distance d'écrantage de Debye, les interactions électrostatiques ne sont plus perceptibles.

Méthode de Calcul de Charge effective de NCPs.

Les NCPs sont fortement chargées. De ce fait, elles sont entourées d'un nombre important d'ions de charge opposée, les contre-ions. Une NCP et ses contre-ions condensés constituent une particule effective dont la charge Z_{eff} est inférieure à la charge structurale Z_{str} . Plusieurs définitions de la charge effective existent (Belloni, 1998) et aboutissent à des valeurs légèrement différentes. Le calcul de la charge effective a été effectué comme dans Alexander et al. (1983). La charge effective est définie comme la charge pour laquelle les potentiels d'interaction calculés à partir des équations de Boltzmann linéarisées ou non linéaires sont égaux.

$$\Phi_{\text{linéarisé}}(Z_{\text{eff}}) = \Phi_{\text{non linéarisé}}(Z_{\text{str}})$$

Le calcul est effectué en utilisant un programme conçu par L Belloni (1998) qui utilise un modèle de Poisson-Boltzmann réseau (Katchalsky 1996). Brièvement, ce modèle fractionne la solution de colloïdes en cellules sphériques de rayon R contenant chacune un unique colloïde. Dans chaque cellule, l'équation de Debye-Hückel est résolue en symétrie sphérique avec des conditions aux limites modifiées par rapport aux conditions II.12. Les conditions à l'infini sont substituées par des conditions en $r=R$. Les NCPs sont considérées comme des sphères de rayon $a=50\text{Å}$. Le programme donne les valeurs de Z_{eff} pour différentes concentrations en ions monovalents Cs. Pour des NCPs recombinantes intactes et privées de queues d'histone H3 et H4 (gH3gH4), les charges effectives ont été calculées en fonction des concentrations salines et présentées dans le chapitre IV (§ A.2).

La charge effective augmente, en valeur absolue avec la concentration saline. En effet, à force ionique élevée, les interactions électrostatiques attractives entre un colloïde et ses contre-ions sont plus écrantées qu'à faible concentration saline. Par conséquent, à forte concentration en sels, les contre-ions condensés par colloïdes sont moins nombreux et la valeur de la charge effective obtenue se rapproche de celle de la charge structurale.

b. Répulsion sphères dures

L'impénétrabilité entre particules implique que lorsque la distance entre deux colloïdes devient très faible, on observe une forte répulsion. Cette répulsion est décrite par l'expression suivante :

$$V(r) = \left(\frac{2a}{r}\right)^n \quad (\text{II.15})$$

Lorsque n est infini, le potentiel répulsif est de type sphères dures et est représenté sur la figure II.2.b. Lorsque la distance entre deux particules est supérieure à $2a$, ce potentiel est nul. Il est infini pour $2a < r$. Ces forces sont d'origine quantique et découlent du principe d'exclusion de Pauli.

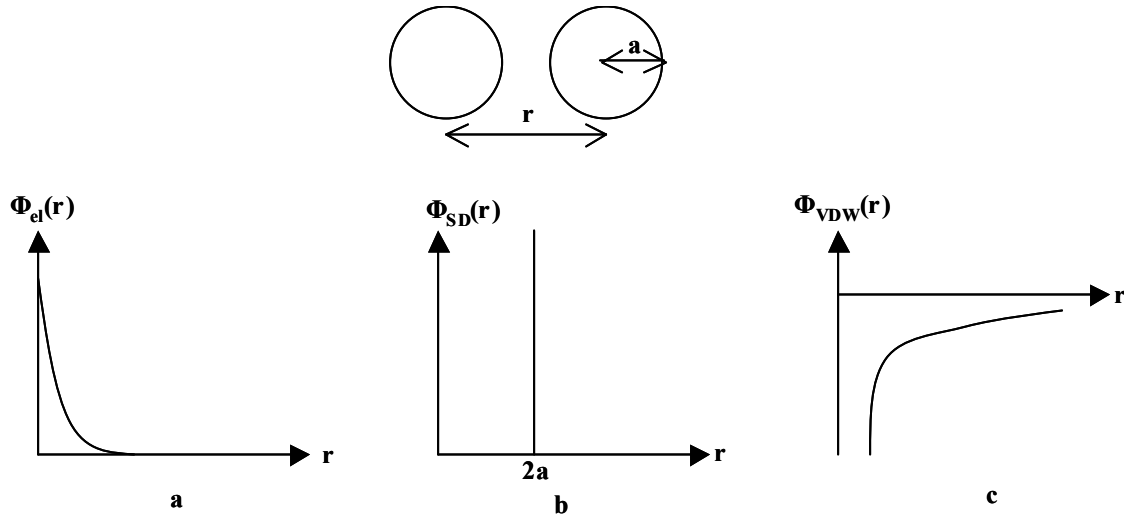


Figure II.2 Forme des potentiels d'interaction entre 2 colloïdes sphériques chargés de rayon a et distantes de r . a : répulsion électrostatique. b : répulsion sphères dures. c : attraction Van der Waals

c. Interactions attractives de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals sont à courte portée. Elles résultent de corrélations entre électrons mis en mouvement par des interactions dipolaires et peuvent avoir différentes origines.

Les interactions dipolaires peuvent avoir lieu entre deux dipôles permanents. Il s'agit alors d'interactions de Keesom.

Des interactions dipolaires entre molécules polaires et molécules non polaires sont appelées interactions de Debye.

On observe également des interactions dipolaires de London entre molécules non polaires. Ces interactions découlent de mouvements du nuage électronique autour de noyaux atomiques. Lorsque deux atomes s'approchent suffisamment, des dipôles temporaires s'alignent et sont à l'origine de moments dipolaires μ non nuls et des forces de dispersion de London. Ce type d'interaction dipolaire a une contribution plus importante pour les interactions entre colloïdes que les deux premières citées ci-dessus.

Entre deux atomes, le potentiel d'interaction de Van der Waals est inversement proportionnel à la distance entre les deux atomes à la puissance 6 : $\Phi(r) \propto \frac{1}{r^6}$. L'expression des interactions attractives de dispersion pour deux colloïdes dépend de la géométrie des particules étudiées. L'interaction de dispersion entre deux particules colloïdales est calculée en sommant deux à deux ces interactions de dispersion par paires de molécules appartenant chacune à une

particule. Pour deux colloïdes sphériques de rayon a dont les centres sont distants de r , l'énergie attractive s'écrit :

$$\Phi(r) = -\frac{Aa}{12(r-2a)} \quad (\text{II.16})$$

A est une constante de Hamaker. Ce potentiel attractif est représenté sur la figure II.2.c.

d. Théorie DLVO

Le potentiel DLVO (Derjaguin, Landau, Vervy et Overbeek) regroupe les trois potentiels présentés en a, b et c. Il décrit les interactions de paires entre colloïdes ainsi que leur stabilité en solution. Il résulte de la somme des trois potentiels représentés sur la figure II.2. L'allure du potentiel DLVO est représenté sur la figure II.3.

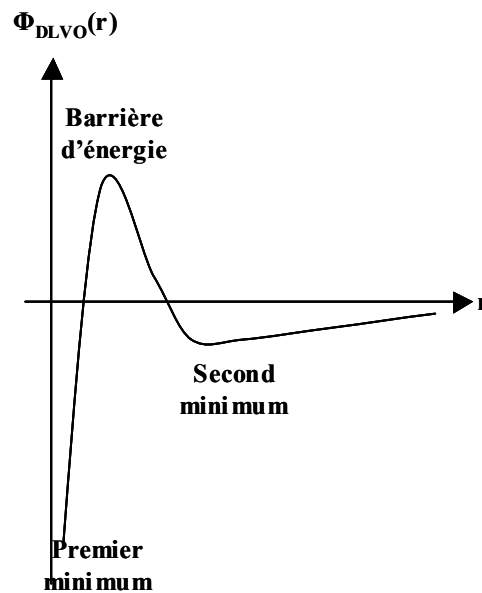


Figure II.3 Potentiel DLVO.

A faible interdistance entre particules, on observe un premier minimum où les particules sont agrégées. Les particules colloïdales sont stables en solution à condition que leur énergie d'interaction de paires soient telles qu'elles correspondent à des interdistances correspondant aux second minimum. La barrière d'énergie doit donc présenter une amplitude suffisante pour éviter l'agrégation des particules. La stabilité cinétique des colloïdes en solution dépend donc de la hauteur de la barrière d'énergie. Lorsque la force ionique augmente, l'amplitude cette barrière d'énergie diminue et l'agrégation des colloïdes est facilitée.

e. Interaction attractive de déplétion

Lorsqu'on ajoute à une solution de colloïdes un polymère qui a une meilleure affinité avec le solvant qu'avec les colloïdes, les particules colloïdales peuvent s'agréger. La figure II.4 décrit schématiquement le processus d'attraction par déplétion. Une couche de déplétion entoure les colloïdes où la concentration en polymère est plus faible que la concentration moyenne en solution (figure II.4.a). Lorsque deux colloïdes s'approchent suffisamment pour que leur couches

de déplétion se superposent, le volume de superposition est complètement dépourvu de polymère (figure II.4.b). Par conséquent, la différence de pression osmotique entre le volume duquel est exclu le polymère et la solution induit une forte interaction attractive entre particules, qui s'agrègent (figure II.4.c). Au cours de nos expériences nous avons utilisé du polyéthylène glycol (PEG) pour concentrer fortement et éventuellement organiser des particules cœur de nucléosome.

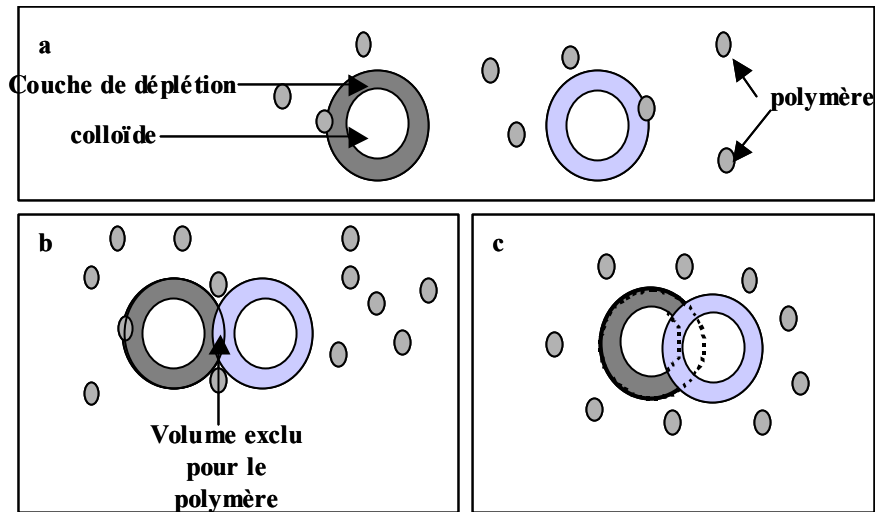


Figure II.4. Interaction attractive de déplétion. a: colloïdes et polymères en solution. b: Les colloïdes s'approchent et créent un volume exclu pour le polymère. c: agrégation des colloïdes.

2. Interactions et coefficients du viriel

a. Développement du viriel

Fonction de distribution radiale de paires

Dans un liquide, l'ordre à courte portée est représenté par la fonction de distribution de paires $g(r)$. $g(r)$ correspond à la probabilité d'observer deux particules distantes de r . Lorsqu'on fait tendre r vers l'infini, $g(r)$ est égale à 1. Le nombre de molécules placées entre r et $r+dr$ d'une molécule placée à l'origine est :

$$\rho g(r) 4\pi r^2 dr \quad (\text{II.17})$$

où ρ est la densité en particules.

L'énergie moyenne E d'un système de N particules, interagissant par un potentiel de paires $v(r)$, dépend de $g(r)$:

$$E = 3Nk_B T + 2N\pi\rho \int_0^\infty v(r)g(r)r^2 dr \quad (\text{II.18})$$

La fonction de distribution de paires se développe en puissance de densité :

$$g(r) = g_0(r) + \rho g_1(r) + \rho^2 g_2(r) + \dots \text{ avec } g_0(r) = \exp\left(\frac{-v(r)}{k_B T}\right) \quad (\text{II.19})$$

$g_0(r)$ renseigne sur les interactions à deux corps alors que $g_1(r)$ renseigne sur les interactions à trois corps, $g_2(r)$ sur les interactions à 4 corps etc...

Développement du viriel

La pression osmotique Π dans un liquide peut s'écrire sous la forme d'un développement appelé développement du viriel. Ce développement résulte d'un calcul de thermodynamique statistique. On se place dans un ensemble canonique où le nombre de molécules N est fixe. On a $\Pi = -\left(\frac{\partial F}{\partial V}\right)_{N,T}$ et $F = -k_B T \ln Q_N$. F est l'énergie libre du système. Q_N est la fonction de partition du système et dénombre les configurations possibles du système.

$$Q_N = \frac{1}{N!} \left(\frac{\sqrt{2k_B T \pi}}{h} \right)^{3N} \int \exp(-v_N(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N)) d\vec{r}^N \quad (II.20)$$

A la suite de quelques étapes de calcul, on peut établir une relation entre pression Π et la fonction de distribution de paires $g(r)$. Il s'agit de l'équation d'état du liquide:

$$\frac{\Pi}{\rho k_B T} = 1 - \frac{\rho 2\pi}{3k_B T} \int_0^\infty r^3 dr g(r) \frac{dv}{dr} = 1 + A_2 \rho + A_3 \rho^2 + \dots \quad (II.21)$$

A_2 et A_3 sont respectivement les second et troisième coefficients du viriel. Ils caractérisent les interactions entre 2 et 3 corps en solution. En particulier :

$$A_2 = 2\pi \int_0^\infty r^2 dr \left(\exp\left(-\frac{v(r)}{k_B T}\right) - 1 \right) = 2\pi \int_0^\infty r^2 dr (g_0(r) - 1). \quad (II.22)$$

A partir de l'expression de A_2 en fonction du potentiel d'interaction de paires $v(r)$, on peut déterminer le caractère attractif ou répulsif des interactions. Pour des interactions répulsives ($v(r) > 0$), A_2 est positif alors que pour des interactions attractives ($v(r) < 0$), A_2 est négatif. Lorsque les pressions restent modérées, le troisième coefficient du viriel peut être négligé.

b. Méthodes de mesure du second coefficient du viriel.

Mesure de pression osmotique.

La pression osmotique en solution est mesurée expérimentalement en fonction des concentrations en particules. Ainsi, dans le cas où les interactions à trois corps sont négligées, la substitution des densités par des concentrations C dans l'équation II.21 donne :

$$\frac{\Pi}{CRT} = \frac{1}{M} + A_2 C \quad (II.23)$$

Les concentrations sont en $g.L^{-1}$ et M est la masse moléculaire en $g.mol^{-1}$. La mesure des pressions osmotiques à différentes concentrations moléculaires permet, après ajustement des données, d'obtenir simultanément le second coefficient du viriel et la masse moléculaire des particules étudiées.

Expérimentalement, la pression osmotique est mesurée à l'aide d'osmomètres. Ils comportent deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable qui permet le passage du solvant mais contraint les particules étudiées à demeurer dans leur compartiment (cf. figure II.5). L'équilibre est atteint lorsque les potentiels chimiques μ sont égaux de part et d'autre de la membrane. L'égalisation des potentiels chimiques induit un flux de solvant et une surpression hydrostatique vers le compartiment contenant les particules étudiées. La surpression

est directement égale à la pression osmotique et provoque une élévation h du niveau de la solution telle que $\Pi = \rho_0 g h$. g est l'accélération de la pesanteur et ρ_0 est la densité de la solution.

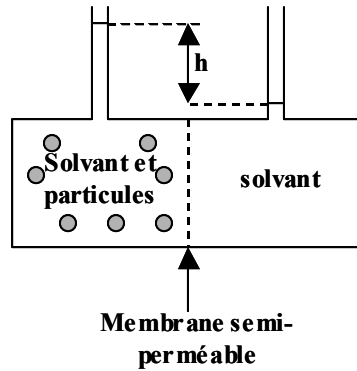


Figure II.5 Schéma d'un osmomètre

Facteur de structure.

Le facteur de structure $S(q)$ est assimilé à la transformée de Fourier de la fonction de corrélation de paires $h(r)$. C'est un terme d'interférence entre particules. La fonction de corrélation de paires est liée à la fonction de distribution radiale de paires par : $h(r) = g(r) - 1$. On a :

$$S(q) = 1 + \rho 4\pi \int_0^{\infty} (g(r) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr \quad (\text{II.24})$$

En solution, la compressibilité isotherme β_T est telle que :

$$\beta_T = \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial \rho} \right)^{-1}_T \quad (\text{II.25})$$

De plus, on peut montrer, que

$$\lim_{q \rightarrow 0} S(q, \rho) = 1 + \rho 4\pi \int_0^{\infty} (g(r) - 1) r^2 dr = \rho k_B T \beta_T \quad (\text{II.26})$$

En combinant II.21 et II.25, on trouve $\rho k_B T \beta_T = \frac{1}{1 + A_2 \rho + A_3 \rho^2} = S(0, \rho)$. Lorsque q tend vers 0, $S(q, \rho)$ est donc directement lié aux coefficients du viriel. $S(q)$ devient égal à 1 lorsque q tend vers l'infini.

Dans les chapitres suivants, nous verrons comment il est possible de déterminer numériquement le facteur de structure. Expérimentalement, des méthodes de diffusion des rayons X (§ IV.A) et de diffusion statique Rayleigh de la lumière (§ V.B et annexe V.4) ont été utilisées au cours de cette thèse pour évaluer des facteurs de structure et déterminer la nature des interactions entre particules.

B Interactions attractives entre particules de même charge.

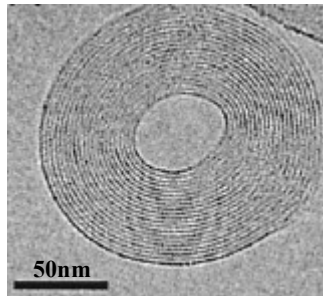
La théorie de champ moyen, où la répartition des ions en solution est décrite par une distribution de Boltzmann, prédit que les interactions entre particules colloïdales de même charge sont systématiquement répulsives. Or, expérimentalement, en présence d'ions multivalents, des

particules de même charge sont capables de s'agréger. Les explications théoriques décrivant ce phénomène sont brièvement présentées.

1 Exemples d'objets biologiques précipités par des agents multivalents.

a. ADN précipités par des ions multivalents

Plongé dans une solution d'ions monovalents à des concentrations physiologiques (0.1M), l'ADN forme une pelote désordonnée dont le rayon de giration peut atteindre suivant la nature de l'ADN typiquement quelques microns. En présence d'ions multivalents de valence supérieure ou égale à trois, l'ADN collapse (Bloomfield, 1996). Les agents de condensation multivalents peuvent être des polyamines (spermine⁴⁺ et spermidine³⁺), des cations inorganiques (CO(NH₃)₆³⁺) où des protéines basiques (histones H1 et H5). Par exemple, l'ADN ainsi condensé s'organise en tores de quelques centaines de nanomètre de diamètre (cf. figure II.6).



Hud et Downing, 2001.

Figure II.6 ADN de phage λ condensé sous forme de tores par du cobalt hexamine (III). Image de cryomicroscopie électronique (Hud et Downing, 2001).

Les brins d'ADN courts ne peuvent pas se condenser en tores et forment des phases ordonnées cristallines liquides hexagonales ou cholestériques (Pelta et al., 1996, Raspaud et al., 2005). Raspaud et al (1998, 1999) ont exploré une large gamme de concentrations en ADN et établi des diagrammes de phases de précipitation de l'ADN par des ions multivalents tels que la spermine⁴⁺ (cf. Figure II.7).

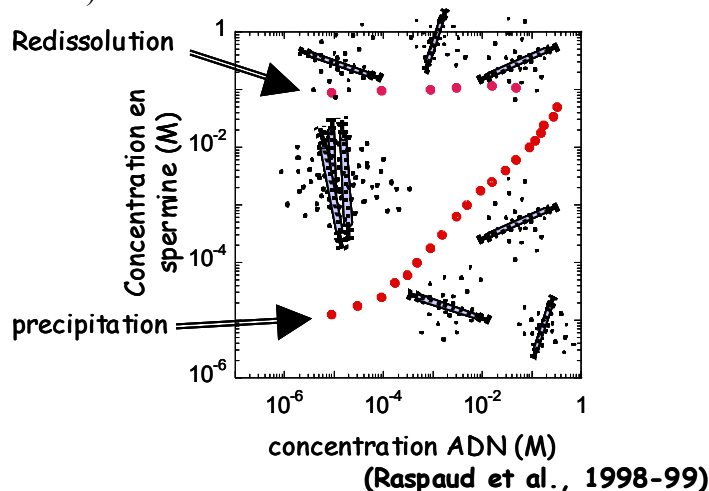


Figure II.7 Diagramme de phase de précipitation de l'ADN par la spermine⁴⁺.

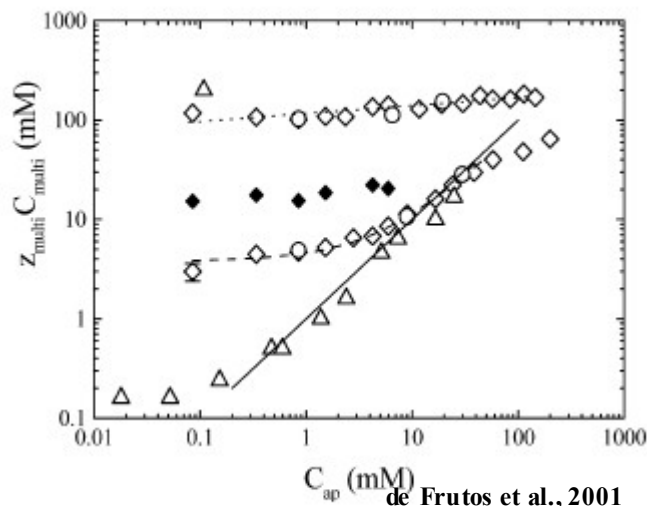
Le domaine biphasique est limité par une ligne seuil de précipitation et une ligne seuil de redissolution. A forte concentration en ions multivalents et monovalents, Raspaud et al. (1998, 1999) constatent une redissolution des précipités.

b. Condensation de la F-actine

L'actine polymérise pour former un double brin filamentueux de F-actine dans des "conditions ioniques physiologiques" (2mM MgCl₂ et 0.1M KCl). La F-actine est un polyélectrolyte rigide de longueur de persistance 10µm, de diamètre 75Å. La F-actine est négativement chargée et sa densité linéaire de charges est de -4e par nm (Tang & Janmey, 1996). En présence d'ions multivalents de valence supérieure ou égale à deux, les filaments d'actine se condensent en faisceaux. Cette condensation se produit pour des concentrations en magnésium supérieures à 10mM. En présence de nucléotides (ATP, GTP et CTP), les faisceaux de filaments d'actines sont ressolubilisés. Sous certaines conditions (entre 3et 15mM en ions) divalents, la F-actine forme une phase lamellaire sous la forme de réseaux de filaments en deux dimensions superposés (cf. Wong et al., 2003).

c. Condensation des NCPs isolées par des cations multivalents

En plus de précipiter des polyélectrolytes linéaires de symétrie cylindrique, les cations multivalents précipitent aussi les NCPs, considérées comme des colloïdes quasi-sphériques. La précipitation de NCPs isolées par des cations multivalents a été étudiée dans le groupe (de Frutos et al., 2001; Raspaud et al, 1999). Le diagramme de phase récapitulatif de nucléosomes natifs précipités par des cations multivalents (Mg²⁺, Ca²⁺, spermine⁴⁺) est représenté sur la figure II.8. Le domaine où les NCPs sont précipitées est délimité par des limites de précipitation et de redissolution. L'allure de ces diagrammes de précipitation reste similaire aux diagrammes de précipitation de l'ADN par des cations multivalents (Figure II.7).



de Frutos et al., 2001

Figure II.8 Précipitation de nucléosomes isolés par des ions multivalents (Mg²⁺ (◇), Ca²⁺ (○) et spermine⁴⁺ (△) en présence de Tris 3.5mM et d'EDTA 1mM. Les concentrations en Mg²⁺ qui induisent une précipitation maximale des NCPs est représenté par ◆. En abscisse les concentrations en nucléosomes sont exprimées par la concentration de charges négatives accessibles C_{ap}. En ordonnée, le nombre de charges positives apportées par les cations multivalents est égale à Z_{multi}C_{multi}. La ligne en trait plein correspond à Z_{multi}C_{multi}=C_{ap}. La ligne discontinue correspond à l'ajustement des point expérimentaux avec Z_{multi}C_{prec}=0.77x C_{ap}+3.8. La ligne en pointillé ajuste les points expérimentaux à la redissolution : C_{redissol}=116.4x C_{ap}^{0.08}.

Les limites de redissolution sont superposées pour le magnésium²⁺ et la spermine⁴⁺ (ligne en pointillés sur la figure II.8). Par contre, les seuils de précipitation sont distincts (ligne en trait plein et ligne discontinue). La zone de précipitation est plus étroite lorsque les NCPs sont agrégés par des cations de valence plus faible.

Les ions monovalents entravent la précipitation. Par exemple, pour $C_{ap}=4mM$ la précipitation en présence de magnésium²⁺ est totalement supprimée pour des concentrations en ions monovalents supérieures à 70mM (de Frutos et al., 2001). Un effet de compétition entre ions monovalents et divalents déjà observé par Widom (1986), pour la chromatine, est donc mis ici en évidence.

Des expériences de mobilité électrophorétique ont été mises en œuvre afin de mettre en relation des phénomènes de précipitation par des ions multivalents avec des phénomènes d'inversion de charge. Les ions divalents, quelle que soit leur concentration, n'inversent pas la charge des NCPs qui s'approche de la neutralité. Par contre, en présence de spermine⁴⁺ et spermidine³⁺ en concentrations suffisantes, la charge des NCPs s'inverse (cf. figure II. 9).

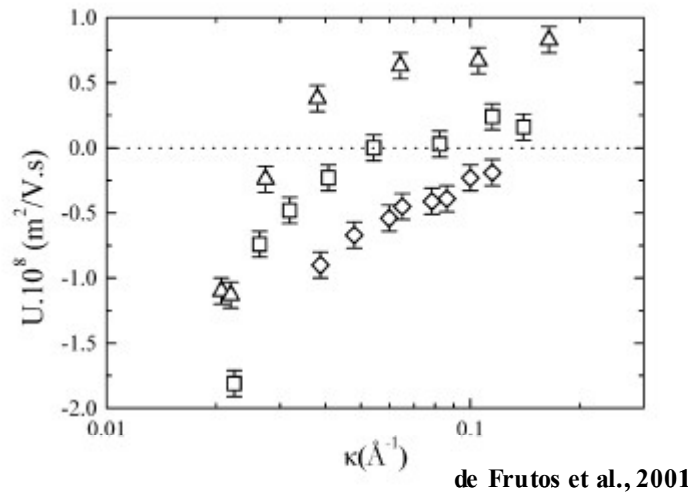


Figure II. 9 Mobilité électrophorétique U de nucléosomes agrégés par des ions multivalents (Mg^{2+} (\diamond), Spermidine³⁺(\square) et spermine⁴⁺(\triangle)).

Les mobilités négatives indiquent que les agrégats sont chargés négativement alors que pour des mobilités positives, les agrégats de NCPs ont subi une inversion de charge.

Pour l'ADN, les NCPs isolées ainsi que pour des chaînes de chromatine, des caractéristiques communes pour les conditions de précipitation par la spermine⁴⁺ sont mises en évidence par Raspaud et al. (1999). Ils constatent que trois régimes peuvent être distingués : les faible concentration en particules, les concentrations intermédiaires et les concentrations élevées. Pour les concentrations intermédiaires, les seuils de précipitation sont superposées pour ces trois types de particules et on a $C_{spermine}^{4+}/C_{ap}=0.2$.

2. Interprétations théoriques

La théorie de champ moyen (§A) prédit une réduction de la charge nette (cf notion de charge effective, §A.1.a.) des particules et une diminution de l'amplitude des interactions répulsives. Toutefois, dans cette description, les interactions entre macro-ions restent répulsives, en présence d'ions multivalents, et ne rendent pas compte des expériences évoquées ci-dessus.

Une des interprétations du phénomène attractif s'appuie sur des corrélations dynamiques de type Van der Waals de fluctuation des contre-ions condensés. Plus récemment, un mécanisme statique entre contre-ions fortement corrélés a été proposé pour rendre compte des interactions attractives. Des articles de revue reprennent ces concepts théoriques (Quesada-Pérez et al.(2003), Gelbart et al.(2000)) que nous décrivons simplement ci-dessous.

a. Corrélations dynamiques entre contre-ions condensés

Condensation de contre-ions

Manning (1978) et Oosawa (1968, 1971) ont proposé que la condensation de contre-ions soit responsable d'interactions attractives.

La condensation de contre-ions sur des colloïdes ou macro-ions résulte d'un compromis entre entropie de contre-ions libres et énergie coulombienne d'interaction des ions avec le macro-ion, pour minimiser l'énergie libre d'interaction. L'entropie S est proportionnelle au logarithme de l'interdistance contre-ion / macroion : $S \sim \ln(r)$. L'expression analytique de l'énergie d'interaction électrostatique U dépend de la géométrie du système considéré. Les NCPs peuvent être considérées comme quasi sphériques.

Dans le cas d'une symétrie sphérique, plus représentative d'une solution de nucléosomes, cette énergie est inversement proportionnelle à r : $U \sim 1/r$. L'entropie est donc le terme dominant et les contre-ions sont donc, suivant cette conception, peu condensés.

Pour une symétrie cylindrique, on a $U \sim \ln(r)$. Le terme énergétique est donc équivalent au terme entropique. Sous certaines conditions, les contre-ions sont donc fortement condensés sur le colloïde considéré. La paramètre de Manning ξ , sans dimension, est introduit :

$$\xi = \frac{(ze)^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T b}$$

où b est la distance entre contre-ions condensés sur le macroion cylindrique. Selon Manning et Oosawa les contre-ions sont condensés lorsque ξ devient supérieur à l'unité. Par conséquent, les travaux théoriques se sont particulièrement concentrés sur la condensation de macroions tel que l'ADN qui présente une symétrie cylindrique et pour lequel b est particulièrement faible et est égal à 1.7 \AA . Il est également notable que pour des ions de valence z élevée, la condensation est plus aisée. On peut remarquer que $\xi = \lambda_B / b$ où λ_B est la longueur de Bjerrum :

$$\lambda_B = \frac{(ze)^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}$$

Lorsque deux ions sont distants de λ_B , l'énergie d'interaction électrostatique est exactement égale à $k_B T$, l'énergie d'agitation thermique.

Interaction entre deux macroions de même charge.

Les interactions attractives entre deux colloïdes découlent alors de la polarisabilité de la distribution de contre-ions condensés. La distribution de ces contre-ions n'est pas homogène. Des

fluctuations thermiques déplacent le centre de masse de cette distribution et induisent un moment dipolaire μ non nul. La fluctuation de distribution de contre-ions est plus marquée pour une symétrie cylindrique que sphérique et est aléatoire sur l'ensemble du macro-ion. Oosawa (1971) décrit analytiquement ces fluctuations, pour des colloïdes cylindriques par un développement en séries de Fourier. Des forces attractives similaires aux forces de dispersion de London (cf. § A.1.c) peuvent agréger les colloïdes. Dans le cas d'une symétrie cylindrique, cette force est perçue pour des distances inférieures à λ_B .

En présence d'ions monovalents, cette distance vaut 7\AA alors que pour des ions divalents elle est de 28\AA . Des ions de valence z élevée condensent donc plus facilement les colloïdes.

Les interactions par corrélation de fluctuation de contre-ions restent étudiées théoriquement aujourd'hui et les concepts de Manning et Oosawa sont approfondis (Podgornik & Parsegian, 1998; Ha & Liu, 1997, O'Shaughnessy & Yang, 2005). Des simulations Monte Carlo ont également été utilisées pour mettre en évidence des interactions attractives entre macroions cylindriques de même signe en présence d'ions multivalents (Diehl et al., 2001; Linse & Lobaskin, 1999, Pack et al., 1999). Ces simulations prennent en compte les corrélations entre contre-ions.

Olvera de la Cruz et al. (1995) proposent un modèle pour l'agrégation de chaînes de polyélectrolytes anioniques par des cations multivalents. Les monomères appartenant au polyélectrolyte présentent deux types d'état. Une fraction de monomères peut être liée à des cation multivalent condensés qui induisent une inversion de charge locale. La fraction de monomères complémentaire n'interagit pas avec les cations multivalents et ils conservent leur charge négative. Des interactions attractives électrostatiques à courte portée entre ces deux types de monomères résultent de pontage par les cations multivalents. Les interactions à courte portée sont décrites par des interactions de Van der Waals et une correction des interactions de type Debye-Hückel impliquant les interactions de pontage à courte portée. Les auteurs comparent des diagrammes de phase théoriques à des diagrammes de phase expérimentaux.

Dans le cas de colloïdes sphériques, on ne trouve pas de développements théoriques analytiques qui décrivent les interactions inter particules en présence d'ions multivalents. Néanmoins, des simulations ont été menées dans cette configuration particulière. Notamment, Grønbech-Jensen et al. (1998) ont simulé les interactions entre particules chargées sphériques dans une solution contenant des ions divalents. Seules les interactions de types sphères dures et électrostatiques sont considérées. A forte concentration en particules, une pression négative est calculée, caractérisant des interactions attractives, alors que les interactions répulsives prédominent à faible densité en colloïdes.

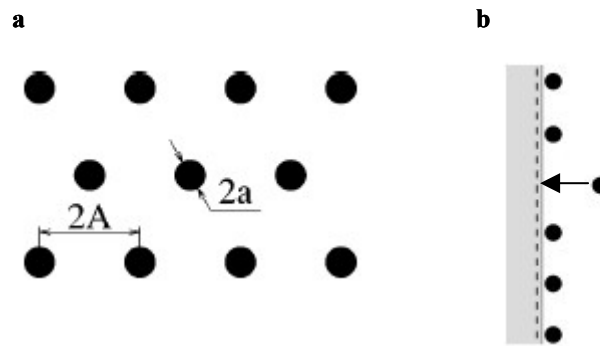
b. Corrélations statiques entre contre-ions condensés

Liquide fortement corrélé

Rouzina et Bloomfield (Rouzina et Bloomfield 1996, Bloomfield, 1996) et Shklovskii (Shklovskii, 1999, Grosberg et al., 2002) ont proposé une théorie où la distribution des contre-ions est ordonnée. Des simulations dynamiques browniennes effectuées sur des bâtonnets rigides chargés en présence de contre-ions montrent, qu'à faible température, les contre-ions s'ordonnent

sur les macro-ions (Grønbech-Jensen et al., 1997). Cet ordre à courte distance, dépendant de la valence des contre-ions, est lié à des interactions attractives à courte distance et peut perdurer à température ambiante.

A cause des fortes interactions avec le macroion et entre contre-ions, ces derniers sont ordonnés dans un réseau à deux dimensions à la surface d'un colloïde chargé. Les contre-ions s'assemblent en un liquide fortement corrélé similaire à un cristal de Wigner (Figure II.10.a). Les cristaux de Wigner sont habituellement utilisés pour décrire la répartition des électrons dans le cadre de la physique de la matière condensée à très basse température et n'ont pas encore été mis en évidence expérimentalement.



Nguyen et Shklovskii, 2001

Figure II.10 Organisation suivant un cristal de Wigner de contre-ions à la surface d'un colloïde chargé en vue de face (a) ou de profil (b). Les contre-ions ont un rayon a et sont séparés de $2A$.

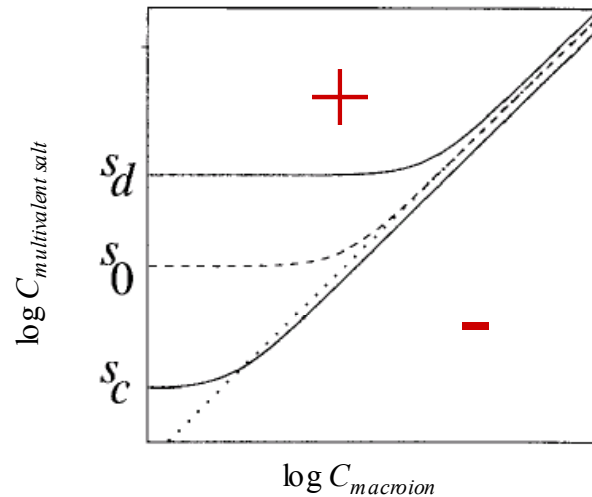
Inversion de charge.

Ce modèle prédit l'inversion de charge de colloïdes chargés en présence d'ions multivalent. Ce phénomène a été mesuré par électrophorèse capillaire pour différents systèmes. Brièvement, quand un contre-ion s'approche de la surface d'un macro-ion, il repousse d'autres contre-ions situés sur la surface (Figure II.10.b). Un trou de charge opposé est créé et le contre-ion est attiré sur la surface. Cette attraction provient du fait que le potentiel chimique d'un contre-ion condensé sur la surface d'un macro-ion est négatif. Une surface déjà neutre peut donc ainsi inverser le signe de sa charge.

Interaction entre deux macroions de même charge

Lorsque deux surfaces où les contre-ions sont organisés s'approchent, elles diminuent leur énergie en se positionnant de manière appropriée dans la direction latérale à la surface. Cette interaction est effective à courte distance et induit une "coagulation" des surfaces. L'association entre de telles surfaces est prédite par un paramètre $\Gamma = \frac{(ze)^2}{\epsilon_0 \epsilon_r a_z k_B T}$. a_z est la distance moyenne entre contre-ions à la surface et est égale à $a_z = \sqrt{\frac{ze}{\sigma}}$ où σ est la densité surfacique de charges. L'association entre surfaces se produit pour $\Gamma = 2$. Dans le cas d'ions monovalents, $z=1$ et le système est faiblement couplé, $\Gamma \sim 1$. Il n'y a pas d'agrégation. Par contre, en présence d'ions multivalents, Γ peut devenir important puisqu'il est proportionnel à la valence z au carré.

En utilisant ce modèle, Nguyen et Shklovskii (2001) déterminent un diagramme de phase théorique de précipitation de macroions en présence de contre-ions (Figure II.11).



(Nguyen et al., 2000 ; Nguyen & Shklovskii, 2001)

Figure II.11 Diagramme de phase d'une solution de macroions en présence de contre-ions multivalents.

La concentration en ions multivalents y est représentée en fonction de la concentration en macroion. Les macroions ou colloïdes considérés sont chargés négativement. A faible concentration en ions multivalents (zone inférieure du diagramme), les macroions n'ont pas subi d'inversion de charge et sont libres en solution. La région centrale correspond à la zone biphasique. La ligne centrale en pointillés correspond à des complexes neutres et délimite l'inversion de charge des macroions. Dans la zone supérieure du diagramme (forte concentration en contre-ions), les macro-ions ont inversé leur charge et sont redissous en solution. En effet, une compétition s'exerce entre interaction de corrélation à courte distance qui agrège les macroions et répulsion coulombienne. A forte concentration ionique de la solution, les répulsions coulombiennes écrantent les interactions attractives de corrélation.

C. Interaction et condensation de particules cœur de nucléosome

Certains aspects des interactions entre particules cœur de nucléosome et de leur condensation avaient été étudiés dans le laboratoire avant que ne débute cette thèse. Ce paragraphe est consacré à la présentation de résultats déjà acquis qui ont servi de base pour établir la problématique de ce travail.

Dans une première partie, les interactions entre NCPs en solution diluée sont développées et les résultats expérimentaux et théoriques sont comparés.

Nous verrons ensuite que les NCPs ont été condensés et précipités en présence d'ions monovalents et multivalents. En particulier, la structure des agrégats et les conditions ioniques de précipitation seront explicités.

1. Interactions et conformation en solution diluée

a. Queues d'histones et interactions attractives

La mobilité des extrémités terminales des histones du nucléosome a été mise en évidence par des expériences de résonance magnétique nucléaire (Hilliard et al, 1986; Smith & Rill, 1989). Des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles effectuées à des concentrations variables en sels monovalents ont montré que ces queues se déplient au-delà du cœur des NCPs. Pour des concentrations salines supérieures à 50mM, les queues d'histones semblent s'étendre au-delà du cœur des particules (Mangenot et al., 2002 a, Figure II.12.b). Cette extension des queues est caractérisée par une augmentation de l'extension maximale des particules D_{\max} et du rayon de giration R_g (Figure II.12.a).

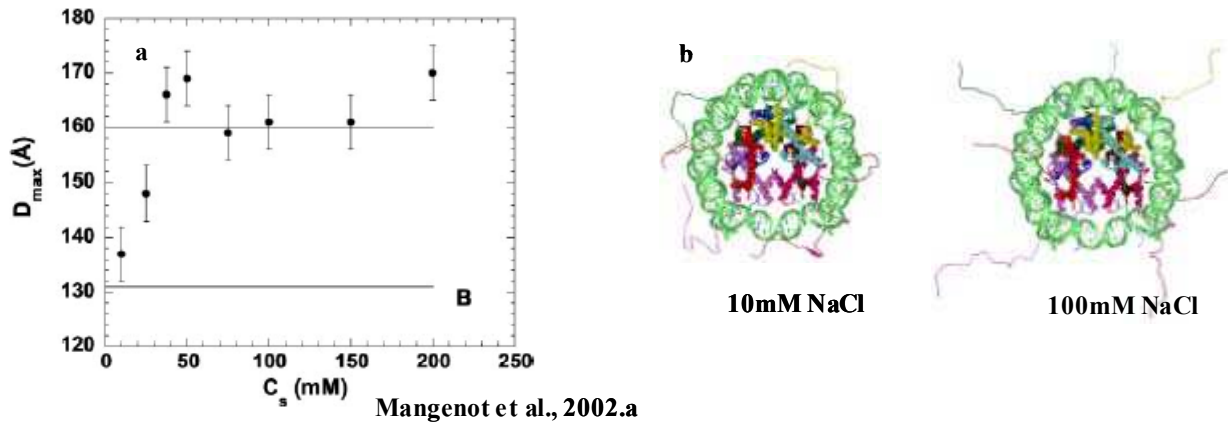


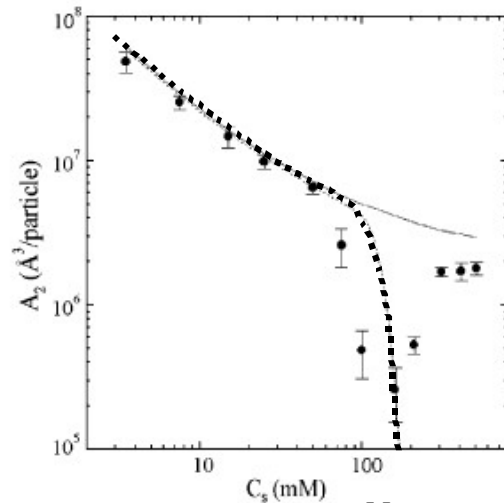
Figure II.12 Evolution de l'extension maximale D_{\max} des NCPs en fonction de la concentration en sels monovalents (a). Cette évolution du D_{\max} caractérise une extension des queues des histones à forte concentration saline(b).

Des mesures de second coefficient du viriel par pression osmotique montrent qu'entre 50 et 300mM en sels monovalents, une composante attractive se manifeste dans les interactions entre NCPs (Mangenot et al, 2002 b). Le second coefficient du viriel diminue à partir d'une concentration saline de 50mM en restant positif et réaugmente pour des concentrations salines supérieures à 160mM (Figure II.13).

Un potentiel DLVO dont la composante attractive est décrite par un potentiel de type Van der Waals ne permet pas de rendre compte de la croissance de A_2 pour des concentrations salines supérieures à 160mM (en pointillés sur la figure II.13). Puisque l'émergence de la composante attractive est simultanée au phénomène d'extension des queues d'histones (50mM en sel), Mangenot et al (2002.b) proposent que les queues d'histones sont responsables de cette composante attractive. Les auteurs supposent que l'attraction observée résulte d'un pontage par les queues d'histones entre particules. Ce pontage attractif est modélisé par un potentiel $V(r)$ attractif de Yukawa :

$$\frac{V(r)}{k_B T} = -\frac{\Omega 2a}{r} \exp\left(-\frac{(r-2a)}{D}\right) \quad (\text{II.29})$$

a est le rayon des NCPs. D est l'extension des queues d'histones et est déduit de la mesure d'extension maximale des particules par SAXS. Ω est la profondeur du potentiel et permet d'ajuster les valeurs expérimentales avec ce modèle.



Mangenot et al., 2002.b

Figure II.13 Variation du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en sels monovalents. Les points expérimentaux sont représentés par des ronds pleins. En pointillé sont représentées les valeurs de A_2 correspondant à un potentiel DLVO en présence d'un potentiel attractif de van der Waals. En trait continu, les valeurs de A_2 correspondant à des interactions essentiellement répulsives sont indiquées.

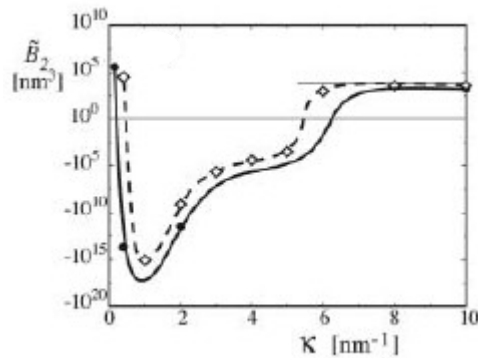
b. Modèles théoriques et simulations des interactions entre NCPs

Les expériences de Mangenot et al. (2002.a et b.) ont suscité un intérêt certain de la part de théoriciens. Des résultats théoriques ou de simulation récents sont rapportés ci-dessous. Dans le même temps, nous avons approfondi notre étude d'un pont de vue expérimental. Ces travaux expérimentaux sont reportés dans le chapitre IV.

Modèle théorique d'interaction entre sphères chargées

Boroudjerdi & Netz (2003 & 2005) ont considéré un modèle constitué d'une sphère chargée et d'un polyélectrolyte semi-flexible de charge opposée. La sphère est représentative de l'octamère d'histones et l'ADN qui s'enroule autour des histones est assimilé au polyélectrolyte. Ce modèle ne prend pas en considération les queues d'histone.

Ces auteurs considèrent les interactions entre deux complexes sphère-polyélectrolyte et construisent un diagramme de phase où, à courte distance entre deux complexes, un pontage attractif par le polyélectrolyte est observé. Le second coefficient du viriel entre deux complexes est calculé en fonction de κ , l'inverse de la longueur d'écrantage de Debye (Figure II.14). A très faible concentration saline (κ très faible), les répulsion prédominent et le second coefficient du viriel est positif. Pour des concentrations salines élevées, ($\kappa > 6\text{nm}^{-1}$) le second coefficient du viriel est égal à la valeur correspondant à des sphères dures. Il n'y a plus d'influence de l'électrostatique. Pour des concentrations salines intermédiaires, le second coefficient du viriel devient négatif et rend compte d'interactions attractives.



H. Boroudjerdi & R. Netz (2003, 2005)

Figure II.14 Second coefficient du viriel en fonction de κ calculé par Boroudjerdi & Netz pour des sphères dont la charge est égale à 100.

Modèles théoriques de sphères chargées : rôle des queues d'histone

R. Podgornik (2003) utilise un modèle théorique pour décrire les interactions de pontage par les queues d'histones. Ce modèle considère des macroions ponctuels chargés négativement sur lesquels sont greffés des chaînes de polyélectrolyte de charges opposées. Les chaînes de polyélectrolyte greffées représentent les queues d'histones. Sont prises en compte les interactions d'une chaîne de polyélectrolyte avec le macroion associé, les interactions de la chaîne avec elle-même, la rigidité de la chaîne et l'entropie de configuration de la chaîne. Les interactions électrostatiques sont traitées suivant le modèle de Debye-Hückel. Les équations sont résolues numériquement et distinguent deux régimes. Le régime à faible couplage est tel que la configuration est déterminée par les interactions électrostatiques intrinsèques aux chaînes de polyélectrolytes. Pour le régime à fort couplage, le champ extérieur domine la configuration statistique des chaînes. Dans les deux cas, l'évolution des interactions n'est pas monotone et dépend de la longueur des polyélectrolytes ainsi que de l'écrantage des interactions électrostatiques. On observe des interactions attractives de pontage. Néanmoins, l'auteur considère que ce modèle est perfectible et reste assez peu représentatif des conditions expérimentales.

Mülbacher et al. (2006) ont effectué des simulations de dynamique moléculaires pour mettre en évidence des interactions de pontage par les queues d'histones entre particules isolées. Leur modèle consiste en une sphère chargée sur laquelle sont greffées huit chaînes flexibles identiques représentant les huit queues d'histone. Les interactions électrostatiques sont décrites par un potentiel de type Debye-Hückel. Les répulsions à courte distance sont modélisées par un potentiel de Lennard-Jones où l'exposant n dans l'équation II.15 est égal à 12. La connectivité des chaînes greffées est représentée par un potentiel élastique non linéaire. La rotation des particules sur elles-mêmes est libre. A faible concentration saline, les "queues" sont repliées sur la sphère et lorsque l'écrantage augmente elles se décollent. Les interactions sont également évaluées et il apparaît que le second coefficient du viriel présente un minimum à la concentration saline où le dépliement des queues se produit. Ces simulations sont donc en bon accord avec les expériences de Manganot et al. (2002.a et b). De plus, des simulation sont effectuées où les queues flexibles sont substituées par des charges locales. Ces dernières simulations ne permettent pas de rendre

compte de l'attraction observée expérimentalement. Les auteurs attribuent donc la composante attractive des interactions à un pontage par ces queues flexibles.

Rôle des queues d'histone dans les interactions entre NCPs au sein d'une fibre de chromatine

Récemment, des simulations de type Monte Carlo ont évalué l'effet des queues d'histones sur les interactions entre nucléosomes en présence de sels monovalents dans une fibre de chromatine. Une fibre constituée de 12 nucléosomes est modélisée (Sun et al, 2005). Chaque nucléosome est représenté par une surface dont la forme et la distribution de charges sont restitués par un modèle DiSCO ("Discrete Charge Optimization") qui s'appuie sur la structure cristallographique 1KX5 (Davey et al., 2002). Cette surface est irrégulière, comporte 300 charges effectives et tient compte de la présence des queues d'histones. Les interactions électrostatiques sont calculées à l'aide d'un modèle de type Debye-Hückel. En plus de l'analyse des différentes configurations de repliement de la fibre qui ne sera pas abordée ici, les énergies d'interaction électrostatiques entre nucléosomes sont évaluées. En particulier, cette énergie est calculée pour des configurations où certaines des queues d'histones seraient absentes. L'absence des queues est modélisée en neutralisant localement sur la surface les charges correspondant à ces queues. Les queues d'histones apparaissent nécessaires aux interactions attractives. De plus, la queue d'histone H3 semble apporter une plus grande contribution à l'établissement des interactions attractives électrostatiques entre nucléosomes et entre ADN de liaison et nucléosomes.

2. Phases denses de NCPs

a. Cristaux de NCPs

Les structures cristallographiques de nucléosome évoquées dans le chapitre I sont obtenues par diffraction des rayons X sur des monocristaux de NCPs. Ces cristaux sont obtenus dans des conditions ioniques particulières et la présence d'ions divalent et plus particulièrement de manganèse est nécessaire. Par exemple, les cristaux de NCPs utilisés pour obtenir la structure 1KX5 ont été équilibrés contre 40-46mM de $MnCl_2$, 30-40mM de KCl et 10-20mM de cacodylate de potassium à pH 6.

Les cristaux de NCPs sont tous organisés dans un réseau orthorhombique de groupe d'espace $P2_12_12_1$.

La figure II.15 représente schématiquement la maille orthorhombique dans laquelle cristallisent les NCPs ainsi que les axes cristallographiques a, b et c tels que nous les avons choisis pour comparer les différentes données expérimentales. L'orientation de ces axes est tel que le définit Luger et al. (1997).

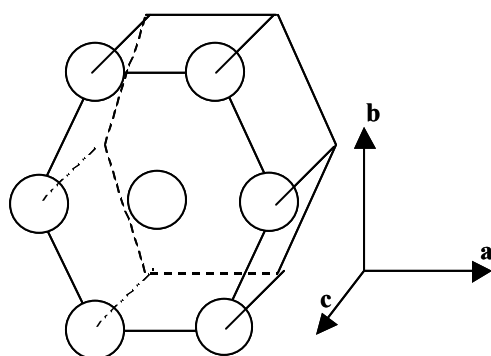


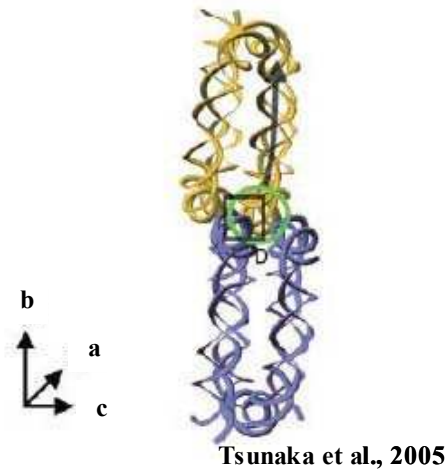
Figure II.15 Réseau orthorhombique dans lequel cristallisent les NCPs.

Suivant la nature de l'ADN et des histones constituant les NCPs les paramètres de maille des cristaux peuvent légèrement varier et sont regroupés dans le tableau II.2.

Fichier PDB	1AOI	1KX3	1KX4	1KX5	1EQZ	1ID3	1F66	2CV5	
Référence	Luger et al., 1997	Davey et al., 2002	Davey et al., 2002	Davey et al., 2002	Harp et al., 2000	White et al., 2001	Suto et al., 2000	Tsunaka et al., 2005	
Histones	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>	poulet	levure	<i>xenopus laevis</i> sauf H2AZ (souris)	homme	
ADN α -satellite humain	146pb	146pb	146pb	147pb	146pb	146pb	146pb	146pb	
Paramètres de maille (Å)	a	106.4	105.4	105.3	105.95	105.28	104.4	105.7	99.6
	b	181.78	181.54	176.69	181.17	181.12	192.6	183.2	169.4
	c	110.12	109.6	109.53	109.49	109.71	110.4	109.9	108.4

Tableau II.2 Paramètres de maille des cristaux de NCPs

L'agencement de NCPs les unes par rapport aux autres peut également être différent d'un type de NCPs à un autre. Suivant l'axe *c*, parallèle à l'axe de la superhélice, les NCPs s'empilent les unes au dessus des autres en étant plus ou moins décalées. Dans la structure 1AOI, pour des histones de *Xenopus laevis*, les NCPs sont quasiment superposées suivant la direction *c*. Par contre, pour les histones de levure, les NCPs sont décalées de 20Å par rapport à cet axe. Les paramètres de maille des cristaux de NCPs humains (Tsunaka et al., 2005) sont plus faibles que pour les autres structures. En effet, les molécules d'ADN de deux nucléosomes superposés s'interpénètrent (Figure II.16). Ainsi les paramètres de maille suivant les axes cristallographiques *b* et *a* sont réduits.



Tsunaka et al., 2005

Figure II.16 Points de contact entre deux NCPs dans un cristal de NCPs.

b. Condensation de NCPs en présence d'ions monovalents

Diagramme de phase

Par pression de PEG sur une solution de NCPs, il est possible d'organiser les NCPs en phases denses (§ A.1.e). Mangenot et al, 2003 ont fait varier les concentrations en NCPs ainsi que les concentrations en ions monovalents afin d'obtenir un diagramme de phase des NCPs en présence d'ions monovalents (Figure II.17). La caractérisation des différentes phases a été effectuée par des méthodes de diffraction des rayons X (Mangenot et al., 2004), de cryomicroscopie électronique, de cryofracture et par des observations en microscopie optique.

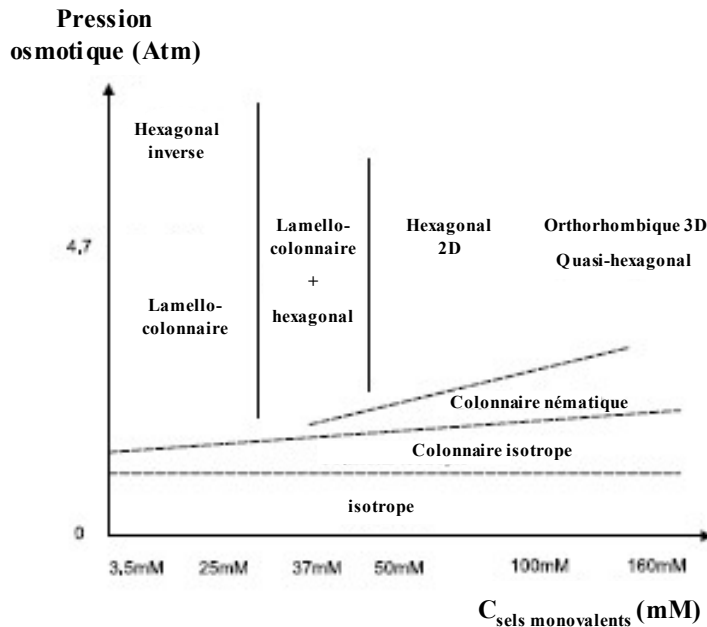


Figure II.17 Diagramme de phase des NCPs en présence d'ions monovalents

A faibles concentrations en nucléosomes, les particules sont réparties de manière isotrope en solution. Lorsque la densité en NCPs croît, les nucléosomes s'empilent les uns sur les autres et

forment des colonnes. Pour des pressions relativement élevées, ces colonnes s'organisent en des phases denses. A faible force ionique, une phase lamello-colonnaire et une phase hexagonale inverse sont observées. Pour des concentrations salines plus élevées, des phases hexagonales 2D et orthorhombiques 3D sont obtenues. La formation de chaque phase nécessite des temps d'équilibration très longs pouvant atteindre plusieurs mois voire plusieurs années.

Phase lamellaire

Pour des concentrations salines comprises entre 3.5mM et 25mM et des pressions entre 3 et 25 atmosphères, la phase lamello-colonnaire est observée (Figure II.18.a.). Des double couches de colonnes de NCPs sont séparées par une couche de solvant et forment une structure lamellaire (Figure II.18.a.1). La distance inter-lamellaire varie entre 376 et 358Å. La concentration en nucléosomes y est évaluée à 280-320mg.mL⁻¹.

En microscopie optique, des tubes isolés (Figure II.18.a.3) sont observés pour des pressions comprises entre 3 et 5atm. Lorsque les pressions atteignent 5-10atm, les tubes sont plus courts et des tubes supplémentaires apparaissent à chaque extrémité. Entre 15 et 25atm, des sphérulites (Figure III.18.a.4) sont formées.

Les NCPs ne sont pas orientées aléatoirement au sein des colonnes. Des cryo-coupes perpendiculaires aux colonnes de ces phases denses permettent de déterminer l'orientation des NCPs (Figure II.18.a.2). Pour chaque NCP, l'ADN entrant / sortant fait face au solvant. Leforestier et al., (2001) ont proposé que les queues d'histone H2B, située du côté opposé à l'ADN entrant / sortant établirait des interactions attractives entre nucléosomes. Ces queues seraient responsables de la formation et de la cohésion de ces phases lamello-colonnaires.

Phase colonnaire hexagonale inverse

Dans des conditions de faibles concentrations ioniques mais pour des pressions élevées (>25atm), les bicouches forment un réseau hexagonal (Figure II.18.b.1). La concentration en nucléosomes y est comprise entre 320 et 420mg.mL⁻¹. En microscopie optique, ces phases sont caractérisées par des bâtonnets rigides biréfringents (Figure II.18.b.3). Des images de répliques obtenues après cryofractures dans un plan normal aux colonnes mettent en évidence cette organisation hexagonale (Figure II.18.b.2).

Phase orthorhombique 3D

Pour des concentrations salines comprises entre 50 et 160mM, et des pressions variant entre 4.7 et 13atm, des cristaux sont mis en évidence par diffraction des rayons X. Les NCPs y sont organisées comme dans les monocristaux formés en présence d'ions divalents et utilisés pour résoudre les structures cristallographiques. Suivant les concentrations en PEG, les paramètres du groupe d'espace orthorhombique a , b et c varient respectivement de 115.4Å, 203.6Å et 119.0Å à 110.1Å, 194.0Å et 112.7Å.

Phase hexagonale 2D

Dans des conditions ioniques et de stress osmotique qui sont nécessaires à la formation des cristaux orthorhombiques, les NCPs peuvent s'ordonner en des phases hexagonales à deux

dimensions. La formation de phases orthorhombiques ou hexagonales 2D dépend des concentrations initiales en nucléosomes. Dans ces deux types d'organisation, les concentrations finales en NCPs varient entre 500 et 610 mg.mL⁻¹. Les phases hexagonales à deux dimensions sont caractérisées par un agencement latéral hexagonal des colonnes (Figure II.18.c.1). Ces phases ne présentent pas de corrélation entre l'organisation longitudinale des NCPs dans les colonnes et la distribution latérale des colonnes. En microscopie optique, des textures typiquement hexagonales ainsi que des germes hexagonaux en forme de fleurs sont visualisés (Figure II.18.c.2 et 3).

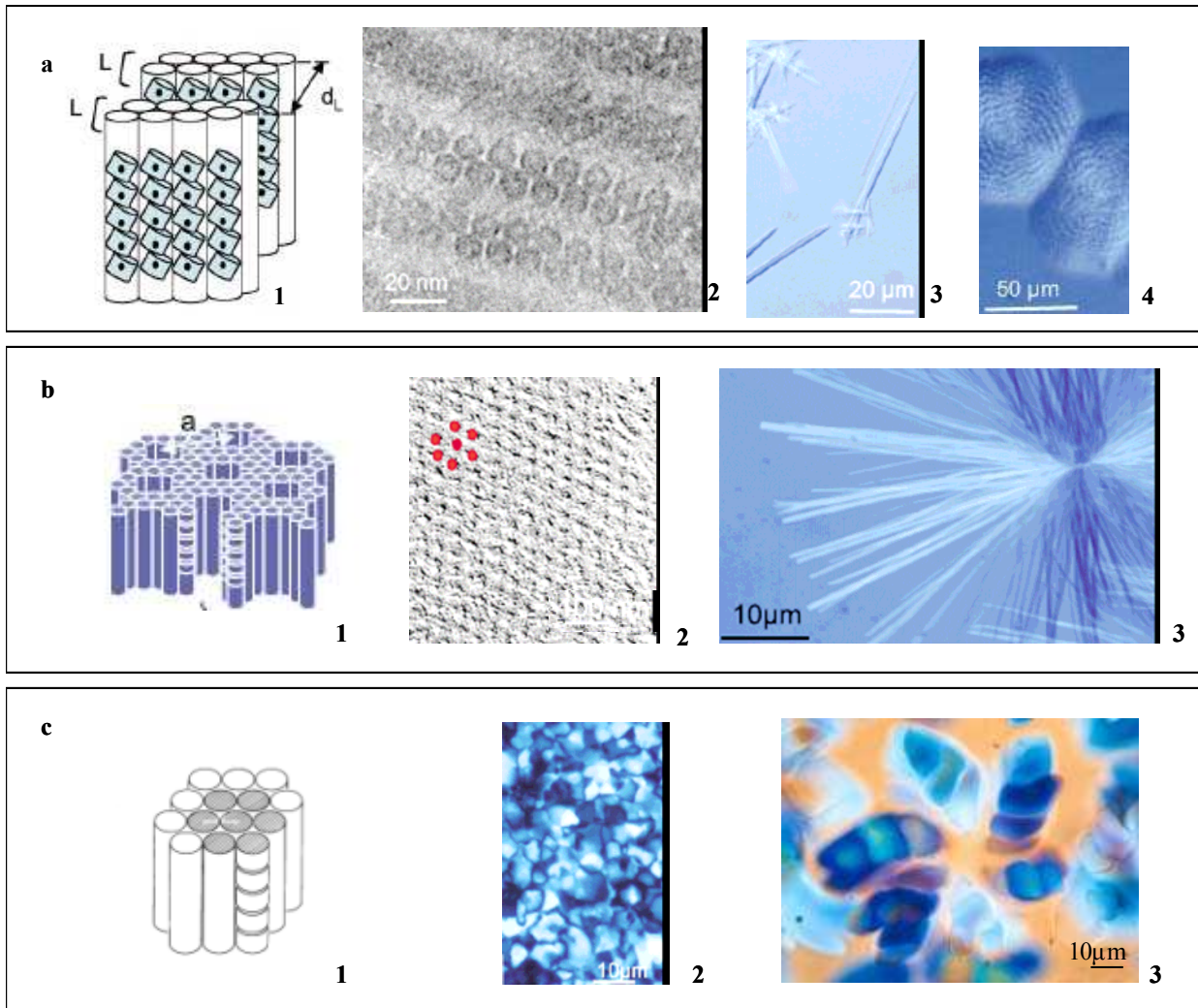


Figure II.18 Phases denses de NCPs observées en présence d'ions monovalents.

a Phase lamello-colonnaire. 1. Représentation schématique. 2. Cryo-coupe normale aux colonnes. 3. Tubes observés au microscope optique en contraste de Nomarski. 4 Sphérulites observées en Nomarski.

b Phase hexagonale inverse. 1. Représentation schématique. 2. Réplique d'une cryofracture perpendiculaire aux colonnes. 3. Observation au microscope polarisant.

c Phase hexagonale 2D. 1. Représentation schématique. 2. Texture hexagonale observée au microscope polarisant. 3. Germe hexagonal à 6 branches observé au microscope polarisant.

c. Phases denses de NCPs agrégées par de la spermidine³⁺

Le diagramme de phase de NCPs précipitées par la spermidine³⁺ n'a pas été établi. Seule la structure des agrégats formés en présence de spermidine³⁺ a été étudiée par des méthodes de cryomicroscopie électronique et de microscopie optique (Leforestier et al., 1999). Ces travaux mettent en évidence différentes phases denses plus ou moins ordonnées (Figure II.19). Des solutions isotropes de NCPs, des solutions de colonnes de NCPs désordonnées ou orientées en moyenne parallèlement les unes aux autres pour former des phases nématiques sont mises en évidence. Une phase colonnaire hexagonale est également observée où la distance entre colonnes varie entre 10.9 et 11.8nm et la distance entre nucléosomes dans les colonnes est comprise entre 6.15 et 6.7nm. Les phases hexagonales colonnaires ne sont observées qu'à faible concentration en spermidine³⁺ (2-10mM).

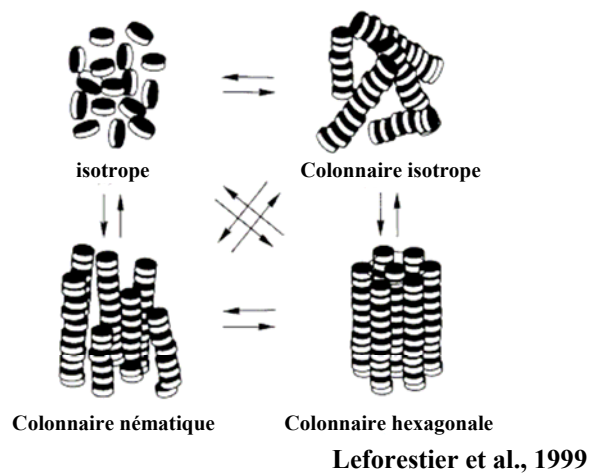


Figure II.19 Phases formées par les NCPs en présence de spermidine³⁺.

CONCLUSIONS du chapitre II.

- Les Particules cœur de NCPs ont été assimilées à des colloïdes chargés.
- Les bases physiques utiles pour la compréhension des interactions entre NCPs et de leur agrégation par des ions multivalents ont été présentées.
- Les résultats déjà acquis et relatifs aux interactions entre NCPs et à leur condensation dans différentes conditions ont été exposés :
 - ◇ La conformation des NCPs en solution diluée dépend de la concentration en sels monovalents. Une extension des queues d'histone est observée à forte concentration saline.
 - ◇ Les queues des histones semblent jouer un rôle dans la composante attractive des interactions observée au-delà d'une concentration seuil en ions monovalents.
 - ◇ En présence d'ions monovalents et sous stress osmotique, des phases denses organisées de NCPs se forment.
 - ◇ Sans stress osmotique, les NCPs peuvent être précipités par des cations de valence supérieure à deux et former des phases denses ordonnées.

Objectifs de la thèse.

● Nous tenterons d'apporter des éléments pour la compréhension des mécanismes électrostatiques qui contrôlent les interactions au sein de la chromatine ainsi que son organisation. Pour cela, nous utilisons un système modèle, la particule cœur de nucléosome. Les propriétés électrostatiques d'une solution des NCPs peuvent être modulées soit en altérant les charges intrinsèques des particules par suppression de queues d'histones soit en modifiant l'environnement ionique en solution par l'ajout, notamment d'ions multivalents.

◇ Les différents choix effectués et problèmes rencontrés pour modifier les charges des particules par suppression des queues d'histones font l'objet du **chapitre III**.

◇ Dans le **chapitre IV**, nous montrerons que les queues d'histones, et plus particulièrement celles des histones H3 et H4, sont essentielles pour maintenir la conformation des NCPs en solution ainsi que pour établir des interactions attractives entre particules.

◇ L'effet d'ions multivalents sur les interactions entre NCPs et leur organisation en phases denses sera présenté dans le **chapitre V**.

◇ Dans le **chapitre VI**, l'organisation des NCPs condensés par stress osmotique et l'effet des queues d'histones dans la formation de ces phases denses sera présenté.

Chapitre III

Préparation de
Particules Cœur de
Nucléosome natives ou
recombinantes:
Caractérisation et
stabilité des particules

Introduction

Avant mon arrivée au laboratoire, les particules cœur de nucléosome étaient exclusivement préparées soit à partir de thymus de veau soit de sang de poulet. Suivant les conditions de préparation et notamment les quantités d'enzymes mises en œuvre, la qualité des échantillons peut varier, principalement en terme de polydispersité. Ces particules natives restent néanmoins appropriées pour certaines expériences. Elles ont permis de répondre pertinemment à certaines des questions formulées dans le cadre de ma thèse. Par ailleurs, ce mode de préparation a l'avantage de ne pas être limitant par rapport aux quantités de matériel biologique.

J'ai insisté dans les chapitres précédents sur le rôle prépondérant des queues d'histones tant dans la structure que dans la fonction de la chromatine. Nous avons donc dans un premier temps, testé le rôle des queues d'histones en les éliminant totalement par trypsinisation sur des NCPs natives. Afin de connaître leur rôle plus précisément et plus finement, il nous a semblé opportun de pouvoir effectuer des reconstitutions de nucléosomes à partir de combinaisons variables d'histones recombinantes entières ou tronquées de leur extrémités N et C terminales (les queues). En plus d'être monodisperses, ces NCPs recombinantes ne présentent pas de modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation...) qui ne peuvent être totalement exclues dans le cas de particules natives.

Ces techniques de production d'ADN et d'histones recombinants puis de reconstitution en nucléosomes sont parfaitement maîtrisées dans le laboratoire de Karolin Luger (Fort Collins, Colorado State University, Etats-Unis). J'y ai été accueillie un mois, en Novembre 2002 dans le but de me former à ces techniques puis de les introduire dans notre laboratoire. K. Luger m'a également fourni les souches de bactéries *E. Coli* ainsi que les plasmides permettant la production d'ADN et d'histones recombinantes.

Ce chapitre est consacré, dans un premier temps, à une description des méthodes de préparation des particules cœur de nucléosome natives ou reconstituées, avec ou sans queues. Les problèmes de positionnement de l'ADN autour du cœur protéique seront ensuite abordés. Le rôle des queues d'histones dans la reconstitution des NCPs ainsi que dans leur stabilité sera enfin exposé.

A. Préparation et Caractérisation des particules cœur de nucléosome : deux approches.

1 Purification à partir de chromatine de thymus de veau

a. Préparation

Afin d'éviter toute dégradation des protéines, nous nous sommes procurés les thymus de veau, "frais", directement aux abattoirs. Ils ont été soit traités directement soit conservés à -80°C. Après préparation de noyaux cellulaires de thymus, une première digestion grossière de la chromatine à la nucléase de microcoque (Amersham Bioscience) est effectuée. Les histones H1 sont extraites de la chromatine par une résine échangeuse d'ions (CM-Séphadex 50-120). Les NCPs sont ensuite obtenues par digestion contrôlée de l'ADN de liaison à l'aide de nucléase de

microcoque (Amersham). Les NCPs (resuspendues dans un tampon Tris-HCl 10mM pH7,5 contenant NaCl 150mM, EDTA 1mM et PMSF 0.1mM) sont ensuite purifiées par passage sur colonne de chromatographie (exclusion de taille séphacryl S 300 ou S200, Amersham). Les dinucléosomes très minoritaires en solution sont alors éliminés. Les NCPs sont dialysées contre un tampon TE (Tris-HCl pH 7.6, EDTA) et concentrées par ultrafiltration jusqu'à 200mg.mL⁻¹ au moins. Les NCPs peuvent ainsi être conservées plusieurs mois dans la glace. Le protocole expérimental est détaillée dans l'annexe III.1.

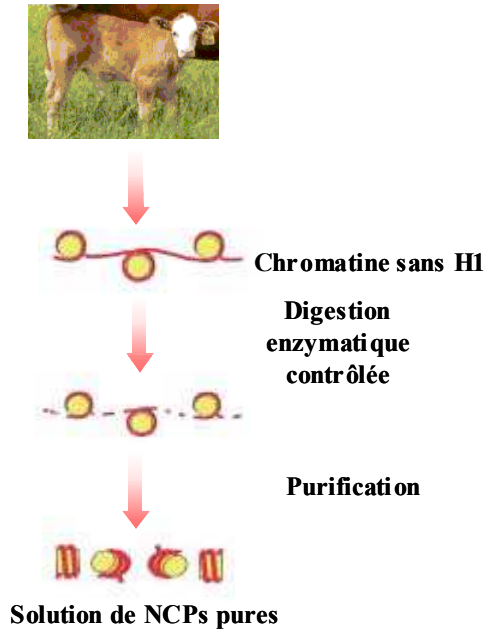


Figure III.1 : Préparation des particules coeur de nucléosome à partir de thymus de veau. Le thymus de veau est riche en noyaux à partir desquels la chromatine est extraite. Les nucléosomes sont obtenus après digestion de la chromatine à la nucléase de microcoque.

b. Caractérisation des lots de particules cœur de nucléosomes utilisés

Les NCPs du lot noté I sont extensivement décrites dans le chapitre IV (§A.1). C'est pourquoi, leurs caractéristiques ne seront pas précisément présentées dans ce paragraphe.

Cohésion des nucléosomes

Il convient de vérifier l'absence de dissociation des nucléosomes. En effet, la présence d'ADN libre est susceptible d'interférer dans le déroulement et l'interprétation des expériences. Pour cela des électrophorèses non dénaturantes ou "gels retards" sont utilisées (cf. figure III.3).

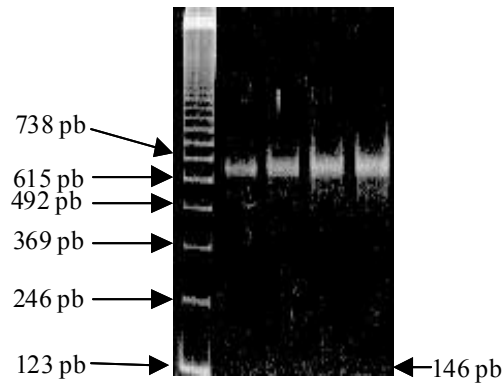


Figure III.3. Electrophorèse retard de NCPs sur gel d'acrylamide concentré à 7.5% pour des quantités croissantes en nucléosomes. On ne détecte pas d'ADN libre dissocié.

Longueur d'ADN

La nucléase de miccorocoque élimine l'ADN de liaison tout en conservant intactes les 146 paires de bases protégées par leur enroulement autour de l'octamère d'histones. L'ADN associé aux histones peut donc présenter des longueurs et des polydispersités variables suivant les quantités d'enzyme et les temps mis en œuvre au cours de la digestion. La qualité des NCPs, en termes de polydispersité, est choisie en fonction des expériences envisagées.

La longueur d'ADN associée aux histones est évaluée par des électrophorèses sur gel de polyacrylamide concentrés à 12%. Il est possible d'obtenir des NCPs dont l'ADN nucléosomal comporte 146 ± 3 pb (cf. figure III.2, lot I). Les longueurs d'ADN des NCPs des différents lots utilisés au cours de cette thèse sont représentées et évaluées sur la figure III.2. Les profils de distribution présentés sur la figure III.2, même s'ils ne sont pas symétriques, permettent d'estimer des longueurs moyennes ainsi que la polydispersité de l'ADN nucléosomal. Le lot I présente une longueur d'ADN de 146 ± 3 pb. Les lots de NCPs notés A et D sont similaires avec une longueur de 155 ± 20 pb. Le lot de NCPs B a une longueur d'ADN associé de 147 ± 15 pb. Enfin 146 ± 10 pb d'ADN sont associées au lot de NCPs C. Ces longueurs restent approximatives puisque la coloration des gels d'acrylamide au BET reste plus qualitative que quantitative. Cependant, la qualité relative des différentes préparations en termes de longueur et polydispersité d'ADN peut être comparée.

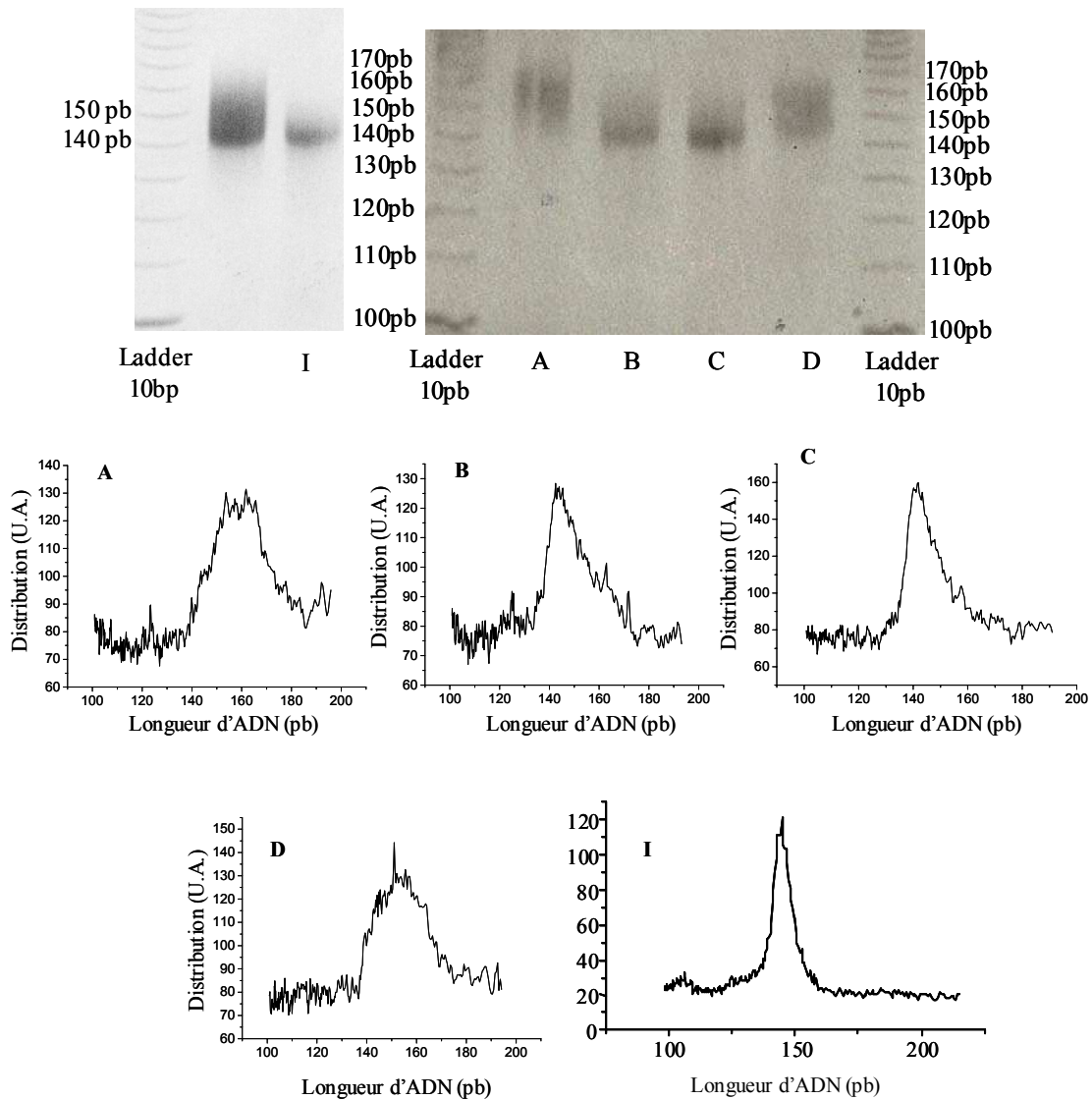


Figure III.2 Electrophorèses et profils de distribution des différents lots d'ADN des NCPs utilisés au cours de cette thèse. Gel à 12% en acrylamide, migration 15 heures.

Lot I : NCPs utilisées pour les expériences de SAXS.

Lot A : NCPs utilisées pour les expériences de précipitation à la spermidine (chapitres V et VI).

Lot B : NCPs utilisées dans le cadre des expériences réalisées en présence d'ATP.

Lot C : NCPs utilisées pour former des phases denses dans des capillaires plats.

Lot D : NCPs utilisées pour les expériences de précipitation au magnésium (chapitres V et VI).

Qualité des histones

La composition en histones est déterminée par des électrophorèses dénaturantes SDS-PAGE à 18% (Figure III.4.a). Des contrôles sont également réalisés au cours des expériences pour vérifier l'absence de dégradations éventuelles. Les quatre histones doivent être présentes en proportions stoechiométriques.

Une fraction des NCPs du lot I a été traitée à la trypsine (§IV.A.1) afin d'éliminer les queues des histones. Différentes enzymes sont susceptibles de supprimer des queues d'histone et

possèdent une activité plus ou moins spécifique. La clostripaïne permet d'éliminer les extrémités N terminales de H3 et H4 sous certaines conditions (Encontre et Parello, 1988). Notre choix s'est porté sur la trypsine, utilisée couramment dans la littérature. Cette enzyme hydrolyse la liaison peptidique du côté C terminal des résidus basiques (arginine et lysine). Les "queues" des histones, particulièrement riches en lysines et arginines, sont donc totalement éliminées sous l'action de la trypsine alors que le cœur protéique structuré et protégé reste intact.

Sur la figure III.4.b, on constate que les histones résultantes ont des poids moléculaires plus faibles que celles des NCPs intacts. Le détail de l'identification des peptides obtenus après trypsinisation est donné dans le tableau III.1 et discuté dans le paragraphe IV.A.1.

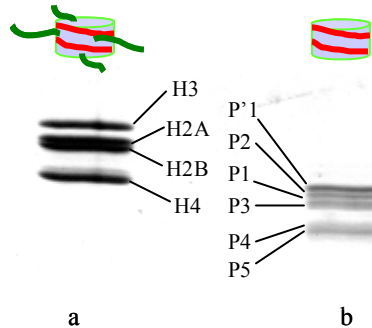


Figure III.4. Caractérisation des histones intactes et trypsinisées par des électrophorèses sur gel d'acrylamide à 18%. Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie. Pour les nucléosomes intacts, 4 bandes sont obtenues correspondant aux 4 histones intactes. Pour les nucléosomes trypsinisés, 6 bandes sont observées.

Histone	Nombre d'a.a.	Nombre d'a.a. après trypsinisation (avec leur position dans la séquence initiale)	Dénomination des peptides d'histones obtenus
H2A	129	107 (12-118)	P2
H2B	125	102 (24-125)	P3
H3	135	103 (27-129) 115 (21-135)	P1 P'1
H4	102	85 (18-102) 83 (20-102)	P4 P5

Tableau III.1. Identification et dénomination des peptides obtenus après trypsinisation.

Six bandes majoritaires sont obtenues pour les histones, après trypsinisation. Au dessus de ces 6 bandes majoritaires, des bandes d'intensité mineure (observées lors de dépôt d'un excès de matériel biologique) sont présentes. Il persiste donc de manière minoritaire des peptides de poids moléculaire plus élevé et dont la fraction, par rapport aux peptides totalement digérés, n'excède pas 5%. Ce faible pourcentage déterminé par des coloration à l'argent, plus sensibles que la coloration au bleu de Coomassie, permet d'effectuer les expériences envisagées.

2 Reconstitution de particules cœur de nucléosome à partir d'histones et d'ADN recombinants.

Pour certaines expériences, nous avons décidé d'utiliser des NCPs parfaitement monodisperses. Pour cela, nous avons reconstitués des particules à partir d'ADN et d'histones recombinants. Ainsi, en exprimant des histones entières et des histones sans queues il est possible d'obtenir, en théorie, des NCPs présentant de multiples combinaisons en terme de présence ou d'absence de queues. Le principe général de préparation de particules cœur de nucléosome recombinants est présentée sur la figure III.5 et est décrit par Dyer et al.(2004).

Nous présentons ci-dessous les méthodes utilisées pour la production d'ADN et d'histones recombinants et leur reconstruction en NCPs. Les particules obtenues sont caractérisées de manière exhaustive dans l'article du paragraphe suivant (§B.1).

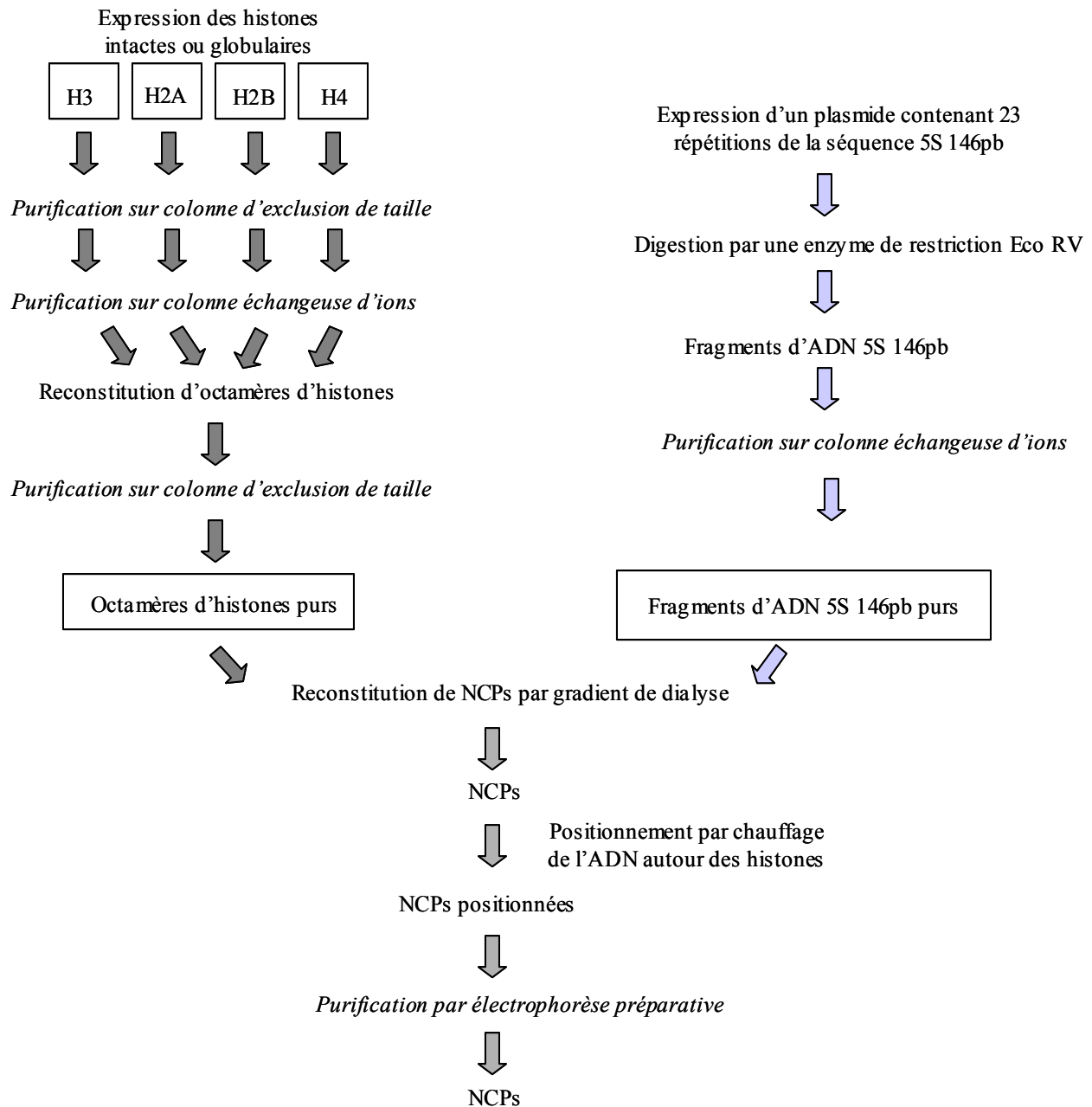


Figure III.5. Principe de reconstitution des NCPs à partir d'ADN et d'histones recombinants.

a Production et purification d'ADN 5S.

La séquence de 146 paires de bases que nous utilisons est celle du gène de l'ARN 5S de l'oursin de mer *Lytechinus variegatus*. Cette séquence d'ADN a été clonée en de multiples copies dans un plasmide pUC9 pour constituer le plasmide pTJR2 (Richmond et al., 1988 et Figure III.6.a). Les fragments d'ADN 5S 146pb sont La séquence d'ADN 5S (Figure III.6.b) est l'une des séquences naturelles les plus positionnantes pour la formation de NCPs (Chapitre I). La préparation de cet ADN de 146 paires de bases est décrite précisément dans l'annexe III.2.

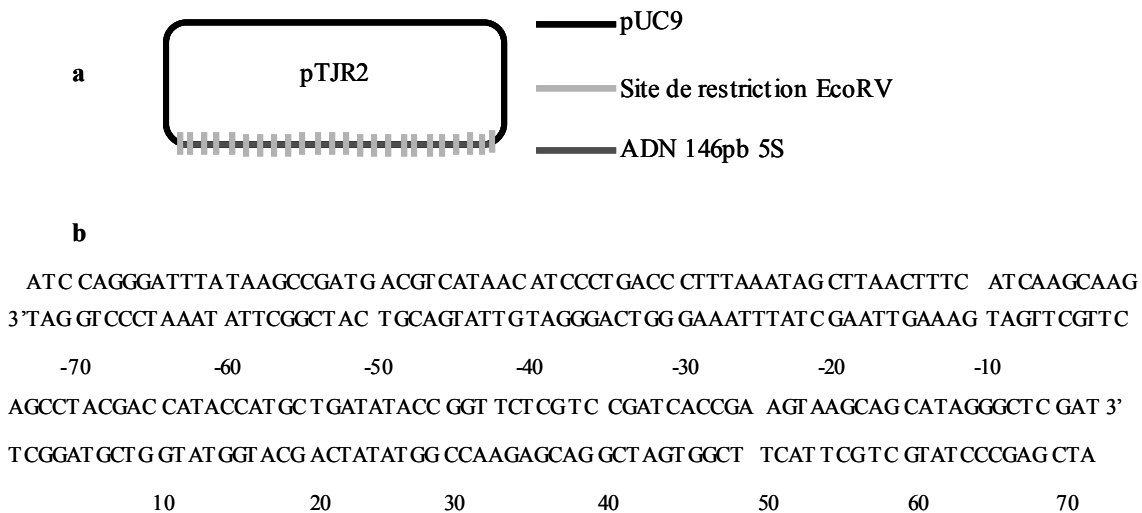


Figure III.6 Description du plasmide pTJR2 (a) et séquence de l'ADN 5S (b).

Les différentes étapes d'amplification et de purification du plasmide pTJR2 sont représentées schématiquement sur la figure III.7. Des bactéries *E.coli* HB101 sont transformées par le plasmide pTJR2 (étape 1 sur la figure III.7). Le plasmide pTJR2 est amplifié dans des bactéries *E.Coli* HB101 (étape 2 sur la figure III.7). Le plasmide est ensuite isolé par la méthode de lyse alcaline qui sépare les molécules de faibles poids moléculaires (ADN plasmidique, protéines et ARN) des macromolécules des haut poids moléculaire (ADN chromosomal) (étape 3 sur la figure III.7). Les protéines sont, par la suite, éliminées par extraction au phénol chloroforme et l'ARN digéré sous l'action de ribonucléases (étape 4 sur la figure III.7).

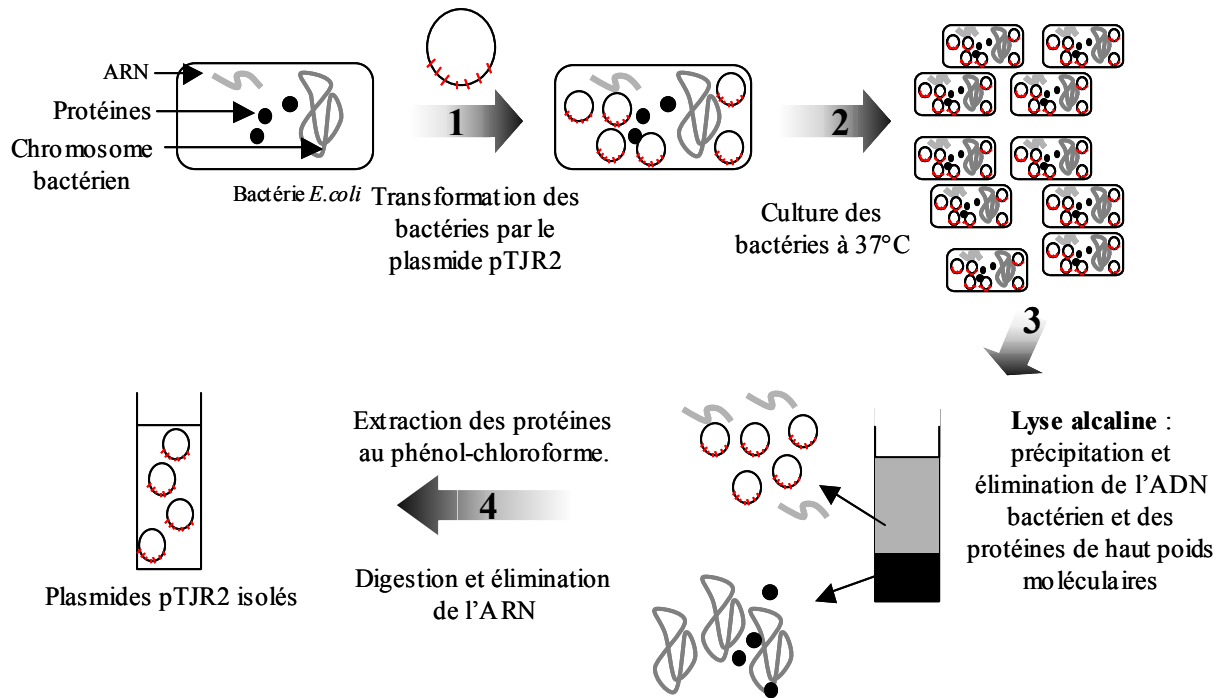


Figure III.7 Représentation schématique Etapes de purification du plasmide pTJR2.

Les fragments de 146 pb sont obtenus par digestion par les enzymes de restriction ECO RV (New England Biolabs) ou ECO 321 (Fermentas) (Figure III.8). Ces enzymes agissent au niveau d'un site de restriction ECORV présent entre chaque monomère de 146pb. Le vecteur pUC9 ne possède pas de site de restriction ECO RV. Deux types de fragments d'ADN résultent de la digestion : la séquence 5s de 146 pb et le vecteur pUC9 linéarisé de 2665 pb. Le long fragment d'ADN peut être sélectivement précipité par une solution de PEG 6%. Le surnageant contient exclusivement de l'ADN "5S" de 146 pb. Une dernière étape de purification sur colonne échangeuse d'anions DEAE-5PW (Tosohaas) permet d'éliminer l'enzyme ECO RV qui subsiste en solution. Pour chaque préparation, environ 10 mg d'ADN 5S parfaitement défini sont obtenus à partir de trois litres de milieu de culture.

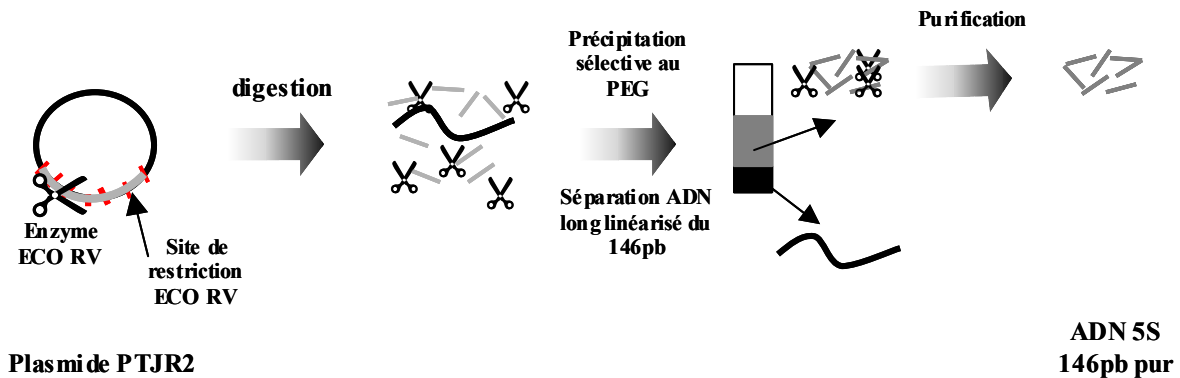


Figure III.8 Obtention et purification d'ADN 5S.

b Production et purification d'histones intactes ou globulaires recombinantes

Les gènes codant pour les différentes histones entières ou globulaires ont été clonées dans des plasmides pet 3a et pet 3d (Luger et al., 1997). Les huit plasmides nous ont été donnés par Karolin Luger. Les histones sont produites soit entières soit tronquées de leurs extrémités N et C-terminales. Dans la suite du manuscrit, les histones sans queues seront qualifiées de globulaires et sont constituées par les portions des séquences protéiques structurées en hélices α . Le protocole de production et de purification des histones est détaillée dans l'annexe II.3. Les séquences détaillées de chaque histone sont données ci-dessous (Figure III.9).

H2A (a.a. 1-128)

SGRGKQGGKTRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYL
AAVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGRVTIAQGGVLPNI
QSVLLPKKTESSKSAKSK

gH2A (a.a. 13-117)

MKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLA VLEYLTAEI
LELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAVRNDEELNKLGRVTIAQGGVLPNIQSVLLPK

H2B (a.a. 1-122)

AKSAPAPKKGSKKAVTKTQKKGKRRKTRKESYAIYVYKVLKQVHPDTGI
SSKAMSIMNSFVNDVFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEG
TKAVTKYTSK

gH2B (a.a. 24-122)

MKKRRKTRKESYAIYVYKVLKQVHPDTGISSKAMSIMNSFVNDVFERIAGEA
SRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSK

H3 (a.a. 1-135)

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREI
RRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEASEAYLVALFEDTNLCA
IHAKRVTIMPKDIQLARRIGERA

gH3 (a.a. 27-135)

MKCAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQD
FKTDLRFQSSAVMALQEASEAYLVALFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIGERA

H4 (a.a. 1-102)

SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLDRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIY
EETRGLVKVFLENVIRDAVYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRPLYGFGG

gH4 (a.a. 20-102)

MKVLDRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGLVKVFLENVIRDAVY
TEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRPLYGFGG

Figure III.9 Séquences des histones entières et globulaires.

Les histones sont surexprimées individuellement par des bactéries *Escherichia coli* BL21(DE3)pLys S sous forme de corps d'inclusion. Après traitement et solubilisation des corps d'inclusion, les histones sont purifiées par chromatographie d'exclusion de taille (Séphacryl S200

(Amersham)) puis sur une résine échangeuse de cations (TSK SP-5PW (Tosohaas)). Ces histones sont ensuite dialysées dans de l'eau et du β -mercaptoéthanol, aliquotées, lyophilisées et conservées à -20°C . Pour chaque préparation, environ 100 à 150mg d'histones sont obtenues. Néanmoins, le rendement constaté pour les histones globulaires et plus particulièrement pour gH4 est plus faible.

La pureté de chaque histone est vérifiée par électrophorèse des protéines sur gel SDS-PAGE à 18% en acrylamide (§ B.1) et par des expériences de spectrométrie de masse réalisées dans le laboratoire de chimie des protéines de M. Pierre le Maréchal à l'IBBMC (Orsay).

Les spectres de masse sont regroupés dans l'annexe II.4 et attestent de la qualité des histones produites. Les masses sont détaillées dans le paragraphe B.1.

Le protocole de Karolin Luger (Dyer et al, 2004) préconise l'emploi d'un réducteur (β -mercaptoéthanol) pour éviter la formation de ponts disulfure au niveau des cystéines des histones H3 ou gH3. Nous avons constaté la formation d'une liaison covalente entre le β -mercaptoéthanol et le soufre des cystéines de H3 et gH3 qui entrave une reconstitution correcte des histones en octamère (Figure III.10.a). Nous avons donc décidé de substituer le β -mercaptoéthanol par un autre réducteur, le DTT qui a l'avantage d'éliminer cet adduit (Figure III.10.b) et de favoriser ainsi la reconstitution du complexe protéique.

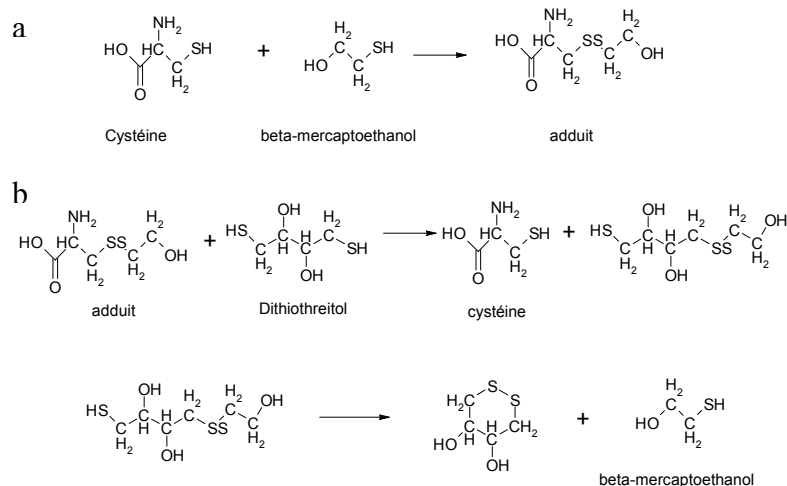


Figure III.10 a Formation d'adduit de β -mercaptoéthanol sur les cystéines. b Action du DTT sur les adduits de β -mercaptoéthanol

c. Reconstitution d'octamères d'histones et de nucléosomes.

Reconstituer des nucléosomes à partir d'ADN chargé négativement et d'histones de charge globale opposée implique une influence importante de l'environnement ionique et des interactions électrostatiques. Dans un premier temps, l'octamère est reformé à partir des quatre types protéiques puis l'ADN est ajouté pour reconstituer la NCP complète.

Reconstitution d'octamères d'histones

Les histones lyophilisées sont resuspendues dans un tampon dénaturant à base de guanidinium 7M. Les 4 types d'histones sont mélangées dans des proportions stoechiométriques

et mises à dialyser dans un tampon de concentration saline élevée (2M en NaCl). En effet, les histones sont globalement chargées positivement et il est nécessaire d'écranter totalement les répulsions électrostatiques pour obtenir un complexe stable.

Après dialyse, on obtient majoritairement l'octamère d'histones mais également des dimères H2A-H2B, des tétramères H3-H4 et éventuellement des agrégats. Ces agrégats sont plus nombreux lorsqu'on utilise des histones globulaires. Il est donc nécessaire de purifier l'octamère protéique obtenu par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne de chromatographie (Superdex 200 (Amersham)). La fraction pure d'octamère contenant les quatre histones dans un rapport stoechiométrique est concentrée par ultrafiltration sur "vivaspine" (Vivascience) et conservée à 4°C. Par électrophorèse dénaturante SDS-PAGE, composition et stoechiométrie des octamères sont vérifiées (§ B.1).

Une variante consiste à reconstituer séparément, suivant le même processus expérimental, dimères H2A-H2B et tétramères (H3-H4)₂. En effet, *in vivo* tétramères (H3-H4)₂ et dimères H2A-H2B ne se lient pas simultanément à l'ADN, mais successivement.

Reconstitution de particules cœur de nucléosomes par gradient de dialyse

Les protocoles de reconstitution des NCPs reposent tous sur le même principe. Octamères d'histones et ADN sont mélangés dans un rapport stoechiométrique (ou quasiment stoechiométrique) dans une solution tampon contenant deux molaires de sels monovalents. A cette concentration saline, les octamères d'histones sont stables et les interactions électrostatiques attractives entre ADN (négativement chargé) et histones (globalement positivement chargées) sont totalement écranées. Histones et ADN ont alors peu d'affinité les uns pour les autres et s'échangent rapidement pour atteindre un état d'équilibre thermodynamique. La concentration en sels monovalents est alors réduite progressivement pour atteindre 250mM. ADN et octamères d'histones peuvent alors interagir. A faible concentration en sels, l'échange entre ADN et histones devient cinétiquement lent (Widom, 1999).

Réduire la concentration saline "par sauts" revient à effectuer des dilutions successives de la solution initiale (Prunell et al., 1999) ou à réaliser des bains de dialyse successifs de concentrations salines décroissantes (Lee et al. 1999, Studitsky 1999, Chafin et al., 1999). La concentration en sels peut être réduite plus progressivement par des méthodes de "double dialyse" (Thaström et al, 2004) ou par un lent gradient de dialyse (Dyer et al., 2004) où les solutions restent en équilibre thermodynamique au cours du processus de reconstitution. La "double dialyse" consiste à insérer le bouton ou le sac de dialyse contenant le mélange ADN protéines dans un autre sac de dialyse rempli de tampon à 2 molaires en sels. L'ensemble est mis à dialyser dans du TE (10mM en sels monovalents). Ce procédé diminue la vitesse de dialyse. Nous avons choisi de reconstituer nos particules par gradient de dialyse où le tampon à 2 molaires en sels monovalents est progressivement substitué par du tampon à 250mM en sels monovalents.

Le principe de reconstitution est présenté sur la figure III.11. Une pompe péristaltique permet simultanément d'aspirer le tampon à 2M en KCL et de le remplacer par un tampon à 250mM en KCl avec un débit de 1.5mL/min. Le gradient de dialyse s'étend sur 18 heures.

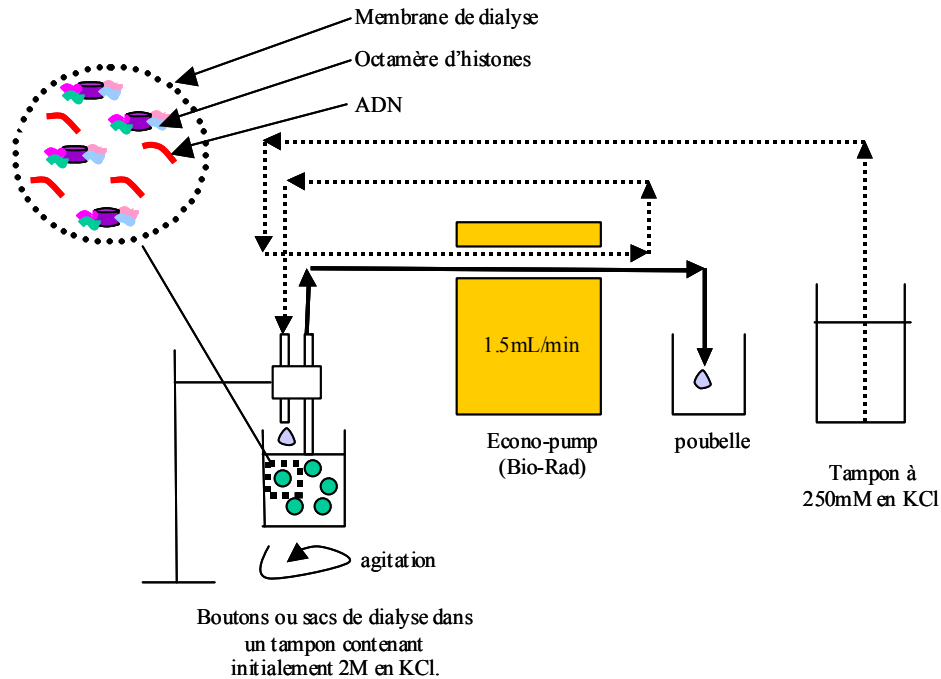


Figure III.11. Reconstitution des nucléosomes par gradient de dialyse.

Avant d'effectuer une reconstitution à grande échelle, il est nécessaire d'effectuer des tests sur des petites quantités de matériel biologique. En effet, le rapport molaire ADN/histones optimal pour la reconstitution doit être évalué. Avec un taux d'histones trop élevé par rapport à l'ADN, des agrégats protéiques se forment et peuvent diminuer considérablement le rendement. Par ailleurs, un excès d'ADN empêche un bon repositionnement par chauffage de l'ADN sur l'octamère d'histones. Ce point particulier sera exposé en détails dans un autre paragraphe. Les tests sont effectués dans des boutons de micro-dialyse de 50 μ L.

Après avoir sélectionné le rapport ADN / histones le plus approprié, une reconstitution à plus grande échelle est effectuée dans le but d'obtenir quelques milligrammes de NCPs. Les nucléosomes reconstitués sont alors dialysés contre un tampon pH 7.6 à 20mM en Tris-HCl comportant 5mM de DTT et 1mM d'EDTA.

De l'ADN libre et d'éventuels agrégats protéiques sont ensuite éliminés par électrophorèse préparative sur Prep Cell (Bio-Rad).

Positionnement de l'ADN autour de l'octamère d'histone

Dans le chapitre I, nous avons vu que la population de NCPs obtenues peut être hétérogène en termes de positionnement autour de l'octamère d'histones. Expérimentalement, avec des NCPs intactes, on observe plusieurs bandes sur gel d'électrophorèse non dénaturant qui correspondent à plusieurs positions de l'ADN autour du cœur protéique. Un positionnement symétrique est thermodynamiquement plus stable mais d'un point de vue cinétique, la transition d'une position décalée à centrée peut être très lente. Les différentes positions asymétriques peuvent également correspondre à des états métastables. C'est pourquoi, il est nécessaire de

chauffer les échantillons afin d'obtenir une population homogène de NCPs. Pour des histones toutes intactes, il suffit de chauffer une demi-heure à 37°C pour obtenir des NCPs tous identiques. Par contre, pour certains types de particules il est nécessaire de chauffer 2 heures à 55°C pour observer un résultat comparable. Le positionnement de l'ADN peut être suivi par électrophorèse non dénaturante (§ B.1)

B. Rôle des queues d'histone dans la reconstitution et la stabilité des NCPs

1. Rôle particulier des queues H2A-H2B dans la reconstitution en particules cœur de nucléosome

En théorie, il est possible de reconstituer des NCPs en utilisant toutes les combinaisons d'histones, intactes ou tronquées, possibles. Cependant, suivant la nature des extrémités terminales des histones choisie pour former des NCPs, la reconstitution peut s'avérer plus ou moins aisée et la stabilité des particules peut varier. Notamment, l'absence de queues H2A et H2B semble particulièrement affecter la reconstitution et la stabilité des NCPs. En particulier, de telles NCPs sont dissociées après vitrification en films minces. La conformation de telles particules est relâchée, ce que nous avons pu montrer par des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles et de digestion à la nucléase de microcoque.

Nous avons choisi de décrire et de discuter ces résultats sous la forme d'un article présenté ci-dessous. Dans cet article, les NCPs reconstituées recombinantes sont soigneusement caractérisées.

Recombinant NCPs require H2A and H2B histone tails to be reconstituted properly on 5S 146bp DNA.

Aurélie Bertin, Madalena Renouard, Stéphanie Mangenot, Dominique Durand and Françoise Livolant.

Abstract

We have performed here a detailed study of the conformation and stability of recombinant nucleosome core particle deprived of their H2A and H2B histone tails (named gH2AgH2B). The migration of these particles in acrylamide native gels is different from the migration of intact reconstituted NCPs. Moreover gH2AgH2B NCPs are much more sensitive to Mnase digestion than intact NCPs. Both results suggest that DNA ends might be slightly unbound from the gH2AgH2B particle core and that the protruding parts are preferentially digested by Mnase. The conformation of gH2AgH2B NCPs has also been studied using small angle X-ray scattering (SAXS) and cryo-electron microscopy (cryo-EM). The SAXS experiments demonstrate that gH2AgH2B NCPs adopt a conformation much more opened than the intact NCPs compact structure. The SAXS curves can be simulated using a NCP conformation where 25 DNA base pairs are separated from the histone octamer. Cryo-EM images show also a detachment of DNA portions from the particle core. The effect is even stronger because the vitrification of the samples worsens the instability of gH2AgH2B NCPs. All these results underline the crucial role played by the H2A and H2B histone tails in the NCP stability.

Introduction

In eukaryotic cells, DNA is hierarchically organized and highly condensed in the nucleus to form chromatin. Several organization levels are present but both the condensation mechanisms and the chromatin accurate organization *in situ* remain puzzling. However, the lowest chromatin organization level, the nucleosome core particle (NCP) has been precisely described, at high resolution (Luger et al., 1997b, Davey et al., 2002). Two superhelical turns of DNA (146bp to 147bp) are wrapped around a disk-shaped protein octamer containing two copies of four different histones (H2A, H2B, H3 and H4). The crystallographic data at 1.9Å resolution (Davey et al., 2002) display the histones-DNA contacts and the location of unstructured N- and C-terminal portions of histones. Those unstructured portion are commonly called histone tails. Those tail domains contain a high proportion of basic residues (lysines and arginines). Upon low salt conditions, they bind to the particle core.

At moderate concentrations of monovalent salts (150mM-300mM) tail domains are more mobile and can extend beyond the particle core (Smith and Rill, 1989, Mangenot *et al.*, 2002, Bertin *et al.*, 2004). Histone terminal domains have been shown to be involved in intra and inter nucleosomal interactions (Zheng and Hayes, 2003). Nucleosome oligomers deprived of some of the histone tails remain indeed only partially condensed as compared with native ones, upon divalent cation addition (Garcia-Ramirez *et al.*, 1992; Fletcher and Hansen, 1995; Krajewski and Ausio, 1996, Tse and Hansen, 1997; Dorigo et al., 2003, Gordon *et al.*, 2005). Not only seems histone tails involved in chromatin compaction they are necessary for ATPase activity of remodeling

factors such as ISWI and NURF (Clapier *et al.*, 2001; Hamiche *et al.*, 2001) and nucleosomal DNA transcription (Protacio *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2005).

In order to determine the role of histone tails, they can be completely or specifically removed either by enzymatic digestion or by reconstitution using recombinant histones deprived of their terminal extensions. Upon enzymatic tail deletions, several authors have shown the global NCPs conformation remains rather unaffected (Ausio et al., 1989, Dumuis-Kervabon et al., 1986). However tailless particles are more sensitive to thermal (Ausio et al., 1989) and mechanical (Brower –Toland *et al.*, 2005) stress. Through the use of recombinant tailless histones, Gottesfeld and Luger (2001) have compared the dissociation constants of intact, gH3, gH4 and gall (all tails deleted) NCPs. gall NCPs happen to have a lower reconstitution yield and seem to be more stable upon dilution.

The use of intact recombinant histones and DNA has proven to be of great interest to produce perfectly monodisperse particles and yield nucleosome high resolution structures (Luger *at al.*, 1997a and b). Using recombinant methods, any tail combination can be theoretically obtained. However, we have noticed that the removal of both H2A and H2B terminal extension is critical for the histone octamer to be properly reconstituted onto *Lychnenatus variegatus* 5S 146bp DNA fragments. We propose here to analyze the conformational disruptions occurring for NCPs reconstituted using tail-depleted H2A and H2B histones.

Material and methods

Nucleosome Core Particles preparation

Nucleosome core particles were prepared as described by Dyer *et al.* (2004).

5S 146 base pairs DNA purification. HB101 *E. Coli* cells were transformed by pTJR2 plasmids (Richmond *et al.*, 1988) and grown in "Terrific Broth". Amplified plasmids containing 146 bases pairs 5S DNA repeats were purified by an alkaline lysis process. Plasmids were digested with ECO 321 (Fermentas) restriction enzyme, an ECO RV analog. Linearized pUC9 plasmid was separated from 146 base pairs fragments by precipitation with 6% PEG 6000. 5S 146 base pairs DNA fragments were eventually purified using an anion exchange chromatography column (DEAE-5PW, Tosohaas).

Intact and globular histone purification. BL21DE3-pLysS *E.Coli* cells were transformed with pET plasmids corresponding to either intact or "trypsin-resistant" globular histones (Luger *et al.*, 1997). Histones were expressed during two hours following IPTG induction. After growth and harvest, cells were subjected to a flash freeze/thaw cycle. Cells were homogenized using a blender. Inclusion bodies were then isolated. Histones purification was carried on in two steps in buffers containing urea 7M, NaAC 20mM, pH5.2, β -mercaptoethanol 5mM and NaCl from 0.2 to 0.7M. They were first purified by size exclusion chromatography using a Sephacryl S-200 1.8L column (Amersham Bioscience) and purified again by ion-exchange chromatography using a TSK SP-5PW Tosohaas gel. Purified histones were finally dialyzed against 5mM β -mercaptoethanol in water, lyophilized and aliquoted.

Histone octamer assembly and purification Lyophilized histones were dissolved in denaturing buffer : 7M guanidinium hydrochloride, 10mM DTT, 20mM Tris-HCl, pH 8. After one hour incubation in denaturing buffer at room temperature, chosen combinations of intact or globular histones were mixed in a stoichiometric ratio for a final histone concentration of 1mg.mL⁻¹. The mixture was transferred to a dialysis tubing (Spectra-por, MW cut-off :6,000-8,000) and dialyzed against a renaturation buffer (NaCl 2M, DTT 5mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 8) at 4°C. Compared to the protocol described by Dyer *et al.*, DTT was chosen instead of β -mercaptoethanol to improve octamer reconstitution. DTT removes the β -mercaptoethanol covalently bound adduct from cysteines. After two changes of renaturation buffer, the histone solution was concentrated to 10mg.mL⁻¹ by ultrafiltration using a Vivascience Vivaspin concentrator (10,000 MW cut-off). Concentrated histone octamers were purified by size exclusion chromatography using a Superdex S-200HR Hiload (Amersham Bioscience) gel filtration

column equilibrated in renaturation buffer. Fractions were analyzed using SDS-PAGE electrophoresis. Fractions containing the four histones in equimolar amounts were combined and concentrated up to 10mg.mL⁻¹.

Nucleosome core particle reconstitution and purification

Pure histone octamer and 5S 146 base pairs DNA were mixed in a DNA:histone octamer ratio of 1:1.2 in a high salt containing buffer (KCl 2M, DTT 10mM, EDTA 0.5mM, Tris-Cl 10mM pH 8). The solution was gradually dialyzed to a low salt buffer (KCl 0.25M, DTT 5mM, EDTA 0.5mM, Tris-Cl 10mM pH8) as described by Dyer *et al.* (2004) at 4°C. After completion of the dialysis gradient, solutions were dialyzed four more hours in low salt buffer (KCl 0.25M, DTT 5mM, EDTA 0.5mM, Tris-Cl pH8 10mM). Solutions were then equilibrated in TCS buffer (Tris-HCl 20mM pH 7.6, EDTA 1mM) by dialysis. Solutions were then heated at 37°C to achieve nucleosome positioning. After concentration by ultrafiltration up to 10mg.mL⁻¹, nucleosome core particles solutions were loaded on a 6%, 7.5cm high non-denaturing polyacrylamide gels casted in a Bio-Rad Prep-cell apparatus. Purification by preparative gel electrophoresis was performed at 10W constant. Pure NCPs fractions were purified from free DNA, aggregates and partially unshifted NCPs. Diluted pure fractions were immediately concentrated by ultrafiltration to prevent any nucleosome dissociation.

Micrococcal nuclease digestion

Mnase digestions were performed at 37°C in a 10mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 5mM CaCl₂ divalent salt. NCPs concentrations were adjusted at 0.16mg.mL⁻¹. Both Mnase concentrations and digestion time were varied in separate assays. Time course experiments were performed for a constant Mnase concentrations of 0.015units per μ g of NCPs. Digestion times were varied from 0 to 16minutes. In parallel, identical amounts of NCPs (10 μ g) were digested with increasing amounts of Mnase varying from 0.05 to 0.2 units. Reactions were stopped on ice upon the addition of EGTA 5mM and SDS 1%. Histones were finally digested using 5 μ g of proteinase K per mg of NCPs at 37°C for 30 minutes. DNA fragments were analyzed on 5% acrylamide electrophoresis gels.

Small Angle X-rays Scattering

SAXS data collection and processing

The SAXS (Small Angle X-rays Scattering) experiments were carried out on a laboratory equipment. The instrument used is a commercially available small-angle X-ray camera (Nanostar,

Brucker AXS) adapted to a rotating anode X-ray source (CuK α , $\lambda=1.54\text{\AA}$). The experimental setup was optimized by Jan Skov Pedersen (University of Aarhus, Denmark) to obtain higher flux (J.S. Pedersen, 2004). The instrument has an integrated vacuum in order to reduce background. The scattering vector range was $0.008\text{\AA}^{-1} < q < 0.35\text{\AA}^{-1}$, where $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, with 2θ being the scattering angle. The sample to detector distance was 662mm. Samples were enclosed into 2mm diameter quartz capillaries directly inserted into vacuum. Measurements were performed at 5°C. Both buffers and samples were exposed during 7200 seconds. Data were collected using a position-sensitive gas detector (HiSTAR). The SAXS data were azimuthally averaged, corrected for variations in detector efficiency and for spatial distortions. Measurement on buffers were used as backgrounds and were subtracted from the recorded integrated curves. Finally, the data were converted to absolute scale using the scattering from pure water as primary standard.

Samples preparation for SAXS

NCPs were dialyzed against Tris-HCl 10mM, pH 7.6 buffer containing EDTA 1mM, PMSF 0.1mM and DTT 2mM. NCPs concentration were adjusted to be 8mg.mL^{-1} . Concentrations were assessed by UV-absorbance measurements. Various NaCl buffer solutions were prepared and added to dialyzed nucleosomes core particles solutions to adjust final monovalent salt concentrations. Both Tris⁺ and Na⁺ ions are included in the total monovalent salt concentration Cs. Added NaCl solution concentrations never exceeded 300mM to prevent any NCPs dissociation. Monovalent salt concentrations Cs considered here were 10, 25, 50, 100 and 150mM. For each salt concentration, NCPs were diluted to 4, 2 and 1mg.mL^{-1} . Sample volumes were adjusted to $50\mu\text{L}$.

Cryo-electron microscopy

NCPs in TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.6, EDTA 1mM) buffer were vitrified using a controlled environment chamber designed and set up in the laboratory where both humidity and temperature can be controlled. A $4\mu\text{L}$ drop of the NCPs solution concentrated at 2.5mg.mL^{-1} was deposited onto a perforated carbon film mounted on a 200 mesh electron microscopy grid. The home-made carbon film holes dimensions are about 2μ in diameter. Most of the drop was removed with a blotting filter paper and the residual thin films remaining within the holes were vitrified by immersion in liquid ethane using a guillotine-like frame. The specimen was then transferred using liquid nitrogen to a cryo-specimen holder and observed using a CM-12 Philips electron

microscope. Micrographs were recorded under low-dose conditions at a magnification of 45,000 on SO-163 Kodak films developed for 12 minutes in full-strength D19 (Kodak). Micrographs were digitised using a film scanner (Super coolscan 8000 ED, Nikon) and their contrast was magnified with the image J software.

Results

Nucleosome Core Particles characterization

Reconstitution yields

The use of globular histones for NCPs reconstitution induce much more aggregation than NCPs reconstitution from intact, full-length proteins. For tailless particles, aggregation occurs whatever the DNA / histones molar ratio is. Aggregates are made of both DNA and proteins and are removed by centrifugation and by preparative electrophoresis purification (Prep-Cel, Bio-Rad). Consequently reconstitution yields are much lower when one aims at preparing tailless NCPs. Reconstitution yields vary between 50 and 80% for intact NCPs, equal 50% for gH3gH4 and are about 30% for gH2AgH2B NCPs.

Histone characterization.

After histone production and purification, histone purity was checked by electrophoresis on 15% SDS-PAGE polyacrylamide gels. For any full-length or tailless histone, one single band could be observed on electrophoresis gels (Figure 1).

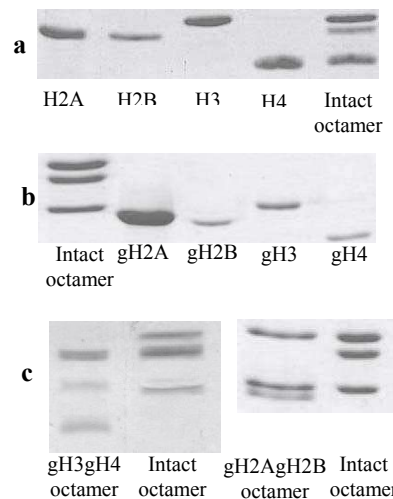


Figure 1 Histones characterization: histones electrophoresis on 15% SDS-PAGE polyacrylamide gels for intact (a) and globular (b) histones and octamers (c).

Mass Spectrometry experiments were also performed on individual histones to confirm their purity. Histones molecular masses are presented in table 1.

Histone	a.a. sequence	Measured mass	Calculated mass
H2A	1-128	13949.0	13950.2
H2B	1-122	13493.7	13493.7
H3	1-135	15272.3	15270.9
H4	1-102	11236.5	11236.2
gH2A	13-117	11739.2	11739.2
gH2B	24-122	11291.3	11288.1
gH3	27-135	12656.2	12653.9
gH4	20-102	9522.9	9521.2

Table 1 *Xenopus laevis* Histone molecular mass determination using Mass Spectrometry. Measured masses were determined with a MALDI-TOF apparatus. Calculated Masses were obtained from the web site : <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html> after entering the histone sequences.

Measured histone masses are in excellent agreement with theoretical masses calculated from the web site <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html> using the protein sequences. After purification and prior to lyophilisation, histones were dialyzed against a 5mM β -mercaptoethanol solution. β -mercaptoethanol adducts were detected on histones H3 and globular H3 (gH3) by mass spectrometry. The adduct covalent bonds between cystein amino-acids and β -mercaptoethanol molecules could be easily removed after 5mM DTT addition (figure 2).

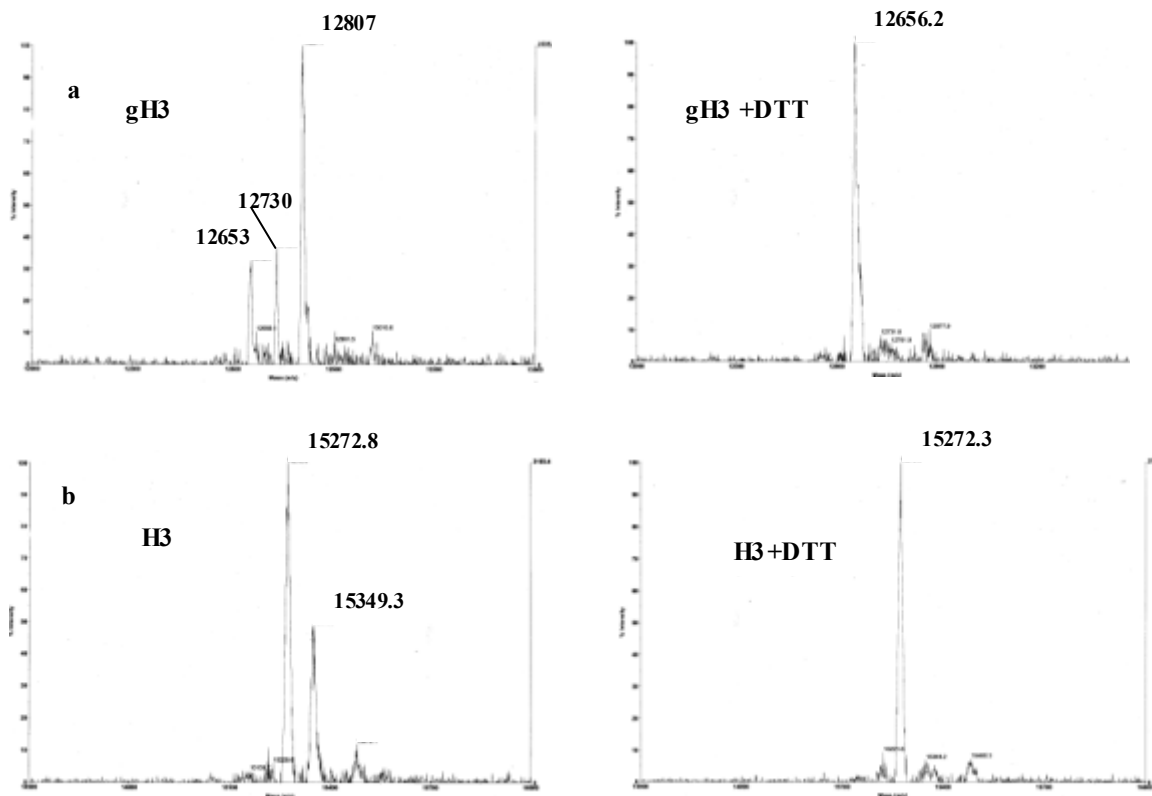


Figure 2 β -mercaptoethanol adduct removal consecutively to DTT addition. Without DTT (left side), three peaks for gH3 and 2 peaks for H3 are observed. They are separated from $77\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. After DTT addition (right side), a single peak is obtained with removal of β -mercaptoethanol adducts.

Consequently, it was decided to use DTT instead of β -mercaptoethanol as a reducing agent during the reconstitution process to prevent such covalent bonds

to form. We realized indeed that reconstitution did not occur properly using β -mercaptoethanol.

Histone octamer characterization

After histone octamer reconstitution, protein composition was checked on SDS-PAGE polyacrylamide electrophoresis gels (Figure 1). Three octamer types were reconstituted : intact, gH3gH4 (without H3 and H4 tails) and gH2AgH2B (deprived of H2A and H2B histone tails). The amino acids remaining in the globular domains sequences are displayed in table 1.

Histone octamer positioning

Following salt gradient reconstitution, NCPs solutions are not homogeneous. Discrepancies result from differential DNA positioning 10 base pairs from one another around the histone octamer (Dong et al, 1990). Analyzed right after reconstitution, several bands of similar intensities are observed on non denaturing acrylamide gels, indicating NCPs populations are present in comparable proportions (Figure 3).

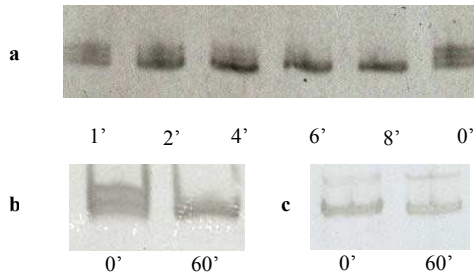


Figure 3 NCPs were heated at 37°C in order to achieve a homogeneous positioning of DNA around the histone octamers. For Intact NCPs, DNA positioning was complete after 8 minutes heating (a). For gH3gH4 NCPs, positioning was achieved after 60 minutes heating (b). For gH2AgH2B NCPs heating samples during two hours would be ineffective in positioning nucleosomal DNA (c).

For intact NCPs three distinct bands are observed. The lowest one, which migrates faster in the acrylamide gel corresponds to a configuration where DNA is centrally positioned around the histone octamer. The highest bands in the gel migration pattern are consistent with particles in which DNA is asymmetrically positioned. One of the DNA entry – exit end is, as a result, protruding from the particle core and slows down NCPs migration in the gel. DNA positioning around histones is sensitive to temperature. Heating samples reduces the energy barrier that prevents DNA from reaching thermodynamic equilibrium and from being centrally positioned (Pennings, 1991, Meersseman, 1992). In order to get a homogeneous centrally positioned batch of particle, samples were heated. Figure 3.a displays a time-course experiment where intact NCPs are heated

up to 37°C during times varying from two to eight minutes. Prior to heat shifting, positioning is quite a fast process. After no more than two minutes heating, the lowest band is indeed majoritary and positioning is complete after 8 minutes heating. For gH3gH4 NCPs DNA also positions around histone octamers quite easily. Figure 3.b displays the result of heat shifting after 60 minutes. However, for gH2AgH2B, positioning was never observed (Figure 3.c). Temperatures from 37 up to 55°C were applied without being able to "shift" DNA. Samples were even heated up to 55°C during two hours, which only induced NCPs aggregation and still no positioning.

NCPs migration in gels

Disregarding aggregates, gH2AgH2B NCPs migrate as one single band or at least as one majoritary band on non-denaturing acrylamide gels (Figure 3 and Figure 4), right after reconstitution. It therefore implies that gH2AgH2B NCPs are quite homogeneous particles in terms of DNA positioning around the histone octamer. No repositioning of gH2AgH2B octamers onto 5S DNA is observed after heat treatment.

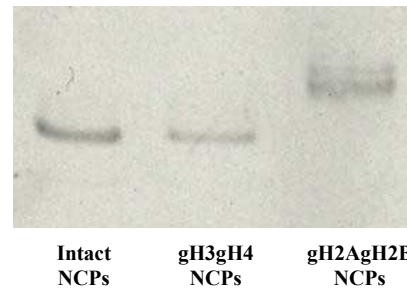


Figure 4 Migration of Intact, gH3gH4 and gH2AgH2B NCPs in 5% non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. gH2AgH2B NCPs migrate more slowly than Intact and gH3gH4 NCPs.

On Figure 4, intact, gH3gH4 and gH2AgH2B NCPs are compared. Bands corresponding to intact and gH3gH4 NCPs migrate similarly in the acrylamide gel. gH2AgH2B NCPs migrate significantly more slowly in the gel. We have checked by SDS PAGE that all four histones were still present in equimolar amount after NCPs reconstitution. This particular behavior probably emphasizes conformational discrepancies, as compared with intact and gH3gH4 NCPs. For reconstituted NCPs deprived of all their tails, NCPs migration speed in acrylamide native gels is different from the migration rate of intact particles as well (Luger et al., 1997a).

Mnase digestions

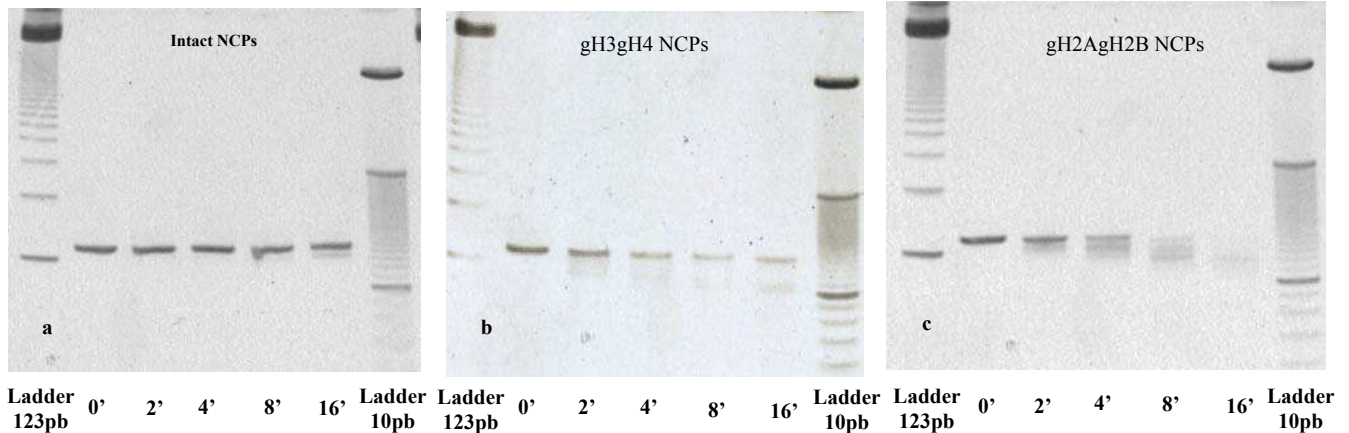


Figure 5 Micrococcal nuclease digestion time course experiments for intact (a), gH3gH4 (b) and gH2AgH2B (c) NCPs. NCPs concentrations and Mnase amounts in assays were constant. NCPs concentration was $0.16\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.015 units of Mnase per μg of NCPs was used. Digestion times varied from 0 to 16 minutes. DNA ladders 123pb and 10pb (Invitrogen) were used as markers.

Nucleosomal DNA is known to be protected from *Micrococcal* nuclease digestion. In order to determine the role of histone tails in protecting the nucleosomal DNA, we have performed Mnase digestion experiments on intact, gH3gH4 and gH2AgH2B NCPs. Both digestion time and nuclease quantities were varied in distinct experiments. On Figure 5, the results of time course digestion experiments are shown on non denaturing electrophoresis acrylamide gels. Mnase amounts were kept constant at 0.015 units per μg of NCPs and digestion times were varied from 0 to 16 minutes. Intact NCPs (Figure 5.a.) are barely affected by Mnase. After 4 minutes incubation with Mnase, DNA from intact NCPs remains unharmed. For the longest digestion times (8 and 16 minutes), a lower band can be perceived that is about 10bp lower than the 146bp of 5S DNA. This 135 ± 2 pb long DNA piece represents a small proportion as compared to 146pb DNA. However, for gH3gH4 NCPs (Figure 5.b) DNA appears to be more sensitive to Mnase digestion. After only two minutes incubation with Mnase, DNA is already partially digested by nuclease to DNA pieces as short as about 122 ± 2 pb long. After 16 minutes digestion, 146pb DNA fragments and 110 ± 2 pb much shorter DNA pieces are still remaining. Nucleosomal DNA wrapped around gH2AgH2B octamers (Figure 5.c) is even more affected by Mnase digestion. After 16 minutes incubation with nuclease, 146pb original DNA fragments are no longer present. Moreover, no more than two minutes incubation with Mnase for gH2AgH2B NCPs have similar consequences on DNA length as 16 minutes digestion for intact NCPs. For gH2AgH2B NCPs, DNA digestion seems to occur within consecutive steps, looking at the

acrylamide gel pattern. At first, DNA fragments of about 135 ± 2 pb are obtained followed by shorter fragments of 122 ± 2 pb as digestion time increases. Ultimately, after 16 minutes nuclease digestion, only 122 ± 2 pb DNA fragments remain in solution. For intact and gH2AgH2B NCPs, *Micrococcal* nuclease digestion experiments were performed with varying nuclease concentrations (0 to 0.2 units per $10\mu\text{g}$ of NCPs) and a 6 minutes constant digestion time (Figure 6).

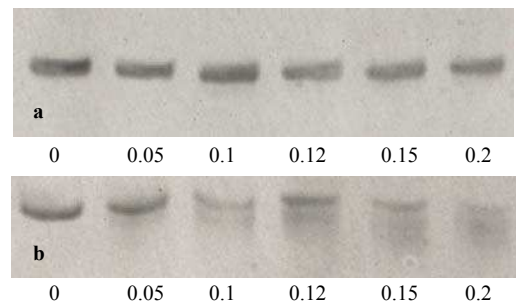


Figure 6 Intact (a) and gH2AgH2B (b) NCPs were digested by varying amounts of *Micrococcal* nuclease. Digestion time was constant for all samples and was equal to 6 minutes. Mnase quantities used varied from 0 to 0.2 Mnase units per $10\mu\text{g}$ of NCPs.

In that range of nuclease concentration, DNA from intact NCPs was not affected by digestion (Figure 6.a.). For all conditions, only 146pb 5S DNA fragments are obtained whatever the nuclease amount was. However, for gH2AgH2B NCPs, DNA digestion is initiated and effective as 0.1 units enzyme per μg of NCPs is spent (Figure 6.b). Note that the DNA fragments lengths were determined from the comparison with the 10bp ladder.

SAXS curves

SAXS experiments were carried out for intact, gH3gH4 and gH2AgH2B NCPs. Data analysis for both intact and gH3gH4 NCPs is detailed in another article (Bertin et al., in preparation).

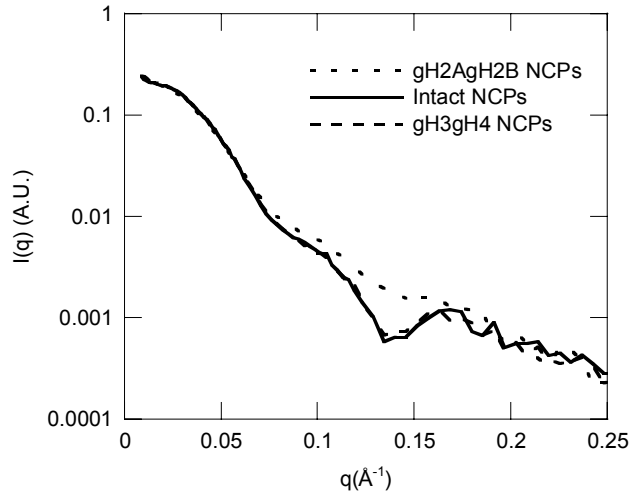


Figure 7 Small Angle X-ray scattering curves obtained at a particle concentration of $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in a 25m monovalent salt solution. Intact (full line), gH3gH4 (dashed line) and gH2AgH2B (dotted line) NCPs are compared.

On Figure 7, curves obtained at $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ particles concentrations and in 25mM monovalent salt are compared. Curves obtained for intact and gH3gH4 NCPs are very much alike. Nevertheless, the curve second minimum around 0.14Å^{-1} is not as deep for gH3gH4 NCPs. This second minimum is barely perceptible for gH2AgH2B and discrepancies are here much more significant. Form factors for gH2AgH2B NCPs are very different from those of intact and gH3gH4 particles, implying that gH2AgH2B NCPs display conformational distinctive features. Similar differences are observed at any particle and salt concentrations. From the 1KX5 crystallographic structure, a schematic NCP representation was designed using Web Lab Viewer Lite where one DNA is unbound from the particle core 25 base pairs from the ends (Figure 8.a). The resulting form factor was calculated with CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995). The calculated form factor is in good agreement with the experimental curve. On Figure 8.b a comparison between calculated form factor of 1KX5 intact NCPs and the form factor resulting from the structure displayed in figure 8.a is presented. Upon the 25 DNA bp unbinding from the particle core, the resulting form factor second minimum is filled and is much alike to the experimental curve. Therefore such

a representation features gH2AgH2B NCPs in a possible configuration.

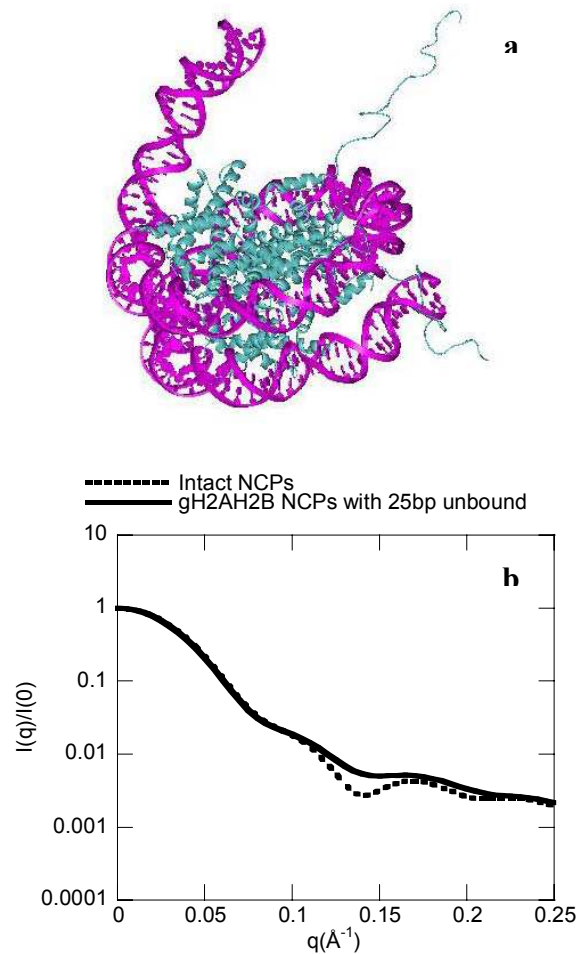


Figure 8 The form factor resulting from a structure where 25 DNA bp is unbound from the particle core (a) was calculated with CRY SOL and compared to calculated form factor of intact 1KX5 crystallographic structure (b). The structure displayed (a) was designed using Web Lab Viewer Lite and is derived from the 1KX5 crystallographic structure.

Lower stability upon vitrification in thin cryo-EM films

In order to further determine features of the gH2AgH2B NCPs conformation, these particles were vitrified in thin films to be imaged by cryoelectron microscopy. Those particles happened to be destabilized upon vitrification. In the thinnest sample portions, free DNA is visualized, indicating that NCPs are completely dissociated. Prior to sample vitrification, we checked, by non-denaturing gel electrophoresis, that samples were devoid of any free DNA. In thicker samples, along the carbon holes sides, particles that are being dissociated during the vitrification process can be distinguished.

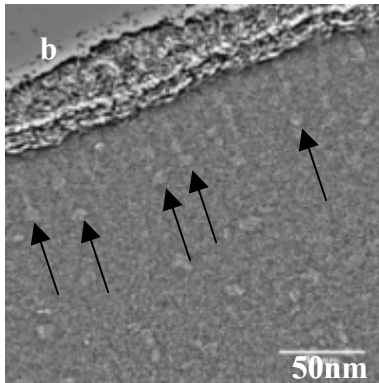


Figure 9 Destabilization of gH2AgH2B NCPs upon vitrification in thin films. Upon vitrification, using a controlled environment chamber, gH2AgH2B NCPs are partially dissociated. The protein core (black arrow) is visible at the extremity of DNA fragments.

Filaments stretching perpendicularly from the carbon holes sides and terminated by a round-shaped proteic portion are indeed visible (Figure 9). Those filaments of about 35nm long seem to be made of DNA (~100bp) decorated with free histones. The globular part may correspond to a partially unwrapped NCPs (Figure 9). Consequently, vitrification seems to alter specifically gH2AgH2B particles stability. gH2AgH2B NCPs are therefore particularly fragile as compared with intact NCPs.

Discussion

gH2AgH2B NCPs are much more sensitive to Mnase digestion than gH3gH4 and in a larger extent than intact NCPs. Only 122 ± 2 bp of the nucleosomal DNA is eventually protected against nuclease digestion. Since heat shifting is inefficient on those gH2AgH2B NCPs, one could possibly argue that, on such NCPs, DNA is not symmetrically positioned and protruding DNA ends would therefore be preferentially digested by Mnase. However, Figure 4 points out that gH2AgH2B NCPs migration in gels is much more slowed down than migration of unshifted NCPs (Figure 3). This spectacular improved sensitivity to Mnase is more likely to be resulting from a lower affinity of nucleosomal DNA ends with the histone octamer. DNA ends, being rather dissociated from the histone core would be more accessible to nuclease. Both or only one end could be slightly detached from the particle core (Figure 8.a). Since DNA-histones interactions are altered, NCPs appear to be more destabilized upon vitrification (Figure 9). gH2AgH2B NCPs are actually dissociated consecutively to their vitrification in thin films while intact NCPs remain stable under the same vitrification conditions. Particles made of about 100bp DNA fragment extending from a proteic portion where only

50bp are still bound (Figure 9) is certainly not representative of the actual gH2AgH2B NCPs conformation. It is more likely to result from the vitrification process, regarding the Mnase digestion assays. In the thin film, surface tension may mechanically disrupt the gH2AgH2B NCPs conformation.

All histone tails were positioned on the crystallographic structure proposed by Davey *et al.* (2002). For intact NCPs, H2B histone tails pass through the gyres of the DNA nucleosomal superhelix about 20-25bp from the DNA ends. H2B histone tails presence might therefore be necessary to maintain the DNA ends close to the particle core. Both the Mnase digestion pattern and the SAXS data are compatible with that assumption, showing that 20 to 25 DNA base pairs may be slightly unbound from the particle core. H3 histone tails also pass through the superhelix gyre only 13 base pairs from the DNA ends. H3 histone tails might not interact with DNA *via* strong enough interactions to be able to maintain DNA ends stuck onto the gH2AgH2B particle core. Photocross-linking experiments (Lee and Hayes, 1997) have shown that the N-terminal tails of H2A systematically binds DNA at two locations within NCPs centered around a position about 40bp from the dyad axis. The H2A N-terminal tails might therefore be involved as well in keeping a compact NCPs conformation. We have reconstituted particles removing only either H2A or H2B histone tails. For both types of particles (gH2A NCPs and gH2B NCPs), heat shifting happened to be ineffective and DNA repositioning was therefore not observed. However, those particles seemed less affected by Mnase digestion than gH2AgH2B NCPs but after 16 minutes incubation with Mnase, in similar conditions as described above, nucleosomal DNA is either completely (Figure 10.b) or partially (Figure 10.a) digested. Both H2A and H2B histone tails seem to contribute individually in a proper NCPs reconstitution process. Consequently, when they are simultaneously removed, particles get even more disrupted. Nucleosomal DNA is digested by Mnase in a stepwise manner. Starting from an intact DNA fragment of 146bp, 135 ± 2 bp is obtained first and only 122 ± 2 bp remain eventually intact after extensive Mnase digestion. Considering the accuracy of the DNA fragments lengths determination, one notices that digestion steps occur about every 10pb. Such steps were already observed after 5S DNA digestion with Mnase (Dong *et al.*, 1990, Pennings *et al.*, 1991). Not only does this 10bp periodicity correspond to this of the histone-DNA contact points on the crystallographic structure (Luger *et al.*, 1997b) but also to the DNA helicity periodicity. From those observations, one can conclude that 25bp of DNA fluctuate from the particle core, from a bound state to

an unbound configuration. In addition to that, the 10bp periodicity tends to show intermediate states are likely to exist, from a fully unbound configuration to a properly folded pattern.

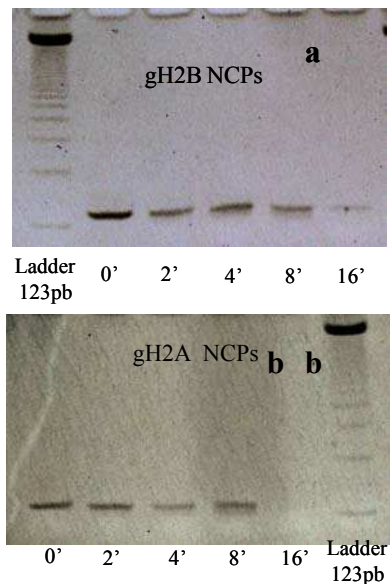


Figure 10 Micrococcal nuclease digestion time course experiments for gH2B (a), and gH2A NCPs. NCPs concentrations and Mnase amounts in assays were constant. NCPs concentration was $0.16\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.015 units of Mnase per μg of NCPs was used. Digestion times varied from 0 to 16 minutes. DNA ladders 123pb and 10pb (Invitrogen) were used as markers.

Tse and Hansen (1997) have performed sedimentation coefficient measurements on intact, gH3gH4 and gH2AgH2B 12-mer NCPs arrays. In low salt conditions, when arrays are decondensed, sedimentation coefficients are measured to be 27S for gH2AgH2B NCPs, 28.5S for gH3gH4 NCPs and 29S for intact NCPs. Sedimentation coefficients for intact and gH3gH4 NCPs arrays are therefore quite close while gH2AgH2B NCPs arrays come up with a significant lower value. Tse and Hansen (1997) propose that H2A and H2B tails would stabilize the wrapping of the core DNA near the entry-exit point of nucleosomes. Their findings are in good agreement with our own observations. In addition to that, we have performed SAXS experiments on different NCPs species. SAXS is much more sensitive in detecting conformational discrepancies than other methods usually used such as circular dichroism and sedimentation coefficient measurements. While intact and gH3gH4 NCPs form factors are much alike, gH2AgH2B NCPs scattering curve is very different. More precisely, the second curve minimum around 0.14\AA^{-1} can barely be perceived. Scattering intensity resulting from a hollow flat cylinder comparable to the NCPs peripheral DNA corona would feature a marked second minimum. A disruption in the DNA

superhelix regularity is responsible for the differences noticed. NCPs where both DNA ends would be unwrapped, in a sensible extent, from the histone core, would achieve similar scattering pattern. gH3gH4 NCPs also display a slightly more opened conformation than intact NCPs since their form factor second minimum is not as deep as intact NCPs one. This slight conformational dissimilarity is detailed in another article (Bertin et al., in preparation) and accounts for the Mnase enhanced sensitivity and digestion pattern for gH3gH4 NCPs. gH2AgH2B NCPs also appear to be much less easily reconstituted as intact NCPs. The reconstitution yield is actually lower.

Hamiche et al (2001) have reconstituted NCPs on 256 and 357bp 5S DNA templates to study the role of histone tails on nucleosome sliding induced by NURF remodeling factors. They unexpectedly found out that upon removal of H2B tails, a nucleoprotein reconstitution artefact is formed and that uncatalyzed nucleosome sliding occurs. They conclude that H2B histone tails is essential for maintaining translational positions of histone octamers on DNA templates. It does therefore imply that affinity of 5S DNA with histone octamers depleted of H2B histone tails is reduced. NCPs reconstituted with the H2A.Bbd (Barr body deficient) histone behaves quite similarly as gH2AgH2B NCPs. H2A.Bbd histones are completely depleted of their C-terminal extension and contain a row of 6 arginines in its amino terminus. Bao et al (2004) have found out that nucleosomes containing H2A.Bbd histone variant organize only 118 DNA bp around the histone octamer. Their conclusion rely on Mnase digestion experiments as well. Moreover, migration of such NCPs in non denaturing acrylamide gels is also significantly slowed down. Gautier et al. (2004) also found out that variant histone H2A.Bbd confers lower stability to the nucleosome using analytical centrifugation and FRAP experiments. They more precisely noticed H2A.Bbd exchange more rapidly in cells than H2A.

The 5S DNA sequence used here might not be the most appropriate sequence to achieve particle reconstitution using H2A and H2B tailless histones. A more positioning sequence, and displaying higher affinity for histones has already been used in that purpose (Dorigo et al., 2003) for the reconstitution of NCPs arrays and seems to be more suitable. The DNA corona opening might also result from an octamer distortion in the first place. Without H2A histone tails, it has indeed been shown that H2A-H2B histone dimers have a lower affinity for H3-H4 histone tetramers (Eickbush et al., 1988). Consequently, histone octamers containing tailless H2A might be less compact than intact octamers and

more easily disassembled. The absence of H2A and H2B histone terminal extensions also affect H2A-H2B dimers structure and stability (Placek and Gloss, 2002). Without those tails, the α helical content of dimers is actually altered. However, the thermodynamic stability and properties of H2A-H2B dimers and H3-H4 tetramers does not seem to be altered (Karantza et al., 2001).

Native NCPs can also be depleted of both H2A and H2B histone tails using clostripaine (Dumuis-Kervabon et al., 1986). Using circular dichroism, Dumuis-Kervabon et al. suppose the overall NCPs conformation is conserved upon removal of H2A and H2B histone tails. Consequently, we can not exclude that the opened conformation we observe here results from reconstitution artifacts in a first place.

References

Ausio J., Dong F., van holde KE. (1989), Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of chromatin histone "tails" in the stabilization of the nucleosome, *Journal of Molecular Biology*, **206**, 451-463.

Bao Y., Konesky K., Park YJ., Rosu S., Dyer PN., Rangasamy D., Tremethick DJ., Laybourn PJ., Luger K. (2000), Nucleosomes containing the histone variant H2A.bbd organize only 118 base pairs of DNA, *The EMBO Journal*, **23**, 3314-3324.

Bertin, A., Leforestier, A., Durand, D. and Livolant, F. (2004) Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles, *Biochemistry* **43**, 4773-4780.

Brower-Toland B., Wacker DA., Fulbright RM., Lis JT., Kraus WL., Wang MD. (2005), Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes., *Journal of Molecular Biology*, **346**, 135-146.

Clapier C.R., Längst G., Corona D.F.V., Becker P.B., Nightingale K.P. (2001), Critical Role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI., *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 875-883.

Davey CA., Sargent DF., Luger K., Armin WM. & TJ. Richmond (2002), Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9Å resolution., *J. Mol. Biol.*, **319**, 1097-1113.

Dong F., Hansen J.C., van Holde K.E. (1990), DNA and protein determinants of nucleosomes positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequence in vitro, *PNAS*, **87**, 5724-5728.

Dorigo B., Schalch T., Bystricky K. & Richmond T. (2003), Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail., *Journal of Molecular Biology*, **327**, 85-96.

Dumuis-Kervabon A., Encontre I., Etienne G., Méry J., Mesnier D. and Parello J. (1986) A chromatin core

Proteolytic clostripaine digestion is indeed performed when NCPs are already formed whereas the use of globular H2A and H2B histones might prevent a proper salt gradient reconstitution to occur. Consequently resultant NCPs obtained by either removing H2A and H2B histone tails by enzymatic treatments or by salt gradient reconstitution using recombinant tailless histones might exhibit dissimilar structures.

We have shown here that H2A and H2B histone tails play an essential role in the NCPs reconstitution process and are involved as well in the histones-DNA complex stability.

particle obtained by selective cleavage of histones by clostripains, *The EMBO Journal*, **5**, 1735-1742.

Dyer P., Edayathumangalam R., White C., Bao Y., Chakravarthy S., Muthurajan U. and Luger K. (2004), *Methods in Enzymology*, **375**, 23-44.

Eickbush T.H., Gogfrey J.E., Elia M.C., Moudrianakis E.N. (1988) H2a-specific proteolysis as a unique probe in the analysis of the histone octamer, *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18972-18978.

Fletcher TM & Hansen JC. (1995), Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms., *The Journal of Biological Chemistry*, **43**, 25359-25632.

Garcia-Ramirez M., Dong F., Ausio J. (1992), Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1, *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 19587-19595.

Gautier T., Abbott DW., Molla A., Verdel A., Ausio J. and Dimitrov S. (2004) Histone variant H2Abbd confers lower stability to the nucleosome, *EMBO reports*, **5**, 1-6.

Gordon F., Luger K., Hansen JC. (2005); The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt dependent oligomerization of nucleosome arrays, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 33701-33706.

Hamiche A., Kang JG, Dennis C., Xiao H., Wu C. (2001), Histone tail modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 14316-14321.

Karantza V., Freire E. & Moudrianakis EN. (2001), Thermodynamic studies of the core histones : stability of the octamer subunits is not altered by their removal of their terminal domain, *Biochemistry*, **40**, 13114-13123.

- Krajewski WA. & Ausió J. (1996), Modulation of the higher-order folding of chromatin by deletion of histone H3 and H4 terminal domains., *Biochemical Journal*, **316**, 395-400.
- Lee KM., Hayes JJ. (1997), the N-terminal tail of histone H2A binds to two distinct sites within the nucleosome core., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8959-8964.
- Luger K., Rechsteiner T.J., Flaus A.J., Wayne M.M. and Richmond T.J. (1997a), Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J.Mol.Biol.*, **272**, 301-311.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997b), Cristal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution., *Nature*, **389**, 251-260.
- Luger K., Rechsteiner T.J. and Richmond T.J. (1999), *Methods Enzymol.*, **304**, 3-19.
- Mangenot S., Leforestier A., Vachette P., Durand D. & Livolant F. (2002), Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles., *Biophysical journal*, **82**, 345-356.
- Meersseman G., Pennings S., Bradbury E.M. (1992), Mobile nucleosomes-a general behavior, *The EMBO Journal*, **11**, 2951-2959.
- Pedersen J.S. (2004), A flux- and background-optimized version of the NanoSTAR small-angle scattering camera for solution scattering, *J. Appl.Cryst.*, **37**, 369-380.
- Pennings S., Meersseman G.; Bradbury (1991), Mobility of positioned nucleosomes on 5S rDNA, *Journal of Molecular Biology*, **220**, 101-110.
- Placek B.J., Gloss L.M. (2002) The N-terminal tails of the H2A-H2B histones affect dimer structure and stability., *Biochemistry*, **41**, 14960-14968.
- Protacio RU., Li G., Lowary PT. And Widom J. (2000) Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8866-8878.
- Smith RM. & Rill R.L (1989), Mobile histone tails in nucleosomes. Assignments of mobile segments and investigation of their role in chromatin folding., *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 10574-10581.
- Svergun DI., Barbareto C. & Koch MHJ. (1995), CRYSOLO-a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates., *Journal of Applied Crystallography*, **28**, 768-773.
- Tse C. and Hansen J.C. (1997), Hybrid trypsinized nucleosomal arrays: Identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction., *Biochemistry*, **36**, 11381-11388.
- Yang Z., Zheng C., Thiriet C. and Hayes JJ. (2005) The core histone N-terminal tail domains negatively regulate binding of transcription factor IIIA to a nucleosome containing a 5S RNA gene via a novel mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 241-249.
- Zheng C. and Hayes JJ. (2003), Intra and inter-nucleosomal protein-DNA interactions of the core histone tail domains in a model system., *J. Biol. Chem.*, **278**, 24217-24224.

2 Stabilité des particules cœur de nucléosome trypsinisées

La stabilité de NCPs natives trypsinisées a également été évaluée par des expériences de résistance à la MNase. Jusqu'à des concentrations en sel monovalent (NaCl) de 0.7M, la stabilité des NCPs natives semble indépendante de la présence ou de l'absence de queues N-terminales. (Ausio et al. 1989). Au cours du même travail Ausio et al. ont mis en évidence une dénaturation thermique de l'ADN plus importante sur les échantillons trypsinisés. Dumuis-Kervabon et al. (1986) ont également mis en évidence une diminution de la température de fusion de l'ADN (inférieure à 2 °C) pour des nucléosomes digérés à la clostripaine. Ils montrent par des mesures de dichroïsme circulaire, que les nucléosomes protéolysés conservent la même structure générale mais sont plus accessibles aux ions multivalents cationiques (spermidine).

Associé à l'octamère d'histones, l'ADN nucléosomal est protégé lors de la digestion à la nucléase de microcoque. La résistance de l'ADN nucléosomal à la nucléase de microcoque a été testée, ici, pour des particules intactes ou trypsinisées. La digestion à la MNase (Nucléase de Microcoque) s'effectue dans un tampon Tris-HCl 10mM pH 8 contenant 5mM de CaCl₂ à 37°C. La réaction est stoppée à 0°C, en présence de 5mM d'EGTA. Les protéines sont ensuite extraites au phénol-chloroforme et l'ADN nucléosomal est analysé par électrophorèse sur gel d'acrylamide. La figure II.18 montre un exemple de test de résistance à la nucléase pour différents temps de digestion et des quantités constantes en enzyme.

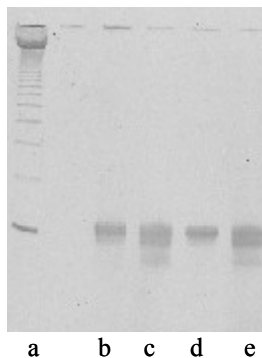


Figure II.18 : Digestion de nucléosomes intacts (b et d) ou trypsinisés (c et e) à la nucléase de microcoque (0.8 u.e. pour 120 pm de nucléosomes). Ligne a : ladder 123pb (GIBCO); Lignes b et c: 2 minutes de digestion; lignes d et e : 4 minutes de digestion. Les nucléosomes trypsinisés sont plus sensibles à la digestion par la nucléase de microcoque

Pour des quantités égales en nucléase et des temps de digestion identiques, la résistance à la nucléase des NCPs intact ou trypsinisés diffère. En l'absence de "queues", l'ADN nucléosomal est plus facilement digéré par la nucléase de microcoque. Les queues permettraient donc de protéger l'ADN lié aux histones. On peut supposer qu'une partie de l'ADN "entrant" et "sortant" des nucléosomes est légèrement décollé par rapport à la surface protéique et est, de ce fait, digéré plus facilement.

Conclusions du chapitre III

Les particules cœur de nucléosome ont été préparées suivant deux méthodes différentes.

● partir de thymus de veau, quelques **grammes** de NCPs sont obtenus. Les longueurs d'ADN de NCPs natifs et leur **polydispersité** sont **contrôlées**. Une digestion enzymatique à la **trypsine** permet d'éliminer l'ensemble des queues des histones. La trypsinisation diminue la résistance à la MNase.

● Quelques **milligrammes** de NCPs parfaitement **monodisperses** sont reconstituées à partir d'ADN et d'histones recombinants. Les histones sont produites soit entières soit dépourvues de leur extrémité N et /ou C terminales. En théorie, toutes les combinaisons de queues d'histones tronquées ou présentes sont envisageables pour reconstituer les NCPs. Nous avons préparé :

- ◇ Des NCPs **intactes**
- ◇ Des NCPs **gH3H4** (sans queues H3 et H4)
- ◇ Des NCPs **gH2AgH2B** (sans queues H2A et H2B)

10mg environ de chaque type de NCPs purs et monodisperse ont été préparés.

● Les NCPs gH2AgH2B ne sont pas correctement reconstitués. Ils montrent une sensibilité particulière à la MNase et présentent une conformation relâchée.

Chapitre IV

Interaction et
conformation de NCPs
en solution.

Introduction du chapitre IV

La structure cristallographique à haute résolution des NCPs est connue depuis 1997 (Luger et al., 1997, Harp et al., 2000). Les cristaux de NCPs sont préparés dans des conditions bien spécifiques (~40mM MnCl₂, 40mM KCl et 20mM de cacodylate de potassium, pH 6). En outre, les structures cristallines représentent les NCPs dans une configuration figée. La conformation des NCPs en solution est, par opposition, dynamique (Polach & Widom, 1995, Widom, 1999, Tomschick et al., 2005) et varie avec les conditions salines. La conformation des NCPs en solution a été ici étudiée par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) (§A) et cryo-microscopie électronique (§B). Ces deux méthodes présentent une résolution suffisante pour mettre en évidence des particularités structurales précises. En outre, l'utilisation de SAXS présente l'avantage d'évaluer à la fois la conformation des NCPs et les interactions entre particules.

Nous avons choisi de présenter la première partie (§A) sous forme d'articles. Les résultats y sont, en effet, présentés de manière concise et exhaustive. Ces deux articles présentent deux séries distinctes d'expérience de diffusion des rayons X aux petits angles. Pour des NCPs natives, une extension des queues d'histones avec l'augmentation des concentrations en sel monovalent était observée simultanément avec l'apparition d'une composante attractive dans les interactions (Mangenot et al., 2002.a et b). Nous proposons, par SAXS, de démontrer que les queues d'histones sont effectivement indispensables pour l'établissement d'interactions attractives entre particules. C'est l'objet du premier article (§ A.1, "Role of histone tails in the interaction and conformation of nucleosome core particles"). Pour cela, nous avons utilisé des NCPs extraites de thymus de veau auxquelles l'ensemble des queues d'histones ont été supprimées par trypsinisation. Dans un deuxième temps, nous précisons le rôle particulier des queues d'histone H3 et H4 et proposerons un modèle pour décrire les interactions. C'est l'objet de l'article 2 (§ A.2, " Role of H3 and H4 histone tails in the interaction and conformation of recombinant nucleosome core particles"). Cette deuxième série d'expériences a été effectuée sur un instrument de laboratoire optimisé par Jan Skov Pedersen (Université de Aarhus, Danemark). Nous avons reconstitué pour ces expériences des NCPs à partir d'ADN et d'histones recombinantes. Plus précisément, nous avons comparé le comportement de NCPs intactes et de NCPs privées de queues H3 et H4. Un modèle de potentiel pour décrire les interactions entre NCPs a été établi.

Dans une deuxième partie, les résultats de cryo-microscopie électronique seront exposés. Il sera question de la mise au point de méthodes d'imagerie et de préparation d'échantillons de NCPs isolées en films minces. Des résultats préliminaires de reconstruction d'image seront présentés.

A. Rôle des queues d'histones dans la conformation et les interactions de particules cœur de nucléosome

1. Article 1

Role of histone tails in the interaction and conformation of nucleosome core particles.

Role of Histone Tails in the Conformation and Interactions of Nucleosome Core Particles[†]

Aurélie Bertin,[‡] Amélie Leforestier,[‡] Dominique Durand,[§] and Françoise Livolant^{*:‡}

Laboratoire de Physique des Solides, CNRS UMR 8502, Bât 510, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, and Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique (LURE), Bât 209D, Université Paris-Sud, BP34, 91 898 Orsay Cedex

Received December 9, 2003; Revised Manuscript Received February 19, 2004

ABSTRACT: The goal of this work was to test the role of the histone tails in the emergence of attractive interactions between nucleosomes above a critical salt concentration that corresponds to the complete tail extension outside the nucleosome [Mangenot, S., et al (2002) *Biophys. J.* 82, 345–356; Mangenot, S., et al (2002) *Eur. Phys. J. E* 7, 221–231]. Small angle X-ray scattering experiments were performed in parallel with intact and trypsin tail-deleted nucleosomes with 146 ± 3 bp DNA. We varied the monovalent salt concentration from 10 to 300 monovalent salt concentration and followed the evolution of (i) the second virial coefficient that characterizes the interactions between particles and (ii) the conformation of the particle. The attractive interactions do not emerge in the absence of the tails, which validates the proposed hypothesis.

In vitro condensation of chromatin is known to be dependent on the presence of the histone tails of the nucleosome core (for a recent review, see ref 1). These tails correspond to the N terminal portion of all four histones, and the C terminus of histone H2A. They represent about 30% of the histone mass in the nucleosome, and are highly conserved throughout evolution. They exit out of the nucleosome and are accessible to enzymes such as acetyl transferases, and methylases, among others. Therefore, they are in position to mediate and control interactions between nucleosomes both along the chain and between chains (2–4). The major part of histone tails is not resolved in the crystalline structures, suggesting that these tails do not adopt defined positions inside the crystals. It was shown years ago by NMR experiments that the tail domains interact with DNA at low salt and are released and mobile at moderate salt (0.3–0.4 M) (5–8). Using small angle scattering experiments and well-defined samples, it was shown recently that the extension of the tails occurs at a much lower salt concentration. Their extension is completed at 50 mM monovalent salt for nucleosome core particles (NCP)¹ carrying 146 ± 3 bp DNA, and at a slightly higher salt concentration when the DNA fragment associated with the particle is longer (9). By determining the second virial coefficient, the interactions between particles were followed over the same salt range. At low salt, NCPs that are negatively charged interact via net repulsive interactions. Interestingly, the maximal exten-

sion of the tails coincides with the emergence of an attraction (9). The emergence of an attraction was confirmed by osmometry measurements, and a tail bridging hypothesis was proposed to interpret this effect (10). A theoretical investigation confirmed that bridging interactions can be obtained in a system composed of two macroions with two oppositely charged flexible chains, but it was not clear that such effects could lead to a non-monotonic variation of the second virial coefficient as observed with NCPs (11).

To test the hypothesis that the tails are responsible for this attraction, we designed a new series of experiments. A batch of nucleosomes was prepared and half of them were treated with trypsin to delete the histone tails. A comparative analysis of the two samples was performed by small angle X-ray scattering to determine whether the deletion of the tails suppressed the attractive interactions between particles. We followed the evolution of the second virial coefficient for monovalent salt concentrations ranging from 10 to 300 mM. The comparison of the intact and tail-deleted NCP clearly shows that the decrease of the second virial coefficient reaches the hard sphere limit for tail-deleted nucleosomes, whereas it decreases below this value for intact NCP. We thus verified that the attractive interactions that emerge between the particles above 50 mM come from the extended tails. We also detected minor effects of the tail-deletion on the conformation of the nucleosome, at moderate salt concentration, that were not reported yet, and become significant at low salt concentration. These effects are discussed here.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of Nucleosome Core Particles. NCP were prepared by controlled digestion of H1-depleted calf thymus chromatin with micrococcal nuclease (Pharmacia) as described by Mangenot et al (9). The NCPs were suspended in 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6 and purified by chromatography using Sephacryl S300 HR (Pharmacia). The particles were dialyzed at a concentration of 2 g L⁻¹ against

[†] This work was supported by the CNRS program (ACI Physico-chimie de la Matière Complexe).

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: livolant@lps.u-psud.fr.

[‡] Laboratoire de Physique des Solides, CNRS UMR 8502.

[§] Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique (LURE).

¹ NCP, nucleosome core particle; aa, amino acids; C_s, monovalent salt concentration; SAXS, small angle X-ray scattering; A₂, second virial coefficient; D_{max}, maximum extension of the particle; R_g, radius of gyration; P(r), distance distribution function; I(q), scattered intensity.

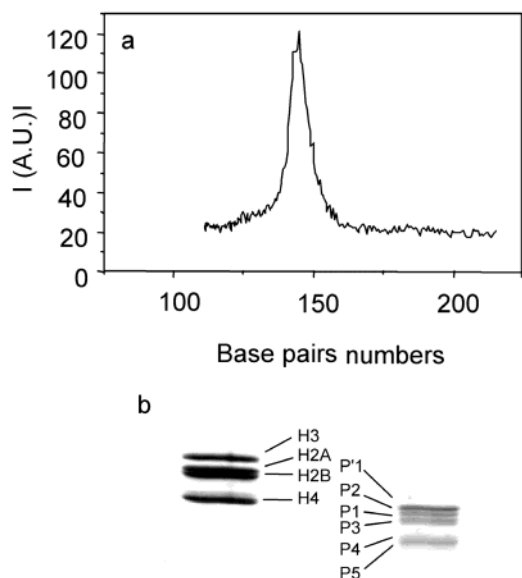


FIGURE 1: Characterization of intact and trypsinized nucleosomes. (a) The distribution profile of DNA fragments lengths (146 ± 3 bp) associated with the histone octamer was determined by scan densitometry of a BET-stained 7.5% polyacrylamide electrophoresis gel. (b) 18% polyacrylamide electrophoresis gel of proteins stained with Coomassie blue. Four bands can be seen, corresponding to the four intact histones H2A, H2B, H3, and H4 (left). For trypsinized NCPs (right), six bands are obtained (P1, P'1, P2, P3, P4, and P5), in agreement with ref 14.

10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, and concentrated to 200 g L^{-1} by ultrafiltration in a pressurized cell throughout a hydroxypropylcellulose membrane (Amicon YM100).

Trypsin Digestion of the Histone Tails. Histone tails were digested as described by Ausio et al (12), using trypsin attached to agarose beads (TPCK Sigma). Time-course experiments were performed to optimize the enzyme concentration and the digestion time to get the most homogeneous sample. A concentration of 1.3 units of enzyme per mg of NCPs and a digestion time of 7 min 30 s were chosen. Before use, the trypsin beads were washed thoroughly with 25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, and drained. The NCPs to be digested were mixed with the suspension of beads at a concentration of 1 g L^{-1} in the same buffer, and the suspension was incubated at room temperature under moderate shaking. Digestion was stopped by the removal of the agarose beads using two 5-min centrifugations at 10 000 rpm, a filtration through a $0.2 \mu\text{m}$ syringe filter (Millex, Millipore), and finally the addition of an inhibitor of the enzyme (Complete, Roche) at a ratio of 1/100 (v/v). The tail-depleted NCPs were purified by chromatography (Sephacryl S300 HR, Pharmacia) with an elution solution of 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.6. They were concentrated by ultrafiltration to a concentration of a few mg/mL in the same buffer and stored at 0°C on ice.

NCP Characterization. After DNA extraction, the length of DNA associated to the histone octamer was assessed at 146 ± 3 bp, by electrophoresis on 12% polyacrylamide gel. The distribution profile of the DNA length associated to the particles is shown in Figure 1a. The absence of any dissociation between histones octamer and DNA was checked by electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gel, under non-denaturing conditions. The histone composition of the intact or tail-deleted NCPs was determined using electrophoresis

on 18% polyacrylamide SDS gels (Figure 1b). For intact NCPs, four bands of the same intensity indicate that the four histones (H2A, H2B, H3, and H4) are present in stoichiometric amount. After controlled trypsin digestion, six bands are obtained. Trypsin removes the N-terminal regions of each core histone that extends beyond the edge of the nucleosome, and the shorter but analogous C-terminal tail of histones H2A. According to Böhm et al (13–15) and to Ausio et al (12), the six bands correspond to peptides P'1, P1, P2, P3, P4, and P5. P'1 and P1 correspond respectively to peptides 21–135 (115 aa) and 27–129 (103 aa) of H3; P2 to peptide 12–118 (107 aa) of H2A; P3 to 24–125 (102 aa) of H2B; and P4 and P5 to peptides 18–102 (85 aa) and 20–102 (83 aa) of H4. On top of these six major bands, a few minor ones (seen only when a large amount of material is deposited for electrophoresis) reveal the presence of peptides of higher molecular weight. Using a more sensitive silver staining method (16), we determined that the NCPs with incompletely digested tails represent less than 5% of the total number of NCP. This amount was acceptable to perform the proposed SAXS experiments.

The stability of the NCP was checked several times during the experiments, and we detected neither degradation of the histones nor dissociation of DNA from the histone cores.

Sample Preparation. The intact and tail-deleted NCPs solutions were dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing from 0 to 290 mM NaCl. Both Tris^+ and Na^+ ions are included in the total monovalent salt concentration C_s . We investigated C_s concentrations equal to 10, 25, 50, 100, 150, and 300 mM. 0.1 mM PMSF was added in all solutions to prevent degradation of the intact tails or further digestion of the trypsinized particles.

Solutions were concentrated by ultrafiltration to 8 g L^{-1} and the NCP concentration was determined by ultraviolet absorbance at 260 nm using respectively $A_{260} = 9.5 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ for intact NCP and $A_{260} = 10.5 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ for trypsinized NCP. Samples were further diluted to 4, 2, 1, and 0.5 g L^{-1} by weighing.

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) Experiments. The SAXS measurements were carried out on station D24 of the radiation synchrotron source DCI at LURE (Orsay, France). A wavelength of 1.488 \AA was selected by a bent germanium monochromator (Ni K-absorption edge). The sample-to-detector distance was 1880 mm. The scattering vector range was $0.01 < q < 0.19 \text{ \AA}^{-1}$, where $q = 4\pi \sin \theta/\lambda$, with 2θ being the scattering angle. The samples were injected in a quartz cell under vacuum. Eight successive frames of 100 s were recorded at room temperature. Buffer was exposed during 16 frames. To improve statistics, the acquisition was repeated two, three, or four times, depending on the NCP concentration. After each acquisition, fresh solution was moved into the beam to be sure that the measurements were not performed on damaged NCPs. No radiation damage was suspected after looking at all frames. The curves were scaled to the transmitted beam before background subtraction.

SAXS Data Analysis. Considering noninteracting particles, the scattering intensity at small q values can be written according to the Guinier approximation (17):

$$I(q) = I(0)_{\text{ideal}} \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (1)$$

The intensity at null scattering angle ($q = 0$) is expressed by

$$I(0) = V_{\text{sol}} \frac{CM}{N_A} \left(\frac{m_p N_A}{M} - \rho_s \overline{V_p} \right)^2 \quad (2)$$

where C is the NCP concentration (w/v), M the NCP molecular weight, N_A the Avogadro number, m_p the number of electrons in the dry particle, ρ_s the electron density of the buffer, and $\overline{V_p}$ is the partial specific volume of the particle.

R_g is the radius of gyration of the NCP, which can be expressed as follows:

$$R_g^2 = \frac{\int_v r^2 \Delta\rho(r) d^3r}{\int_v \Delta\rho(r) d^3r} \quad (3)$$

For a nearly spherical particle, this approximation can be used when $qR_g < 1.3$. Experimentally, R_g and $I(0)$ are obtained by fitting $\ln(I(q))$ as a function of q^2 . Additional information about the particle conformation can be obtained from the distance distribution function $P(r)$ of the particle, which is the Fourier transform of the scattering intensity $I(q)$:

$$P(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} q^2 dq \quad (4)$$

$P(r)$ goes to zero for distances larger than the maximal dimension D_{max} of the particles. $P(r)$ was evaluated using the program GNOM (18, 19). The radius of gyration can also be assessed from the distance distribution function $P(r)$:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\text{max}}} r^2 P(r) dr}{2 \int_0^{D_{\text{max}}} P(r) dr} \quad (5)$$

For interacting particles, the scattering intensity is modified. It can be expressed as

$$I(q, C) = I(q)_{\text{ideal}} S(q, C) \quad (6)$$

$I(q)_{\text{ideal}}$ is the scattering intensity in the absence of interactions and is called the form factor. $S(q, C)$ is the structure factor, characterizing the interactions between particles. The scattering intensity at null scattering angle can be expressed as a function of the concentration of the particle C :

$$I(0, C) = \frac{I(0)_{\text{ideal}}}{1 + 2MA_2C + 3MA_3C^2 + \dots} \quad (7)$$

with M the molecular mass of the particle, A_2 the second virial coefficient that is related to the two particles interactions, and A_3 the third virial coefficient which characterizes the three particles interactions. Considering the particle concentrations used here ($0.5\text{--}4 \text{ mg mL}^{-1}$), the third virial coefficient can be neglected and the equation above is modified as follows:

$$I(0, C) = \frac{I(0)_{\text{ideal}}}{1 + 2MA_2C} \quad (8)$$

A_2 is deduced from the slope of the curve $1/I(0, C)$ as a

function of the concentration C . $I(0, C)$ is obtained by the Guinier approximation. The second virial coefficient A_2 simply discriminates between attractive and repulsive interactions. Net repulsive interactions lead to a positive A_2 , while attractive interactions correspond to negative A_2 values.

To obtain the form factor $I(q)_{\text{ideal}}$ free from interparticle interactions, it is advisable to collect scattering patterns $I(q, C)$ at very low concentration C (e.g., 0.5 mg/mL). In the case of strong interactions, it is even better to extrapolate to zero concentration $I(q, C)$ curves measured at several concentrations C (e.g., 0.5, 1, 2, and 4 mg/mL). Both methods allowed us to obtain an undistorted pattern in the low angle region. In our case, the latter procedure was used only for trypsinized samples at 10 mM where the interactions are strongly repulsive. For the high angle region ($q > 0.05 \text{ \AA}^{-1}$), which is unaffected by interparticle interactions, concentrated solutions (e.g., 4 mg/mL) were used to improve the statistics.

RESULTS

Salt Effects on the Intact and Trypsinized Nucleosome Core Particles. Two series of experiments were performed in parallel, one with intact NCP, and the other with trypsin-digested NCP, prepared from the same batch of nucleosomes.

To follow the shape of the intact NCP, the form factor, $I(q)_{\text{ideal}}$ was analyzed for monovalent salt concentrations C_s ranging from 10 to 300 mM. Over the explored salt range, the form factors of intact NCP are similar at high q values ($q > 0.03 \text{ \AA}^{-1}$). Particles keep the same general conformation between 10 and 300 mM monovalent salt concentration. An example is given in Figure 2a for $C_s = 50$ mM. Distance distribution functions were also calculated from the $I(q)_{\text{ideal}}$ curves obtained as explained above for the different salt concentrations, using GNOM. Three of them at 10, 50, and 150 mM monovalent salt concentration are presented in Figure 3a. To prevent any effect of interactions at the smallest q values on the $P(r)$ calculations, distribution functions were computed using a q range $q > 0.0217 \text{ \AA}^{-1}$. They are scaled to the intensity at the origin $I(0)$.

For each salt concentration, the maximum extension of the particle D_{max} and the radius of gyration R_g were obtained from the distance distribution function $P(r)$. The radii of gyration obtained from Guinier approximation and from the $P(r)$ curves are not strictly identical but in good agreement, the slight differences remaining within the error bars. As C_s increases, R_g values rise from $42.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$ and plateau at a value of $44.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$. This plateau value is reached for $50 \leq C_s \leq 100$ mM (Figure 4a). Simultaneously, the maximal extension of the particle D_{max} goes from $127 \pm 5 \text{ \AA}$ to a plateau value at $147 \pm 5 \text{ \AA}$ (Figure 5a) as noticed on the distance distribution curves (Figure 3a).

After trypsinization of the tails, form factors do not superimpose anymore for high values of the scattering angle ($q > 0.03 \text{ \AA}^{-1}$) at all salt concentrations. For example, the experimental curves recorded at $C_s = 10$ and 50 mM, given in Figure 2b, reveal that the second minimum (at $q = 0.14 \text{ \AA}^{-1}$) is less pronounced at 10 mM. This means that the conformation of the NCP does not remain unchanged over the explored salt range. The values of the radius of gyration R_g decrease from 46 ± 0.5 to $42.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$ as the salt concentration increases from 10 to 50 mM and further increase up to $44 \pm 0.5 \text{ \AA}$ at 300 mM (Figure 4b). The

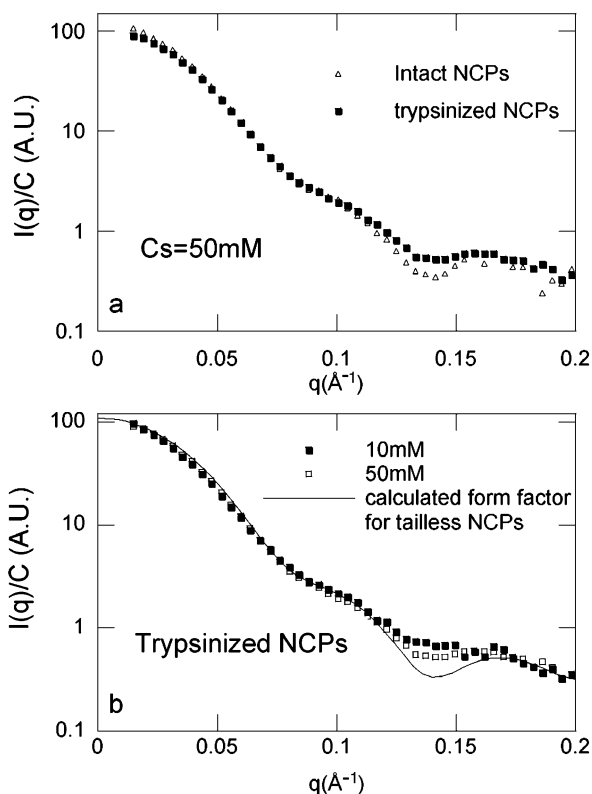


FIGURE 2: Form factors recorded for intact and trypsinized NCPs for different salt concentrations. (a) The form factors for intact (Δ) and trypsin-digested (\blacksquare) NCPs do not superimpose for $C_s = 50$ mM. (b) Comparison of the form factors recorded with trypsin-digested NCP at $C_s = 10$ mM (\blacksquare) and $C_s = 50$ mM (\square) and calculated for tailless particles (—). The calculated form factor presents a lower second minimum at 0.14 \AA^{-1} that is much less pronounced in experimental curves, especially at 10 mM (\blacksquare). The program CRY SOL (18) was used to calculate the scattering intensity, using the PDB file 1eqz from which amino acids belonging to the tails were discarded.

maximal extension of the particle follows the same evolution. It is maximum at 10 mM NaCl ($D_{\text{max}} = 154 \pm 5 \text{ \AA}$). It further decreases to $137 \pm 5 \text{ \AA}$ between 25 and 50 mM NaCl and increases again up to $148 \pm 5 \text{ \AA}$ at 300 mM (Figure 5b).

Interactions between Nucleosome Core Particles. For each salt concentration, the scattering profiles were recorded for intact and trypsinized NCP at concentrations of 0.5 , 1 , 2 , and 4 mg/mL NCP. Figure 6a shows the data collected for $C_s = 10 \text{ mM}$ with trypsinized NCPs. The scattered intensity at very low q values decreases when the NCP concentration is raised, which is the signature of repulsive interactions between NCPs. Similar observations were done on intact NCPs. The value of the second virial coefficient A_2 can be derived from these $I(q)$ values, using eq 8 (Figure 6b). A_2 values obtained for both intact and trypsinized NCPs are plotted in Figure 7. For intact NCPs, A_2 values are positive at low salt concentration. They drop when the salinity rises from 10 to 50 mM and become negative above 50 mM . This means that interactions turn from repulsive in the low salt range ($10 < C_s < 50 \text{ mM}$) to attractive above 50 mM . These observations are consistent with the observations of Mangenot et al (9). It can be noticed that at 300 mM , the value of the second virial coefficient is slightly higher, although remaining negative, showing less attractive interactions. For trypsin-digested NCPs, values of the second virial coefficient are positive whatever the salt concentration between 10 and

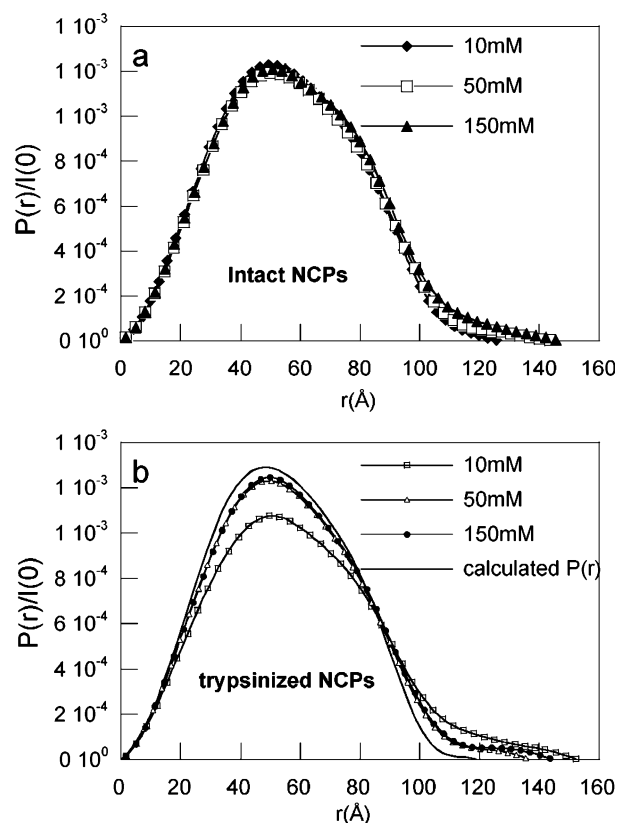


FIGURE 3: Distance distribution functions $P(r)$ obtained for intact (a) and trypsin-digested NCP (b). The curves are scaled to the intensity at the origin $I(0)$. Each $P(r)$ function goes to zero at a distance r that corresponds to the maximum extension of the particle D_{max} . (a) For intact NCP, the $P(r)$ functions recorded at monovalent salt concentrations of 10 (\blacklozenge), 50 (\square), and 150 mM (\blacktriangle) exhibit similar shapes except for the highest distances. (b) For trypsin-digested NCP, $P(r)$ curves were recorded at 10 (\square), 50 (\triangle), and 150 mM (\bullet). The $P(r)$ function was also calculated for a tailless particle using CRY SOL (18) and the PDB file 1eqz from which amino acids belonging to the tails were discarded (—). The calculated $P(r)$ leads to a maximal extension value lower than the experimental ones. The curve recorded at 10 mM salt concentration (\square) differs significantly from the other curves.

300 mM . Interactions between trypsin-digested NCPs remain repulsive. More precisely, A_2 decreases from 10 to 50 mM and reaches a plateau above 50 mM . This plateau is very close to the A_2 value calculated for the hard sphere potential of the NCP. The hard sphere value of A_2 is related to the excluded volume and is equal to $4\nu NA/M^2 = 4.9 \times 10^{-8} \text{ mol L g}^{-2}$, where ν is the volume of the particle.

DISCUSSION

Shape of the Intact NCP. Using intact calf thymus nucleosome cores particles with $146 \pm 3 \text{ bp}$ DNA, we confirmed the observations of Mangenot et al (9) performed with NCP prepared from chicken blood cells, and carrying the same DNA fragment length. When the monovalent salt concentration is raised from 10 to 50 mM monovalent salt, the maximum extension of the particle D_{max} increases progressively. D_{max} further stabilizes at a plateau value above 50 mM . This increase of the maximum extension of the particle was interpreted as a salt-induced change of the conformation of the histone tails. The tails are condensed onto DNA at the periphery of the particle at low salt and they extend outside of the particle when the salt concentration

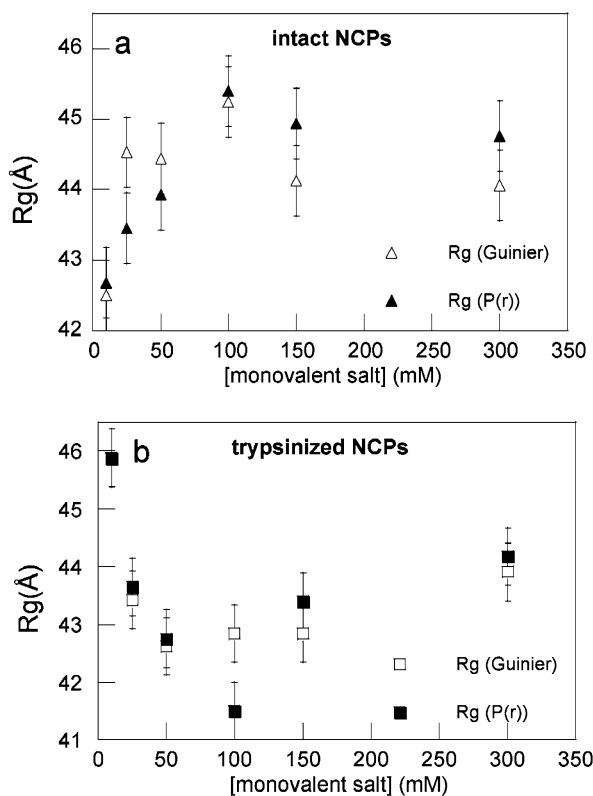


FIGURE 4: Variation of the radius of gyration R_g for intact (a) and trypsinized NCPs (b) as a function of the monovalent salt concentration. Radii of gyration were calculated both by the Guinier approximation (empty symbols) and using $P(r)$ functions (filled symbols). (a) R_g values rise from 42.5 ± 0.5 to 44.5 ± 0.5 Å. (b) For trypsinized NCPs, the values of the radius of gyration R_g decrease from 46 ± 0.5 to 42.5 ± 0.5 Å as the salt concentration increases from 10 to 50 mM and further increase up to 44 ± 0.5 Å at 300 mM.

is increased. As expected, a very small increase of the radius of gyration R_g correlates with this increase of D_{\max} . Nevertheless, minor differences can be noticed between the two series of experiments. The maximum extension of the particle increases from 127 ± 5 to 145 ± 5 Å in the present study, from 137 ± 5 to 165 ± 5 Å in the previous one (9).

In the previous experiments, we observed a significant increase of the $I(q)$ values, at low q , for increasing NCP concentrations, for salt concentrations $C_s \geq 100$ mM. This effect prevented us from determining the A_2 value for $C_s \geq 100$ mM. This effect is not observed in the present experiments, suggesting that the purity of the sample was improved. As reported in Mangelot et al (9), models of the NCP were built, using the crystallographic coordinates published by Harp et al (2000) (pdb file 1eqz) (20) to which the 102 missing amino acids of the tails were added in a random coil configuration. Tools from Turbo-FRODO (21) were used to build two models: one with the tails extended away from the particle, in the “extended conformation”, and the other with the tails close to the DNA surface, in the “compact conformation”. $I(q)$ curves were then calculated for ideal solutions of these two modeled conformations, using the program CRY SOL (18). A good fit between calculated and experimental $I(q)$ curves was obtained by placing the tails not too close to the DNA in the compact conformation. In the extended conformation, we observed (see Figure 8 in ref 9) that the end-to-end distance for a tail containing 25

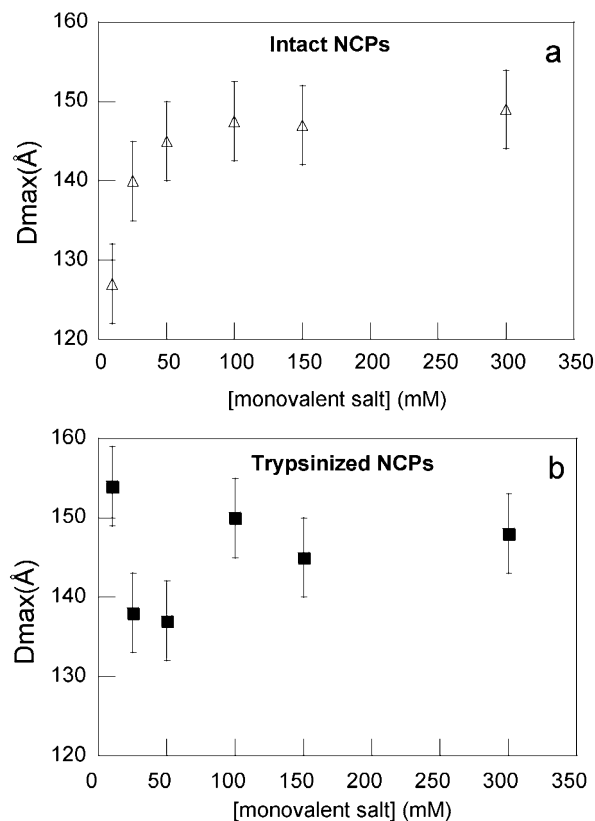


FIGURE 5: Variation of the maximal salt extension of the particle D_{\max} as a function of the monovalent salt concentration for intact (a, Δ) and trypsinized NCPs (b, \blacksquare). (a) For intact NCPs, D_{\max} goes from 127 ± 5 to 147 ± 5 Å as the salt concentration increases from 10 to 50 mM. These values plateau between 50 and 300 mM. (b) For trypsinized NCPs, D_{\max} is maximum at 10 mM NaCl ($D_{\max} = 154 \pm 5$ Å). It further decreases to 137 ± 5 Å between 25 and 50 mM NaCl and increases again up to 148 ± 5 Å at 300 mM.

aa was about 50–55 Å long, slightly more than the expected value (42 Å) for a polypeptide chain with a persistence length of about 10 Å. Considering these new experimental data, the tails are closer to DNA in the compact conformation and not stretched anymore in the extended conformation.

As a conclusion, this new series of experiments confirms our previous observations (9) and demonstrates that the conformation of the intact nucleosome slightly changes with the salt concentration. The tails are condensed onto DNA at low salt and extend when the salt concentration is raised. For NCP with 146 bp associated DNA, the extension of the tails is completed at 50 mM, well below the salt concentration at which any change of the NCP conformation had been detected by other methods (for a review, see ref 1). Moreover, the quality of the data collected in this new series of experiments gave us a more quantitative evaluation of conformational changes. This sample was therefore perfectly suited to test the hypothesis that the extended tails create attractive interactions between the particles.

Salt Dependence of NCP Interactions in Intact and Trypsinized NCP. With intact NCP, the second virial coefficient A_2 varies as described previously (9). A_2 values are positive at low salt concentration. These values decrease with the increase of salt concentration, become null at $C_s = 50$ mM, which corresponds to the full extension of the tails and turn negative above. A small increase of the A_2 values occurs at $C_s = 300$ mM, although they remain negative. For trypsinized

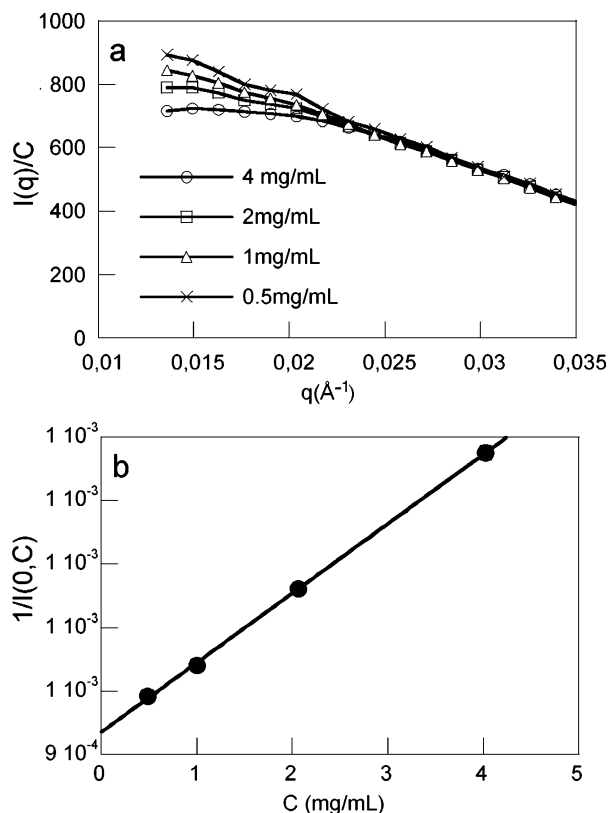


FIGURE 6: Method used to determine the second virial coefficient; example of trypsinized particles at 10 mM monovalent salt concentration. (a) Scattered intensities at small angle values ($q = 4\pi \sin \theta/\lambda < 0.035 \text{ \AA}^{-1}$) are normalized by the particle concentration. The scattered intensity increases when the NCP concentration is lowered, which indicates repulsive interactions between particles in this case. (b) The curve $1/I(0,C)$ as a function of the NCP concentration is a straight line. The slope of this line is related to the second virial coefficient and is equal to $2MA_2/I(0)$ (cf. eq 8).

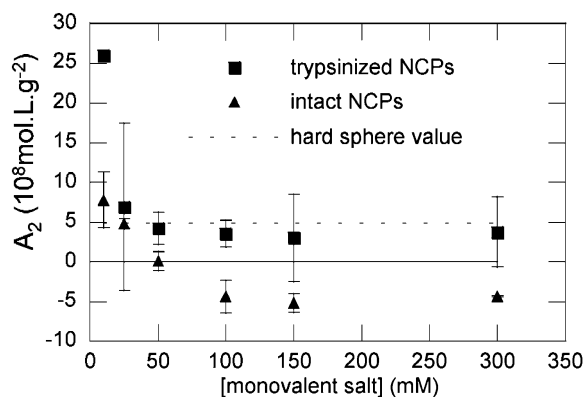


FIGURE 7: Variation of the second virial coefficient as a function of the monovalent salt concentration for intact (\blacktriangle) and trypsinized (\blacksquare) NCPs. The dotted line corresponds to the hard sphere value and the continuous line corresponds to the null A_2 value. For intact NCPs, A_2 values are positive at low salt concentration. They drop when the salinity rises from 10 to 50 mM and become negative above 50 mM. For trypsinized NCPs, the second virial coefficient remains positive over all range of salt concentration. A_2 decreases from 10 to 50 mM and reaches a plateau above 50 mM. This plateau is very close to the A_2 value calculated for the hard sphere potential of the NCP.

NCP, the A_2 values also decrease when the salt concentration is raised, and tend to the hard sphere value calculated for tail-deleted NCP. A_2 values remain positive and constant for

$C_s \geq 50 \text{ mM}$. Keeping in mind that negative A_2 values reveal attractive interactions between particles, we conclude that the attractive part of the potential has been suppressed by the elimination of the tails. We thus verified that the attractive part of the potential that exists between the particles above 50 mM comes from the extended tails (9, 10).

The role played by the histone tails in the nucleosome–nucleosome interactions has been explored for years because of its importance in the understanding of chromatin organization. In the presence of monovalent ions (NaCl), reconstituted oligonucleosomes depleted of their tails by trypsinization, remain unfolded upon addition of NaCl and are unable to achieve higher levels of compaction (22). Butinelli et al (23) also beautifully described how the cooperativity in assembling histone cores onto supercoiled DNA is remarkably decreased after the tails of the octamer histones have been trypsinized, showing that the tails are needed for nucleosomes to attract each other on the supercoiled plasmid DNA. Widlund et al (24), using a comparison of histones partitioning between donor histones (either histone cores, mononucleosomes, or long H1-depleted chromatin fragments) to acceptor short DNA fragments of given sequences, also noticed the “unwillingness” of histone octamers to transfer from the oligonucleosome filament to form mononucleosomes. The authors interpret these data as the existence of internucleosomal interactions in chromatin that add to the intranucleosomal interactions between DNA and histones. Furthermore, they showed that these internucleosomal interactions are lost when the histone tails are trypsinized. Similar observations were done in the presence of divalent (MgCl_2) cations: trypsinized nucleosomal arrays are also incapable of folding upon addition of 2 mM MgCl_2 (25). More recently, nucleosome arrays were self-assembled with recombinant, posttranslationally unmodified histone proteins. Upon addition of MgCl_2 , fully compacted chromatin fibers are obtained with any one of the histone tails deleted, with the exception of the H4 N terminus. More precisely, the amino acids residues 14–19 of H4 contain structural features critical for the formation of the fiber. The importance of this tail was already pointed out from crystallographic studies (26).

All these observations were done on nucleosome chains, either linear or circular. To our knowledge, the effect of tail deletion has not been analyzed so far separately from the effect of DNA sequence and topology that have been shown to interfere with tails effects in the emergence of these interactions between NCP (23, 24). Our results clearly establish that in the absence of DNA linking nucleosomes together, histone tails mediate the attractive interactions between NCP above a critical monovalent salt concentration.

Conformation of Trypsinized Nucleosome Core Particles. Trypsinized NCP have been widely used in many laboratories as models of hyperacetylated NCP since the histone extremities cleaved by trypsin carry all the lysine residues that are subject to regulated acetylation in vivo. It is generally accepted that these “tailless” nucleosomes remain otherwise intact in vitro (12, 27–30). The ability of X-ray diffraction methods to detect small conformational changes has been demonstrated above with intact nucleosomes. It was therefore tempting to look for possible slight changes of the structure of the nucleosome core introduced by the removal of the tails, possibly undetected yet by less sensitive methods.

In the absence of any crystallographic structure of the tailless nucleosome core particle, the form factor of the NCP deleted from its tails has been calculated, using the crystallographic data published by Harp et al (20) from which the amino acids supposedly deleted by trypsin digestion of the tails were removed. The calculated $I(q)$ curve does not fit very well with the experimental curves, whatever the salt concentration is (Figure 2a). The less pronounced minimum in the form factor observed at 0.14 \AA^{-1} , compared to the calculated curve (Figure 2a) and to the experimental curve of the intact NCP (Figure 2b), reveals that the shape of the particle deviates slightly from the initial cylindrical shape of the NCP. The values calculated for the maximal extension of the particle ($D_{\max} = 120 \text{ \AA}$) and for its radius of gyration ($R_g = 41.3 \text{ \AA}$) are also notably different from the experimental values (see Figures 4 and 5). It thus appears that the structure of the trypsinized NCP at 50 mM NaCl is slightly different from the crystallographic structure of the intact NCP simply deleted of its tails. The differences are a little more pronounced at 25 mM, and the structure differs significantly from the crystallographic structure at 10 mM. At this salt concentration, the minimum in the form factor almost disappeared and the R_g (45.8 \AA) and D_{\max} values (153 \AA) are far from both the values found experimentally for the intact NCP at the same salt concentration (42.5 and 128 \AA , respectively) and the values calculated for the tailless NCP ($R_g = 41.3 \text{ \AA}$ and $D_{\max} = 120 \text{ \AA}$). On account of these structural changes, we may wonder whether trypsin digestion (even under precisely controlled conditions) also introduced other protein cleavages inside the octamer core. The observation of six bands on SDS-PAGE electrophoresis, as already reported by others (14), instead of the expected three bands found in reconstituted recombinant tail-deleted reconstituted NCP (30) and in trypsinized histones prepared from chromatin fragments (31) shows that the tail digestion is not as precise as we would like it to be. Nevertheless, we never observed shorter polypeptide fragments migrating faster than these fragments in gel electrophoresis, even in highly loaded gels, showing that there is no reproducible protein cuts inside the protein core. Moreover, the linearity of $\ln(I)$ as a function of q^2 at low q , attests that the polydispersity is low. Our feeling is that the quality of the samples is as good as we can expect from this trypsinization method, and that the internal structure of the histone octamer is preserved. So, we most likely detected by this low angle scattering method subtle progressive changes of the nucleosome core conformation in the moderate salt concentration range (50–25 mM) that turn significant at 10 mM. Either partial dissociation of the DNA from the histone core or distortions of the core itself could account for such structural changes.

The hypothesis of a partial dissociation of DNA from the histone octamer is supported by theoretical and biological arguments. In the moderate salt range, although structural changes were not described, several observations were done that support the hypothesis of a partial dissociation of DNA from the histone core upon deletion of the tails: (i) The accessibility of DNA for DNase digestion was increased on 12-mers oligonucleosomes (22) as well as on reconstituted isolated nucleosome core particles (30); (ii) removal of the tails also leads to a significant but small increase in the position-dependent equilibrium constants for site exposure

(31) and (iii) reduces the ability of the histone octamer to discriminate between nucleosome positions in reconstitution experiments. The predominant positioning remains the same in the tailless nucleosome, but there is a modestly increased population of alternative positions (31). When lowering the salt concentration to 10 mM, this effect is even more important with trypsinized NCP and suggests a destructure of the particle. It can be noticed that intact NCP are also sensitive to such effects at much lower salt concentration (32). It can be concluded that the tails are essential to maintain the stability of the NCP to lower salt concentration. To go further in the description of the structural changes that happen at low salt concentration in the presence and in the absence of the tails, there is no doubt that experiments should be performed on recombinant nucleosomes.

As a conclusion, we confirm that for nucleosomes with 146 bp DNA, the salt-induced extension of the histone tails is completed before any other structural change of the nucleosome has occurred, at $C_s = 50 \text{ mM}$. The suppression of the tails suppresses the attractive interactions that emerge between NCP above salt concentration for which the histone tails are fully extended. The presence of the tails is therefore necessary for the emergence of this attraction. Nevertheless, the structure of the nucleosome core after trypsin digestion of the tails is not identical to the crystallographic structure of the NCP simply deleted of tails. Further studies should be done with recombinant NCP to establish how the absence of the tails change the structure of the nucleosome core with reference to the structure of the core of the intact NCP, and whether it is possible to discriminate between separate tails effects in these attractive interactions.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Eric Raspud for many fruitful discussions all along this work and Patrice Vachette for assistance in using beamline D24 at LURE.

REFERENCES

- Zheng, C., and Hayes, J. J. (2003) Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers* 68, 539–546.
- Schwarz, P. M., Felthauer, A., Fletcher, T. M., and Hansen, J. C. (1996) Reversible oligonucleosome self-association: dependence on divalent cations and core histone tail domains. *Biochemistry* 35, 4009–4015.
- Widom, J. (1998) Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 285–327.
- Wang, X., He, C., Moore, S. C., and Ausio, J. (2001) Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. *J. Biol. Chem.* 276, 12764–12768.
- Cary, P., Moss, T., and Bradbury, M. (1978) High-resolution proton-magnetic-resonance studies of chromatin core particles. *Eur. J. Biochem.* 89, 475–482.
- Walker, I. O. (1984) Differential dissociation of histone tails from core chromatin. *Biochemistry* 23, 5622–5628.
- Hilliard, P. R., Smith, R. M., and Rill, R. L. (1986) Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of histone and DNA dynamics in nucleosome cores. *J. Biol. Chem.* 261, 5992–5998.
- Smith, R. M., and Rill, R. L. (1989) Mobile histone tails in nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 264, 10574–10581.
- Mangenot, S., Leforestier, A., Vachette, P., Durand, D., and Livolant, F. (2002) Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles. *Biophys. J.* 82, 345–356.
- Mangenot, S., Raspud, E., Tribet, C., Belloni, L., and Livolant, F. (2002) Interactions between isolated nucleosome core particles: A tail-bridging effect? *Eur. Phys. J. E* 7, 221–231.

11. Podgornik, R. (2003) Two-body polyelectrolyte-mediated bridging interactions. *J. Chem. Phys.* *118*, 11286–11296.
12. Ausio, J., Dong, F., and van Holde, K. E. (1989) Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone “tails” in the stabilization of the nucleosome. *J. Mol. Biol.* *206*, 451–463.
13. Bohm, L., Briand, G., Sautiere, P., and Crane-Robinson, C. (1981) Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of the limit peptides of histones H3 and H4. *Eur. J. Biochem.* *119*, 67–74.
14. Bohm, L., and Crane-Robinson, C. (1984) Proteases as structural probes for chromatin: the domain structure of histones. *Biosci. Rep.* *4*, 365–386.
15. Bohm, L., Crane-Robinson, C., and Sautiere, P. (1980) Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of a limit peptide of histone H2A. *Eur. J. Biochem.* *106*, 525–530.
16. Merrill, C. R. (1990) Silver staining of proteins and DNA. *Nature* *343*, 779–780.
17. Guinier, A., and Fournet, G. (1955) *Small Angle Scattering of X-rays*, Wiley, New York.
18. Svergun, D. I., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL: a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* *28*, 768–773.
19. Svergun, D. I., Semenyuk, A., and Feigin, L. A. (1988) Small-angle scattering angle data treatment by the regularization method. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* *44*, 244–250.
20. Harp, J. M., Hanson, B. L., Timm, D. E., and Bunick, G. J. (2000) Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* *56 Pt 12*, 1513–1534.
21. Roussel, A., and Cambillau, C. (1989) TURBO-FRODO, Silicon Graphics, Mountain View, CA.
22. Garcia-Ramirez, M., Dong, F., and Ausio, J. (1992) Role of the histone “tails” in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J. Biol. Chem.* *267*, 19587–19595.
23. Buttinelli, M., Leoni, L., Sampaolese, B., and Savino, M. (1991) Influence of DNA topology and histone tails in nucleosome organization on pBR322 DNA. *Nucleic Acid Res.* *19*, 4543–4549.
24. Widlund, H. R., Vitolo, J. M., Thiriet, C., and Hayes, J. J. (2000) DNA sequence-dependent contributions of core histone tails to nucleosome stability: differential effects of acetylation and proteolytic tail removal. *Biochemistry* *39*, 3835–3841.
25. Fletcher, T. M., and Hansen, J. C. (1995) Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.* *270*, 25359–25362.
26. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
27. Ausio, J., and van Holde, K. E. (1986) Histone hyperacetylation: its effects on nucleosome conformation and stability. *Biochemistry* *25*, 1421–1428.
28. Dumuis-Kervabon, A., Encontre, I., Etienne, G., Jauregui-Adell, J., Mery, J., Mesnier, D., and Parello, J. (1986) A chromatin core particle obtained by selective cleavage of histones by clostripain. *EMBO J.* *5*, 1735–1742.
29. Hayes, J. J., Clark, D. J., and Wolffe, A. P. (1991) Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 6829–6833.
30. Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Waye, M. M., and Richmond, T. J. (1997) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* *272*, 301–311.
31. Polach, K. J., Lowary, P. T., and Widom, J. (2000) Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes. *J. Mol. Biol.* *298*, 211–223.
32. Yager, T. D., McMurray, C. T., and van Holde, K. E. (1989) Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles. *Biochemistry* *28*, 2271–2281.

BI036210G

2 Article 2 :

Role of H3 and H4 histone tails in the interaction and conformation of recombinant Nucleosome Core Particles in solution.

Aurélié Bertin was supported by fellowships from CNRS (Centre National pour la Recherche Scientifique) and from ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer).

Aurélié Bertin[‡], Madalena Renouard[‡], Jan Skov Pedersen[§], Françoise Livolant[‡] and Dominique Durand[†].

[‡]Laboratoire de Physique des Solides, CNRS UMR 8502, Bât 510, Université Paris-Sud, Orsay, France.

[†]Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 8619, Bât 430, Université Paris Sud, Orsay, France.

[§]Department of Chemistry and iNANO Interdisciplinary Nanoscience Centre, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus C, Denmark.

Abstract

Interactions between native calf thymus Nucleosome Core Particles (NCPs) have been investigated by Small Angle X-ray Scattering (SAXS). In order to get insight into the specific roles of the histone tails and to elucidate the nature of the interactions, perfectly monodisperse recombinant reconstituted NCPs were used. Dilute solutions of intact and gH3gH4 NCPs (particles deprived of both H3 and H4 histone tails) were investigated. The conformation of intact NCPs agrees with the NCP 3D crystal structure *s*. In contrast to this, for gH3gH4 NCP, the results suggest that DNA ends are slightly extending from the particle core, leading to a rather open conformation. A pair potential model was used to describe interactions between NCPs. At all salt concentrations, interactions between gH3gH4 NCPs are best described by only repulsive interactions. For intact NCPs, an additional attractive term is required to account for inter particle interactions above 50mM monovalent salt. The results are in agreement with a previous study [Bertin *et al.* (2004) *Biochemistry* 43, 4773-4780] which showed that in dilute solution, above a critical salt concentration, interactions between native calf thymus Nucleosome Core Particles (NCPs) turn from attractive to repulsive after histone tails removal by trypsinization. The present results validate the hypothesis that, upon extension, histone N and C terminal extensions induce attractive interactions between NCPs.

Introduction

Chromatin is made of periodic repetitive units called nucleosome and connected by linker DNA. A left-handed helix of 146 DNA base pairs wraps around a histone octamer to form a NCP. The histone octamer assembles four different histones each in two copies. About 30% of the histone total mass is not structured (Luger *et al.*, 1997) and is located in the N and C terminal amino-acid sequence portion. Those tails are mobile (Smith and Rill, 1989; Hilliard *et al.*, 1986) and can extend beyond the particle core (Mangenot *et al.*, 2002.a; Bertin *et al.*, 2004). NCPs are highly heterogeneously charged colloidal particles. Negative charges are mainly located along the peripheral DNA corona. Histones carry a net positive charge and histone tails are particularly positively charged. The ratio of basic to acidic amino acids is higher in the tails than in the global sequence.

In vivo, histone tails are modified by post-translational modifications such as acetylation or methylation (Rice and Allis, 2001, Strahl and Allis, 2000). These modifications establish a "histone code" that controls chromatin organization, accessibility and activity (Strahl and Allis, 2000). Acetylation that neutralises lysine positive charges and methylation mostly affect H3 and H4 histone tails and spare H2A and H2B. . Hyperacetylated chromatin is known to be

decondensed, accessible to transcription factors and genetically active (Cheung *et al.*, 2000).

Under *in vitro* hyperacetylation, isolated chromatin chains require multivalent salts to reach a high condensation state (Pollard *et al.*, 1999, Tse *et al.*, 1998, Annunziato *et al.*, 1988, Garcia-Ramirez *et al.*, 1995). More precisely, specific acetylation of histone H4 lysine 16 seems to be sufficient to prevent nucleosome arrays condensation (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Hyperacetylation can be modelled by the removal of histone tails that can be obtained either by enzymatically chopping tails or by using recombinant tailless histones. Nucleosome oligomers deprived of some of the histone tails remain indeed only partially condensed as compared with native ones (Garcia-Ramirez *et al.*, 1992; Fletcher and Hansen, 1995; Tse and Hansen, 1997; Gordon *et al.*, 2005). Histone H3 and H4 tails seem to be more involved than H2A and H2B in controlling and inducing chromatin folding upon divalent cations addition. Removal of both H3 and H4 histone tails prevents chromatin from complete folding (Krajewski and Ausio, 1996, Tse and Hansen, 1997). H3 histone tails seem to participate in intra-nucleosome interactions when nucleosome arrays are decondensed while they engage inter-nucleosomal interactions upon salt-dependent folding (Zheng *et al.*, 2005). Dorigo *et al.* (2003) have shown that histone H4 tails alone appear

to be necessary for getting fully compacted chromatin. Not only seems histone H4 tail involved in chromatin compaction but this specific tail is necessary for ATPase activity of remodelling factors such as ISWI and NURF (Clapier *et al.*, 2001; Hamiche *et al.*, 2001). More recently, Gordon *et al.* (2005) have shown that all four histone tails contribute additively and independently to chromatin chains oligomerization.

We have moreover shown, with isolated particles that histone tails are necessary for building attractive interactions between nucleosome core particles. Mangenot *et al.* (2002 a,b) have shown that attractive interactions between calf thymus chicken erythrocytes NCPs occur simultaneously with histone tails extension, above 50mM monovalent salt. A tail-bridging hypothesis for attractive interaction has been proposed. Bertin *et al.* (2004) have tested and confirmed that hypothesis using trypsinized calf thymus nucleosome core particles. Removal of histone tails actually cuts down the attractive interaction term.

We propose here to get more insight in the specific role of H3 and H4 histone tails in internucleosomal interactions and nucleosome conformation. Intact NCPs and NCPs deprived of both H3 and H4 histone tails (designed as gH3gH4, globular histones being distinguished by the letter g) were reconstituted from recombinant DNA and histones. Using perfectly monodisperse particles of defined size and charge, particles interactions and conformation could be considered more accurately. SAXS was used to evaluate conformation and interactions simultaneously. An interaction pair potential model was used to assess second virial coefficients and to describe interactions between NCP. For gH3gH4 NCPs, interactions could be well described with repulsive interactions exclusively. For intact NCPs, an attractive term was involved to describe attractive interactions occurring above 50mM salt concentration, simultaneously with tail extension. NCPs conformations in solution appear to be similar to NCPs conformation in dense crystals. Instead, gH3gH4 NCPs exhibit small conformational particularities.

Material and methods

Recombinant reconstituted Nucleosome Core Particle preparation

Nucleosome core particles were prepared as described by Dyer *et al.* (2004).

5S 146 base pairs DNA purification. HB101 *E. Coli* cells were transformed by pTJR2 plasmids (Richmond *et al.*, 1988) and grown in "Terrific Broth". Amplified plasmids containing 146 bases pairs 5S DNA repeats were purified by an alkaline

lysis process. Plasmids were digested with ECO 321 (Fermentas) restriction enzyme, an ECO RV analogue. Linearized pUC9 plasmid was separated from 146 base pairs fragments by precipitation with 6% PEG 6000. 5S 146 base pairs DNA fragments were eventually purified using an anion exchange chromatography column (DEAE-5PW, Tosohaas).

Intact and globular histone purification. BL21DE3-pLysS *E.Coli* cells were transformed with pET plasmids corresponding to either intact or globular histones (Luger *et al.*, 1997). The globular histones were so called after their participation in the structured protein portion, as compared with the terminal extensions unstructured section. Histones were expressed during two hours following IPTG induction. After growth and harvest, cells were subjected to a flash freeze/thaw cycle. Cells were homogenized using a blender. Inclusion bodies were then isolated. Histones purification was carried on in two steps in buffers containing urea 7M, NaAC 20mM, pH5.2, β -mercaptoethanol 5mM and NaCl. They were first purified by size exclusion chromatography using a Sephacryl S-200 1.8L column (Amersham Bioscience) and purified again by ion-exchange chromatography using a TSK SP-5PW Tosohaas gel. Purified histones were finally dialyzed against 5mM β -mercaptoethanol in water, lyophilized and aliquoted. After histone production and purification, histone purity was checked by electrophoresis on 15% SDS-PAGE polyacrylamide gels. For any full-length or tailless histone, one single band could be observed on electrophoresis gels (Figure 1a; and 1.b, respectively).

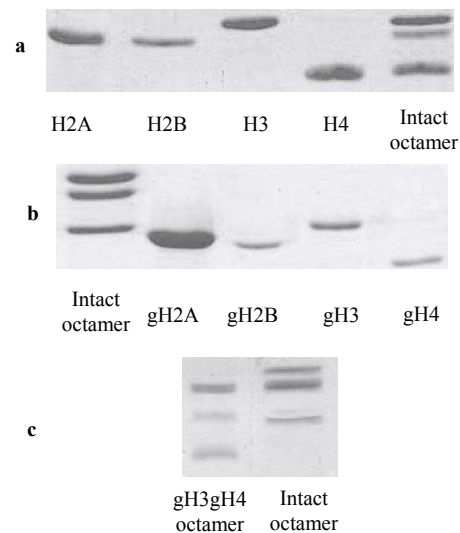


Figure 1 Histone characterization by electrophoresis on 15% SDS-PAGE polyacrylamide gels. a: Intact histones. b: Globular histones. c: Comparison of gH3gH4 octamer with intact octamer.

Mass Spectrometry experiments were also performed on individual histones to confirm their purity. Histone molecular masses are presented in table 1. Measured histone masses are in excellent agreement with theoretical masses calculated from the web site <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>, using the protein sequences. Upon removal of H3 and H4 tails, the nucleosome core particles structural charge turns from -150 to -182 (see table 2).

Histone	a.a. sequence	Measured mass	Calculated mass
H2A	1-128	13949.0	13950.2
H2B	1-122	13493.7	13493.7
H3	1-135	15272.3	15270.9
H4	1-102	11236.5	11236.2
gH2A	13-117	11739.2	11739.2
gH2B	24-122	11291.3	11288.1
gH3	27-135	12656.2	12653.9
gH4	20-102	9522.9	9521.2

Table 1 *Xenopus laevis* Histone molecular mass determination using mass spectrometry. Measured masses were determined with a Maldi-TOF apparatus. Calculated masses were obtained from the web site: <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html> after entering the histone sequences.

Histone	Basic a.a.	Acid a.a.	Global charge	Positive charges in tails	Negative charges in tails
H2A (128a.a.)	24	9	+15	N-ter: 4 C-ter: 3	C-ter: 1
H2B (122a.a.)	28	9	+19	N-ter: 8	N-ter: 1
H3 (135a.a.)	30	11	+19	N-ter: 9	0
H4 (102 a.a.)	25	7	+18	N-ter: 7	0
gH3 (a.a. 27-135)	21	11	+10		
gH4 (a.a. 20-102)	18	7	+11		

Table 2 Amount of charges carried by recombinant full-length or tailless *Xenopus laevis* histones. Signs of charges are specified as well as their location in the terminal or globular histone domains.

Histone octamer assembly and purification. Lyophilized histones were dissolved in denaturing buffer: 7M guanidinium hydrochloride, 10mM DTT, 20mM Tris-HCl, pH 8. After one hour incubation in denaturing buffer at room temperature, chosen combinations of intact or globular histones were mixed in a stoichiometric ratio for a final histone concentration of 1mg.mL⁻¹. The mixture was transferred to a dialysis tubing (Spectra-por, molecular weight cut-off :6,000-8,000) and dialyzed

against a renaturation buffer (NaCl 2M, DTT 5mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 8) at 4°C. Compared to the protocol described by Dyer *et al.*, DTT was chosen instead of β -mercaptoethanol to improve octamer reconstitution. After two changes of renaturation buffer, the histone solution was concentrated to 10mg.mL⁻¹ by ultrafiltration using a Vivascience Vivaspin concentrator (10,000 molecular weight cut-off). Concentrated histone octamers were purified by size exclusion chromatography using a Superdex S-200HR Hiloal (Amersham Bioscience) gel filtration column equilibrated in renaturation buffer. Fractions were analyzed using SDS-PAGE electrophoresis. Fractions containing the four histones in equimolar amounts were combined and concentrated up to 10mg.mL⁻¹. After histone octamer reconstitution, protein composition was checked on SDS-PAGE polyacrylamide electrophoresis gels (figure 1.c). Two octamer types were reconstituted: intact, gH3gH4 (without H3 and H4 tails).

Nucleosome core particle reconstitution and purification. Pure histone octamer and 5S 146 base pairs DNA were mixed in a DNA:histone octamer ratio of 1:1.2 in a high salt containing buffer (KCl 2M, DTT 10mM, EDTA 0.5mM, Tris-Cl pH 8 10mM). The solution was gradually dialyzed to a low salt buffer (KCl 0.25M, DTT 5mM, EDTA 0.5mM, Tris-Cl pH8 10mM) performing a dialysis gradient as described by Dyer *et al.*(2004) at 4°C. After completion of the dialysis gradient, solutions were dialyzed four more hours in low salt buffer (KCl 0.25M, DTT 5mM, EDTA 0.5mM, Tris-Cl pH8 10mM). Solutions were then equilibrated in TCS buffer (Tris-HCl 20mM pH 7.6, EDTA 1mM) by dialysis. After nucleosome core particle reconstitution, DNA needs to be positioned around the histone octamer in a central position (Dyer *et al.*, 2004). DNA can actually position around histones in different configurations that are supposed to be spaced 10 base pairs from one another (Dong *et al.*, 1990). In order to achieve homogeneous positioning, NCPs were heated to 37°C. Appropriate shift in DNA positioning was analyzed by non denaturing electrophoresis on 5% polyacrylamide gels (Figure 2). For intact particles (Figure 2.a), NCPs only need to be heated for eight minutes at 37°C to position DNA around histone octamers. From several bands, a lower single and well-defined band is obtained that corresponds to DNA perfectly centered around histones. For gH3H4 NCPs positioning could also be reached easily (Figure 2.b). Concentrated nucleosome core particles solutions (10mg.mL⁻¹) were loaded on a 6%, 7.5cm high non-denaturing polyacrylamide gels casted in a Bio-Rad Prep-cell apparatus (28mm outer diameter, 19mm inner diameter). Purification by

preparative gel electrophoresis was performed at 10W constant. Pure NCPs fractions were purified from free DNA, aggregates and unshifted NCPs. Diluted pure fractions were immediately concentrated by ultrafiltration to prevent any nucleosome dissociation.

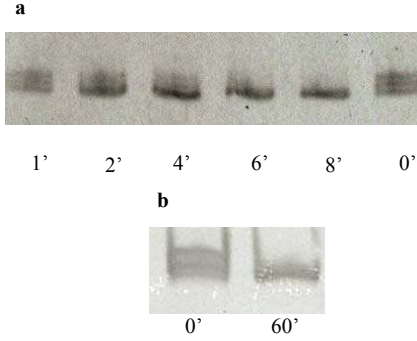


Figure 2 DNA positioning around the histone octamer monitored by electrophoresis on 5% non denaturing polyacrylamide gels. NCPs were heated up to 37°C before analysis.

a. DNA positioning for intact NCPs. Positioning is complete after 8 minutes heating. Three distinct bands are observed at $t=0'$. The lowest one, which migrates faster in the acrylamide gel corresponds to a configuration where DNA is centrally positioned around the histone octamer. The highest bands in the gel migration pattern are consistent with particles in which DNA is asymmetrically positioned.

b. DNA positioning for gH3gH4 NCPs. Shift is complete after 60minutes heating.

Samples Preparation

Intact and gH3gH4 NCPs were dialyzed against Tris-HCl 10mM, pH 7.6 buffer containing EDTA 1mM, PMSF 0.1mM and DTT 2mM. NCPs concentration was adjusted to $8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and assessed by UV-absorbance measurements. Various NaCl buffer solutions were prepared and added to dialyzed NCP solutions to adjust final monovalent salt concentrations C_s to 10, 25, 50, 100 and 150mM. Both Tris^+ and Na^+ ions are included in the total monovalent salt concentration C_s . The concentration of added NaCl solution never exceeded 300mM to prevent any NCPs dissociation. For both intact and gH3gH4 NCPs, monovalent salt concentrations C_s considered were 10, 25, 50, 100 and 150mM. For each salt concentration, NCPs were diluted to 4, 2 and $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sample volumes were adjusted to $50\mu\text{L}$.

Small Angle X-rays Scattering experiments (SAXS)

The Small Angle X-ray Scattering experiments (SAXS) were carried out on a laboratory equipment. The instrument used is a commercially available small-angle X-ray camera (Nanostar, Bruker AXS) adapted to a rotating anode X-ray source ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1.54\text{\AA}$). The experimental setup was optimized by Jan Skov Pedersen (University of Aarhus, Denmark)

to obtain higher flux (J.S. Pedersen, 2004). The instrument has an integrated vacuum in order to reduce background. The scattering vector range was $0.008\text{\AA}^{-1}<q<0.35\text{\AA}^{-1}$, where $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, with 2θ being the scattering angle. The sample to detector distance was 662mm. Samples were enclosed into 2mm diameter quartz capillaries directly inserted into vacuum. Measurements were performed at 5°C. Both buffers and samples were exposed during 7200 seconds. Data were collected using a position-sensitive gas detector (HiSTAR). The SAXS data were azimuthally averaged, corrected for variations in detector efficiency and for spatial distortions. Buffers measurements were used as background and subtracted from the recorded integrated curves. Finally, the data were converted to absolute scale using the scattering from pure water as primary standard.

SAXS data analysis

Particles size and conformation

Considering non interacting particles, the scattering intensity at small q values can be written according to the Guinier approximation:

$$I(q)=I(0)_{\text{ideal}}\exp\left(-\frac{q^2R_g^2}{3}\right) \quad (1)$$

The intensity at null scattering angle ($q=0$) is expressed by:

$$I(0)_{\text{ideal}}=\frac{CM}{N_A}\left(\frac{m_p N_A}{M}-\rho_s \overline{V_p}\right)^2 \quad (2)$$

where C is the sample concentration (w/v), M is the molecular weight of NCPs, N_A is the Avogadro number, m_p is the number of electron in the dry protein, ρ_s is the electronic density of the buffer, and $\overline{V_p}$ is the partial specific volume of the particle.

R_g is the radius of gyration of the particle, which can be expressed as follows:

$$R_g^2=\frac{\int r^2\Delta\rho(r)d^3r}{\int \Delta\rho(r)d^3r} \quad \text{with } \Delta\rho(r)=\rho(r)-\rho_s \quad (3)$$

where $\rho(r)$ is the particle electronic density.

For a nearly spherical particle, this approximation can be used when $qR_g<1.3$. Experimentally, R_g and $I(0)$ can be obtained by fitting $\ln(I(q))$ as a function of q^2 . Additional information about the particle conformation can be obtained from the distance distribution function of the particle, which is the Fourier transform of the scattering intensity $I(q)$:

$$P(r)=\frac{r^2}{2\pi^2}\int_0^\infty I(q)\frac{\sin(qr)}{qr}q^2dq \quad (4)$$

$P(r)$ represents all distances that can be found within the particles. $P(r)$ gets to zero for distances larger than

the maximal dimension D_{\max} of the particles. $P(r)$ was evaluated using the program GNOM. Radii of gyration can also be assessed from the distance distribution function $P(r)$:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} r^2 P(r) dr}{2 \int_0^{D_{\max}} P(r) dr} \quad (5)$$

We did prefer that method for R_g evaluation. Indeed, the expression (5), making use of the whole scattering curve is much less sensitive to residual inter-particle interactions.

Scattering intensities $I(q)$ can be also calculated from PDB crystallographic structural files using the program CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995). Structures are modified with Web Lab Viewer Lite that creates new PDB files. Calculated scattering curves can be fitted and compared with experimental data.

Interactions between particles and second virial coefficient

For interacting spherical particles, the scattering intensity can be written as:

$$I(q,C) = I(q,0)S(q,C) \quad (6)$$

$I(q,0)$ is the scattering intensity for ideal solutions when all interactions between particles are neglected. $I(q,0)$ is called the form factor. Equation 6 can still be considered valid with quasi-spherical particles, so with NCPs. $S(q,C)$ is the structure factor and characterizes interactions between particles. $S(q,C)$ is the Fourier transform of the autocorrelation function of the pair-distribution function $g(r)$ (cf. equation 7). $g(r)$ describes the probability for a given particle to stand at a distance r from another particle located at the origin.

$$S(q,C) = 1 + \frac{CN_A}{M} \int 4\pi r^2 (g(r)-1) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (7)$$

The structure factor is related to the second virial coefficient that describes interactions between two particles. Interaction description can be limited to pairs when interactions are weak and solutions are dilute. The structure factor at null scattering angle can be expressed as a function of particle concentration:

$$S(0,C) = \frac{1}{1+2MA_2C} \quad (8)$$

with M the molecular mass of the particle and A_2 the second virial coefficient. A_2 is associated to the pair interaction potential $V(r)$ by the following relationship:

$$A_2 = \frac{1}{2} \int_0^\infty (1 - \exp(-\beta V(r))) 4\pi r^2 dr \quad (9)$$

For positive A_2 values, interactions are repulsive while for negative values interactions are globally attractive. The sign of A_2 discriminates between repulsive and attractive interactions.

Form and structure factors determination.

Usually, the form factor $I(q,0)$, free from inter-particle interactions, is obtained by collecting the scattering pattern at a very low concentration or by extrapolating to a null concentration $I(q,C)$ curves recorded at several concentrations (e.g. 1, 2 and 4mg.mL⁻¹). In the present case, the curve statistics collected at the lowest concentration are not satisfactory enough to apply this procedure. Consequently, the curve giving the best statistics (4mg.mL⁻¹) was preferentially used to determine the form factor $I(q,0)$ with the program GNOM (Svergun *et al.*, 1992). The data points at very low scattering angles ($q < 0.03 \text{ \AA}^{-1}$) were removed from the fit to get rid of interaction effects. The experimental structure factors $S(q,C)$ were obtained from dividing the scattering total intensities $I(q,C)$ by this form factor $I(q,0)$.

Structure factors simulation using a pair potential model.

Structure factors were also numerically assessed as explained in Niebuhr and Koch, 2005; Tardieu *et al.*, 1999 and Bonneté *et al.*, 1997, using an algorithm written by L. Belloni. A simulation model was used to compare experimental structure factors with numerically calculated ones. Experimental data below 0.013 \AA^{-1} were not exploitable and were disregarded. Experimental and numerical structure factors were compared for scattering angles ranging from 0.0142 \AA^{-1} to 0.0498 \AA^{-1} . The iterative calculations are based on hypernetted chain (HNC) integral and Ornstein-Zernike equations that associate the pair distribution function $g(r)$ to the total ($h(r)=g(r)-1$) and direct ($c(r)$) correlation functions.

$$g(r) = \exp(-\beta V(r) + h(r) - c(r)) \quad (10)$$

NCPs were considered as spherical particles of 10 nm in diameter. The model used here for the potential is inspired from the DLVO theory (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek). Two repulsive and one attractive terms compose the pair potential we used. A repulsive hard core term describes the impossibility for particles of diameter σ to interpenetrate. Repulsive coulombic long-range interactions and short range interactions (van der Waals, hydrophobic and hydrogen bridges forces) are represented by the sum of two Yukawa potentials: an attractive and a repulsive term. The final potential is written below:

$$v(r) = \infty \quad \text{if } r \leq \sigma \quad (11)$$

$$v(r) = J_r \frac{\sigma}{r} \exp\left(-\frac{r-\sigma}{\lambda_D}\right) - J_a \frac{\sigma}{r} \exp\left(-\frac{r-\sigma}{d}\right) \text{ if } r \geq \sigma \quad (12)$$

In equation 12, the range of the repulsive contribution to the Yukawa potential is equal to the Debye screening length λ_D expressed in Å. λ_D depends on the

$$\text{solution ionic strength: } \lambda_D = \frac{1}{\sqrt{4\pi * L_B \sum \rho_i Z_i^2}} \quad (13)$$

where L_B is the Bjerrum length ($L_B = \frac{e^2}{4\pi * \epsilon_0 \epsilon_r kT}$), Z_i

the charge of ion i and ρ_i the ions density.

The depth of the repulsive coulombic potential J_r is directly related to the particles effective charge Z_{eff} :

$$J_r = \frac{Z_{eff}^2}{\sigma} \frac{L_B}{\left(1 + \frac{0.5\sigma}{\lambda_D}\right)^2} \quad (14)$$

In this expression, the effective charge is the one as calculated by Alexander *et al.* (1983). The particles effective charge is smaller than the actual structural charge. Alexander *et al.* (1983) have renormalized the charge by solving the Poisson-Boltzmann equation numerically in a spherical Wigner-Seitz cell. For each salt concentration the particles effective charge Z_{eff} was assessed from the structural charge using a program that based on a Poisson Boltzmann Wigner-Seitz cell calculation (Katchalsky, 1996).

In the attractive part of the Yukawa expression (equation 12), both the depth J_a and the range d of the potential are varying parameters.

Second virial coefficient determination

Following Bonneté *et al.* (1999), second virial coefficients can be obtained by two distinct means, depending on the interactions strength.

(i) When interactions are attractive or slightly repulsive, scattering intensities at null scattering angles $I(0,C)$ can be evaluated from Guinier approximation (Equation 1). Guinier plots, displaying $\ln(I(q))$ versus q^2 , are actually linear in a large domain of scattering angles. A_2 is then deduced from the slope of the curve $1/I(0,C)$ as a function of the

$$\text{particle concentration } C \text{ because } I(0,C) = \frac{I(0,0)}{1 + 2MA_2C}.$$

(ii) Upon strong repulsion, Guinier approximation is no longer reliable for assessing interactions. The best agreements between experimental and calculated structure factors were used to determine values for $S(0,C)$. Second virial coefficients are calculated from equation 8 and $S(0,C)$ values. From 10 to 50 mM salt, interactions were strong enough to proceed that way and Guinier approximation was used for higher salt concentrations.

Results

Dmax and Rg evolution with salt concentration.

Distance distribution functions $P(r)$ were evaluated from $I(q,C)$ curves obtained at $C=4\text{mg.mL}^{-1}$ and $q \geq 0.03 \text{Å}^{-1}$ using the program GNOM (Figure 3).

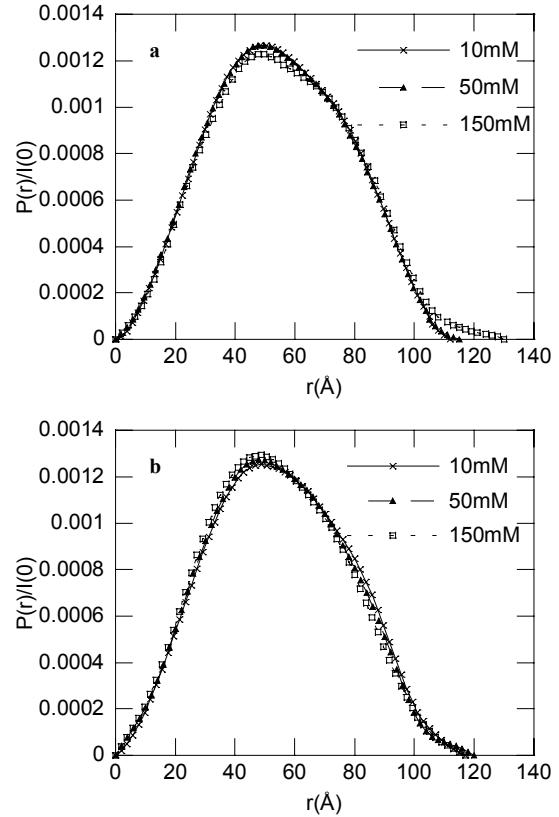


Figure 3 Distance distribution functions $P(r)$ calculated from the scattering intensities $I(q)$ ($q \geq 0.03 \text{Å}^{-1}$) measured at 4mg.mL^{-1} using GNOM. $P(r)$ were evaluated for intact (a) and gH3gH4 (b) NCPs. Data at 25 and 100mM monovalent salt are not shown for clarity.

Data were disregarded for $q < 0.03 \text{Å}^{-1}$ in order to get rid of interaction effects. For gH3gH4 NCPs that are deprived of both H3 and H4 tails, $P(r)$ are all superimposable whatever the salt concentration (Figure 3b). On the other hand, for intact particles, $P(r)$ is different at 10, 25 and 50mM as compared to 100mM and 150mM, where D_{max} values are slightly higher (Figure 3a).

On figure 4, D_{max} , the maximal particles extensions are plotted as a function of monovalent salt concentration. For gH3gH4 NCPs, D_{max} remains constant considering the error bars on the whole range of salt concentration. Its values fluctuate around $115-120 \pm 5 \text{Å}$. However, for intact particles, D_{max} increases from 112 to $130 \pm 5 \text{Å}$ with monovalent salt concentration. Its maximum value is reached above

100mM monovalent salt concentration. The D_{max} increase with salt is significant and is consistent with D_{max} rise observed with native nucleosome core particles as well (Mangenot *et al.*, 2002a, Bertin *et al.*, 2004).

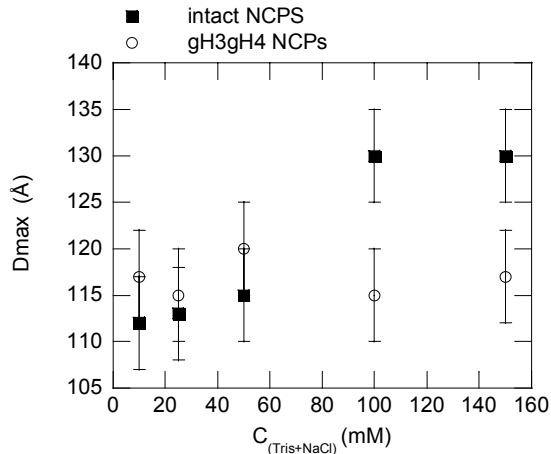


Figure 4 Maximal particle extension D_{max} as a function of monovalent salt concentration for intact (■) and gH3gH4 (○) NCPs.

The radius of gyration assesses global size modifications as well as a function of monovalent salt conformation (Figure 5).

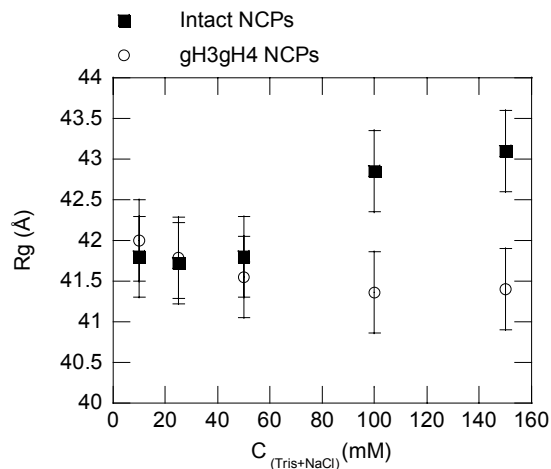


Figure 5 Radius of gyration as a function of the monovalent salt concentration for intact (■) and gH3gH4 (○) NCPs.

Radii of gyration were calculated from $P(r)$ (cf. equation 5). For intact NCPs, R_g increases from $41.8 \pm 0.5 \text{ \AA}$ to $43.1 \pm 0.5 \text{ \AA}$ with increasing ionic strength. For gH3gH4 NCPs, R_g values vary between $42.0 \pm 0.5 \text{ \AA}$ and $41.4 \pm 0.5 \text{ \AA}$. Regarding error bars, this small variation can not be related to an actual R_g decrease and R_g can be considered almost constant and equal to 41.7 \AA .

Comparison of experimental and calculated form factors.

Form factors calculated with CRY SOL and using crystallographic coordinates were compared to experimental ones. In order to get rid of interaction effects, an experimental form factor was built for each salt concentration by assembling the experimental curve at $C=4 \text{ mg.mL}^{-1}$ for $q \geq 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ and the form factor assessed from GNOM for $q \leq 0.03 \text{ \AA}^{-1}$.

Conformational variation of intact NCPs with salt.

The NCPs global size increase observed here (Figures 4 and 5) has previously been assumed to result from a mechanism of histone tails folding on DNA at low salt and extension at high salt (Mangenot *et al.* 2002a, Bertin *et al.*, 2004). Structural models were constructed from the PDB crystallographic structure file 1KX5 (cf. Davey *et al.*, 2002) taking into account such a folding-extension mechanism (Figure 6).

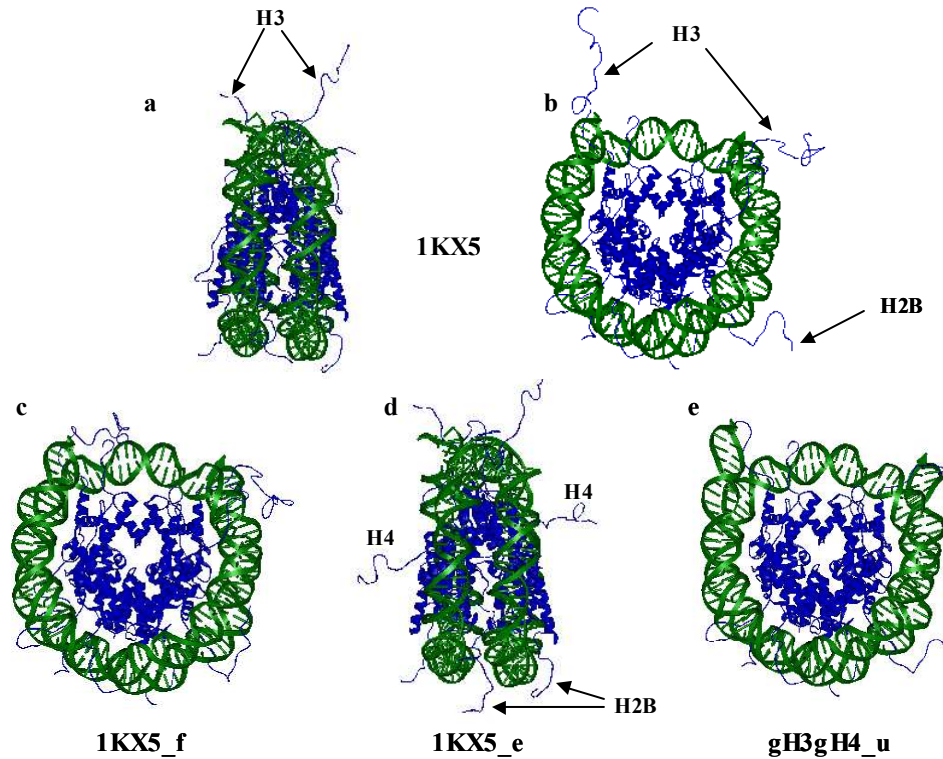


Figure 6 NCPs structures visualized using Web Lab Viewer Lite. Histone and DNA structural modifications were performed with Web Lab Viewer Lite as well. Histone tails are pointed and specified for more clarity.
a and b: 1KX5 NCP crystallographic structure (Davey *et al.*, 2002) from side and top views respectively. 1KX5 structure positions every amino acids.
c : 1KX5 structure with all tails folded back on the nucleosome core, noted 1KX5_f.
d : 1KX5 structure with histone tails extended, noted 1KX5_e.
e : 1KX5 structure where H3 and H4 N-terminal tails were removed and DNA ends partially unwrapped from the nucleosome core, noted gH3gH4_u.

We chose this structure since it has been so far, the only one where all amino acids, including N and C-terminal ones are positioned. This structure was not available yet when our previous papers were published. Figures 6a and 6b display 1KX5 structure from top and side views. In such a configuration both H3 tails, and to a lesser extent one H2B tail, are rather extended. The others are rather folded on DNA. The amino acids belonging to the histone unstructured portions are not as accurately positioned as the amino acids located in the protein core, as attested by their high B-factors. Anyway, it does feature one of the possible tail positioning configuration. From that structure, two other conformations were designed where histone tails positioning was modified using Web Lab Viewer Lite:

- (i) 1KX5_f: all histone tails were folded on the nucleosome core (Figure 6c)
- (ii) 1KX5_e: H4 and H2B histone tails were extended (Figure 6d). In densely packed crystals (1KX5

structure), H4 histone tails and one of the H2B histone tails are actually folded on the core. One can expect that these tails may be more extended in solution. The H2A histone tails, being much shorter, are ignored. These constructions are representative of particle conformations that are likely to exist in solution.

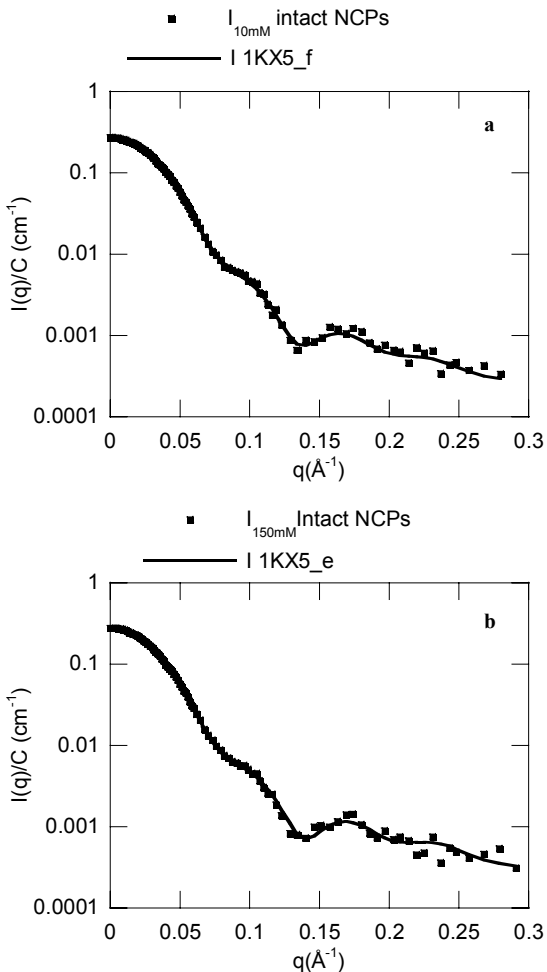


Figure 7 Comparison of experimental (■) and calculated (full lines) scattering intensities using CRY SOL.

a: Experimental scattering intensity for intact NCPs at 10mM salt is fitted to 1KX5_f calculated scattering intensity. On 1KX5_f structure, histone tails are folded on the particle core.

b: Experimental scattering intensity for intact NCPs at 150mM is fitted to 1KX5_e calculated scattering intensity. On 1KX5_e structure, histone tails are extended.

For each salt concentration, form factors calculated from 1KX5, 1KX5_f and 1KX5_e structures using the program CRY SOL were fitted to experimental curves. Discrepancies between the three fits remain subtle but better fits can obviously be identified. For the lowest salt concentrations (10, 25 and 50mM), the best fits are obtained using the so-called 1KX5_f structure (Figure 7a). With higher ionic strengths, (100 and 150mM salt), best fits are observed for the 1KX5_e structure (Figure 7b). In conclusion we can claim that our data are compatible with tails extension upon increasing salt concentration, as previously observed for native NCPs.

gH3gH4 NCPs structure in solution: DNA ends opening from particle core

Experimental form factors from intact and gH3gH4 NCPs were compared at all salt concentrations. At all salt concentrations salt discrepancies affect the curve second minimum, around $q=0.135 \text{\AA}^{-1}$ which is observed as displayed on Figure 8a at 25mM. More particularly, the second minima at 0.135\AA^{-1} for the gH3gH4 NCPs are not as deep as the ones obtained from the intact NCPs. Scattering intensity resulting from a hollow flat cylinder comparable to the NCPs peripheral DNA corona would feature such a marked second minimum. A disruption in the DNA superhelix regularity was therefore suspected to be responsible for the differences noticed. Consequently, structures were designed with modifications of DNA conformation. More precisely, two different structures were built:

(i) gH3gH4: H3 and H4 N-terminal tails were removed from 1KX5 structure.

(ii) gH3gH4_u: gH3gH4 with DNA ends unstuck from the particle core (Figure 6e).

In both cases, one H2B tail is rather extended while the other one is rather folded on DNA. We have built other structures with both H2A and H2B tails folded or extended and checked that the three form factors corresponding to both H2B tails folded, both H2B tails extended and a single one folded and the other extended are indistinguishable. Consequently, only gH3gH4 and gH3gH4_u will be considered in the following.

In figure 8b, the form factors calculated from gH3gH4 and gH3gH4_u structure using CRY SOL are compared in the range $0.1 \leq q \leq 0.17 \text{\AA}^{-1}$. When DNA entry and exit sides were artificially slightly unwrapped from the nucleosome core, the second minimum is partially filled (Figures 8b). Figure 8c displays indeed a perfect agreement between the experimental form factor measured for gH3gH4 NCPs at 10mM salt concentration and the calculated one corresponding to gH3gH4_u structure. For any salt concentration, the best fits are obtained with the model displaying slightly opened DNA ends. Nucleosomal DNA ends are consequently certainly slightly unstuck from the gH3gH4 particle core and exhibit a more opened conformation at the entry-exit DNA sides than intact NCPs.

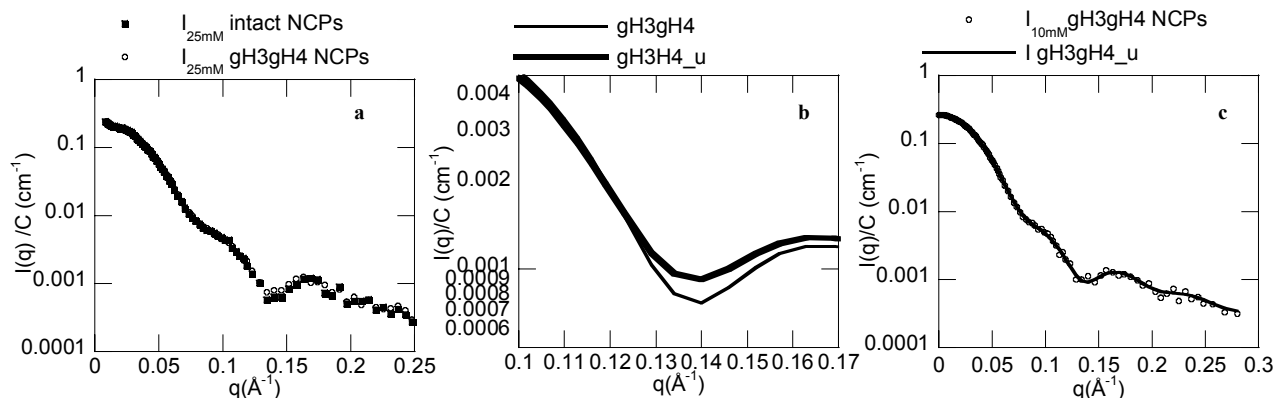


Figure 8 a : Comparison of experimental scattering intensities of intact (■) and gH3gH4 (○) NCPs at 25mM monovalent salt concentration. b : Comparison of calculated scattering intensities resulting from gH3gH4 (thin line) and gH3gH4_u (thick line) structures. c : Experimental scattering intensity for gH3gH4 NCPs (○) are fitted to gH3gH4_u (full line) calculated scattering intensity. On gH3gH4_u structure, H3 and H4 histone tails are removed and DNA ends are slightly unstuck from the particle core.

Interactions between nucleosome core particles.

Pair potential interaction model

Effective charges, Z_{eff} , as calculated by Alexander *et al.* (1983) were evaluated as explained above. Results are displayed in table 3 for both types of particles. Z_{eff} increases in absolute value with monovalent salt concentration. These values were inserted in Equation 14 and 12 for the description of coulombic repulsive interactions.

Total monovalent salt concentration (mM)	Effective charge for intact recombinant NCPs	Effective charge for gH3gH4 recombinant NCPs
10	-69.9	-73.3
25	-80.15	-85.15
50	-91.55	-98.3
100	-104.1	-114.5
150	-111.55	-124.3

Table 3 Effective charges calculated from a program written and provided by L. Belloni. The calculation is based on a Poisson-Boltzman Wigner-Seitz cell calculation (Katchalsky, 1996). The effective charges displayed above are the effective charges as calculated in Alexander *et al.* method (1983). NCPs were considered as spherical particles of 50Å radius. Structural charges are -150 and -182 for recombinant intact and gH3gH4 NCPs, respectively. Structural charge is the net actual particle charge, considering the whole set of charges carried by histones and DNA.

Figure 9 displays a typical comparison between experimental and numerically calculated structure factors for gH3gH4 NCPs at 25mM salt. With decreasing particle concentration from 4 to 1mg.mL⁻¹, structure factors values at null scattering angle increase, indicating that interactions are here repulsive. Experimental and simulated data are in good agreement at 2 and 4mg.mL⁻¹. Though statistics are lower at 1mg.mL⁻¹, experimental data, for this

lowest concentration, fluctuate around $S(q,C)=1$ and are still consistent with simulation.

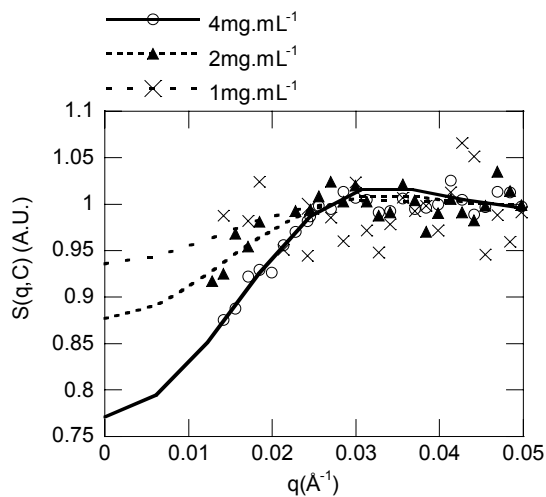


Figure 9 Comparison between experimental and simulated structure factors for gH3gH4 recombinant NCPs at 25mM monovalent salt. Simulated structure factors are represented by continuous or dashed lines and experimental data are represented using symbols. For experimental curves, data were disregarded for q below 0.013Å⁻¹. NCPs concentrations of 4mg.mL⁻¹(○), 2mg.mL⁻¹(▲) and 1mg.mL⁻¹(×) are displayed.

For intact recombinant NCPs, at low salt concentrations (10 and 25mM), the best agreements between experimental and numerical $S(q,C)$ were obtained with no attractive terms involved (figure 10.a). Under those conditions, J_a , the potential depth of the attractive term (Equation 12) was set to zero. At higher salt concentrations (50, 100 and 150mM), experimental structure factors cannot be properly described any more without adding an attractive term to the pair interaction potential ($J_a > 0$ in equation 12).

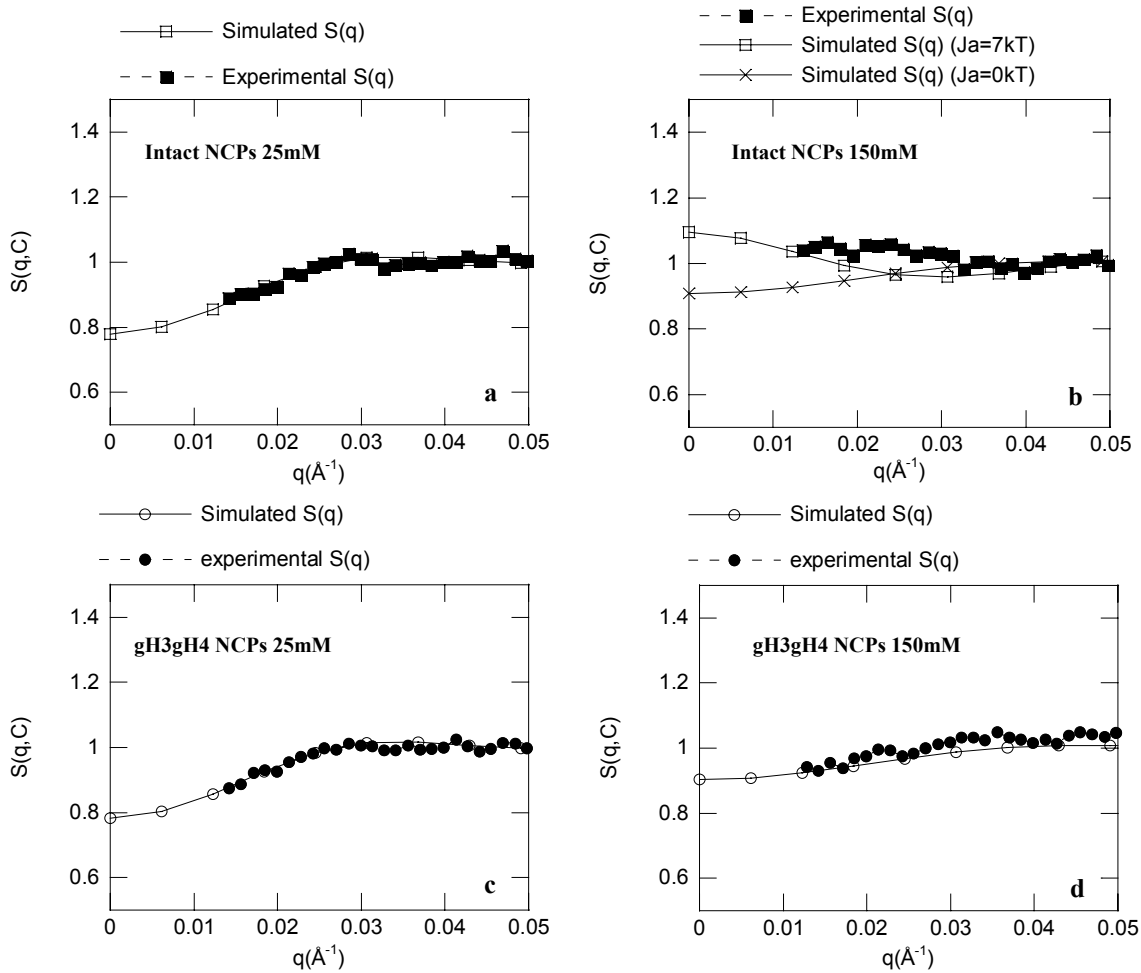


Figure 10 Comparison between simulated and experimental structure factors $S(q,C)$ for intact (a and b) and gH3gH4 (c and d) NCPs at low salt (25mM, a and c) and high salt (150mM, b and d) for $C=4\text{mg.mL}^{-1}$.

Obviously, the structure factor calculated using repulsive terms exclusively cannot describe the experimental curve (Figure 10.b). In equation 12, both the potential depth J_a and its range d can be varying parameters. Best agreements were obtained when the interaction range d was set as high as 20\AA and for J_a values around $5kT$ and $10kT$. It is noteworthy that the best d values is in good agreement with the D_{max} increase due to the so called tail extension (Mangenot *et al.*, 2002a., Bertin *et al.*, 2004). Figure 10.b. presents the best agreement we could possibly obtain between experimental and calculated structure factors at 150mM salt. Consequently, at high salt concentration for intact NCPs, interactions are better described with attractive potentials involved.

For gH3gH4 NCPs, the best agreements between experimental and numerical structure factors were obtained when calculations were performed considering the repulsive potentials only. The attractive term in the Yukawa potential was

disregarded for all salt concentrations ($J_a=0kT$). Consequently, no fitting parameter was introduced in the calculation since the repulsive term of the Yukawa potential is only dependent on the effective particle charges imposed by the Poisson-Boltzmann network calculation made. The agreement between experimental and numerical structure factor at low salt concentration is very satisfactory (Figure 10.c). At high salt concentration (150mM, Figure 10.d) the fit is not as outstanding but the addition of an attractive term would worsen the agreement between calculated and experimental curves.

Second virial coefficients

Second virial coefficients for intact and gH3gH4 NCPs are reported in Figure 11. At low salt concentrations (10 and 25mM monovalent salt), A_2 values are quite similar for intact and gH3gH4 NCPs. At high salt concentration, the second virial coefficient for intact particles turns negative. For intact NCPs at high salt concentration, interactions

are therefore globally attractive. However, for gH3gH4 NCPs, A_2 values remain positive whatever the ionic strength and remains close to the hard spheres value. Hard sphere value for a particle of volume V_{NCP} is expressed as: $A_2^{\text{HS}} = 4V_{\text{NCP}}Na/M^2$ and equals $3.8 \cdot 10^{-8} \text{mol.L.g}^{-2}$ for a radius of gyration of 42\AA . Consequently, for NCPs depleted of H3 and H4 N-terminal tails, interactions remain repulsive whatever the ionic strength.

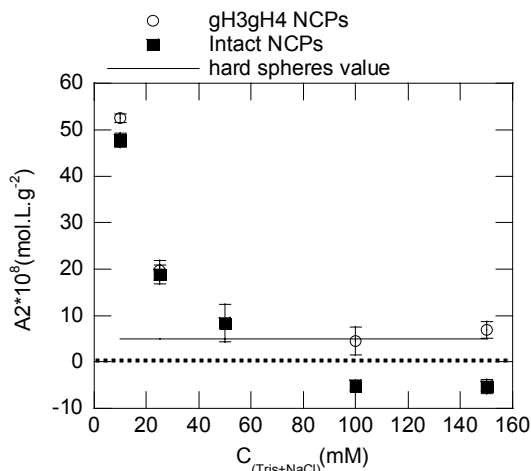


Figure 11 Second virial coefficient evolution as a function of the monovalent salt concentration.

A_2 values are presented for intact (■) and gH3gH4 (○)NCPs. Second virial coefficient for hard sphere value is indicated with a thin line.

Discussion

H3 and H4 histone tails are required for setting attractive interactions between NCPs.

Pair potential interaction model

Using a pair potential model for the numerical calculation of structure factors gives information about the interparticle interactions nature. Such a procedure has been successfully used for globular proteins such as lysozyme or γ -crystallin (Niebuhr *et al.*, 2005, Tardieu *et al.*, 1999, Bonneté *et al.*, 1999; Bonneté *et al.*, 1997). Although NCPs are much more complicated particles than globular proteins in terms of both geometry and charge distribution, our simulations lead to much reasonable outcome.

For gH3gH4 NCPs, interactions are best described by repulsive potentials exclusively at any salt concentration (Figures 10c and d). In the numerical structure factor calculation, no parameter was involved since particle size was fixed and effective charge was imposed by the Poisson-Boltzmann network calculation. Interactions for gH3gH4 NCPs are therefore only driven by coulombic and hard spheres repulsions.

For intact NCPs, at low salt concentration (10 and 25mM), interactions are described without adding any attractive term as well (Figure 10.a). However, at higher salt concentrations, attractive potentials could not be ignored any more. In the attractive term, two parameters could be varied, the range d and the potential depth J_a . The more relevant interaction range was found to be 20\AA in order to better describe experimental data. Best agreements occurred at J_a values varying between 5 and $10kT$ above 50mM salt (Figure 10b). However, comparisons are not as outstanding as results obtained at low salt concentrations. The experimental and calculated curve shape dissimilarities might result from geometrical issues. Calculations were performed considering that particles were perfectly spherical and covered with a homogeneous distribution of charges. In fact, NCPs can be better described as flat cylinders with a highly heterogeneous charge distribution which certainly worsens when histone tails extend. Because of that heterogeneous geometry, interactions are not isotropic. The Yukawa expression used to describe attractive interactions is probably not elaborate enough to account for our observations. Within that salt concentration range, Mangenot *et al.* (2002.a) evaluated potentials depth to vary between 5 and $10kT$ for native calf thymus NCPs from osmometry measurements, which is in good quantitative agreement with our current findings.

Second virial coefficients

In Bertin *et al.*, 2004, second virial coefficients were assessed using $I(0,C)$ resulting from Guinier plots at all salt concentrations. Using that method, A_2 values might have been underestimated especially at low salt concentrations where interactions are strongly repulsive and where Guinier plots are actually not linear in a large range of scattering angles. At 10mM salt, A_2 values in Bertin *et al.* (2004) did not exceed $25 \cdot 10^8 \text{mol.L.g}^{-2}$ while in this current study A_2 values reach $50 \cdot 10^8 \text{mol.L.g}^{-2}$ in similar salt conditions. Data from Bertin *et al.* (2004), at 10mM salt, were reprocessed using the same pair potential model and the same A_2 value was found. At higher salt concentrations, A_2 values for either calf thymus NCPs or recombinant intact NCPs are similar. Consequently, native and recombinant NCPs display comparable behaviour in terms of interparticle interactions.

At the lowest salt concentrations (10 and 25mM) second virial coefficients for intact or gH3gH4 recombinant NCPs are equal, considering error bars. At low ionic forces, both types of particles may interact *via* similar means. At higher salt concentration, interactions turn attractive for intact

NCPs ($A_2 < 0$ on Figure 11) but interactions remain repulsive for gH3gH4 NCPs. These results are consistent with previous experiments that compared intact and trypsinized NCPs purified from calf thymus (Bertin *et al.*, 2004). At high salt concentrations (above 50mM), interactions were repulsive for tailless trypsinized NCPs and attractive for intact NCPs. Moreover, second virial coefficients for both gH3gH4 and trypsinized NCPs remain close to a hard spheres value above 50mM salt.

Attractive interactions: role of H3 and H4 histone tails

Previous experimental studies have reported that histones tails extension was responsible for attractive interactions *via* a "tail-bridging" mechanism (Mangenot *et al.*, 2002b; Bertin *et al.*, 2004). Here again, attractive interactions occur simultaneously with D_{max} increase. Our results on recombinant NCPs are therefore in good agreement with the "tail extension" assumption previously proposed for native NCPs. Moreover, we show here that attractive interactions are suppressed consecutively to the removal of H3 and H4 histone tails. Recently, theoretical and simulation studies have been carried out in order to describe and demonstrate the NCPs "tail-bridging" hypothesis. Models used are often simplified compared to real NCPs solutions but results contribute to confirm our interpretation. Boroudjerdi and Netz (2003, 2005) modeled NCPs as complexes of charged spheres associated with a polyelectrolyte chain of opposite charge. The authors considered interactions between two complexes considering Debye-Hückel interactions between polyelectrolytes and sphere, a short-range repulsive term, the curvature polyelectrolyte energy and electrostatic coulombic repulsion between polyelectrolytes and spheres. A negative second virial coefficient was calculated at intermediate salt concentration, describing attractive interactions. R. Podgornik (2003) has built a theoretical model where polyelectrolyte chains are grafted to point-like macroions of opposite charge. He considered chain configurational entropy and rigidity, interactions between polyelectrolytes and macroions and interactions within the polyelectrolytes chains. Equations were solved numerically and bridging attractive interactions are observed. Mülbacher *et al.* (2006) have carried out molecular dynamics simulations on isolated charged spheres carrying eight identical grafted flexible chains. In the simulations, tail extension occurs above a ionic force threshold where second virial coefficient is minimum. The theoretical models and computer simulations approaches, briefly presented above, tend to confirm a histone tail bridging interaction.

In addition to that, we demonstrate that H3 and H4 histone tails are essential for building those attractive interactions. However, we do not state that H2A and H2B tails don't have a role in setting attractive interactions. Gordon *et al.* (2005) have indeed proposed that histone tails act additively and independently for inducing NCPs oligomers condensation. H2A and H2B may also build attractive interactions but their contribution might be of a lesser extent than H3 and H4 histone tails involvement in setting attractive interactions. H2A N and C terminal extensions are indeed quite short in terms of a.a. sequence (see tables 1 and 2) and have probably little contribution in making interactions. *et al.* At the chromatin level, H3 and H4 are more involved than other tails in compacting chromatin and therefore in building attractive interactions as well (Krajewski and Ausio, 1996; Tse and Hansen, 1997, Dorigo *et al.*, 2003). Sun *et al.* (2005) have performed Monte Carlo simulations on nucleosome fibers where each NCPs is represented as a charged surface. NCPs charge distribution is not homogeneous. Authors have evaluated internucleosomal interactions and concluded that histone tail H3 is essential for building attractive interactions in nucleosome arrays. Histone tails are also thought to bind linker DNA (Angelov *et al.*, 2001) and it is not possible to differentiate whether H3 interact with the neighbouring NCP along the chain or with the following NCP itself by using chromatin arrays. Isolated NCPs can be considered as an appropriate model for probing such internucleosomal interactions. It should now be relevant to elucidate whether H3 or H4 histone tails alone are able to establish these attractive interactions.

NCPs conformation

gH3gH4 recombinant NCPs

In gH3gH4 NCPs, DNA might actually exhibit a more opened conformation at the entry-exit DNA sides than in intact NCPs (Figures 8). H3 histone tails are located at the entry/exit DNA sites, close to its ends. This specific H3 histone tail passes through the gyres of nucleosomal DNA 13 base pairs from DNA ends and might therefore be involved in keeping DNA ends stuck on the particle. In Bertin *et al.* (2004), we noticed that trypsinized NCPs, depleted of all tails, showed an opened conformation that was even more pronounced at low salt concentration (10mM).

For gH3gH4 NCPs, $P(r)$ are identical and D_{max} values remain constant whatever the salt concentration is. H2A and H2B histone tails are still present in gH3gH4 particles, and the question

remains as to whether they extend beyond the particle core by increasing the salt concentration. No evidence of such extension is seen from our results. However, it is important to note that for NCPs with all extended tails, the experimental D_{max} values are significantly lower than the actual maximal particle extension (Mangenot *et al.*, 2002b.) that would be assessed from the end to end distances of the structural models built and displayed for instance in Figure 6d. Since the histone tails represent a very low fraction of the scattering mass, compared with the central core of the NCP, the largest distances (separating the extremities of the tails) inside the particle in the extended conformation contribute too few vectors to be fully detected in the calculated scattering pattern. The end to end distance is therefore underestimated. The D_{max} value extracted from the $P(r)$ distribution corresponds to the maximal overall diameter of the particle only in the “compact” conformation. Consequently, it is probable that increase of D_{max} due to the tail extension can be observed if all tails extend but becomes undetectable if only H2A tails (very short) and H2B tails extend.

The conformational state of the H2B histone tail cannot be elucidated. It could either be folded or extended. From its conformation and charge distribution, we would nevertheless assume that it will behave as H3 and H4 tails do, and extend for Cs above 50mM.

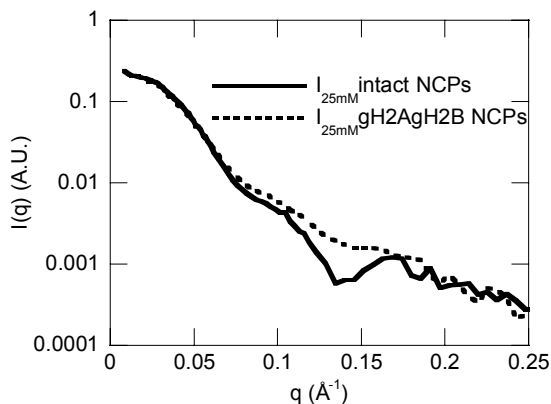


Figure 12 Experimental scattering intensities of intact (full line) and gH2AgH2B (dash line) NCPs at 25mM and 4mg.mL⁻¹.

gH2AgH2B recombinant NCPs : an even stronger disruption

NCPs deprived of H2A and H2B histone tails were also prepared. These particular gH2AgH2B NCPs nevertheless happened to present a much more opened conformation after reconstitution. Form factors of those NCPs are quite different from a

particle where nucleosomal DNA is tightly wrapped around an octamer core (Figure 12). The second minimum at 0.135\AA^{-1} is barely discernible and tends to indicate that the structure is quite loose. Since conformation was no more alike a well structured NCP, data for gH2AgH2B NCPs were not further analyzed. Indeed, it was not possible to isolate tail effects from other more pronounced structural effects. A forthcoming paper will describe the gH2AgH2B NCPs particularities.

Intact recombinant NCPs

Conformational discrepancies between NCPs densely organized within crystals and NCPs in solution remain barely perceptible. Form factors calculated from the 1KX5 crystallographic structures are indeed very similar to experimental form factors (Figure 7). This study brings therefore clear evidence to state that crystallographic data are trustworthy representations of isolated NCPs in solution under the explored range of experimental conditions.

Both D_{max} and R_g increase with monovalent salt concentration. At low salt concentrations, experimental curves are perfectly fitted with calculated form factors resulting from a histone folded tails configuration. At high salts, best fits are obtained building a structure where histone tails are extended. From the fits presented in Figure 7, experimental data are compatible with tail extension. The D_{max} increase observed here is significant and corresponds to a genuine structural modification. Absolute sizes and size increase were of larger extent using native calf thymus (Bertin *et al.*, 2004). NCPs obtained from calf thymus purification cannot be as monodisperse as recombinant ones since nucleosomal DNA length and polydispersity are dependent on the enzymatic Micrococcal nuclease digestion conditions of DNA. Native NCPs prepared in Bertin *et al.* (2004) were monodisperse enough to achieve SAXS but a small fraction of particles with longer DNA might have increased the particle apparent sizes evaluated by D_{max} and R_g .

Conclusion.

NCPs conformation evolution as a function of monovalent salt remains consistent with the histone tail extension observed in previous papers (Mangenot *et al.* (2002) Bertin *et al.* (2004)). In dilute solutions, intact NCPs conformation is reliable with the NCPs structure deduced from closely packed crystals. However, gH3gH4 NCPs DNA ends seem to slightly unstuck from the particle core, leading to a rather more opened conformation. A pair potential model was used to describe interactions between NCPs. At

any salt concentrations, interactions between gH3gH4 NCPs are exclusively driven by repulsive interactions. For intact NCPs, an additional attractive term is required to account for inter particle interactions above 50mM monovalent salt. At high salt concentrations, attractive interactions are characterized by negative second virial coefficients values.

Acknowledgement.

We are very grateful to Karolin Luger and the whole Luger lab for transmitting their knowledge in nucleosome reconstitution and giving constant advice

References.

Alexander, S., Chaikin, P.M., Grant, P., Morales, J., Pincus, P. and Hone, D. (1983) Charge renormalization, osmotic pressure and bulk modulus of colloidal crystal: theory., *J. Chem. Phys.* **80**, 5776-5781.

Angelov, D., Vitolo, J.M., Mutskov, V., Dimitrov, S. and Hayes, J.J. (2001) Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 6599-6604.

Annunziato, A.T., Frado, L-L.Y., Seale, R.L. and Woodcock, C.L.F. (1998) Role of histone acetylation in the assembly, maintenance, and modulation of chromatin structure, *Gene expression* **9**, 37-61.

Bertin, A., Leforestier, A., Durand, D. and Livolant, F. (2004) Role of histone tails in the conformation and interactions of nucleosome core particles, *Biochemistry* **43**, 4773-4780.

Bonneté, F., Malfois, M., Finet, S., Tardieu, A., Lafont, S. and Veesler, S. (1997) Different tools to study interaction potentials in γ -crystallin solutions: relevance to crystal growth, *Acta Crystallogr. D53*, 438-447.

Bonneté, F., Finet, S. and Tardieu, A. (1999) Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions, *J. of cryst. growth* **196**, 403-414.

Boroudjerdi, H. and Netz, R. (2003) Interactions between polyelectrolyte-macroion complexes, *Europhys. Lett.* **64**, 413-419.

Boroudjerdi, H. and Netz, R. (2005), Strongly coupled polyelectrolyte-macroion complexes, *J. Phys.-Condens. Mat.* **17**, S1137-S1151.

Cheung, W.L., Briggs, S.D. and Allis, C.D.(2000), Acetylation and chromosomal functions, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 326-333.

Clapier, C.R., Längst, G., Corona, D.F.V., Becker, P.B. and Nightingale, K.P. (2001) Critical Role for

during the process. We thank Karolin Luger for the gift of histones expression plasmids and recombinant DNA plasmids. We are thankful to Luc Belloni for having provided his programs. We also want to thank Pierre le Maréchal laboratory (IBBMC, Orsay) for the mass spectrometry measurements. We thank Eric Raspaud for sensible advice and fruitful discussions.

the histone H4 N terminus in nucleosome remodelling by ISWI, *Mol. Cell. Biol.* **21**, 875-883.

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Armin, W.M. and T.J. Richmond (2002), Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9Å resolution, *J.Mol. Biol.* **319**, 1097-1113.

Dong, F., Hansen, J.C. and van Holde, K.E. (1990) DNA and protein determinants of nucleosomes positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequence *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5724-5728.

Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K. and Richmond T. (2003) Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail, *J.Mol.Biol.* **327**, 85-96.

Dyer, P., Edayathumangalam, R., White, C., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U. and Luger, K.(2004), *Methods Enzymol.* **375**, 23-44.

Fletcher, T.M. and Hansen, J.C. (1995) Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms, *J.Biol. Chem.* **43**, 25359-25632.

Garcia-Ramirez, M., Dong, F. and Ausio, J. (1992) Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1, *J.Biol.Chem.* **267**, 19587-19595.

Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. and Ausio, J.(1995), Modulation of chromatin folding by histone acetylation, *J.Biol.Chem.* **270**, 17923-17928.

Gordon, F., Luger, K. and Hansen, J.C. (2005) The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt dependent oligomerization of nucleosome arrays, *J.Biol.Chem.* **280**, 33701-33706.

Hamiche, A., Kang, J.G., Dennis, C., Xiao, H. and Wu, C. (2001) Histone tail modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14316-14321.

Hilliard, P.R., Smith R.M. and Rill R.L. (1986), Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic

- resonance studies of histone and DNA dynamics in nucleosome cores, *J.Biol.Chem.* 261, 5992-5998.
- Katchalsky, A., Alexandrowicz, O. and Koden, O. (1996) Chemical physics of ionic solution, ed Conway B.E. & Barradas R.G. (Wiley), 295.
- Krajewski, WA. and Ausió, J. (1996) Modulation of the higher-order folding of chromatin by deletion of histone H3 and H4 terminal domains, *Biochem. J.* 316, 395-400.
- Luger, K., Rechsteiner, T, Flaus, A.J., Waye, M.M.Y. and Richmond, T.J. (1997), Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria, *J. Mol. Biol.* 272, 301-311.
- Malfois, M., Bonneté, F., Belloni, L. and Tardieu, A. (1996) A model of attractive interactions to account for fluid-fluid phase separation of proteins solutions, *J. Chem. Phys.* 105, 3290-3300.
- Mangenot, S., Leforestier, A., Vachette, P., Durand, D. and Livolant F. (2002 a) Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles, *Biophys. J.* 82, 345-356.
- Mangenot, S., Raspaud, E., Belloni, L. and Livolant, F. (2002 b) Interactions between isolated nucleosome core particles: a tail-bridging effect? *Eur. Phys. J. E.* 7, 221-231.
- Mangenot, S., Leforestier, A., Durand, D. and Livolant, F. (2004) Phase diagram of nucleosome core particles, *J. Mol.Biol.* 333, 907-916.
- Mülbacher, F., Holm, C. and Shiessel, H. (2006) Controlled DNA compaction within chromatin : the tail-bridging effect, *Europhys. Lett.* 73, 135-141.
- Niebuhr, M. and Koch M.H.J. (2005) Effects of urea and trimethylamine N-oxide (TMAO) on the interactions of lysozyme in solution, *Biophys. J.* 89, 1978-1983.
- Pedersen, J.S. (2004) A flux- and background-optimized version of the NanoSTAR small-angle scattering camera for solution scattering, *J. Appl.Cryst* 37, 369-380.
- Podgornik, R. (2003) Two-body polyelectrolyte-mediated bridging interactions, *J.Chem.Phys.* 118, 11286-11296.
- Pollard, K, Samuels ,ML., Crowley, KA, Hansen, JC. and Peterson, C.P. (1999) Functional interaction between GCN5 and polyamines : a new role for core histone acetylation, *EMBO J.* 18, 5622-5633
- Rice, JC. and Allis CD. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263-273.
- Richmond, T.J., Searles, M.A., Simpson, R.T. (1988) Crystals of a nucleosome core particle containing defined sequence DNA, *J. Mol. Biol.* 199, 161-170.
- Shogren-Knaak, M., Haruhiko, I., Sun, JM., Pazin, M.J., Davie, J.R., Peterson, C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions, *Science* 311, 844-847.
- Smith, R.M. and Rill, R.L (1989) Mobile histone tails in nucleosomes. Assignments of mobile segments and investigations of their role in chromatin folding, *J. Biol.Chem.* 264, 10574-10581.
- Strahl, B.D.and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications, *Nature* 403, 41-45.
- Sun, J, Zhang, Q. and Schlick, T. (2005), Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8180-8185.
- Svergun, D.I. (1992), Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J.Appl.Cryst.* 25, 495-503.
- Svergun, D.I., Barbareto, C. & Koch M.H.J. (1995) CRY SOL-a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J.Appl.Cryst.* 28, 768-773.
- Tardieu, A., Le Verge, A., Malfois, M., Bonneté, F., Finet ,S., Riès-Kautt, M. and Belloni, L. (1999) Proteins in solution: from X-ray scattering intensities to interaction potentials, *J. cryst. growth* 196, 193-203.
- Tse, C., Fletcher, T.M. and Hansen, J.C. (1998) Enhanced transcription factors access to arrays of H3/H4 tetramer-DNA complexes : implications for replication and transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 95, 12169-12173.
- Tse,C. and Hansen, J.C. (1997) Hybrid trypsinized nucleosomal arrays: identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction, *Biochemistry* 36, 11381-11388.
- Zheng, C., Lu, X., Hansen, J.C. and Hayes, J.J. (2005) Salt-dependent intra- and inter-nucleosomal interactions of the H3 tail domain in a model oligonucleosomal array, *J.Biol.Chem.* 280, 33552-33557.

B. Etude Préliminaire de la conformation des particules cœur de nucléosome par cryomicroscopie électronique

Associée à des méthodes de reconstruction d'images, la cryo-microscopie électronique permet de résoudre des structures à relativement haute résolution (de l'ordre de 10\AA) pour des particules isolées dépourvues d'axes de symétrie particuliers. Les expériences de SAXS, présentées dans le chapitre précédent, indiquent que la conformation des NCPs est significativement différente à faible et à forte concentration en sels monovalents. Un des objectifs consiste à visualiser plus finement les conformations des NCPs dans des conditions salines variables. En outre, les NCPs privées de certaines queues d'histones telles que gH3gH4 (sans queues H3 et H4) mais surtout gH2AgH2B (sans queues H2A et H2B) présentent des distorsions dans l'enroulement de la superhélice d'ADN nucléosomal. La cryo-microscopie électronique devrait nous donner des précisions sur ces conformations. Quelques notions de microscopie électronique et de cryomicroscopie électronique sont exposées dans l'annexe IV.1. Dans un premier temps, la méthode de vitrification des échantillons en films minces sera présentée. Nous montrerons ensuite comment les conditions d'imagerie et de préparation des échantillons ont été optimisées. Pour ces expériences, des lots, parfaitement monodisperses, de NCPs recombinantes ont été utilisés.

1. Mode de préparation d'échantillons vitrifiés en films minces

a. Préservation de l'environnement aqueux par vitrification des échantillons

Les méthodes conventionnelles d'observation des échantillons biologiques utilisent des procédés chimiques pour "fixer" les échantillons et des atomes lourds pour augmenter le contraste. Il est probable que le traitement chimique et la présence d'atomes lourds modifie la conformation native des particules étudiées. En outre, les échantillons ne sont alors plus hydratés. C'est pourquoi, ces méthodes ne sont pas employées pour résoudre des structures de molécules biologiques à très haute résolution.

Les techniques de cryo-microscopie électronique en films minces sont décrites de manière exhaustive par Dubochet et al. (1988). Les objets biologiques sont congelés afin de préserver leur environnement ionique et aqueux. L'eau sous forme solide est habituellement sous forme cristalline (hexagonale ou cubique). La glace cristallisée présente une structure très différente de l'eau dans un état liquide. Une congélation très rapide de l'échantillon permet d'obtenir de la glace amorphe et de préserver l'organisation des solutions aqueuses après congélation.

b. Principe de vitrification d'échantillons en films minces

Les échantillons sont vitrifiés sur des grilles de microscopie électronique de 3mm de diamètre et recouvertes d'un film mince de carbone à trous dont les diamètres sont de 1 à $2\mu\text{m}$. Nous avons utilisé soit des grilles commerciales (Quantifoil 200 mesh, en cuivre, Agar Scientific Ltd) présentant des trous tous identiques, de diamètre $2\mu\text{m}$, et espacés de manière régulière soit des grilles à trous que nous avons confectionnées au laboratoire. Dans ce cas, le diamètre et la répartition des trous est sont variables.

Le principe de vitrification des échantillons en films mince est présenté sur la figure IV.1.

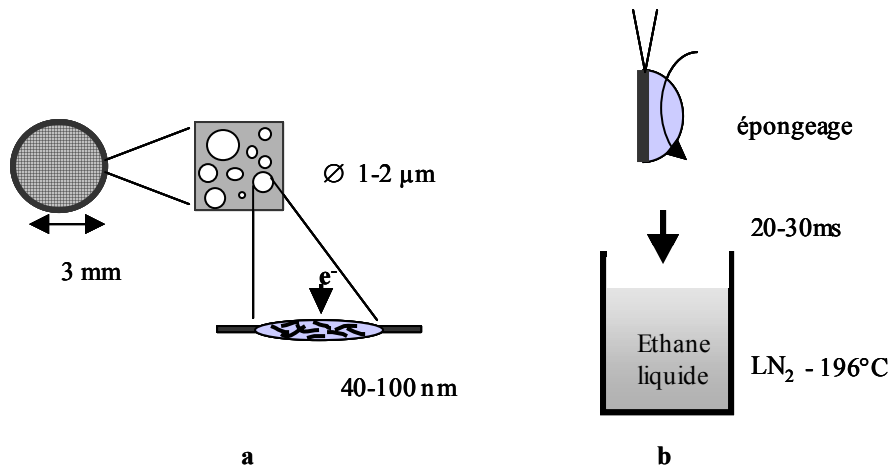


Figure IV.1 Préparation d'échantillons vitrifiés en films minces.

La grille est tout d'abord fixée à une pince, solidaire d'un plongeur, capable de faire chuter rapidement la grille dans un bain d'éthane liquide refroidi par de l'azote liquide. Une goutte (quelques microlitres) de solution est ensuite déposée sur la grille. L'excès de solution est époncée à l'aide d'un papier absorbant pour former des films minces au sein des trous de carbone. Le film mince renfermant les particules est piégé dans les trous du film de carbone et son épaisseur varie entre 40 et 100nm. Le plongeur est immédiatement déclenché et fait tomber la grille dans l'éthane liquide. L'échantillon vitrifié est ensuite transféré dans le microscope. Pendant les opérations de transfert de la grille dans le porte-objet du microscope il faut s'assurer que la température de l'échantillon reste inférieure à la température de vitrification (-135°C pour l'eau pure).

20 à 30ms séparent l'épongeage de la plonge dans l'éthane liquide. Pendant cet intervalle de temps, le film mince peut s'évaporer partiellement et concentrer les particules et les sels en solution. Pour s'affranchir de ce problème, une chambre à humidité contrôlée a été élaborée et construite au laboratoire (A. Leforestier et V. Klein). Ce dispositif régule simultanément la température et le taux d'humidité dans la chambre. De plus, les conditions de vitrification étant contrôlées (température, hydrométrie, temps d'épongeage), la qualité des échantillons est reproductible.

2. Détermination des conditions optimales pour l'imagerie de NCPs isolées.

a. Intérêt de la chambre à environnement contrôlé

Le diagramme de stabilité des NCPs en fonction de leur concentration et des concentrations en sels monovalents établi par Yager et al. (1989) montre que les NCPs sont particulièrement sensibles à l'environnement ionique. Plus précisément, pour des concentrations salines supérieures à 0.6M, les NCPs sont partiellement ou même complètement dissociées. Sans

contrôle de l'environnement les NCPs peuvent donc éventuellement être dissociées. Par ailleurs, le contrôle de l'environnement ionique est essentiel pour nos expériences puisque nous étudions l'effet des concentrations salines sur la conformation des NCPs. Dans la première partie de ce chapitre nous avons, en effet, montré que les NCPs sont soumises à changements conformationnels en fonction des concentrations en ions monovalents.

Sans contrôle de l'environnement et lorsque les NCPs sont dans une solution dont la force ionique est relativement élevée, les particules se dissocient et on ne distingue plus que l'ADN libre en solution. La figure IV.2 montre le résultat de cryo fixation d'une solution de NCPs à 0.5mg.mL^{-1} comportant des sels monovalents à 100mM sans chambre à humidité contrôlée.

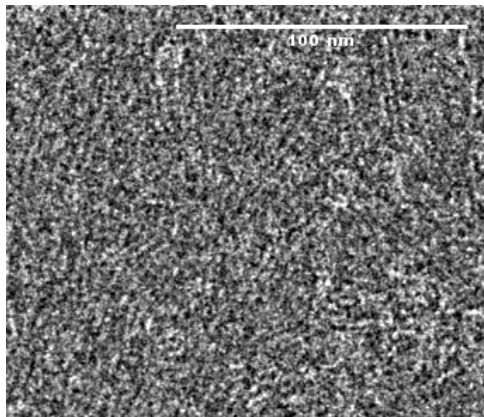


Figure IV.2 NCPs dissociées. La concentration initiale en NCPs était de 0.5mg.mL^{-1} et la concentration saline de 100mM . Les négatifs ont été scannés à l'aide d'un scanner (Super coolscan 8000, Nikon) et le contraste a été magnifié dans Image J.

On remarque que la densité des brins d'ADN dans le film mince est particulièrement élevée. Il semblerait donc, qu'au moment de la préparation de l'échantillon, survienne un effet simultané de concentration des échantillon et des sels dans le film mince qui induit la dissociation des NCPs. De plus, les brins d'ADN ne sont pas disposés aléatoirement les uns par rapport aux autres dans le film mais ont tendance à s'aligner. Faute de temps, nous n'avons pas pu déterminer les conditions (taux d'humidité, température, taux de ventilation de la chambre humide) qui pourrait préserver l'intégrité des NCPs à forte concentration saline.

Par contre, pour de faibles forces ioniques (10mM en sels monovalent) nous avons constaté que les NCPs intactes restent parfaitement stables lorsque la chambre à environnement contrôlée est saturée en humidité (100%) à l'aide d'une solution comportant également 10mM d'ions monovalents (Tris-HCL, 10mM , pH 7.6, EDTA 1mM). Nous avons vérifié que les NCPs intactes restent stables après vitrification pour des concentrations en particules supérieures à 0.2mg.mL^{-1} .

b. Conditions d'imagerie optimale pour l'obtention de contraste : choix de la défocalisation

Dans l'annexe IV.1, nous montrons comment il est possible d'obtenir du contraste de phase en appliquant une défocalisation Δz donnée entre le plan de l'échantillon et le plan conjugué par la lentille objectif du plan focal image.

Les images de NCPs isolées intactes ont toutes été obtenues à l'aide d'un microscope JEOL 2010F équipé d'un canon à effet de champ, avec un grandissement de 50 000. Dans les cas de particules isolées, la détermination d'une valeur de sous-focalisation Δz pour laquelle le contraste de phase est maximum n'est pas immédiate. En effet, pour des particules isolées, une fréquence spatiale de répétition caractéristique de l'échantillon n'est pas discernable de manière évidente. Nous avons donc testé différentes valeurs de sous-focalisation pour les échantillons de NCPs isolées. Les images de meilleur contraste ont été obtenues pour des valeurs de Δz comprises entre 1300nm et 2000nm. Les fonctions de transfert de contraste correspondantes sont représentées sur la figure IV.3.

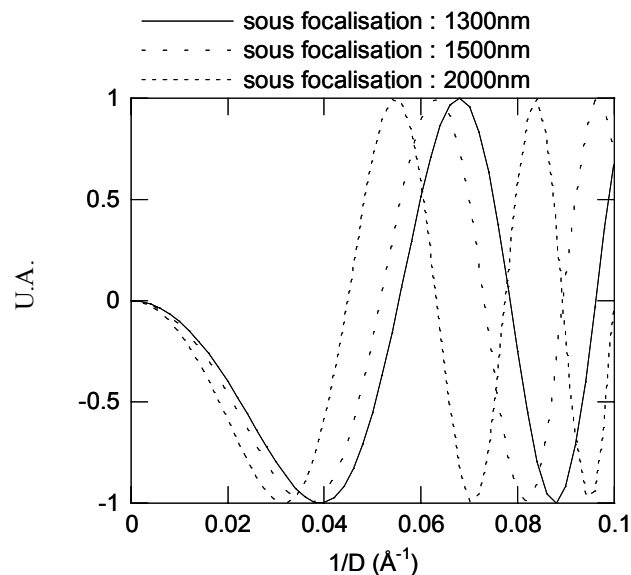


Figure IV.3 Fonctions de transfert de contraste pour un microscope JEOL 2010 200kV de Cs 2mm et de Cc 2.1mm. Les CTF correspondant à des sous focalisations de 1300, 1500 et 2000nm sont présentées.

Lorsque la sous focalisation Δz s'élève à 1300nm, la période spatiale correspondant au premier extremum de la CTF vaut 25.8Å alors qu'elle vaut 27.9Å pour un Δz de 1500nm et 32Å pour une sous focalisation de 2000nm (Figure IV.3). La distance de répétition intrinsèque à l'échantillon qui confère du contraste à l'image est donc comprise entre 25.8 et 32Å. La structure cristallographique des NCPs montre effectivement que la superhélice gauche de l'ADN nucléosomal a un pas de 28Å (Luger et al., 1997) qui constitue une distance de répétition de la particule. Les gammes de défocalisation (-1300 à -2000nm) qui permettent d'obtenir un contraste optimum correspondent donc en première approximation au pas de la superhélice d'ADN nucléosomal.

c. Images résultantes : NCPs intactes isolées en présence de 10mM de sels monovalents

Nous avons déterminé les conditions optimales pour la préparation des échantillons ainsi que les meilleures conditions d'imagerie. Nous avons ensuite collecté des données dans le but d'obtenir la conformation de NCPs isolées par reconstruction d'images (Annexe IV.1). Le

processus de reconstruction d'images n'est envisageable que pour des particules parfaitement monodisperses telles que les NCPs recombinantes reconstituées.

Les échantillons ont été préparés à l'aide de la chambre humide dans une atmosphère saturée en humidité (100% humidité) par du TE. La concentration initiale de la goutte déposée sur la grille de microscopie est de $0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La figure IV.4 constitue un exemple typique d'images de NCPs isolées pour des défocalisations de -1300nm (a) et -2000nm (b).

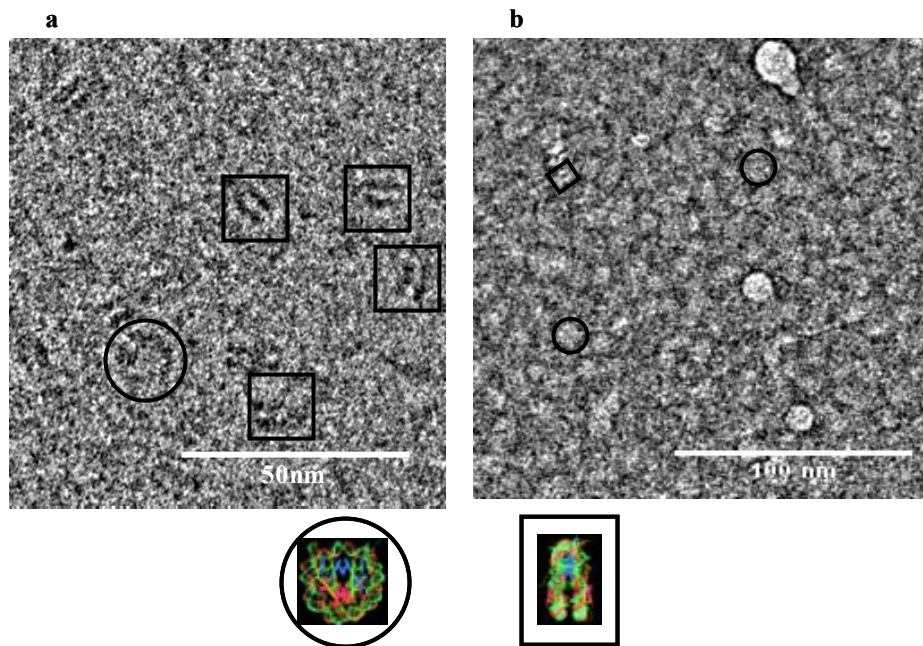


Figure IV.4 images de NCPs isolées dans du TE par cryomicroscopie électronique pour des défocalisations de -1300nm et -2000nm . Les négatifs ont été scannés à l'aide d'un scanner (Super coolscan 8000, Nikon) et le contraste a été magnifié dans Image J. Certaines NCPs en vue de face sont encerclées et encadrées, en vue de profil.

Pour une défocalisation de -1300nm (Figure IV.4.a), le contour des NCPs est nettement distingué. Sur les images obtenues avec une défocalisation plus importante (Figure IV.2.b), les NCPs sont visualisées avec une moins bonne résolution. Sur la figure IV.2.b, des particules sphériques concentrées et juxtaposées dans le film mince sont distinguées.

On distingue les NCPs suivant des vues de face ou de profil (Figure IV.2.a). Il semble que les NCPs ne présentent pas d'orientation privilégiée dans le film mince. Le contraste obtenu reste très faible.

Dans les trous du film de carbone, les NCPs ne se répartissent pas de manière homogène dans le film vitrifié. En effet, il semble qu'ils se concentrent préférentiellement en périphérie des films minces.

d. Résultats préliminaires de reconstruction d'images

A partir d'images similaires à celles de la figure IV.4, des résultats préliminaires de reconstitution d'un volume de NCPs intactes ont été obtenus par S. Mangenot en collaboration avec B. Klaholtz (IGBMC, Strasbourg). Le principe général pour la reconstruction d'images à partir de particules isolées est brièvement décrit dans l'annexe IV.1. Le traitement d'images a été réalisé à l'aide du logiciel IMAGIC. Deux négatifs ont été exploités comportant 36000 particules

chacun. Un agrandissement de l'un de ces négatifs est présenté sur la figure IV.4.b et montre que la densité en NCPs dans le film mince est élevée. Les valeurs de défocalisation ont été mesurées à -1990nm et -2010nm , respectivement. La résolution théorique évalué à partir de la CTF est de 9.1\AA .

Pour un négatif donné, 9320 particules ont été sélectionnées de manière automatisée en utilisant des masques. Ces particules ont été ensuite alignées puis catégorisées en 100 classes distinctes. Les NCPs sont donc disposées suivant au moins 100 orientations différentes, dans le film mince vitrifié. La pertinence de la sélection et de la classification est vérifiée manuellement. Au cours de ces différentes étapes différents types de filtres en fréquence spatiale ont été appliqués. Avant l'établissement d'un modèle à trois dimensions, la CTF est corrigée. La détermination de l'orientation relative de chacune des projections a été mise en œuvre à l'aide de sinogrammes, permettent ainsi l'obtention d'un volume en trois dimensions. Ce processus de reconstruction a été ensuite réitéré plusieurs fois pour obtenir le volume présenté sur la figure IV.5.

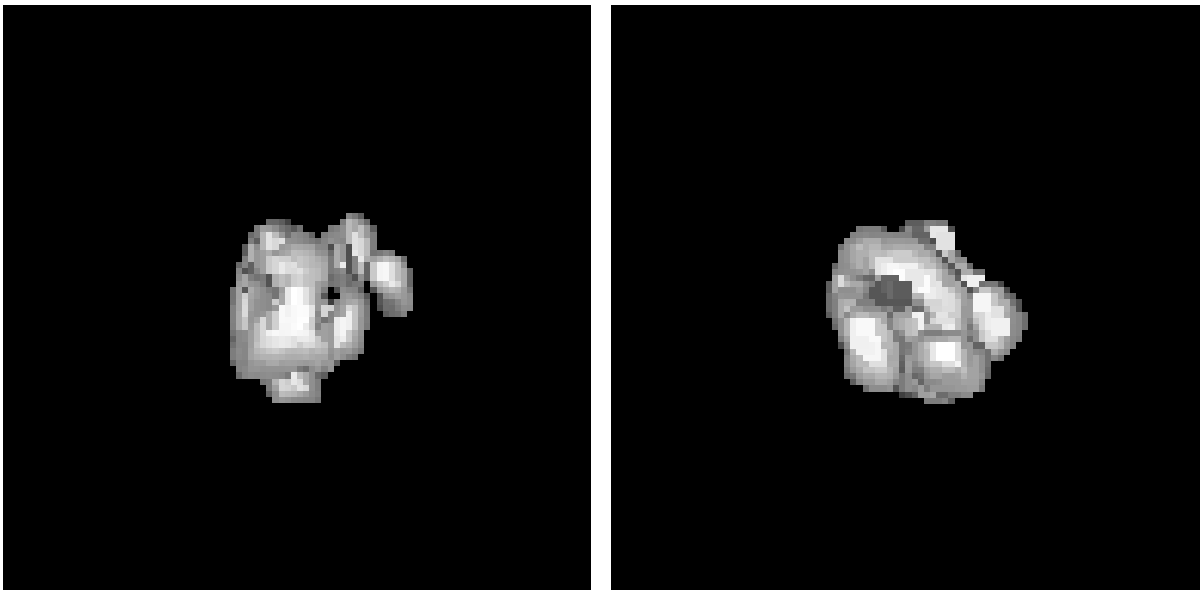


Figure IV.5 Volume préliminaire en trois dimensions de NCPs intactes obtenu à partir d'images de cryomicroscopie électronique.

Ce volume préliminaire fait apparaître une protubérance qui se déploie à partir d'une face de la particule. Dans l'hypothèse où les particules présenteraient une telle excroissance, elle serait mise en évidence par les expériences de SAXS (IV.A). Par ailleurs, il est vraisemblable que cette excroissance ne caractérise pas l'extension de queues d'histones discutée dans le paragraphe IV.A. En effet, la contribution de l'ADN dans la densité électronique est supérieure à celle des protéines (quatre fois) et les queues d'histones ne sont certainement pas visibles sur le volume de la figure IV.5. Il s'agit donc plutôt d'un artéfact résultant du processus de reconstruction d'image probablement lié à l'encombrement des particules dans l'échantillon. En effet, la densité en particules étant élevée (Figure IV.4.b), des contacts s'établissent entre chaque particules et

seraient visualisés dans le volume reconstruit. En même temps que la sélection de chaque NCP, une portion de la NCP adjacente aurait été sélectionnée.

Puisque cette protubérance apparaît à partir d'une sélection de milliers de particules, elle est certainement représentative d'un mode d'interaction privilégié entre NCPs suivant les faces supérieures et inférieures des particules.

Les échantillons étant trop concentrés en particules, de nouvelles collectes d'images doivent être effectuées. Malgré cela, un volume de NCPs isolé devrait être bientôt obtenu. Ces résultats attestent, en effet, de la bonne qualité des images et montrent que les conditions d'imagerie choisies sont optimales.

e. Déstabilisation de NCPs gH2AgH2B par vitrification en films minces

Après avoir déterminé les conditions optimales pour l'imagerie par cryomicroscopie électronique de NCPs intactes, nous avons tenté d'imager des NCPs gH2AgH2B. Des expériences de SAXS (§ IV.A.2) et de digestion à la MNase (§ III.B.1) montrent que la conformation de telles particules est moins compacte que celles de NCPs intactes et qu'aux extrémités entrantes et sortantes de l'ADN, les interactions ADN/histones sont fragilisées.

Les acquisitions d'images ont été effectuées sur un microscope Philips CM12 de tension d'accélération 100kV.

En premier lieu, ces expériences montrent que les NCPs gH2AgH2B sont particulièrement instables et fragiles. En effet, bien que les échantillons aient été préparés en chambre humide et dans des conditions de faible salinité (10mM), on constate une dissociation ADN-histone mise en évidence par la présence de brins d'ADN libres en solution. Pour des échantillons de NCPs intactes vitrifiées en chambre humide, une telle dissociation n'est jamais observée. Cette dissociation se produit préférentiellement dans les trous où les films vitrifiés sont les plus minces. Dans le cas de films légèrement plus épais, et au niveau périphérique, légèrement plus épais que la partie centrale des films, un nouveau type de structure est observé (Figure IV.6). Des filaments, d'environ 30nm de long, sont alignés perpendiculairement au bord des trous. Ces filaments correspondent probablement à de l'ADN décoré par des histones sous forme non nucléosomale. Ces filaments sont terminés par une partie plus globulaire qui correspondrait à un NCPs partiellement déroulé, sur environ 100pb. Par comparaison avec les expériences de biochimie menées en parallèle (§ III.B.1), ces dissociations totales ou partielles ADN - histones ne sont pas représentatives de la conformation en solution des NCPs gH2AgH2B. Cette dissociation se produit certainement au cours de la formation de films minces et rend compte de la fragilité de ces particules. La tension de surface au niveau des films mince est certainement suffisante pour déstabiliser mécaniquement les particules. Par ailleurs, ces particules ont tendance à former des agrégats. A la périphérie de ces agrégats, on distingue des brins d'ADN libre. Ces agrégats résulteraient donc aussi de la dissociation totale ou partielle des NCPs gH2AgH2B.

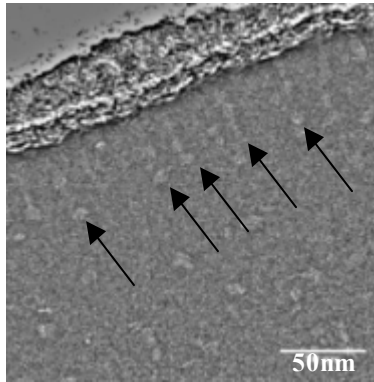


Figure IV.6 NCPs gH2AgH2B analysées par cryomicroscopie en films minces . Des filaments, d'environ 30nm de long, sont alignés perpendiculairement au bord des trous. Ces filaments sont terminés par une partie plus globulaire (flèches) qui correspondrait à un NCPs partiellement déroulé.

Par cryomicroscopie électronique, on montre que les NCPs gH2AgH2B sont particulièrement instables, par comparaison avec les NCPs intactes qui ne sont pas dénaturées après vitrification. En solution, l'affinité ADN-histone, pour des particules gH2AgH2B, est inférieure à celle de NCPs intactes. La vitrification met en évidence la fragilité de cette association. Les conditions de préservation des structures restent à explorer. La tension de surface des films minces pourrait, par exemple, être modifiée par l'ajout de tensioactifs. Les propriétés de surface du film de carbone pourraient éventuellement être modulées par des techniques de "glow-discharge".

Conclusions et perspectives du chapitre IV.

● Conclusions.

◇ L'établissement d'interactions attractives entre NCPs isolées nécessitent la présence de queues d'histones et plus précisément de celles de H3 et H4.

◇ Les queues d'histones semblent nécessaires au maintien de la conformation des NCPs isolées. En particulier, les NCPs gH3gH4 présentent un ADN entrant et sortant plus ouvert par rapport à celui des particules intactes. Les NCPs sans queues d'histones H2A et H2B sont particulièrement déformés et sont beaucoup plus instables que des NCPs intactes.

◇ Les conditions de collecte de données par cryomicroscopie électronique en films minces de NCPs isolées ont été mises au point.

● Perspectives.

◇ Le rôle précis de chacune des queues d'histones H3 et H4 pourra être évalué, indépendamment, par SAXS. On peut supposer que l'une d'entre elle pourrait avoir un rôle prépondérant dans les interactions et la conformation des NCPs.

◇ Les premières tentatives de reconstruction d'images obtenues par cryomicroscopie électronique sont très préliminaires. De nouvelles acquisitions de données doivent être entreprises à partir d'échantillons moins concentrés et retraitées pour obtenir un volume plus représentatif d'une NCPs isolée. Nous espérons que les résultats à venir permettront de distinguer précisément des variations conformationnelles en fonction de l'environnement ionique. De plus, cette méthode d'imagerie pourrait inclure l'étude des interactions entre particules et des interactions avec des protéines tels que les facteurs de remodelage.

◇ Des images de NCPs gH3gH4 pourraient être traitées et exploitées afin de confirmer les observations faites par SAXS (IV.A). Nous avons en effet montré que l'ADN est légèrement ouvert au niveau entrant / sortant pour les NCPs gH3gH4.

Chapitre V

Rôle des ions
multivalents dans les
interactions entre NCPs.

Introduction

Dans les cellules eucaryotes, les NCPs interagissent avec de nombreuses espèces chargées (protéines, ions...). Les concentrations cellulaires en ions sont reportées dans la première partie du chapitre I. Le magnésium est un cation divalent nécessaire au fonctionnement de nombreuses enzymes. Les polyamines (putrescine²⁺, spermidine (Spd³⁺), et spermine (Sp⁴⁺)) sont des polycations de faible poids moléculaire impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire. Des anions tels que l'ATP sont également présents *in situ*. L'ATP, essentielle au métabolisme énergétique cellulaire, comporte trois charges négatives dues aux groupements phosphates. Sa concentration cellulaire est de l'ordre du millimolaire. L'ATP est la source d'énergie nécessaire au remodelage dynamique de la chromatine. L'ATP est hydrolysée en ADP au cours de ce processus.

En présence d'ions multivalents, des particules colloïdales de signes opposés peuvent s'agréger, *in vitro*. Le Mg²⁺ est capable de précipiter la chromatine et les nucléosomes mais n'a pas de conséquences sur la solubilité de l'ADN linéaire (Widom, 1986; Bloomfield, 1994). La Spd³⁺ et la Sp⁴⁺ agrègent et organisent l'ADN en phases cristallines liquides (Pelta et al, 1996).

Nous avons choisi d'étudier de manière complète les conditions de précipitation des NCPs avec ces ions multivalents et de décrire les structures obtenues. De plus, nous nous sommes montrés particulièrement attentifs au rôle de l'EDTA, dans ces interactions. Les caractéristiques chimiques et le poids moléculaire du Mg²⁺, de la Spd³⁺, du NaATP (Adénosine triphosphate de sodium) et de l'EDTA dans sa forme complètement protoné sont présentés sur la figure V.1.

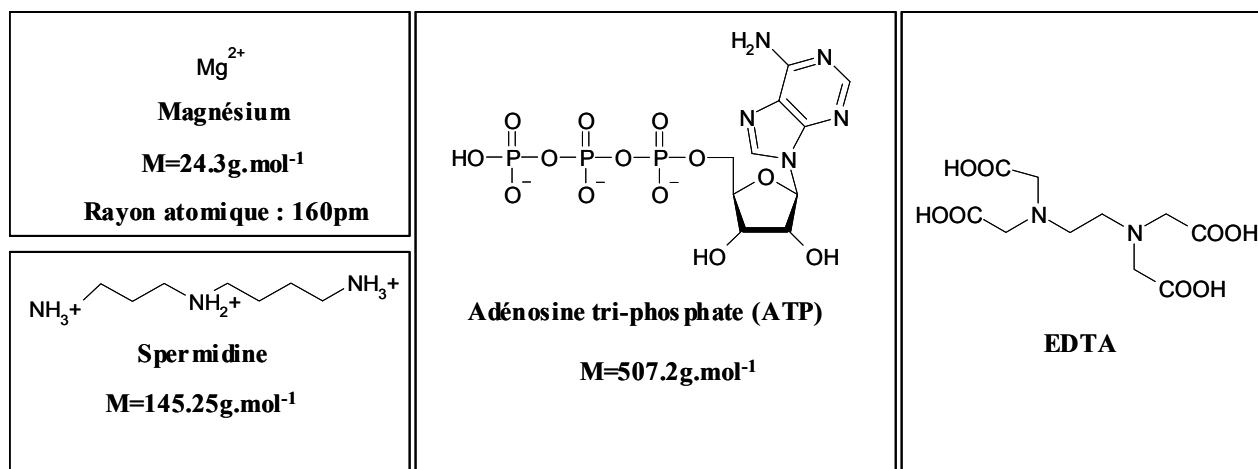


Figure V.1 Formules chimiques et poids moléculaires du magnésium, de la spermidine de l'ATP et de l'EDTA.

Les NCPs utilisées pour ces expériences sont extraites de thymus de veau. Les NCPs du lot noté A (Chapitre III) ont été précipitées à la Spd³⁺. Les NCPs du lot D ont été utilisées dans les expériences de précipitation au Mg²⁺ et celles du lot B pour l'agrégation par de l'ATP.

Des diagrammes de phase de précipitation des NCPs en présence de cations multivalents (Mg²⁺ et Spd³⁺) sont présentés. Par diffusion de lumière, nous avons tenté de déterminer la nature des interactions entre NCPs et ATP.

A. Agrégation des NCPs par des cations multivalents

L'objet de ce paragraphe consiste, dans un premier temps, en la description des conditions de précipitation des NCPs par des cations multivalents magnésium (Mg^{2+}) et spermidine (Spd^{3+}). Pour cela, des diagrammes de phases ont été établis où sont distinguées des régions monophasiques et biphasiques en fonction des concentrations en particules et en ions multivalents. La structure des agrégats de NCPs obtenus fait l'objet d'une seconde partie.

I. Diagrammes de phase de précipitation des NCPs par des cations multivalents

1. Etablissement des courbes de précipitation et des diagrammes de phase de précipitation

Pour des concentrations en nucléosomes inférieures à $60mg.mL^{-1}$, des courbes de précipitation sont tracées. Pour une courbe de précipitation donnée, la concentration en NCPs reste constante alors que la concentration en cations multivalents varie. Les expériences sont effectuées en présence de Tris-HCl 10mM, pH 7.6 avec ou sans EDTA. Les solutions de NCPs et de Mg^{2+} ou Spd^{3+} , de concentrations connues, sont équilibrées dans le même tampon. Pour chaque point expérimental, une solution de cations multivalents est ajoutée à une solution de NCPs pour atteindre des concentrations globales de mélange données en NCPs (C_{gNCPs}) et en ions multivalents ($C_{gMg^{2+}}$ et $C_{gSpd^{3+}}$). Le mélange est "vortexé" puis centrifugé à 11000 ou 41000g pendant 20 minutes. Le taux de précipitation est ensuite évalué par la mesure des concentrations de NCPs subsistant dans les surnageants par spectrométrie UV à 260nm. La figure V.2 reprend schématiquement la méthode mise en œuvre pour établir chaque point expérimental d'une courbe de précipitation.

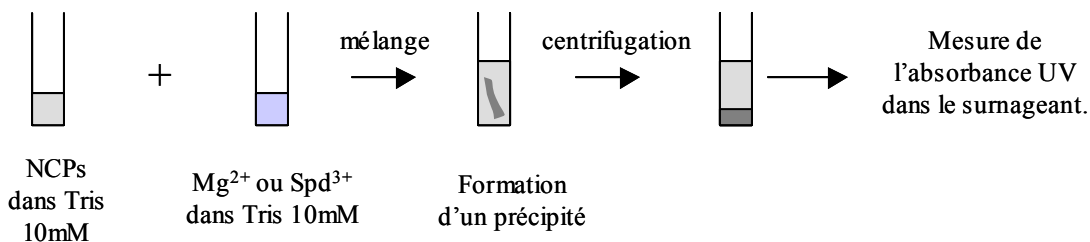


Figure V.2 Méthode utilisée pour établir des courbes de précipitation.

La figure V.3 représente schématiquement l'allure de deux courbes de précipitation typiques qui peuvent être obtenues pour une concentration donnée en NCPs. Ces courbes sont représentatives du comportement de polyélectrolytes précipités par des ions multivalents (Pelta et al., 1996, Sabbagh et Delsanti, 2000).

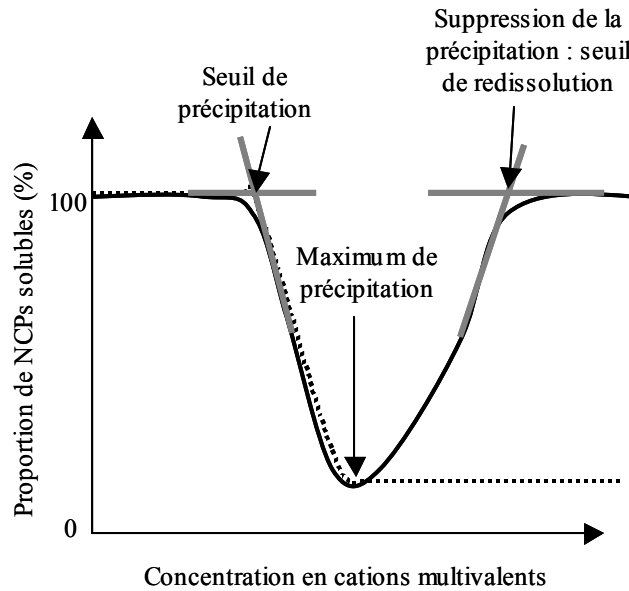


Figure V.3 Allure générale des courbes de précipitation. En trait continu, on représente une courbe pour laquelle la précipitation est supprimée au-delà d'une concentration seuil en ions multivalents. En pointillés, le précipité persiste quelles que soient les concentrations en ions multivalents. Les seuils de précipitation et de redissolution sont déterminés graphiquement par tracé des droites en traits gras.

Deux configurations sont possibles (en traits continus et en pointillés). Dans les deux cas, à partir d'une concentration seuil en ions multivalents, les NCPs précipitent jusqu'à atteindre un taux maximum de précipitation. Dans certaines conditions, le précipité persiste (traits pointillés) alors qu'on peut également constater une suppression partielle ou totale (traits pleins) de la précipitation pour une concentration seuil plus élevée en ions multivalents. Il sera question de seuil de précipitation, de maximum de précipitation puis de seuil de redissolution. Les seuils de précipitation et de suppression du précipité permettent de délimiter les zones biphasiques des diagrammes de phase où coexistent une phase où les NCPs sont insolubles et fortement concentrées et une phase moins dense de particules solubles. Ces seuils de précipitation et de redissolution sont déterminés graphiquement (traits gris et gras, Figure V.3). Ce mode de détermination permet de donner des valeurs de seuil avec une précision de 10 à 20%. Au-delà de 60mg.mL^{-1} en NCPs, les seuils de précipitation sont déterminés visuellement par la présence ou non d'agrégats dans le tube. En effet, l'établissement de courbes complètes de précipitation pour des concentrations supérieures nécessiterait des quantités trop importantes de matériel biologique.

Après mélange des solutions de NCPs et d'ions multivalents, les échantillons sont turbides. La fraction plus dense de l'échantillon sédimente ensuite spontanément au fond du tube. Cette phase plus dense et le surnageant sont translucides à température ambiante et délimitée par une interface nette. Par chauffage, la phase plus dense devient turbide de nouveau.

2. Agrégation des NCPs par le magnésium

a. Allure des courbes de précipitation de NCPs précipités par le magnésium

Les courbes de précipitation de NCPs agrégées par du magnésium ont été établies pour les concentrations suivantes : 0.5, 1, 5, 20 et 50mg.mL⁻¹. La figure V.4 ne présente que trois concentrations représentatives en NCPs (1, 20 et 50mg.mL⁻¹). Pour toutes les courbes de précipitation des NCPs par le Mg²⁺, toute trace d'EDTA a été soigneusement éliminée des solutions de NCPs par dialyse.

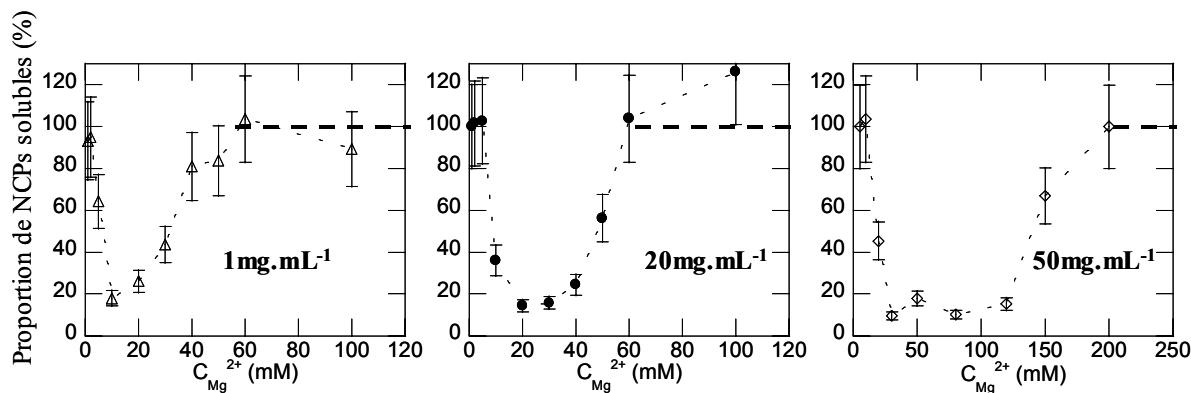


Figure V.4 NCPs précipités par du magnésium dans une solution tampon de Tris-HCl 10mM à pH 7.6 pour des concentrations globales en NCPs de 1 (Δ), 20 (\bullet) et 50 (\diamond) mg.mL⁻¹. Les courbes en pointillés ne sont que des guides pour les yeux.

Quelle que soit la concentration en nucléosomes, l'allure générale des courbes de précipitation reste semblable. Une fraction des NCPs est agrégée au-delà d'une concentration seuil en Mg²⁺. Pour des concentrations supérieures en Mg²⁺, la proportion de NCPs solubles décroît jusqu'à un maximum de précipitation. Pour des concentrations encore supérieures en ions divalents, la précipitation est partiellement puis totalement supprimée. Pour des concentrations croissantes en NCPs, les courbes sont décalées. Les concentrations seuil de précipitation et de redissolution croissent avec les concentrations en particules. Pour des concentrations en NCPs inférieures à 40mg.mL⁻¹, un maximum de précipitation est aisément identifiable et correspond à une concentration précise en ions multivalents. Par contre, pour les concentrations les plus élevées, la précipitation reste maximale sur un intervalle important de concentrations en NCPs.

La température à laquelle les expériences sont effectuées n'affecte pas l'allure des courbes de précipitation. A 4 et à 20°C, les courbes sont quasiment identiques. (Figure V.5). La température n'a donc pas d'influence sur les conditions de précipitation.

Les courbes de précipitation obtenues avec des vitesses de centrifugation distinctes (11000 et 41000g) sont légèrement différentes pour des concentrations en magnésium qui induisent une redissolution des précipités. La fraction de NCPs restante en solution est inférieure après centrifugation à 41000g par rapport à une centrifugation moins rapide (cf. figure V.5). Soumis à un couple peu important, de très petits agrégats subsistent certainement en solution et sont comptabilisés comme non précipités au cours des mesures de concentration. Néanmoins,

pour des raisons pratiques, l'ensemble des courbes de précipitation sera réalisé avec une vitesse de centrifugation de 11000g, à température ambiante.

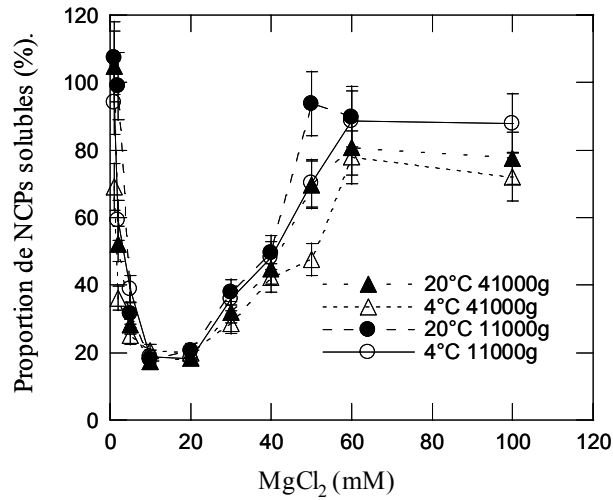


Figure V.5 Effet de la température et de la vitesse de centrifugation sur l'allure des courbes de précipitation pour des concentrations globales en NCPs de NCPs à $5mg.mL^{-1}$.

b. Diagramme de phase des NCPs agrégées par le Mg^{2+}

La figure V.6.a présente la forme globale du diagramme de phase pour des NCPs précipités par du magnésium.

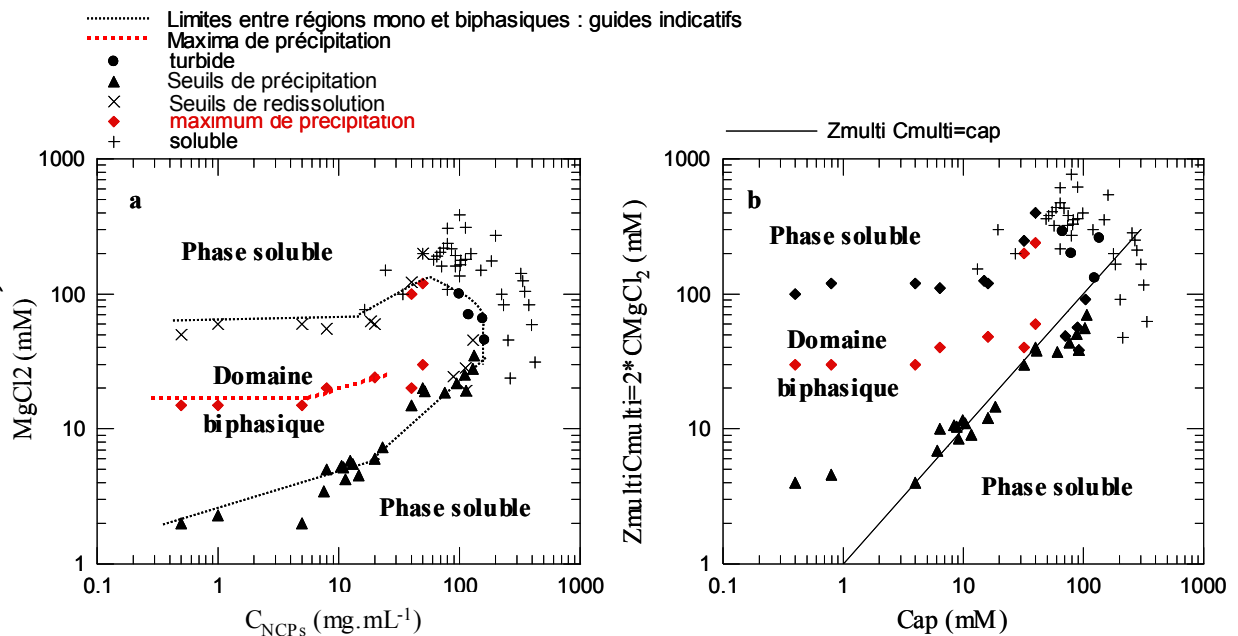


Figure V.6.a Allure globale du diagramme de phase de NCPs précipitées par du magnésium²⁺.

Figure V.6.b Changement d'échelle : $Z_{multi} C_{multi} = 2 * C_{MgCl_2}$ en fonction de $Cap(mM) = 0.799 C_{NCPs}(mg.mL^{-1})$. La courbe en trait plein correspond à $Z_{multi} C_{multi} = Cap$.

Le domaine biphasique est "fermé" aux concentrations élevées en NCPs et MgCl_2 . C'est-à-dire qu'au-delà de concentrations seuil en MgCl_2 ($>150\text{mM}$) et NCPs ($>300\text{mg.mL}^{-1}$), on observe une suppression de la précipitation. Cette zone de fortes concentrations a été particulièrement explorée pour s'assurer de la fermeture du domaine biphasique.

Les concentrations minimales de MgCl_2 qui induisent la précipitation croissent avec la concentration en NCPs. Les concentrations en Mg^{2+} au seuil de redissolution augmentent légèrement avec les concentrations en NCPs jusqu'à $C_{\text{NCPs}}=20\text{mg.mL}^{-1}$ puis plus rapidement.

Afin d'adopter une représentation qui permette une interprétation plus aisée des diagrammes, les charges positives apportées par les ions multivalents et les charges négatives disponibles sur les NCPs sont portées en ordonnées et en abscisse, respectivement (Figure V.6.b). Un ADN nucléosomal de 155pb apporte 310 charges négatives par NCP qui a une masse moléculaire de 210000Da. 142 charges sont neutralisées par l'octamère d'histones. 168 charges négatives sont donc globalement disponibles par nucléosome. Une concentration apparente Cap de charges négatives est donc calculée en fonction des concentrations en NCPs : $\text{Cap}(\text{mM})=0.799*C_{\text{NCPs}}(\text{mg.mL}^{-1})$. Cette valeur de Cap reste approchée. La répartition de charges dans la structure de la NCP est, en effet, inhomogène (cf. chapitre I) et l'accessibilité des charges est variable. En première approximation, on peut toutefois supposer que cette valeur de Cap est proche du nombre de charges négatives réellement accessibles par NCP. Les charges positives apportées par les ions multivalents sont égales au produit de la valence des ions par leur concentration : $Z_{\text{multi}}C_{\text{multi}}=2*C_{\text{MgCl}_2}(\text{mM})$.

Pour $\text{Cap}>10\text{mM}$, l'évolution du seuil de précipitation est décrite par la courbe d'équation $Z_{\text{multi}}C_{\text{multi}}=\text{Cap}$. Pour $\text{Cap}>10\text{mM}$, la précipitation se produit lorsque le nombre de charges positives apportées par le magnésium équivaut au nombre de charges négatives disponibles des NCPs, dans des conditions d'électroneutralité. Ainsi, les ions multivalents sont, dans ce régime, en majorité condensés et les ions monovalents sont libres en solution. Ce type de comportement est observé dans le cas de polyélectrolytes linéaires tels que l'ADN précipités par des cations multivalents et les NCPs précipités par la spermine⁴⁺ (Raspaud et al., 1998, 1999).

Pour $\text{Cap}<10\text{mM}$, $Z_{\text{multi}}C_{\text{multi}}>\text{Cap}$. Par conséquent, une fraction d'ions multivalents est libre en solution.

c. Effet des ions monovalents

Les courbes de précipitation décrites ci-dessus ainsi que les diagrammes de phase qui en résultent ont été réalisés dans des conditions où les proportions en ions monovalents sont réduites. Seuls 10mM de Tris-HCl restent nécessaires pour tamponner les échantillons et assurer la stabilité des particules. Pour tester l'effet des ions monovalents sur la précipitation, différentes courbes ont été établies en présence de quantités variables de NaCl (de 2.5 à 60mM) pour une concentration de NCPs fixée à 1.5mg.mL^{-1} . (cf. figure V.7.a).

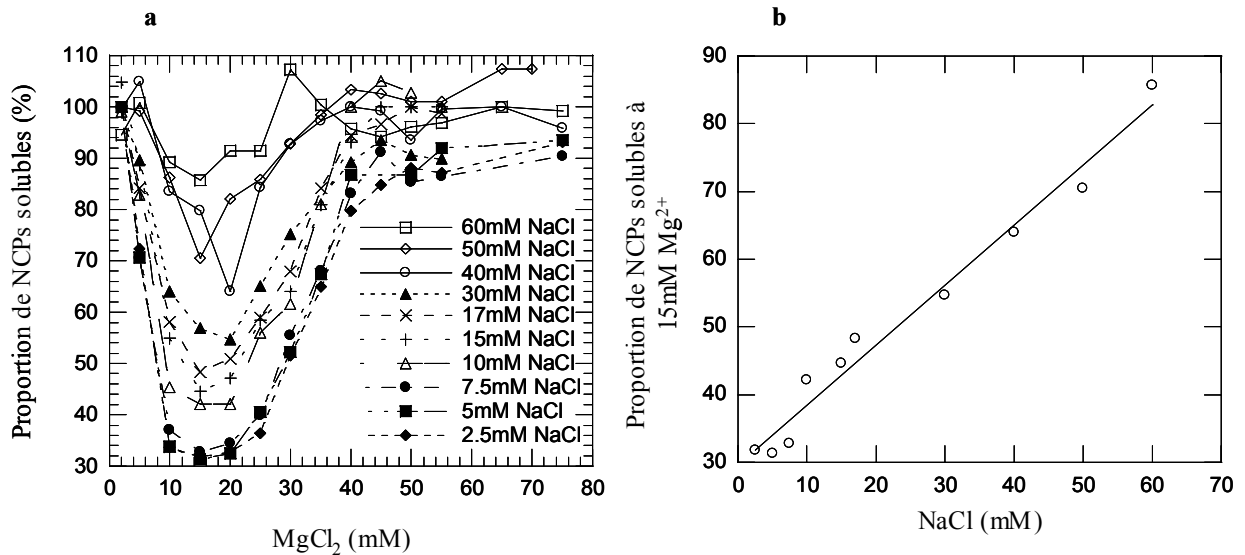


Figure V.7 Effet de la concentration en ions monovalents sur la précipitation des NCPs par le Mg²⁺.

a Courbes de précipitation obtenues pour des concentrations variables en ions monovalents. Les concentrations en NCPs et Tris-HCl restent constantes et valent respectivement 1.5mg.mL⁻¹ et 10mM.

b Proportion de NCPs solubles à 15mM MgCl₂ (au maximum de précipitation) en fonction des concentrations en ions monovalents (NaCl) pour une concentration en NCPs égale à 1.5mg.mL⁻¹.

Pour des concentrations croissantes en NaCl, la proportion de nucléosomes précipités par le magnésium décroît. La précipitation est quasiment abolie en présence de 60mM NaCl. Le maximum de précipitation est induit à des concentration en magnésium peu différentes (vers 15mM) quelles que soient les concentrations en ions monovalents. La figure V.7.b représente la proportion de NCPs solubles à 15mM MgCl₂ (au maximum de précipitation) en fonction des concentrations en ions monovalents (NaCl) ajoutées. Le pourcentage de NCPs solubles au maximum de précipitation semble croître linéairement avec les concentrations en cations monovalents. Un effet de compétition entre ions monovalents (NaCl + Tris 10mM) et multivalents pour la condensation autour du nucléosome est ainsi mis en évidence. Les ions monovalents représentent une fraction des contre-ions condensés. Lorsque la concentration en ions monovalents croît, la proportion d'ions multivalents condensés diminue. Ainsi, l'attraction à courte portée due aux ions multivalents est fortement réduite. De plus, les interactions attractives à courte distance sont écartées par l'addition d'ions monovalents en solution.

3. Agrégation des NCPs par la spermidine

a. Allure des courbes de précipitation de NCPs précipités par la Spd³⁺

Des courbes de précipitation de NCPs agrégées par la Spd³⁺ ont été également tracées. Les expériences ont été réalisées en présence de Tris-HCl 10mM, pH 7.6 pour des concentrations en NCPs comprises entre 0.2 et 64mg.mL⁻¹ (0.2, 0.5, 1, 2, 4, 10, 25, 35, 40, 60 et 64mg.mL⁻¹). La

figure V.8 montre les courbes obtenues pour 3 concentrations en NCPs. L'ensemble des courbes de précipitation obtenu n'est pas présenté pour des raison de clarté.

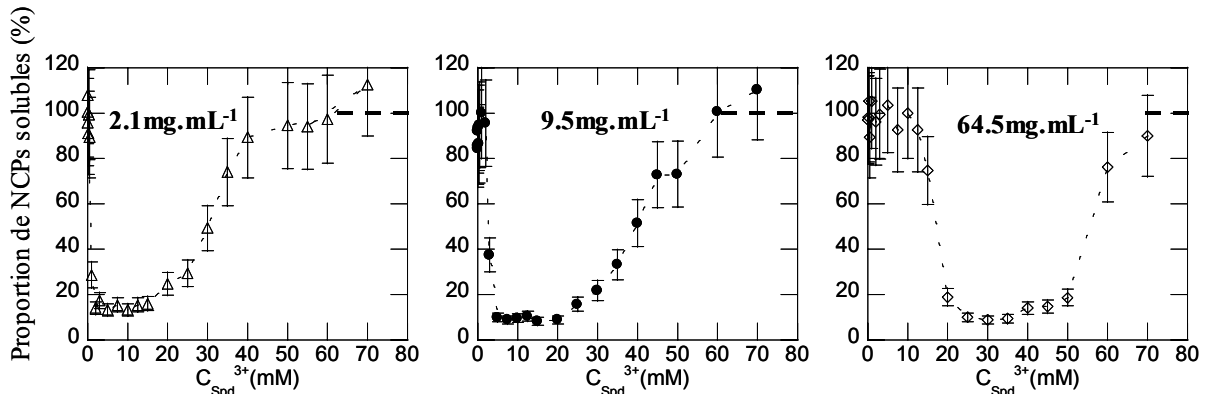


Figure V.8 Courbes de précipitation des NCPs par la Spd^{3+} obtenues en présence de Tris-HCl 10mM pH 7.6 sans EDTA pour des concentrations globales en NCPs de 2.1 (Δ), 9.5 (\bullet) et 64.5 (\diamond) $mg.mL^{-1}$. Les traits en pointillés sont utilisés comme guide pour les yeux.

Les seuils de précipitation et de redissolution sont décalés vers des concentrations en ions plus importantes pour des concentrations croissantes en NCPs. Un domaine de concentration en Spd^{3+} où la précipitation est maximale est observé plutôt qu'une valeur précise de concentration maximale.

b. Diagramme de phase des NCPs agrégés par la Spd^{3+}

La figure V.9.a présente l'allure du diagramme de phase de NCPs précipitées par la Spd^{3+} en présence de Tris-HCl 10mM. Les zones mono et biphasiques sont mises en évidence dans un diagramme où les concentrations en ions multivalents spd^{3+} sont représentées en fonction des concentrations en NCPs.

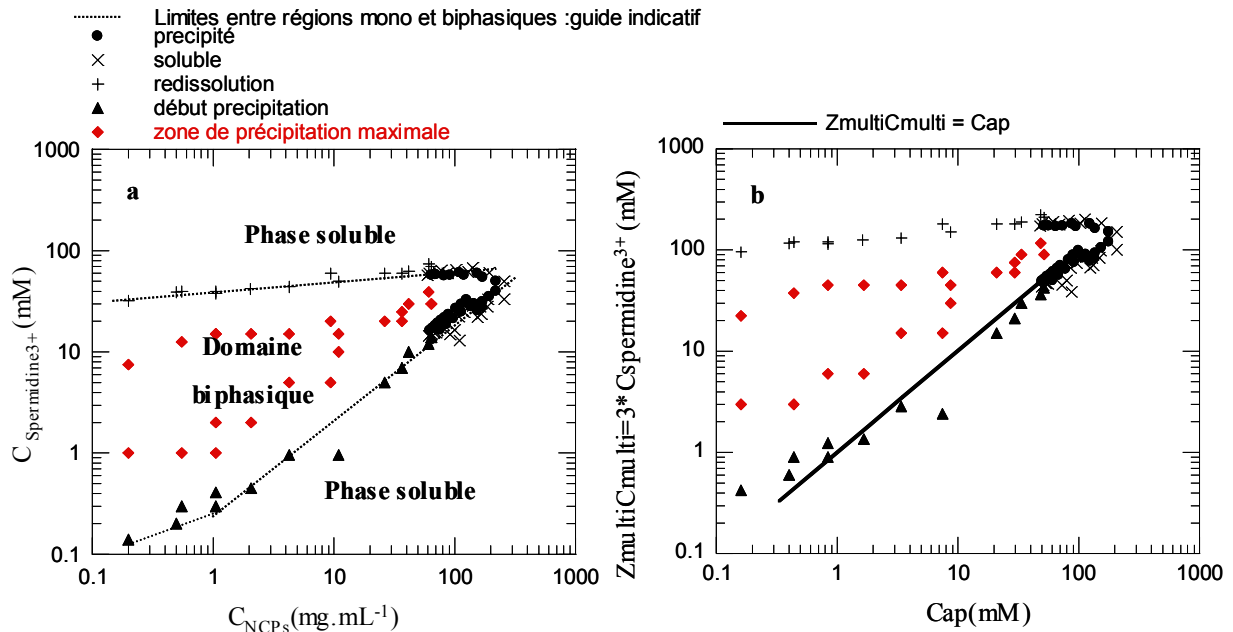


Figure V.9.a Allure générale du diagramme de phase de NCPs précipités par la Spd^{3+} .

Figure V.9.b Changement d'échelle : en ordonnée $Z_{multi}C_{multi}=3 \cdot C_{Spd^{3+}}$ et en abscisse, $Cap(mM)=0.799 \cdot C_{NCPs} (mg.mL^{-1})$. La courbe en traits continus a pour équation $Z_{multi}C_{multi}=Cap$.

Les lignes discontinues délimitent le domaine biphasique. La région du diagramme où la précipitation est maximale est délimitée par les losanges. Pour des concentrations élevées en Spd^{3+} et nucléosomes, supérieures à 70mM et 200mg.mL⁻¹, respectivement, les solutions sont solubles. Le domaine biphasique est donc fermé pour les plus fortes concentrations en NCPs et Spd^{3+} .

Ce diagramme de phase est également tracé en considérant le nombre de charges positives apportées par la Spd^{3+} ($Z_{\text{multi}}C_{\text{multi}}=3*C_{\text{Spd}^{3+}}$) en fonction du nombre de charges disponibles au niveau des NCPs ($\text{Cap(mM)}=0.799C_{\text{NCPs}}(\text{mg.mL}^{-1})$) (Figure V.9.b).

Lorsque $\text{Cap}>1\text{mM}$, le seuil de précipitation est décrit par la courbe d'équation $Z_{\text{multi}}C_{\text{multi}}=\text{Cap}$. Au seuil de précipitation, la plupart des cations multivalents sont utilisés pour précipiter les NCPs. Peu de cations Spd^{3+} sont libres en solution. Les concentrations en Spd^{3+} nécessaires à la redissolution augmentent légèrement avec les concentrations en NCPs.

4. Discussion

a. Allure générale des diagrammes de phase

A très faibles concentrations en ions multivalents, les NCPs sont solubles. Une concentration seuil en cations multivalents induit des interactions fortement attractives entre particules qui s'agrègent. Certaines des théories qui rendent compte de l'agrégation de particules colloïdales de même charge par des ions multivalents sont décrites dans le chapitre II. L'agrégation de NCPs résulterait de corrélations statiques et/ou dynamiques entre les contre-ions multivalents des NCPs (Revue par Gelbart et al. (2000)). Olvera de la Cruz et al (1995) proposent un modèle de pontage entre polyélectrolytes par des contre ions multivalents condensés pour décrire la précipitation. Lorsque les concentrations en cations multivalents augmentent, les interactions attractives à courte portée sont progressivement écrantées et les répulsions électrostatiques prédominent. Par conséquent, une ressolubilisation des précipités est observée. Shklovskii (1999) évoque ce phénomène de suppression de précipitation et le désigne par l'expression : "condensation réentrante". Cette redissolution se produit pour les systèmes régis par des interactions électrostatiques à courte portée engendrées par la condensation de contre-ions (Sabbagh & Delsanti, 2000). Dans l'hypothèse où le phénomène de redissolution ne serait pas observé, la précipitation des particules résulterait de complexation spécifique entre groupements chimiques des cations multivalents et particules (Sabbagh & Delsanti, 2000).

Pour les deux diagrammes présentés ici, les seuils de redissolution croissent légèrement avec Cap. Olvera de la Cruz et al. (1995) ont tracé des diagrammes de phase calculés pour des polyélectrolytes de poids moléculaires variables précipités à la Spd^{3+} . Lorsque les polyélectrolytes ont un poids moléculaire élevé, les concentrations seuil de redissolution sont indépendantes des concentrations en particules. Par contre, pour des polyélectrolytes courts, les concentrations seuil de Spd^{3+} nécessaires à la redissolution croissent avec les concentrations en polyélectrolytes. Les NCPs présenteraient donc un comportement similaire aux polyélectrolytes courts.

Plusieurs auteurs ont calculé les domaines de stabilité ou d'instabilité de polyélectrolytes en présence d'ions multivalents de charge opposée pour établir des diagrammes de phase. L'allure

globale de ces diagrammes de phase théorique, est proche de celle des diagrammes de phase expérimentaux que nous avons établis à l'aide de NCPs (Figure II.11). En première approximation, les NCPs bien qu'elles ne soient pas des polyélectrolytes donnent lieu à des diagrammes de précipitation similaires.

Nguyen & Shkolovskii (2001), en décrivant les interactions attractives suivant un modèle de corrélation statique de contre-ions condensés (chapitre II), établissent un diagramme de phase de stabilité de l'ADN en présence de sphères chargées positivement (Figure II.11). Ce diagramme de phase indique des seuils de précipitation et de redissolution. L'allure globale de ce diagramme théorique décrit correctement les expériences de précipitation et de redissolution pour les concentrations en particules et en ions multivalents peu élevés. En particulier, au-delà d'une concentration limite en NCPs, le seuil de précipitation est proche de l'électroneutralité (trait en pointillés, Figure II.11), comme le montrent nos diagrammes expérimentaux. Par contre, à fortes concentrations en particules et ions multivalents, le diagramme est ouvert, ce qui n'est pas observé dans le cas des diagrammes expérimentaux. Dans l'hypothèse où une "cheminée" prolongerait le domaine biphasique de nos diagrammes expérimentaux, sa taille serait extrêmement réduite. En effet, les points expérimentaux ont été multiples au niveau de ces domaines à concentrations élevées en cations multivalents et particules.

De plus, Nguyen & Shkolovskii (2001) proposent que la redissolution s'accompagne d'une inversion de la charge des particules dont le seuil est représenté par un trait discontinu sur la figure II.11. Or, de Frutos et al (2001) ont montré à partir de mesures de mobilité électrophorétique que les NCPs précipitées par du Mg^{2+} ne présentent pas d'inversion de charge induite. Par contre, les NCPs précipitées par la Spd^{3+} en subissent une.

La théorie de Shkolovskii permet donc de rendre compte qualitativement des principales caractéristiques de la précipitation de NCPs par des cations multivalents mais d'un point de vue quantitatif, il faut tenir compte des caractéristiques et particularités des NCPs. En effet, la répartition des charges des NCPs est très hétérogène et sa forme n'est ni parfaitement sphérique ni cylindrique.

b. Comparaison Mg^{2+} et Spd^{3+}

La figure V.10 compare des courbes de précipitation obtenues avec du Mg^{2+} et de la Spd^{3+} pour deux concentrations distinctes en NCPs (0.5 (a) et 1(b) $mg.mL^{-1}$). Le seuil de précipitation est atteint pour des concentrations de Spd^{3+} inférieures aux concentrations en Mg^{2+} . De plus, au maximum de précipitation, la proportion de NCPs solubles est plus importante en présence de Mg^{2+} . La Spd^{3+} apparaît donc comme un agent précipitant plus efficace que le Mg^{2+} .

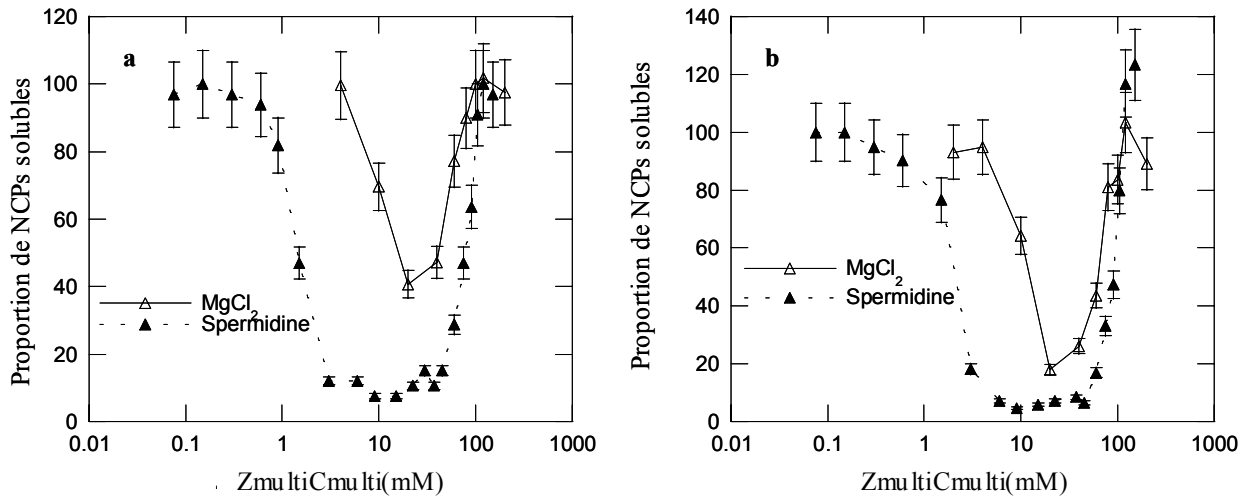


Figure V.10 Comparaison de courbes de précipitation obtenues avec du Mg^{2+} (Δ) et de la Spd^{3+} (\blacktriangle).
 a : Concentrations en NCPs de $0.5g.L^{-1}$. b : Concentrations en NCPs de $1g.L^{-1}$.

Sur la figure V.11 les diagrammes de phase de NCPs précipités par le Mg^{2+} et la Spd^{3+} sont superposés. Dans les deux cas, la zone biphasique est fermée aux fortes concentrations en NCPs et cations multivalents.

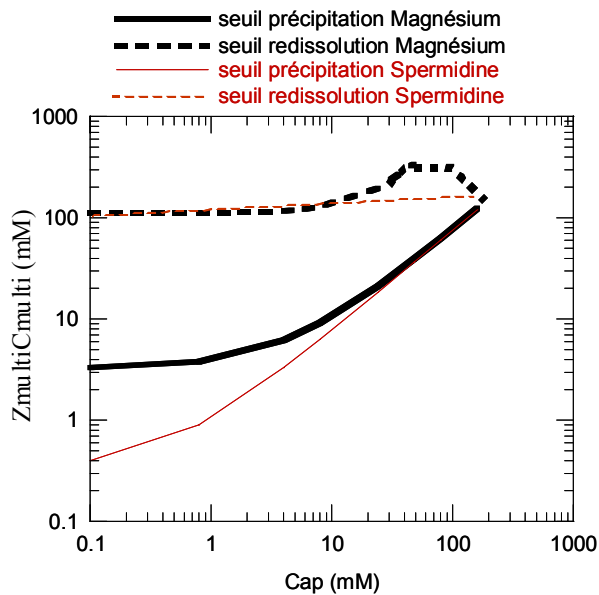


Figure V.11 Comparaison des diagrammes de phase de NCPs précipitées par la Spd^{3+} et le Mg^{2+} .

La surface du domaine biphasique s'étend sur une gamme de concentration en cations multivalents plus large dans le cas de la Spd^{3+} que du Mg^{2+} . Notamment à faible concentration en NCPs ($Cap=0.1mM$), la précipitation est induite pour des concentrations en ions multivalents environ 10 fois plus faible pour la Spd^{3+} que pour le Mg^{2+} . Jusqu'à $Cap>30mM$, les seuils de

précipitation dépendent de la valence des cations. Plus la valence des ions multivalents utilisés comme agents précipitant est élevée, plus la précipitation des NCPs semble aisée. Les théories, pour des polymères chargés (polyélectrolytes), prédisent que la précipitation est d'autant plus aisée que la valence des ions utilisés comme agent précipitant est élevée. Par exemple, Rouzina & Bloomfield (1996) et Grosberg et al. (2002) proposent que la précipitation se produit pour :

$$\Gamma = \frac{(z_{\text{multi}}e)^2}{\epsilon a_z k_B T} \geq 2$$

z_{multi} est la valence des ions multivalents utilisés, e la charge élémentaire, ϵ la constante diélectrique, a_z la distance entre charges condensées, k_B la constante de Boltzmann et T la température.

Les seuils de redissolution des deux diagrammes sont très peu différents pour $Cap < 10\text{mM}$. A faible concentration en particules, la redissolution des agrégats ne dépend donc pas de la valence des cations précipitants. Pour $Cap > 10\text{mM}$, les seuils de redissolution diffèrent pour le Mg^{2+} et la Spd^{3+} . Malgré l'imprécision sur la détermination des seuils de redissolution, on semble observer que la redissolution des agrégats précipités par le Mg^{2+} nécessite une plus grande quantité d'ions multivalents qu'en présence de Spd^{3+} . Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

La Spd^{3+} est plus chargée que la magnésium. On peut supposer que la Spd^{3+} en excès écranterait plus facilement les interactions électrostatiques attractives que le Mg^{2+} et permette une redissolution plus facile.

De plus, la structure et la taille de la Spd^{3+} lui confère un encombrement stérique important qui faciliterait également la redissolution d'agrégats de NCPs.

En outre, de Frutos et al. (2001) ont montré que les NCPs précipitées par du Mg^{2+} ne subissent pas d'inversion de charge au cours de la redissolution alors que la charge des particules est inversée en présence de Spd^{3+} . Or, Nguyen & Shkolovskii (2001) proposent que la redissolution s'accompagne forcément d'une inversion de charge des particules. L'absence d'inversion de charges des NCPs précipitées par du Mg^{2+} est donc probablement liée à leur redissolution moins aisée.

c. Effet de l'EDTA dans la précipitation des NCPs par des cations multivalents

Au pH où les expériences sont réalisées, l'EDTA est un polyanion pour lequel sont en équilibre deux formes ionisées (3 et 4 fois). Sa structure chimique dans une forme entièrement protonée est présentée sur la figure V.1.

Effet de l'EDTA pour des NCPs précipitées par du Mg^{2+} .

La figure V.12 superpose deux diagrammes de phase de NCPs précipités par du Mg^{2+} dans des conditions expérimentales légèrement différentes. Les traits épais représentent les limites de la zone biphasique décrite ci-dessus pour des échantillons en absence d'EDTA alors que en traits fins, les données de de Frutos et al.(2001) sont reportées pour des échantillons comportant 1mM d'EDTA.

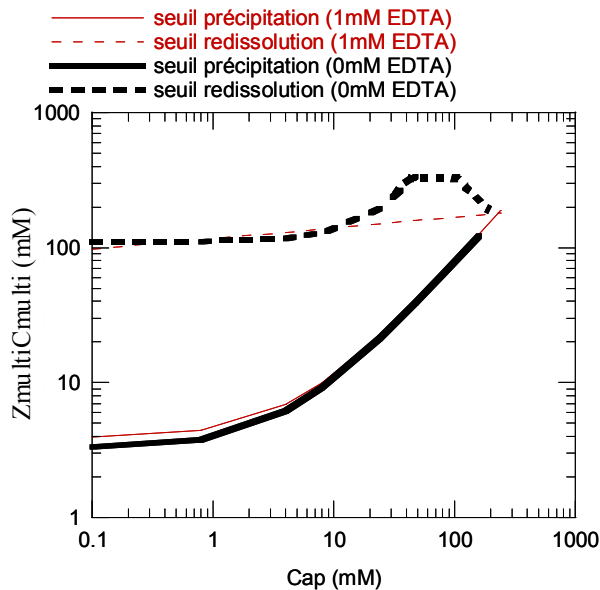


Figure V.12 Comparaison des diagrammes de phase de NCPs précipitées par le Mg²⁺ dans les conditions de cette thèse et de de Frutos et al. (2001).

Dans le cas des expériences réalisées par de Frutos et al. (2001), les concentrations en Mg²⁺ au seuil de précipitation sont très légèrement supérieures. Cependant, en première approximation, le décalage observé reste inclus dans les barres d'erreurs liées à la détermination des seuils de précipitation. Par ailleurs, de légères disparités dans le nombre de paires de bases d'ADN associées aux histones peuvent induire de tels décalages. Les NCPs utilisées par de Frutos et al. (2001) comportaient 160±10pb alors que l'ADN des particules utilisées dans le cadre de cette thèse (lot D) ont une longueur de 155±20pb. En outre, une fraction faible des ions Mg²⁺ est chélatée par l'EDTA. La concentration apparente d'ions divalents disponibles est donc inférieure aux concentrations de Mg²⁺ initiales en solution, dans le cas des résultats de de Frutos et al. (2001). Il est donc nécessaire d'apporter légèrement plus d'ions divalents en solution pour induire la précipitation des particules.

Les différences entre les deux diagrammes de phase sont particulièrement remarquables au niveau du seuil de redissolution pour les concentrations en NCPs les plus élevées (Cap>10mM). A ces concentrations en NCPs, la détermination du seuil de redissolution est visuelle et reste donc assez peu précise. Cependant les mesures ont été répétées à plusieurs reprises, dans ce domaine du diagramme de phase et il est probable que les différences observées résultent de la présence ou non d'EDTA. On peut avancer l'hypothèse que l'EDTA entre en compétition avec les NCPs pour le Mg²⁺, ce qui réduirait ainsi la surface du domaine biphasique.

Effet de l'EDTA sur les conditions de précipitation des NCPs par la Spd³⁺

L'effet de l'EDTA sur la précipitation des NCPs par la Spd³⁺ a été testé par comparaison de courbes effectuées avec et sans EDTA pour trois concentrations distinctes en nucléosomes (cf. figure V.14).

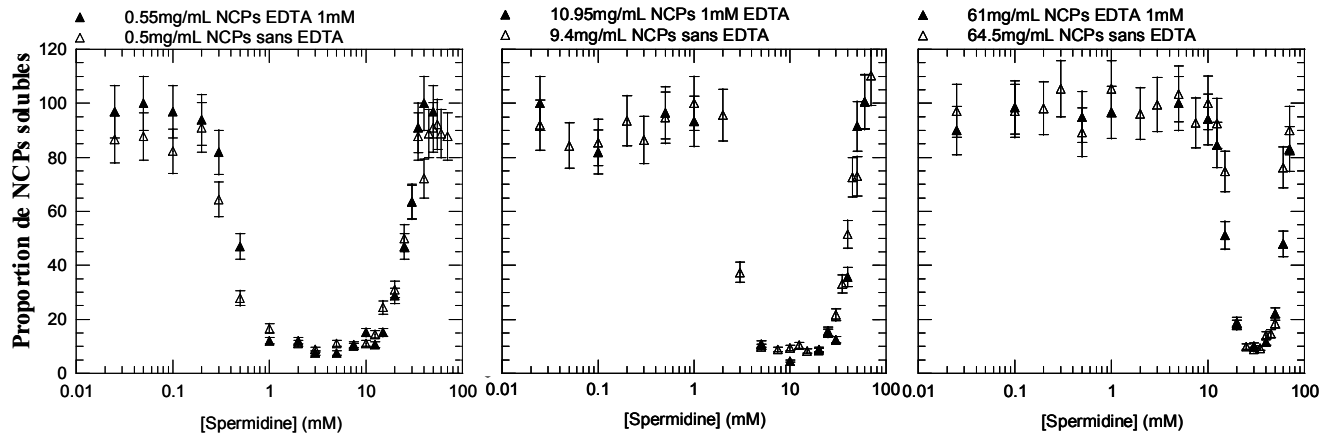


Figure V.13 Courbes de précipitation de NCPs agrégés par la spermidine en présence ou en absence d'EDTA.

L'influence de l'EDTA sur les conditions de précipitation de NCPs par la spermidine est négligeable, pour des concentrations proches en NCPs. Les courbes sont superposables. En effet, la Spd^{3+} , cation trivalent est un agent remarquablement efficace pour la précipitation des NCPs en comparaison avec le Mg^{2+} . Par conséquent, la présence d'EDTA concentré à 1mM ne masque pas l'effet de la Spd^{3+} .

d. Particules Cœur de Nucléosome isolées et chromatine : comparaison

La chromatine est également condensée en présence d'ions divalents, qu'elle soit associée ou non aux histones de liaison H1. Plusieurs travaux sont mentionnés dans les chapitres I et II. Widom (1986) a notamment montré que des chaînes de chromatine natives comportant des histones de liaisons H1 s'organisent en fibres de 30nm pour des concentrations en magnésium²⁺ supérieures à 0.5mM en présence de 10mM en ions monovalents. Schwartz et al. (1996) ont montré qu'en présence de 10mM de sels monovalents, des chaînes de chromatine dépourvues d'histones de liaison sont condensées pour des concentrations en magnésium supérieures à 2mM. Au delà de 60mM Mg^{2+} , ces chaînes ne sont plus précipitées. Dans le cas de particules isolées, nous venons de montrer que les NCPs, quelle que soit leur concentration, ne précipitent que pour des concentrations en magnésium²⁺ supérieures à 2mM et sont solubles pour des concentrations en Mg^{2+} supérieures à 60mM. Les chaînes de chromatine privées d'histones de liaison précipitent donc dans des gammes de concentration en ions divalents similaires aux NCPs isolées. Par contre, associées aux histones de liaison, les chaînes de chromatine sont condensées pour des concentrations en Mg^{2+} plus faibles. Les histones de liaison sont fortement basiques et neutralisent une partie des charges négatives des NCPs et de l'ADN de liaison. Ainsi les répulsions électrostatiques au sein de la chromatine sont partiellement écrantées et la précipitation de telles chaînes nécessite des quantités moindres en ions divalents. Toutefois, des diagrammes de phase plus complets de précipitation de chaînes de chromatine par des ions divalents ne sont pas disponibles et seraient utiles pour établir la comparaison.

Des expériences réalisées à partir de chromosomes isolés (Poirier et al., 2002) ont également montré une évolution du degré de condensation de chromosomes mitotiques en présence d'ions multivalents. En particulier, l'effet d'ions divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) et trivalents

($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) a été testé sur le degré de condensation de chromosomes mitotiques. Pour des concentrations de 10mM à 100mM en ions Mg^{2+} , les chromosomes sont condensés de manière réversible. L'effet du $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ est similaire mais de plus forte amplitude. Pour des concentrations en Mg^{2+} supérieures à 200mM, les chromosomes sont complètement décondensés. Le domaine de concentrations en ions divalents où les chromosomes mitotiques se condensent s'étend d'au moins 10mM jusqu'à 100mM en ions divalents. On retrouve le résultat établi ici, à savoir qu'à des concentrations supérieures à $40\text{-}50\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, les NCPs isolées sont effectivement précipitées entre 10 et 100mM en ions divalents.

La comparaison des conditions de précipitation par la spermine⁴⁺ pour de l'ADN, des fibres de chromatine et des NCPs a été effectuée par Raspaud et al. (1998, 1999). Notamment, un diagramme de phase expérimental complet de molécules d'ADN précipitées par la spermine⁴⁺, établi par Raspaud et al. (1998-1999), est présenté sur la figure II.7. Ce diagramme présente une allure similaire à celui qui décrit la précipitation des NCPs par la Spd^{3+} .

Des caractéristiques communes pour les conditions de précipitation par la spermine⁴⁺ sont mises en évidence pour l'ADN, la chromatine et les NCPs. En particulier, dans un régime intermédiaire de concentration ($\text{Cap}\sim 1\text{mM}$), les conditions de précipitation sont identiques pour l'ADN, les NCPs et la chromatine et décrits par $C_{\text{spermine}^{4+}}/\text{Cap}=0.2\pm 0.02$ (Raspaud et al., 1999). Dans ces conditions, les conditions de précipitation ne dépendent donc ni de la densité de charge ni de la géométrie des objets chargés.

II. Structure des phases denses de NCPs obtenus après précipitation induite par des ions multivalents

L'organisation des NCPs précipitées par des cations multivalents est étudiée de manière systématique et en relation avec les diagrammes de phase présentés dans la première partie. NCPs et cations multivalents de concentrations initiales connues sont mélangés pour que leurs concentrations globales respectives en solution, après mélange (C_{gNCPs} et C_{gmulti}) induisent la formation de précipités. Ces concentrations sont préalablement choisies et définies à partir des diagrammes de phases décrit dans le paragraphe précédent. Ces concentrations consécutives au mélange sont à distinguer des concentrations finales de NCPs et d'ions multivalents (C_{fNCPs} et C_{fmulti}) au sein du précipité après séparation de phase. Les expériences sont réalisées dans un milieu tamponné par du Tris-HCl 10mM, pH 7.6 qui apporte donc 10mM d'ions monovalents.

Les méthodes expérimentales ont été adaptées aux échantillons. Des images de microscopie optique (Annexe V.1) et des expériences de cryofracture (Annexe V.2) ont permis de visualiser l'organisation macroscopique des agrégats de NCPs. Des expériences de cryomicroscopie en films minces (chapitre IV) et de diffraction des rayons X (Annexe V.3) ont permis d'analyser, localement, l'organisation de NCPs précipitées (Figure V.14).

Cette récapitulation précise l'état de l'échantillon pour chaque type d'étude. En particulier, pour la cryomicroscopie en films minces, des agrégats de NCPs suspendus en solution sont étudiés alors que la cryofracture et la diffraction des rayons X sont utilisés pour analyser la phase précipitée après centrifugation sous forme de culot.

En particulier, la cryomicroscopie électronique en films minces a été utilisée dans un domaine de faibles concentrations en NCPs alors que la diffraction des rayons X a été mise en œuvre pour les concentrations plus élevées. L'analyse par diffraction des rayons X a été réalisée pour des échantillons dont les temps d'équilibration sont de 1 mois à 1 an.

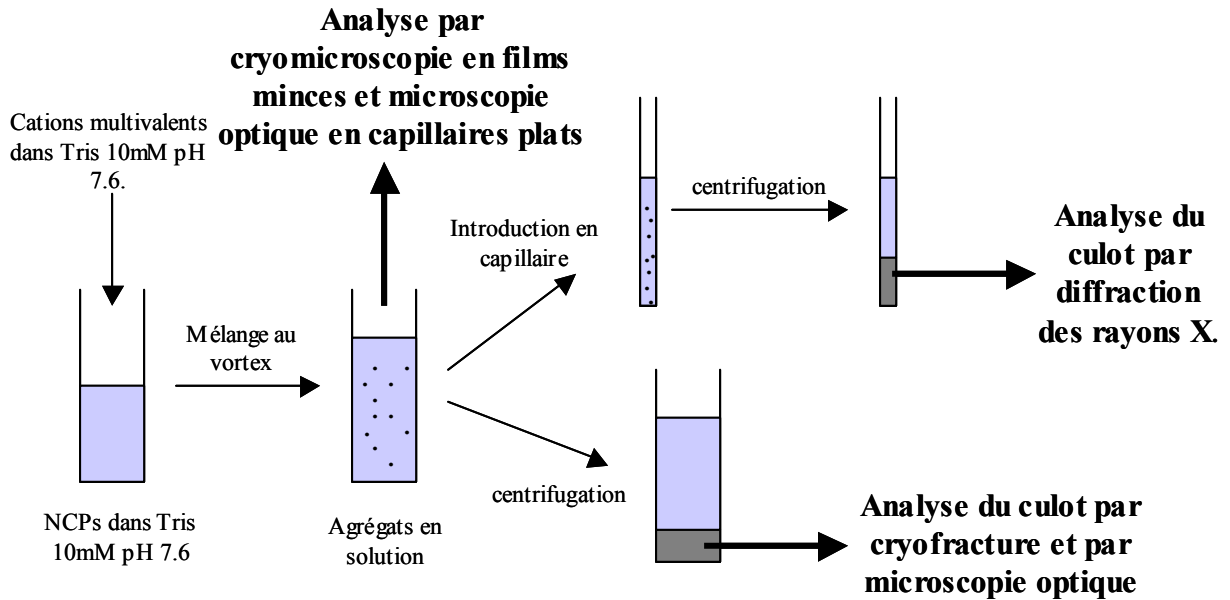


Figure V.14 Méthodes utilisées pour l'étude de l'organisation de NCPs précipitées par le Mg^{2+} et la SPd^{3+} .

1. Organisation des NCPs précipitées par du Magnésium²⁺

Pour les NCPs précipitées par le Mg^{2+} , une vue d'ensemble des différentes techniques employées et des conditions en concentrations analysées au sein du diagramme de phase est présentée sur la figure V.15.

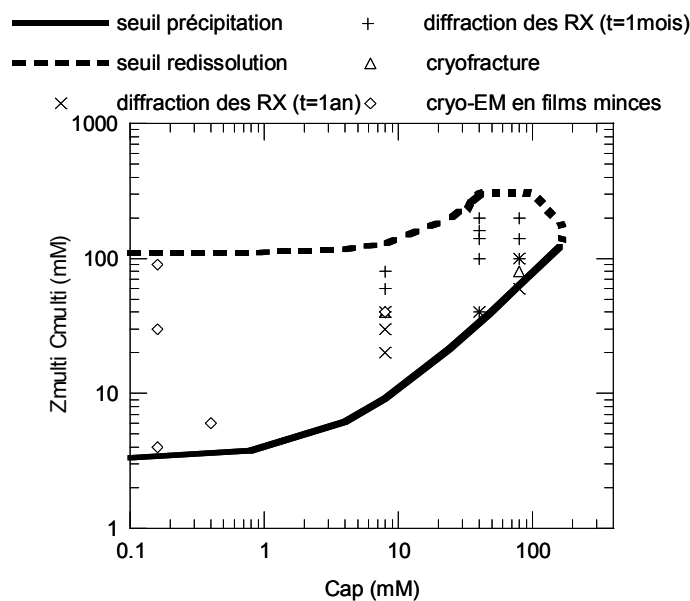


Figure V.15 Conditions en concentrations globales de NCPs et d'ions multivalents pour les méthodes employées dans l'étude de l'organisation des NCPs précipitées par du Mg^{2+} .

a. Description macroscopique du précipité

Observations par microscopie optique

Les NCPs précipitées par le Mg^{2+} forment une phase dense qui sédimente au fond du tube. Le culot translucide à température ambiante devient opaque si on le chauffe à $37^{\circ}C$.

Observés au microscope polarisant, les échantillons ne sont pas biréfringents, quelle que soit la température. Il est donc probable que précipitées par du Mg^{2+} , les NCPs ne s'organisent pas à longue distance. L'interface entre précipité et surnageant est visualisée sur la figure V.16. Les échantillons ont été colorés à l'acridine orange, un fluorochrome intercalant de l'ADN, afin de localiser les domaines plus denses en NCPs dans le précipité et le surnageant. Par contraste interférentiel de Nomarski, on observe la formation de gouttelettes de 2 à $20\mu m$ de diamètre (Figure V.16). Une densité importante de gouttelettes de surnageant est visible dans le précipité. Seules quelques gouttelettes de la phase plus dense sont visualisées dans le surnageant. Il semble que la densité et la taille des gouttelettes évoluent avec la température. Une étude détaillée et systématique en température reste à faire.

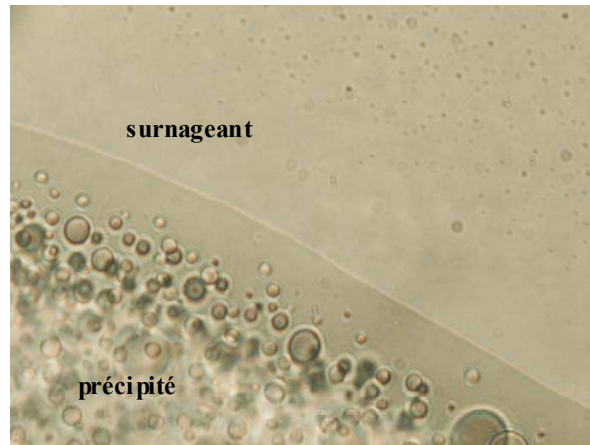


Figure V.16 Interface entre la phase précipitée au magnésium et le surnageant observées par contraste interférentiel de Nomarski.

Observation après Cryofracture

Deux points du diagramme ont été analysés par cryofracture (NCPs $10mg.mL^{-1}$, $Mg^{2+} 20mM$ et NCPs $100mg.mL^{-1}$, $Mg^{2+} 40mM$). Ces conditions correspondent chacune à un maximum de précipitation. Les échantillons ont été centrifugés ($11000 g$) et les culots vitrifiés par la projection sur un bloc de cuivre refroidi à la température de l'Helium liquide (*LHSF Liquid Helium Slam Freezing method*). Les observations sont identiques pour les deux échantillons.

Les gouttelettes déjà mises en évidence par microscopie optique sont également observées ici (Figure V.17.a et b). Deux phases de granulosité différente sont visualisées et clairement mises en évidence sur l'agrandissement de la figure V.17.c Par contre, les échantillons ne sont pas assez organisés pour que des structures bien définies soient discernées suivant le plan de fracture de l'échantillon.

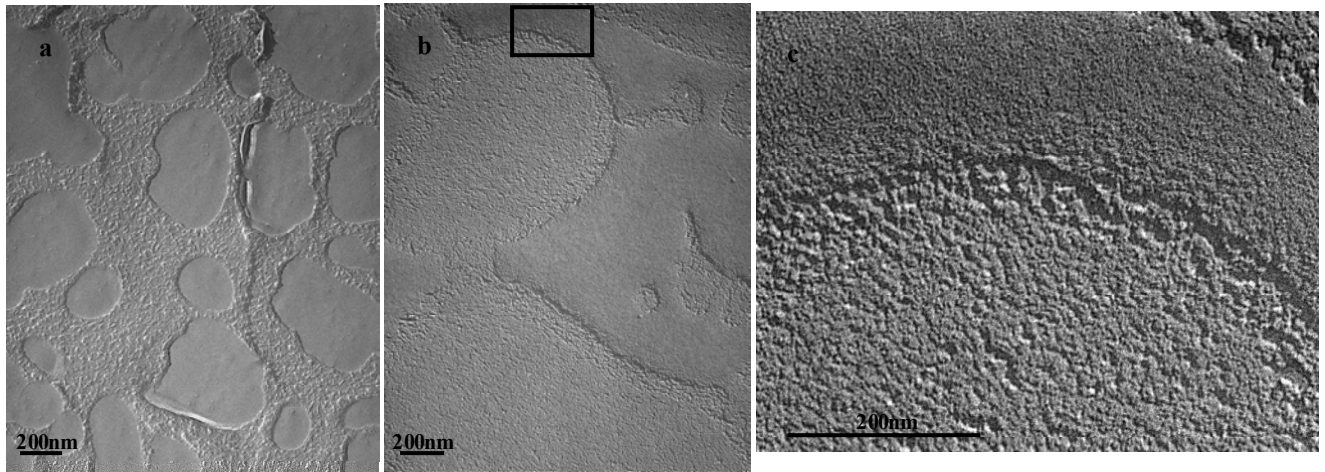


Figure V.17 Répliques de cryofracture visualisées par microscopie électronique. Un facteur d'agrandissement de 30 000 a été utilisé pour la prise d'image. Les figures V.17.a et b représentent des vues d'ensemble de répliques alors que la figure V.17.c montre un agrandissement d'une région encadrée de la figure V.17.b.

b. Organisation locale des NCPs dans les agrégats précipités au Mg^{2+}

Observation microscopique des agrégats en suspension

Plusieurs points du diagramme ont été analysés. Dans ce cas, les échantillons n'ont pas été centrifugés. Une goutte de la solution contenant les microagrégats a été déposée sur une grille à trous. La préparation du film mince et sa vitrification dans l'éthane liquide ont été réalisés en chambre humide pour éviter toute variation des concentrations en particules et en ions. Les grilles ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope électronique (Jeol 2011 LaB6).

On reconnaît les NCPs en vue de face ou de profil. Elles sont peu organisées dans le film mince (Figure V.18.a). Lorsque la concentration globale en NCP excède quelques $mg.mL^{-1}$, la densité en particules est élevée et les images sont difficilement analysables (Figure V.18; 10mg/ml NCP, 20mM Mg^{2+}).

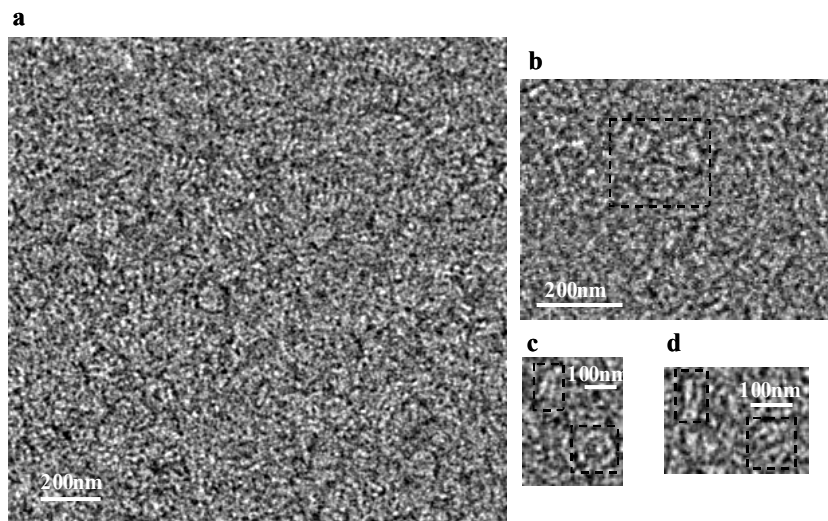


Figure V.20 NCPs à $10mg.mL^{-1}$ précipitées par 20mM de Mg^{2+} en films minces. Les images ont été prises à l'aide d'un microscope JEOL 2010 LaB6 avec un grandissement de 50 000 et une défocalisation de -1300nm.

Sur la figure V.18.b, trois particules juxtaposées, en vue de face, sont distinguées. Quand les NCPs sont de profil, l'ADN nucléosomal peut présenter une forme caractéristique "en V" montrée sur les figures V.18.c et d. L'absence d'ADN libre montre que les conditions de vitrification des films minces ne provoquent pas la dissociation de l'ADN et des histones.

Afin de visualiser plus facilement l'organisation des NCPs dans les microagrégats, des concentrations plus faibles en NCPs ont été envisagées ($<1\text{mg.mL}^{-1}$). Les images présentées ici (Figure V.19) correspondent à des concentrations en NCPs de 0.2 et 0.5mg.mL^{-1} et des concentrations en Mg^{2+} de 45 et 2mM , respectivement.

Sur la figure V.19.a, on observe que les NCPs tendent à s'empiler pour former des colonnes. Néanmoins, ces colonnes restent relativement désorganisées. Au sein de ces colonnes, les NCPs montrent une orientation aléatoire. La taille de ces colonnes reste réduite et les empilements regroupent au plus une dizaine de particules. Aucun ordre particulier n'est observé entre colonnes. Les transformées de Fourier correspondant à ces images ont été calculées à l'aide du logiciel Image J et mettent en évidence une fréquence spatiale caractéristique des échantillons (Figure V.19.a). Cette fréquence spatiale de 26\AA est proche du pas de la superhélice d'ADN nucléosomal. La fonction de transfert de contraste théorique pour une défocalisation de -1300nm est extrême pour une fréquence spatiale de 25.8\AA (chapitre IV, §B.2.a). On peut donc en déduire qu'une telle sous-focalisation est particulièrement bien choisie pour mettre en évidence l'ADN nucléosomal et permet d'optimiser le contraste. Sur les images (Figure V.19), l'interdistance entre NCPs successives dans l'empilement des particules en colonnes est évaluée à $57.8\pm 0.5\text{\AA}$.

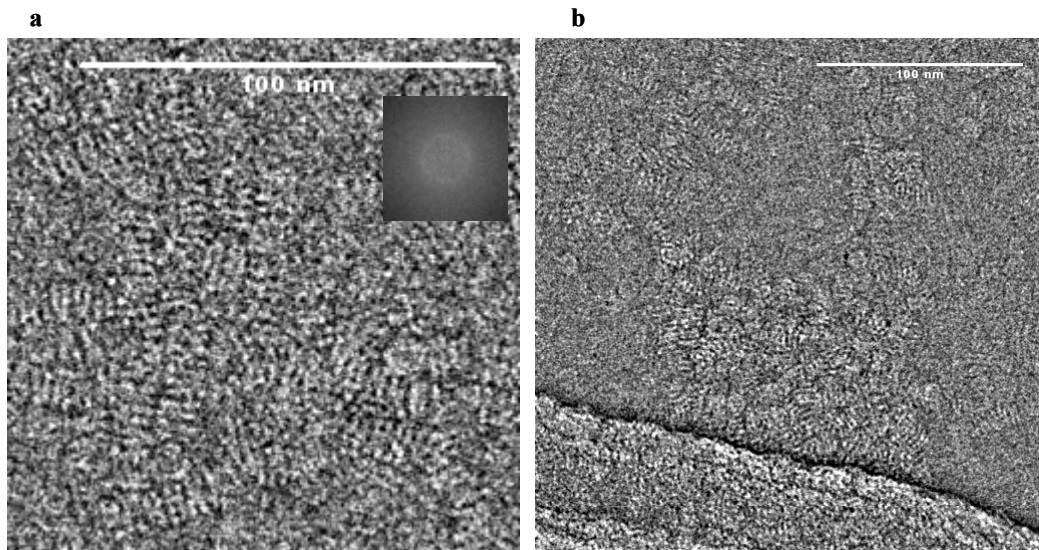


Figure V.19.a Empilements de NCPs en colonnes pour une concentration en particules de 0.2mg.mL^{-1} et une concentration en ions divalents de 45mM . L'image ainsi que sa transformée de Fourier sont présentées ici.

Figure V.19.b Agrégat de NCPs en film mince. La concentration en NCPs est de 0.5mg.mL^{-1} et la concentration en magnésium vaut 3mM .

Pour cette concentration en NCPs (0.2mg.mL^{-1}), l'organisation des NCPs semble rester invariable quelle que soit la concentration en Mg^{2+} le long d'une ligne verticale dans le

diagramme de phase. En effet, des échantillons comportant 2, 15 et 45mM en magnésium ont été analysés et présentent une organisation identique à celle qui est présentée sur la figure V.21.a. Des agrégats sont également localement observés pour des concentrations en NCPs de 0.5mg.mL^{-1} et semblent également peu organisés (Figure V.19.b). La cryomicroscopie en films minces permet donc de mettre en évidence, à faibles concentrations en NCPs ($<1\text{mg.mL}^{-1}$), un empilement local des NCPs en colonnes, peu organisées entre elles. L'organisation des NCPs précipitées au Mg^{2+} pour des concentrations plus élevées en particules a été étudiée par diffraction des rayons X.

Diffraction des rayons X

Pour évaluer l'effet du temps dans l'organisation des précipités, une première série de capillaires contient des NCPs préparées environ un an avant leur étude par diffraction des rayons X. Une seconde série a été préparée environ un mois avant les expériences. Les concentrations globales en particules varient de 10 à 100mg.mL^{-1} et les concentrations en magnésium de 7 à 100mM. Les conditions analysées sont reportées dans le diagramme de phase de la figure V.15. Faute de temps et de matériel biologique disponible, seulement une dizaine de conditions ont été analysées dans la zone biphasique.

La figure V.20.a montre une comparaison entre des échantillons récents et anciens concentrés tous deux à 10mg.mL^{-1} en NCPs et 20mM en Mg^{2+} . L'allure générale de la courbe obtenue à partir de l'échantillon récent est assez peu différente du facteur de forme calculé avec CRY SOL à partir de la structure cristallographique 1KX5 (Davey et al., 2002) de NCPs isolées. On note cependant une légère différence, aux très petits angles de diffusion, où une agrégation des particules est observée. L'intensité diffusée croît en effet beaucoup plus vite que le facteur de forme quand q diminue, pour la courbe expérimentale. Par contre, l'échantillon plus ancien donne lieu à un spectre de diffusion significativement différent et la variation de $I(q)$ au voisinage de $q=0.1\text{\AA}^{-1}$ caractérise un début d'empilement des NCPs. Aucun des échantillons dont le temps d'équilibration est court (1mois) ne présente des pics de Bragg ni même un profil caractéristique de NCPs empilées. Seuls des spectres caractéristiques de NCPs agrégées sont obtenus.

L'ensemble des spectres de diffraction obtenus après un temps d'équilibration long (1an) est présenté sur la figure V.20.b. Pour deux conditions, des pics de Bragg de faible intensité sont visualisés. Lorsque les NCPs sont concentrées à 50mg.mL^{-1} et la concentration en Mg^{2+} atteint 20mM, deux pics de faible intensité mais bien définis se superposent au facteur de forme des NCPs agrégées (Figure V.20.b). Ces deux pics correspondent au premier et au second ordre de l'empilement des NCPs en colonnes et sont indexés en 001 et 002 sur la figure V.20.b. La distance entre deux NCPs consécutives au sein de ces empilements vaut $2\pi/0.104\text{\AA}^{-1}=60.3\text{\AA}$. De plus, la largeur à mi-hauteur du pic pointé à 0.102\AA^{-1} vaut 0.0066\AA^{-1} et indique que l'organisation s'étend sur des domaines dont les dimensions atteignent 2500\AA . L'empilement s'étend donc, pour cet échantillon, sur plus d'une quarantaine de particules successives. Aucun pic caractéristique de l'ordre entre colonnes n'est observé. Pour une concentration en NCPs de 10mg.mL^{-1} , le spectre obtenu en présence de 10mM de Mg^{2+} comporte un seul pic de Bragg, observé très localement dans le culot en une unique position. Ce pic correspond à l'ordre en $\sqrt{7}$ d'une organisation hexagonale dont le paramètre serait égal à 114.3\AA . Le pic observé résulte

essentiellement d'une réflexion de Bragg et provient certainement de la présence d'un petit cristallite, dans l'échantillon. Les autres échantillons ne donnent pas lieu à des pics de Bragg bien définis et sont au mieux caractéristiques de la présence de petites colonnes (NCPs 100mg.mL⁻¹, Mg²⁺ 30mM). Cependant, on ne peut pas exclure que des cristallites de taille réduite soient présentes en coexistence avec des particules agrégées et leur trop faible densité ne leur permettrait pas d'être en position de réflexion, sur la sphère d'Ewald (annexe V.3).

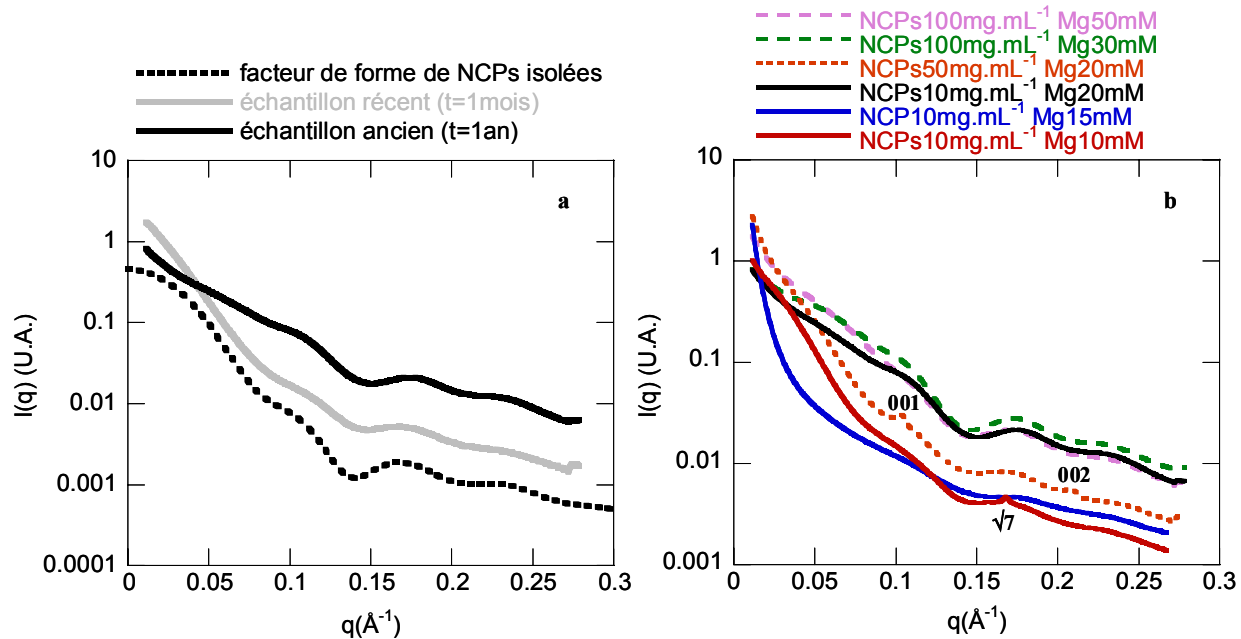


Figure V.20.a Effet du temps d'équilibration. Les NCPs sont concentrées à 10mg.mL⁻¹ et précipitées par 20mM de Mg²⁺ préparées un an ou un mois avant l'analyse par rayons X. Le facteur de forme caractéristique de NCPs isolées est également indiqué (trait pointillés espacés) pour comparaison.

Figure V.20.b Ensemble des diagrammes de diffraction analysés après un temps d'équilibration long (1 an).

On constate néanmoins que les échantillons les mieux organisés sont ceux dont la position dans le diagramme de phase est proche du seuil de précipitation.

Conclusions

Les images de cryomicroscopie en films minces semblent indiquer que les NCPs s'organisent dans un ordre local pour des concentrations en particules inférieures à 1mg.mL⁻¹. Les particules tendent à s'empiler les unes sur les autres pour former des colonnes de petite taille (environ 10 NCPs successives au plus) qui restent peu organisées les unes par rapport aux autres.

On constate également que précipitées par le Mg²⁺, les NCPs agrégées s'organisent très lentement. Par diffraction des rayons X, certains échantillons préparés un an avant analyse présentent des pics de Bragg fins indiquant que l'ordre s'étend à longue distance. Néanmoins l'intensité de ces pics est faible. L'organisation reste locale et coexiste avec des domaines moins structurés. On peut supposer qu'un temps d'équilibration plus long permettrait une meilleure

organisation des échantillons. L'ensemble des capillaires déjà analysé a été conservé et pourrait éventuellement être analysé de nouveau dans quelques années.

2. Organisation des NCPs précipitées par de la spermidine³⁺

a. Nature des phases denses déterminée par diffraction des rayons X

Des capillaires de NCPs précipitées à la Spd³⁺ ont été analysés par diffraction des rayons X. Pour explorer l'ensemble du domaine biphasique établi dans la première partie de ce chapitre, nous avons choisi les concentrations en NCPs suivantes : 6, 14, 25, 30, 40, 60, 100, 150, 200 et 240mg.mL⁻¹. Pour chacune d'entre elles plusieurs concentrations en Spd³⁺ sont analysées. L'effet de la température a été testé pour plusieurs échantillons en effectuant les mesures à 5°C, 25°C et 37°C. Dans un premier temps, les diagrammes de diffraction obtenus pour une concentration en NCPs de 14mg.mL⁻¹ seront précisément décrits. Pour les autres conditions, les résultats seront présentés de manière synthétique.

Spectres de diffraction obtenus pour une concentration en NCPs de 14mg.mL⁻¹

Deux types de courbes sont distinguées et traitées différemment. D'une part, en présence de 10mM de Spd³⁺, des pics de Bragg bien définis sont observés. Pour les autres conditions en Spd³⁺, des diagrammes sans pics de Bragg et présentant des pics larges sont obtenus. Les spectres de diffraction indiquent tous qu'aucun échantillon précipité à la spermidine³⁺ n'est orienté.

Analyse des diagrammes de diffraction avec pics de Bragg :

A 14mg.mL⁻¹, seul l'échantillon précipité avec 10mM de Spd³⁺ est organisé à longue distance. (Figure V.21).

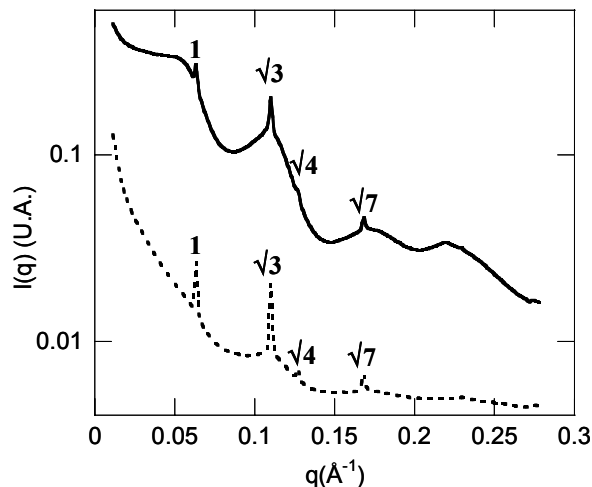


Figure V.21 Spectre de diffraction présentant des pics de Bragg obtenu pour des concentrations en Spd³⁺ de 10mM et de 14mg.mL⁻¹ en NCPs. Les spectres ont été obtenus en différentes positions dans le culot précipité. Le spectre en pointillés correspond à la région supérieure du culot, proche du surnageant. Le spectre en trait continu a été obtenu pour une mesure dans la partie inférieure du culot.

Le diagramme de diffraction représenté en trait continu sur la figure V.21 a été obtenu lors d'une mesure dans la partie inférieure du culot alors que le spectre en trait discontinu

correspond à un enregistrement effectué dans la partie supérieure du culot, proche du surnageant. Les pics de Bragg coexistent avec des pics larges qui caractérisent un empilement moins organisé de NCPs. Les intensités respectives des deux types de pics varient suivant la position dans le culot. Par contre, la position des pics de Bragg reste invariable. Dans un même échantillon, des domaines plus ou moins organisés coexistent. L'échantillon est donc mieux organisé dans une région proche du surnageant.

Les positions relatives des pics de Bragg fins correspondent à q_1 , $q_1\sqrt{3}$, $q_1\sqrt{4}$, $q_1\sqrt{7}$, ce qui traduit l'existence d'une organisation hexagonale à deux dimensions (Figure V.23). Des pics positionnés en $q_1\sqrt{12}$ et $q_1\sqrt{13}$ sont également faiblement discernables. La position de ces pics permet d'accéder au paramètre hexagonal a_H égal à $2/\sqrt{3} * 2\pi/q_1$. Ce paramètre a_H vaut ici 114.3\AA . Les largeurs à mi-hauteur de ces pics fins valent approximativement 0.0015\AA^{-1} et correspondent à la résolution expérimentale. On en déduit que l'ordre à longue distance s'étend au moins sur $3\mu\text{m}$. Des pics supplémentaires, qui caractériseraient l'interdistance entre NCPs successives dans une colonne, ne sont pas observés. Aucune information n'est donc obtenue sur la distance entre NCPs le long d'une colonne. Soit l'ordre est imparfait le long d'une colonne, soit les pics caractéristiques de cet ordre ne sont pas visibles. Dans une colonne de NCPs, l'interdistance entre particules est généralement comprise entre 55 et 60\AA (Mangenot et al., 2003 et 2004). Par conséquent, le pic pointé vers 0.11\AA^{-1} et correspondant à l'ordre en $q_1\sqrt{3}$ de l'organisation hexagonale pourrait masquer le premier ordre en (001) de l'empilement des NCPs en colonnes. De même, le pic en $q_1\sqrt{12}$ masquerait le second ordre en (002). La présence de pics élargis en coexistence avec des pics de Bragg pourrait également empêcher la visualisation de pics fins.

Analyse des diagrammes de diffraction sans pics de Bragg :

La figure V.22 présente les diagrammes de diffractions obtenus pour des concentrations en Spd^{3+} de 7, 20, 30, 40 et 50mM ainsi que les facteurs de forme calculés par CRY SOL de NCPs isolées.

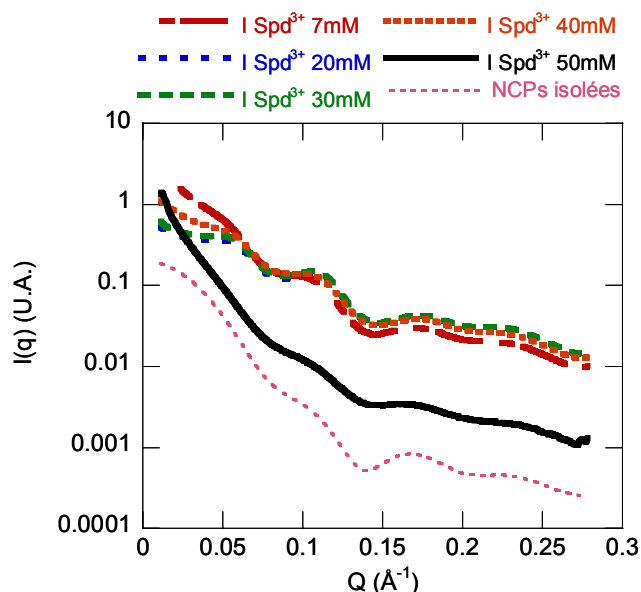


Figure V.22 Spectres de diffraction obtenus pour des concentrations en Spd^{3+} de 7, 20, 30, 40 et 50mM (traits épais continus, discontinus et mixtes). Ces spectres ne présentent pas de pics de Bragg. Ils sont comparés aux facteurs de forme de NCPs isolées (traits fins discontinus).

L'allure générale de la courbe obtenue à 50mM en Spd^{3+} (trait épais continu sur la figure V.22) est similaire à celle d'un facteur de forme calculé de NCPs isolées. La différence majeure est visible aux faibles valeurs d'angles de diffusion où la courbe expérimentale croît fortement avec des valeurs de q décroissantes. 50mM en Spd^{3+} induit donc une agrégation de NCPs isolées.

Pour les autres conditions (7, 20, 30 et 40mM en Spd^{3+}), deux pics larges sont observés vers 0.06\AA^{-1} et 0.11\AA^{-1} . Dans l'espace direct, ces deux pics élargis correspondent respectivement à des distances d'environ 110 et 60\AA , voisines des dimensions d'une NCP. Le premier pic élargi vers 0.06\AA^{-1} peut être attribué à un pic d'interaction latérale entre deux NCPs. Le second pic large vers 0.11\AA^{-1} pourrait correspondre au premier ordre d'un empilement entre NCPs successives mais peut également caractériser le second ordre de l'arrangement latéral. Toutefois, il est vraisemblable que le second pic large indique la formation d'empilements des NCPs en colonnes. En effet, l'amplitude de cette seconde "bosse" est trop élevée pour être uniquement représentative du second ordre de l'arrangement latéral.

La position des pics étant mal définie, une analyse quantitative reste difficile. Afin de donner une interprétation plus quantitative de ces spectres, l'intensité diffractée a été divisée par le facteur de forme d'une NCP isolée. Les facteurs de structure résultants sont présentés sur la figure V.23.

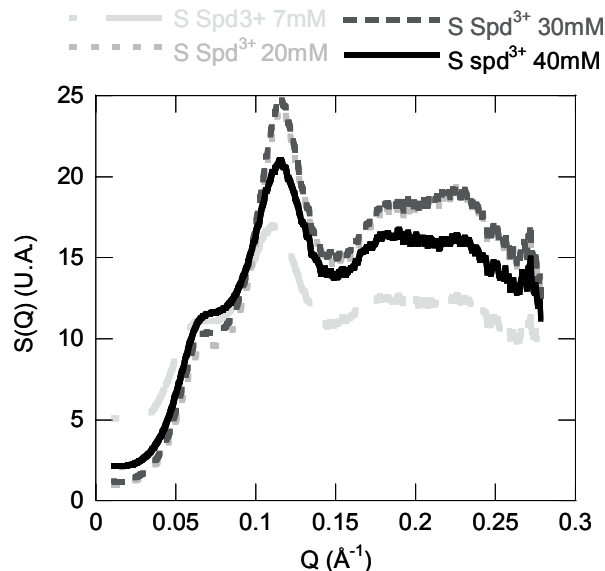


Figure V.23 Facteurs de structure obtenus pour des échantillons concentrés en NCPs à 14mg.mL^{-1} et des concentrations en Spd^{3+} de 7, 20, 30 et 40mM. L'intensité totale est divisée par le facteur de forme de NCPs isolées pour obtenir le facteur de structure.

L'amplitude du second pic vers 0.11\AA^{-1} est très élevée et indique encore qu'il ne s'agit pas du second ordre du pic d'interaction latérale entre NCPs mais résulte plutôt de l'empilement de NCPs en colonnes. Ces facteurs de structure sont ajustés à la somme de deux lorentziennes dans le domaine $0.04\text{-}0.15\text{\AA}^{-1}$. L'utilisation de lorentziennes permet de décrire les profils de diffusion lorsque l'ordre ne s'étend qu'à courte distance. Cette somme de lorentziennes a pour expression :

$$\frac{A_1}{(q-q_1)^2 + \left(\frac{2\pi}{\xi_1}\right)^2} + \frac{A_2}{(q-q_2)^2 + \left(\frac{2\pi}{\xi_2}\right)^2} \quad (V.1)$$

Les valeurs des différents paramètres d'ajustement renseignent sur l'ordre local entre NCPs :

- q_1 permet d'estimer la distance latérale a entre NCPs. Cette dernière est comprise entre $a_L = 1.23 \cdot (2\pi/q_1)$, si on considère que l'ordre latéral est de type liquide, et $a_H = (2\pi/q_1) \cdot 2/\sqrt{3}$, si l'ordre local est de type hexagonal. Lorsque les colonnes de NCPs sont suffisamment longues, l'ordre est vraisemblablement hexagonal.
- En supposant que le second pic résulte majoritairement de l'empilement des NCPs, q_2 permet de donner un ordre de grandeur la distance $d = 2\pi/q_2$ entre deux NCPs consécutives le long d'un empilement.
- ξ_1 caractérise la longueur de corrélation de l'ordre latéral entre NCPs. L'interprétation de ξ_2 est plus complexe et les résultats concernant ξ_2 ne seront pas présentés. Toutefois, les valeurs obtenues pour ξ_1 et ξ_2 sont peu différentes.
- L'ordre longitudinal, le long des colonnes, est caractérisé par le rapport des intensités intégrées I_2/I_1 des deux lorentziennes : $I_2/I_1 = A_2 \xi_1 / A_1 \xi_2$. Ce rapport renseigne sur l'augmentation ou la diminution de la longueur des colonnes au sein d'un domaine organisé.

Les concentrations en particules dans les régions organisées peuvent être estimées à partir des paramètres précédents. En effet, on a :

$$\frac{M}{N_a a_L^2 d^2 \left(\frac{\sqrt{3}}{2}\right)} \leq C_{\text{NCPs}} \leq \frac{M}{N_a a_H^2 d^2 \left(\frac{\sqrt{3}}{2}\right)} \quad (V.2)$$

Pour l'estimation de la concentration dans la phase hexagonale organisée à longue distance, nous supposons que la distance interNCPs le long des colonnes, qui n'a pas pu être déterminée à partir des spectres, est celle de la phase peu organisée.

La figure V.24 présente l'évolution en fonction des concentrations en Spd^{3+} de l'ordre dans les directions longitudinales (caractérisé par I_2/I_1) et transversales (représenté par ξ_1) par rapport aux colonnes de NCPs.

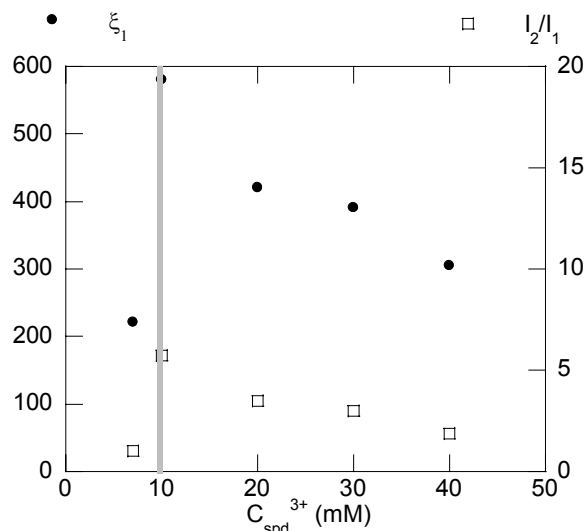


Figure V.24. Evolution de l'ordre longitudinal (représenté par I_2/I_1) et transversal (représenté par ξ_1) par rapport aux colonnes de NCPs.

Ces deux grandeurs croissent avec les concentrations en Spd^{3+} pour atteindre un maximum à 10mM puis diminuent avec des concentrations plus élevées en Spd^{3+} . Quand la concentration en Spd^{3+} augmente, des colonnes de NCPs sont progressivement formées simultanément avec un arrangement hexagonal transversal de ces dernières. A 10mM en Spd^{3+} , où l'ordre transversal et longitudinal sont optimaux, des pics de Bragg décrit ci-dessus sont observés et indiquent une organisation hexagonale à deux dimensions. Pour des concentrations en cations trivalents supérieures à 10mM, cette double organisation est progressivement supprimée, ce qui se traduit par une décroissance simultanée de I_2/I_1 et ξ_1 .

Les distances intercolonnes latérales (a_H , a_L) et longitudinales (d) (Figure V.25.a) ainsi que les concentration en NCPs des échantillons varient peu (Figure V.25.b). Les distances latérales entre NCPs sont indiquées sous la forme d'un intervalle délimité par les valeurs de a_H et a_L . De même, les concentrations sont représentées par une barre verticale correspondant à la fourchette déterminée par l'expression (V.2). A très faible concentration en Spd^{3+} , la concentration en NCPs est légèrement inférieure et les interdistances entre NCPs sont légèrement supérieures à celle des autres conditions en cations Spd^{3+} . A partir de 10mM en Spd^{3+} ces grandeurs restent quasiment constantes. a_H et a_L sont estimées respectivement à 113 et 120Å, d est de l'ordre de 55Å et la concentration en NCPs est de l'ordre de $530 \pm 35 \text{mg.mL}^{-1}$.

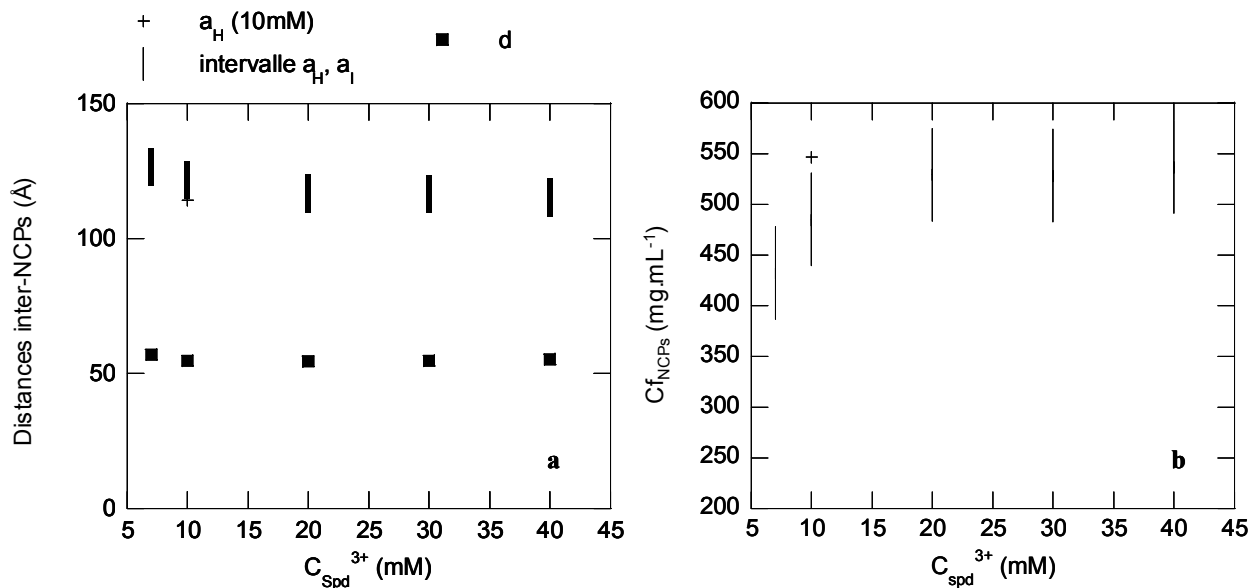


Figure V.25 Evolution des distances inter-NCPs (a) et de la concentration en NCPs dans le précipité (b) avec les concentrations en Spd^{3+} . Les distances latérales entre NCPs sont indiquées sous la forme d'un intervalle délimité par les valeurs de a_H et a_L . Les concentrations sont représentées par une barre verticale correspondant à la fourchette déterminée par l'expression V.2. Lorsque les échantillons sont organisés à longue distance, les valeurs de concentrations et de distances inter-NCPs sont précisément définies (+).

Bilan des résultats pour l'ensemble des conditions

Pour chacune des autres concentrations en NCPs (inférieures à 60mg.mL^{-1}), on observe la même évolution des spectres en fonction de la concentration en Spd^{3+} . Pour chaque série des empilements de NCPs se forment quand on augmente la concentration en Spd^{3+} , puis une

organisation hexagonale à deux dimensions est obtenue pour une concentration particulière en Spd^{3+} . Pour des concentrations en Spd^{3+} encore supérieures, l'ordre des NCPs dans les colonnes et entre colonnes est progressivement altéré. Les paramètres caractérisant l'ordre longitudinal et transversal sont maximaux lorsque les échantillons sont organisés à longue distance puis diminuent progressivement avec l'augmentation des concentrations en Spd^{3+} .

Pour des concentrations supérieures ou égales à 60mg.mL^{-1} , des phases denses de NCPs organisées à longue distance ne sont pas observées. Pour de telles concentrations en NCPs, les spectres obtenus correspondent à des facteurs de forme d'empilements de colonnes de NCPs. Dans la région de plus fortes concentrations en NCPs et Spd^{3+} , le type d'organisation ne varie pas en fonction des concentrations en Spd^{3+} . On observe seulement que plus la concentration globale en NCPs est élevée, moins l'ordre est à longue distance (légère diminution de I_2/I_1 et ξ_1 en fonction de C_{mNCPs} , pour une concentration en Spd^{3+} donnée).

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau V.1. Pour avoir une vue d'ensemble simplifiée des résultats, nous avons donné $a_{\text{moyen}} = \frac{a_H + a_L}{2}$ et $C_{\text{fNCPs}} = \frac{M}{N a_{\text{moyen}}^2 d^2 (\frac{\sqrt{3}}{2})}$.

C_{mNCPs} globale (mg.mL^{-1})	$C_{\text{Spd}^{3+}}$ (mM)	organisation	ξ_1 (Å)	$A_2\xi_1/A_1\xi_2$	a_{moyen} (Å)		le culot (mg.mL^{-1})
6	3	Agrégats					
	5	Hexagonal			114.0		550
	5	Hexagonal+colonnes	909.5	11.73	120.3	55.8	486
	20	Colonnes	465.0	4.02	115.9	54.5	537
	30	colonnes	365.4	2.68	114.0	54.9	550
14	7	colonnes	221.3	1.03	126.4	56.9	432
	10	Hexagonal			114.3		547
	10	Hexagonal+colonnes	580.6	5.73	121.7	54.7	485
	20	colonnes	420.7	3.49	116.6	54.6	529
	30	colonnes	391.2	2.99	116.5	54.8	528
	40	colonnes	305.4	1.88	115.1	55.2	536
	50	agrégats					
25	15	Hexagonal			113.4		556
	15	Hexagonal+colonnes	394.3	2.98	118.8	55.1	506
	20	colonnes	465.6	3.90	118.4	54.5	514
	30	colonnes	389.5	2.93	118.4	54.9	511
	40	colonnes	280.5	1.55	114.6	55.4	541
	50	agrégats					
40	15	Hexagonal			115.5		535
	15	colonnes	633.4	6.82	122.6	55.5	471
	20	colonnes	444.0	3.26	121.5	55.1	483

	30	colonnes	353.0	2.49	119.7	55.1	498
	40	colonnes	278.7	1.61	118.0	55.6	508
60	20	colonnes	323.0	1.90	120.6	56.2	480
	30	colonnes	357.8	2.40	120.4	55.5	488
	50	colonnes	241.5	1.14	118.6	56.2	497
104	25	colonnes	386.0	2.53	118.6	55.7	502
	35	colonnes	324.8	2.02	118.0	55.6	508
	45	colonnes	283.4	1.59	118.0	55.9	506
	55	colonnes	286.2	1.63	117.9	55.8	507
150	35	colonnes	296.7	1.72	119.5	119.5	491
	45	colonnes	270.5	1.51	118.6	118.6	501
	55	colonnes	261.4	1.41	118.8	118.8	498
200	40	colonnes	256.9	1.29	117.9	55.9	506
	50	colonnes	249.2	1.26	118.9	55.7	499
240	40	colonnes	266.8	1.45	116.7	55.6	519

Tableau V.1 Regroupement des résultats principaux obtenus par diffraction des rayons X pour des NCPs précipitées à la spermidine.

On constate que la concentration est de l'ordre de 500-550mg.mL⁻¹ et la distance latérale entre NCPs de l'ordre de 115-122Å.

Effet de la température

L'aspect macroscopique des solutions de NCPs précipitées à la Spd³⁺ est également sensible à la température. Consécutivement à un chauffage à 37°C, ces solutions de NCPs passent de translucides à turbides.

Les expériences de rayons X montrent qu'à l'échelle microscopique, la température ne modifie pas l'organisation globale des NCPs précipitées à la Spd³⁺. En effet, le chauffage à 37°C ou refroidissement à 5°C des échantillons ne modifie pas l'allure globale des diagrammes de diffraction. Par contre, les paramètres hexagonaux diminuent légèrement sous l'effet d'une élévation de température et augmentent par refroidissement.

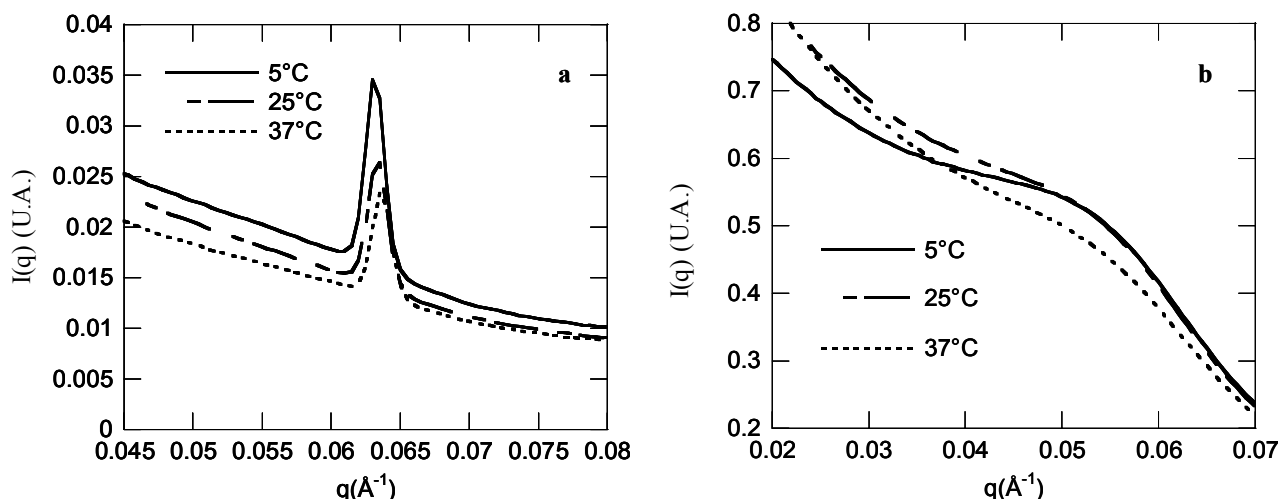


Figure V.26.a Evolution du pic d'ordre 1 de l'organisation hexagonale en fonction de la température pour des NCPs à 14mg.mL^{-1} précipitées par 10mM de spermidine $^{3+}$.

b A 5°C , le premier pic d'un précipité peu organisé (NCPs 60mg.mL^{-1} , spermidine $^{3+}$ 20mM) est plus marqué.

La figure V.26.a présente un agrandissement des spectres au niveau du pic hexagonal d'ordre 1 pour des conditions telles que les concentrations en NCPs et Spd^{3+} s'élèvent respectivement à 14mg.mL^{-1} et 10mM et pour des températures de 5, 25 et 37°C . La position des pics hexagonaux est décalée vers des angles de diffusion croissant lorsque la température augmente. Dans les conditions de la figure V.26.a (NCPs 14mg.mL^{-1} , spermidine $^{3+}$ 10mM), le paramètre hexagonal a_H vaut 114.7\AA à 25°C , 114.2\AA à 37°C et 115.1\AA à 5°C .

Pour les échantillons non organisés à longue distance, un renforcement du premier pic, caractérisant l'ordre latéral entre empilements, est observé à basse température. Sur la figure V.26.b, pour des concentrations globales en NCPs de 60mg.mL^{-1} et de 20mM en Spd^{3+} , un agrandissement du premier épaulement montre que ce dernier est plus marqué à basse température. L'organisation est donc meilleure quand la température diminue.

b. Description par microscopie optique des phases denses de NCPs précipitées par la spermidine

Une série d'échantillons a été préparée pour une concentration globale de NCPs fixée à 14mg.mL^{-1} et des concentrations en Spd^{3+} de 3, 5, 8, 10, 12,5, 15, 20, 30 et 40mM dans des conditions identiques à celles utilisées pour les analyses de diffraction X. Immédiatement après le mélange, les solutions ont été introduites dans des capillaires plats de dimensions $100 \times 0.1 \times 1\text{mm}^3$ fermés hermétiquement à la paraffine. Les observations ont été faites au microscope optique soit en contraste interférentiel de Nomarski soit entre polariseur et analyseur croisés. Les observations ont été répétées à plusieurs reprises après la préparation des capillaires. L'organisation des nucléosomes dans le précipité semble s'établir en quelques jours.

L'aspect macroscopique des précipités, pour des concentrations globales en NCPs de 14mg.mL^{-1} , dépend de la concentration en spermidine. On observe de petits germes hexagonaux, le plus souvent isolés les uns des autres, ou plus rarement regroupés par petits paquets pour $C_{\text{Spd}^{3+}}=3\text{mM}$ (figure V.27.a,b). Certains germes isolés sont encore visibles pour $C_{\text{Spd}^{3+}}=5\text{mM}$

mais la plupart sont regroupés au sein d'agrégats présentant une certaine viscosité et une biréfringence diffuse. A plus forte concentration en Spd^{3+} ($C_{\text{Spd}^{3+}} \geq 8\text{mM}$), les agrégats sont trop épais pour permettre une analyse détaillée des textures. La taille des agrégats augmente ainsi que leur biréfringence globale pour atteindre un maximum pour $C_{\text{Spd}^{3+}} = 12,5 \text{ mM}$ (Figure V.27.f). Ces agrégats sont composés de petits domaines très biréfringents maintenus ensemble par une phase fluide isotrope qui donne une cohésion et une fluidité à l'ensemble (Figure V.27.c,d,e). On peut reconnaître très nettement ces deux phases quand de petits fragments de l'agrégat se sont étalés sur la surface de verre (Figure V.27.e,g). Cette phase dense isotrope semble présente également, mais très minoritaire, pour les concentrations les plus faibles en spermidine (Figure exemple la zone de contact entre les germes hexagonaux et la surface de verre sur la Figure V.27.a,b). Pour les concentrations supérieures en spermidine (15 à 40 mM), la phase précipitée est majoritairement isotrope, visible sous forme de gouttelettes à la surface du capillaire (Fig.V.27.h).

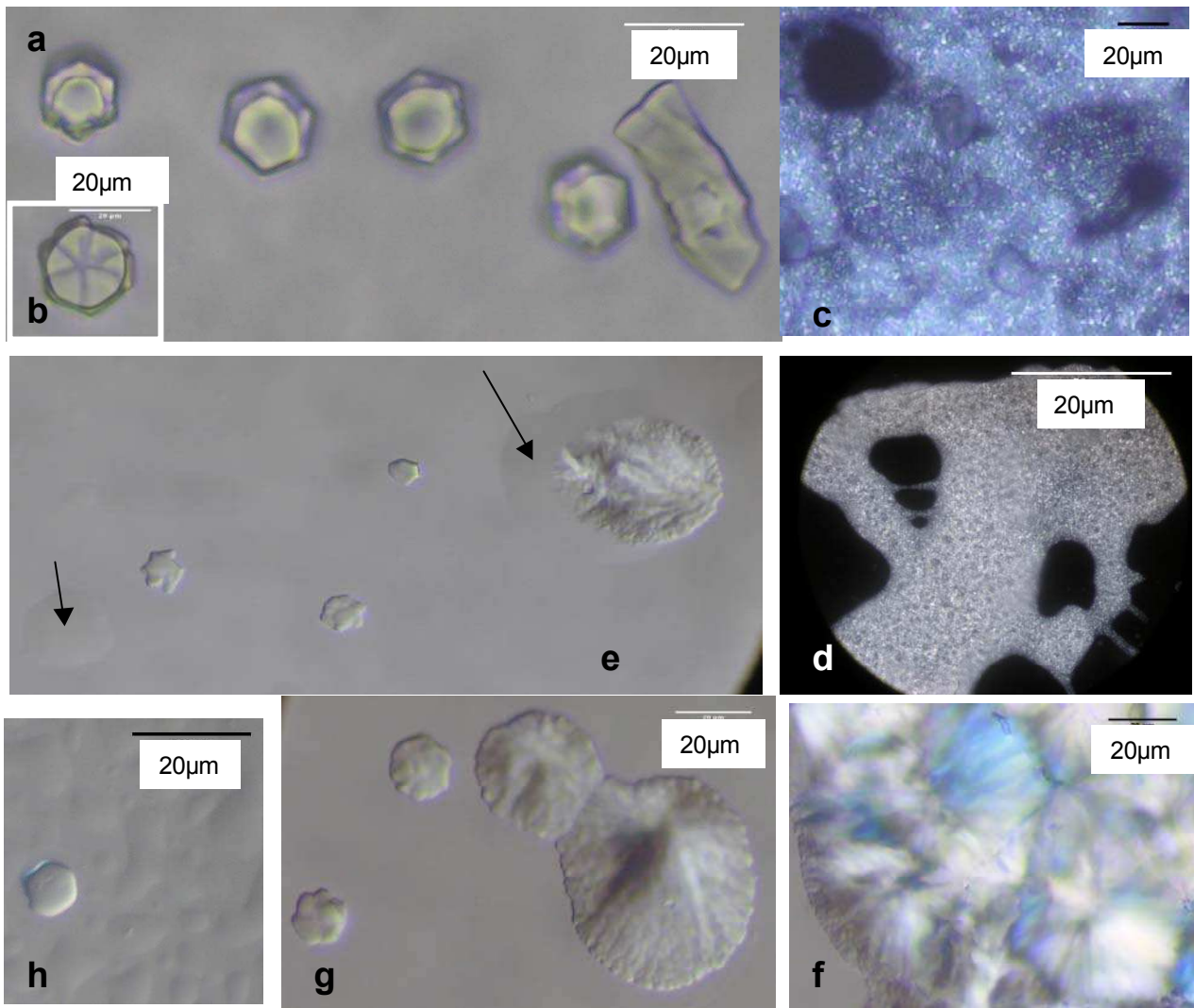


Figure V.27 Textures de NCPs agrégées par la Spd^{3+} pour une concentration globale en NCPs constante et égale à $C_{\text{NCPs}} = 14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Les concentrations en spermidine valent 3 (a,b), 5 (non visualisé, ici), 8 (c), 10 (d), 12.5 (e, f, g), 15, 20 (h), 30 (non visualisé, ici) et 40mM (non visualisé, ici). On observe des germes hexagonaux (a, b, e, g), des agrégats biréfringents (c, d, f) et une phase fluide isotrope (flèches en e, h, a et b).

Nous avons également préparé d'autres échantillons correspondant à des concentrations variées de NCP (6 à 40 mg.mL⁻¹) et notamment une série très complète à $C_{\text{NCPs}} = 25\text{mg.ml}^{-1}$. Les cristaux hexagonaux bien individualisés sont toujours observés pour des concentrations en Spd^{3+} inférieures à la concentration qui définit le maximum de précipitation. Leurs tailles est de l'ordre de 10 μm . Ces cristaux facettés présentent des symétries hexagonales (Figure V.28.a). Nous avons cherché à les analyser plus en détail. Certains sont à l'évidence des monodomains (Figure V.28.a). Ils sont éteints entre polariseur et analyseur croisés. On peut en déduire que les colonnes de nucléosomes sont parallèles à l'axe optique du microscope. En grandissant, ces germes adoptent une structure hélicoïdale visible selon l'axe 6 du cristal (figure V.28.a,i,j) et également en vue latérale (figure V.28.g,h,k). Ces germes hélicoïdaux sont à hélicité droite ou gauche. Il y a donc une torsion qui se manifeste entre colonnes de NCPs au sein du cristal hexagonal. Cette structure en double twist a déjà été décrite dans les phases hexagonales de NCP qui grandissent au sein de la phase isotrope en présence d'ions monovalents (Livolant et Leforestier, 2000). D'autres germes hexagonaux, et ils sont les plus nombreux, semblent croître autour d'une dislocation vis (droite ou gauche) (figure V.28.i,j). Au moins dans certains cas, il semble que ce type de croissance provienne de l'empilement de petits plaquettes hexagonales (Figure V.28.e,e',f,f'). Chacune des plaquettes est facettée, et isotrope quand elle est vue de dessus (axe 6 parallèle à l'axe du microscope). L'empilement se fait de telle sorte que les plans réticulaires présentent une rotation d'un angle de 60° (voir figure V.28.e,e' où l'empilement est gauche). La croissance se fait alors autour d'une dislocation vis centrale, généralement creuse, qui peut être droite ou gauche (Figure V.28.i,j). L'inclinaison des colonnes par rapport à l'axe 6 peut devenir suffisamment importante pour que les germes présentent une certaine biréfringence localement (figure V.28.f') ou plus globalement dans l'ensemble du germe (Figure V.28.i). La croissance de ces germes semble se faire à partir d'une gouttelette d'une phase moins organisée liquide (Figure V.29.a,b) ou plus dense (Figure V.28.e,f). On peut différencier l'une ou l'autre de ces deux situations par l'observation de la ligne de contact de cette phase isotrope avec la surface de verre. Dans certains cas, on peut observer une transition ordre-désordre (ou plus d'ordre-moins d'ordre) au sein du même germe (Figure V.28.e) dans la partie centrale qui joint les plaquettes superposées ou dans le cas d'une germe monodomaine en cours de formation (figure V.280.b). On note également l'existence de cristaux maclés dans certains cas (Figure V.28.c,d). L'ensemble de ces observations suggère une organisation cristalline tridimensionnelle des NCP dans ces cristaux et l'existence manifeste d'effets chiraux.

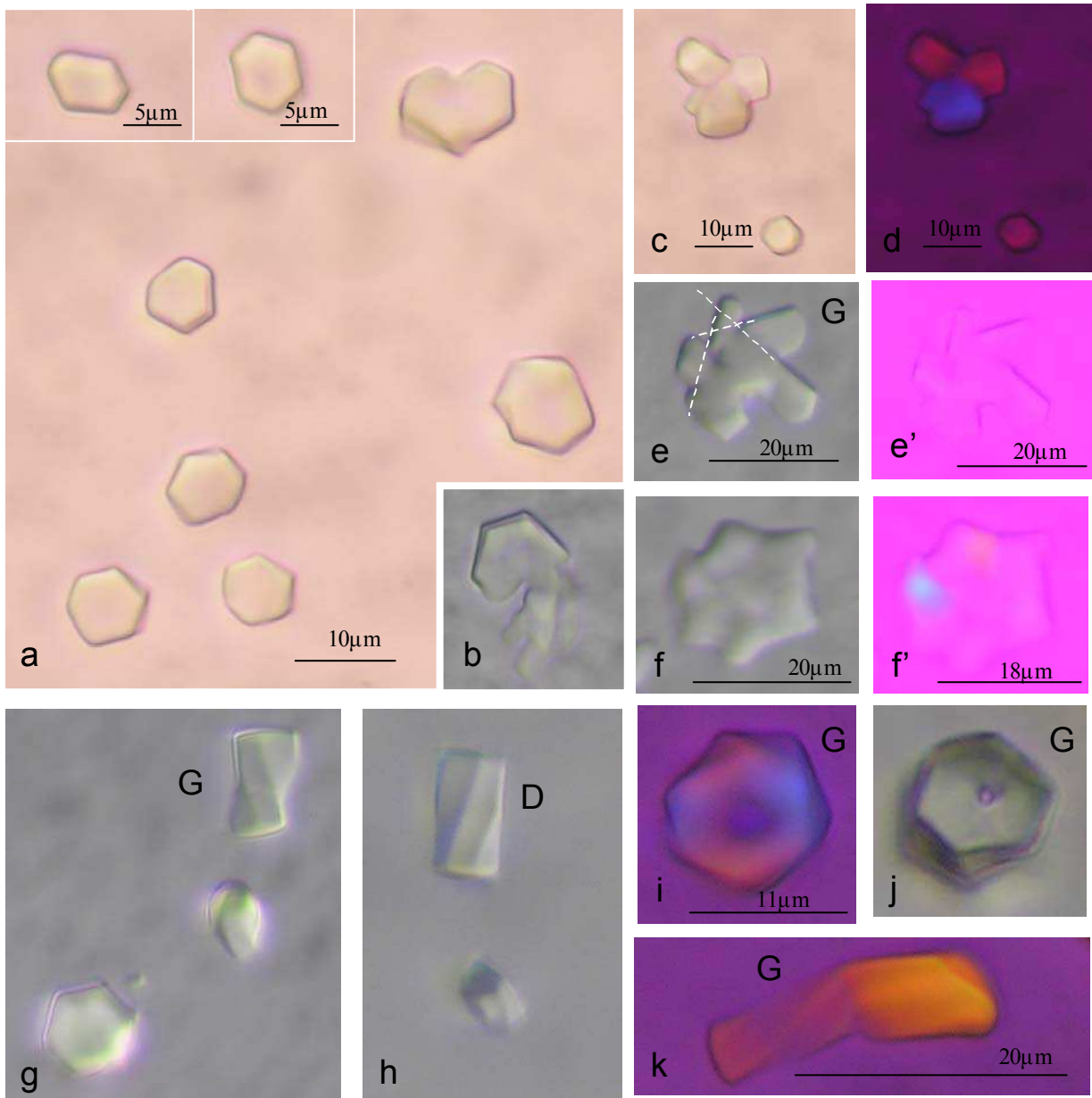


Figure V.28 Description des germes hexagonaux de NCPs précipitées à la spermidine : effets de chiralité. Les germes hexagonaux observés adoptent une structure hélicoïdale droite (notée D en h) ou gauche (notée G en e, g, i, j et k).

c. Conclusions et discussion

Comparaison diffraction des rayons X et microscopie optique

Globalement, l'évolution de l'ordre dans les échantillons reste similaire suivant les deux méthodes employées. En microscopie optique, des microcristaux sont tout d'abord formés puis leur densité augmente avec les concentrations en Spd^{3+} pour s'agréger en des masses fortement biréfringentes. Au-delà d'une concentration seuil en Spd^{3+} , une telle organisation n'est plus observée et on ne distingue plus qu'une séparation de phase entre deux fluides. De même, par diffraction des rayons X, on montre qu'avec des concentrations croissantes en Spd^{3+} , les NCPs s'organisent progressivement en colonnes qui s'agencent simultanément suivant un ordre

hexagonal. Au-delà d'une concentration seuil en Spd^{3+} où cette organisation est optimale l'ordre colonnaire et hexagonal sont progressivement détruits.

Pour une concentration en Spd^{3+} de 7mM et en NCPs de 14mg.mL^{-1} , les "bosses" larges des spectres de diffraction obtenues pour les plus faibles concentrations en Spd^{3+} ne rendent pas compte d'une organisation cristalline des NCPs. Cependant, les conditions explorées par microscopie optique, dans les mêmes gammes de concentrations en ions multivalents ($C_{\text{Spd}^{3+}} = 5$ et 8mM), laissent supposer la présence de petits cristaux à une telle concentration en Spd^{3+} . Rappelons que la mesure par diffraction des rayons X constitue une moyenne sur un domaine relativement étendu de l'échantillon ($200 \times 200 \mu\text{m}$). Il s'ensuit que si les NCPs s'organisent majoritairement sous forme de colonnes peu organisées et que localement, des microcristaux de NCPs plus organisées sont nucléés, les pics de Bragg résultant de ces microcristaux peuvent ne pas être décelés. En outre, il est possible que ces microcristaux, étant en nombre insuffisant, aucun d'eux n'ait ses plans cristallins en position de Bragg. Par ailleurs, le mode de préparation des échantillons est légèrement différent. En effet, pour l'observation en microscopie optique, la phase précipitée et le surnageant sont introduits dans des capillaires plats sans centrifugation. Par contre, l'analyse par diffraction des rayons X est effectuée consécutivement à une centrifugation des capillaires qui fait sédimenter le précipité. On pourrait supposer que la centrifugation, même effectuée à faible vitesse, altère l'organisation des NCPs en microcristaux.

Localisation des phases organisées ou isotropes dans le diagramme de phase

Nous retrouvons une organisation hexagonale, colonnaire isotrope et isotrope des NCPs, précipitée à la spermidine, déjà observée par Leforestier et al. (1999). En plus de cela, nous avons mené une étude systématique en relation avec le diagramme de phase afin de localiser ces différentes phases plus ou moins organisées dans ce diagramme.

Suivant les concentrations en Spd^{3+} et en NCPs, différentes phases plus ou moins organisées de NCPs précipitées à la Spd^{3+} sont observées. Le passage d'un type d'organisation à un autre est progressif et il est probable que ces phases puissent coexister.

Pour des concentrations en particules strictement inférieures à 60mg.mL^{-1} , l'organisation des NCPs évolue graduellement en fonction des concentrations en cations multivalents. Les informations obtenues par diffraction des rayons X et microscopie optique permettent de décrire la structure des phases précipitées de NCPs suivant chacune des lignes verticales du diagramme de précipitation correspondant à différentes concentrations en NCPs.

La figure V.29 indique schématiquement le type d'organisation observée le long de courbes de précipitation à 14mg.mL^{-1} .

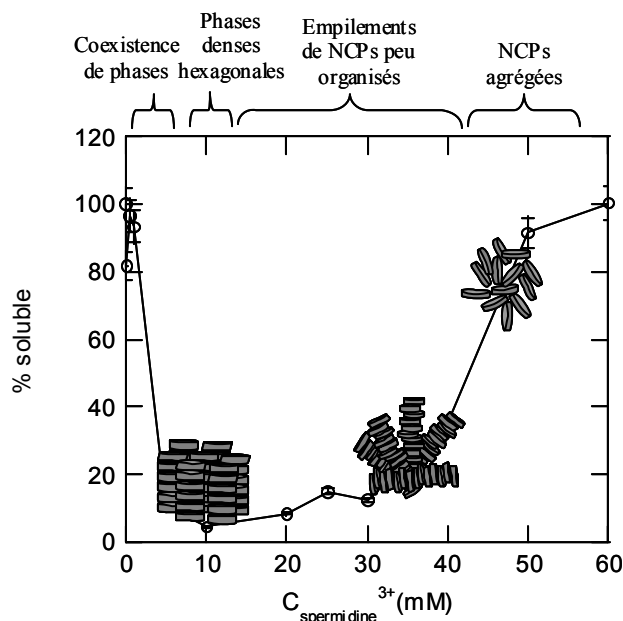


Figure V.29 Organisations de NCPs précipitées à la spermidine³⁺ le long d'une courbe de précipitation à 14mg.mL⁻¹.

Aux plus faibles concentrations en Spd³⁺ qui induisent la précipitation des NCPs, on observe une phase isotrope de NCPs agrégées, certainement en coexistence avec des cristallites de petites dimensions et présentes en faible densité. Pour des concentrations en Spd³⁺ supérieures, des empilements de NCPs en colonnes plus ou moins organisés se forment jusqu'à l'obtention de phases denses hexagonales organisées à longue distance aux conditions en Spd³⁺ où la précipitation est maximale. A des concentrations en Spd³⁺ où les échantillons sont partiellement redissous, les précipités se désorganisent pour former des empilements de NCPs jusqu'à des phases isotropes de particules agrégées. Les phases denses hexagonales organisées sont uniquement observées dans un intervalle de concentrations en cations multivalents. L'organisation des NCPs à longue distance n'est plus observée pour des concentrations en Spd³⁺ supérieures à un seuil limite. Présente en trop grande quantité, la Spd³⁺ augmente, par écrantage, les répulsions électrostatiques entre particules qui ne forment ainsi plus d'agrégats organisés à longue distance. L'inversion de charge des NCPs observée en présence de spermidine au cours de la redissolution (de Frutos et al., 2001) pourrait également, en induisant une réorganisation des ions désorganiser les agrégats. En excès, les molécules de Spd³⁺ pourraient, de plus, induire du désordre par leur présence au sein de la phase précipitée. En effet, le taille de ces molécules (Figure V.1) n'est pas négligeable et pourrait entraîner une gêne stérique au sein du précipité.

Pour des concentrations en NCPs supérieures à 60mg.mL⁻¹, la structure des précipités reste semblables quelles que soient les concentrations en Spd³⁺. Les NCPs ne s'organisent pas à longue distance mais s'empilent pour former des colonnes peu organisées. A cause des concentrations élevées en NCPs, les concentrations locales en ions monovalents apportés par les contre-ions des NCPs augmentent. Ces ions monovalents supplémentaires pourraient, par un effet de compétition avec la Spd³⁺ empêcher la structuration des agrégats et accroître les répulsions électrostatiques entre particules. De plus, l'excès d'ions multivalents en solution augmente les

répulsions électrostatiques entre particules et la gêne stérique au sein du précipité, ce qui contrarierait l'organisation des agrégats. On peut également émettre l'hypothèse que, pour de telles concentrations, les NCPs s'équilibrent très lentement. Afin de tester cette hypothèse ces mêmes échantillons devrait être analysés de nouveau dans quelques mois voire quelques années, pour voir si une phase hexagonale à deux dimensions serait obtenue, à terme. On peut supposer que les échantillons ne soient pas dans un état d'équilibre mais dans un état métastable susceptible d'évoluer avec le temps.

Un diagramme de phase récapitulatif fait l'objet de la figure V.30. Les frontières de ce diagramme sont représentées en traits discontinus. En effet, les différents seuils entre domaines de ce diagramme de phase s'interpénètrent et le passage d'un domaine à un autre est très progressif. Pour chacune des régions de ce diagramme, plusieurs types d'organisation coexistent. Les structures observées majoritairement sont indiquées sur la figure V.30. De plus, dans l'hypothèse où les échantillons se trouvaient dans un état métastable au moment des expériences dont résulte le diagramme, il est représentatif d'une situation à un instant donné. Son allure générale serait susceptible d'évoluer avec le temps.

Pour des molécules d'ADN libres, le diagrammes de phase de précipitation en présence de polyamine (Sp^{4+} et Spd^{3+}) a été établi par Raspaud et al. (2005). Dans la région biphasique, l'ADN s'organise suivant un cristal liquide hexagonal et/ou cholestérique. Ce diagramme présente des caractéristiques communes avec le diagramme de précipitation de la figure V.30. Pour les plus fortes concentrations en ADN, les molécules d'ADN forment des agrégats non structurés, comme dans le cas de NCPs précipitées à la Spd^{3+} . Les auteurs déterminent des distances inter-hélices dans les phases hexagonales. Ils constatent que pour des concentrations constantes en ADN et des concentrations variables en polyamines ces distances diminuent ou stagnent, dans un premier temps, jusqu'à une concentration seuil en polyamine. Puis les distances inter-hélices augmentent jusqu'à la redissolution des agrégats. Ils constatent donc aussi que les agrégats d'ADN s'ordonnent et sont de plus en plus compacts avec des concentrations croissantes en polyamines puis se désorganisent au-delà d'une concentration seuil en ions multivalents.

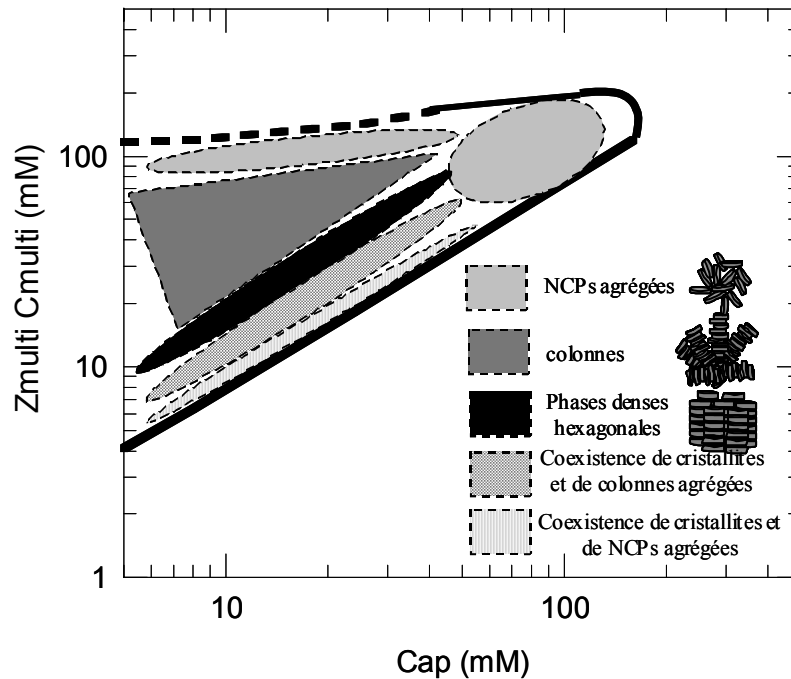


Figure V.30 Diagramme de phase de NCPs précipitées par de la Spd³⁺.

Effet comparé de la spermidine et du magnésium sur l'organisation des agrégats de NCPs

L'organisation des NCPs avec la Spd³⁺ est plus rapide et plus aisée qu'en présence de magnésium. En effet, dans le cas des NCPs précipitées au Mg²⁺, une organisation à longue distance nécessite un an d'équilibration et reste très marginale. Notamment, nous avons vu qu'en diffraction, les pics de Bragg obtenus étaient très peu intenses et montraient que les phases organisées à longue distance coexistaient avec des domaines beaucoup moins structurés. Les facteurs de structure pour les trois conditions pour lesquelles on a débuté l'empilement en présence de Mg²⁺ (NCPs 100mg.mL⁻¹ Mg 50mM, NCP 100mg.mL⁻¹ Mg 30mM, NCP 100mg.mL⁻¹ Mg 20mM) sont comparés avec un facteur de structure obtenu à partir d'un spectre de diffraction caractéristique d'un empilement de NCPs précipitées par de la Spd³⁺ (Figure V.31).

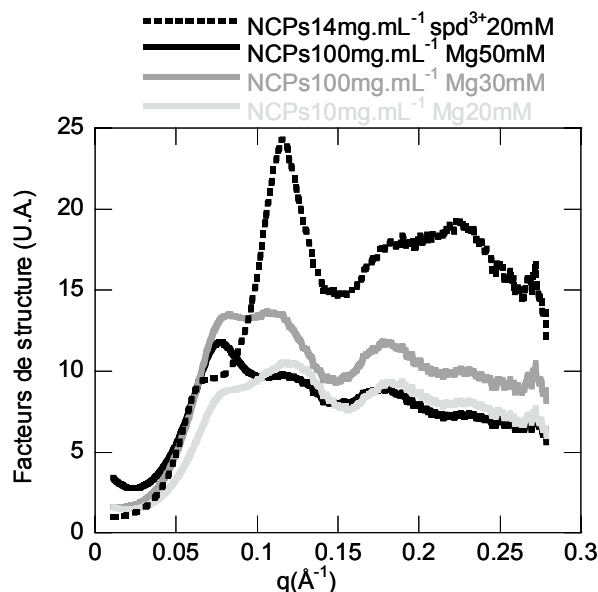


Figure V.31 Comparaison de facteurs de structure pour des empilements de NCPs précipitées à la spermidine (trait discontinu) ou au magnésium (traits continus).

On constate, tout d'abord, que le pic caractéristique de l'empilement des NCPs est beaucoup moins prononcé pour des NCPs précipitées par du magnésium. De plus, le premier pic d'interaction latérale entre particules conduit à des distances à plus faibles ($< 100 \text{ \AA}$) lorsque les NCPs sont agrégées par du Mg^{2+} .

Néanmoins, dans les deux cas, les échantillons bien organisés ou partiellement structurés sont obtenus pour des conditions proches du seuil de précipitation, dans la même région du domaine biphasique.

B. Formation d'agrégats de NCPs en présence d'ATP

La structure de la chromatine est dynamique et modulable. Notamment, des complexes enzymatiques dit de remodelage permettent le glissement des nucléosomes sur l'ADN. L'énergie nécessaire à l'activation de ces complexes est apportée par l'hydrolyse d'ATP par des ATPases. L'ATP étant un polyanion, il semble plausible de considérer que sa présence modifie également les interactions internucléosomales au sein de la chromatine. Nous avons tenté de mettre en évidence son rôle dans les interactions à l'échelle de la particule cœur de nucléosome isolée par des méthodes de diffusion statique de la lumière. Le mode d'évaluation des interactions par diffusion de lumière présenté dans l'annexe V.4. Nous montrerons que l'ATP induit la formation d'agrégats de NCPs.

1. Résultats

a. Evaluation des interactions entre NCPs pour des concentrations salines variables

Evaluation du A2 par diffusion de lumière

Les NCPs du lot B (Chapitre III) sont dialysées contre un tampon Tris-HCl 10mM présentant des concentrations variables en NaCl et en NaATP (adénosine 5'-triphosphate de sodium, Amersham bioscience). Après dialyse, l'EDTA mis en œuvre au cours de la purification des NCPs est éliminé. En effet, nous craignons que ce polyanion endigue ou contrarie un éventuel effet de l'ATP sur les interactions entre nucléosomes. Pour chaque condition, une série d'échantillons de plusieurs concentrations en NCPs est préparée par dilutions successives d'une solution concentrée par ultrafiltration (Vivaspin, Vivascience). Les concentrations en NCPs sont mesurées par absorbance UV à 260nm ($\epsilon_{260}=9.52\text{cm}^2.\text{mg}^{-1}$). La cuve est soigneusement nettoyée par sonication après chaque utilisation et les échantillons sont filtrés préalablement à la mesure.

Les interactions entre NCPs ont été évaluées pour quatre concentrations en sels monovalents (10, 50, 160 et 310mM) par mesure du second coefficient du viriel. Pour chaque condition saline, la courbe $KcI_{\text{toluène}}/(R_{\text{toluène}}(I-I_{\text{tampon}}))$ (Figure V.32.b) est tracée en fonction des concentrations en particules pour évaluer A_2 (Annexe V.4).

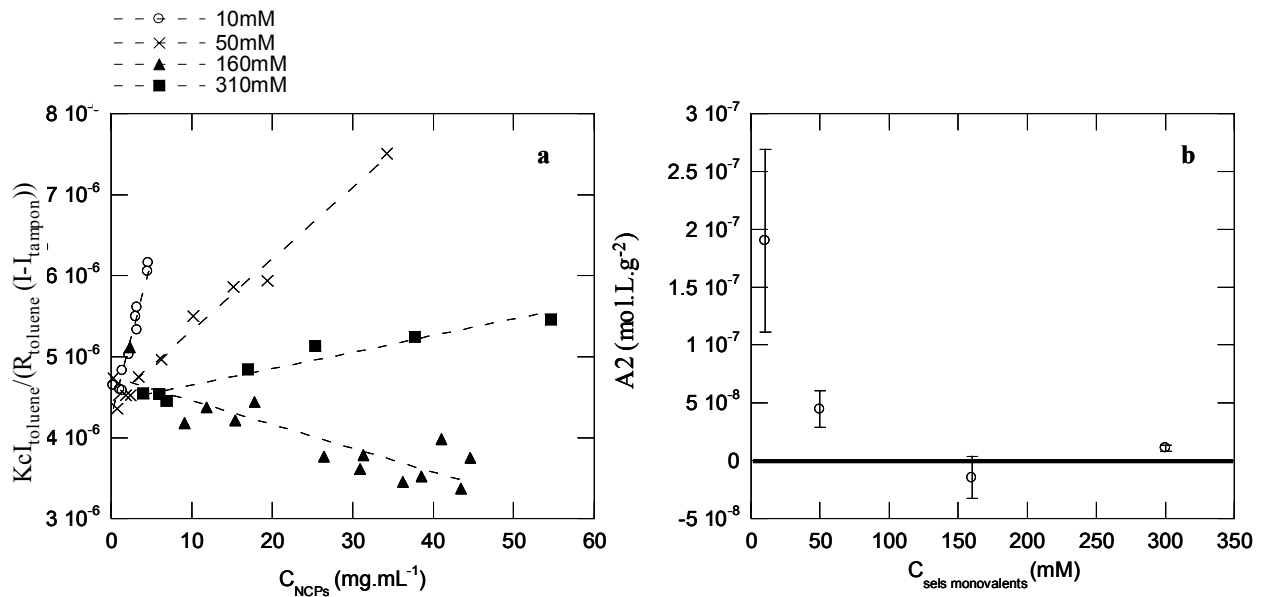


Figure V.32.a Evaluation des interactions entre NCPs par diffusion de lumière à différentes concentrations en sels monovalents (10, 50, 160 et 310mM). La courbe $KcI_{\text{toluène}}/(R_{\text{toluène}}(I-I_{\text{tampon}}))$ est tracée en fonction de c pour déterminer A_2 et M (cf. Equation V.4).

V.32.b Seconds coefficients du viriel mesurés par diffusion de lumière pour des solutions de NCPs en fonction des concentrations en sels monovalents.

Les courbes obtenues sont ajustées à la droite d'équation :

$$\frac{1}{M} + 2A_2C$$

Les valeurs de A_2 et M sont ainsi déterminées. La masse molaire des NCPs utilisées pour ces expériences est évaluée d'après l'ordonnée à l'origine des droites obtenues et s'élève à $223500 \pm 12500 \text{g.mol}^{-1}$. Cette valeur est en accord avec les masses moléculaires de NCPs natives évaluées à 210000g.mol^{-1} . On peut ainsi en déduire l'absence d'agrégation entre particules au cours de ces expériences. La pente de ces droites permet de déterminer le second coefficient du viriel. On rappelle que pour une pente croissante, A_2 est positif et les interactions sont répulsives

tandis que lorsque la pente des droites et par conséquent A_2 sont négatifs, les interactions sont attractives. Les valeurs de A_2 obtenues sont reportées sur la figure V.32.b, ci-dessus. Entre 10 et 160mM en sels monovalents, les interactions passent de répulsives à légèrement attractives ($A_2 < 0$). Pour des forces ioniques plus élevées ($C_{\text{sels}}=300\text{mM}$), les interactions sont globalement faiblement répulsives.

Dans une configuration où les interactions sont légèrement attractives ($A_2 < 0$), à 160mM en sels, les mesures ont été effectuées sur une large gamme de concentrations en particules (de 2 à 200 mg.mL^{-1}). Suivant les concentrations en particules, deux types de comportement sont observés (Figure V.33).

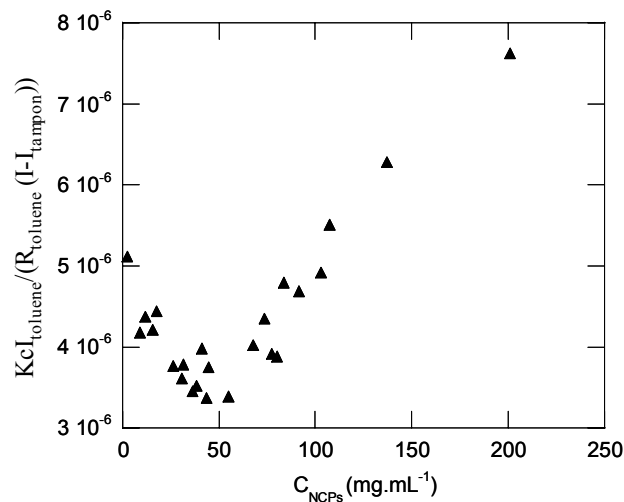


Figure V.33 Evaluation des interactions par diffusion de la lumière à 160mM en sels monovalents.

Jusqu'à 50 mg.mL^{-1} , une droite décroissante est obtenue, caractérisant des interactions attractives. L'inverse de son ordonnée à l'origine est égale à $2,1 \cdot 10^5 \text{g.mol}^{-1}$, valeur correspondante à la masse moléculaire d'une NCP. Un second coefficient du viriel entre paires de NCPs de $-1.5 \cdot 10^{-8} \pm 1.8 \cdot 10^{-8} \text{mol.L.g}^{-2}$ peut donc être calculé. Pour des concentrations en NCPs supérieures à 50 mg.mL^{-1} , la pente de la droite obtenue s'inverse. Deux interprétations sont possibles :

- La portion croissante de la courbe ajustée à l'équation V.4 (Annexe V.4) indique une masse moléculaire de plus de $5 \cdot 10^5 \text{g.mol}^{-1}$, beaucoup plus élevée que la masse d'une particule. Il est donc probable qu'au-delà de 50 mg.mL^{-1} , les NCPs forment des agrégats qui sont dissociés pour des concentrations en NCPs inférieures à 50 mg.mL^{-1} .
- Cette rupture de pente pourrait également être liée à un changement dans la nature des interactions entre NCPs isolées au-delà de 50 mg.mL^{-1} .

b. Evaluation des interactions en présence d'ATP

Les expériences mises en œuvre pour tester l'effet de l'ATP sur les interactions entre NCPs ont été réalisées quelques mois après les premières mesures de A_2 commentées ci-dessus.

La plupart des expériences ont été effectuées par Sofiane Gouendouzen, dans le cadre de son stage de M1 (licence physique et application). Le porte échantillon étant légèrement différent, la calibration au toluène n'a pas pu être utilisée. Néanmoins, il est possible, d'obtenir des valeurs de seconds coefficients du viriel sans calibration au toluène. En effet, l'équation V.4 (Annexe V.4) peut être réécrite de la manière suivante :

$$\frac{c}{I-I_{\text{eau}}} = \frac{R_{\text{eau}}}{I_{\text{eau}}KM} (1+2MA_2c) = \text{constante}(1+2MA_2c) \quad (\text{V.5})$$

Puisque M , la masse moléculaire des NCPs est connue ($M=223500 \pm 12500 \text{ g.mol}^{-1}$), on peut déterminer A_2 d'après la pente de la droite ajustée à la courbe $\frac{c}{I-I_{\text{eau}}} = f(c)$.

L'effet de l'ATP sur les interactions entre NCPs a été déterminé pour deux concentrations salines, 10 et 160mM, correspondant à des configurations où les interactions sont respectivement répulsives et très faiblement attractives. Ces expériences sont préliminaires mais restent pertinentes d'un point de vue qualitatif.

A 10mM en sels, nous avons testé l'effet de concentrations en ATP de 0.1 et 1mM (Figure V.34). En présence de 0.1mM d'ATP et à une concentration en NCPs de 10 mg.mL^{-1} deux molécules d'ATP qui apportent 6 charges négatives sont présentes en solution pour une particule cœur de nucléosome dont les histones portent environ 140 charges positives et l'ADN 310 charges négatives.

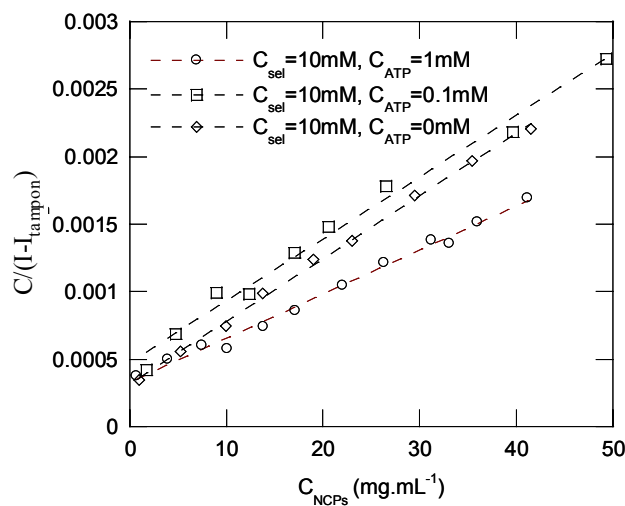


Figure V.34. Effet de l'ATP (0.1 et 1mM) sur les interactions entre NCPs à 10mM en sels monovalents.

Les trois droites obtenues possèdent, aux barres d'erreur près, la même ordonnée à l'origine. Jusqu'à 1mM en ATP, les particules ne s'agrègent donc pas. Les courbes obtenues sans ATP ou en présence de 0.1mM d'ATP sont quasiment identiques. En particulier, on trouve un second coefficient du viriel de $3.26.10^{-7} \pm 0.126.10^{-7} \text{ mol.L.g}^{-2}$. Par contre, à 1mM d'ATP on constate que la pente de la droite obtenue, et par conséquent A_2 , est plus faible que pour des concentrations inférieures en ATP. A_2 vaut effectivement, dans ces conditions, $2.37.10^{-7} \pm 0.9.10^{-7} \text{ mol.L.g}^{-2}$. La présence d'ATP rend donc les interactions globalement moins répulsives.

Pour des concentrations salines plus élevées, à 160mM, le second coefficient du viriel est déjà négatif, sans ATP si l'ensemble des points est ajusté à une droite. Par ailleurs, on observe un léger changement de pente vers 30 mg.mL^{-1} déjà observé précédemment (Figure V.33). Il est

probable que l'ajout d'ATP renforce les interactions attractives entre NCPs. C'est pourquoi une concentration plus faible de 0.1mM en ATP a été testée. La figure V.35 compare des courbes obtenues pour des échantillons sans ATP ou renfermant 0.1mM d'ATP.

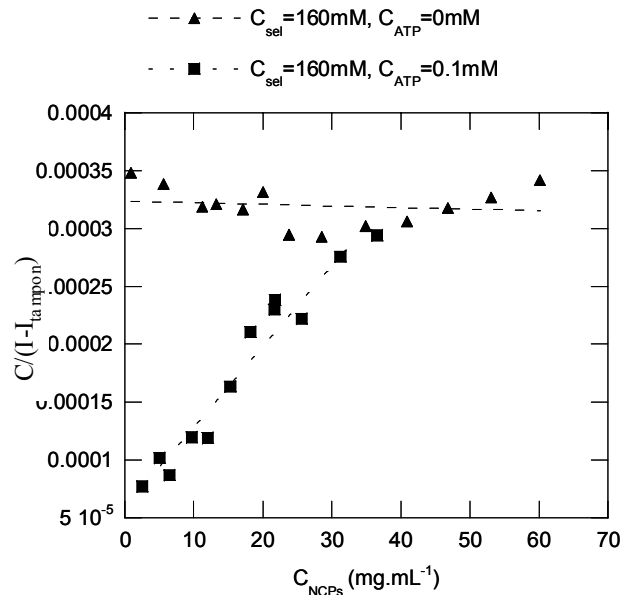


Figure V.35. Effet de 0.1mM d'ATP pour des solutions de NCPs à 160mM en sels monovalents.

Sans ATP, avec 160mM de sels monovalents, A_2 s'élève à $-9.9 \cdot 10^{-10} \pm 1.28 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L.g}^{-2}$. Cette valeur reste cohérente avec les mesures précédentes. 0.1mM d'ATP seulement est suffisant pour agréger les NCPs. En effet, à une telle concentration en ATP, la courbe est très différente de la courbe réalisée sans ATP (figure V.35). Notamment, l'ordonnée à l'origine significativement plus faible signale une agrégation des particules.

c. Courbe de précipitation

Nous avons établi une unique courbe de précipitation pour une concentration en sels monovalents de 10mM et des concentrations en ATP variant de 1 à 100mM en ATP. La concentration en NCPs vaut 1mg.mL^{-1} . Lors de la mesure de concentration en NCPs soluble, l'ATP interfère dans les mesures d'absorbance UV. La contribution de l'ATP à l'absorbance à 260nm (absorbance de 15 pour une solution d'ATP à 1mM) a été soustraite de l'absorbance totale (Figure V.36). Les temps d'incubation des NCPs avec l'ATP valent 1 heure.

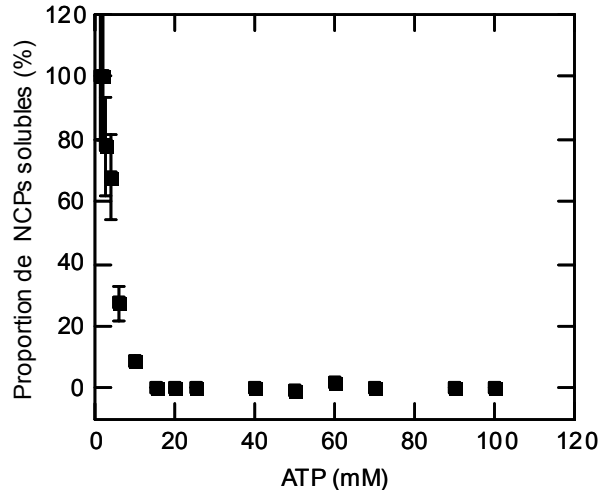


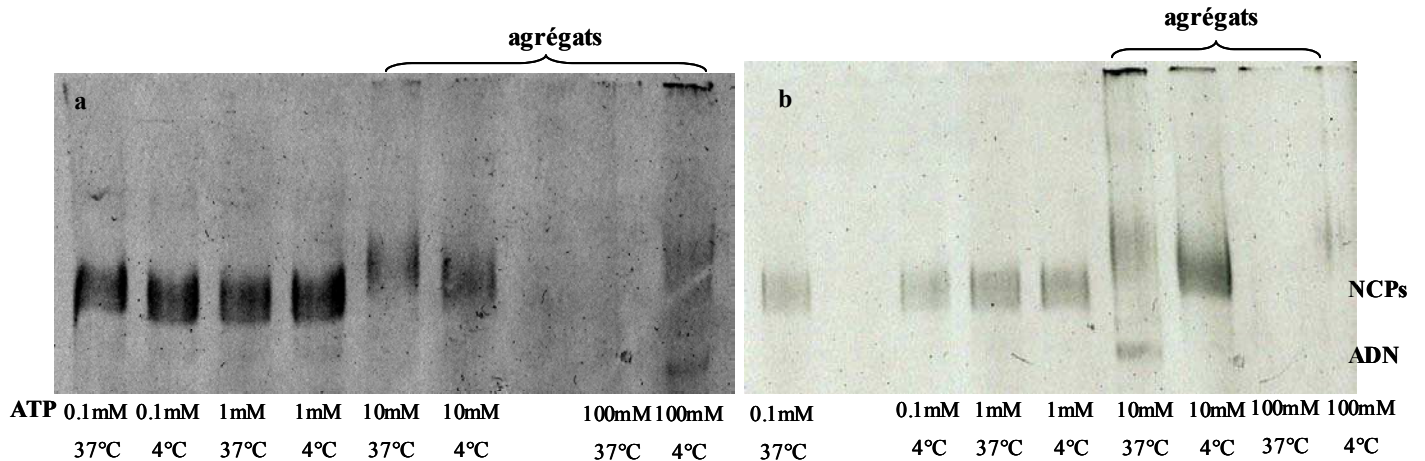
Figure V.36 courbe de précipitation de NCPs précipitées par l'ATP. La concentrations en ions monovalents s'élève à 10mM en la concentration en NCPs vaut 1mg.mL^{-1} .

A partir de 15mM en ATP, les NCPs sont complètement agrégées. Des concentrations de quelques mM d'ATP induisent un début d'agrégation et entre 15 et 100mM d'ATP, la précipitation des particules est totale. Contrairement aux courbes de précipitation obtenues en présence de cations multivalents, aucune suppression de précipitation n'est observée à forte concentration en ATP.

d. Stabilité et dissociation des NCPs en présence de concentrations variables en ATP

Nous nous sommes assurés que dans les gammes de concentrations en ATP envisagées pour les expériences de diffusion de lumière, les particules restent stables. De plus, dans l'hypothèse où les interactions NCPs / ATP sont spécifiques, il est probable que les NCPs sont déstabilisées par l'ATP. Pour des concentrations salines de 10 et 160mM, nous avons testé l'effet de différentes concentrations en ATP (0.1, 1, 10 et 100mM) sur la stabilité de NCPs natives pour des temps d'incubation courts de une heure. Les résultats sont reportés sur la figure V.37. Pour chaque condition, les NCPs ont été conservées à 4°C ou incubées à 37°C pendant une heure puis analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide non dénaturant. Pour les deux concentrations salines envisagées, les résultats sont similaires. Les NCPs ne semblent pas affectées par la présence de quantités d'ATP de 0.1 et 1mM. On n'observe ni dissociation ADN-histones ni agrégation des particules. Par contre, la présence de 10mM d'ATP perturbe la migration des particules dans le gel d'électrophorèse. On observe tout d'abord la formation d'agrégats qui ne pénètrent pas dans les gels d'électrophorèse. L'agrégation semble plus importante à forte (160mM) qu'à faible (10mM) concentration saline. A 160mM en sels et à 37°C, un début de dissociation ADN-histones est par ailleurs observé. En présence de 100mM d'ATP, l'agrégation est certainement complète et les agrégats formés sont probablement trop volumineux pour migrer sur gels d'acrylamide car aucune bande de migration n'est observée. De plus, à une telle concentration en ATP, il est probable que les particules soient au moins partiellement dissociées.

Par ailleurs, les NCPs semblent migrer plus lentement en présence de 10mM d'ATP. En effet, les bandes correspondant aux NCPs sur l'électrophorèse sont légèrement plus hautes. Cet effet est accentué par chauffage des échantillons à 37°C. On peut supposer que les extrémités entrantes et sortantes de l'ADN sont légèrement ouvertes et provoque un ralentissement de la vitesse de migration des particules. Les NCPs se trouvent dans une conformation plus relâchée.



2. Discussion, Perspectives

a. Nature des interactions attractives NCPs-ATP?

Le phénomène observé ici est à priori contre intuitif et inattendu. En effet, l'ATP et l'ADN sont tous deux globalement négativement chargés. En première approximation, on peut donc supposer qu'ils n'interagissent pas de manière attractive. Or, nos expériences indiquent clairement que l'ajout d'ATP en solution induit l'agrégation des NCPs. Il est probable que les histones chargées positivement soient responsables la précipitation des NCPs. La courbe de précipitation établie sur la figure V.36 semble indiquer toute absence de redissolution à forte concentration en ions multivalents.

Les groupement phosphate chargés négativement de l'ATP sont susceptibles d'interagir avec les charges positives des histones au niveau du cœur protéique structuré et /ou des queues des histones. En supposant que l'interaction ATP/histones soit favorisée par rapport aux interactions ADN/histones, on peut envisager que l'ATP se substitue à l'ADN pour dissocier partiellement ou totalement le complexe ADN/histones et favorise la précipitation des NCPs. On constate, en effet un début de dissociation ADN-histones à 10mM en ATP et 160mM en sels monovalents, après chauffage à 37°C (cf. figure V.37). Nakashima et al. (1996) ont montré que l'introduction de sulfate de dextran, chargé négativement, dans des noyaux de cellules ou à des préparations de chromatine induit la formation d'un gel où le polyanion semble remplacer l'ADN pour interagir avec les histones. Dans ces complexes polyanion-histones, seules sont conservées les histones H3 et H4. L'effet de l'ATP sur les NCPs pourrait être similaire à celui de polyanions

tels que le sulfate de dextran. Un effet similaire pourrait être observé dans le cadre de nos expériences qui rendrait compte de vitesses de migration ralenties observées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et de conformations de NCPs moins compactes (Figure V.37).

b. Effet des concentrations en sels monovalents sur les interactions

A 160mM en sels monovalents, les NCPs s'agrègent pour des concentrations en ATP de 0.1mM alors qu'à faible force ionique (10mM), des concentrations plus élevées en ATP (1mM) sont nécessaires pour observer la formation d'agrégats de NCPs. Les expériences de stabilité de NCPs en présence d'ATP (cf. figure V.37) montrent également que les NCPs sont plus sensibles à l'ATP dans 160mM de sels monovalents que dans 10mM. Notamment, un début de dissociation ADN-histones est observé à partir de 10mM en ATP pour des conditions salines de 160mM. A 10mM en sels, cette dissociation est observée pour une concentration de 100mM en ATP. Dans le chapitre IV et dans Mangelot et al. (2002), des expériences de SAXS montrent une augmentation globale de la taille des particules pour des concentrations croissantes en sels monovalents. Cette augmentation de taille a été attribuée à un décollement et à une extension des queues des histones par rapport au cœur des particules. Les molécules d'ATP pourraient éventuellement interagir avec les portions N terminales étendues et positivement chargées des histones. Des études menées sur les interactions entre NCPs intactes ou trypsinisées et polélectrolytes anioniques ont montré que des polyanions tels que l'héparine et l'acide poly(glutamique) interagissent essentiellement avec les résidus basiques des queues des histones (Villeponteau., 1992).

c. Pertinence biologique

Tout d'abord, l'ATP est un ion multivalent et perturbe l'environnement ionique de la chromatine. Makita & Yoshikawa (1999) ont montré que l'ATP en présence de spermidine contrôle la condensation de molécules d'ADN. Ces travaux montrent que l'ATP en tant qu'ion multivalent est un antagoniste de la spermidine pour la condensation de l'ADN.

En outre, le remodelage de la chromatine nécessite l'action d'ATPases, sous unités des facteurs de remodelage qui hydrolysent l'ATP. Deux principaux mécanismes ont été proposés pour décrire le glissement de l'ADN autour de l'octamère d'histones au cours de ce remodelage (revue dans Becker & Hörz, 2002; Längst & Becker, 2004). Le premier mécanisme consiste en une torsion de l'ADN nucléosomal qui se propagerait d'une paire de bases d'ADN à une autre par diffusion. Cette description est maintenant moins convaincante puisque des expériences montrent que le remodelage de la chromatine se produit aussi pour de l'ADN comportant des "nicks" (coupure unilatérale ponctuelle d'un des brins de la double hélice d'ADN) (Längst & Becker, 2000). Il semblerait plutôt que des fragments de 30-35pb d'ADN nucléosomal se décollent des nucléosomes au niveau des extrémités entrantes et sortantes de l'ADN et sont réassociés aux nucléosomes en formant des protubérances ("bulges" en anglais) (Schiessel et al., 2001). Ces protubérances se propagent et modifient la position de l'ADN autour de l'octamère d'histones. On peut faire l'hypothèse que la présence d'ATP seul faciliterait la dissociation de l'ADN nucléosomal par rapport à l'octamère d'histones. En effet, nos expériences semblent montrer qu'en présence d'ATP l'association ADN-histone est fragilisée.

d. Perspectives

Ces expériences restent pour l'instant préliminaires et les premiers résultats obtenus doivent être approfondis et complétés. La diffusion statique de la lumière et les électrophorèses sur gels d'acrylamide sont complémentaires et appropriées pour cette étude.

- La nature de l'interaction entre NCPs et ATP doit être précisée. Afin de déterminer quelle portion protéique interagit plus particulièrement avec l'ATP, l'utilisation de NCPs sans queues d'histones, trypsinisées ou recombinantes peut être envisagée.
- Afin de tester la spécificité de cet effet, nous pouvons envisager de tester d'autres nucléotides tels que le GTP ou le CTP. Le rôle des contre-ions associés à l'ATP pourra être étudié par comparaison du NaATP par rapport au MgATP.
- Il sera également nécessaire d'examiner l'effet de l'ATP sur des fragments d'ADN nu de 146pb et des octamères d'histones seuls.
- On pourra également tester l'effet de l'hydrolyse de l'ATP sur les interactions entre NCPs. Pour cela, il est envisageable de comparer des résultats obtenus en présence d'ATP gamma S non hydrolysable et en présence d'hexokinase qui hydrolyse l'ATP en ADP.
- Des expériences qui testeraient l'effet de la nucléase sur l'ADN nucléosomal, en présence d'ATP pourraient mettre en évidence une réduction de l'affinité ADN-histones en présence d'ATP.
- L'organisation, la structure des agrégats formés pourront être analysés par diffraction des rayons X et cryomicroscopie électronique.

Conclusions et résumé du chapitre V.

● Des diagrammes de phase de NCPs précipités par du Mg^{2+} et de la Spd^{3+} ont été construits et comparés.

◇ Les courbes de précipitations établies en présence de Mg^{2+} et de Spermidine³⁺ sont similaires. On observe une concentration seuil de précipitation et à forte concentration en multivalents une redissolution. Les ions monovalents réduisent la précipitation des NCPs par un effet de compétition avec les cations multivalents pour la condensation de contre ions.

◇ Le domaine de précipitation pour le diagramme obtenu en présence de magnésium est plus réduit qu'en présence de spermidine.

◇ Le diagramme de phase décrivant la précipitation des NCPs par le magnésium est particulier à forte concentration en particules. La limite de redissolution croît avec les concentrations en particules.

◇ Précipitées par du Mg^{2+} , les NCPs ne s'organisent à longue distance qu'après des temps d'équilibres très longs. Ces phases denses sont difficilement formées et coexistent avec des domaines peu organisés.

◇ La Spd^{3+} permet de former des phases denses de NCPs hexagonales à deux dimensions pour des conditions proches du seuil de précipitation des particules. Dans certaines conditions, la Spd^{3+} ne permet d'obtenir que des NCPs agrégées ou des empilements de NCPs peu organisés. Le passage d'une phase à une autre est progressive avec la variation des concentrations en Spd^{3+} .

● L'ATP induit une agrégation des NCPs dépendante de la force ionique. La nature des interactions dont résulte la précipitation des NCPs reste à expliciter.

● Précipitées par l'ATP, les NCPs présentent une conformation plus ouverte. Cet effet signale un effet de l'ATP sur la force de l'interaction ADN-histones. L'ATP, par sa présence en solution, pourrait renforcer ou même induire l'action des facteurs de remodelage qui sont connus pour déstabiliser les interactions ADN-histones et contrôler le glissement de l'ADN autour des protéines.

Chapitre VI

Phases denses de NCPs
recombinantes obtenues
par stress osmotique.

Introduction au chapitre VI

D'après le diagramme de phase établi par Mangenot et al. (2004) la nature des phases denses de NCPs natives obtenues par stress osmotique diffère à faible (10mM) et à forte (150mM) concentrations salines. Alors qu'à faible force ionique des phases lamellaires sont obtenues, à forte concentrations salines, Mangenot et al. (2004) observent la formation de phases hexagonales. Ces phases denses sont décrites en détails dans le chapitre II. Notre objectif consiste ici à déterminer la nature de phases denses obtenues à partir de NCPs recombinantes et à tester le rôle de certaines des queues d'histones sur la nature des phases obtenues.

A. Préparation des phases denses par stress osmotique et méthode d'analyse

Des pressions osmotiques variables sont appliquées par des solutions de PEG 20000 sur des solutions de NCPs déjà concentrées à 100mg.mL^{-1} par ultrafiltration ("Vivaspin", Viva science). Les solutions de PEG sont préalablement équilibrées dans le même tampon et les mêmes conditions salines que les NCPs. Nous avons réalisé des expériences en présence de 1mM d'EDTA ou sans EDTA. Ces séries d'expériences emploient des NCPs natives (lot C) mais également des NCPs recombinantes reconstituées pour lesquelles les rendement obtenus sont environ mille fois plus faibles que dans le cas de NCPs natives. C'est pourquoi nous avons adapté la technique de formation de phases denses par pression de PEG pour des micro volumes, en capillaires plats de petites dimensions (épaisseur intérieure 0.1mm, largeur 1mm et longueur 100mm, "Microslide", Vitro Com Inc). Ces capillaires permettent de faire des observations sur des micro volumes à la fois en microscopie optique et en diffraction des rayons X.

Une unique procédure a été utilisée pour remplir l'ensemble des capillaires. Un volume précis d'une solution de PEG dont la concentration varie suivant la valeur souhaitée pour la pression appliquée sur la solution de NCPs est introduit à la pipette dans un capillaire. Les pressions osmotiques résultantes sont disponibles sur le site internet : http://www.brocku.ca/researchers/peter_rand/osmotic/data/peg20000. Nous avons fait varier les concentrations de PEG entre 19 et 35% pour appliquer des pressions comprises entre 4.7 et 23Atm^1 . Un volume bien défini d'une solution de NCPs concentrée initialement à 100mg.mL^{-1} est ensuite inséré dans ce même capillaire. Le capillaire est enfin scellé à la flamme d'un côté (côté PEG) et bouché à la paraffine de l'autre (côté NCPs). Une interface bien définie se forme instantanément entre la solution de PEG et la solution de NCPs avant que les échantillons ne s'équilibrent . Le mode de remplissage de ces capillaires est présenté schématiquement sur la figure VI.1.

¹ Les pressions sont données en Atmosphères (Atm). On rappelle $1\text{atm}=1.013.10^5\text{Pa}$

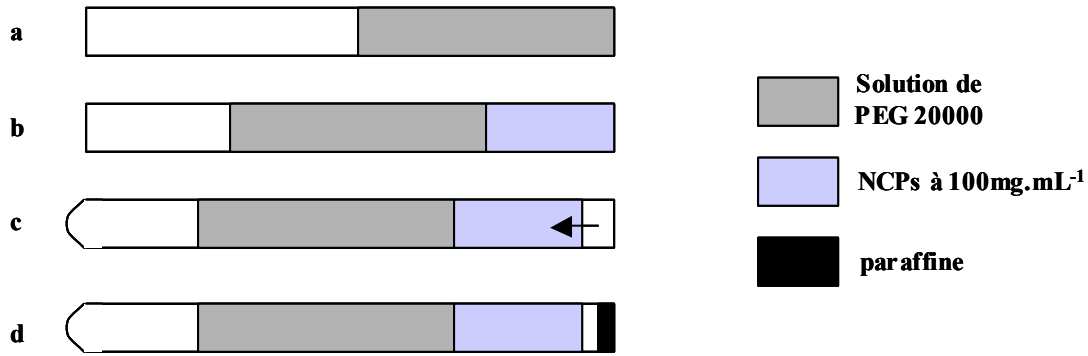


Figure VI.1 Mode de remplissage des capillaires plats. Après introduction du PEG (a) et des NCPs (b), par capillarité, l'extrémité côté PEG est soudée à la flamme à oxygène (c). Consécutivement à la soudure, les solutions se déplacent spontanément dans le capillaire. L'autre extrémité est bouchée à l'aide de paraffine (d).

Par diffraction des rayons X (Annexe V.3), sur la ligne ID2 de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), les capillaires plats ont été scannés avec un pas de 0.4mm et un temps de pose de 0.2 secondes. Après détermination d'une position privilégiée, la mesure y est répétée pendant 0.2 secondes à dix reprises. Les caractéristiques de la ligne ID2 sont détaillées dans l'annexe V.3. Dans ces conditions expérimentales, l'intensité des rayons X diffractés est relativement faible et les diagrammes de diffraction sont assez bruités. En effet, le diamètre interne des capillaires utilisés est réduit à 0.1mm et l'épaisseur de verre traversée induit une absorption importante de l'intensité. Par conséquent, certains pics de diffraction peuvent ne pas être distingués du bruit. Il est toutefois possible de déterminer la nature des phases dans un échantillon donné et d'indexer partiellement les pics de diffraction observés.

Ces mêmes capillaires ont été examinés à l'aide d'un microscope optique polarisant ainsi qu'en contraste interférentiel de Nomarski (Annexe V.1) avant et après irradiation par le faisceau de rayons X. Aucune dégradation remarquable n'a été identifiée après analyse par diffraction des rayons X.

B. Phases denses de NCPs natives analysées en capillaires plats

Nous avons testé, avec des NCPs natives, la reproductibilité des résultats de Mangenot et al. (2003) pour des micro volumes de solutions, en capillaires plats. Dans le cas des expériences de Mangenot et al. (2003), les quantités d'échantillons n'étaient pas limitantes et les expériences avaient été réalisées avec une concentration initiale en NCPs de l'ordre de 200-250mg.mL⁻¹. Pour des NCPs recombinantes, les concentrations initiales en NCPs avant organisation par stress osmotique sont réduites à 100mg.mL⁻¹. Des concentrations supérieures sont difficiles à atteindre car elles nécessitent de très faibles volumes, peu aisés à manipuler.

1. Description des structures obtenues

Sous des pressions trop faibles ou trop fortes les solutions ne s'organisent pas correctement. Lorsqu'on applique une pression minimale de 4.7Atm (PEG 19%), on n'observe que la formation de colonnes isotropes de NCPs. Sous une pression de 23Atm (PEG 35%), le stress osmotique appliqué est trop élevé pour que les NCPs s'organisent. Pour des pressions intermédiaires, des phases organisées sont observées. Toutefois, la méthode de préparation des échantillons induit un gradient de PEG au sein du capillaire encore visible après 4 mois d'équilibration. Par conséquent, l'organisation des NCPs n'est pas homogène sur toute la longueur du capillaire. Dans la suite, nous nous sommes attachés à analyser les diagrammes de diffraction caractérisant les structures les plus organisées.

a. Concentrations ioniques élevées

A force ionique élevée (150mM en sels monovalents), les NCPs s'ordonnent systématiquement suivant une organisation hexagonale. On trouve dans ce cas des résultats assez voisins de ceux obtenus pour S. Mangenot et décrits dans le chapitre III. La figure VI.2.a présente un spectre caractéristique de diffraction des rayons X pour des NCPs natives en présence de 150mM de sels monovalents.

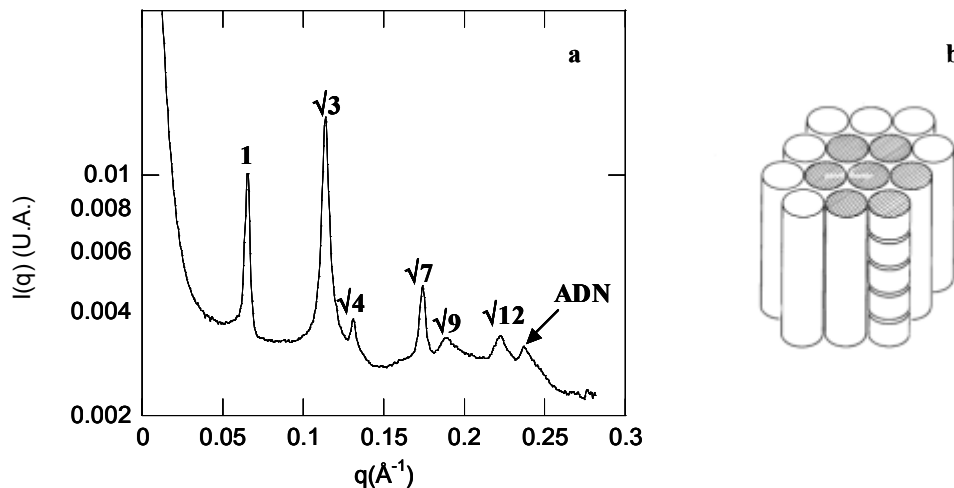


Figure VI.2 Diagramme de diffraction (a) de NCPs natives organisées suivant un réseau hexagonal (b). La pression appliquée est ici de 9.3atm (Peg 25%) et la concentration en sel s'élève à 150mM.

Des pics dont les positions relatives sont indexées en 1, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{7}$, $\sqrt{9}$ et $\sqrt{12}$ caractérisent une organisation hexagonale à deux dimensions des NCPs. Le paramètre hexagonal a_H vaut ici 111.0 \AA . Les pics en (001) et (002) correspondant à l'ordre entre NCPs dans une colonne ne sont pas visibles. Par contre, on observe un pic positionné en 0.237\AA^{-1} qui pourrait correspondre au pas de la superhélice de l'ADN nucléosomal égal, ici, à 26.5 \AA . Ces observations indiquent que les NCPs s'organisent en colonnes formant un réseau hexagonal à deux dimensions, mais qu'il n'y a pas une organisation périodique parfaite le long des colonnes. Des textures hexagonales caractéristiques (Leforestier et Livolant, 1997) ont été visualisées par microscopie optique et sont présentées sur la figure VI.3.

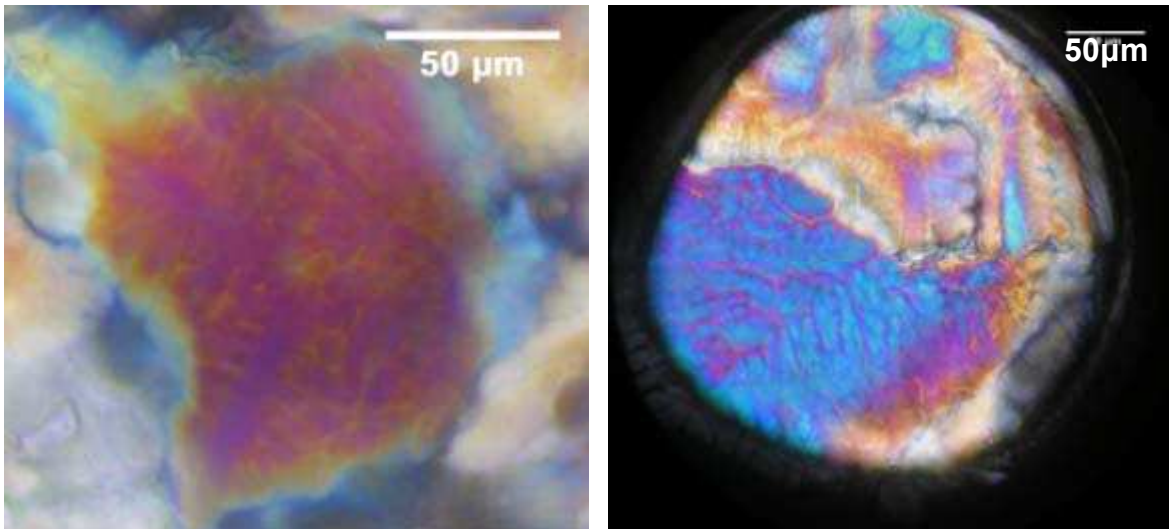


Figure VI.3 Textures hexagonales de NCPs dans 150mM de sels monovalents sous une pression de 12.6Atm (Peg 28%). L'observation est effectuée au microscope polarisant entre polariseur et analyseur croisés.

b. Faibles concentrations salines

Analyse par diffraction des rayons X

Pour des NCPs natives, en présence de 20mM de sels monovalents et sans EDTA, des phases lamellaires sont obtenues pour des concentrations en PEG de 23 et 25% correspondant à des pression respectives de 7.5Atm et 9.3Atm. Ces phases ont été mises en évidence pour les mêmes échantillons en diffraction des rayons X et par microscopie optique. Un spectre de diffraction des rayons X caractérisant une phase lamellaire est présenté sur la figure VI.4.a.

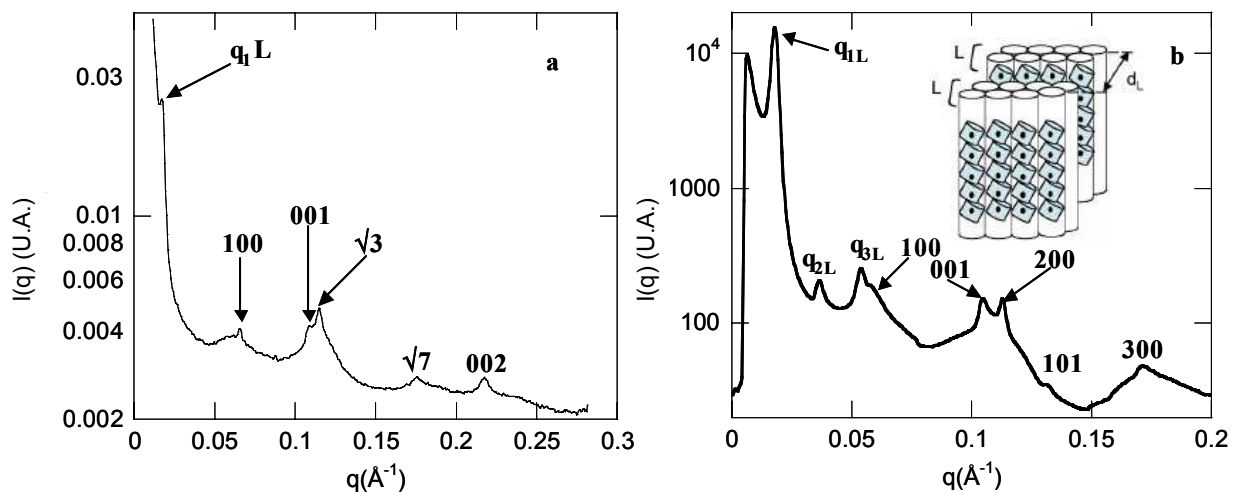


Figure VI.4.a Diagramme de diffraction des rayons X pour des NCPs natives en présence de 20mM de sels monovalents, sans EDTA et pour une pression osmotique de 7.5Atm (Peg 23%). Ce diagramme est à comparer avec le spectre de diffraction obtenu par Mangenot et al. (2003) (b).

Sur le diagramme de phase de la figure VI.4.a, un pic observé à 0.0175\AA^{-1} caractérise la présence de lamelles et correspond à une distance inter lamellaire d_L de 358\AA . L'intensité des pics

d'ordre supérieur est trop faible pour être visualisée. Ce spectre est comparé avec celui de la figure VI.4.b obtenu par Mangenot et al. (2003) dans des conditions légèrement différentes (25mM en sels monovalents, 1mM EDTA, concentrations initiales plus élevées ($>200\text{mg.mL}^{-1}$) en NCPs, capillaires cylindriques). Deux différences entre les deux spectres peuvent être mises en évidence :

Dans le spectre de Mangenot et al. (2003), quatre pics relatifs aux plans des lamelles (les pics 100, 200, 101 et 300) permettent de décrire l'organisation monoclinique des NCPs dans ces plans. Sur le spectre obtenu ici, seul le pic 100 est clairement identifiable. L'organisation dans le plan des lamelles ne peut donc pas être analysée dans notre cas.

Par contre, on observe ici (Figure VI.A.a) deux pics situés en $\sqrt{3}$ et $\sqrt{7}$ par rapport à ce pic 100, qui n'étaient pas présents dans le cas de Mangenot et al. (2003), et qui sont caractéristiques d'un ordre hexagonal.

Les autres pics de Bragg sont indexés de la manière suivante :

Les pics (001) et (002) montrent que les NCPs s'organisent en colonnes telles que la distance entre particules dans les colonnes vaut 57.9\AA .

Le pic (100) caractérise la périodicité perpendiculaire aux colonnes et permet d'évaluer la distance entre colonnes. Les pics (200) et (300) ne sont pas visibles.

On peut, en premier lieu avancer l'hypothèse que coexistent des phases lamellaires et hexagonales dans un même échantillon. Il est également possible qu'un réseau hexagonal de NCPs s'organise au sein d'une phase lamellaire. Sur le schéma de la figure VI.5, deux bicouches de NCPs sont représentées vues de dessus.

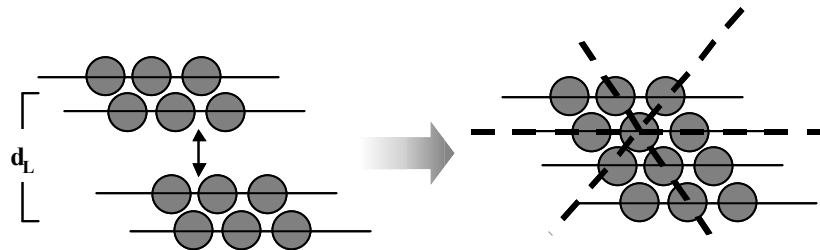


Figure VI.5 Bicouches de NCPs dans une phase lamellaire qui se rapprochent. Après diminution de la distance entre bicouches d_L , un réseau hexagonal est observé.

Dans cette configuration, un rapprochement de ces bicouches induit une organisation des NCPs suivant un réseau hexagonal qui serait responsable des pics caractérisant cet ordre.

Analyse par microscopie optique

A faible concentration en sels monovalents ($\leq 25\text{mM}$), nous nous attendions à observer les textures de la phase lamello-colonnaire décrites par Leforestier et al. (2001) et Mangenot et al (2003.b et 2004). Nous avons effectivement observé ces textures, en particulier les tubes (Figure VI.6.a,f,g) et les sphérulites (figure VI.6.b,c,d) aux plus faibles concentrations en sels monovalents (10mM Tris) et en absence d'EDTA. L'observation des textures dénote une grande sensibilité à de faibles variations des conditions ioniques. En présence de 20mM en sels monovalents (10mM Tris+10mM NaCl), les sphérulites de la phase lamello-colonnaire sont

quelquefois organisés autour de bâtonnets biréfringents (Figure VI.6.b,c). Les tubes sont souvent connectés à des structures fibreuses, soit à leur surface (Figure VI.6.a), soit à leur extrémité (Figure VI.7.a,b, g, flèches).

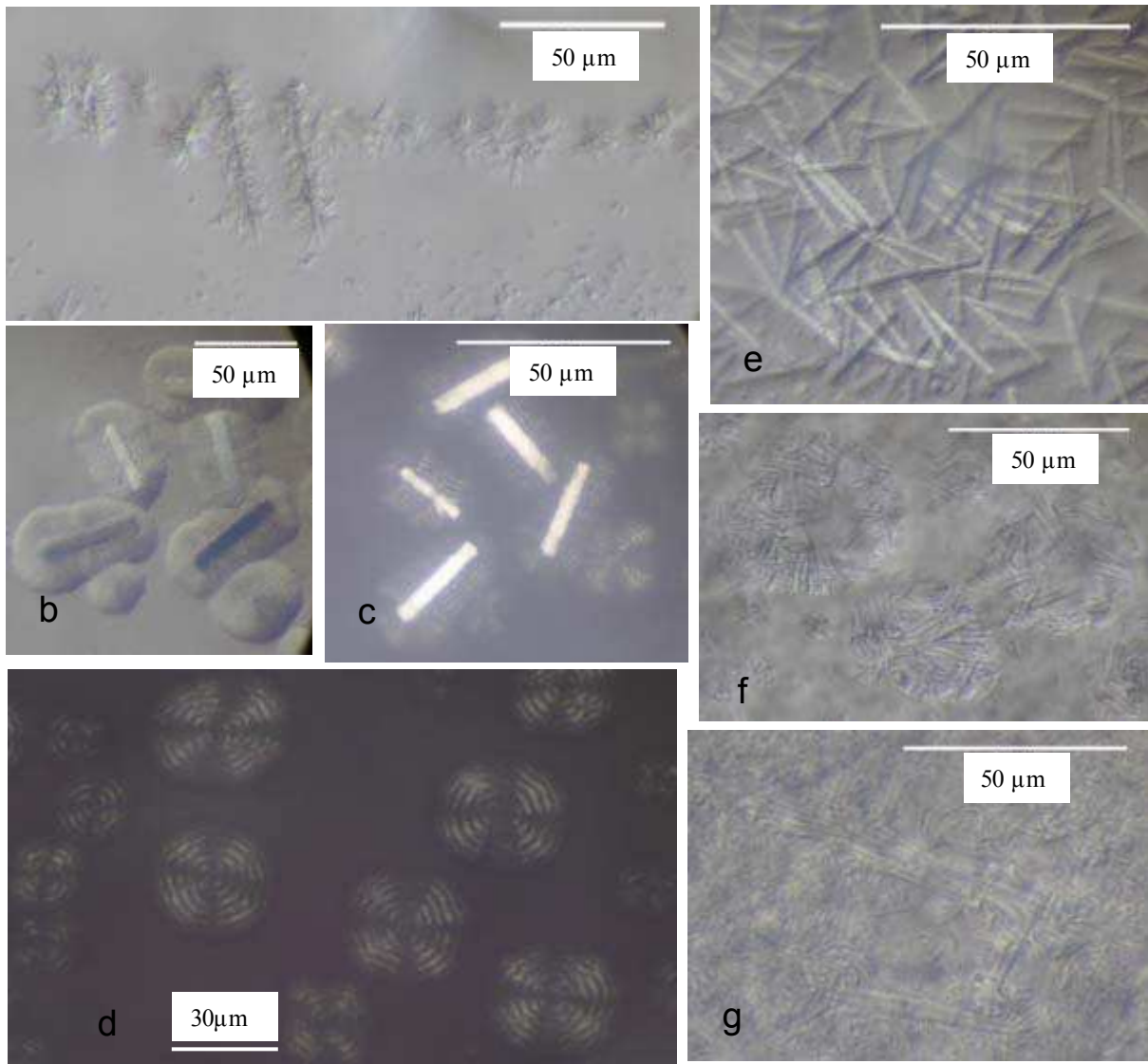


Figure VI.6 Textures observée avec les NCPs natives à faible concentration en sels monovalents dans les microcapillaires. Observations réalisées en contraste interférentiel de Nomarski (a, b, e, f, g) ou entre polariseur et analyseur croisés (c, d).

Ces structures fibreuses sont fortement biréfringentes. En intercalant une lame teinte sensible à 45° entre polariseur et analyseur croisés, on observe qu'elles deviennent bleu quand on les aligne parallèlement au grand axe de la lame teinte sensible (et orange après une rotation de 90°) (Annexe V.1). On a donc dans cette situation superposition des grands indices (N_g) de la lame et de l'échantillon, ce qui permet de déterminer que les molécules d'ADN sont perpendiculaires à l'axe d'allongement de ces faisceaux, puisque la birefringence intrinsèque de l'ADN est négative (Annexe V.1). Les colonnes de nucléosomes sont donc parallèles à l'axe de ces faisceaux fibreux. Ces faisceaux ont quelquefois l'apparence de baguettes rigides (Figure

VI.6.e), mais plus souvent un aspect en mèche de cheveux torsadés qui dénote l'existence d'un twist entre fibres au sein du faisceau (Figure VI.7.a), qui se manifeste également par des extrémités en éventail dans certains cas particuliers (Figure VI.7.e). Le plus souvent, ces faisceaux présentent une structure hélicoïdale, qui peut être très spectaculaire (Figure VI.7.a,c,d). Ces faisceaux hélicoïdaux sont de diamètre divers, connectés entre eux. Leur pas hélicoïdal peut varier notablement (Figure VI.7.d). Dans le cas de la figure VI.7.e et dans certaines structures hélicoïdales, nous avons pu déterminer que les fibres hélicoïdales sont d'hélicité droite, ce qui correspond à une torsion gauche entre éléments de la structure. Ces structures fibreuses peuvent également former des coudes ou des séries de pliures (Figure VI.7.a, VI.7.g flèches évidées), et conduire de même que les structures hélicoïdales, à la formation de fibres à bandes alternativement éclairées et éteintes entre polariseur et analyseur croisés. (Figure VI.7.h). Ces fibres striées sont généralement organisées en faisceaux disposés en éventails. Les structures fibreuses que nous venons de décrire semblent correspondre à une même organisation des nucléosomes, différente de la phase lamello-colonnaire, plus dense et présentant une orientation monodirectionnelle des colonnes de nucléosomes (à l'hélicité près). Il peut s'agir d'une phase hexagonale dense (avec des textures originales) ou de la phase hexagonale inverse décrite auparavant à bas sel et forte concentration en sels monovalents. Les observations par diffraction des rayons X semblent éliminer cette hypothèse.

Superposées à ces textures, on remarque dans certaines conditions ioniques, la présence de pavages, déjà décrits auparavant, et que nous avons attribués à des textures hexagonales malgré leur originalité (Mangenot et al., 2004). Nous les avons retrouvés ici dans certains échantillons (20mM sels monovalents, sans EDTA) (Figure VI.7.a,g, double flèches).

D'une manière générale, les textures ne sont pas visibles immédiatement après introduction des échantillons dans le capillaire, mais s'installent en quelques jours, pour restent stables ensuite, au moins 6 mois, sous réserve que le capillaire soit hermétiquement fermé.

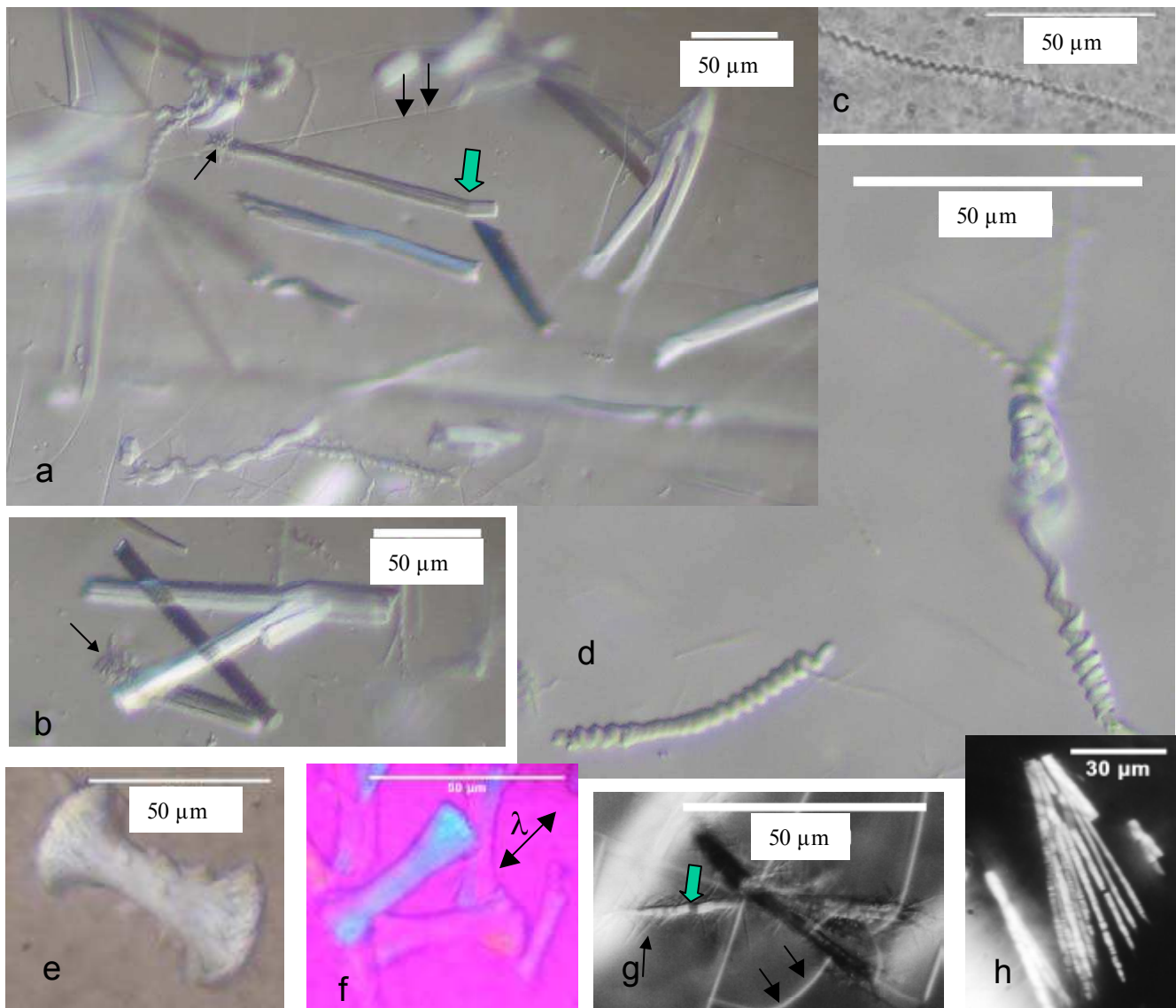


Figure VI.7 Textures observées avec les NCPs natives à faible concentrations en sels monovalents (10 ou 20mM) et sans EDTA dans les microcapillaires. Observations réalisées en lumière naturelle (e), en contraste interférentiel de Nomarski (a, b, d, e) ou entre polariseur et analyseur croisé (f, g, h) et avec une lame teinte sensible (λ) en f.

L'hétérogénéité de ces textures semble être en accord avec une hypothèse où différents types d'organisation coexistent dans un seul échantillon. Ainsi, la coexistence de ces structure est compatible avec les diagrammes de diffraction où cohabitent phases lamellaires et ordre hexagonal. Un gradient de concentration en PEG s'instaure dans ces capillaires plats et le type d'organisation observée dépend du stress osmotique appliqué, localement. On peut supposer que l'échantillon est initialement lamellaire puis évolue, par rapprochement de ces lamelles (Figure VI.5), vers une organisation hexagonale. Il est possible que des temps d'équilibration particulièrement long résultent du confinement des échantillons au sein de capillaires de faible épaisseur. Cela induirait, très localement, des variations en concentrations salines et en pressions qui rendrait compte de l'hétérogénéité des structures observées.

2. Effet de l'EDTA

a. Observations

Dans le chapitre précédent, un effet de l'EDTA sur la précipitation des NCPs par un ion divalent, le magnésium²⁺ a été constaté. Il est possible que l'EDTA interfère également sur la formation de phases denses en présence d'ions monovalents. Afin de tester les conséquences de la présence d'EDTA en solution, des échantillons dépourvus d'EDTA ont été comparés avec des échantillons qui en contiennent. Une partie du lot de NCPs conservées dans un tampon TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM) a été dialysée contre un tampon Tris-HCl 10mM pour éliminer toute trace d'EDTA. Deux séries d'échantillons avec et sans EDTA ont été préparés en capillaires plats comme indiqué en A. Dans ces conditions expérimentales, à faible concentration saline et relativement faible concentrations en NCPs ($100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et en présence d'EDTA 1mM, la formation de la phase lamellaire est contrariée. En effet, dans ces conditions, la structure des phases denses obtenues est hexagonale plutôt que lamellaire. Le diagramme de diffraction obtenu pour des NCPs en présence d'EDTA 1mM et de 20mM de sels monovalents est présenté par la figure VI.8 et est caractéristique d'un ordre hexagonal. Ce diagramme est à comparer avec celui de la figure VI.4.a caractérisant une phase lamellaire, obtenue dans des conditions salines identiques, mais sans EDTA.

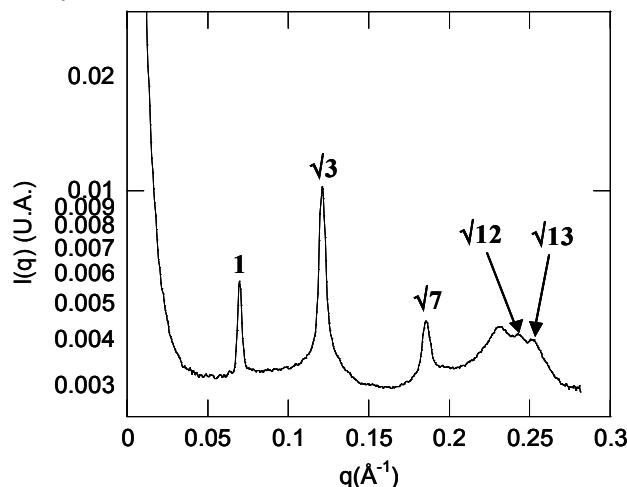


Figure VI.8 Diagramme de diffraction obtenu pour des NCPs natives en présence de 20mM de sels monovalents, d'EDTA 1mM et pour une pression osmotique de 7.5Atm (Peg 23%).

Le paramètre hexagonal est ici plus faible que dans le cas de la figure VI.2.a (150mM sels, Peg 25%) et vaut 103.9Å.

Pour les échantillons qui contiennent 1mM d'EDTA, des textures caractéristiques d'une organisation hexagonale sont observées (Figures VI.9.a, b.). Sans EDTA, on observe une formation de sphérulites (Figure VI.6.d) et tubes (Figure VI.6.a,f,g), spécifiques d'une organisation lamellaire.

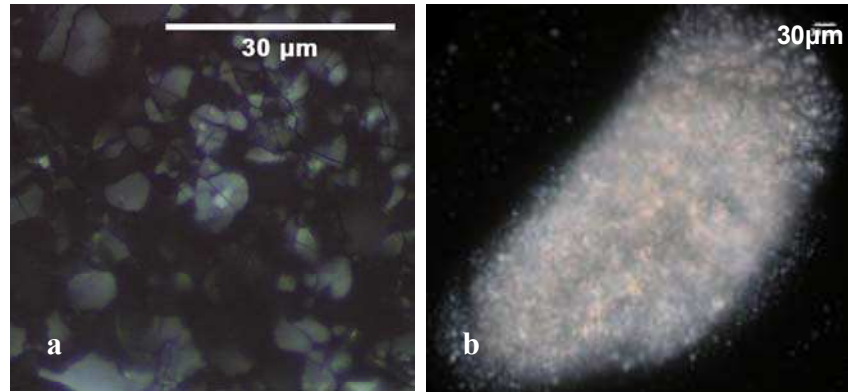


Figure VI.9 Textures hexagonales observées à faibles concentration salines (10mM) en présence d'EDTA 1mM sous une pression osmotique de 7.5Atm (PEG 23%).

b. Interprétation

L'EDTA est habituellement utilisé comme chélateur d'ions divalents pour éviter l'activation de protéases et nucléases, dans le but de conserver les échantillons. Dans nos conditions expérimentales, à un pH de 7.5, l'EDTA est en équilibre entre une forme ionisée trois fois et une forme complètement ionisée (quatre charges négatives). On peut envisager que l'EDTA, s'il est en excès, facilite et induise une complexation des nucléosomes par des interactions spécifiques avec les histones positivement chargées. De plus, l'EDTA étant une molécule chargée modifie la force ionique de la solution ainsi que les interactions électrostatiques entre particules. Ainsi, l'EDTA empêcherait la formation de la phase lamellaire pour favoriser une organisation des NCPs suivant un réseau hexagonal, plus dense. On constate effectivement que le paramètre hexagonal mesuré à partir du spectre de diffraction de la figure VI.8 est petit et indique que l'organisation des particules est particulièrement dense.

c. Rôle du mode de préparation de l'échantillon : effet des concentrations initiales en NCPs

Dans le cas des expériences réalisées par Mangenot et al. (2003), les échantillons comportaient également 1mM d'EDTA alors que des phases lamellaires étaient clairement mises en évidence pour de faibles concentrations salines. Cependant, pour Mangenot et al. (2003), les concentrations initiales en NCPs étaient systématiquement supérieures à 200mg.mL⁻¹ alors que dans nos conditions expérimentales la concentration en particules est égale à 100mg.mL⁻¹. Des échantillons ont été préparés en capillaires plats en utilisant des solutions de NCPs concentrées initialement à 250mg.mL⁻¹. Dans ces capillaires, des sphérulites similaires à celles de la figure VI.6.d sont visualisées et rendent compte d'une organisation lamellaire. Par conséquent, pour des concentrations initiales élevées en NCPs, l'effet d'1mM d'EDTA n'est plus perceptible. La

proportion d'EDTA par rapport à celle de NCPs n'est alors pas suffisante pour empêcher la formation de la phase lamellaire.

Des différentes observations présentées dans ce paragraphe, on peut déduire que l'analyse des phases denses organisées est possible dans des capillaires plats de petites dimensions, globalement. Ainsi, il est envisageable d'utiliser de petites quantités de matériel biologique pour former des micro volumes de phases denses organisées de NCPs. Néanmoins, les concentrations initiales et la présence d'EDTA en solution conditionnent l'organisation des NCPs en phases denses. Nous sommes également conscients qu'avec ce mode de préparation, les échantillons condensés peuvent éventuellement être piégés en des états métastables à cause des variations locales en concentrations ioniques et en pressions. Un temps infiniment long serait nécessaire pour atteindre un état d'équilibre.

C. Effet des queues d'histones dans la formation de phases denses de NCPs recombinantes

Dans le chapitre IV, nous avons montré que les queues d'histones sont essentielles pour que des interactions attractives s'établissent entre particules. Il est donc vraisemblable que ces queues aient un rôle dans la formation de phases denses organisées. Nous avons donc utilisé des NCPs recombinantes intactes et sans queues d'histones H3 et H4 (gH3gH4) pour former des phases denses. Les résultats restent préliminaires puisque nous n'avons considéré que deux concentrations en sels monovalents (20 et 150mM). De plus, une partie des capillaires a été malencontreusement endommagée, de manière inattendue, avant analyse. Tous les échantillons ont été préparés en présence d'EDTA 1mM.

1. Phases denses obtenues avec des NCPs recombinantes intactes

Les phases denses obtenues avec des NCPs recombinantes intactes et analysées par diffraction des rayons X sont quasi hexagonales pour les deux concentrations salines considérées (Figure VI.10). Nous rappelons que les échantillons renferment de l'EDTA concentré à 1mM et que celui-ci empêche la formation de phases lamellaires dans le cas des NCPs natives et pour des concentrations en particules relativement faibles (100mg.mL^{-1}). On peut comprendre que l'EDTA produit ce même effet dans le cas des NCPs recombinantes.

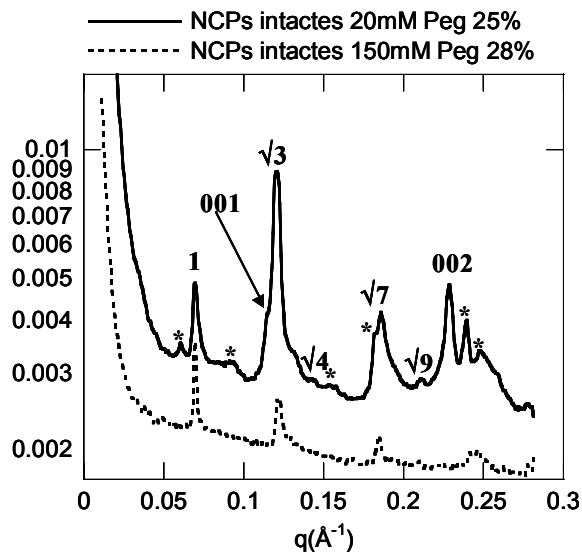


Figure VI.10 Diagrammes de diffraction obtenus pour des NCPs recombinantes intactes obtenus à faible (trait continu) et à forte (trait discontinu) concentrations en sels monovalents. L'organisation est quasi hexagonale.

Plus précisément, les pics en 1, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{7}$ et $\sqrt{9}$ caractérisent une organisation hexagonale des NCPs dont le paramètre hexagonal a_H vaut 104.2\AA , pour le spectre obtenu à 20mM en sels monovalents. Les pics en (001) et (002) sont caractéristiques de la distance entre deux NCPs consécutives dans un agencement des NCPs en colonnes. Cette distance vaut ici 55\AA . Il subsiste des pics non indexés (*) sur le spectre de la figure VI.10), ce qui indique que l'organisation des NCPs est plutôt orthorhombique mais très voisine d'une organisation hexagonale. Les cristaux de NCPs qui ont permis de résoudre la structure cristallographique des NCPs présentent, en effet, ce type d'organisation (Luger et al., 1997). Dans notre cas, l'intensité et la résolution des pics de diffraction est trop faible pour indexer complètement l'ensemble des pics dans une telle structure. Il est toutefois raisonnable de considérer que l'organisation des NCPs est quasi hexagonale à trois dimensions et est caractérisée par un paramètre hexagonal a_H et l'inter distance d_c entre NCPs consécutives dans une colonne. Une étude exhaustive des différentes conditions en terme de force ionique et de stress osmotique n'a pas pu être menée pour les NCPs recombinantes intactes. En effet, la plupart des capillaires endommagés avant analyse appartenaient à cette série.

2. Phases denses obtenues avec des NCPs recombinantes gH3gH4

Pour l'ensemble des conditions en pression et en concentrations salines considérées, des phases denses qui s'avèrent être quasi hexagonales sont observées. Un spectre de diffraction représentatif est présenté sur la figure VI.11.

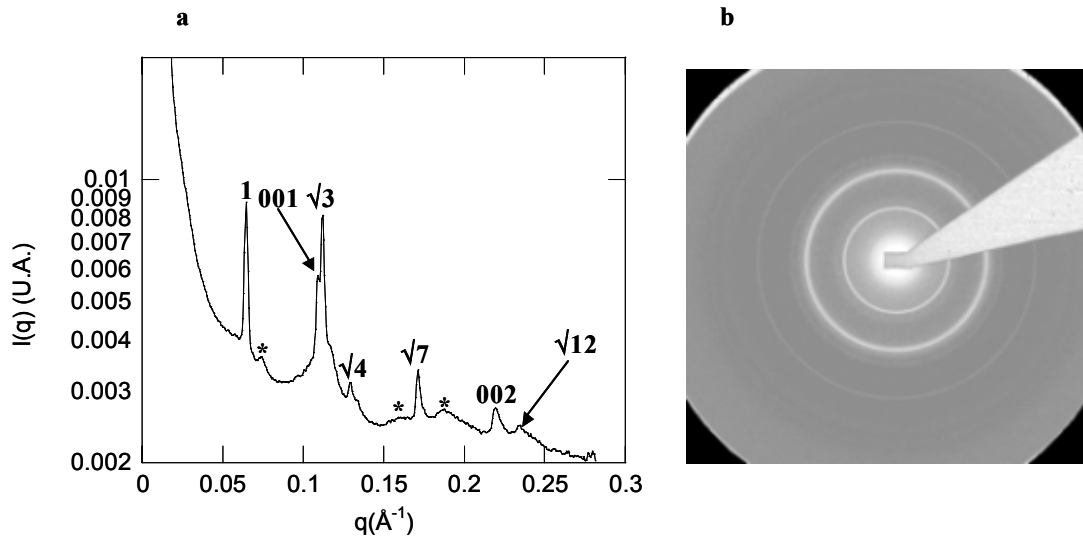


Figure VI.11 Diagramme de diffraction (a) intégré à partir du spectre présenté en b. Il s'agit d'un échantillon de NCPs gH3gH4 dans 20mM de sels monovalents concentrées par du PEG 23%.

Le paramètre hexagonal a_H vaut ici 112.4Å. La distance entre deux NCPs dans une colonne vaut 57.5Å. Il subsiste également des pics non indexés (*). Il s'agit également ici d'une organisation quasi hexagonale à trois dimensions.

a. Effet de la concentration en PEG

La concentration en PEG et par conséquent la pression osmotique appliquée sur les échantillons influe sur le degré de compaction des phases denses obtenues. Les diagrammes de diffraction obtenus à 20 et 150mM en sels monovalents pour différentes pressions appliquées sont comparés sur la figure VI.12.

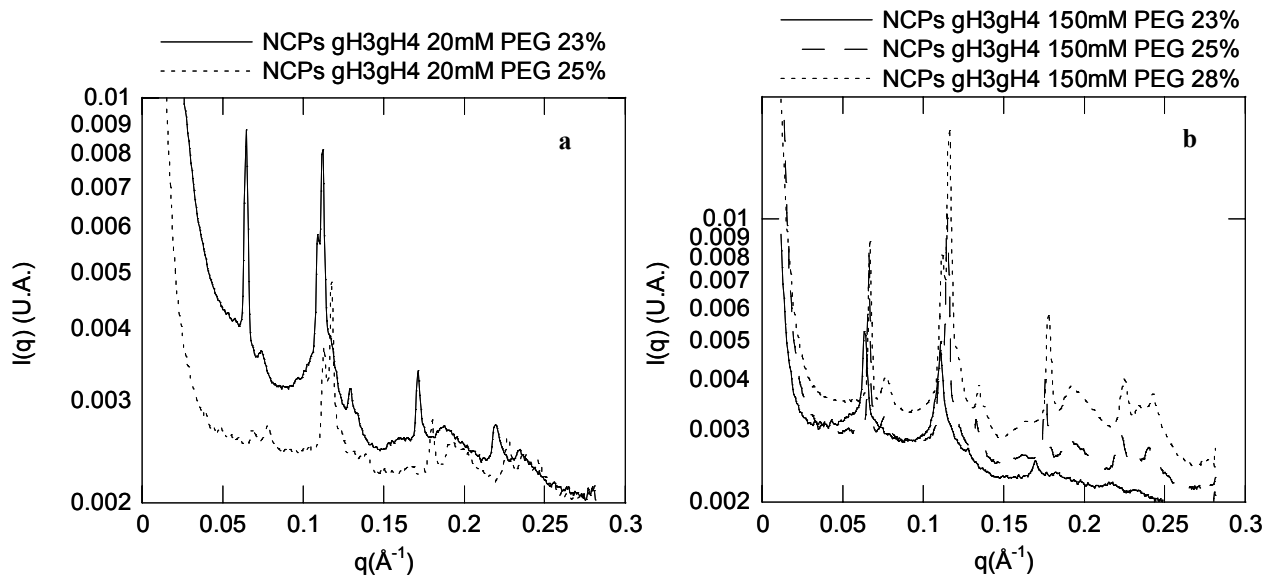


Figure VI.12 Effet du stress osmotique appliqué. Diagrammes de diffractions obtenus pour des NCPs gH3gH4 à 20 (a) et 150mM (b) en sels monovalents pour des concentrations en PEG variant de 23 à 28%.

Pour des concentrations de 20 et 150mM en sels monovalents, les pics des diagrammes de diffraction sont décalés vers des angles de diffusion q plus grand avec des concentrations en PEG

croissantes. Par conséquent, le paramètre hexagonal a_H diminue avec la pression appliquée. Il n'est pas étonnant que l'organisation des NCPs soit plus compacte lorsque le stress osmotique imposé est plus important. Les paramètres de l'organisation hexagonale à deux dimensions sont reportés dans le tableau VI.1.

Concentration en sels	20mM		150mM		
Concentration en PEG et pression.	23% 7.6 atm	25% 9.3 atm	23% 7.6 atm	25% 9.3 atm	28% 13 atm
a_H (Å)	112.4	107.3	113.8	109.4	108.3
d_c (Å)	57.5	55.5	58.7	56.5	56.1
C (mg.mL ⁻¹)	518.0	588.9	495.0	556.5	571.9

Tableau VI.1 Evolution des paramètres de l'organisation hexagonale à deux dimensions en fonction des concentration salines et de la pression appliquée. a_H est le paramètre hexagonal et d_c correspond à la distance entre deux NCPs successives dans une colonne.

On remarque que dans le cas du diagramme de diffraction obtenu à 20mM en sels monovalents pour une concentration de PEG de 25% (pointillés sur la figure VI.12.a), le pic d'ordre 1 de l'organisation hexagonale est peu marqué. Il est peu probable que ceci provienne du fait que, dans ce cas, la structure est différente de celle observée pour les autres concentrations. Les phases denses étant de très petites dimensions, à l'échelle macroscopique, il est probable que toutes les orientations ne sont pas représentées et que les nœuds du réseau réciproque correspondant au pic d'ordre 1 ne coupent pas la sphère d'Ewald et ne soient donc pas en position de réflexion.

b. Effet de la concentration saline

Le niveau de compaction des phases organisées varie également avec les concentrations salines. La figure VI.13 présente une comparaison entre des diagrammes de diffraction obtenus à faible concentration saline et à forte concentration saline pour des concentrations en PEG de 23 (a) et 25% (b).

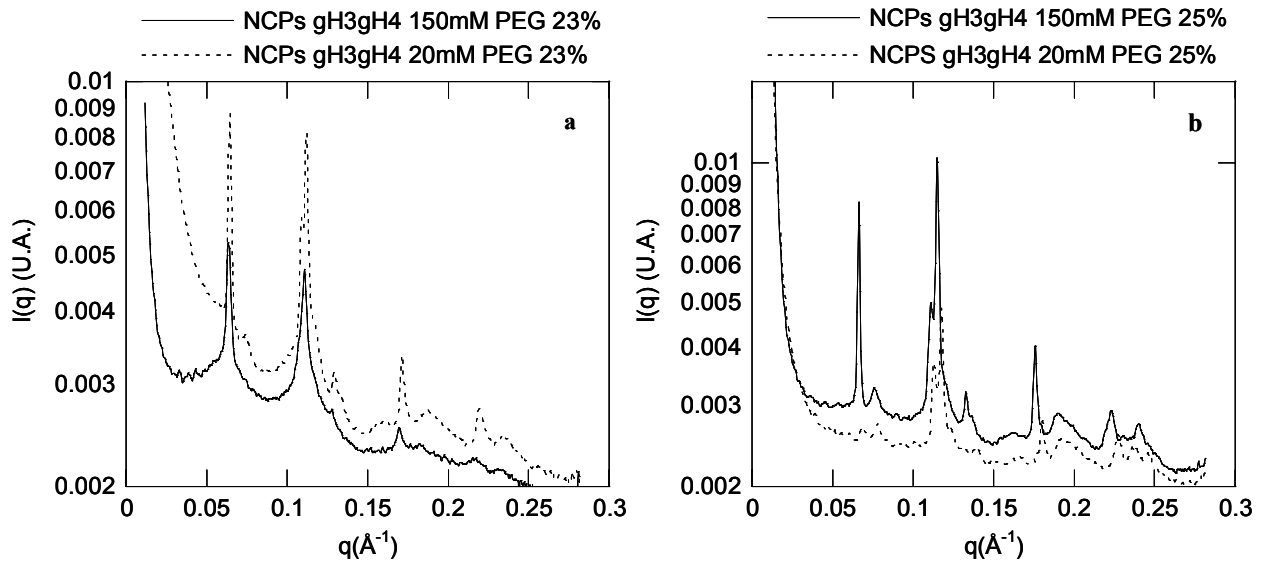


Figure VI.13 Comparaison des diagrammes de diffraction obtenus à 20mM (pointillés) et à 150mM (traits continus) en sels monovalents pour des concentrations en PEG de 23% (a) et 25% (b).

La figure VI.13 montre que les paramètres hexagonaux sont légèrement plus petits à faible concentration saline. Les valeurs de ces paramètres sont reportées dans le tableau VI.1. A faible concentration saline et en solution diluée, les queues d'histones restantes (H2A et H2B) sont repliées sur le cœur de la particule. A plus forte concentration saline, il est probable, comme nous le discutons dans le chapitre IV, qu'elle soient décollées, en solution diluée. En particulier, la queue d'histone H2B, plus longue que celle de H2A s'étend certainement au-delà du cœur des NCPs. Dans l'hypothèse où l'extension de cette queue d'histone H2B, persiste lorsque les NCPs se concentrent, ce phénomène pourrait rendre compte d'une augmentation des paramètres hexagonaux.

3. Comparaison de NCPs intacts et gH3gH4

a Textures macroscopiques des phases denses de NCPs intacts et gH3gH4.

Les textures des capillaires plats ont été observées en microscopie optique, avant leur analyse par diffraction des rayons X (Figure VI.14.a,a',b,b') ou dans les mois qui ont suivi (Figure VI.14.e-f). Les textures obtenues à partir de NCPs avec ou sans queues d'histones H3 et H4 sont typiquement hexagonales.

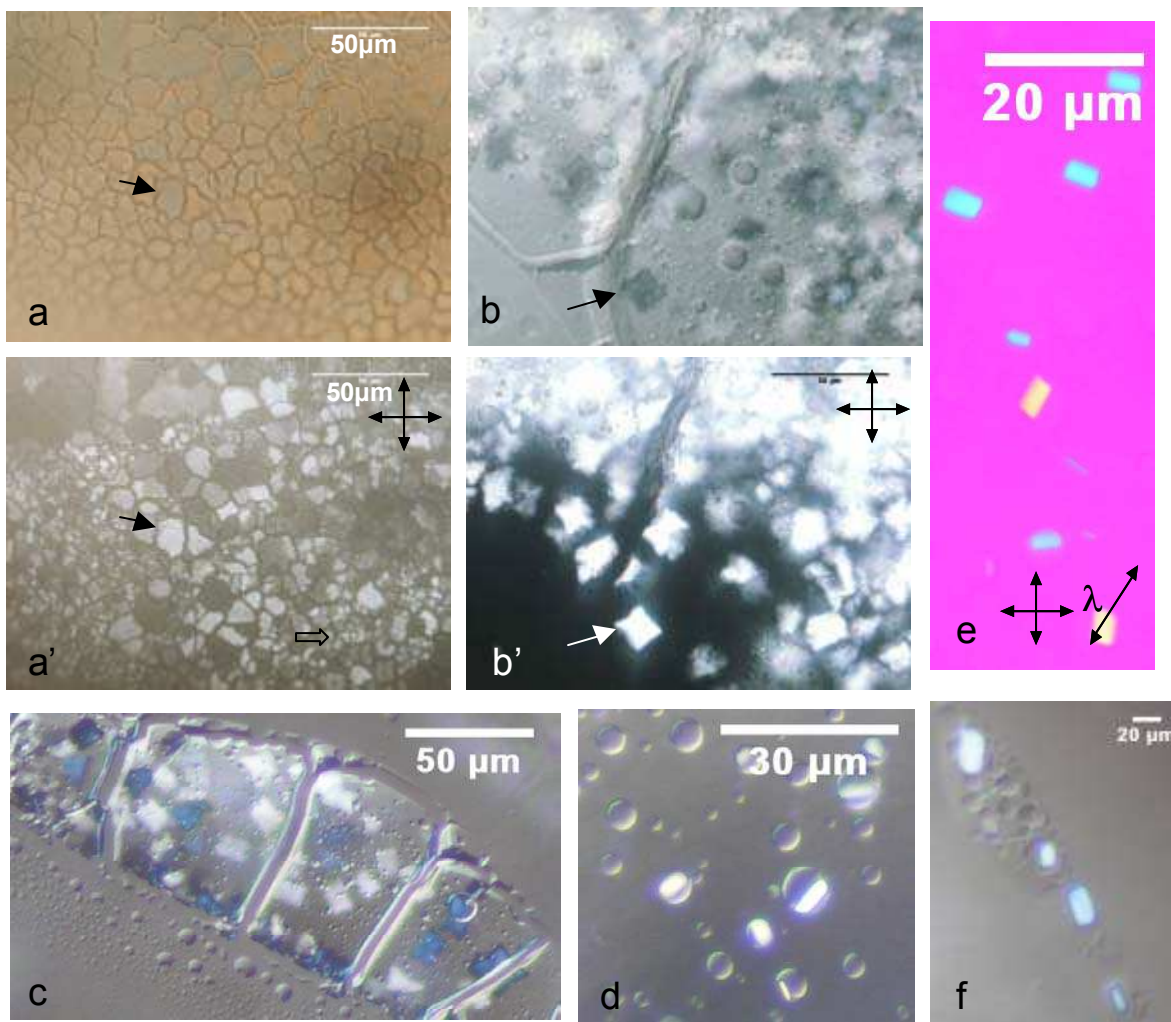


Figure VI.14 Textures observées avec les NCP recombinantes intactes (a,a') et gH3gH4 (b,b') concentrées en présence de PEG dans des microcapillaires plats. Observations en contraste interférentiel de Nomarski (a,b,c,d,f) ou entre polariseur et analyseur croisés (a',b',e) avec en (e) une lame teinte sensible (λ) dont l'axe de grand indice est indiqué par la double flèche. Les conditions sont les suivantes : 150mM monovalents, 23%PEG (d,e,f), 28%PEG (a,a',c); 20mM monovalents, 25%PEG (b,b').

Les NCPs recombinantes intactes s'organisent pour former des textures hexagonales classiques au sein d'une phase dense qui, en se concentrant sous l'effet du PEG, se craquelle en formant des pavages irréguliers (Figure VI.14.1a). Chacun des domaines ainsi formé est biréfringent (Figure VI.14.a'). Il correspond à un seul monodomaine (Figure VI.14.a', flèche) ou contient plusieurs germes cristallins (Figure VI.14.a', flèche évidée). Nous avons observé le même phénomène de craquelures avec les NCPs recombinantes gH3gH4 (Figure VI.14.b, b', c). Dans ces domaines, on reconnaît également les germes de type hexagonal. Il semble que ces craquelures apparaissent avant que la biréfringence ne soit visible au sein des domaines. Nous avons également observé, dans les mêmes préparations, des gouttelettes isotropes au sein desquelles nucléent des germes hexagonaux (Figures VI.14.d, f). Ces germes sont des monodomaines, de forme allongée. Ils sont colorés en jaune quand leur grand axe est aligné parallèlement à la direction de la lame teinte sensible, ce qui indique que les colonnes de nucleosomes sont, dans ce cas, perpendiculaires à l'axe d'allongement du cristal.

b. Variation du taux de compaction des phases denses analysée par diffraction des rayons X

La figure VI.15 montre une comparaison entre des spectres de diffraction obtenus avec des NCPs intacts ou gH3gH4 dans les mêmes conditions de sels et de pression osmotique.

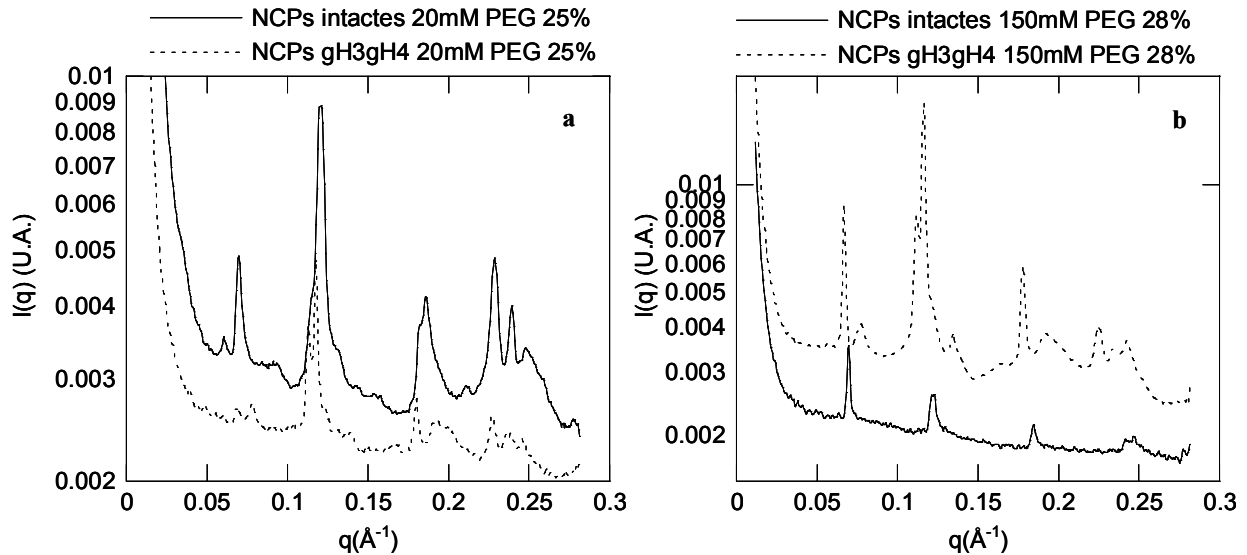


Figure VI.15 Comparaison des diagrammes de diffraction obtenus pour des NCPs intacts (traits continus) et des NCPs gH3gH4 (pointillés) pour deux conditions distinctes : a ($C_{\text{sels}} = 20\text{mM}$, PEG 25%) et b ($C_{\text{sels}} = 150\text{mM}$, PEG 28%)

Pour les deux conditions considérées dans la figure VI.15, les paramètres hexagonaux sont plus faibles pour les NCPs intacts que pour les gH3gH4, à la fois à faible et à forte concentration saline. A 20mM en sels et 25% de PEG, pour des NCPs intacts, le paramètre hexagonal a_H et la distance entre NCPs dans une colonne valent respectivement 104.2Å et 55.0Å. La concentration en NCPs dans cette phase dense vaut 629.0mg.mL⁻¹. A forte concentration saline (150mM) et 28% en PEG, pour des NCPs intacts, a_H vaut également 104.2Å et la distance entre NCPs dans une colonne est égale à 51.9Å. La concentration est donc encore plus élevée et égale à 666.6mg.mL⁻¹.

Dans le chapitre IV, nous avons montré, qu'en solution diluée, les queues d'histone H3 et H4 étaient essentielles pour établir des interactions attractives entre NCPs. Leur présence induit une compaction importante des phases denses de NCPs intacts. Les structures cristallographiques mettent en évidence de tels contacts. La queue d'histone H4 d'une particule contactant la NCP voisine. La suppression de queues d'histones H3 et H4 diminue la quantité de charges positives disponibles et rendrait compte des concentrations plus faibles observées pour ces phases denses.

En conclusion, nous avons montré que l'on peut préparer et analyser les phases denses formées par des NCPs recombinantes intacts ou délétées de certaines de leurs extensions protéiques. Néanmoins, ces expériences doivent être reproduites en évitant d'utiliser de l'EDTA et pour des séries complémentaires en concentrations salines pour analyser finement l'effet combiné de la concentration saline et des queues d'histones.

Conclusions et perspectives du Chapitre VI

● Organisations des NCPs concentrées par stress osmotique :

- ◇ Les quantités de matériel biologique peuvent être réduites et des micro volumes de phases denses de NCPs peuvent être obtenus en utilisant des capillaires plats de petites dimensions et en analysant les résultats par diffraction des rayons X sur la ligne ID2 de l'ESRF.
- ◇ L'EDTA contrarie la formation de la phase lamellaire à faible concentration saline pour des NCPs intactes natives dont la concentration initiale est relativement faible et égale à 100mg.mL^{-1} .
- ◇ Des phases denses organisées quasi hexagonales de NCPs gH3gH4 sont formées par stress osmotique. De petites concentrations en sels et d'importantes concentration en PEG favorise la compaction de ces phases denses.
- ◇ Les paramètres des phases denses obtenues avec des NCPs intactes recombinantes sont inférieures à ceux obtenues à partir de NCPs gH3gH4. Sans queues d'histone H3 et H4, les phases denses sont moins concentrées.

● Perspectives :

Ces expériences restent préliminaires puisque seules deux concentrations en sels monovalents ont été testées. De plus, l'endommagement inattendu de certains capillaires, avant analyse, rendent les interprétations incomplètes. Par conséquent, nous avons prévu de nouvelles expériences sur la ligne ID2. Au cours de ces expériences :

- ◇ Les concentrations en sels monovalents varieront de 10 à 300mM en sels monovalents.
- ◇ Nous réaliserons des capillaires en présence d'EDTA ou sans EDTA.
- ◇ Le stress osmotique appliqué variera entre 4.8 atm et 23 atm.

Conclusion générale

Le contexte biologique dans lequel s'inscrit le travail est celui de la structure de la chromatine eucaryote. Ce travail tend à apporter des éléments de réponse quant au rôle des interactions dans l'organisation de la chromatine, qui peut être régulée par des mécanismes subtils, complexes et très spécifiques. Pour le mener à bien, j'ai utilisé un système modèle : la particule cœur de nucléosome et abordé ces problématiques d'un point de vue physico-chimique.

Avant que ne débute cette thèse, des premiers résultats avaient déjà été obtenus dans le groupe. Notamment, Mangenot et al. (2002.a, b) avaient montré que les extrémités N et C terminales des histones pouvaient être essentielles dans l'établissement d'interactions attractives entre NCPs, en solution diluée. Rappelons que la densité en acides aminés basiques (positivement chargés) de ces queues est particulièrement élevée, ce qui implique qu'elles jouent un rôle particulier dans les mécanismes électrostatiques d'interaction au sein de la chromatine. De plus, *in situ*, les charges de ces queues sont effectivement modulées par des modifications post-traductionnelles.

Mon premier travail a consisté à confirmer l'hypothèse de Mangenot et al. (2002.a et b.) en comparant des NCPs natives intactes et des particules natives privées de queues par trypsinisation (§IV.A.1). Des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été menées et montrent par mesure du second coefficient du viriel que les interactions inter-particules sont répulsives pour des NCPs trypsinisées et deviennent attractives pour des NCPs intactes à des concentrations salines où les queues d'histones s'étendent au-delà du cœur des particules. De plus, la conformation des NCPs trypsinisées semble moins compacte pour des concentrations salines faibles.

Mon second objectif a été de préciser le rôle respectif des queues d'histones. Pour cela, j'ai envisagé de reconstituer des NCPs à partir d'ADN et d'histones recombinantes. En plus d'être parfaitement monodisperses, ces NCPs peuvent être préparées en utilisant soit des histones recombinantes intactes soit des histones tronquées. Ainsi, le rôle spécifique dans les mécanismes d'interaction, au sein de la chromatine, de chacune des queues d'histones peut être potentiellement élucidé. Après que le protocole de production et de reconstitution de ces NCPs ait été adapté au laboratoire, j'ai constaté que certaines des queues d'histones (celles de H2A et H2B, en particulier) sont nécessaires pour obtenir des NCPs de stabilité et conformation similaires à celles de particules natives (§III.B.1). L'ADN des NCPs sans queues d'histones H2A et H2B est, en effet, particulièrement sensible à la digestion par la MNase par rapport à celui de NCPs intactes ou sans queues H3 et H4.

J'ai montré que les queues d'histones H3 et H4 sont nécessaires pour que des interactions attractives s'établissent entre NCPs, en présence d'ions monovalents. Pour cela, j'ai comparé des NCPs recombinantes intactes et gH3gH4 (sans queues H3 et H4) par SAXS en solution diluée (§IV.A.2). Les données expérimentales ont été comparées à des simulations établies à partir d'un modèle simple de potentiel d'interaction de paires. Les interactions entre NCPs gH3gH4 sont décrites par un potentiel de type répulsif uniquement. Par contre, l'introduction d'une composante attractive dans le potentiel est indispensable pour mieux décrire les données expérimentales obtenues avec des NCPs intactes aux concentrations salines les plus élevées. Par ailleurs j'ai montré que les NCPs gH3gH4 présentent une conformation légèrement moins compacte que celle

Conclusion générale.

de NCPs intactes. J'ai mis au point des conditions d'imagerie optimales par cryomicroscopie électronique dans le but d'analyser finement ces différences conformationnelles par reconstruction d'image à trois dimensions.

En parallèle à ces études en solution diluée, j'ai étudié l'organisation des NCPs en phases denses. Afin de mimer les conditions d'encombrement et de compaction de la chromatine dans la cellule, j'ai concentré artificiellement des solutions de NCPs par ajout de cations multivalents ou par stress osmotique.

L'effet des ions multivalents dans les interactions entre NCPs a été examiné. Plus particulièrement, j'ai étudié le rôle des ions magnésium²⁺ et spermidine³⁺ dans la précipitation des NCPs. Des diagrammes de phase ont été établis afin de déterminer précisément les conditions de précipitation des NCPs en présence de Mg²⁺ et Spd³⁺. Ces diagrammes ont été comparés entre eux et confrontés aux diagrammes théoriques. L'organisation des NCPs au sein des domaines biphasiques a été examinée par diffraction des rayons X, microscopies optique et électronique. Nous avons montré que la structure des phases denses obtenues dépend des conditions de précipitation.

Les précipités obtenus en présence de Spd³⁺ sont isotropes, colonnaires isotropes ou hexagonaux à deux dimensions. Pour une concentration donnée en NCPs, j'ai montré que les NCPs s'organisent progressivement latéralement et longitudinalement avec des concentrations croissantes en Spd³⁺ jusqu'à former la phase hexagonale à deux dimensions, mieux organisée. Pour des concentrations encore supérieures, les agrégats se désorganisent progressivement jusqu'à être complètement redissous.

Précipitées par le Mg²⁺, les NCPs s'organisent très lentement, sur une échelle en temps de plusieurs mois. Lorsqu'un début d'organisation est observé, cette dernière reste très locale au sein de l'échantillon. Cependant, les conditions de précipitation permettant d'obtenir des phases mieux organisées sont similaires à celles qui induisent la formation de phases hexagonales organisées à longue distance pour la Spd³⁺.

J'ai également montré, de manière préliminaire, que l'ATP, un polyanion qui intervient dans le processus de remodelage de la chromatine, est capable d'agréger et de déstabiliser les NCPs.

In situ, la chromatine mitotique est localement très concentrée (Chapitre I). Afin de reproduire de telles concentrations, les NCPs isolées sont concentrées par stress osmotique, en présence de sels monovalents. Un diagramme de phase de NCPs concentrées en présence de PEG avait été établi par Mangelot et al. (2004). J'ai tenté de reconsidérer l'organisation des NCPs en phases denses en utilisant des NCPs recombinantes, avec ou sans queues d'histones. Les premières observations semblent montrer que les phases denses sont moins compactes pour des NCPs sans queues H3 et H4.

Pour l'ensemble de mes expériences, j'ai utilisé des NCPs dans des conditions contrôlées en ions et en particules. Je me suis attachée à considérer, entre autres, des conditions ioniques dites physiologiques. Suivant les auteurs, les concentrations locales *in vivo* en chromatine sont variables. Les concentrations atteintes ($\sim 500 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) et résultant de la précipitation par des

cations multivalents ou du stress osmotique sont certainement représentatives, très localement, de concentrations de NCPs *in situ*. J'ai aussi mené des expériences pour de très faibles concentrations en particules. Il est certain que les modes d'interaction entre particules en solution diluée et en phases denses sont différents. Cependant, les résultats semblent montrer des caractéristiques communes et les résultats observés en solution diluée sont consistants avec ceux obtenus pour des phases concentrées. En particulier, sans queues H3 et H4, en solution diluée, les interactions sont répulsives et les phases denses de NCPs sans ces mêmes queues d'histones sont moins compactes que celles de NCPs intactes.

Il est bien clair que l'utilisation de NCPs sans ADN ni histones de liaison est simplificatrice. Toutefois, des modes d'interaction privilégiés entre NCPs sont ainsi mis en évidence et persistent vraisemblablement dans une fibre de chromatine. Raspaud et al. (1999) a par exemple montré qu'ADN libre, NCPs et fibre de chromatine présentent des caractéristiques communes pour la précipitation par la spermine⁴⁺. Dans ce travail j'ai montré que les queues d'histones H3 et H4 jouaient un rôle particulier dans les interactions, en solution diluée: ce rôle avait été constaté également dans le cadre de travaux sur des fibres de chromatine (Dorigo et al. 2003, Krajewski et Ausio, 1996). D'autre part, l'étude des phases denses montre que les NCPs s'empilent systématiquement pour former des colonnes et que les faces supérieures et inférieures des NCPs interagissent de manière privilégiée. Ceci est à rapprocher de la structure cristallographique de tétranucléosomes qui comporte les ADN de liaison, dans laquelle les NCPs adjacents se contactent suivant leurs faces supérieures et inférieures, également (Schalch et al. 2005).

L'objectif ultime est d'établir la structure de la chromatine *in vivo*. En variant l'ensemble des conditions ioniques et en concentration de NCPs, on répertorie un catalogue de structures possibles de NCPs concentrées. L'étape suivante pourrait correspondre à l'étude de chaînes de chromatine mais également à l'étude directe de l'organisation de la chromatine au sein de noyaux, *in situ*. Dans ces noyaux, on peut espérer retrouver des organisations similaires à ce qu'on observe pour des NCPs isolées.

Annexes

Annexe II.1 Préparation de NCPs à partir de thymus de veau.

Utilisation du PMSF (inhibiteur des protéases) : préparer chaque jour une solution stock fraîche à 0.1 M dans isopropanol anhydre (**porter un masque et des gants pour peser le PMSF**). Conserver à l'abri de l'humidité (en présence d'eau, le PMSF n'est plus actif après quelques heures).

Quantités à préparer : 1er et 2ème jour 100 ml de stock. Ensuite 10- 5 ml par jour

Avant la manip, s'être assuré par un test sur un échantillon, que les histones du thymus sont en bon état.

PREPARATION DES NOYAUX

(en chambre froide 4°C, ou sur de la glace)

- Préparer les solutions d'homogénéisation (4 solutions en tout) cf. "solutions à préparer à l'avance"
- Thymus de veau (100 à 200g) congelé par petits morceaux à -80°C. On peut également utiliser un thymus frais non congelé commandé le jour même à l'abattoir.
- Couper le thymus de veau en morceaux en éliminant la membrane qui recouvre les lobes et le gras.
- mélanger les morceaux avec 500 ml de milieu d'homogénéisation préalablement refroidi à 0°C.
- Ajouter 1 ml d'octanol et 10 ml de PMSF (le PMSF inhibe les protéases du veau) 0.1 M dans de l'isopropanol.
- Attention: PMSF dangereux (porter des lunettes et un masque)**
- Homogénéiser 5 mn à vitesse moyenne (mixeur 15000) ; puis augmenter la vitesse (17000 tours/min).
- Filtrer l'homogénat à travers deux couches de gaze prélavées avec de l'eau distillée puis le milieu d'homogénéisation + PMSF 1 mM. Changer la gaze quand nécessaire.
- Centrifuger la solution dans de grand flacons (4 flacons en tout de 250 ml) 15 min, 1464 g (3000 tours/minute, rotor Sorvall GSA). Penser à équilibrer les pots
- Nettoyer les noyaux en les resuspendant deux fois dans 500 ml de Triton 0.5 % (détergent non ionique qui détruit les membranes cellulaires) dans le milieu d'homogénéisation + 1 mM PMSF (5 ml dans 1 litre de milieu d'homogénéisation). Remettre le culot en suspension en agitant (pas trop vigoureusement).
- Répéter cette opération deux fois avec du milieu d'homogénéisation contenant 2 mM CaCl₂ + 1 mM PMSF (1.2 ml de CaCl₂ 2 M pour 1.2 litre de milieu d'homogénéisation). (les ions calcium permettent d'activer la nucléase)
- Resuspendre le culot final dans 100 ml de la solution précédente ajustée à pH=8 (sans ajouter de PMSF).
- A chaque fois, se débarrasser du surnageant à l'aide d'une pipette.
- Préparer la solution "saline EDTA"

PREPARATION DE LA CHROMATINE

- Prééquilibrer la suspension de noyaux 10 min à 37°C. (dans le bain marie avec poids pour stabiliser le pot)
- Ajouter 5000 unités de nucléase de microcoque et incuber 30 minutes à 37°C avec agitation.
- Pour arrêter la digestion, placer le flacon dans de la glace et ajouter 1 ml d'EGTA 0.5 M (pH 8) + 1 mM PMSF. (l'EGTA chélate le calcium pour l'arrêt de la digestion)
- Mélanger puis centrifuger 15 minutes à 1464 G (3000 tours/min, GSA).
- Resuspendre le culot dans 200 ml de "Saline EDTA" (solubilisation de la chromatine acétylée?) en agitant doucement dans un homogénéiseur de virtis.
- Centrifuger 15 minutes à 1464 g (3000 tours/min, GSA).
 - * Resuspendre le culot dans 200 ml d'EDTA (solubilise la chromatine) 2 mM ajusté à pH = 6.5. Agiter avec un agitateur magnétique afin d'obtenir une solution homogène (minimum 15 minutes à 4°C) en chambre froide.
- Centrifuger 15 minutes à 16270 g (10000 tours/min., GSA).
- Collecter le surnageant qui contient la chromatine.*
- Répéter de * à * plusieurs fois en gardant les surnageants à chaque fois. Normalement 4 fois suffisent. Pour la dernière solubilisation, on peut continuer l'agitation pendant plus longtemps.
- Stocker au fur et à mesure les différents surnageant à 0°C en ajoutant du PMSF 1 mM (2mL pour 200mL).
- À chaque fois, vérifier la concentration en ADN du surnageant (mesure de la DO_{260nm} : diluer 100 fois le surnageant dans du SDS 1 % (blanc = SDS 1 %). DO₂₆₀ = 1 pour C_{ADN} = 50 µg/ml). S'arrêter quand la concentration en ADN devient < 0.5 mg/ml).
- Estimer la quantité d'ADN récupérée (remarque: la solution n'est ni pure ni homogène, cette quantité n'est pas exacte ; ne pas s'étonner si par la suite on a des écarts à cette estimation, même très fantaisistes).

EXTRACTION DES PROTEINES H1

(d'après la méthode de Libertini et Small)

- Diluer la chromatine dans EDTA 2 mM (pH 6.5) + PMSF 0.5 mM pour atteindre une concentration en ADN \approx 3 mg/ml.
- Mesurer le volume final de la solution et ajouter petit à petit un volume adéquat de NaCl 2 M pour atteindre une concentration finale en NaCl de 50 mM. (ajout avec agitation par un agitateur magnétique)
- Ajouter 12.3 à 13 mg de CM-Sephadex 50-120 (Sigma) sec par mg d'ADN.
- Mélanger doucement et laisser au moins 1 heure à 4°C (on peut s'arrêter là pour la nuit). Formation d'un gel de texture "purée"
- Filtrer sous vide (Büchner) : (trompe à eau, vide faible, attention aux retour d'eau dans le filtrat; en cas de contamination, jeter) :
 - maintenir les solutions et le gel à 0°C (sur de la glace)
 - filtrer à travers la toile (1 épaisseur, rincée à l'eau distillée puis la solution de rinçage du Séphadex).
- Conditions de rinçage et filtration: ajouter au mélange chromatine-Sephadex à filtrer 100 ml de solution de rinçage du Sephadex. Remuer et filtrer une première fois. Puis ajouter 100 à 150 ml de NaCl 0.6 M et continuer à filtrer.
 - filtrer ensuite sur deux épaisseurs de papier filtre Whatman GF/A Glass Microfibre sur Büchner. (tapisser le büchner avec deux couches de papier)
- Mesurer la quantité d'ADN récupérée (DO₂₆₀). Si cette quantité est trop faible, recommencer l'opération.
- Ajouter PMSF pour obtenir une concentration de 0.5 mM (**sauf si on fait le test et la digestion tout de suite après**).
- Vérifier la composition en histones de la chromatine par électrophorèse des protéines sur gel SDS (jamais de problèmes d'élimination des H1). **Vérifier surtout la qualité des histones du nucléosome.**

PREPARATION DE LA FRACTION "NUCLEOSOMES"*ATTENTION : Le PMSF inhibe légèrement l'action de l'enzyme. Ne pas en rajouter juste avant la digestion.*

- Ajouter 1/20ème de volume de Tris 200 mM, CaCl₂ 100 mM, pH = 8.

• Test de digestion enzymatique:

Déterminer le temps de digestion avec de la nucléase de microcoque (Pharmacia) pour obtenir une fraction de mono-nucléosomes. Si le temps de digestion est trop court, on a plus de di-, tri-, tétra-, etc.. nucléosomes et la longueur de l'ADN nucléosomal n'est pas en butée sur 146 pb (fragments plus longs). Si le temps est trop long, l'ADN du nucléosome commence à se dégrader.

Remarque: on n'obtient jamais de fraction "mono-nucléosomes" pure.

Penser à mettre le speed vac en marche et le bain marie à 37°C

- Diluer la quantité d'enzyme nécessaire à la digestion de toute la chromatine (45 unités d'enzyme pour 1 mg d'ADN) dans de l'eau distillée, à la concentration de 5000 ue/ml.

test conseillé : 2 concentrations en enzyme en parallèle rem: concentrations en enzymes plus élevées non encore testé systématiquement mais sembleraient être meilleures. Tests également à faire: effet de la concentration en chromatine ... à suivre

50 ue/mg	3'	6'	9'	12'	15'	20'	25'
25 ue/mg	5'	10'	15'	20'	25'	30'	(35')

- Déterminer quel volume **V** de la solution contient 200 µg d'ADN (utilisation d'un volume **V** par point).
- Stocker dans de la glace autant de tubes numérotés que l'on veut faire de points (plus un témoin), chaque tube contenant une volume **V** de TBE (x1), EGTA 10 mM (pour atteindre ensuite une concentration finale en EGTA de 5 mM).

Pour le test conseillé ci-dessus:

- Mettre au bain marie à 37°C deux tubes (1 par concentration en enzyme testée) contenant chacun 10 **V** de solution de chromatine (correspond à un peu plus que nécessaire pour être à l'aise en cas de raté).
- Ajouter la quantité d'enzyme nécessaire (100 ue = 20 µl pour le test à 50 ue/mg et 50 ue = 10 µl pour le test à 25 ue/µl) au temps $t = 0$, et vortexer.
- Prélever **1 V** à chaque temps test et le déposer dans un tube numéroté. Vortexer. Laisser dans la glace.
- Extraire l'ADN dans chacun des tubes (+ un tube témoin de chromatine non digérée):

- Ajouter 2 V de phenol (**attention: phenol dangereux, travailler sous hotte**). Vortexer et centrifuger 2 minutes dans la centrifugeuse de paillasse (11000 g). Récupérer le surnageant dans lequel se trouve l'ADN (phase du dessus), en évitant de prélever l'interface blanchâtre sur laquelle se trouvent les protéines.
 - Répéter l'opération avec du phénol : chloroforme-alcool isoamyl (1 : 1)
 - Idem chloroforme-alcool isoamyl (24 : 1)
 - Ajouter MgCl₂ afin d'obtenir une concentration finale de 10 mM et précipiter avec 2.5 x (2V) de EtOH 100 (-20°C). Laisser les tubes 15 minutes à - 20°C. Centrifuger 5 min. à 11000 g. Éliminer l'alcool et sécher les culots sous vide (speed-vac).
 - Dissoudre chaque culot dans 20 µl de TE (x1). Prélever 2 µl de cette solution pour l'électrophorèse.
- Électrophorèse de l'ADN des différents points test sur gel de polyacrylamide 7.5 %. Déterminer les conditions de digestion optimales.
 - Penser à préparer des membranes de cellule Amicon pour le lendemain
 - Digérer ensuite la totalité de la chromatine dans les mêmes conditions. Équilibrer au préalable la solution 10 minutes à 37°C. Arrêter la réaction en ajoutant EGTA 0.5 M pour atteindre une concentration finale en EGTA 5 mM, et plonger le récipient dans de la glace. Ajouter PMSF pour obtenir une concentration de 1 mM.
 - Dialyser la solution 1 nuit à 4°C contre 10 litres (au moins) de "tampon nucléosome" (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6) + 1 mM PMSF.
 - Centrifuger la solution à 11000 g 15 minutes. Récupérer le surnageant. La fraction précipitée (culot) peut être éliminée (très minoritaire et enrichie en di-nucléosomes par rapport à la solution mère).
 - Concentrer la solution par ultrafiltration à travers une membrane poreuse (Amicon YM 100) et sous pression d'azote (2 bars) dans une cellule à agitation (Amicon 8050), jusqu'à obtenir une concentration en nucléosomes de l'ordre de 30-45 mg/ml (15-22.5 mg/ml d'ADN). La solution obtenue est légèrement translucide mais reste aussi fluide que les solutions plus diluées.
 - Prélever la quantité de solution à déposer sur colonne. Mettre le reste de la solution à concentrer pour la journée dans une cellule Amicon et éventuellement : *rediluer le soir dans du tampon nucléosome + PMSF 0.5 mM. Prélever la solution de nucléosomes à déposer le lendemain sur la colonne. De cette façon, on laisse la concentration en isopropanol (solvant du PMSF) constante. Répéter cette opération chaque jour.*
- ATTENTION** : utilisation des membranes AMICON YM100. Les membranes de cellulose sont très aimées par les bactéries et se contaminent vite. Le soir après utilisation de la cellule à concentration, rincer la cellule et sa membrane à l'eau distillée ; stocker dans EDTA 2 mM ou EtOH 20 % + EDTA 2 mM. Le lendemain, rincer et nettoyer en faisant passer un peu de tampon nucléosome dans la cellule avant une nouvelle utilisation. **Stériliser les membranes après 2-3 jours d'utilisation.**

PURIFICATION PAR GEL FILTRATION SUR SEPHACRYL S 300

Colonne de Sephacryl S 300 (Pharmacia) de 1 m de hauteur et 2,6 cm de diamètre (ou colonne Pharmacia 60/26 pré-coulée), préalablement équilibrée dans le "tampon nucléosome".

Tampon d'éluion: "tampon nucléosome" (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6).

Volume des fractions 2 à 2.5 ml.

Il faut une vingtaine de colonnes pour purifier la totalité de la solution de départ. On peut obtenir ainsi une quantité de mono-nucléosomes de l'ordre de 2 g.

- Dégazer la solution avant dépôt sur colonne.
- Déposer 7 ml de solution à la surface de la colonne. $V_{\text{dépôt}} = 30 \text{ ml/h}$ (position 5) (6 ml s'il s'agit d'une colonne 60/26 du commerce). Après le dépôt, faire pénétrer la solution dans le gel en éluant 10 minutes à 30-35 ml/h
- Éluer ensuite à 20-25 ml/h. (position 4)
- Déterminer le profil d'éluion par mesure de la DO_{260} (dilution 50 x)
- Vérifier la pureté de chaque fraction du pic principal par électrophorèse-retard sur gel de polyacrylamide 7.5 %.
- Regrouper les fraction correspondant aux mono-nucléosomes purs.
- Récupérer les fractions contenant des mono-nucléosomes + ε di-nucléosomes et les réinjecter dans la solution à purifier.
- Filtrer la solution (seringue 10 ml + filtre "bleu" 0.22 µm).
- Ajouter PMSF 0.1 mM
- Dialyser contre le tampon désiré (si différent du "tampon nucléosomes") + PMSF 0.1 mM. Changer le bain de dialyse (+ PMSF frais) tous les jours.
- Concentrer au maximum (environ 250-300 mg/ml) par ultrafiltration sous pression d'azote (comme décrit ci-dessus).

Annexes

(remarque: selon les besoins ultérieurs, on peut aussi faire dans un autre ordre (1) concentrer la solution obtenue en sortie de colonne, (2) diluer en fin de manip dans le tampon désiré, c = 2 à 3 mg/ml, (3) filtrer, (4) dialyser, (5) reconcentrer)

• **Stocker à 0°C** (dans la glace en chambre froide, donc se préoccuper de renouveler la glace). Se conserve plusieurs mois.

CARACTERISATION DES SOLUTIONS DE NUCLEOSOMES

- Vérification de la composition en histones par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide 15 % en présence de SDS.
- Vérification de la longueur de l'ADN des nucléosomes purifiés (146 bp) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7.5 % (après extraction de l'ADN au phenol-choroforme)
- Vérification de l'association ADN-histones par électrophorèse-retard sur gel de polyacrylamide 7.5 %.

Annexe II.2 Production et purification d'ADN 5S 146pb.

PREPARATION DES MILIEUX ET TRANSFORMATION DES BACTERIES

1 -Préparer le milieu TB ("Terrific Broth").

2 –Préparer des flacons de 2X TY stériles (100mL dans 500mL).

3 -Transformer le plasmide 5S avec HB101.

Cette opération prend en tout 1h30 environ. Le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline.

4 -Penser à préparer pour le lendemain 4 tubes **stériles** (tubes en verre ou Falcon 50mL) contenant 5mL de milieu 2X TY ainsi que des erlen 500mL contenant 100mL de 2X TY.

CULTURE DES BACTERIES

0 -Pendant les temps d'attente, on peut préparer des solutions pour le lendemain. (Acétate de potassium, lysis buffer, TE 10/50, TE 10/0.1)

1 -Très tôt le matin, retirer les boîtes de pétri de l'incubateur. On doit y observer des colonies. Aux 5mL de 2X TY contenus dans les 4 tubes stériles, ajouter 10µL d'ampicilline 50mg/mL. A l'aide d'une pince passée à la flamme et à l'éthanol, prendre quelques colonies à l'extrémité d'un cure-dents stérile et introduisez les dans le tube de culture.

2 –**Première pré-culture** : incuber 3 à 4 heures environ à 37 degrés sous agitation jusqu'à ce que les tubes soient turbides.

3 –**Deuxième pré-culture** : dans un erlen 500mL contenant 100mL de 2X TY stérile, ajouter 100µL d'ampicilline 50mg/mL. Verser le contenu des tubes dans cet erlen et incuber à nouveau à 37 degré pendant 1 à 2 heures. Il faut que la solution soit bien turbide. Les cure-dents peuvent tomber au fond de l'erlen.

4 -Dans les grands erlens (2L), sont ajoutés 20mL de 20X tampon phosphate ainsi que 1mL d'ampicilline 50mg/mL par erlen. Le contenu de l'erlen 500mL est réparti entre les grands erlens.

5 -Incuber 18 à 20 heures. On peut introduire deux pipettes stériles par erlen pour faciliter oxygénation et agitation du milieu. Le rendement est ainsi amélioré.

LYSE ALCALINE ET DIGESTION DE L'ARN.

1 -Récolte des cellules.

Le milieu de culture doit mousser et sent fort. La récolte des cellules doit impérativement être effectuée à température ambiante. Si cela n'est pas respecté, la lyse cellulaire sera incomplète.

On centrifuge en plusieurs fois à 7000 rpm, 20minutes. A chaque fois, il suffit de verser le surnageant. Les culots sont solides.

2 -Faire une solution de NaOH-SDS entre les centri.

3 -Régler la centrifugeuse sur 4 degrés à la fin de la récolte. Il ne faut pas congeler les culots à cette étape, cela diminue considérablement le rendement.

4 -Mettre l'acétate de potassium dans la glace.

5 -Ajouter 30mL de "lysis buffer" dans chaque pot. Resuspendre à la pipette 10mL. Cette opération prends du temps. La solution est verte-marron.

Le "lysis buffer", solution tamponnée de glucose, permet de lyser les bactéries. Cette opération doit être effectuée à température ambiante. Dans le cas contraire, la lyse s'effectue difficilement.

6 -Ajouter 60mL de NaOH-SDS dans chaque pot. Ajouter (très) vigoureusement jusqu'à ce qu'on ne voit plus de grumeaux. Laisser incuber 20 minutes dans la glace en remuant de temps en temps.

Le SDS dénature les membranes. Les protéines sont solubilisées et les acides nucléiques sont dénaturés à cause du pH très basique.

7 -Ajouter 105mL d'acétate de potassium (très froid). Remuer plus doucement en deux temps. (inversion des pots puis rotation). On observe la formation d'un précipité blanc. C'est l'ADN chromosomal. Incuber 20 minutes dans la glace.

La solution est neutralisée. Les grosses protéines, ARN et l'ADN bactérien précipitent alors que les plasmides sont renaturés et restent en solution.

8 - Centrifuger 9000rpm, 20 minutes à 4 degrés. Remarque : il faut bien vérifier que les joints de bouteilles soient bien placés.

9 -Retirer délicatement de la centrifugeuse et filtrer dans 2 éprouvettes de 2 litres sur "miracloth" (calbiochem). Le filtrat est jaune pâle.

10 -Ajouter 0.52V d'isopropanol dans 2 erlens de 2L. Agiter et attendre 15 minutes ou plus. *L'ADN précipite.*

11 -Centrifuger 25 minutes à TA, 9000rpm. Penser à remuer la solution avant de transvaser dans les pots à centri car l'ADN précipité est au fond.

Annexes

12 -Après avoir éliminé le surnageant, faire sécher à l'air libre 1 heures environ. Sécher les parois intérieures du pot avec un kimwipe. A l'aide d'une spatule mettre les culots dans deux tubes centrifugeuse 40mL.

13 -Ajouter 15mL de TE 10/50 puis resuspendre à la pipette. Penser à rincer les pots. C'est une opération un peu longue.

Le TE est concentré en EDTA (50mM) pour que ce dernier chélate les ions divalents susceptibles d'activer les nucléases indésirables, encore présentes en solution.

14 -Ajouter 120µL Rnase A (10mg/mL) et incubé à 37 degrés toute la nuit. On peut s'arrêter à cette étape et congeler les tubes aussi longtemps que l'on veut.

L'ARN est digéré en petits fragments.

ELIMINATION DES PROTEINES ET DE L'ARN.

1- Mettre les tubes plus du phénol à décongeler à 37 degrés (bain thermostaté).

2 -Répartir le contenu des deux tubes en 4 ou 6 et ajouter dans chaque TE10/50 pour doubler le volume.

Il ne faut pas hésiter à diluer la solution. Dans le cas où la concentration en ADN est trop élevée, le rendement obtenu est faible.

3-Extraire une première fois au phénol (10mL par tubes). Agiter, laisser reposer 5 minutes puis centrifuger 20 minutes à TA à 20000 rpm. Il faut éviter d'utiliser les joints des bouchons qui ne résistent pas aux solvants. Récupérer le surnageant grossièrement avec une pipette P5000 ou P1000. Introduire l'interface dans des petits tubes eppendorf et centrifuger une nouvelle fois pour être certain de tout récupérer.

Une membrane contenant essentiellement des protéines est observée au niveau de l'interface aqueuse/solvant. Elle ne doit pas être trop épaisse. Si tel est le cas, cela indique qu'il reste encore une grosse proportion d'ADN chromosomal en solution. Dans l'idéal, l'interface doit constituer une fine pellicule qui flotte à l'interface phénol-eau.

4 - Effectuer deux autres extractions au phénol.

Ces extractions au phénol successives éliminent les protéines. Au fur et à mesure des extractions, la pellicule protéique est de plus en plus réduite et disparaît.

Les extractions doivent être effectuées le plus soigneusement possible pour obtenir un rendement suffisant.

5 -Extraire une fois au CIA (24/1 chloroforme/isoamylalcool)

Le CIA élimine les traces de phénol en solution.

6 -Répartir également en deux tubes Falcon. Ajouter 1/5 du volume initial de NaCl 4M et 2/5 de PEG 6000 40%. Incuber 5 minutes à 37 degrés.

Les fragments d'ARN digérés la veille restent en solution alors que l'ADN plasmidique est précipité par le PEG 6000 à 10%.

7 - Mettre 30 minutes dans la glace. La solution doit être un peu jaunâtre.

8 -Centrifuger 20 minutes à 4 degrés à 5000rpm. Le plasmide précipite. On conserve le surnageant pour électrophorèse. On laisse sécher le culot la tête en bas sur des kimwipes.

9 - Si le volume initial était de 30mL, ajouter 15mL de TE 10/0.1 et redissoudre. (37 degré pendant une heure puis à la pipette).

10 -On remet la solution dans des petits tubes de centrifugation. On extrait deux fois au CIA. La première centrifugation dure 15 minutes à 15000 rpm, la deuxième 5 minutes à 15000 rpm.

Le CIA élimine le PEG.

11 -On ajoute 1/10 du volume final de NaAc 3M (ex 1.66mL pour 15mL) et 2.5 fois le volume d'éthanol froid (-20 degrés) pour précipiter l'ADN et on laisse une nuit ou plus à -20 degrés.

On observe un précipité immédiatement après l'ajout d'ADN. L'ajout de sel (NaAc) permet de faciliter la précipitation de l'ADN plasmidique.

DIGESTION EN FRAGMENTS DE 146 PAIRES DE BASES.

1 -centrifugation 20 minutes à 4 degré à 5400rpm.

2 -On ajoute au culot 10mL de TE 10/0.1 et on le resuspend par bain thermostaté à 37 degré puis à la pipette.

3 -Evaluation de la concentration (DO)

4 -Gels agarose 1% dans TAE pour le plasmide et le surnageant de la PEG-précipitation. Migration pendant une heure à 100 volts.

On vérifie ici, que le surnageant conservé de la précipitation au PEG ne contient pas d'ADN plasmidique.

5 - digestion d'un aliquot.

Ce test n'est pas quantitatif, il permet uniquement de voir si le tampon de digestion utilisé est bon. L'enzyme est ici en large excès.

On mélange 8µL d'eau stérile, 1µL de tampon *10, 0.5µL de plasmide et 0.5µL d'enzyme. On incube une heure à 37 degrés puis le tube est mis dans la glace.

Annexes

On vérifie l'efficacité de cette digestion à l'aide d'un gel acrylamide 10%.

6 -Si c'est satisfaisant, on peut digérer la totalité de l'échantillon dans les conditions suivantes:

- La concentration en plasmide est de 1mg/mL
- DTT 1mM
- Eco RV (1mg d'un plasmide de 16 copies a 7.86 nmoles de ecoRV sites=236 U
- Tampon Eco RV (50mM Tris HCl, pH 8, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂)

L'incubation doit durer au moins 15 heures (une nuit) à 37°C.

ELIMINATION DE L'ADN PLASMIDIQUE LINEARISE.

1 - On **vérifie que la digestion est totale** sur gel agarose 1% ainsi que sur gel d'acrylamide 10%. Si la digestion n'est pas totale on observe un "ladder" de bandes au lieu de deux bandes correspondantes au reste du plasmide ainsi qu'au 146 pb.

Il faut alors rajouter la moitié de la quantité d'enzyme initiale et incuber une nouvelle fois au moins 15 heures à 37 degrés.

2 -Si la digestion est complète on peg-précipite le restant du plamide en conservant en solution le 146pb.

Pour cela, on ajoute 0.192 volume de NaCl 4M et 0.346 volume de peg 6000 40%. *Attention, il faut être précis car c'est une étape cruciale.* Incuber une heure dans la glace puis centrifuger 20 minutes à 4 degrés à 15000 rpm.

Le PEG 6000, à 6%, précipite le plasmide linéarisé long (plus de 2700 pb). Les fragments courts d'ADN 146pb restent dans le surnageant.

3. Précipiter l'ADN du surnageant avec 2.5 volumes d'éthanol à -20 degrés. On ne voit pas ici, l'ADN précipiter. On laisse une ou plusieurs heures à -20°C puis on centrifuge à 4000rpm à 4 degrés pendant 20 minutes. Le culot est redissous dans 5mL de TE 10/0.1. puis on évalue la quantité d'ADN obtenue.

4 – On vérifie le contenu des culots et surnageant après précipitation au PEG 6000 6%. On fait migrer sur gel le surnageant ainsi que le culot de la précipitation au peg.

Habituellement, le surnageant contient exclusivement les fragments courts d'ADN alors que le culot renferme le plasmide linéarisé ainsi qu'une très faible proportion d'ADN 146 paires de bases.

PURIFICATION

Purification sur colonne échangeuse d'ions DEAE 5PW.

1 -La colonne est équilibrée de la manière suivante :

- un volume de colonne de tampon A (100mM NaCl, 10mM Tris-HCL pH 7.5, 1mM EDTA).
- un volume de colonne de tampon B (1M NaCl, 10mM Tris-HCL pH 7.5, 1mM EDTA).
- un volume de colonne de tampon A.
- un volume de colonne de tampon à 28% de B et 72% de A.

L'échantillon est injecté par une boucle d'injection de volume adapté (5mL). L'élution s'effectue à 4mL/minutes.

2 -On choisit un programme où on élue :

- à 28% en B et 72% en A pendant un volume de colonne.
- en appliquant un gradient de 28 à 38% en B pendant 5 volume de colonne.

3 -Après analyse sur gel de polyacrylamide à 10%, les fractions contenant l'ADN 5S de 146 paires de bases sont précipités à l'éthanol.

4 –Le culot d'ADN centrifugé est resuspendu dans du TE (quelques centaines de microlitres). La quantité d'ADN obtenu est évaluée. L'aliquote est conservé à -20°C.

Annexes

Solutions à préparer :

- Milieu TB (6 litres ie 12 erlens contenant 500mL) **A faire la veille de la culture**

- 72g de tryptone
- 144g d'extrait de levure
- 30mL glycérol

Diluer le tout dans 2.85 litres d'eau pour obtenir une solution deux fois concentrée.

Ajouter dans chaque erlen 238mL H₂O et 238mL de TB deux fois concentré.

Boucher le tout (bouchon coton recouvert d'aluminium)

Stériliser 20 minutes à 121 degrés à l'autoclave

- Milieu 2X TY (1 litre) **A faire à l'avance**

- 16g tryptone
- 10g extrait de levure
- 5g NaCl

Autoclaver 20 minutes à 121 degrés

Il faut en avoir dans une bouteille qu'on peut restériliser de temps en temps et préparer des flacons de 500mL pour les cultures pour en avoir d'avance.

- tampon phosphate 20X (1 litre) **A faire à l'avance**

- 46.28g KH₂PO₄
- 250.84g K₂HPO₄

- Lysis buffer (1litre) Pas besoin de préparer à l'avance

- 9.9g glucose (ajouter doucement)
- 25mL 1M Tris-HCL pH8
- 20mL EDTA 0.5M

- acétate de potassium (1 litre) préparer la veille (2litres) **a faire sous la hotte**

- 115mL acide acétique glacial (2M)
- 393g acétate de potassium (4M)

L'acétate de potassium est à conserver au frigo.

- TE 10/50 (150mL) **Préparer à l'avance**

- 1.5mL 1M Tris-HCl pH8 (10mM)
- 15mL 0.5M EDTA (50mM)
- qsp 150mL H₂O

Autoclaver

- TE 10/0.1 (150mL) **Préparer à l'avance**

- 1.5mL 1M Tris-HCl pH8 (10mM)
- 30µL 0.5M EDTA
- qsp 150mL H₂O

- NaOH-SDS (1 litre) A faire pendant la récolte des cellules

- 10g SDS poudre (pesé au masque puis dissous dans l'eau chaude) ou SDS liquide pour une quté finale de 1% w/v

- 8g NaOH

tampon A (X10)

- 200mL Tris 1M pH 7.5
- 2mL 0.5M EDTA
- 58g NaCl

Filtrer avant utilisation

Faire quelques jours avant

-tampon B (X5)

- 100mL 1M Tris-HCl pH 7.5
- 1mL 0.5M EDTA
- 292.2g NaCl

Filtrer avant utilisation

Faire quelques jours avant

Annexe II.3 Production et purification d'histones recombinantes.**Production d'histones et traitement des corps d'inclusion**TRANSFORMATION DES BACTERIES ET PREPARATION DES MILIEUX

- 1 -Préparation des solutions suivantes : (si elles ne sont pas encore faites)
- "Inclusion wash buffer +"
 - "Inclusion wash buffer -"
 - milieu LB (Lennox L Broth) (500mL pour erlen 2L)
 - milieu 2X TY (100mL dans erlen 500 plus solution)
 - ampicilline à 50mg/mL
 - Chloroamphénicol à 25mg/mL dans éthanol
 - IPTG 0.4M
- 2 -Transformer les bactéries BDPs (BL21(DE3)pLys S) par le plasmide codant pour (les) l'histone choisie(s) sur une(des) boîte(s) de pétri contenant à la fois AMP (ampicilline) et CAMP (chloroamphénicol).
Le plasmide est résistant à l'ampicilline et les cellules BDPs au chloroamphénicol.
- 3 -Préparer des tubes de culture pour le lendemain :
- 5mL 2X TY
 - 25µL glucose 20%
 - 5µL Chloroamphénicol
 - 10µL ampicilline
- Il faut 4 tubes par histones.
Dans notre cas, on ne peut préparer qu'un type d'histone à la fois à cause de la capacité de l'incubateur.

CULTURE DES BACTERIES

Il faut arriver très tôt!!! (pas après 7 heures, c'est plutôt mieux)

- 1 –**Première pré-culture** : Inoculer les tubes contenant 5mL de milieu avec une colonie des boîtes de pétri. Mettre les tubes à 37 degrés dans l'incubateur.
- 2 –Ajouter aux milieux de culture :

	5mL 2X TY	100 mL 2X TY	500mL LB
Glucose 20%	25µL	500µL	2.5mL
Chloroamphénicol 25 mg/mL	5µL	100µL	0.5mL
Ampicilline 50 mg/mL	10µL	200µL	1mL

3 –**Deuxième pré-culture** : Quand le contenu des tubes de 20mL est turbide (typiquement après 2 à 3 heures), on transvase dans un erlen 500mL (contenant 2X TY).

4 –**Culture** : **Lorsque le contenu de l'erien devient turbide, on répartit son contenu équitablement dans les grands erlens.**

5 –Commencer à évaluer des DO à 600nm (visible) après deux heures de culture. On prend du 2X TY comme référence. La croissance bactérienne est exponentielle. On peut prendre des DO tous les quart d'heures sur 3 des erlens, par exemple.

Penser à décongeler l'IPTG. (à garder dans la glace)

6 –**Induction** : Lorsque la DO atteint 0.4 à 0.6 ajouter 0.5mL d'IPTG par erlens.

Mettre la centri sur 4°C.

La production des protéines doit être initiée au cours de la phase exponentielle de croissance des bactéries.

7 –**Récolte des cellules** : Après 2 heures –2H30, centrifuger 30 minutes à 4500 rpm, à 4°C.

rem : le culot est petit mais il ne faut pas s'en inquiéter.

8 –**Resuspendre les culots dans 5mL de "wash buffer – " + βme. Transférer la solution dans des tubes falcons 50mL (attention pas plus de 35 mL par tubes)**

Congeler à l'azote liquide et mettre à -20 degrés pour le lendemain.

On peut recommencer ici les opérations précédentes pour les autres types d'histones.

TRAITEMENT DES CORPS D'INCLUSION

1 –En arrivant le matin, mettre la centri sur 4°C, couler un gel 18% pour faire une électrophorèse des protéines, aller chercher de la glace.

Annexes

2 –**Lyse des bactéries** : Faire fondre la préparation d'histones au bain marie à 37°C. Il faut que la consistance soit gluante. Si cela n'est pas le cas, on peut être certain que la lyse des cellules est incomplète. Pour lyser les cellules, on incube alors la préparation une demi-heure avec du lysozyme à 1mg/mL.

Cette lyse bactérienne est induite par la présence d'un plasmide codant pour le lysozyme du phage T7 contenu dans les bactéries elles-mêmes lors du processus de congélation-décongélation. De ce fait, il n'est normalement pas nécessaire d'introduire de lysozyme pour ce premier traitement.

3 –**Homogénéisation** : On "mixe" alors la préparation en plusieurs fois afin d'éviter de chauffer les échantillons. La préparation doit devenir plus fluide. On peut le vérifier à la pipette pasteur.

PS : Un "tissumizer" est utilisé usuellement mais nous utilisons un mixer classique.

Il faut veiller à ce que la préparation soit conservée la plupart du temps à 4°C.

4 –Transvaser le tout dans un pot de centri de 250mL. Veillez à tout garder dans la glace. Mettre 20µL de la préparation de côté dans un ep que l'on note **0**.

5 –Centrifuger 20 minutes à 4°C à 10 000 rpm. Conserver le surnageant dans un bécher et en conserver 20µL dans un autre ep noté **T1**.

Resuspendre le culot à la pipette 10mL avec 75 mL de wash buffer +.

6 –Centrifuger une nouvelle fois 20 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Conserver le surnageant dans le même bécher et en conserver 20µL dans un ep noté **T2**.

Resuspendre une nouvelle fois le culot dans 75mL de wash buffer +.

Rem : Le culot blanchit.

7 -Centrifuger une nouvelle fois 20 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Conserver le surnageant dans le même bécher et en conserver 20µL dans un eppendorf noté **W1**.

Resuspendre le culot dans 75mL de wash buffer -.

8 –Centrifuger une nouvelle fois 20 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Conserver le surnageant dans le même bécher et en conserver 20µL dans un eppendorf noté **W2**.

Resuspendre une nouvelle fois le culot dans 75mL de wash buffer – et conserver 20µL de la solution resuspendue dans un eppendorf noté **F**.

Recentrifuger et congeler le culot à –20°C. Il peut rester congeler aussi longtemps que l'on veut.

9 –Vérifier sur un gel de protéine à 18% qu'il n'y a pas d'histones dans les différents surnageants afin de pouvoir s'en séparer.

Rem : Au fur et à mesure des centrifugations le culot est de plus en plus petit.

Purification des histones

PURIFICATION SUR COLONNE D'EXCLUSION DE TAILLE

On équilibre la colonne la veille. L'équilibration a lieu toute la nuit. On prépare du SAUDE 200 (2L). Le volume de colonne est approximativement de 1.8 litres.

Il faut veiller à ce qu'il reste du SAUDE 200 lorsqu'on arrive le lendemain matin. On calcule le débit à cet effet. (ex : 2.5mL/minutes)

On peut équilibrer à la pompe péristaltique.

En arrivant, le lendemain matin on peut diminuer le débit de la pompe et refaire du SAUDE 200.

1 –Dans le pot contenant les histones, ajouter un mL de DMSO afin que celui-ci recouvre entièrement la surface des culots. On peut pencher les pot si nécessaire et laisser ainsi pendant une demi-heure jusqu'à ce que le culot soit décongelé.

2 –Faire de l'"unfolding buffer". **On ne doit pas le préparer à l'avance.**

Ajouter 20mL d'"unfolding buffer". Le mélange doit présenter un aspect granulaire. Agiter **très doucement** une heure ou plus.

Ce tampon solubilise les corps d'inclusion.

3 –Changer les tuyaux sur le purifier (1mm au lieu de 0.5)

4 –Centrifuger 10 minutes à 14 000rpm à 4 degrés dans des tubes 30mL de centrifugation. Rincer le pot de 250mL avec 10mL d'"unfolding buffer".

5 –Resuspendre le culot dans les 10 mL d'"unfolding buffer" de rinçage et centrifuger 10 à minutes à 14 000rpm. On conserve le surnageant dans la glace.

6 –Rassembler les surnageants. Déposer l'échantillon à la pompe péristaltique à 3mL par minutes. Pour éviter de perdre du matériel, lorsque le récipient est quasiment vide, rajouter un peu de SAUDE 200.

Annexes

7- On élue à 3mL/min après avoir connecté la colonne au FPLC. La taille des fractions récupérées est de 12mL. On peut redéposer une autre histone et l'éluer dans la journée.

8-Faire une électrophorèse des protéines sur gel 18% pour sélectionner les fractions que l'on conserve. Il faut éviter de laisser les protéines trop longtemps dans l'urée. On peut décider soit de purifier sur TSK immédiatement, soit de dialyser et lyophiliser.

9-Lorsqu'on n'utilise plus la colonne, rincer les pompes à l'eau et remettre la colonne dans l'eau. La colonne est ensuite conservée dans l'éthanol 20%. Lorsque la colonne est remise dans l'éthanol, il faut veiller à réduire le débit (0.5mL/minutes maximum) afin de préserver le Séphacryl S 200.

PURIFICATION SUR COLONNE ECHANGEUSE DE CATIONS

1 –Refaire du SAUDE 200 et du SAUDE 1000.

2 –Equilibrer la colonne échangeuse de cations TSK. Pour cela, faire passer un volume de colonne de SAUDE 200 à 10mL/minutes, un volume de SAUDE 1000 à 10mL/minutes puis du SAUDE 200 jusqu'à ce que la conductivité rediminue.

3 – Déposer l'échantillon sur la colonne à 6.4 mL/minutes au moins. Penser à récupérer ce qui sort dans un flacon propre.

4 –On élue alors à 10mL/minutes pour un gradient de SAUDE 1000 évoluant de 0% à 60% en 2.5 volumes de colonne.

5 –Les fractions pures sont conservées. On évalue également la concentration et les quantités produites.

6 –La colonne doit être remise dans l'eau aussitôt après son utilisation. Elle ne peut être conservée sans dommages dans une solution ionique. Elle peut être conservée dans l'éthanol 20%.

7 –L'échantillon est dialysé dans l'eau (3.5 litres eau plus 250µL βme). Le bain de dialyse est changé deux fois. (sur deux jours).

8 –lyophiliser

9 –Aliquoter

10 –Les histones lyophilisées se conservent à –20°C.

Remarques :

- Il est possible, dans la journée d'effectuer les deux purifications. La colonne échangeuse d'ions doit être équilibrée au cours de la première purification.
- Afin d'optimiser son temps, on peut exprimer plusieurs histones et les purifier au cours de la semaine.

Solutions à préparer :

-wash buffer - + βme

-100mL wash buffer –

-7µL βme

-Inclusion wash buffer + (1 litre) Ne pas préparer à l'avance

-5.84g NaCl

-0.16g benzamide

-10mL triton X-100

-50mL Tris-HCl pH 7.5

-2mL EDTA pH8 0.5M

-Inclusion wash buffer - (1 litre) Ne pas préparer à l'avance

Même chose que plus haut sans le triton.

-milieu LB (pour 1 litre) 6litres par histone. Ne pas faire en avance.

-16g tryptone

-10g yeast extract

-5g NaCl

Passer à l'autoclave 20 minutes à 121 degrés. Les erlens sont boucjhés par un bouchon de coton et recouvert d'aluminium.

-2X TY (1 litre)

-10g tryptone

-5g yeast extract

- 8g NaCl

-Ampicilline 50mg/mL

Peser 2.5g d'ampicilline à dissoudre dans l'eau pour un total de 50mL. Filtrer à 0.2µm. Faire des aliquots dans des ép. Conserver la plus grande partie dans un Falcon. Mettre à -20 degrés.

-Chloroamphénicol 25 mg/mL

Peser 1.25g de chloroamphénicol à dissoudre dans 50mL d'éthanol. Filtrer à 0.2µm.

Faire des aliquots dans des ép. Conserver la plus grande partie dans un Falcon. Mettre à -20 degrés

Annexes

IPTG 0.4M dans leau

Peser, filtrer, aliquoter et conserver à -20 degrés.

SAUDE 200

Il faut deux agitateurs. (un agitateur chauffant et l'autre non).

- Urée 840.84 g.

On dissout en chauffant dans 1.5L. Il faut éviter de trop chauffer. Sinon, on sent une odeur anormale d'ammoniaque.

Lorsque la totalité est presque dissoute, on utilise un agitateur non chauffant.

On ajoute une cuillère bombée de dowex et on agite 5 minutes. Ainsi l'urée est déionisée. La solution est filtrée sur Miracloth.

On ajoute alors :

- 13.33 mL NaAc 3M
- 23.376g NaCl
- 694 μ L β me
- 4mL 0.5M EDTA

On complète à 2L. On filtre sur filtre 0.45 μ m.

SAUDE 1000

Le SAUDE 1000 est identique au SAUDE 200 à la différence près que la concentration en NaCl est, cette fois de 1M.

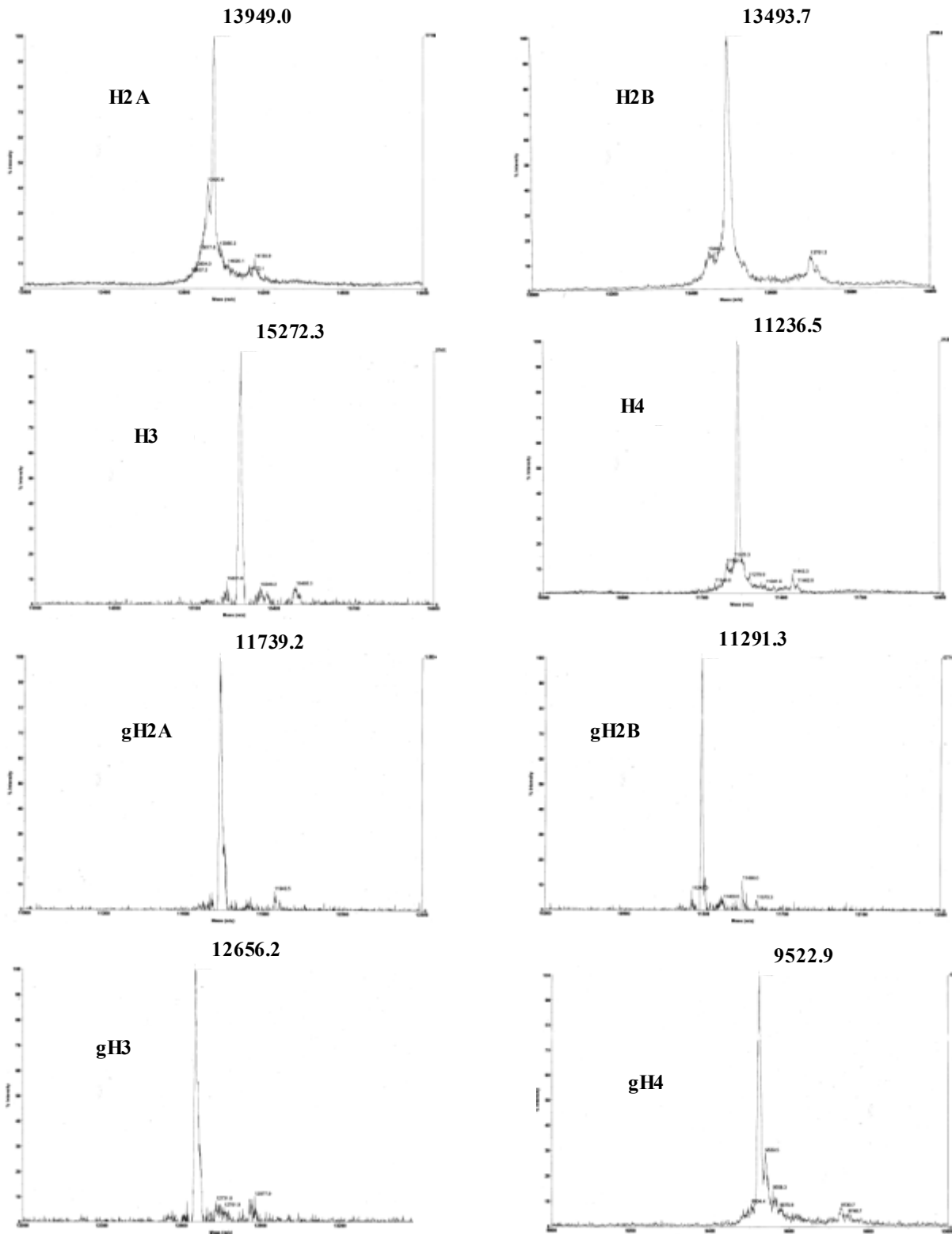
Unfolding buffer

- guanidinium 14.33g
- 1M Tris pH 7.5 0.5mL
- DTT 19mg

Qsp 25mL

Annexe II.4 Spectres de masses des histones produites.

Les spectres de masse ci-dessous ont été obtenus dans le laboratoire de Pierre le Maréchal à l'IBBMC (Orsay) par une méthode de MALDI ("Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization")-TOF ("Time On flight").



Annexe IV.1 Notions de microscopie et de cryomicroscopie électronique en transmission.

a Notions de microscopie électronique en transmission.

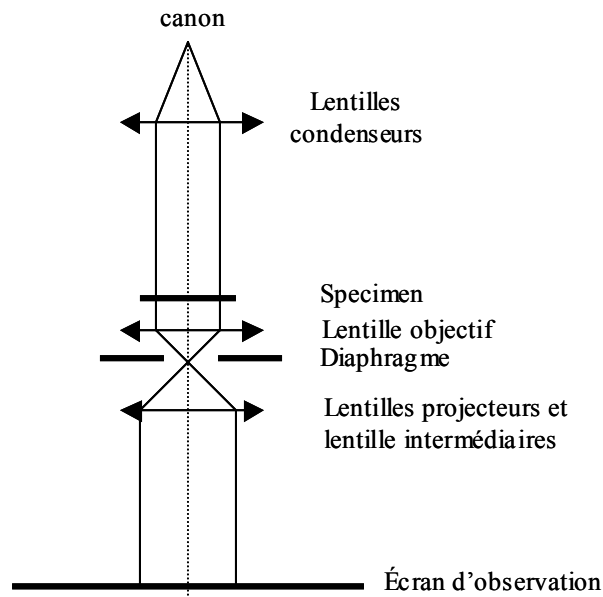
Au cours de ma thèse, trois microscope ont été utilisés. Pour obtenir les images de NCPs isolées nous avons utilisé un microscope JEOL 2010 F équipé d'un canon à émission de champ et un microscope 100kV à filament de tungstène (CM12, Philips) situé à l'institut Pasteur. Les images d'agrégats de NCPs commentées dans le chapitre VI ont été collectées sur le microscope JEOL 2011 LaB6 200kV du laboratoire, à Orsay.

Présentation du microscope électronique à transmission

Une description simplifiée du microscope électronique à transmission est schématisée sur la figure ci-dessous.

Les électrons sont émis par un canon. Deux procédés distincts sont utilisés pour l'émission des électrons. Dans les cas de canons thermoélectroniques, le chauffage de matériaux réfractaires (1800K pour le LaB6) permet d'apporter l'énergie nécessaire à la libération d'électrons du solide. Ces électrons sont ensuite accélérés par une anode. Les électrons peuvent également être émis par des canons à émission de champ (dits "FEG"). Les électrons y sont émis par effet tunnel sous la contrainte d'un champ électrique intense. Ces canons ont l'avantage d'émettre des électrons plus cohérents, plus monochromatiques et de produire un flux d'électrons, une brillance bien plus élevés.

La trajectoire des électrons est ensuite contrôlée par un dispositif de lentilles magnétiques. Ces lentilles imposent une trajectoire hélicoïdale aux électrons qui se propagent dans une colonne sous vide. Le vide est typiquement compris entre 10^{-5} - 10^{-10} pascals. En optique géométrique, la distance focale des lentilles est fixe alors que celle des lentilles magnétiques a l'avantage d'être variable. En effet, cette distance focale est dépendante du courant qui alimente les bobines magnétiques des lentilles. Pour décrire la trajectoire des électrons et schématiser les lentilles d'un microscope électronique, la représentation utilisée en optique géométrique est utilisée.



Description schématique du microscope électronique.

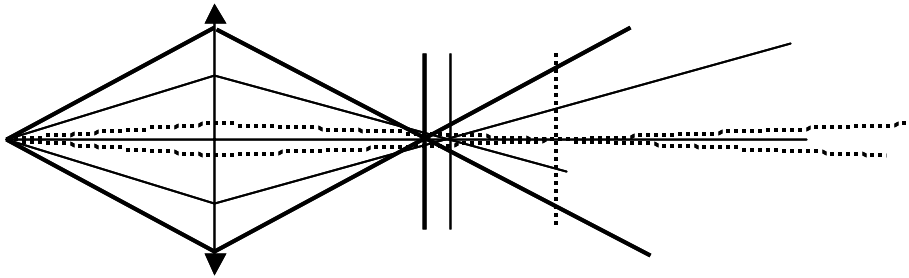
Une première série de lentilles condenseurs conditionnent le faisceau d'électrons et permettent de contrôler les conditions d'éclairage du specimen. La lentille objectif présente une courte distance focale de 1 à 3mm. Ses caractéristiques déterminent la qualité du microscope. Pour disposer de lentilles objectif très focalisantes, le champ magnétique est confiné dans un espace réduit délimité par l'entrefer d'une pièce polaire en fer doux d'un électro-aimant. L'échantillon ou specimen est situé entre les pièces polaires de la lentille objectif. Dans le plan focal image de la lentille objectif, un diaphragme permet d'augmenter le contraste. Des lentilles projecteurs et intermédiaires projettent l'image du specimen ou de sa transformée de Fourier, l'image de la diffraction sur un écran d'observation.

Résolution et aberrations

La résolution d'un microscope est limitée par la diffraction. L'image d'un point par une lentille consiste en une tâche circulaire entourée d'anneaux moins lumineux. Cette tâche "d'Airy" limite le pouvoir de résolution à $\frac{0.61\lambda}{n\sin\alpha}$ où λ est la longueur d'onde, n est l'indice de réfraction du milieu et α est l'angle d'ouverture du microscope.

La résolution est donc d'autant meilleure que la longueur d'onde est faible. Pour un microscope optique dont la longueur d'onde est de l'ordre de 500nm (visible) et en considérant $n \sin\alpha$ proche de 1, la résolution maximale est limitée à 0.3 μ m. La longueur d'onde des électrons dans un microscope électronique dépend de la tension d'accélération des électrons. Pour un microscope dont la tension s'élève à 200kV, la longueur d'onde correspondante vaut 2.5.10⁻¹²m. Ainsi, en théorie, un microscope électronique peut aisément atteindre des résolution subatomiques.

Cependant la résolution se trouve limitée par différents types d'aberrations. L'aberration sphérique, caractérisée par une constante C_s , de la lentille objectif est la principale cause de limitation de résolution des microscopes. Les électrons passant près du centre de la lentille sont moins déviés de leur trajectoire que ceux qui se propagent en périphérie. Par conséquent, d'un objet ponctuel résulte une série de trajectoires électroniques coniques qui ne sont pas focalisées dans un unique plan image.



Aberration sphérique. Les rayons marginaux convergent plus rapidement que les rayons para-axiaux.

Par ailleurs, les faisceaux d'électrons ne sont jamais parfaitement monochromatiques et induisent des aberrations chromatiques caractérisées par une constante C_c . Deux électrons de longueurs d'onde légèrement différentes provenant d'un même point objet ne focalisent, en effet, pas dans le même plan image. Enfin, des défauts dans la symétrie de révolution des lentilles introduisent des aberrations d'ellipticité ou astigmatisme qui peuvent être corrigées en équilibrant les courants passant dans les lentilles magnétiques. Les constantes C_s et C_c sont respectivement égales à 2mm et 2.1mm pour le microscope JEOL 2010 Feg que nous avons utilisé.

b. Cryomicroscopie électronique

Obtention de contraste, formation d'images

Dans un microscope électronique, le contraste peut avoir différentes origines. Le contraste d'amplitude est lié à des différences de densité et d'épaisseur dans le spécimen. La diffusion et l'angle de diffusion des électrons dans un échantillon dépend de l'épaisseur des échantillons et de sa composition atomique. L'ajout d'un diaphragme de contraste dans le plan focal image de l'objectif permet d'éliminer la fraction d'électrons dont l'angle de diffusion est élevé, c'est-à-dire des éléments plus denses. Ainsi, on obtient une image où seule la contribution des éléments plus légers est observée.

En cryo-microscopie électronique, les échantillons biologiques ne sont composés que d'éléments légers dont les noyaux interagissent peu avec les électrons. En outre, l'eau vitrifiée introduit un bruit de fond supplémentaire. Le contraste d'amplitude apporte donc une faible contribution au contraste total. Pour les objets biologiques, le contraste de phase est prépondérant. Le contraste de phase provient d'interférences d'ondes diffractées par l'échantillon. Ces décalages de phases et interférences résultent des aberrations de la lentille objectif mais également de défocalisations Δz entre le plan de l'échantillon et le plan conjugué par la lentille objectif du plan focal image. Le contraste est caractérisé par une fonction de transfert de contraste, caractéristique et spécifique d'un microscope. Cette fonction "CTF" ("Correlation Transfer Function") représente le contraste en fonction des fréquences spatiales ν dans l'échantillon :

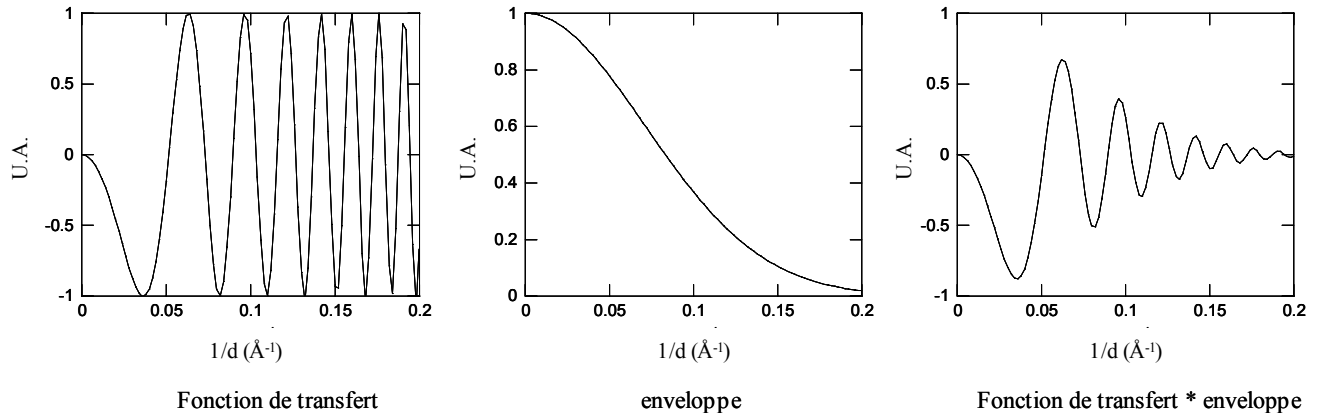
$$CTF(\nu) = 2 [(1-W) \sin\gamma - W \cos\gamma] \text{ avec } \gamma = 2\pi (0.25 \nu^4 C_s \lambda^3 - 0.5 \lambda \Delta z \nu^2).$$

W est le pourcentage de la contribution du contraste d'amplitude par rapport au contraste de phase. C_s est le coefficient d'aberration sphérique. Δz caractérise la défocalisation et λ la longueur d'onde des électrons. Dans une configuration où la défocalisation est nulle, seules les aberrations du microscope sont sources de contraste. La fonction de transfert de contraste oscille entre des valeurs positives et négatives (cf. Figure IV.3). Dans certaines conditions, le contraste peut être nul ou inversé. En outre, la fonction de transfert est multipliée par une fonction d'enveloppe qui amortit le contraste pour les fréquences spatiales élevées. En pratique, la sous focalisation optimale

Annexes

Δz est celle pour laquelle on obtient la plus large bande de fréquence spatiale à contraste stable. Dans l'hypothèse où une fréquence spatiale caractéristique des particules étudiées est connue, on cherche une sous focalisation telle que le contraste atteigne un *extremum* pour cette fréquence particulière. Les fonctions de transfert de contraste peuvent être calculées à l'aide du site internet : <http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/wen/ctf>.

La figure ci-dessous représente la fonction de transfert ainsi que son enveloppe calculée pour une sous focalisation de 1500nm et un microscope JEOL 2010 200kV dont les constantes C_s et C_c sont respectivement égales à 2mm et 2.1mm.



La fonction de transfert d'un microscope représente le contraste de phase en fonction des fréquences spatiales dans l'échantillon. La fonction de transfert d'un microscope électronique est multipliée par une fonction enveloppe qui induit un amortissement de la CTF. Ces fonctions ont été calculées à l'aide du site internet : <http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/wen/ctf>.

Particularités des microscope utilisés pour la cryo-microscopie.

Les microscopes électroniques destinés à la cryo-microscopie bénéficie d'un équipement particulier. Tout d'abord, le porte échantillon est équipé d'un Dewar permettant de conserver l'échantillon à une température de -180°C , environ. La pièce polaire qui entoure lentille objectif et échantillon est refroidie à la température de l'azote liquide. La pièce polaire refroidie est utilisée comme piège d'impuretés afin d'éviter toute contamination du spécimen.

Les échantillons biologiques vitrifiés sont très sensibles au faisceau d'électrons. Les microscopes consacré à la cryo-microscopie sont équipés de systèmes qui contrôlent et limitent les doses d'électrons reçues afin d'éviter tout échauffement et détérioration des spécimens. Les microscopes JEOL que nous avons utilisés sont équipés d'un système particulier appelé MDS ("Minimum Dose System") qui minimise l'irradiation des échantillons. Le principe de préparation des échantillons en film mince est décrit dans le chapitre IV (§B.1).

Quelques notions sur le principe de reconstruction d'images de particules isolées

Les images obtenues par cryomicroscopie électronique en films minces représentent les particules suivant des projections à deux dimensions. A partir des ces différentes projections, un modèle à trois dimensions des particules est établi. Le processus de reconstruction de ce volume est itératif et s'effectue suivant une méthode particulière. Deux logiciels sont couramment utilisés pour la reconstruction d'images de particules isolées : SPIDER et IMAGIC.

Après l'acquisition de données et leur numérisation, une première étape consiste à sélectionner les particules de manière pertinente au sein des images. Il s'agit de distinguer chaque particule, de manière individuelle, du bruit ou des contaminations présentes dans l'image. Ce processus est plus ou moins automatisé par différents algorithmes mais la pertinence de la sélection doit être vérifiée manuellement. Plusieurs milliers de particules ainsi sélectionnées et constituant des images individuelles sont nécessaires au processus de reconstruction d'images.

Les particules sont ensuite alignées les unes par rapport aux autres. Elles sont à la fois centrée par translation et disposées suivant la même direction à l'aide de fonctions de corrélation croisées.

Une classification des particules est alors effectuée suivant leur orientation par rapport à l'observateur. Les particules qui sont disposées en présentant la même face sont catégorisées suivant une classe particulière. Ces différentes classes résultent des différentes orientations possibles des particules dans le film mince du specimen. Plus le nombre de classes est élevée, plus la résolution du volume final sera satisfaisant. Plusieurs orientations peuvent

Annexes

être obtenues en faisant des acquisitions sur un même zone de l'échantillon, en inclinant le porte objet d'un angle donné entre chaque prise d'image.

En déterminant l'orientation relative des différentes classes de particules dans l'espace, un modèle à trois dimensions peut être établi. Ce modèle est affiné. A partir d'un volume préliminaire, le processus de reconstruction est repris à l'étape de sélection des particules de manière itérative jusqu'à l'obtention d'un volume de résolution optimale.

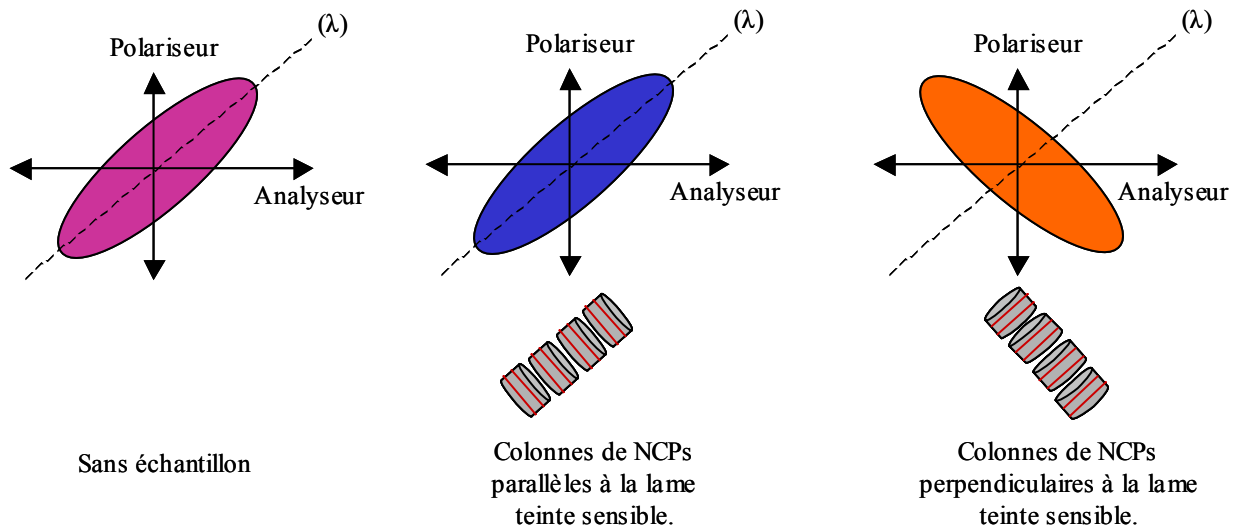
Les images obtenues correspondent à l'image réelle des particules multipliée par une fonction de transfert de contraste. Au cours du processus de reconstruction d'image, la fonction de transfert de contraste (CTF) est donc corrigée pour optimiser la résolution du volume final. Pour cela, différents types de filtres sont appliqués. La correction de la CTF peut être appliquée en différentes étapes de la reconstruction d'image.

Annexe V.1 Observations en microscopie optique.

Les observations en microscopie optique ont été effectuées à l'aide d'un microscope polarisant (Optiphot X Pol, Nikon) permettant également une observation des échantillons en "contraste de Nomarski" ou contraste interférentiel.

En mode polarisant, l'échantillon est placé entre polariseur et analyseur. Ces polariseurs et analyseurs imposent à la lumière une direction de polarisation rectiligne. Lorsqu'ils sont croisés (disposés à 90° l'un de l'autre) et que l'échantillon est isotrope, on observe une extinction totale de la lumière. Dans un échantillon isotrope, la lumière se propage avec une vitesse indépendante de la direction de propagation. Par contre, dans l'hypothèse où l'échantillon est biréfringent et fait donc varier la direction de polarisation de la lumière qui le traverse, cette extinction n'est plus observée. En effet, dans ce cas, la vitesse de la lumière est dépendante de sa direction de propagation. L'indice de réfraction d'échantillons anisotropes est décrit par une ellipsoïde des indices dont les axes sont définis par ces indices, grands n_g et petits n_p dans les matériaux uniaxes. Les domaines anisotropes organisés et biréfringents sont ainsi mis en évidence. L'ADN présente une biréfringence de forme extrinsèque positive et une biréfringence intrinsèque négative due à l'empilement des paires de base. Pour les molécules d'ADN, la biréfringence intrinsèque négative, pour laquelle le grand indice n_g est parallèle au plan des paires de bases, est prépondérante par rapport à la biréfringence de forme.

Les échantillons biréfringents, en lumière naturelle, prennent des teintes de polarisation dépendantes de $n_g - n_p$, de leur épaisseur et de leur orientation par rapport aux polariseurs et analyseurs. Ces teintes de polarisation sont décrites par l'échelle des teintes de Newton. En utilisant une lame teinte sensible (λ) en quartz, il est possible de déterminer la direction des grand et petits indices dans un échantillon peu biréfringent. D'un point de vue pratique, les axes de l'ellipsoïde (n'_p et n'_g) des indices de la lame teinte sensible sont disposés à 45° des polariseurs et analyseur croisés. Sans échantillon, on observe une couleur violette résultante de la teinte de polarisation de la lame (λ). Lorsqu'on insère un échantillon biréfringent, un retard supplémentaire est soit ajouté soit retranché et fait varier la teinte de polarisation de la lame (λ). Si la teinte passe au bleu, le grand indice de l'échantillon n_g est superposé à celui de la lame n'_g . Si la teinte passe à l'orange, le grand indice de l'échantillon n_g est superposé au petit indice n'_p de la lame (λ). L'orientation des brins d'ADN et par conséquent des colonnes de nucléosomes dans l'échantillon peut ainsi être déterminé. Dans l'hypothèse où la teinte passe au bleu, les molécules d'ADN sont perpendiculaires à l'axe d'allongement de l'objet et les colonnes de NCPs sont parallèles à celle-ci. Si la teinte devient orangée, les molécules d'ADN sont parallèles à la lame teinte sensible et les NCPs perpendiculaires à la lame.



Evolution de la teinte de polarisation pour des échantillons comportant des colonnes de NCPs en présence d'une lame teinte sensible (λ).

Le "contraste de Nomarski" est obtenu consécutivement à la séparation du rayonnement incident en deux faisceaux parallèles et distants de moins de 200nm dont les polarisations respectives sont perpendiculaires. On fait ensuite reconverger ces deux faisceaux. La séparation et reconvergence des rayonnements sont assurées par des prismes de "Wollaston". La différence de marche induite donne un effet de perspective sans toutefois conduire à la formation d'images doubles car leur espacement reste inférieure à la limite de résolution d'un microscope optique. Ce microscope est équipé d'un appareil photo numérique (COOLPIX 8400, Nikon).

Annexe V.2 cryofracture.

Vitrification des échantillons.

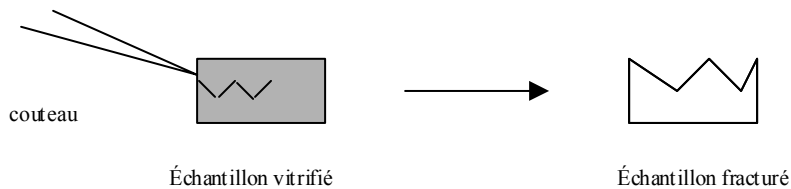
Quelques microlitres d'une solution de NCPs sont tout d'abord vitrifiés sur une zone superficielle par "slam freezing" à l'aide d'un appareil spécifique (Cryovacublock). Les échantillons sont projetés rapidement sur un bloque de cuivre poli maintenu à une température de 15-25Kelvin par de l'hélium liquide.



"Cryovacublock" utilisé pour la vitrification d'échantillons massifs par "slam freezing".

Fracture des échantillons.

La fracture des échantillons vitrifiés s'effectue à froid dans une enceinte sous vide (Balzers). La fracture est réalisée sous un vide de 10^{-7} torr à l'aide d'un couteau maintenu à froid. Un plan de fracture est alors établi suivant une zone de moindre résistance de l'échantillon qui dépend et est caractéristique de sa structure.



Représentation schématique de la fracture des échantillons vitrifiés.

Formation et récupération des répliques.

Immédiatement après la fracture des échantillons, une réplique est formée par évaporation de platine puis de carbone sur l'échantillon. Dans un premier temps, un ombrage de platine est réalisé avec une inclinaison de 45° par rapport à l'échantillon pour former une couche de métal dont l'épaisseur est de 2nm environ. Une couche de carbone de 20nm d'épaisseur, évaporée verticalement par rapport à l'échantillon, vient ensuite renforcer la couche de platine. La réplique est ensuite réchauffée à température ambiante et lavée à l'eau de javel avant d'être abondamment rincée à l'eau distillée. La réplique obtenue peut enfin être déposée sur une grille de microscopie pour être observée à l'aide d'un microscope électronique JEOL 2010 LaB6.

Annexe V.3 Diffraction des rayons X.

Quelques rappels théoriques.

Les quelques notions théoriques rappelées ci-dessous sont développées de manière complète et détaillée par l'ouvrage de A. Guinier (1956).

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques qui interagissent avec les électrons. Les rayons X peuvent éventuellement interférer lorsqu'ils sont diffusés de manière élastique (sans changement de longueur d'onde) et cohérente par des électrons. Lorsque les électrons sont distribués aléatoirement, les rayons X ne donnent pas lieu à des phénomènes d'interférence. Par contre, dans des conditions où les électrons sont distribués de manière organisée, on observe des interférences constructives pour certaines directions privilégiées. Les rayons X peuvent donc être diffractés par les électrons d'un cristal. Les plans atomiques constituent alors des miroirs semi réfléchissants. Dans des conditions où la loi de Bragg est satisfaite entre deux plans atomiques successifs, des interférences constructives sont observées. La loi de Bragg est telle que $2d\sin\theta = n\lambda$ avec d la distance entre deux plans atomiques, λ la longueur d'onde des rayons X (typiquement 1Å), n l'indice du milieu et θ l'angle entre le faisceau incident et le faisceau diffusé.

Les molécules d'un cristal sont distribuées périodiquement. Un réseau cristallin répète selon un ordre tridimensionnel une unité structurale, un motif. Ce réseau est défini par trois vecteurs de translation \mathbf{a} , \mathbf{b} et \mathbf{c} qui conduisent à un arrangement de "nœuds" dans l'espace. Ces nœuds sont définis par des translations : $\mathbf{t} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}$. Le cristal correspond à la répétition dans les directions \mathbf{a} , \mathbf{b} et \mathbf{c} d'une maille élémentaire. Les cristaux sont aussi caractérisés par des opérations de symétrie qui définissent leur groupe d'espace.

L'ensemble des plans parallèles et équidistants d'un cristal sont caractérisés par les indices de Miller, notés h , k et l . Les équations de Laue définissent les directions privilégiées de l'espace pour lesquelles les interférences entre les ondes diffusées par les molécules d'un cristal sont constructives :

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{q} = 2\pi h \quad \mathbf{b} \cdot \mathbf{q} = 2\pi k \quad \mathbf{c} \cdot \mathbf{q} = 2\pi l$$

\mathbf{q} est le vecteur de diffusion des rayons X, défini par $\mathbf{q} = \mathbf{q}_1 - \mathbf{q}_0$. \mathbf{q}_1 et \mathbf{q}_0 sont les vecteurs d'onde des ondes incidentes et diffusées respectivement, de norme $2\pi/\lambda$. Des relations précédentes, on extrait l'expression de $\mathbf{q} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$ où \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* et \mathbf{c}^* sont les vecteurs d'un réseau réciproque du cristal :

$$\mathbf{a}^* = 2\pi \frac{\mathbf{b} \wedge \mathbf{c}}{(\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c})} \quad \mathbf{b}^* = 2\pi \frac{\mathbf{c} \wedge \mathbf{a}}{(\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c})} \quad \mathbf{c}^* = 2\pi \frac{\mathbf{a} \wedge \mathbf{b}}{(\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c})}$$

$(\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c})$ est le produit mixte entre les vecteurs \mathbf{a} , \mathbf{b} et \mathbf{c} et représente le volume de la maille cristallographique. Les positions des pics de diffraction sont directement reliées aux distances inter-réticulaires d_{hkl} , entre plans du cristal et donnent ainsi accès aux paramètres du réseau cristallin. Par exemple, dans le cas d'un réseau

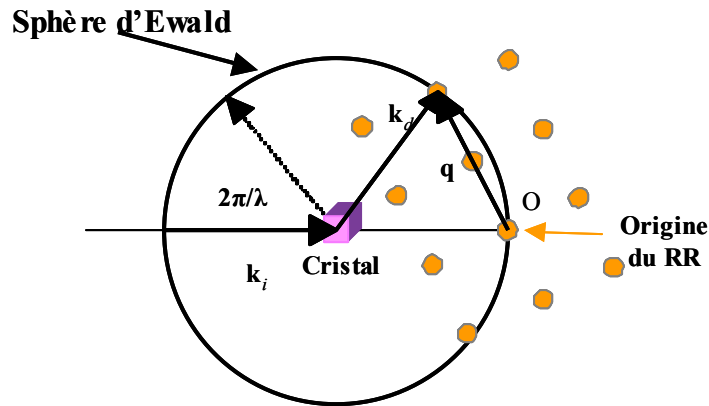
hexagonal à deux dimensions, on a : $d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{\frac{4}{3}(h^2 + k^2 + hk)}}$ avec $l=0$ où a est la distance entre deux objets premiers

voisins.

L'intensité diffractée dans la direction repérée par $\mathbf{q} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*$ est égale au carré de l'amplitude diffractée. L'amplitude diffractée est caractérisée par le facteur de structure noté F_{hkl} : $F_{hkl} = \sum_j f_j \exp[2i\pi(x_j h + y_j k + z_j l)]$. (x_j , y_j et z_j) représentent la position d'un atome dans la maille et f_j son facteur de diffusion atomique.

Les positions des pics de diffraction obtenus renseignent sur la taille et la forme de la maille cristalline. La nature et la position des atomes dans la maille dépend de l'intensité des pics observés.

En radiocristallographie, chaque nœud du réseau réciproque (correspondant à un plan dans l'espace réel) représente une éventualité de diffraction. Pour déterminer si ces nœuds sont en position de Bragg et peuvent donner lieu à des pics de diffraction, on utilise la construction de la sphère d'Ewald :



Représentation schématique de détermination des positions de Bragg dans le réseau réciproque par la construction de la sphère d'Ewald. On a : $k_i = k_d = 2\pi/\lambda$.

- On trace les nœuds du réseau réciproque, orientés par rapport au réseau direct.
- On trace ensuite un axe indiquant la direction du faisceau de rayons X et passant par l'origine (000) du réseau réciproque.
- On trace une sphère de rayon $1/\lambda$, centrée sur le faisceau X, et placée de sorte que le nœud origine soit à l'intersection de la sphère et de l'émergence du faisceau X.

Tous les nœuds du réseau réciproque qui sont situés sur cette sphère sont en position de diffraction.

L'obtention des pics de Bragg dépend donc de l'orientation du faisceau de Rayons X par rapport au cristal diffusant.

Dispositif expérimental.

Les solutions sont introduites soit dans des capillaires cylindriques en quartz (Glas Technik & Konstruktion) dont les diamètres sont compris entre 1.5 et 1.7mm soit dans des capillaires plats (InVitroCom). Les capillaires cylindriques sont centrifugés pour que la phase précipitée sédimente complètement au fond du capillaire. Les capillaires sont scellés à la paraffine et/ou à la flamme à oxygène puis conservés à température ambiante.

Les expériences de diffractions des rayons X ont été effectuées sur la ligne ID2 de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble). La longueur d'onde est fixée à 1\AA . Le faisceau de rayons X est collimaté par des fentes de dimensions $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$. La distance échantillon détecteur peut s'élever jusqu'à 10mètres. Pour nos échantillons, cette distance est fixée à 2mètres. Le faisceau diffracté est détecté par une caméra CCD de dimensions 1024×1024 pixels. Pour certains échantillons, nous avons utilisé un porte capillaires thermalisé. Le flux de photons X disponible sur ID2 est optimal et assez intense pour qu'un échantillon, même peu épais induise un rayonnement diffracté auquel le détecteur est sensible. Les échantillons ont été scannés sur l'ensemble de leur longueur. Les capillaires de 1.5 à 1.7mm de diamètre ont été dans un premier temps analysés tous les 0.5mm pendant 0.02secondes afin de choisir une région mieux organisée où la mesure est répétée dix fois pendant 0.2secondes. Au cours de ces mesures, l'absence de dégâts d'irradiation due aux rayons X a été contrôlée.

Annexe V.4 Calcul du second coefficient du viriel A_2 par diffusion Rayleigh statique de la lumière.

Principe.

Pour la rédaction de cette annexe, nous nous sommes inspirés de la thèse de E. Raspaud.

Une onde électromagnétique incidente telle qu'une source de lumière de longueur d'onde λ_0 , en traversant une solution de polarisabilité moyenne α , induit des dipôles oscillants. Ces dipôles deviennent des sources de rayonnement électromagnétique secondaire émis sous la forme de lumière diffusée. Dans le cas d'une diffusion Rayleigh, la diffusion est élastique, c'est-à-dire que les rayonnements secondaires ont la même longueur d'onde que le rayonnement incident. Pour une solution comportant des particules colloïdales la diffusion et l'amplitude de l'onde électromagnétique résultante dépendent des fluctuations de densité du solvant ainsi que des fluctuations de concentration des particules. Les fluctuations locales de polarisabilité $\delta\alpha$ s'expriment en fonction des fluctuations de concentration en particules δC et de l'incrément d'indice de réfraction de la solution dn/dC :

$$\delta\alpha^2 = \left(\frac{V n_s}{2\pi} \left(\frac{dn}{dC} \right) \right)^2 \delta C^2 \quad (V.1)$$

avec n_s l'indice de réfraction du solvant égal à 1.33, dans le cadre de nos expériences et V le volume de la solution.

L'intensité diffusée par les particules dépend des intensités diffusées par l'ensemble de la solution I_{solution} et l'intensité diffusée par le solvant pur I_{solvant} . On a :

$$I = \frac{I_{\text{solution}} - I_{\text{solvant}}}{I_{\text{solvant}}} \quad (V.2)$$

L'angle de diffusion θ correspond à l'angle entre le vecteur d'onde de la lumière diffusée k_d et le vecteur d'onde de la lumière incidente k_i . Le vecteur de diffusion q est tel que $q = k_d - k_i$ et a pour norme $4\pi n_s / \lambda_0 \sin(\theta/2)$. En supposant que les fluctuations de concentrations sont majoritairement liées à l'inverse de la compressibilité osmotique $1/C(d\pi/dC)$, l'intensité diffusée $I(q)$ s'exprime comme :

$$I(q) = \frac{K}{R_s} CRT \left(\frac{d\pi}{dC} \right)^{-1} \quad (V.3)$$

où - K est une constante égale à $\frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dC} \right)^2$ avec N_A le nombre d'Avogadro. Pour les nucléosomes, l'incrément d'indice de réfraction $\frac{dn}{dC}$ n'est pas connu. Nous l'avons estimé à partir des valeurs mesurées sur de l'ADN nu et dilué ($\frac{dn}{dC}_{\text{ADN}} = 0.168 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Nicolai & Mandel, 1989)) et sur des protéines. Pour les protéines, typiquement, $\frac{dn}{dC}_{\text{protéines}} = 0.185 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Huglin, 1972). Puisque les proportions en ADN et protéines au sein des NCPs sont quasiment égales, une valeur intermédiaire a été considérée : $\frac{dn}{dC}_{\text{NCPs}} = 0.176 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. La constante K est donc égale à $2.04 \cdot 10^{-7}$ et $2.24 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-2} \cdot \text{mol}$ pour l'ADN nu et les NCPs, respectivement.

- RT est l'agitation thermique

- R_s est le rapport de Rayleigh du solvant déterminé en utilisant le rapport de Rayleigh déjà connu du toluène ($R_{\text{toluène}} = 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$). On a, en effet, $R_s = R_{\text{toluène}} (I_{\text{solvant}} / I_{\text{toluène}})$.

Or, le gradient de pression osmotique $d\pi/dC$ peut s'écrire suivant un développement du viriel : $d\pi/dC = (RT/M)(1 + 2MA_2C)$ avec M la masse molaire des particules. Pour une solution de particules colloïdales monodisperse telle qu'une solution de NCPs, l'intensité diffusée s'écrit :

$$I(q) = \frac{K}{R_s} C \frac{M}{1 + 2MA_2C} \quad (V.4)$$

La mesure d'intensités diffusées pour des séries de solutions à concentrations en particules variables permet d'évaluer donc les interactions entre particules par l'évaluation de A_2 .

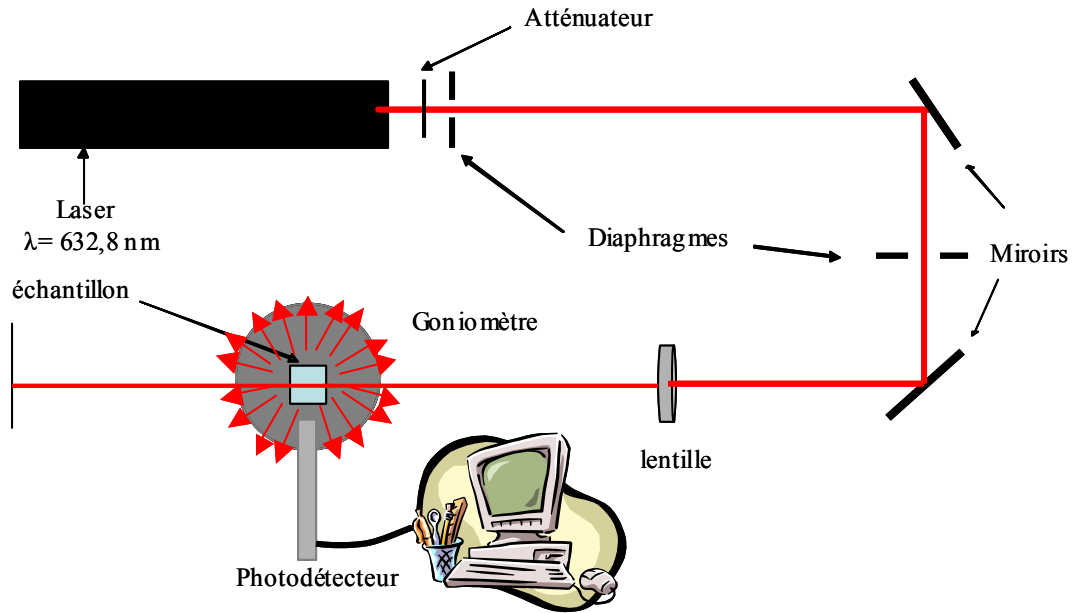
Expérimentalement, le dispositif expérimental a été calibré par du toluène. On peut écrire l'équation V.4 sous la forme :

$$\frac{K C I_{\text{toluène}}}{R_{\text{toluène}} * (I - I_{\text{solvant}})} = \frac{1}{M} (1 + 2MA_2C) \quad (V.5)$$

L'intensité diffusée par le toluène, $I_{\text{toluène}}$ est mesurée expérimentalement. Ainsi, le tracé de la fonction $\frac{C}{I - I_{\text{solvant}}} = f(C)$ permet de déterminer simultanément la masse molaire des particules ainsi que le second coefficient du viriel.

Montage expérimental.

Les expériences de diffusion de lumière ont été réalisées sur un montage non commercial monté et mis au point au laboratoire par E. Raspaud. La source de lumière est un laser Hélium-Néon polarisé de longueur d'onde 632.8nm et de puissance 75mW. Le faisceau incident est dirigé et focalisé sur l'échantillon par un dispositif de miroirs, diaphragmes et lentilles adaptés. Les échantillons sont placés au centre d'un goniomètre afin de mesurer l'intensité diffusée à différents angles par rapport au faisceau incident. L'ensemble de nos mesures ont été effectuées à un angle de 90° par rapport au faisceau incident. Les mesures sont effectuées à température ambiante. Les échantillons sont introduits dans une cuve en quartz parallélépipédique de largeur 3mm (Suprasil, Helma) dont les dimensions permettent d'utiliser des volumes inférieurs à 50 μ L. L'intensité diffusée est évaluée par un détecteur de photons (Hamamatsu, série H7421) et enregistrée par un compteur Racal-Dana (Universal Counter 1991). Les acquisitions sont réalisées par un programme élaboré à partir de Labview.



Description schématique du montage expérimental de diffusion de lumière.

Références bibliographiques

- Adams C., Kamakaka R. 1999, Chromatin assembly : biochemical identities and genetic redundancy, *Cur. Opin. genet. Dev.*, **9**, 185-190.
- Anderson JD., Lowary PT & Widom J. (2001), Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites, *J. Mol. Biol.*, **307**, 977-985.
- Angelov D., Vitolo JM., Mutskov V., Dimitrov S., Hayes JJ. (2001), Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6599-6604.
- Annunziato AT., Easton MB., Perry CA (1995), Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells, *Biochemistry*, **34**, 2916-2924.
- Annunziato AT., Frado L-LY., Seale RL., Woodcock CLF (1998), Role of histone acetylation in the assembly, maintenance, and modulation of chromatin structure, *Gene expression*, **9**, 37-61.
- Arents G., Burlingame RW., Wang BC, Love WE. & Moudrianakis EN.(1991), The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å resolution : a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10148-10152.
- Ausio J., Dong F., van holde KE. (1989), Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of chromatin histone "tails" in the stabilization of the nucleosome, *J. Mol. Biol.*, **206**, 451-463.
- Ausio & van Holde (1986), Histone hyperacétylation : its effects on nucleosome conformation and stability, *Biochemistry*, **25**, 1421-1428.
- Banéres JL., Martin A. & Parello J. (1997), The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome., *J. Mol. Biol.*, **273**, 503-508.
- Bao Y., Konesky K., Park YJ., Rosu S., Dyer PN., Rangasamy D., Tremethick DJ., Laybourn PJ., Luger K. (2000), Nucleosomes containing the histone variant H2A.bbd organize only 118 base pairs of DNA, *EMBO J.*, **23**, 3314-3324.
- Becker P., HörzW. (2002), ATP-dependent nucleosome remodeling, *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 247-273.
- Bednar J., Horowitz RA., Grigoryev SA., Carruthers LM., Hansen JC., Koster AJ., Woodcock CL. (1998), Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher order folding and compaction of chromatin., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14173-14178.
- Belloni L. (1998), Ionic condensation and charge renormalization in colloidal suspensions, *Colloid. Surface.*, **140**, 227-243.
- Belmont AS.& Bruce K. (1994), Visualization of G1 chromosomes : a folded, twisted, supercoiled chromosome model of interphase chromatid structure., *J. Cell Biol.*, **27**, 287-302.
- Bennett MD., Heslop-Harrison JB., Smith JB., Ward JP (1983), DNA density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals., *J. Cell Sci.*, **63**, 173-179.
- Blank T.A. Becker P.B. (1995), Electrostatic mechanism of nucleosome spacing, *J. Mol. Biol.*, **252**, 305-313.
- Bloomfield VA., Ma C. & Arscott PG. (1994), Role of multivalent cations in condensation of DNA, Macro-ion characterization from diluted solutions to complex fluids. *American chemical society symposium series*, **548**, 195-209.
- Bloomfield VA. (1996), DNA condensation, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **6**, 334-341.
- Bloomfield VA., Crothers DM., Tinoco I. (1996), Nucleic acid : structures, properties and functions, *University science Books*.
- Böhm et al. (1980), Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of a limit peptide of histone H2A., *Eur. J. Biochem.*, **106**, 525-530.
- Böhm et al. (1981), Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of the limit peptides of histones H3 and H4., *Eur. J. Biochem.*, **119**, 67-74.
- Bohrmann B., Haider M. & Kellenberg E. (1993), Concentration evaluation of chromatin in unstained resin-embedded sections by means of low-dose ratio-contrast imaging in STEM., *Ultramicroscopy*, **49**, 235-251.
- Bonneté F., Malfois M., Finet S., Tardieu A., Lafont S. & Veesler S. (1997), Different tools to study interaction potentials in γ -crystallin solutions: relevance to crystal growth., *Acta Crystallogr.*, **D53**, 438-447.

- Bonneté F., Finet S. & Tardieu A. (1999), Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions., *J. cryst. growth*, **196**, 403-414.
- Borochoy N., Ausio J & Eisenberg H. (1984), Interaction and conformational changes of chromatin with divalent ions., *Nucleic Acids Research*, **12**, 3089-3096.
- Boroudjerdi H. & Netz R. (2003), Interactions between polyelectrolyte-macroion complexes., *Europhys. Lett.*, **64**, 413-419.
- Boroudjerdi H. & Netz R. (2005), Strongly coupled polyelectrolyte-macroion complexes., *J. Phys-Condens. Matter.*, **17**, S1137-S1151.
- Brower-Toland B., Wacker DA., Fulbright RM., Lis JT., Kraus WL., Wang MD. (2005), Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes., *J. Mol. Biol.*, **346**, 135-146.
- Bustamante C., Bryant Z. and Smith SB. (2003), Ten years of tension : single-molecule DNA mechanics., *Nature*, **421**, 423-427.
- Cameron IL., Smith NKR. & Pool TB. (1979), Element concentration changes in mitotically active and postmitotic enterocytes. An X-ray microanalysis study., *J. Cell Biol.*, **80**, 444-450.
- Chaffin D.R., Kyu-Min Lee, Hayes J.J. (1999), Site directed chemical probing of histone-DNA interactions, *Method. Enzymol.*, **119**, 27-43.
- Chegini N, Grgory SP., Hilder VA, Pocklington MJ & Maclean N. (1981), Structural transitions of chromatin in isolated xenopus erythrocyte nuclei. I. The effect of ions., *J. Submicrosc. Cytol.*, **13**, 291-308.
- Chen H., Tini M., Evans RM. (2001) HATs on and beyond chromatin, *Current opinion in Cell Biology*, **13**, 218-224.
- Cheung P. & Lau P. (2005), Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants, *Molecular Endocrinology*, **19**, 563-573.
- Cheung WL., Briggs SD., Allis CD.(2000), Acetylation and chromosomal functions, *Curr. Opin. cell Biol.*, **12**, 326-333.
- Clapier C.R., Längst G, Corona D.F.V., Becker P.B., Nightingale K.P. (2001), Critical Role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 875-883.
- Cremer T., Küpper K., Dietzel S. and Fakan S. (2004), Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function., *Biol. cell*, **96**, 555-567.
- Cui Y. & Bustamante C. (2000), Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher order structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 127-132.
- Daban J.R (2000), Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures, *Biochemistry*, **39**, 3861-3866.
- Daban JR. (2003), High concentration of DNA in condensed chromatin, *Biochem. Cell Biol.*, **81**, 91-99.
- Davey CA., Sargent DF., Luger K., Armin WM. & T.J. Richmond (2002), Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9Å resolution., *J. Mol. Biol.*, **319**, 1097-1113.
- Davis RH., Morris DR. & Coffino P. (1992), Sequestered end products and enzyme regulation : the case of ornithine decarboxylase. *Microbiol. Rev.*, **56**, 280-290.
- De Frutos M., Raspaud E., Leforestier A. & Livolant F. (2001), Aggregation of nucleosomes by divalent cations., *Biophys. J.*, **81**, 1127-1132.
- DeLange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L. & Bonner (1969). Calf and pea histone IV.III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5569-5679.
- Diehl A., Carmona HA. & Levin Y.(2001), counterion correlations and attraction between like-charged macromolecules. *Phys. Rev. E*, **64**, 011804.
- Dillon N., Festenstein R. (2002), Unravelling heterochromatin : competition between positive and negative factors regulates accessibility., *Trends Genet.*, **18**, 252-258.
- Dong F., Hansen J.C., van Holde K.E. (1990), DNA and protein determinants of nucleosomes positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequence in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5724-5728.
- Dorigo B., Schalch T., Bystricky K. & Richmond T. (2003), Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail., *J. Mol. Biol.*, **327**, 85-96.

- Dorigo B., Schalch T., Kulangara A., Dada S., Schroeder RR. And Richmond TJ. (2004), *Science*, **306**, 1571-1573.
- Dubochet J., Adrian M., Chang J., Homo JC., Lepault J., McDowell A.W. and Schultz P. (1988), Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Q. rev. Biophys.*, **21**, 2, 129-228.
- Dumis-Kervabon A., Encontre I., Etienne G., Jauregui-Adell, Méry J., Mesnier D., Parello J. (1986), A chromatin core particle obtained by selective cleavage of histones by clostripain, *EMBO J.*, **5**, 1735-1742.
- Dyer P., R. Edayathumangalam, C. White, Y. Bao, S. Chakravarthy, U. Muthurajan and K. Luger (2004), *Method Enzymol.*, **375**, 23-44.
- Encontre I. Et Parello J. (1988) Chromatin core particle obtained by selective cleavage of histones H3 and H4 by clostripain, *J. Mol. Biol.*, **202**, 673-676.
- Earnshaw WC., Laemmli UK. (1983) Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffold., *J. Cell Biol.*, **96**, 84-93.
- Finch JT., Klug A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1897-1901.
- Fiori C.E., Leapman R.D. and Swyt C.R. (1988), Quantitative X-ray mapping of biological cryosections, *Ultramicroscopy*, **24**, 237-250.
- Flaus A. et Richmond T.J. (1998), Positioning and stability of nucleosomes on MMTV 3'LTR sequences, *J. Mol. Biol.*, **275**, 427-441.
- Fletcher TM & Hansen JC. (1995), Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms., *J. Biol. Chem.*, **43**, 25359-25632.
- Frangakis AS., Hegerl U. (2002) Segmentation of two and three dimensional data from electron microscopy using eigenvector analysis. *J. Struct. Biol.*, **138**, 105-113.
- Garcia-Ramirez M., Dong F., Ausio J. (1992), Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1, *J. Biol. Chem.*, **267**, 19587-19595.
- Garcia-Ramirez M., Rocchini C., Ausio J.(1995), Modulation of chromatin folding by histone acetylation, *J. Biol. Chem.*, **270**, 17923-17928.
- Gautier T., Abbott D.W., Molla A., Verdel A., Ausio J. & Dimitrov S. (2004) Histone variant H2Abbd confers lower stability to the nucleosome, *EMBO reports*, **5**, 1-6.
- Gelbart WM., Bruinsma RF., Pincus PA. & Parsegian A. (2000), DNA-inspired electrostatics, *Physics today*, **53**, 38.
- Giannasca PJ., Horowitz RA. & Woodcock CL. (1993), Transitions between in situ and isolated chromatin, *J. Cell Sci.*, **105**, 551-561.
- Gordon F., Luger K., Hansen JC. (2005); The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt dependent oligomerization of nucleosome arrays, *J. Biol. Chem.*, **280**, 33701-33706.
- Gottesfeld J., Luger K. 2001, Energetics and affinity of the histone octamer for defined DNA sequences, *Biochemistry*, **40**, 10927-10933.
- Grønbech-Jensen N., Beardmore KM. & Pincus P. (1998), Interactions between charged spheres in divalent counterion solution, *Physica A*, **261**, 74-81.
- Grønbech-Jensen N., Mashl RJ., Bruinsma RF. & Gelbart WM. (1997), counterion induced attraction between rigid polyelectrolytes, *Physical Review Letters*, **78**, 2477-2480.
- Grosberg YA., Nguyen TT. & Shklovskii BI. (2002), Colloquium : The physics of charge inversion in chemical and biological systems, *Reviews of modern Physics*, **74**, 329-345.
- Guinier A. (1956) Théorie et technique de la radiocristallographie., seconde édition, Dunod.
- Ha BY. & Liu A. (1997), Counterion-mediated attraction between two like-charged rods, *Phys. Rev. Lett.*, **79**, 1289-1292.
- Harp JM., Hanson BL., Timm DE., Bunick GJ.(2000), Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5Å resolution., *Acta crystallogr.*, **D56**, 1513-1534.
- Hamiche A., Kang JG, Dennis C., Xiao H., Wu C. (2001), Histone tail modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14316-14321.

- Hewish DR., Burgoyne LA (1973), Chromatin sub-structure : the digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease., *Biochemical Biophysical Research Communication*, **52**, 504-510.
- Hilliard PR., Smith RM. & Rill RL. (1986), Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of histone and DNA dynamics in nucleosome cores., *J. Biol. Chem.*, **261**, 5992-5998.
- Horowitz RA., Agard DA., Sedat JW., Woodcock CL. (1994), The three dimensional architecture of chromatin in situ : electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon, *J. cell Biol.*, **125**, 1-10.
- Horowitz-Scherer R.A., Woodcock C.L. (2006), Organization of interphase chromatin, *Chromosoma*, **115**, 1-14.
- Hud N.V., Downing K.M. (2001), Cryoelectron microscopy of λ phage DNA condensate in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14925-14930.
- Huglin M.B. (1972), Light scattering from polymer solutions. *Academic Press, London*.
- Huisinga K.L., Brower-Toland B. et Elgin S.C.E. (2006) The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing, *Chromosoma*, **115**, 110-122.
- Jason LJM, Moore SC., Ausio J., Lindsey G. (2001), Magnesium dependent association and folding of oligonucleosomes reconstituted with ubiquitinated H2A, *J. Biol. Chem.*, **276**, 14597-14601.
- Jason LJM., Moore SC., Lewis JD., Lindsey G., Ausio J. (2002), Histone ubiquitination : a tagging tail unfolds?, *Bioessays*, **24**, 166-174.
- Kamakaka RT., Biggins S (2005), Histone variants : deviants?, *Genes and Development*, **19**, 295-310.
- Karantza V., Freire E. & Moudrianakis EN. (2001), Thermodynamic studies of the core histones : stability of the octamer subunits is not altered by their removal of their terminal domain, *Biochemistry*, **40**, 13114-13123.
- Katchalsky A., Alexandrowicz O. & Koden O. (1996), chemical physics of ionic solution, *ed Conway B.E. & Barradas R.G. (Wiley)*, 295.
- Katritch V., Bustamente C., Olson WK. (2000), Pulling chromatin fibers : Computer simulations of direct physical micromanipulations, *J. Mol. Biol.*, **295**, 29-40.
- Koch MHJ., Sayers Z., Michon AM., Marquet R., Houssier C. & Willführ J. (1988), The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. *Eur. Biophys. J.*, **16**, 177-185.
- Kornberg RD., Thoma JO. (1974), Chromatin structure : oligomers of the histones, *Science*, **184**, 865-868.
- Krajewski WA. & Ausió J. (1996), Modulation of the higher-order folding of chromatin by deletion of histone H3 and H4 terminal domains., *Biochem. J.*, **316**, 395-400.
- Kulić I.M., Schiessel H. 2003, Nucleosome repositioning via loop formation, *Biophys. J.*, **84**, 3197-3211.
- Kunze KK, Netz RR. (2000), Salt induced DNA-histones complexation, *Phys. Rev. Lett.*, **85**, 4389-4392.
- Längst G. & Becker PB (2001), ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA, *Mol. Cell*, **8**, 1085, 1092.
- Längst G. & Becker P.B. (2004), Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena?, *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**, 58-63.
- Leapman R.D., Ornberg R.L. (1988), Quantitative energy loss spectroscopy in biology, *Ultramicroscopy*, **24**, 251-268.
- Lee K.M., Chaffin D.M., Hayes J.J (1999), Targeted cross-linking and DNA cleavage within model chromatin complexes. *Method Enzymol.* **304**:231-51
- Leforestier A. et Livolant F. (1997), Liquid crystalline ordering of nucleosome core particles under macromolecular crowding conditions: evidence for a discotic columnar hexagonal phase, *Biophys. J.*, **73**, 1771-1776.
- Leforestier A., Fudaley S. & Livolant F. (1999), Spermidine-induced aggregation of nucleosome core particles : evidence for multiple liquid crystalline phases., *J. Mol. Biol.*, **290**, 481-494.
- Leforestier A., Dubochet J. & Livolant F. (2001), Bilayers of Nucleosome Core Particles., *Biophys. J.*, **81**, 2414-2421.

- Li G., Levitus M., Bustamante C. et Widom J. (2005), Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **12**, 46-53.
- Li W., Nagaraja S., Delacuve GP., Hendzel MJ., Davie JR. (1993), effect of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability, *Biochem. J.*, **296**, 737-744.
- Linse P. & Lobaskin V. (1999), Electrostatic attraction and phase separation in solutions of like-charged colloidal particles., *Phys. Rev. Lett.*, **83**, 4208-4211.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. (2000), Molecular cell biology, *Edition W.H. Freeman*.
- Lorch Y., Maier-Davis B. et Kornberg R.D. (2006), Chromatin remodeling by nucleosome disassembly *in vitro.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3090-3093.
- Lowary P.T., Widom J., New DNA sequences rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning, *J. Mol. Biol.*, 1998.
- Loyola A., Almouzni G. 2004, Histone chaperones, a supporting role in the limelight, *Biochim. Biophys. Acta*, **1677**, 3-11.
- Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997a), Cristal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution., *Nature*, **389**, 251-260.
- Luger K., Rechsteiner T, Flaus A.J., Wayne M.M.Y., Richmond T.J.(1997b), Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria, *J. Mol. Biol.*, **272**, 301-311.
- Luger K. (2006), Dynamic nucleosomes, *Chromosome Res.*, **14**, 5-16.
- Makita N. & Yoshikawa K. (1999), ATP/ADP switches the higher-order structure of DNA in the presence of spermidine. *FEBS lett.*, **460**, 333-337.
- Malfois M., Bonneté F., Belloni L. & Tardieu A. (1996), A model of attractive interactions to account for fluid-fluid phase separation of proteins solutions. *J. chem. Phys.*, **105**, 3290-3300.
- Mangenot S., Leforestier A., Vachette P., Durand D. & Livolant F. (2002 a), Salt-induced conformation and interaction changes of nucleosome core particles., *Biophys. J.*, **82**, 345-356.
- Mangenot S., Raspaud E., Belloni L. & Livolant F. (2002 b), Interactions between isolated nucleosome core particles : a tail-bridging effect? *Eur. Phys. J. E.*, **7**, 221-231.
- Mangenot S., Leforestier A., Durand D. & Livolant F. (2003), X-ray diffraction characterization of the dense phases formed by nucleosome core particles., *Biophys. J.*, **81**, 2414-2421.
- Mangenot S., Leforestier A., Durand D. & Livolant F. (2004), Phase diagram of Nucleosome core Particles., *J. Mol. Biol.*, **333**, 907-916.
- Manning GS (1978), The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides., *Q. rev. biophys.* **II**, **2**, 179-246.
- Mello A., Almouzni G. 2001, The ins and outs of nucleosome assembly, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 136-141.
- Meersseman G., Pennings S., Bradbury E.M. (1992), Mobile nucleosomes-a general behavior, *EMBO J.*, **11**, 2951-2959.
- Misteli T. (2001), Protein dynamics implication for nuclear architecture and gene expression, *Science*, **291**, 843-847.
- Mohammad-Rafiee F., Kulić I.M., Schiessel H. (2004), Theory of nucleosome corkscrew sliding in the presence of synthetic DNA ligands, *J. Mol. Biol.*, **344**, 47-58.
- Mülbacher F., Holm C. & Schiessel H. (2006), Controlled DNA compaction within chromatin : the tail-bridging effect., *Europhys. Lett.*, **73**, 135-141.
- Nakashima A., Mori K. & Sasaki S. (1996), Interaction between polyanions and cell nuclei: mechanism of gelatination of nuclei., *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **228**, 846-851.
- Nguyen TT & Shklovskii BI. (2001), Complexation of DNA with positive spheres : Phase diagram of charge inversion and reentrant condensation, *J. Chem. Phys.*, **115**, 7298-7308.
- Nicolai T. & Mandel M. (1989), Dynamic light scattering by aqueous solutions of low molar mass DNA fragments in the presence of NaCl., *Macromolecules*, **22**, 2348-2356.
- Niebuhr M., Koch MHJ (2005) Effects of urea and trimethylamine N-oxide (TMAO) on the interactions of lysozyme in solution. *Biophys. J.*, **89**, 1978-1983.
- Nowak SJ., Corces VG. (2004), Phosphorylation of histone H3 : a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation, *Trends Genet.*, **20**, 214-220.
- Olins AL. & Olins DE (1974), Spheroid chromatin units (v bodies), *Science*, **183**, 330-332.

- Olvera de la Cruz M., Belloni L., delSanti M., Dalbiez JP., Spalla O. & Drifford M. (1995), Precipitation of highly charged polyelectrolyte solution in the presence of multivalent salts., *J. Chem. Phys.*, **103**, 5781-5791.
- Oosawa F. (1968), Interaction between parallel rodlike macroions, *Biopolymers*, **6**, 1633-1647.
- Oosawa F. (1971), Polyelectrolytes, *Marcel Dekker, Inc, New York*.
- O'Shaughnessy B & Yang Q. (2005), Manning-Oosawa counterion condensation, *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 048302.
- Pack GR., Wong L. & Lamm Gene (1999), Divalent cations and the electrostatic potential around DNA : Monte Carlo and Poisson-Boltzmann calculations., *Biopolymers*, **49**, 575-590.
- Pardon JF. & Wilkins MHF. (1972), A super-coil model for nucleohistone, *J. Mol. Biol.* **68**, 115-124.
- Pedersen J.S. (2004), A flux- and background-optimized version of the NanoSTAR small-angle scattering camera for solution scattering, *J. Appl. Cryst.*, **37**, 369-380.
- Pelta J., Durand D., Doucet J., Livolant F. (1996), DNA mesophases induced by spermidine : structural : structural properties and biological implications. *Biophys. J.*, **71**, 48-63.
- Penning S., Meersseman G.; Bradbury (1991), Mobility of positioned nucleosomes on 5S rDNA, *J. Mol. Biol.*, **220**, 101-110.
- Pienta KJ. & Coffey DS (1984), A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome., *J. Cell Sci. Suppl.*, **1**, 123-135.
- Podgornik R. (2003), Two-body polyelectrolyte-mediated bridging interactions., *J. Chem. Phys.*, **118**, 11286-11296.
- Poirier MG., Marko JF. (2002), Mitotic chromosomes are chromatin networks without a mechanically contiguous protein scaffold., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15393-15397.
- Placek BJ., Harrison L.N, Villers BM. & Gloss LM. (2005), The H2A.Z/H2B dimer is unstable compared to the dimer containing the major H2A isoform., *Protein Sci.*, **14**, 514-522.
- Podgornik R. & Parsegian VA. (1998), Charge fluctuation forces between rodlike polyelectrolytes : pairwise summability reexamined. *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 1560-1562.
- Poirier MG., Monhait T. & Marko JF. (2002), Reversible hypercondensation and decondensation of mitotic chromosomes studied using combined chemical-micromechanical techniques., *J. Cell. Biochem.*, **85**, 422-434.
- Polach KJ. & Widom J. (1995), Mechanisms of protein access to specific DNA sequences in chromatin : a dynamic model equilibrium for gene regulation., *J. Mol. Biol.*, **254**, 130-149.
- Polach KJ., Lowary PT., Widom J. (2000), Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes, *J. Mol. Biol.*, **298**, 211-223.
- Pollard K, Samuels ML., Crowley KA, Hansen JC., Peterson CP. (1999), Functional interaction between GCN5 and polyamines : a new role for core histone acetylation, *EMBO J.*, **18**, 5622-5633.
- Protacio RU., Li G., Lowary PT. And Widom J. (2000) Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8866-8878.
- Prunell A., Alilat M., De Lucia F. (1999), Nucleosome structure and dynamics. The DNA minicircle approach, *Method. Mol. Cell Biol.*, **119**, 79-101.
- Pusaria RH., Bhargava P. (2005), Histones in functional diversification. Core histone variants., *FEBS J.*, **272**, 5149-5168.
- Quesada-Perez M., González-Tovar E., Martín-Molina A., Lozada-Cassou M. & Hidalgo-Álvarez R. (2003), Overcharging in colloids : beyond the Poisson-Boltzmann approach, *Chemical Physical Chemistry*, **4**, 234-248.
- Raspaud E., Olvera de la Cruz M., Sikorav JL. & Livolant F. (1998), Precipitation of DNA by polyamines : a polyelectrolyte behavior., *Biophys. J.*, **74**, 1547-1555.
- Raspaud E., Chaperon I., Leforestier A. & Livolant F. (1999). Spermine-induced aggregation of DNA, nucleosomes, and chromatin. *Biophys. J.*, **77**, 1547-1555.
- Raspaud E. Durand D. & Livolant F. (2005), Interhelical spacing in liquid crystalline spermine and spermidine-DNA precipitates., *Biophys. J.*, **88**, 392-403.
- Rice JC. & Allis CD. (2001), Histone methylation versus histone acetylation : new insights into epigenetic regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 263-273.

- Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D. and Klug A. (1984), Structure of the nucleosome core particle at 7Å resolution, *Nature*, **311**, 532-537.
- Richmond T.J., Searles M.A., Simpson R.T. (1988), Crystals of a nucleosome core particle containing defined sequence DNA, *J. Mol. Biol.*, **199**, 161-170.
- Rouzina I. & Bloomfield V.A. (1996), Macroion attraction due to electrostatic correlation between screening counterions., *J. Phys. Chem.*, **100**, 9977-9989.
- Ruiz-Carillo A., Jorcano J.L. (1979), An octamer of core histones in solution: central role of the H3-H4 tetramer in the self-assembly, *Biochemistry*, **18**, 760-768
- Sarma K, Reinberg D. 2005, Histone variants meet their match, *Nat. rev. Mol. Cell Bio.*, **6**, 139-149.
- Schalch T., Duda S., Sargent D.F., Richmond T.J. (2005), X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fiber., *Nature*, **436**, 138-141.
- Schiessel H. (2003), The Physics of chromatin, *J. Phys-Condens. Mat.*, **15**, R699-R774.
- Schiessel H., Widom J., Bruinsma R.F., Gelbart W.M. (2001), Polymer reptation and nucleosome repositioning, *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 4414-4417.
- Schiessel H., Gelbart W.M., Bruinsma R. (2001 b), DNA folding : structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin. *Biophys. J.*, **80**, 1940-1956.
- Shklovskii B.I. (1999), Screening of a macroion by multivalent ions : Correlation-induced inversion of charge., *Phys. Rev. E*, **60**, 5802-5811.
- Sedat J. & Manuelidis L. (1978), A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harb. Sym.*, **42**, 331-350.
- Shilatifard A. (2006), Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression, *Annu. Rev. biochem.* **75**, 243-269.
- Schwarz P.M., Felthauer A., Fletcher T.M. & Hansen J.C. (1996), Reversible oligonucleosome self-association : dependence on divalent cations and core histone tail domains?, *Biochemistry*, **35**, 4009-4015.
- Shogren-Knaak, M., Haruhiko, I., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., Peterson, C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions., *Science* **311**, 844-847.
- Siino J.S., Yau P.M., Imai B.S., Gatewood J.M., Bradbury E.M. (2003), Effect of DNA length and H4 acetylation on the thermal stability of reconstituted nucleosome particles, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **302**, 885-891.
- Smith R.M. & Rill R.L (1989), Mobile histone tails in nucleosomes. Assignments of mobile segments and investigations of their role in chromatin folding., *J. Biol. Chem.*, **264**, 10574-10581.
- Spector D.L. (2001), Nuclear domains, *J. Cell Sci.*, **114**, 2891-2893.
- Strahl B.D., Allis C.D. (2000), The language of covalent histone modifications, *Nature*, **403**, 41-45.
- Studitsky V.M. (1999), Preparation and analysis of positioned nucleosomes, *Method Mol. Biol.*, **119**, 17-26.
- Sun J, Zhang Q. & Schlick T. (2005), Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8180-8185.
- Suto R.K., Clarkson M.J., Tremethick D.J. & Luger K. (2000), Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z., *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1121-1124.
- Svergun D.I. (1992), Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.*, **25**, 495-503.
- Svergun D.I., Barbareto C. and Koch M.H.J. (1995), CRYSOLE-a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates., *J. Appl. Crystallogr.*, **28**, 768-773.
- Tabor C.W. and Tabor H. (1984), Polyamines, *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749-790.
- Tardieu A., Le Verge A., Malfois M., Bonneté F., Finet S., Riès-Kautt M., Belloni L. (1999), Proteins in solution: from X-ray scattering intensities to interaction potentials, *J. cryst. growth*, **196**, 193-203.
- Thaström et al., Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences, *J. Mol. Biol.*, 1999.

- Thaström A., Lowary P.T. and Widom J;(2003), Measurement of histone-DNA interaction free energy in nucleosomes, *Methods*, **33**, 33-44.
- Thaström et al., Measurement of histone-DNA interaction free energy in nucleosomes, *Methods*, 2004.
- Thoma JO. & Butler PJG. (1977), Characterization of the octamer of histones free in solution, *J. Mol. Biol.*, **116**, 769-781.
- Thoma F. Koller TH., Klug A. (1979), Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.*, **83**, 403-427.
- Tomschik M., Zheng H., van Holde K., Zlatanova J.& Leuba SH.(2005), Fast, long-range, reversible conformational fluctuations in nucleosomes revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3278-3283.
- Tse C., Fletcher TM., Hansen JC (1998), Enhanced transcription factors access to arrays of H3/H4 tetramer-DNA complexes : implications for replication and transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12169-12173.
- Tse & Hansen (1997), Hybrid trypsinized nucleosomal arrays : identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction, *Biochemistry*, **36**, 11381-11388.
- Tsunaka Y., Kajimura N., Tate SI., Morikawa K.(2005), Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle., *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3224-3434.
- Tyler J., 2002, Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2268-2274.
- van Holde K., Zlatanova J. (1995), Chromatin higher order structure : chasing a mirage? *J. Biol. Chem.*, **270**, 8373-8376.
- Villeponteau B. (1992), Heparin increases chromatin accessibility by binding the trypsin-sensitive basic residues in histones., *Biochem. J.*, **288**, 953-958.
- Wang X., Moore SC., Laszckzak M. & Ausio J. (2000), Acetylation increases the α -Helical content of the histone tails of the nucleosome, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35013-35020.
- Wang MD., Yin H., Landick R., Gelles J. and Block SM. (1997), Stretching DNA with optical tweezers, *Biophys. J.*, **72**, 1335-1346.
- Warley A. & Stephen J. (1983), X-ray microanalysis of HeLa S3 cells. II. Analysis of elemental levels during the cell cycle., *J. cell sci.*, **62**, 339-350.
- Watanabe SI., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H. & Igarashi K. (1991), Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20803-20809.
- White CL., Suto RK., Luger K (2001), Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions, *EMBO J.*, **20**, 5207-5218.
- Widom J. (1986), Physicochemical studies of the folding of the 100Å nucleosome filament into the 300Å Filament, *J. Mol. Biol.*, **190**, 411-424.
- Widom J. (1999), Equilibrium and dynamic nucleosome stability, *Methods in Molecular Biology*, **119**, 61-77.
- Widom J., Finch JT., Thomas JO. (1985), Higher order structure of long repeat chromatin, *EMBO J.*, **4**, 3189-3194.
- Widom J. & Klug A. (1985), Structure of the 300Å chromatin filament : X-ray diffraction from oriented samples., *Cell*, **43**, 207-213.
- Wolffe (1995), Histone deviants, *Curr. Biol.*, **5**, 452-454.
- Wong GCL., Lin A., Tang JX., Li Y., Janmey PA., & Safinya CR. (2003), Lamellar phase of stacked two dimensional rafts of actin filaments., *Phys. Rev. Lett.*, **91**, 018103.
- Woodcock CL. (1994), Chromatin fibers observed insitu in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. *J. Cell Biol.*, **125**, 11-19.
- Woodcock CLF., frado LLY., Rattner JB. (1984), the higher-order structure of chromatin : evidence for a helical ribbon arrangement., *J. Cell Biol.*, **99**, 42-52.
- Woodcock CL. & Horowitz RA (1997), Electron Microscopy of Chromatin, *Methods*, **12**, 84-95.
- Yager D., McMurray C., van Holde K.E. (1989), Salt-Induced release of DNA from Nucleosome Core Particles, *Biochemistry*, **28**, 2271-2281.

Yuan GC., Liu YJ., Dion M.F., Slack M.D., Wu L.F., Altschuler S.J., Rando O.J. (2005), Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*, *Science*, 309, 626-630.

Zheng C. & Hayes JJ. (2003), Intra- and Inter-nucleosomal protein-DNA interactions of the core histone tail domains in a model system, *J. Biol. Chem.*, **278**, 24217-24224.

Zheng C. and Hayes JJ. (2003), Intra and inter-nucleosomal protein-DNA interactions of the core histone tail domains in a model system., *J. Biol. Chem.*, **278**, 24217-24224.

Zheng, C., Lu, X., Hansen, J.C. and Hayes, J.J. (2005) Salt-dependent intra- and inter-nucleosomal interactions of the H3 tail domain in a model oligonucleosomal array., *J. Biol. Chem.*, **280**, 33552-33557.

◆Résumé :

Il s'agit de comprendre les mécanismes électrostatiques qui contrôlent les interactions entre particules cœur de nucléosome (NCPs) et leur organisation en phases denses. Nous montrons qu'en solutions diluées, les queues des histones sont essentielles pour l'établissement d'interactions attractives entre NCPs et contrôlent leur conformation. L'organisation des NCPs précipitées par des ions multivalents est déterminée pour établir des diagrammes de phase.

◆mots clés :

Chromatine, nucléosomes, histones, interaction, second coefficient du viriel, électrostatique, ions multivalents, conformation, solution diluée, phases denses, structure, diffusion et diffraction des rayons X, diffusion de la lumière, cryomicroscopie électronique

◆Laboratoire de rattachement :

LABORATOIRE DE PHYSIQUE DES SOLIDES
Bâtiment 510-Campus d'Orsay
Université Paris Sud XI
91405 Orsay

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE

UNIVERSITÉ PARIS XI
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex