



HAL
open science

DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES POUR LA CARACTERISATION DES COMPLEXES ADN-PROTEINES PAR AFM ET ETUDE DES INTERACTIONS ADN-KU.

Fabrice Landousy

► **To cite this version:**

Fabrice Landousy. DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES POUR LA CARACTERISATION DES COMPLEXES ADN-PROTEINES PAR AFM ET ETUDE DES INTERACTIONS ADN-KU.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT: . tel-00129367

HAL Id: tel-00129367

<https://theses.hal.science/tel-00129367>

Submitted on 6 Feb 2007

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.

**UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT
UFR DE PHYSIQUE**

Année 2006

N° attribué par la bibliothèque

||_|_|_|_|_|_|_|

THESE

présentée et soutenue publiquement
le 11 décembre 2006
pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7

SPECIALITE : INTERFACES PHYSIQUE BIOLOGIE

Par

Fabrice LANDOUSY

Titre :

**DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES
POUR LA CARACTERISATION DES COMPLEXES
ADN-PROTEINES PAR AFM
ET ETUDE DES INTERACTIONS ADN-KU.**

Membres du jury

M. Jean-Marc di Meglio, Président du jury

M. Christian Frétiigny, Rapporteur

M. Pierre-Emmanuel Milhiet, Rapporteur

M. Patrick Calsou, Examineur

M. Emmanuel Paris, Examineur

M. Eric Le Cam, Directeur de thèse

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire (LM2C) de l'UMR 8126 « Interactions moléculaires et cancer », à l'Institut Gustave Roussy.

Je tiens d'abord à remercier Eric Le Cam de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir dirigé mon travail de thèse au cours de ces quatre années. Sa patience, ses conseils, son sens critique, font partie des ingrédients qui m'ont sans cesse aidé à avancer dans l'aventure scientifique de la thèse et à améliorer la qualité et les résultats de mon travail.

Je remercie également Christian Fréty et Pierre-Emmanuel Milhiet, pour avoir accepté de juger en détails mon travail en tant que rapporteurs ; Patrick Calsou et Emmanuel Paris, pour avoir accepté de participer au jury en tant qu'examineurs ; Jean-Marc di Meglio pour avoir accepté de participer au jury et d'en assurer la présidence.

Ma gratitude va aussi aux différentes personnes qui se sont impliquées dans le financement de ma thèse, que ce soit à la direction de l'UMR 8126 ou de l'Ecole Doctorale « Constituants Elémentaires Systèmes Complexes », chez Veeco Instruments, au CNRS ou à la Fondation Recherche Médicale.

J'exprime une reconnaissance particulière à Olivier Piétrement et David Pastré, dont le travail méthodologique de fond a servi de cadre à une grande partie de mon propre travail. Leur disponibilité et leur dynamisme ont été très précieux et ont beaucoup contribué à la réussite de ma thèse. Un grand merci également à Sophie Lafosse et Sonia Bacconnais, pour leur gentillesse et leur aide essentielle, en particulier dans la finalisation du travail sur les interactions ADN-Ku. Merci à Etienne Delain, qui m'a permis à maintes reprises de compléter ma bibliographie, et qui a participé avec minutie aux relectures du manuscrit. Un clin d'œil amical à Pauline Dupaigne et Anthony Justome ; que votre quatrième année de thèse voie tous vos efforts aboutir brillamment ! Jeanne Ayache et Christophe Lavelle sont venus plus récemment compléter l'équipe, je les remercie aussi de m'avoir encouragé lors du sprint final.

Ils sont partis vers d'autres horizons parfois lointains mais ont aussi accompagné une partie de mon travail au LM2C : Sébastien Lyonnais, Gilles Mirambeau, Josette Jeusset, Bernard Revet. Merci à vous.

Je pense enfin avec amitié à tous ceux et celles, dans les étages de l'UMR 8126, avec lesquels j'ai sympathisé et souvent discuté. Ces moments font partie des bons souvenirs !

PLAN GENERAL DE LA THESE

Introduction générale	6
Chapitre 1 – Les différentes approches d'étude de l'ADN et des interactions ADN-protéines.	
Introduction	11
I – Interactions ADN-protéines.....	11
A. L'ADN.	11
1. <i>Structure.</i>	<i>11</i>
2. <i>Courbure et flexibilité locales.</i>	<i>14</i>
3. <i>Topologie.....</i>	<i>17</i>
B. Interactions ADN-protéines.....	18
1. <i>Reconnaissance chimique et structurale.....</i>	<i>18</i>
2. <i>Implication des propriétés locales de l'ADN.</i>	<i>19</i>
3. <i>Des processus dynamiques complexes.</i>	<i>20</i>
C. Etude in vitro de l'ADN et des interactions ADN-protéines.	21
1. <i>Paramètres et ordres de grandeurs.....</i>	<i>21</i>
2. <i>Techniques d'étude.....</i>	<i>21</i>
II – Etude de l'ADN et des interactions ADN-protéines en microscopie.	26
A. Microscopie électronique en transmission (MET) et cryoMET.....	27
B. Microscopie de fluorescence.	30
C. Microscopie à force atomique.	31
Conclusion.....	32
Bibliographie du chapitre 1.....	33
Chapitre 2 – Les différents modes de fonctionnement de l'AFM et leurs applications en biologie.	
Introduction	42
I - Principes des différents modes de fonctionnement.	42
A - Courbes force-distance (AFM 1D).....	43
B – Modes d'imagerie.	43
1. <i>Mode contact.</i>	<i>44</i>
2. <i>Mode non contact.</i>	<i>45</i>
3. <i>Mode contact intermittent.</i>	<i>45</i>
II – Mode contact intermittent : aspects instrumentaux.	47
A. Utilisation du mode contact intermittent à l'air.	47
1. <i>Propriétés de la résonance.....</i>	<i>47</i>
2. <i>Modélisation de l'interaction pointe-surface.....</i>	<i>48</i>
B. Utilisation du mode contact intermittent en milieu liquide.	49
1. <i>Modes d'excitation de l'oscillation.</i>	<i>50</i>

2. Facteur de qualité de la résonance.....	51
3. Modélisation de l'interaction pointe-surface.....	52
C. Temps d'acquisition des images.....	53
1. Paramètres de construction intrinsèques à l'instrument.....	53
2. Fréquence de résonance des microleviers.....	54
3. Paramètres d'imagerie.....	55
4. Performances.....	56
III – Principales applications de l'AFM en biologie.....	56
A. Biomolécules.....	56
1. Imagerie.....	56
2. Courbes force-distance.....	57
B. Membranes.....	57
1. Imagerie.....	57
2. Courbes force-distance.....	57
C. Cellules.....	58
1. Imagerie.....	58
2. Courbes force-distance.....	59
D. CryoAFM.....	59
Conclusion.....	59
Bibliographie du chapitre 2.....	61

Chapitre 3 – Adsorption et étalement de l'ADN sur le mica.....	64
---	-----------

Introduction.....	67
I – Données initiales sur l'adsorption et l'étalement de l'ADN pour l'observation AFM.....	67
A. Présentation du substrat AFM, le mica.....	67
B. Problématique de l'étalement de l'ADN sur la surface.....	68
C. Problématique de l'observation des interactions ADN-protéines par AFM.....	68
D. Méthode des cations divalents.....	69
1. Données principales sur l'adsorption.....	69
2. Applications.....	71
E. Méthodes de fonctionnalisation par des groupes chargés positivement.....	72
1. AP-mica.....	72
2. Surfaces dérivées de l'AP-mica.....	73
3. Autres fonctionnalisations.....	74
F. Discussion.....	74
II – Etude de la force d'adsorption de l'ADN sur le mica.....	75
A. Modélisation des forces d'interactions électrostatiques ADN-mica.....	76
1. Force d'interaction des doubles couches électriques.....	76
2. Force associée aux corrélations de position entre cations.....	80
3. Comparaison des forces de répulsion et d'attraction.....	86
B. Etude expérimentale de l'effet de la charge de la surface et des concentrations en cations sur l'adsorption de l'ADN.....	87
1. Matériels et méthodes.....	87
2. Effet d'un prétraitement par les ions nickel.....	88

3. Effet des concentrations en cations monovalents et divalents.	89
C. Discussion	91
1. Discussion du modèle proposé.....	91
2. Discussion des applications à l'étude des complexes ADN-protéines.....	92
Conclusion	93
III - Recherche d'un système d'ancrage des extrémités de l'ADN sur le mica entre deux plots distants.	93
A. Matériel et méthodes	94
1. Préparation d'ADN fonctionnalisé à une ou deux extrémités.....	94
2. Plots couplés aux extrémités en une étape de réaction.....	95
3. Plots couplés aux extrémités en deux étapes de réaction.....	98
4. Microscopie électronique à transmission.	99
5. Méthodologies de test de l'ancrage des plots à la surface.	99
B. Résultats et discussion.	103
1. Streptavidine.....	103
2. Streptavidine-peroxydase.	106
3. IgG anti-digoxygénine.....	109
4. ADN simple brin biotinylé.....	110
5. Etiquette histidine biotinylée.....	113
6. BSA biotinylée.	116
Conclusion	121
Conclusion générale du chapitre	122
Bibliographie du chapitre 3	123
Annexe C3-1.	130
Annexe C3-2.	131
Annexe C3-3.	132
<hr/>	
Chapitre 4 – Accessibilité et réactivité de l'ADN adsorbé sur la surface.	133
Introduction	135
I – Présentation de la bléomycine.	135
II - Matériels et méthodes.	137
A. Méthodologie de préparation des échantillons.	137
1. Clivage de l'ADN adsorbé sur le mica par la bléomycine.....	137
2. Clivage de l'ADN en solution par la bléomycine.....	138
3. Paramètres testés.	138
4. Observation AFM.....	138
B. Méthode de détermination du nombre moyen de coupures par molécule d'ADN.	138
III – Résultats et discussion.	140
A. Validation de la méthode de détermination de n.	140
B. Etude de l'influence de la surface.	141
1. Evolution de n avec $[Mg^{2+}]$	141
2. Evolution de n avec $[Ni^{2+}]$	144
3. Evolution de n avec [bléomycine] et effet de l'ascorbate.	145
Conclusion	146

Bibliographie du chapitre 4.....	148
Annexe C4-1.	150

Chapitre 5 – Etude des interactions entre l’ADN et la protéine Ku.	151
--	------------

Introduction	154
---------------------------	------------

I – Présentation générale de la protéine Ku.....	154
---	------------

Introduction	154
A. Localisation cellulaire.	154
B. Données structurales sur l’hétérodimère Ku70/80.....	154
C. Implication de Ku dans la réparation des cassures double brin de l’ADN.....	156
D. Interaction de Ku avec les protéines impliquées dans le NHEJ.....	158
1. <i>L’association Ku-DNA-PKcs.</i>	<i>158</i>
2. <i>Interaction de Ku avec d’autres partenaires impliqués dans le NHEJ.....</i>	<i>160</i>
3. <i>Cas de la recombinaison V(D)J.</i>	<i>161</i>
E. Implication de Ku dans d’autres mécanismes.	162
Conclusion.....	162

II – Etude des propriétés des interactions ADN-Ku en AFM et MET.....	163
---	------------

A. Introduction.	163
B. Matériels et méthodes.....	163
1. <i>Protéine Ku.</i>	<i>163</i>
2. <i>ADN.....</i>	<i>163</i>
3. <i>Complexes streptavidine - ADN biotinylé aux extrémités.....</i>	<i>165</i>
4. <i>ADN avec cassures simple brin.....</i>	<i>166</i>
5. <i>Microscopie électronique à transmission.</i>	<i>167</i>
6. <i>Microscopie à force atomique.....</i>	<i>168</i>
C. Résultats et discussion.....	168
1. <i>Etude par AFM.....</i>	<i>168</i>
2. <i>Etude en MET.....</i>	<i>177</i>
3. <i>Discussion.</i>	<i>194</i>

Conclusion et perspectives.....	198
--	------------

Bibliographie du chapitre 5.....	199
---	------------

Conclusion générale.	208
----------------------------------	------------

Introduction générale.

Introduction générale.

L'ADN, support de l'information génétique, est une macromolécule qui présente un grand polymorphisme dans le noyau cellulaire. Il est sous le contrôle de machineries protéiques qui le structurent et régulent son métabolisme (recombinaison, réplication, transcription, réparation, ...). Les mécanismes de reconnaissance et d'assemblage des complexes nucléoprotéiques impliqués dans ces processus doivent être caractérisés en essayant de prendre en compte la diversité des interactions. Les connaissances actuelles résultent d'approches pluridisciplinaires faisant appel à des techniques biochimiques et biophysiques utilisées de manière complémentaire. L'imagerie de l'ADN prend une place de plus en plus importante parmi ces approches avec les développements de la microscopie électronique à transmission (MET) et de la microscopie à force atomique (AFM).

Les mécanismes de recherche par les protéines de structures ou de séquences particulières le long de l'ADN menant à la formation de complexes stables passent par des interactions faibles et des états intermédiaires. Ils sont difficiles à caractériser et donc peu documentés. Les techniques de microscopie sont des outils privilégiés pour étudier ces états.

Les méthodes d'observation en MET puis en cryoMET ont été développées depuis de nombreuses années et permettent de caractériser les complexes nucléoprotéiques d'un point de vue structural à haute résolution et/ou d'un point de vue dynamique à partir d'approches statistiques sur une grande population de molécules.

L'AFM offre de nouvelles perspectives de pouvoir combiner l'analyse structurale à haute résolution et l'analyse dynamique à des échelles de temps courts, sur des molécules uniques. De plus sa capacité à étudier des échantillons en milieu liquide ouvre le champ de la caractérisation fine des machineries protéiques sur l'ADN, en combinant résolution spatiale et temporelle. Ainsi le développement méthodologique et instrumental de l'AFM constitue un enjeu majeur de la biophysique pour comprendre à l'échelle moléculaire les propriétés et les mécanismes de régulation des génomes ; mon travail de thèse s'inscrit dans cette démarche.

La compréhension des interactions entre les biomolécules et la surface utilisée constitue le premier verrou méthodologique de l'étude des complexes nucléoprotéiques par AFM. Il faut satisfaire un compromis entre une accroche forte favorisant l'imagerie et une accroche faible favorisant la disponibilité de l'ADN pour interagir avec des ligands. L'étude du comportement des protéines le long de l'ADN nécessite également l'ancrage de l'ADN au niveau de ses extrémités entre des plots suffisamment distants pour l'obtention de molécules tendues. L'accessibilité de l'ADN aux ligands doit alors être caractérisée pour définir des conditions expérimentales optimales. Ces différents aspects sont présentés successivement dans ce mémoire.

Le premier chapitre rappelle les principales caractéristiques structurales de l'ADN et des protéines, leur polymorphisme, et les propriétés qui déterminent leurs interactions. Les diverses méthodes d'étude de l'ADN, des protéines, et des interactions ADN-protéines, aux différentes échelles d'analyse, sont ensuite resituées. Une attention particulière est portée aux méthodes mécaniques sur molécules uniques et aux méthodes de microscopie, afin de souligner les spécificités de l'AFM.

Le deuxième chapitre précise les différents modes de fonctionnement de l'AFM. Les principales limitations de l'instrument concernant la visualisation de l'ADN et des protéines et les pistes d'amélioration sont discutées à partir d'une analyse bibliographique. La capacité de l'AFM à réaliser des mesures de forces et des images en fait un outil polyvalent utilisé aussi dans bien d'autres domaines de la biologie, dont les principaux sont évoqués brièvement.

Le troisième chapitre commence par exposer la problématique de l'adsorption et de l'étalement de l'ADN sur le mica et l'état de l'art des méthodes utilisées. Nous présentons

ensuite de nouveaux éléments de compréhension et de caractérisation de l'adsorption en proposant un modèle semi-quantitatif pour décrire les interactions électrostatiques ADN-mica. Puis nous confrontons ce modèle à une étude expérimentale de la force d'adsorption de l'ADN sur le mica par AFM. Afin de pouvoir maintenir l'ADN accroché et étendu sur la surface indépendamment des conditions ioniques de la solution, nous testons ensuite plusieurs types de molécules dans la recherche d'un système d'ancrage de l'ADN entre deux plots distants.

Parallèlement au travail sur l'adsorption de l'ADN, il est essentiel de caractériser l'influence de la surface sur les interactions ADN-ligands. Nous nous intéressons ainsi dans le quatrième chapitre à l'accessibilité de l'ADN adsorbé vis-à-vis d'un ligand déjà bien caractérisé en biochimie : la bléomycine, dont l'effet sur l'ADN est facile à visualiser en microscopie. Nous comparons en fonction des conditions ioniques l'activité de la bléomycine sur les molécules d'ADN adsorbées et sur les molécules d'ADN en solution.

Dans le cinquième chapitre nous analysons les interactions entre l'ADN et un ligand beaucoup plus complexe : la protéine Ku, notamment impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. Nous étudions la reconnaissance de l'ADN par Ku, en fonction de la nature du substrat ADN, et nous testons la possibilité de suivre en direct la dynamique des interactions ADN-Ku sur la surface du mica par observation AFM en milieu liquide, dans différentes conditions d'adsorption.

Chapitre 1

Les différentes approches
d'étude de l'ADN
et des interactions ADN-protéines.

PLAN DU CHAPITRE 1

Introduction	11
I – Interactions ADN-protéines	11
A. L'ADN.	11
1. <i>Structure.</i>	11
2. <i>Courbure et flexibilité locales.</i>	14
3. <i>Topologie.</i>	17
B. Interactions ADN-protéines.	18
1. <i>Reconnaissance chimique et structurale.</i>	18
2. <i>Implication des propriétés locales de l'ADN.</i>	19
3. <i>Des processus dynamiques complexes.</i>	20
C. Etude in vitro de l'ADN et des interactions ADN-protéines.	21
1. <i>Paramètres et ordres de grandeurs.</i>	21
2. <i>Techniques d'étude.</i>	21
2.1. <i>Biochimie.</i>	21
2.2. <i>Biologie structurale.</i>	23
2.3. <i>Nouvelles approches de molécules uniques.</i>	24
II – Etude de l'ADN et des interactions ADN-protéines en microscopie.	26
A. Microscopie électronique en transmission (MET) et cryoMET.	27
B. Microscopie de fluorescence.	30
C. Microscopie à force atomique.	31
Conclusion	32
Bibliographie du chapitre 1	33

CHAPITRE 1

Les différentes approches d'étude de l'ADN et des interactions ADN-protéines.

Introduction

Le polymorphisme structural de l'ADN et des protéines capables de s'y lier détermine la variété de leurs interactions. Les connaissances actuelles sur l'ADN et les interactions ADN-protéines résultent d'approches pluridisciplinaires utilisant des techniques biochimiques et biophysiques. Parmi celles-ci les techniques de micromanipulation et les techniques d'imagerie de molécules uniques se sont particulièrement développées ces dernières années, et ont complètement changé l'approche par rapport aux techniques plus traditionnelles de la biochimie et de la biologie structurale.

I – Interactions ADN-protéines.

A. L'ADN.

1. Structure.

L'ADN (pour Acide DéoxyriboNucléique) double brin se présente sous la forme de deux chaînes de polydéoxynucléotides enroulées en double hélice. Chacune des deux chaînes est constituée d'une alternance de sucres désoxyriboses et de phosphates associés par des liaisons phosphodiester. Une base parmi quatre est portée par chaque sucre : l'adénine (A) ou la guanine (G), qui sont des purines, la thymine (T) ou la cytosine (C), qui sont des pyrimidines (**figure I-1a**). L'ensemble base + sucre + phosphate constitue l'élément de base de l'ADN, le nucléotide (**figure I-1b**). Les deux chaînes sucre-phosphate de l'ADN sont maintenues associées par appariement spécifique entre les bases des nucléotides, A d'une chaîne avec T de l'autre chaîne et G d'une chaîne avec C de l'autre chaîne. Cet appariement est médié par des liaisons hydrogène (**figure I-2**). L'orientation des deux chaînes sucre-phosphate, indiquée par la polarité 5' phosphate – 3' OH, est antiparallèle.

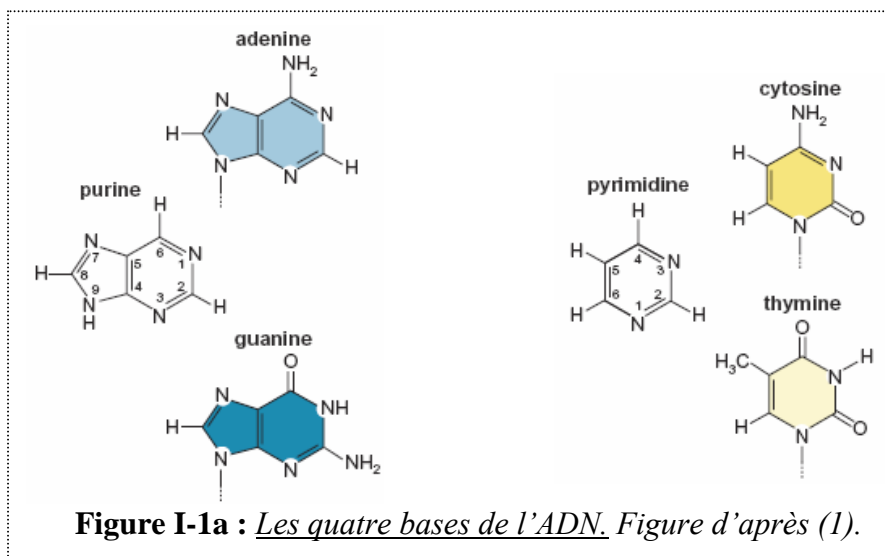


Figure I-1a : *Les quatre bases de l'ADN. Figure d'après (1).*

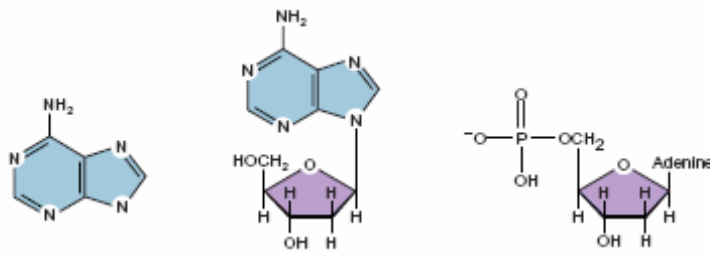


Figure I-1b : L'ensemble base + sucre constitue le nucléoside, l'ensemble nucléoside + phosphate constitue le nucléotide. Figure d'après (1).

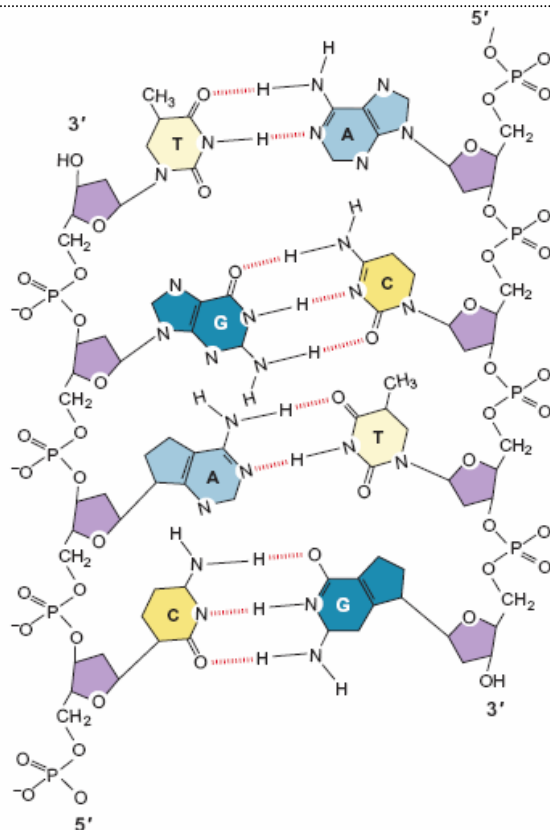


Figure I-2 : Représentation 2D d'une portion d'ADN double brin. L'adénine est appariée spécifiquement à la thymine par 2 liaisons hydrogène, et la guanine à la cytosine par 3 liaisons hydrogènes. Les deux chaînes sucre-phosphate ont une orientation 5' phosphate - 3' OH antiparallèle. Figure d'après (1).

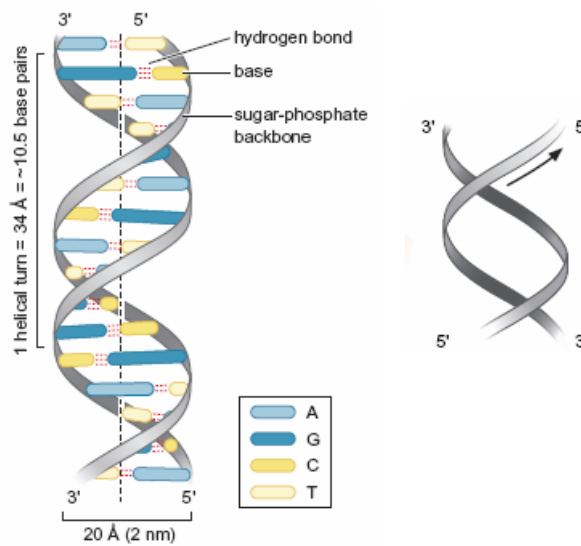


Figure I-3 : *Enroulement des 2 brins de l'ADN B en hélice droite. Figure d'après (1).*

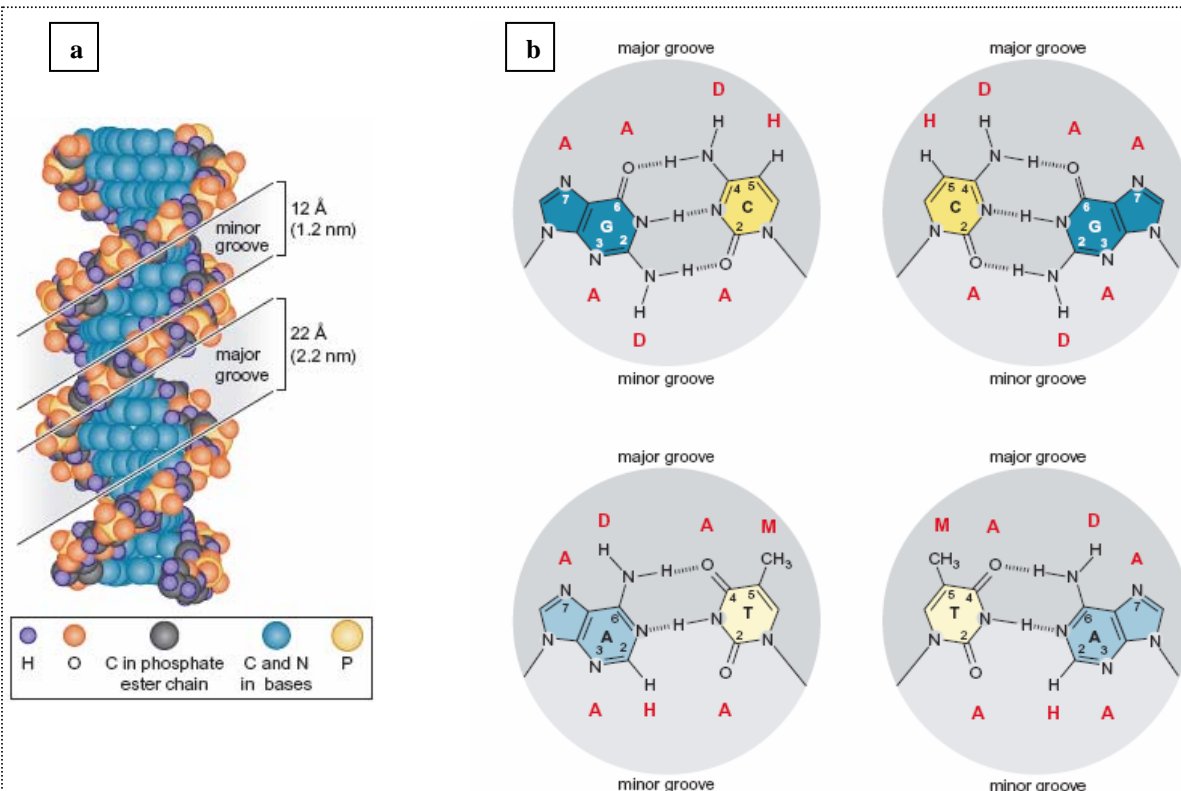
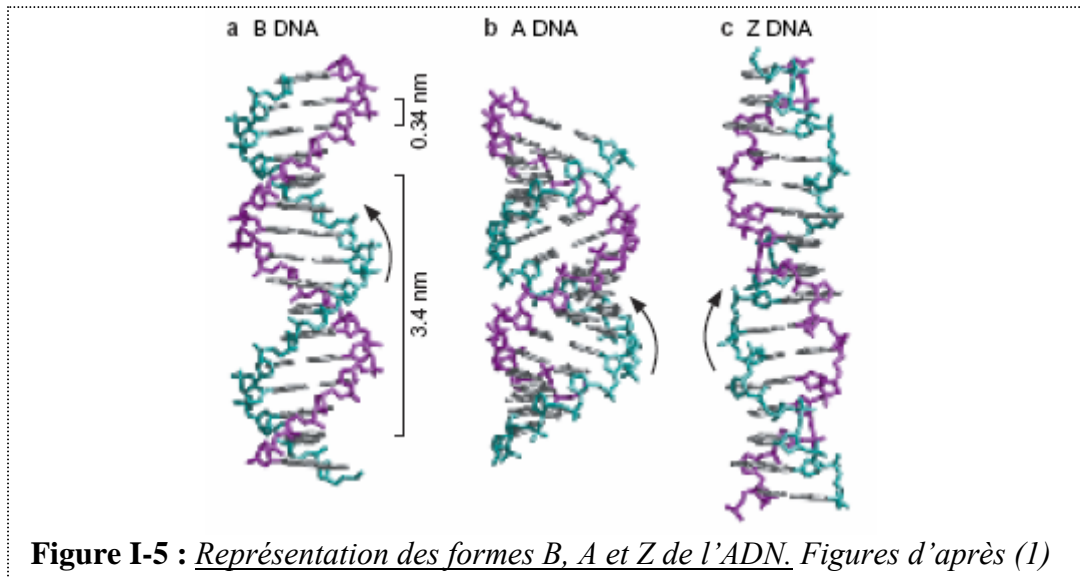


Figure I-4 : *a) La double hélice d'ADN présente un grand sillon et un petit sillon ; b) Le grand sillon est plus riche en information chimique que le petit sillon. Figures d'après (1)*

Historiquement trois formes de l'ADN double brin ont été décrites : les formes A, B et Z. Dans la forme la plus courante en solution (hélice droite appelée forme B) un tour d'hélice correspond en moyenne à 10,5 paires de nucléotides, soit un pas de 3,4 nm (figure I-3). L'hélice présente deux sillons de tailles différentes : le grand sillon, et le petit sillon (figure I-4). Comme la forme B, la forme A est une double hélice droite, mais les paires de bases sont positionnées et inclinées différemment par rapport à l'axe de la double hélice. Le grand sillon est plus profond et plus étroit dans la forme A que dans la forme B, et le petit sillon est moins

profond et plus large. Le changement de conformation entre les formes A et B est réversible en fonction de l'hydratation relative de l'hélice, la forme A apparaissant quand celle-ci diminue. La forme Z est une hélice gauche qui peut être observée au niveau de répétitions d'alternances purine/pyrimidine et à haute force ionique (**figure I-5**). Ces trois formes peuvent coexister le long d'une même molécule d'ADN, lui conférant ainsi un polymorphisme local.



L'ADN est le plus souvent sous forme double brin comme décrit ci-dessus mais il existe aussi sous d'autres états au cours de la vie de la cellule. En particulier, il y a besoin que la double hélice de l'ADN s'ouvre (dénaturation) lors de mécanismes comme la réplication, la transcription, ... L'ADN est alors localement sous forme simple brin. L'ADN peut aussi subir d'autres contraintes (étirement, compaction, ...) lors des différentes phases du cycle cellulaire.

2. Courbure et flexibilité locales.

L'approche du polymorphisme structural de l'ADN ne se réduit pas à une description globale par les formes A, B ou Z. Au niveau de l'enchaînement des paires de bases, les contraintes géométriques et stériques d'empilement des cycles puriques et pyrimidiques (qui peuvent être décrites par les paramètres de la **figure I-6**) entraînent des variations locales de conformation, dépendantes de la séquence. Ces variations sont habituellement décrites en termes de courbure locale (partie statique, correspondant à la position d'équilibre moyenne de l'axe de la double hélice) et de flexibilité locale (partie dynamique, correspondant à l'écart supposé isotrope autour de la position moyenne). Considérer la flexibilité locale comme isotrope est en réalité simplificateur, elle varie en fonction de la direction : certaines séquences peuvent se plier plus facilement dans un sens que dans un autre. Courbure et flexibilité locales de l'ADN sont aussi affectées par les structures particulières qui peuvent être rencontrées le long de la séquence, par exemple celles qui résultent de dommages (bases modifiées, cassures simple brin, ...). Comme les variations de conformation observées résultent de la superposition des deux propriétés, il est difficile de dissocier leurs contributions respectives.

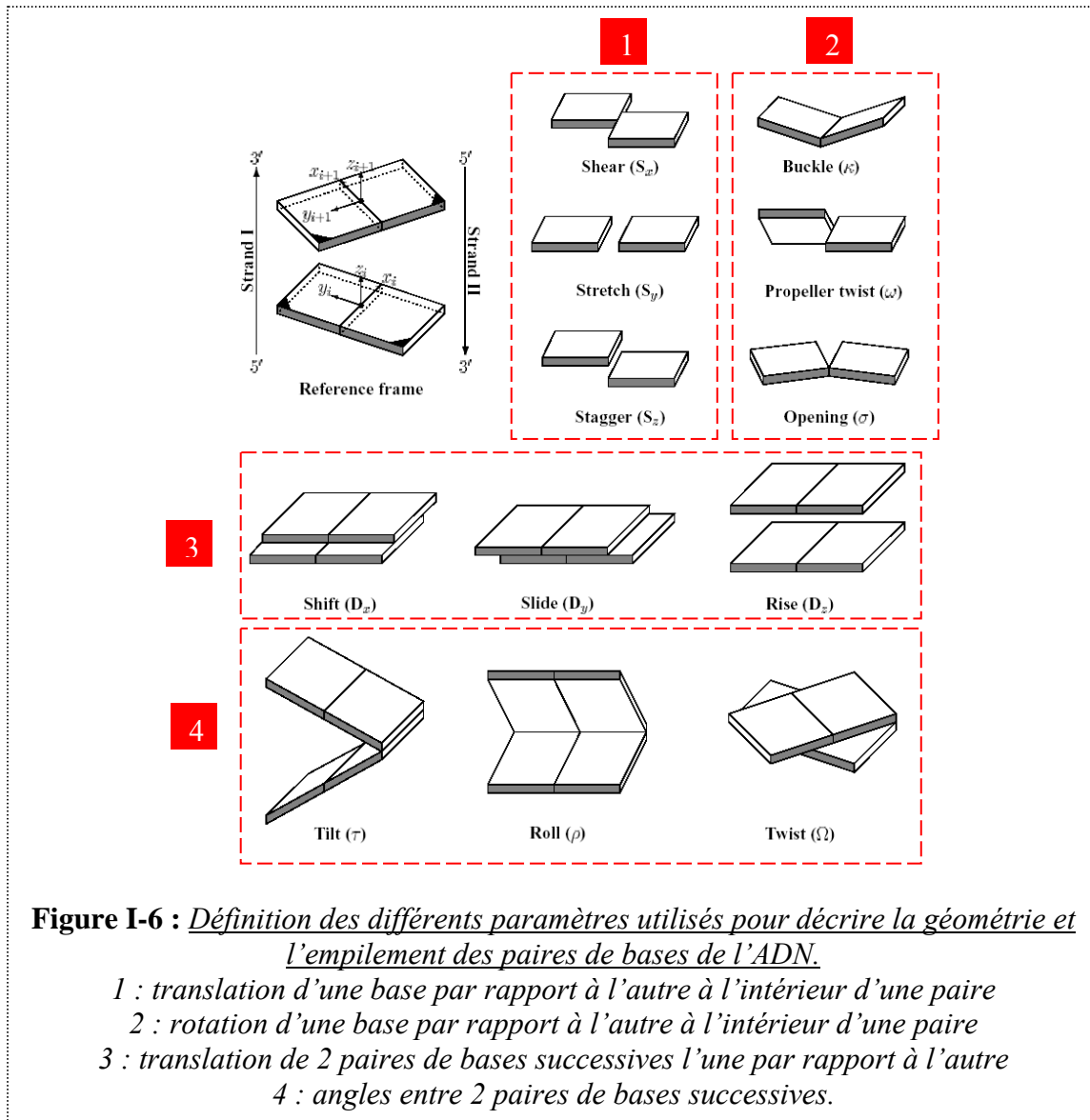


Figure I-6 : Définition des différents paramètres utilisés pour décrire la géométrie et l'empilement des paires de bases de l'ADN.

1 : translation d'une base par rapport à l'autre à l'intérieur d'une paire

2 : rotation d'une base par rapport à l'autre à l'intérieur d'une paire

3 : translation de 2 paires de bases successives l'une par rapport à l'autre

4 : angles entre 2 paires de bases successives.

La composante axiale de la courbure locale est essentiellement caractérisée par les variations des angles d'inclinaison (*tilt*) (pliure vers une chaîne sucre-phosphate ou l'autre) et de roulis (*roll*) (pliure vers le petit ou vers le grand sillon) des paires de bases successives. La composante torsionnelle de la courbure locale est caractérisée par les variations d'angle de torsion (*twist*) entre les paires de bases successives. L'angle de *twist* est en moyenne de 36° pour l'ADN B, il est à l'origine de la périodicité de la double hélice. Une variation locale de cet angle génère une contrainte torsionnelle. La répétition d'un motif de courbure locale en phase avec le pas de l'hélice entraîne une courbure à plus grande échelle, comme dans les suites de A espacés de 10,5 paires de bases dans l'ADN B.

La flexibilité globale d'un polymère est généralement caractérisée par sa longueur de persistance L_p . Ce paramètre doit être estimé à partir d'un modèle de l'ADN. Le plus courant est le modèle de *Worm-Like Chain* (WLC), qui considère l'ADN comme un polymère semi-rigide formé d'une succession de bâtonnets droits et rigides (figure I-7). La longueur de persistance L_p correspond alors à la distance L sur laquelle les directions de deux bâtonnets séparés de L restent corrélées. En considérant que les bâtonnets sont de longueur h et articulés entre eux par une rotation libre d'angle ϑ :

$$L_p = \frac{h}{1 - \cos \vartheta}$$

Avec ϑ petit :

$$L_p \approx \frac{2h}{\langle \theta^2 \rangle}$$

L_p ne dépend pas de la longueur de contour de la molécule d'ADN considérée, mais elle est affectée par les conditions du milieu, en particulier les concentrations en cations.

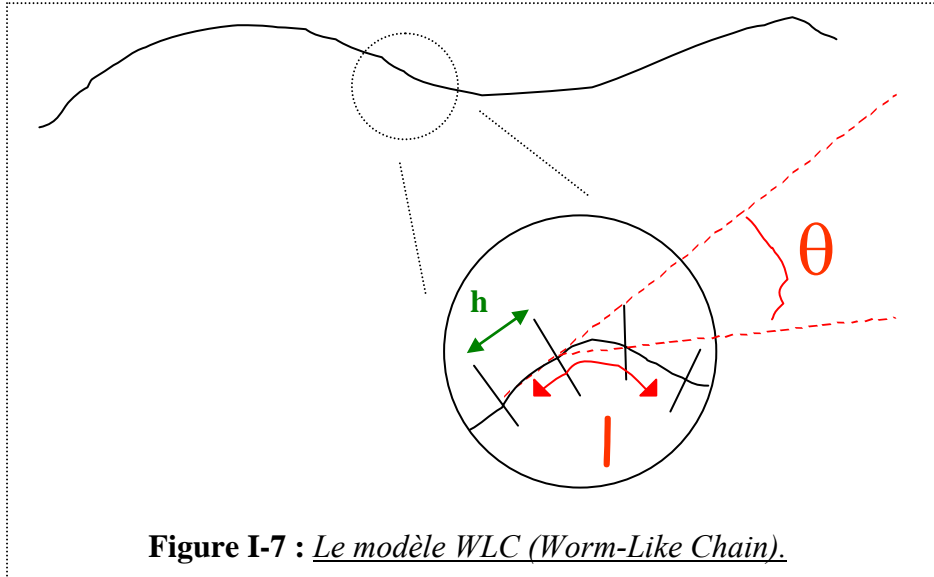


Figure I-7 : *Le modèle WLC (Worm-Like Chain).*

A pH physiologique ($\sim 7,5$) L_p varie peu dans la gamme NaCl 10 mM – NaCl 400 mM, où elle vaut environ 50 nm. Aux concentrations inférieures la molécule d'ADN est beaucoup plus rigide ($L_p \sim 80-100$ nm à NaCl < 1 mM), à cause de la répulsion entre les phosphates de l'ADN. Aux concentrations supérieures, l'écrantage des charges des phosphates fait que la molécule d'ADN apparaît plus souple ($L_p \sim 30$ nm à NaCl ~ 1 M). Les résultats sont plus disparates dans le cas des cations divalents (2). Les principales méthodes expérimentales pour déterminer L_p sont récapitulées dans (3).

Les variations locales de flexibilité sont plus difficiles à caractériser. D'un point de vue conceptuel, le caractère hétéropolymérique et le polymorphisme structural de l'ADN sont pris en compte dans la formule :

Equation 1 :

$$\frac{1}{L_{p,app}} = \frac{1}{L_{p,stat}} + \frac{1}{L_{p,dyn}}$$

avec

$L_{p,app}$: longueur de persistance apparente de la molécule d'ADN

$L_{p,stat}$: longueur de persistance statique, liée à la géométrie et aux contraintes d'empilement (courbure intrinsèque)

$L_{p,dyn}$: longueur de persistance dynamique, liée aux fluctuations thermiques (flexibilité intrinsèque).

3. Topologie.

Dans la cellule il n'y a jamais d'extrémités d'ADN libres. Chez les procaryotes, l'ADN est circulaire, fermé sur lui-même ; chez les eucaryotes, il est maintenu dans des boucles, qui déterminent des domaines topologiques. Lorsque l'ADN est fermé, en plus des propriétés locales décrites ci-dessus, une nouvelle dimension apparaît : la topologie. Les cercles ou les boucles peuvent présenter un surenroulement de la double hélice d'ADN. Si le nombre de croisements des deux brins est supérieur à celui de la forme relâchée le surenroulement est dit positif, s'il est inférieur il est dit négatif. Le surenroulement prend en compte la torsion (*twist*) et le vrillage (*writhe*) de l'ADN, avec la formule :

Equation 2 :

$$L_k = T_w + W_r$$

L_k : enlacement

T_w : torsion

W_r : vrillage

L_k correspond au nombre de fois où les deux brins de l'ADN se croisent dans le même sens ; c'est toujours un nombre entier. T_w correspond au nombre de tours d'hélice d'un brin de l'ADN autour de l'autre brin. Le vrillage peut exister sous deux formes : le vrillage plectonémique, dans lequel l'axe de la double hélice s'enroule autour de lui-même, et le vrillage toroïde, dans lequel il s'enroule pour former une spirale cylindrique (**figure I-8**) ; W_r est donc le nombre total d'enroulements plectonémiques et/ou toroïdes.

L'équation 2 traduit le fait que sur un ADN circulaire, l'état topologique ne peut pas varier (sans coupure d'au moins un des deux brins), mais que la torsion et le vrillage sont topologiquement interconvertibles, en fonction des distorsions mécaniques subies par la molécule d'ADN. Une coupure simple brin permet aux deux brins de se détordre ou de se tordre en tournant l'un autour de l'autre, pour minimiser les contraintes ; l'ADN adopte alors une forme circulaire relâchée. Une coupure double brin fait apparaître la forme linéaire.

Le degré ΔL_k de sur- ou de sous-enroulement est défini par rapport au nombre d'enlacement de la forme circulaire relâchée, noté L_k^0 : $\Delta L_k = L_k - L_k^0$. Dans les cellules vivantes les fonctions biologiques de régulation de l'ADN nécessitent la plupart du temps que l'ADN soit sous forme surenroulée négativement, sauf chez certains organismes où il peut être surenroulé positivement (bactéries thermophiles). Ce surenroulement négatif correspond à un déroulement partiel de l'ADN, laissant apparaître des zones dénaturées.

La répartition de la topologie sur un ADN circulaire fermé est notamment dépendante des conditions ioniques : à basse force ionique, la structure est plutôt sous forme toroïde tandis qu'à force ionique élevée, la structure est plutôt sous forme plectonémique. Certains ligands, notamment certaines protéines, sont aussi capables d'introduire du surenroulement, en modifiant la torsion ou le vrillage de l'ADN. Un exemple très connu est l'enroulement de l'ADN en superhélice gauche autour des octamères d'histone, dans la chromatine.

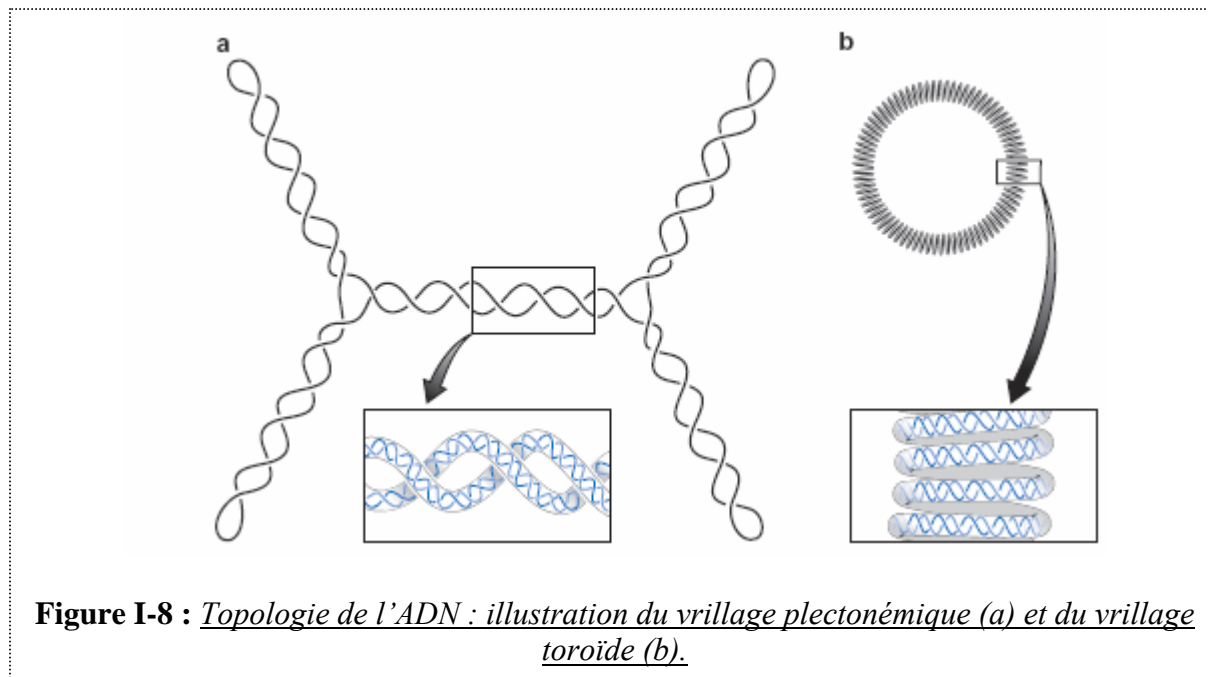


Figure I-8 : Topologie de l'ADN : illustration du vrillage plectonémique (a) et du vrillage toroïde (b).

B. Interactions ADN-protéines.

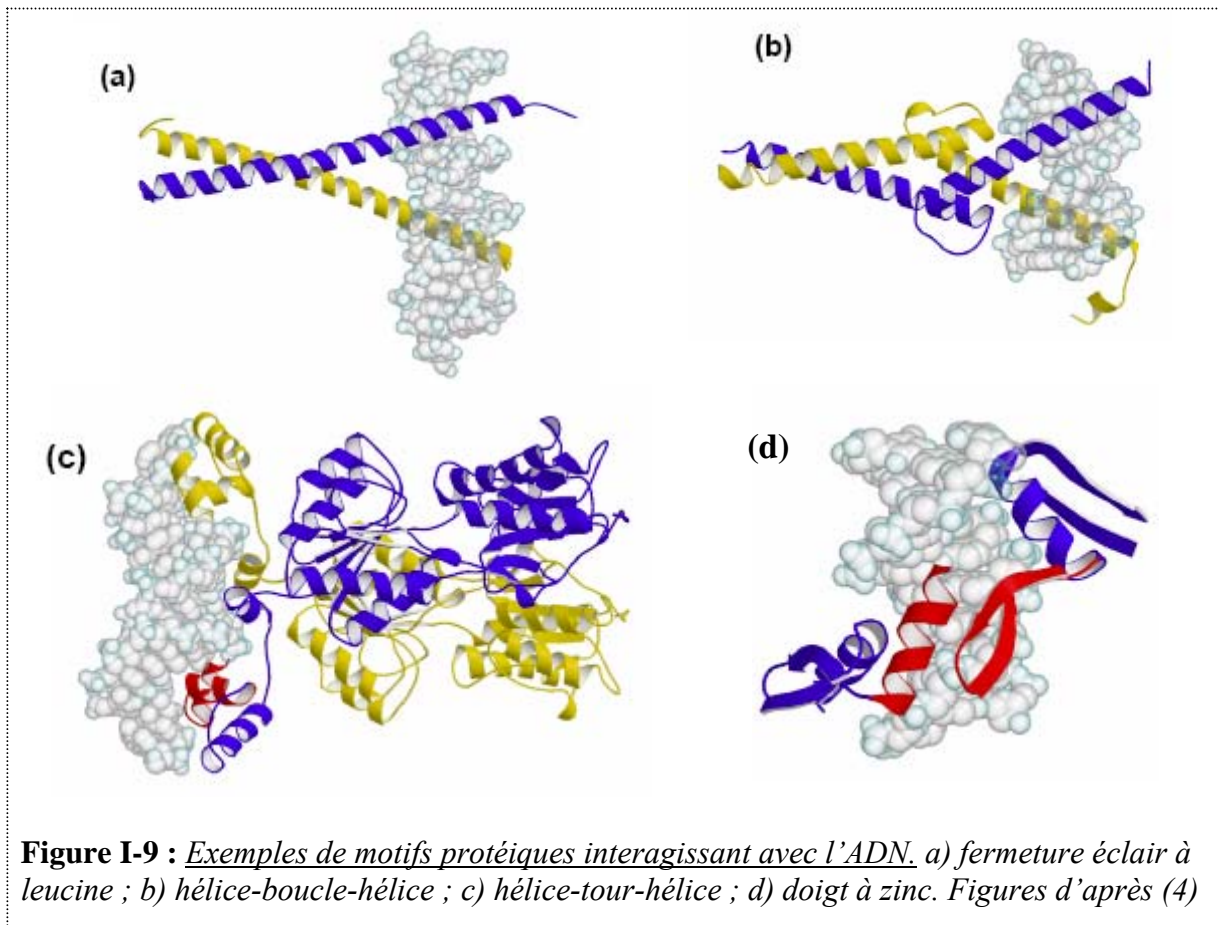
1. Reconnaissance chimique et structurale.

Les acides aminés qui constituent une protéine se distinguent par leur chaîne latérale, qui leur confère des propriétés différentes (chargé +, chargé -, polaire non chargé, hydrophobe) et déterminent le repliement de la protéine en une structure tridimensionnelle. Les groupes qui restent accessibles dans la protéine repliée déterminent son affinité différentielle pour l'ADN, la membrane cellulaire, d'autres protéines... Parmi les protéines capables de se lier à l'ADN, différents types de liaisons entre les acides aminés des protéines et l'ADN ont été caractérisés : liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals, liaisons électrostatiques, liaisons hydrophobes... Toutes ces liaisons contribuent à une affinité générale de la protéine pour l'ADN et à la stabilisation d'un complexe.

Certaines protéines reconnaissent une séquence d'ADN spécifique ; la majorité d'entre elles reconnaissent leur séquence cible du côté du grand sillon. Les protéines sans spécificité de séquence interagissent pour la plupart plutôt du côté du petit sillon, où les bases sont moins accessibles et où l'information chimique est moins riche. Le motif de donneurs et d'accepteurs de liaison hydrogène exposé dans les sillons identifie chimiquement la paire de bases auquel il appartient. Le grand sillon est plus riche en information chimique que le petit sillon et donc davantage impliqué dans la discrimination de la séquence de l'ADN par les ligands.

Les repliements différents des protéines correspondent à différents modes de liaison à l'ADN. Les domaines protéiques interagissant avec l'ADN peuvent être classés en fonction de leur organisation structurale tridimensionnelle. Initialement un certain nombre de motifs ont été caractérisés : motifs hélice-boucle-hélice, motifs à doigts à zinc, fermetures éclair à leucine (*leucine zipper*) et motifs hélice-tour-hélice ; plusieurs autres familles de structures impliquant soit des hélices α soit des structures β ont aussi été identifiées (4), cette classification restant non exhaustive (**figure I-9**). En plus de ce polymorphisme de domaines

protéiques, il existe des protéines qui interagissent avec l'ADN sous forme monomérique, sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, ou sous forme de multimères plus complexes.



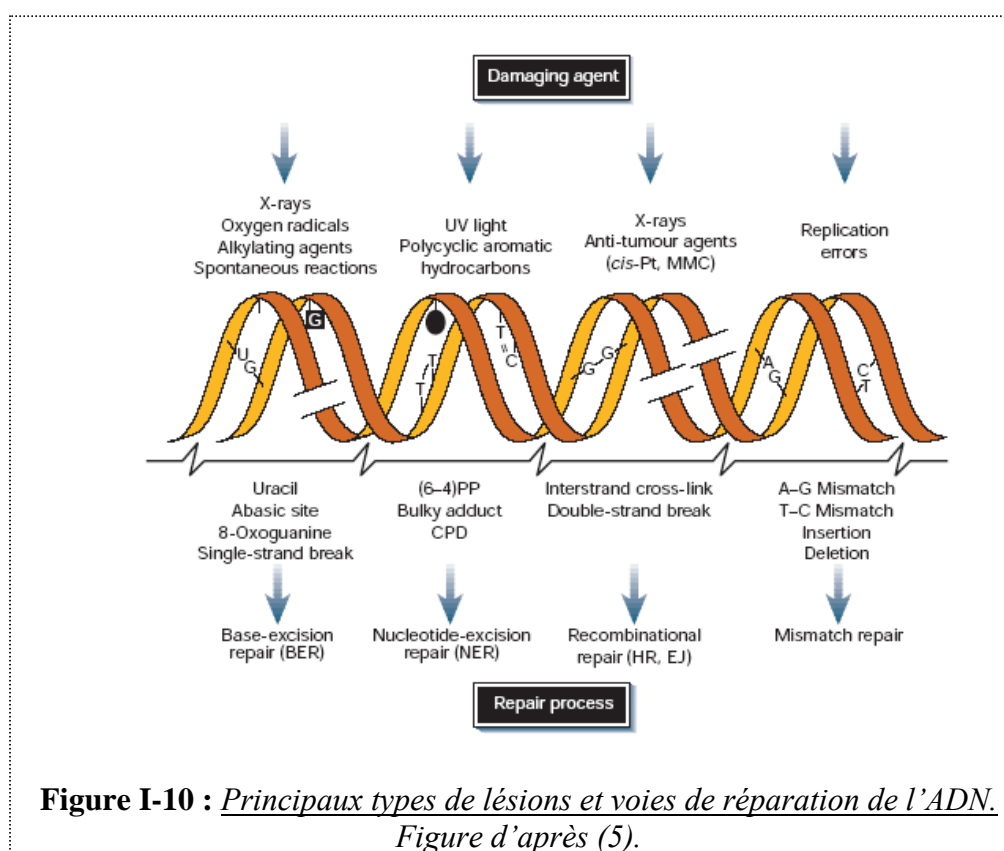
2. Implication des propriétés locales de l'ADN.

Comme nous venons de le décrire, la formation d'un complexe ADN-protéine résulte d'une reconnaissance à la fois chimique et structurale entre l'ADN et un domaine protéique. Les interactions dépendent des propriétés de liaison mais aussi de l'accessibilité des sites de liaison, c'est-à-dire de contraintes stériques. Le mécanisme de reconnaissance implique en général l'accessibilité du petit et du grand sillon, dont la taille et les propriétés géométriques varient en fonction de la séquence de l'ADN. Une conformation locale particulière de l'ADN peut être sélectionnée ou induite pour favoriser au moindre coût énergétique les liaisons nécessaires à la formation du complexe. La courbure et la flexibilité locales de l'ADN, ainsi que sa topologie, jouent un rôle déterminant dans cette adaptation dynamique du motif protéique et du motif nucléotidique. Les contraintes stériques peuvent également être liées à l'état de l'ADN, par exemple la dénaturation locale de l'ADN, qui est plus facile dans les zones riches en A/T que dans les zones riches en G/C, et rend l'ADN accessible sous forme simple brin. Ce sont essentiellement des protéines de structure (par exemple les histones) ou des moteurs moléculaires (par exemple les polymérases, les hélicases, les topoisomérases,...) qui sont connues pour stabiliser ou induire des états ou des conformations particulières de l'ADN.

3. Des processus dynamiques complexes.

Il existe une variété énorme de types de complexes ADN-protéines, avec par exemple des protéines qui :

- étalent l'ADN simple brin comme la gp32
- avancent et transloquent sur l'ADN simple brin comme les hélicases hexamériques
- glissent en anneau le long de l'ADN comme PCNA
- travaillent sur l'ADN simple brin pour synthétiser un brin complémentaire comme les polymérases
- permettent à la polymérase de se positionner au niveau d'un promoteur comme les facteurs de transcription
- structurent l'ADN comme les protéines histones
- ...



La combinaison du polymorphisme de l'ADN et du polymorphisme des protéines entraîne des affinités différentielles et des stabilités très diverses au sein de cette variété de complexes ADN-protéines. Le jeu permanent de l'association et de la dissociation des complexes permet à de nombreux processus dynamiques impliquant plusieurs acteurs protéiques de se dérouler sur l'ADN. Les mécanismes de reconnaissance de l'ADN peuvent prendre en compte le grand ou le petit sillon, des états particuliers comme celui de l'ADN dénaturé, des lésions particulières de l'ADN comme des bases modifiées chimiquement, des bases mésappariées, des cassures de la chaîne sucre-phosphate... La régulation de la maintenance de l'ADN est un excellent exemple illustrant à la fois diversité des protéines et la diversité des états de l'ADN (**figure I-10**) : la reconnaissance et le traitement des lésions font appel au recrutement de nombreuses protéines, qui réalisent des mécanismes de réparation spécifiques du type de lésion.

Les mécanismes de réparation par excision de base (*Base Excision Repair* ou BER) et de réparation par incision de nucléotide (*Nucleotide Incision Repair* ou NIR) traitent essentiellement les bases modifiées chimiquement. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (*Nucleotide Excision Repair* ou NER) répare notamment les lésions induites lors de l'exposition aux rayonnements, comme les photoadduits qui peuvent résulter de l'exposition aux ultraviolets. Le mécanisme de *MisMatch Repair* (MMR) corrige les mésappariements qui peuvent survenir lors de la réplication ou de la recombinaison homologue.

Pour la réparation des cassures double brin, deux voies de réparation sont décrites : la recombinaison homologue (*Homologous Recombination* ou HR) et la jonction non homologue d'extrémités (*Non Homologous End-Joining* ou NHEJ). La HR dépend de l'utilisation d'un ADN homologue – tel que l'ADN de la chromatide sœur dans les phases S et G2 du cycle cellulaire – tandis que le NHEJ accole et joint les deux extrémités de la cassure au sein d'un complexe ADN-protéines sans que l'utilisation d'une homologie soit nécessaire.

C. Etude *in vitro* de l'ADN et des interactions ADN-protéines.

L'étude fine des interactions ADN-protéines se fait par des techniques d'analyse *in vitro* qui font appel à la biochimie et à la biophysique. De nombreuses techniques ont été développées pour caractériser la nature des interactions et les stoechiométries mises en jeu.

1. Paramètres et ordres de grandeurs.

Au niveau macroscopique d'un ensemble de molécules, la liaison protéine-ADN est caractérisée classiquement par des constantes d'équilibre thermodynamique : constante d'association K_a (ou de dissociation $K_d = 1/K_a$) (6), reliées aux vitesses d'association k_{on} (en $M^{-1}.s^{-1}$) et de dissociation k_{off} (en s^{-1}) par : $K_d = k_{off}/k_{on}$ (7). Le K_d est situé entre le μM et le nM en fonction de l'affinité de la protéine pour l'ADN. Dans le cas simple d'une protéine interagissant avec un seul site sur l'ADN, K_a est reliée à la concentration en ADN, en protéine, et en complexe ADN-protéine par :

Equation 1 :

$$K_d = \frac{[ADN] \cdot [protéine]}{[complexe]}$$

Au niveau de la molécule individuelle, les ordres de grandeur pertinents pour décrire les interactions ADN-protéines sont typiquement le nanomètre pour les longueurs, le piconewton pour les forces, et la milliseconde pour le temps. Nous allons maintenant examiner à quelles échelles les principales techniques d'étude *in vitro* apportent des informations.

2. Techniques d'étude.

2.1. Biochimie.

Ce sont les techniques de la biochimie qui sont le plus traditionnellement utilisées pour analyser *in vitro* les états et les propriétés de l'ADN et les interactions ADN-protéines.

Les méthodes de gels retard ont d'abord été mises au point pour caractériser les états de l'ADN nu (taille, changements de conformation, topologie). Naturellement ces méthodes ont été utilisées aussi pour caractériser les complexes ADN-protéines. Elles sont fondées sur l'analyse des changements de mobilité électrophorétique de l'ADN en fonction de ses

propriétés et/ou sous l'effet de la liaison aux protéines. La migration de l'ADN dans le gel dépend en premier lieu de sa longueur et de sa conformation ; il existe des migrations particulières pour des ADN de même taille qui traduisent des propriétés de courbure et de flexibilité locales différentes. La migration de l'ADN dépend également de sa topologie (surenroulé, relâché, linéaire) et des méthodes existent pour caractériser finement le degré de surenroulement. Concernant les interactions ADN-protéines, il est possible d'étudier la stoechiométrie des complexes ADN-protéine, l'affinité relative d'une protéine pour différents substrats, voire même d'identifier la composition en protéines d'un complexe à l'aide d'anticorps spécifiques (pour une revue voir (7)). (figure I-11a).

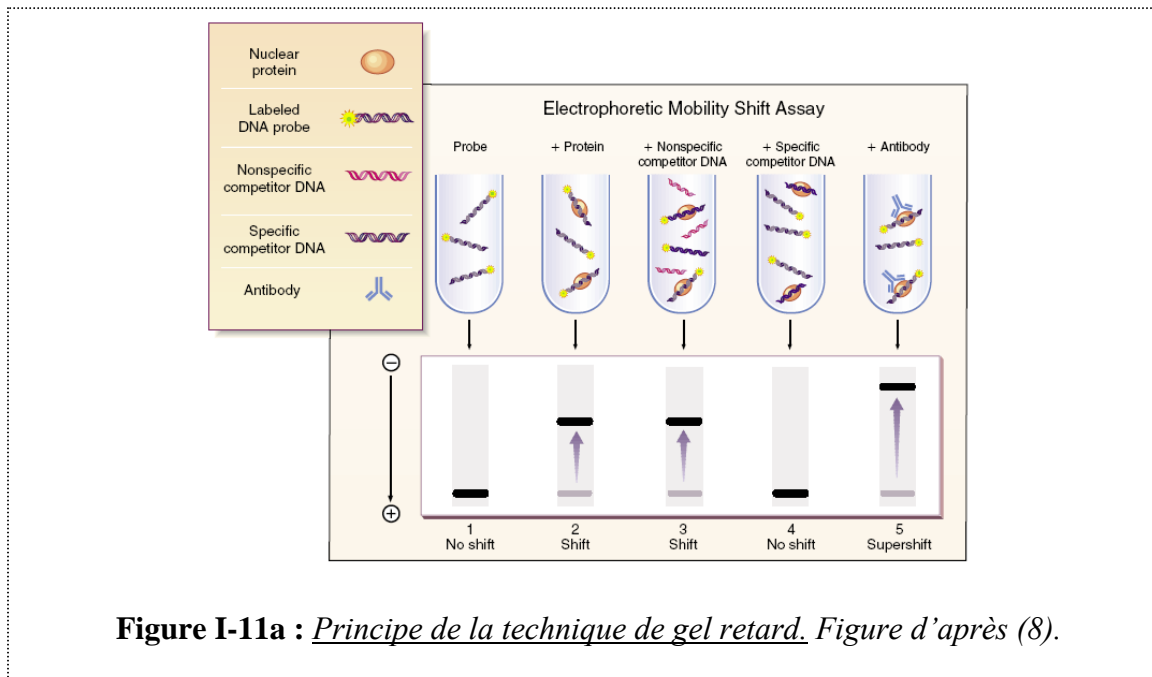


Figure I-11a : Principe de la technique de gel retard. Figure d'après (8).

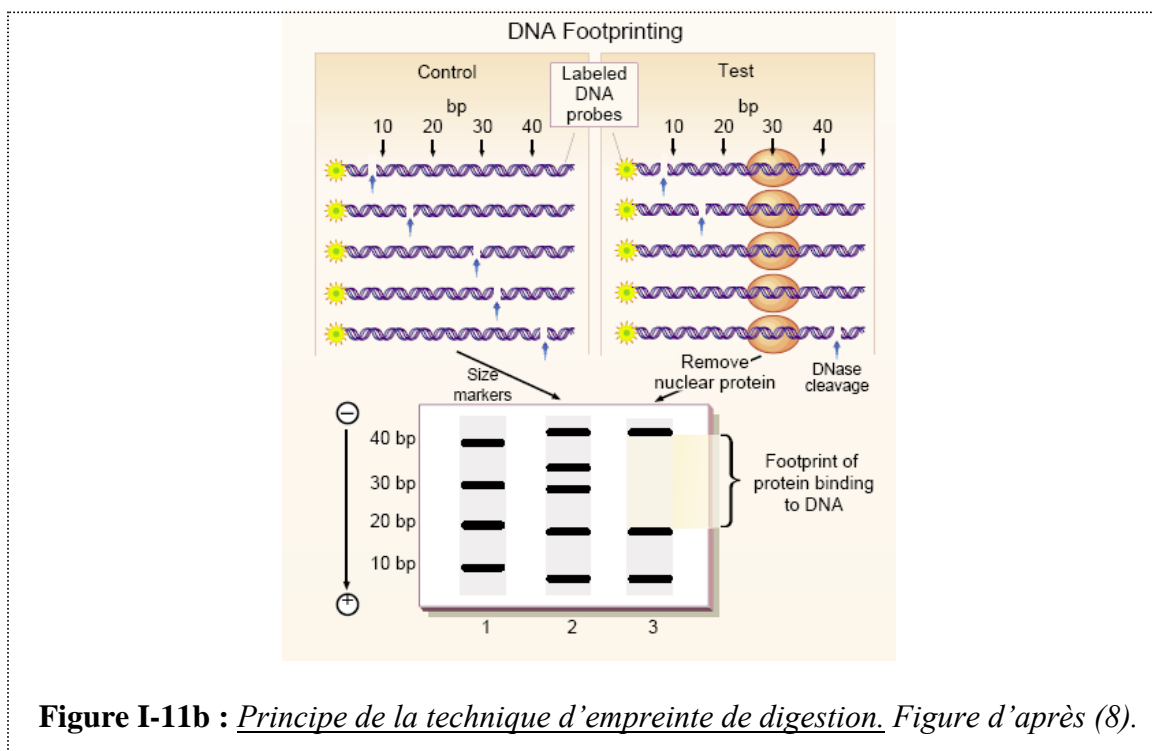


Figure I-11b : Principe de la technique d'empreinte de digestion. Figure d'après (8).

Le *footprinting* ou technique d’empreinte de digestion d’ADN est aussi très utilisé. Il permet d’analyser l’accessibilité d’une séquence par une sonde (enzyme ou réactif chimique) capable de couper l’ADN, pour caractériser les bases de l’ADN impliquées dans l’interaction avec une protéine, et éventuellement les déformations locales. Les sites sur l’ADN où la protéine étudiée s’est liée sont exclus de la coupure par la sonde et peuvent être révélés par migration sur gel retard ; les blancs dans le motif de coupure du fragment d’ADN représentent l’empreinte de liaison ou *footprint* caractéristique de la protéine. L’une des méthodes les plus connues est celle développée par Galas et Schmitz en 1978, le *footprinting* par la DNase I, où la protéine liée à l’ADN dans un complexe protège la région de liaison de la digestion par la DNase I (chapitre 1 de (9)) (**figure I-11b**). Le *footprinting* par les radicaux hydroxyle est aussi très utilisé (chapitre 3 de (9)).

Il existe beaucoup d’autres techniques, qui, comme pour les deux exemples présentés ici, permettent la caractérisation précise d’un comportement moyen d’équilibre, des propriétés physico-chimiques de l’interaction et/ou de la cinétique de liaison entre un ADN et une protéine. Les propriétés sont mises en évidence à l’échelle globale de la quantité de molécules mises en interaction.

2.2. Biologie structurale.

Il est possible d’étudier la structure de l’ADN, des protéines et de leurs complexes à l’échelle atomique en utilisant les techniques de la biologie structurale, principalement la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le prérequis pour étudier la structure d’une molécule ou d’un complexe biologique par cristallographie aux rayons X est d’obtenir un cristal tridimensionnel bien ordonné. L’analyse du motif de diffraction du cristal permet de remonter à la répartition spatiale des nuages électroniques, puis de reconstruire une structure tridimensionnelle de la molécule ou du complexe cristallisé. La résolution est de l’ordre de la longueur d’onde du rayonnement X, aux alentours de 0,1 nm. Un des plus beaux exemples en biologie structurale a été l’élucidation de la structure de l’ADN par Watson et Crick en 1953 (10) (**figure I-12**). La technique est aujourd’hui très utilisée pour établir une structure tridimensionnelle de protéines (petites protéines ou sous-domaines de grosses protéines), pour étudier la conformation de petites séquences (au plus une vingtaine de paires de bases) ou de structures d’acides nucléiques particulières (revue dans (11)), ou encore pour analyser la structure de certains complexes ADN-protéines.

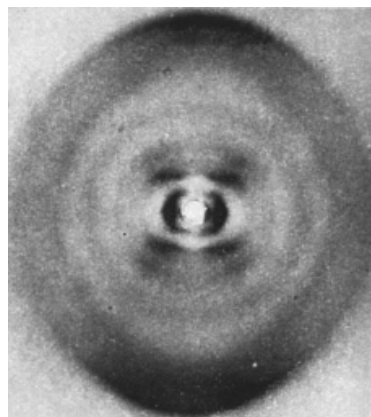
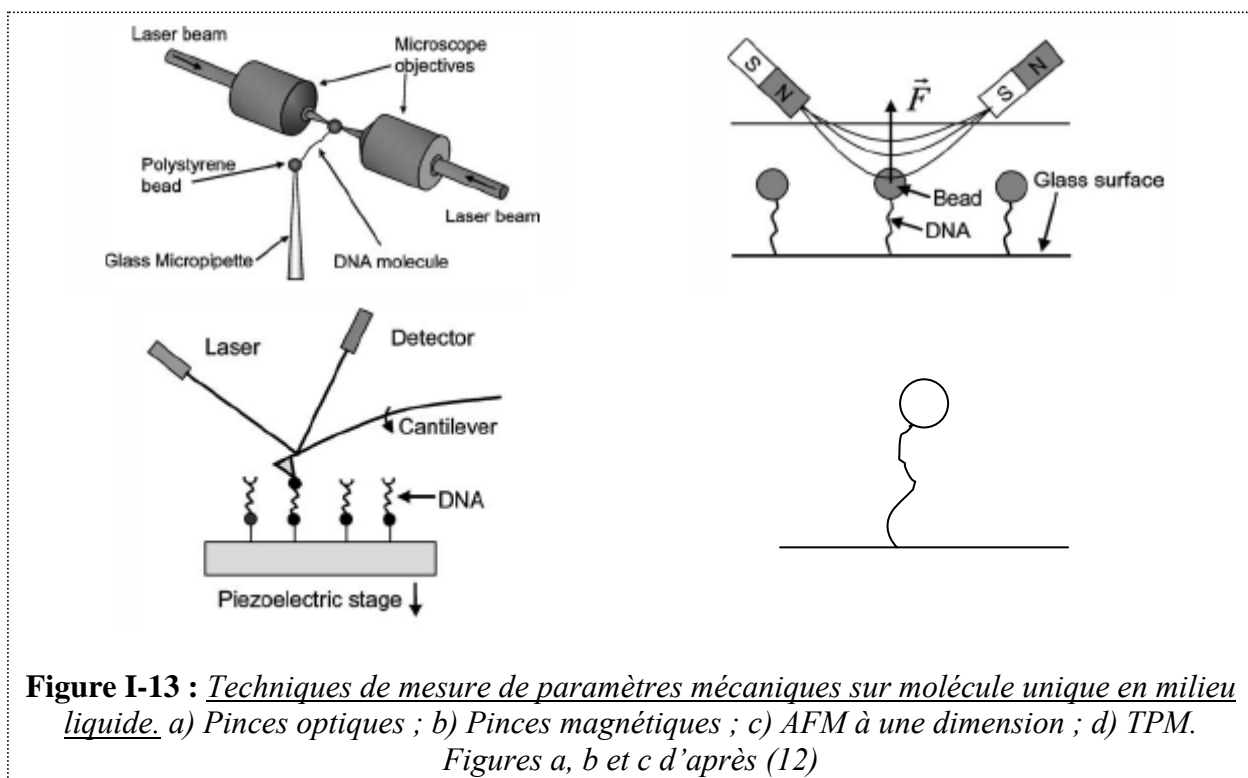


Figure I-12 : *Figure de diffraction de l’ADN publiée par Watson et Crick en 1953. Image tirée de (10).*

La RMN apporte ces informations de manière complémentaire en permettant de travailler sur molécules purifiées mais restant en solution. Elle utilise les propriétés de certains noyaux atomiques particuliers tels que ^1H , ^{13}C , ^{15}N et ^{31}P , qui possèdent un moment magnétique (ou spin) nucléaire ; quand l'échantillon est placé dans un champ magnétique élevé, les spins s'alignent dans la direction du champ. En appliquant des impulsions radiofréquence contrôlées cet alignement d'équilibre est perturbé ; le retour des spins à l'alignement d'équilibre s'accompagne de l'émission d'ondes dont les fréquences sont caractéristiques de chaque type de noyau et de leur environnement chimique. L'analyse des différents signaux permet de les attribuer à des atomes précis et de remonter à la distance entre atomes, pour aboutir à une reconstruction tridimensionnelle de la molécule étudiée. De plus en plus il est aussi possible d'aborder des aspects de dynamique moléculaire. Mais l'utilisation de la RMN en biologie se limite aux petites molécules : ADNs courts, petites protéines (typiquement jusqu'à ~150 acides aminés) ou sous-domaines de protéines de plus grande taille, complexes entre de petits motifs d'ADN et des protéines.

Ces techniques ont déjà permis de caractériser les structures d'un grand nombre de complexes ADN-protéines, et à partir de leur analyse, de poser les bases d'une réflexion sur les mécanismes de reconnaissance, de déformation, de stabilité des complexes.

2.3. Nouvelles approches de molécules uniques.



Ces dernières années, les caractéristiques de certains états de l'ADN nu ou complexé à des protéines et les caractéristiques du comportement de certains moteurs moléculaires ont été étudiées par des approches sur molécule individuelle en milieu liquide : principalement pinces optiques ou pinces magnétiques, et dans une moindre mesure AFM 1D et *tethered particle motion* (TPM) (figure I-13). Les quatre dispositifs ont pour point commun la nécessité de tenir une molécule d'ADN unique entre deux points d'attache, dont l'un au moins est associé à un objet mobile de dimensions microscopiques. L'objet tire sur la molécule d'ADN, sous l'effet de son mouvement brownien et/ou d'une force extérieure, et ses déplacements dans le

liquide peuvent être suivis par une méthode de détection optique. Des réponses mécaniques de la molécule d'ADN nue et de la même molécule après injection de protéines sont enregistrées. L'analyse des changements entre les deux réponses donne indirectement des informations sur les interactions des protéines le long de la molécule d'ADN, ce qui permet d'argumenter par rapport à des modèles mécaniques, conformationnels et/ou cinétiques locaux de l'état de l'ADN imposé par l'interaction avec la protéine.

La technique des pinces optiques utilise le piégeage optique d'une bille dans un faisceau laser (revue des aspects instrumentaux dans (13)). Une des extrémités de la molécule d'ADN est attachée à cette bille, l'autre soit à une surface soit à une autre bille, pour pouvoir contrôler la distance bout à bout et la force de tension. La réponse mécanique de l'ADN, éventuellement en fonction des conditions ioniques du liquide (14-17), est caractérisée à partir de courbes force-distance. Des petits ligands (intercalants, ligands du petit ou du grand sillon (17-19)) mais aussi de nombreuses protéines induisent par leur association à l'ADN des changements locaux d'état ou de conformation de l'ADN qui se traduisent au niveau de la réponse mécanique globale de la molécule. Ces changements sont par exemple ceux qui surviennent lors de l'assemblage ou du désassemblage de nucléosomes (20-25), de la formation d'un filament protéique sur l'ADN (26), ou de la formation de boucles par un facteur de transcription (27). L'effet de protéines sur la dénaturation et la renaturation de l'ADN est également analysé (28-32). Enfin, la vitesse de processus sur l'ADN tels qu'une polymérisation de protéine, (26,33,34), un déplacement d'enzyme (35-38) ou encore une digestion enzymatique (39,40) est caractérisée, en fonction de la force de tension exercée sur l'ADN.

Les pinces magnétiques permettent de contrôler un paramètre supplémentaire – la torsion - à l'échelle de la molécule d'ADN unique (41). La molécule d'ADN est accrochée entre une surface de verre et une bille paramagnétique. La tension et la torsion subies par la molécule d'ADN sont alors ajustables en modifiant la position verticale ou la position angulaire d'aimants qui maintiennent la bille éloignée de la surface. Les changements locaux induits par la liaison de protéines à l'ADN sont donc analysés en fonction d'un paramètre supplémentaire, le surenroulement de l'ADN. A surenroulement nul, le principe et les applications sont complètement similaires à ceux des pinces optiques, qu'il s'agisse d'analyser les changements locaux associés à la liaison de protéines (42,43), la polymérisation de protéines le long de l'ADN (44), la réponse mécanique de la chromatine (45) ou de caractériser la cinétique d'un processus enzymatique en fonction de la tension exercée sur l'ADN (46-49). En présence de surenroulement, des applications spécifiques sont possibles, comme l'étude de l'action des topoisomérases, capables de relâcher tout ou partie du surenroulement en fonction des conditions (50-55).

L'AFM peut être utilisé à une dimension, pour construire des courbes force-distance. Celles-ci permettent de sonder la réponse élastique d'une molécule attachée entre la pointe AFM et une surface, comme une protéine (56), un fragment d'ADN nu (57), complexé à de petits ligands (58,59) ou complexé à des protéines (60). Les courbes force-distance commencent également à être utilisées pour analyser les forces d'interaction entre protéines (61), les forces de dénaturation de duplex d'ADN (62,63) ou les forces de rupture des complexes ADN-protéine (64-66). Ceci nécessite d'attacher covalamment l'un des partenaires à la pointe AFM et l'autre à la surface – respectivement les deux partenaires protéiques (61), les extrémités 5' de chacun des brins d'ADN (62,63) ou l'ADN et la protéine (64-66). La technique reste actuellement beaucoup moins utilisée que les techniques de pinces décrites ci-dessus pour analyser les complexes ADN-protéines.

Dans l'approche *TPM*, initiée plus récemment, la molécule d'ADN est attachée entre une bille et une surface, sans que la bille soit maintenue par une quelconque technique de micromanipulation. Les fluctuations en x-y (67,68) et/ou z (69) de la position de la bille sont

suivies par vidéomicroscopie. Leur amplitude dépend directement de la distance bout à bout de la molécule d'ADN, qui peut être modifiée par l'interaction avec certaines protéines. Des changements conformationnels de l'ADN sont détectés, comme lors de la liaison à l'ADN de protéines régulatrices (69) ou de protéines « architecturales » (42), ou encore lors de l'action d'une enzyme sur une structure particulière (67). Des paramètres cinétiques sont également déduits, par exemple une vitesse de translocation (70) ou une vitesse d'élongation (71), avec l'enzyme attachée à la bille (70,71) ou à la surface (68,72).

	Pincés optiques	Pincés magnétiques	AFM 1D	TPM
Gamme L_{ADN} typique	>quelques kb	>quelques kb	~30 à >5000 pb	300-3500 pb
Précision spatiale	quelques nm	~5-10 nm x-y-z	~ 1 nm	quelques nm
Gamme de forces contrôlées	~1 à 150 pN	~0,1 à 100 pN	~1 pN à 1 nN	-
Précision en force	~0,1 pN	~0,01 pN	~1 pN	-
Résolution temporelle	~40 ms	~40 ms	quelques ms	~40 ms
Suivi de distance bout à bout	X	X	X	X
Suivi de force de tension	X	X	X	-
Suivi de couple de torsion	-	X	-	-

Tableau I-1 : Performances des différentes techniques.

En résumé, ces diverses techniques sur molécules individuelles en milieu liquide ont permis ces dernières années de caractériser certains états de l'ADN nu ou complexé à des protéines (allongement ou compaction, dénaturation, enroulement,...) et le comportement de certains moteurs moléculaires (vitesse, processivité,...), et par là-même de mieux décrire et de mieux comprendre certains mécanismes dont l'analyse fine résistait aux approches de biochimie ou de biologie structurale (par exemple, le mode d'action des topoisomères). Il manque cependant à ces différentes approches la possibilité de visualiser directement la molécule d'ADN et les protéines ; la précision spatiale, entre 1 et 10 nanomètres selon la technique, ne concerne ici que la position des points d'attache de la molécule d'ADN, entre lesquels la contrainte mécanique est exercée. En particulier, les aspects mécaniques et cinétiques sont caractérisés sans connaître la position des protéines le long de la séquence d'ADN. Le comportement d'une protéine sur l'ADN ne peut alors être décrit que dans le cadre d'un modèle d'interaction qui doit faire le lien entre le changement global de réponse mécanique de l'ADN et le changement local d'une propriété de l'ADN par la protéine.

II – Etude de l'ADN et des interactions ADN-protéines en microscopie.

Seules les techniques de microscopie permettent de visualiser directement les molécules d'ADN et les protéines. Les performances de chacune des techniques dans ce domaine d'étude dépendent à la fois du principe physique sur lequel elles se fondent, de la réalisation technologique du microscope, et des méthodologies de préparation des

échantillons. Dans tous les cas il ne s'agit pas simplement de visualiser les molécules, mais plutôt de les visualiser en altérant au minimum leurs propriétés moléculaires (structures, conformations, interactions, dynamiques). Cela dépend principalement de l'interaction des molécules avec leur substrat et des conditions liées au milieu d'observation, mais aussi de la nécessité ou non de marquer les molécules à l'aide d'un agent ou d'un procédé de contraste. Il est aussi souhaitable d'être capable de piéger les états intermédiaires d'assemblage ou de désassemblage des complexes ADN-protéines, soit en figeant les molécules à différents temps de réaction, soit directement en milieu liquide.

Les techniques de microscopie électronique à transmission (MET et cryoMET) ont été développées en premier ; ensuite sont apparues de nouvelles techniques d'observation des molécules individuelles : la microscopie fluorescence, et la microscopie à sonde locale de type AFM (*Atomic Force Microscopy*). Le **tableau II-1** récapitule les principales caractéristiques de ces quatre techniques, qui orientent leurs applications.

	MET	cryoMET	Fluorescence	AFM
Type d'image	2D électronique	2D électronique stéréoscopique → 3D	2D optique	2D + topographie
Résolution latérale	quelques nm	quelques nm	~200 nm	quelques nm
Résolution verticale	-	-	-	quelques Å
Résolution temporelle en liquide	-	-	~100-200 ms	~3-10 s
Substrat	carbone	-	verre ou mica	mica
Milieu d'observation	vide	glace vitreuse	air, liquide	air, liquide
Configuration de l'ADN	étalé sur la surface	piégé dans la glace	étiré sur la surface	étalé sur la surface
Agent de contraste	métal (ombrage) / sel de métal lourd (coloration)	-	fluorophore	-

Tableau II-1 : principales caractéristiques des différents procédés de visualisation de molécules uniques.

A. Microscopie électronique en transmission (MET) et cryoMET.

La microscopie électronique en transmission (MET), fondée sur un contraste d'origine électronique, permet de visualiser des particules isolées (ADN, protéines ou complexes) avec une très bonne résolution spatiale (quelques nm) mais ne permet pas d'appréhender directement les aspects dynamiques. Les molécules sont immobilisées sur un substrat mince (épaisseur entre ~5 nm et ~100 nm) et l'observation se fait dans une colonne optique électronique (**figure II-1**), sous vide. La visualisation de l'ADN et des protéines nécessite un traitement particulier pour obtenir un bon contraste électronique : en général, soit un ombrage métallique de l'échantillon, soit la coloration par un sel de métal lourd comme l'acétate d'uranyle.

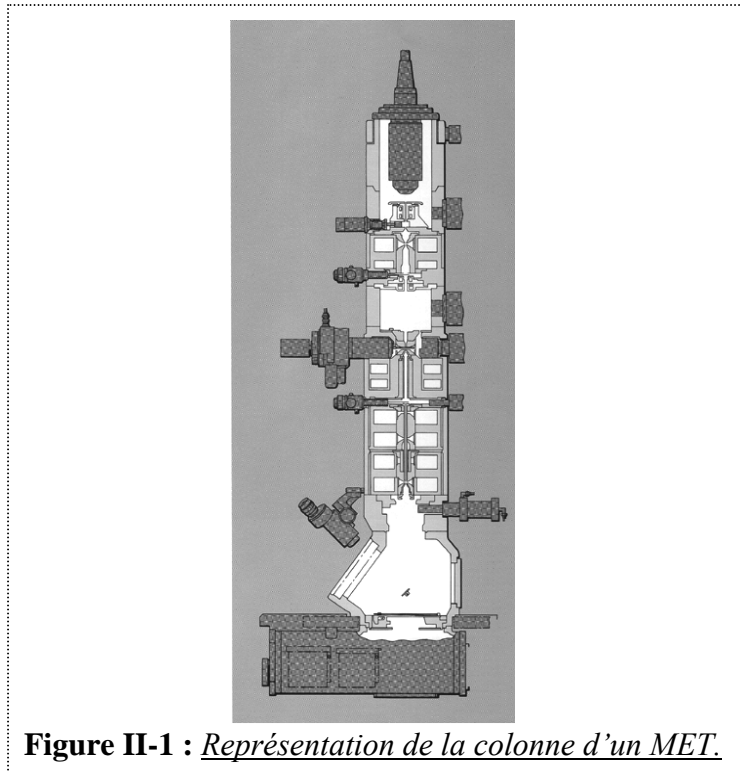
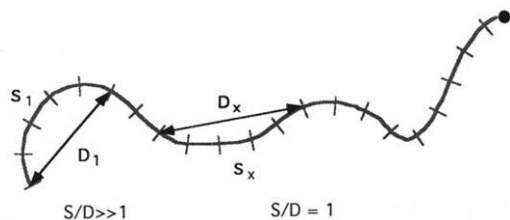


Figure II-1 : *Représentation de la colonne d'un MET.*

Il existe des conditions qui permettent de bien maîtriser l'étalement de l'ADN sur le substrat (film de carbone) et de conserver ses propriétés de conformation. Il est alors possible, sur la base d'un suivi de contour, d'étudier la conformation et la topologie locales intrinsèques de l'ADN, et ses variations en fonction de la séquence, de structures particulières, ou des conditions ioniques de la solution de dépôt. La courbure et la flexibilité locales de l'ADN sont quantifiables par des méthodes statistiques d'analyse d'image, dont certaines ont été développées au laboratoire (**figure II-2**) (73,74). La MET permet aussi de cartographier les complexes ADN-protéines individuels (75-77), de visualiser l'interaction de protéines avec des structures (75) ou des séquences (77) particulières, et les modifications de conformations de l'ADN induites par leur liaison. La gamme des complexes et des conformations observées renseigne indirectement sur la dynamique des interactions. De plus, en figeant les complexes à différents temps de réaction, les changements d'état de l'ADN, l'assemblage ou le désassemblage des complexes peuvent être analysés quantitativement (78,79) ; mais la résolution en temps est limitée par la durée préparation de l'échantillon, de l'ordre de trente secondes au minimum, ce qui pose une limite au piégeage d'états intermédiaires.

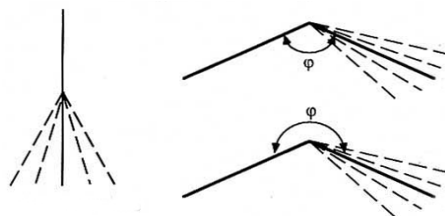
Figure II-2 : Méthodes de quantification de la courbure et de la flexibilité locales de l'ADN en MET.

Sur grands fragments (~1000 à 10000 paires de bases) :



La courbure est caractérisée par la valeur moyenne du rapport S/D (S : distance curviligne, D : distance linéaire), tandis que la dispersion autour de la valeur moyenne reflète la flexibilité (73).

Sur petits fragments (~50 paires de bases) :



La courbure et la flexibilité au centre de la molécule sont déduites de la distribution des angles entre les deux bras (74).

En cryomicroscopie électronique en transmission (cryoMET) les molécules ne sont plus étalées sur une surface 2D mais restent dans un espace 3D : elles sont incluses dans un film fin d'eau vitrifiée (glace amorphe) et observées à la température de l'azote liquide (revue dans (80)). Aucun agent contrastant ou ombrage métallique n'est utilisé : le contraste de l'image est uniquement lié à la densité de la matière observée. Dans le cas des molécules biologiques, ce contraste est très faible et il est très difficile de distinguer l'objet étudié du bruit de fond de l'image. Mais la technique a l'avantage de donner accès à la conformation tridimensionnelle des molécules piégées dans la glace. La reconstruction 3D se fait à partir du traitement informatique des images 2D obtenues dans le microscope : différentes projections de l'objet, enregistrées sous différents angles d'inclinaison (*tilt*) en fonction de l'orientation imposée à l'échantillon dans l'appareil, sont accumulées et combinées. Il suffit par exemple d'enregistrer deux vues stéréoscopiques d'une molécule d'ADN pour reconstruire sa trajectoire dans l'espace, ce qui permet d'étudier la conformation tridimensionnelle intrinsèque de l'ADN et les variations de conformation induite par une protéine (voir par exemple (81,82)) (figure II-3). L'utilisation de la cryoMET reste cependant particulièrement exigeante, en raison notamment de l'étape de congélation dans la glace amorphe, délicate à maîtriser techniquement, et du traitement d'images important à réaliser pour extraire les données structurales 3D.



Figure II-3 : *Observation d'ADN circulaire piégé dans la glace vitreuse en cryomicroscopie électronique à transmission. A partir de deux images stéréoscopiques (-15 et +15°) la trajectoire tridimensionnelle de la molécule d'ADN peut être reconstruite.*

Les deux techniques permettent également d'obtenir des informations structurales sur les protéines, soit à partir de cristaux 2D de protéines, soit à partir de l'analyse des images de plusieurs milliers de molécules isolées. En MET, la résolution est de l'ordre de 0,5-1 nm ; à cette échelle ce ne sont bien sûr pas les atomes mais seulement des domaines structuraux qui sont résolus (83). L'analyse des images de plusieurs milliers de protéines ou de complexes isolés colorés par un agent de contraste et figés dans différentes orientations peut permettre de reconstruire une structure 3D, avec une résolution un peu inférieure, de l'ordre de 2,5-3 nm (84). C'est aussi possible en cryoMET, cette fois sans coloration, avec une résolution typiquement de l'ordre de 3 nm (84). Les domaines structuraux identifiés peuvent éventuellement être corrélés avec des données de cristallographie aux rayons X ou de RMN, quand elles existent, pour une interprétation plus fine.

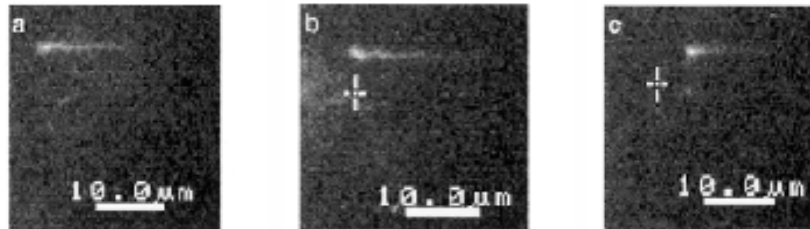
B. Microscopie de fluorescence.

La microscopie de fluorescence, fondée sur un contraste d'origine optique, a été développée sur molécules individuelles essentiellement pour aborder les aspects dynamiques des interactions ADN-protéines, en particulier voir des moteurs moléculaires progresser le long de l'ADN. La résolution spatiale maximale est de l'ordre de 200 nm. Cette résolution relativement faible nécessite de travailler sur une molécule d'ADN suffisamment longue (au moins quelques kb) et suffisamment étendue ; ainsi la molécule d'ADN est maintenue étirée dans le liquide grâce à un champ électrique (85), une pince optique et un flux de liquide (86-88) ou deux pinces optiques (89). L'autre principale contrainte est de marquer soit l'ADN (85-87) (**figure II-4a**) soit la protéine (88,89) (**figure II-4b**) par un fluorophore. Mais l'enregistrement de type vidéo a une bonne résolution temporelle, de l'ordre de la centaine de millisecondes (86,89), ce qui est une échelle de temps intéressante pour analyser la dynamique des complexes ADN-protéines. Cela a déjà permis d'estimer la vitesse de processus enzymatiques tels qu'une digestion (par exemple par l'exonucléase λ (85)) ou un déplacement (par exemple celui de l'ARN polymérase (89) ou de l'hélicase RecBCD (86-88)) sur molécule individuelle fluorescente. Le développement de nouveaux marqueurs comme les nanocristaux fluorescents (90) élargira probablement ce champ d'applications.

Figure II-4 : Visualisation de molécules uniques en microscopie de fluorescence en milieu liquide.

a) L'ADN est marqué par un fluorophore.

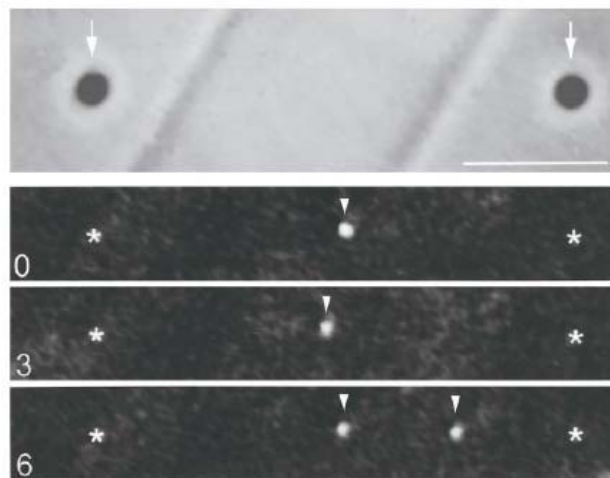
L'ADN est marqué par le YOYO-1. L'observation sur les images avant l'injection de l'exonucléase λ (a), à $t=0$ s (b) et à $t=10$ s est faite en microscopie de fluorescence classique. D'après (85).



b) La protéine est marquée par un fluorophore.

L'observation sur l'image supérieure est faite en microscopie optique simple et montre les billes entre lesquelles la molécule d'ADN est tenue.

L'observation sur les images à $t = 0, 3$ et 6 secondes est faite en TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy). Les astérisques indiquent la position des extrémités de l'ADN. La barre d'échelle correspond à $5 \mu\text{m}$. La protéine est conjuguée à un fluorophore (Cy3). D'après (89).



C. Microscopie à force atomique.

L'imagerie AFM n'est pas fondée sur les lois de l'optique visible ou électronique, et en ce sens ce n'est pas une technique de microscopie « classique ». Le contraste est d'origine mécanique : c'est une pointe de dimensions nanométrique couplée à un microlevier faisant office de ressort, qui vient sonder mécaniquement la surface de l'échantillon. La technique présente deux performances particulièrement originales : d'une part, l'AFM est capable de donner une représentation topographique des molécules (résolution verticale de quelques Å) ; d'autre part, l'observation peut être faite soit à l'air après séchage (ou sous vide pour augmenter la résolution), soit en milieu liquide sans figer ni sécher les molécules adsorbées sur la surface.

L'application de l'AFM à l'air ou sous vide à l'étude de l'ADN et des complexes ADN-protéines est à rapprocher de celle de la MET, où les molécules sont aussi figées sur une surface, et où la résolution latérale est aussi de quelques nm. Mais la surface en général utilisée en AFM (mica) est différente de celle utilisée en MET (carbone), et le processus d'étalement met en jeu des interactions ADN-surface différentes, qui ont moins bien été étudiées jusqu'ici et sont donc moins bien maîtrisées.

La possibilité de travailler en milieu liquide constitue en réalité le principal intérêt de l'AFM pour l'étude des macromolécules biologiques. Comme en MET, la haute résolution spatiale permet d'étudier des aspects structuraux à partir de cristaux 2D de protéines, mais cette fois-ci en milieu liquide (91). Pour les études de dynamique, la résolution temporelle actuelle (de l'ordre de quelques secondes) est moins bonne que celle de la microscopie de fluorescence mais l'amélioration de la technologie va continuer à repousser cette limite. Comme l'imagerie AFM ne nécessite par ailleurs pas de marquage des molécules (le contraste est d'origine mécanique) et offre déjà une bien meilleure résolution latérale que la microscopie de fluorescence, on peut espérer à terme observer le comportement des protéines sur l'ADN dans des conditions très intéressantes. L'engouement pour cette technique et ses potentialités ne doit cependant pas reléguer au second plan le travail méthodologique de fond qui reste à faire pour optimiser les conditions d'observation des complexes ADN-protéines.

Conclusion

Dans ce chapitre les bases du polymorphisme de l'ADN et des protéines, à l'origine de la diversité de leurs interactions, ont été rappelées, et le panorama des principales techniques d'étude biochimiques et biophysiques utilisées pour les caractériser a été dressé. Parmi celles-ci, les techniques de micromanipulation de l'ADN en milieu liquide permettent de caractériser certains états de l'ADN nu ou complexé à des protéines et le comportement de certains moteurs moléculaires, à partir des propriétés mécaniques globales d'une molécule d'ADN individuelle tenue entre deux points d'attache. Les techniques d'imagerie de molécules individuelles sont aussi en plein essor, l'objectif étant de progresser encore vers la haute résolution spatiale combinée à la haute résolution temporelle, en milieu liquide, pour analyser finement les aspects dynamiques des complexes ADN-protéines. L'AFM est un outil polyvalent de mesures de forces et d'imagerie en plein développement, qui a un rôle potentiel énorme à jouer par rapport à cet objectif, en complémentarité avec les autres techniques d'étude.

Bibliographie du chapitre 1.

1. Watson, J., T. Baker, S. Bell, A. Gann, M. Levine, and R. Losick. 2004. Molecular biology of the gene. 5th ed., Pearson, Benjamin Cummings Chapter 6:97-128.
2. Hagerman, P. J. 1988. Flexibility of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 17:265-286.
3. Le Cam, E. 1995. Conformation de l'ADN et interactions ADN-protéines en microscopie électronique. Thèse de doctorat de l'Université Paris IV.
4. Luscombe, N. M., S. E. Austin, H. M. Berman, and J. M. Thornton. 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol* 1:REVIEWS001.
5. Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
6. Rippe, K. 1997. Analysis of protein-DNA binding at equilibrium. *B.I.F. Futura* 12:20-26.
7. Lane, D., P. Prentki, and M. Chandler. 1992. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev* 56:509-528.
8. Rosenthal, N. 1995. Molecular medicine. Recognizing DNA. *N Engl J Med* 333:925-927.
9. Kneale, G. G. 1994. DNA-protein interactions : principles and protocols. *Methods in Molecular Biology* 30.
10. Watson, J. D. and F. H. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.
11. Egli, M. 2004. Nucleic acid crystallography: current progress. *Curr Opin Chem Biol* 8:580-591.
12. Williams, M., K. Pant, I. Rouzina, and R. Karpe. 2004. Single molecule force spectroscopy studies of DNA denaturation by T4 gene 32 protein. *Spectroscopy* 18:203-211.
13. Neuman, K. C., Block S.M. 2004. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments* 75:2787-2809.
14. Wang, M. D., H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. 1997. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys J* 72:1335-1346.
15. Wenner, J. R., M. C. Williams, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. 2002. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophys J* 82:3160-3169.

16. Baumann, C. G., S. B. Smith, V. A. Bloomfield, and C. Bustamante. 1997. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6185-6190.
17. Baumann, C. G., V. A. Bloomfield, S. B. Smith, C. Bustamante, M. D. Wang, and S. M. Block. 2000. Stretching of single collapsed DNA molecules. *Biophys J* 78:1965-1978.
18. Rocha, M. S., N. B. Viana, and O. N. Mesquita. 2004. DNA-psoralen interaction: a single molecule experiment. *J Chem Phys* 121:9679-9683.
19. Sischka, A., K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros, and D. Anselmetti. 2005. Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands. *Biophys J* 88:404-411.
20. Pope, L. H., M. L. Bennink, K. A. van Leijenhorst-Groener, D. Nikova, J. Greve, and J. F. Marko. 2005. Single chromatin fiber stretching reveals physically distinct populations of disassembly events. *Biophys J* 88:3572-3583.
21. Pope, L. H., M. L. Bennink, and J. Greve. 2002. Optical tweezers stretching of chromatin. *J Muscle Res Cell Motil* 23:397-407.
22. Brower-Toland, B. D., C. L. Smith, R. C. Yeh, J. T. Lis, C. L. Peterson, and M. D. Wang. 2002. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1960-1965.
23. Bennink, M. L., S. H. Leuba, G. H. Leno, J. Zlatanova, B. G. de Grooth, and J. Greve. 2001. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Biol* 8:606-610.
24. Cui, Y. and C. Bustamante. 2000. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:127-132.
25. Gemmen, G. J., R. Sim, K. A. Haushalter, P. C. Ke, J. T. Kadonaga, and D. E. Smith. 2005. Forced unraveling of nucleosomes assembled on heterogeneous DNA using core histones, NAP-1, and ACF. *J Mol Biol* 351:89-99.
26. Hegner, M., S. B. Smith, and C. Bustamante. 1999. Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10109-10114.
27. Sakata-Sogawa, K., M. Kurachi, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama, and H. Tashiro. 1998. Direct measurement of DNA molecular length in solution using optical tweezers: detection of looping due to binding protein interactions. *Eur Biophys J* 27:55-61.
28. Williams, M. C., I. Rouzina, J. R. Wenner, R. J. Gorelick, K. Musier-Forsyth, and V. A. Bloomfield. 2001. Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6121-6126.

29. Williams, M. C., R. J. Gorelick, and K. Musier-Forsyth. 2002. Specific zinc-finger architecture required for HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8614-8619.
30. Pant, K., R. L. Karpel, and M. C. Williams. 2003. Kinetic regulation of single DNA molecule denaturation by T4 gene 32 protein structural domains. *J Mol Biol* 327:571-578.
31. Pant, K., R. L. Karpel, I. Rouzina, and M. C. Williams. 2004. Mechanical measurement of single-molecule binding rates: kinetics of DNA helix-destabilization by T4 gene 32 protein. *J Mol Biol* 336:851-870.
32. Pant, K., R. L. Karpel, I. Rouzina, and M. C. Williams. 2005. Salt dependent binding of T4 gene 32 protein to single and double-stranded DNA: single molecule force spectroscopy measurements. *J Mol Biol* 349:317-330.
33. Bennink, M. L., O. D. Scharer, R. Kanaar, K. Sakata-Sogawa, J. M. Schins, J. S. Kanger, B. G. de Groot, and J. Greve. 1999. Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using optical tweezers: interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1. *Cytometry* 36:200-208.
34. Shivashankar, G. V., M. Feingold, O. Krichevsky, and A. Libchaber. 1999. RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: the role of ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7916-7921.
35. Wang, M. D., M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. 1998. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* 282:902-907.
36. Wuite, G. J., R. J. Davenport, A. Rappaport, and C. Bustamante. 2000. An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules. *Biophys J* 79:1155-1167.
37. Wuite, G. J., S. B. Smith, M. Young, D. Keller, and C. Bustamante. 2000. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature* 404:103-106.
38. Perkins, T. T., H. W. Li, R. V. Dalal, J. Gelles, and S. M. Block. 2004. Forward and reverse motion of single RecBCD molecules on DNA. *Biophys J* 86:1640-1648.
39. Perkins, T. T., R. V. Dalal, P. G. Mitis, and S. M. Block. 2003. Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules. *Science* 301:1914-1918.
40. van den Broek, B., M. C. Noom, and G. J. Wuite. 2005. DNA-tension dependence of restriction enzyme activity reveals mechanochemical properties of the reaction pathway. *Nucleic Acids Res* 33:2676-2684.
41. Gosse, C. and V. Croquette. 2002. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J* 82:3314-3329.

42. Ali, B. M., R. Amit, I. Braslavsky, A. B. Oppenheim, O. Gileadi, and J. Stavans. 2001. Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10658-10663.
43. van Noort, J., S. Verbrugge, N. Goosen, C. Dekker, and R. T. Dame. 2004. Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6969-6974.
44. Ristic, D., M. Modesti, T. van der Heijden, J. van Noort, C. Dekker, R. Kanaar, and C. Wyman. 2005. Human Rad51 filaments on double- and single-stranded DNA: correlating regular and irregular forms with recombination function. *Nucleic Acids Res* 33:3292-3302.
45. Leuba, S. H., M. A. Karymov, M. Tomschik, R. Ramjit, P. Smith, and J. Zlatanova. 2003. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: magnetic tweezers study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:495-500.
46. Amit, R., O. Gileadi, and J. Stavans. 2004. Direct observation of RuvAB-catalyzed branch migration of single Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11605-11610.
47. Dawid, A., V. Croquette, M. Grigoriev, and F. Heslot. 2004. Single-molecule study of RuvAB-mediated Holliday-junction migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11611-11616.
48. Dessinges, M. N., T. Lionnet, X. G. Xi, D. Bensimon, and V. Croquette. 2004. Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6439-6444.
49. Maier, B., D. Bensimon, and V. Croquette. 2000. Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12002-12007.
50. Charvin, G., D. Bensimon, and V. Croquette. 2003. Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9820-9825.
51. Charvin, G., T. R. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. 2005. Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34:201-219.
52. Charvin, G., T. Strick, D. Bensimon, and V. Croquette. 2005. Topoisomerase IV bends and overtwists DNA upon binding. *Biophys J*.
53. Crisona, N. J., T. R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, and N. R. Cozzarelli. 2000. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev* 14:2881-2892.

54. Dekker, N. H., T. Viard, C. B. de La Tour, M. Duguet, D. Bensimon, and V. Croquette. 2003. Thermophilic topoisomerase I on a single DNA molecule. *J Mol Biol* 329:271-282.
55. Strick, T. R., V. Croquette, and D. Bensimon. 2000. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature* 404:901-904.
56. Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276:1109-1112.
57. Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. 1999. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol* 6:346-349.
58. Eckel, R., R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald, and D. Anselmetti. 2003. Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes. *Biophys J* 85:1968-1973.
59. Krautbauer, R., L. H. Pope, T. E. Schrader, S. Allen, and H. E. Gaub. 2002. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy. *FEBS Lett* 510:154-158.
60. Zlatanova, J. and S. H. Leuba. 2002. Stretching and imaging single DNA molecules and chromatin. *J Muscle Res Cell Motil* 23:377-395.
61. Lin, S., J.-L. Chen, L.-S. Huang, and H.-W. Lin. 2005. Measurement of the forces in protein interactions with atomic force microscopy. *Current proteomics*. 2:55-81.
62. Pope, L. H., M. C. Davies, C. A. Laughton, C. J. Roberts, S. J. Tendler, and P. M. Williams. 2001. Force-induced melting of a short DNA double helix. *Eur Biophys J* 30:53-62.
63. Strunz, T., K. Oroszlan, R. Schafer, and H. J. Guntherodt. 1999. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11277-11282.
64. Baumgarth, B., F. W. Bartels, D. Anselmetti, A. Becker, and R. Ros. 2005. Detailed studies of the binding mechanism of the *Sinorhizobium meliloti* transcriptional activator ExpG to DNA. *Microbiology* 151:259-268.
65. Bartels, F. W., B. Baumgarth, D. Anselmetti, R. Ros, and A. Becker. 2003. Specific binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of *Sinorhizobium meliloti*--a combined molecular biology and force spectroscopy investigation. *J Struct Biol* 143:145-152.
66. Kuhner, F., L. T. Costa, P. M. Bisch, S. Thalhammer, W. M. Heckl, and H. E. Gaub. 2004. LexA-DNA bond strength by single molecule force spectroscopy. *Biophys J* 87:2683-2690.
67. Pouget, N., C. Dennis, C. Turlan, M. Grigoriev, M. Chandler, and L. Salome. 2004. Single-particle tracking for DNA tether length monitoring. *Nucleic Acids Res* 32:e73.

68. Yin, H., I. Artsimovitch, R. Landick, and J. Gelles. 1999. Nonequilibrium mechanism of transcription termination from observations of single RNA polymerase molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13124-13129.
69. Kooiker, M., C. A. Airoidi, A. Losa, P. S. Manzotti, L. Finzi, M. M. Kater, and L. Colombo. 2005. BASIC PENTACYSTEINE1, a GA Binding Protein That Induces Conformational Changes in the Regulatory Region of the Homeotic Arabidopsis Gene SEEDSTICK. *Plant Cell* 17:722-729.
70. Dohoney, K. M. and J. Gelles. 2001. Chi-sequence recognition and DNA translocation by single RecBCD helicase/nuclease molecules. *Nature* 409:370-374.
71. Tolic-Norrelykke, S. F., A. M. Engh, R. Landick, and J. Gelles. 2004. Diversity in the rates of transcript elongation by single RNA polymerase molecules. *J Biol Chem* 279:3292-3299.
72. Yin, H., R. Landick, and J. Gelles. 1994. Tethered particle motion method for studying transcript elongation by a single RNA polymerase molecule. *Biophys J* 67:2468-2478.
73. Theveny, B., D. Coulaud, M. Le Bret, and B. Revet. 1988. Structure and expression, volume 3 : DNA bending and curvature. Editors : Olson, WK ; Sarma, MH ; Sundaralinjam, MS.:39-55.
74. Cognet, J. A., C. Pakleza, D. Cherny, E. Delain, and E. Le Cam. 1999. Static curvature and flexibility measurements of DNA with microscopy. A simple renormalization method, its assessment by experiment and simulation. *J Mol Biol* 285:997-1009.
75. Le Cam, E., F. Fack, J. Menissier-de Murcia, J. A. Cognet, A. Barbin, V. Sarantoglou, B. Revet, E. Delain, and G. de Murcia. 1994. Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. *J Mol Biol* 235:1062-1071.
76. Le Cam, E., D. Frechon, M. Barray, A. Fourcade, and E. Delain. 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11816-11820.
77. Beloin, C., J. Jeusset, B. Revet, G. Mirambeau, F. Le Hegarat, and E. Le Cam. 2003. Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* 278:5333-5342.
78. Veaute, X., J. Jeusset, C. Soustelle, S. C. Kowalczykowski, E. Le Cam, and F. Fabre. 2003. The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* 423:309-312.
79. Veaute, X., S. Delmas, M. Selva, J. Jeusset, E. Le Cam, I. Matic, F. Fabre, and M. A. Petit. 2005. UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J* 24:180-189.

80. Frank, J. 2002. Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31:303-319.
81. Larquet, E., E. Le Cam, A. Fourcade, F. Culard, P. Furrer, and E. Delain. 1996. [Complementarity of microscopies in the structural analysis of DNA minicircles associated to protein MC1]. *C R Acad Sci III* 319:461-471.
82. Larquet, E. 1996. Etude structurale des macromolécules biologiques par cryomicroscopie électronique et analyse d'images. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6.
83. Levy, D., M. Chami, and J. L. Rigaud. 2001. Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy. *FEBS Lett* 504:187-193.
84. Spagnolo, L., A. Rivera-Calzada, L. H. Pearl, and O. Llorca. 2006. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell* 22:511-519.
85. Matsuura, S., J. Komatsu, K. Hirano, H. Yasuda, K. Takashima, S. Katsura, and A. Mizuno. 2001. Real-time observation of a single DNA digestion by lambda exonuclease under a fluorescence microscope field. *Nucleic Acids Res* 29:e79.
86. Spies, M., P. R. Bianco, M. S. Dillingham, N. Handa, R. J. Baskin, and S. C. Kowalczykowski. 2003. A molecular throttle: the recombination hotspot chi controls DNA translocation by the RecBCD helicase. *Cell* 114:647-654.
87. Bianco, P. R., L. R. Brewer, M. Corzett, R. Balhorn, Y. Yeh, S. C. Kowalczykowski, and R. J. Baskin. 2001. Processive translocation and DNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules. *Nature* 409:374-378.
88. Handa, N., P. R. Bianco, R. J. Baskin, and S. C. Kowalczykowski. 2005. Direct visualization of RecBCD movement reveals cotranslocation of the RecD motor after chi recognition. *Mol Cell* 17:745-750.
89. Harada, Y., T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, and T. Yanagida. 1999. Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time. *Biophys J* 76:709-715.
90. Crut, A., B. Geron-Landre, I. Bonnet, S. Bonneau, P. Desbiolles, and C. Escude. 2005. Detection of single DNA molecules by multicolor quantum-dot end-labeling. *Nucleic Acids Res* 33:e98.
91. Scheuring, S., J. Seguin, S. Marco, D. Levy, C. Breyton, B. Robert, and J. L. Rigaud. 2003. AFM characterization of tilt and intrinsic flexibility of *Rhodospirillum rubrum* light harvesting complex 2 (LH2). *J Mol Biol* 325:569-580.

Chapitre 2

Les différents modes de
fonctionnement de l'AFM
et leurs applications en biologie.

PLAN DU CHAPITRE 2

Introduction	42
I - Principes des différents modes de fonctionnement	42
A - Courbes force-distance (AFM 1D)	43
B – Modes d'imagerie	43
1. <i>Mode contact</i>	44
2. <i>Mode non contact</i>	45
3. <i>Mode contact intermittent</i>	45
II – Mode contact intermittent : aspects instrumentaux	47
A. Utilisation du mode contact intermittent à l'air	47
1. <i>Propriétés de la résonance</i>	47
2. <i>Modélisation de l'interaction pointe-surface</i>	48
B. Utilisation du mode contact intermittent en milieu liquide	49
1. <i>Modes d'excitation de l'oscillation</i>	50
2. <i>Facteur de qualité de la résonance</i>	51
3. <i>Modélisation de l'interaction pointe-surface</i>	52
C. Temps d'acquisition des images	53
1. <i>Paramètres de construction intrinsèques à l'instrument</i>	53
1.1. <i>Bande passante du convertisseur RMS-DC</i>	53
1.2. <i>Bande passante de la rétroaction (boucle PID + scanner)</i>	54
2. <i>Fréquence de résonance des microleviers</i>	54
3. <i>Paramètres d'imagerie</i>	55
3.1. <i>Nombre de pixels de l'image</i>	55
3.2. <i>Le problème de la dérive</i>	55
4. <i>Performances</i>	56
4.1. <i>Avec un AFM commercial</i>	56
4.2. <i>Avec un AFM spécialisé</i>	56
III – Principales applications de l'AFM en biologie	56
A. Biomolécules	56
1. <i>Imagerie</i>	56
2. <i>Courbes force-distance</i>	57
B. Membranes	57
1. <i>Imagerie</i>	57
2. <i>Courbes force-distance</i>	57
C. Cellules	58
1. <i>Imagerie</i>	58
2. <i>Courbes force-distance</i>	59
D. CryoAFM	59
Conclusion	59
Bibliographie du chapitre 2	61

CHAPITRE 2

Les différents modes de fonctionnement de l'AFM et leurs applications en biologie.

Introduction

Le chapitre précédent a situé les spécificités de l'AFM, outil de mesure de force et outil d'imagerie, parmi les différentes techniques d'étude de l'ADN et des interactions ADN-protéines. Même s'il a d'abord été conçu pour des applications en physique (caractérisation topographique et/ou mécanique locale de matériaux,...) cet instrument a en effet un potentiel important pour de nombreuses applications en biologie. En imagerie, la nature des objets biologiques empêche d'atteindre une résolution aussi élevée que sur des matériaux physiques, qui sont en général bien plus durs, plus inertes et plus stables. Elle reste cependant du même ordre de grandeur : le nanomètre en résolution latérale et l'angström en résolution verticale. Cette résolution dépend avant tout de l'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon, l'objectif étant d'interagir suffisamment avec l'objet (pour être sensible à ses détails) tout en minimisant la force que la pointe lui fait subir (pour éviter de le détériorer). Plusieurs modes de fonctionnement de l'AFM ont été développés, qui diffèrent principalement par la manière dont la pointe interagit avec l'échantillon.

I - Principes des différents modes de fonctionnement.

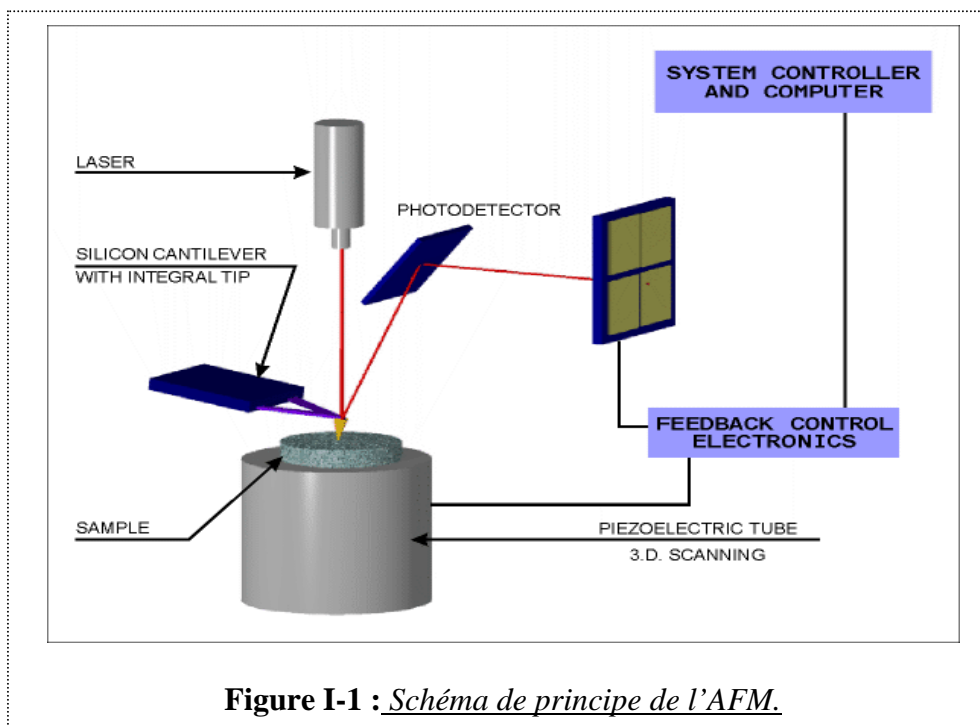


Figure I-1 : Schéma de principe de l'AFM.

L'AFM fait partie de la famille des microscopes dits « à sonde locale ». Le précurseur de l'AFM, le microscope à effet tunnel (*Scanning Tunelling Microscope* ou STM en anglais), a été inventé en 1982 (1) par Binnig et Rohrer tandis que l'invention de l'AFM par Binnig, Quate et Gerber remonte à 1986 (2). Les organes essentiels de l'AFM sont schématisés sur la **figure I-1**. Une pointe de dimensions nanométriques (~10-20 nm typiquement) située à l'extrémité d'un microlevier (*cantilever* en anglais) est approchée d'une surface et soit déplacée verticalement, pour construire une courbe force-distance, soit balayée latéralement

relativement à la surface de l'échantillon, pour construire une image. Les déplacements sont commandés par les déformations d'une céramique piézoélectrique sous l'effet de la tension qui lui est appliquée. Les déformations du microlevier en fonction de l'interaction pointe-surface sont suivies par un faisceau laser réfléchi sur le microlevier vers une photodiode à quatre cadrans, qui convertit les déplacements du spot lumineux en signaux électriques. Ceux-ci sont traités par une électronique et une informatique de contrôle, et la répétition de ce processus pour différentes positions verticales ou dans une zone de balayage aboutit respectivement à la construction d'une courbe force-distance ou à la construction d'une image tridimensionnelle de la surface de l'échantillon.

A - Courbes force-distance (AFM 1D).

Les courbes force-distance sont obtenues en modulant la position verticale de l'échantillon et en enregistrant la déflexion du microlevier, sans balayer latéralement la surface de l'échantillon. L'amplitude verticale maximale de déplacement est de quelques μm . La **figure I-2** représente une courbe de force typique, avec un schéma représentatif de la déflexion du microlevier en différents points de la courbe. La force est déduite de la déflexion du microlevier en multipliant par la constante de raideur du microlevier, en général déterminée expérimentalement avec l'une des méthodes de calibration existantes (décrites par exemple dans (3)). Eventuellement, les courbes force-distance peuvent être enregistrées en chaque point d'une surface pour réaliser une image d'élasticité ou d'adhésion ; on parle alors d'imagerie en *pulsed-force mode*.

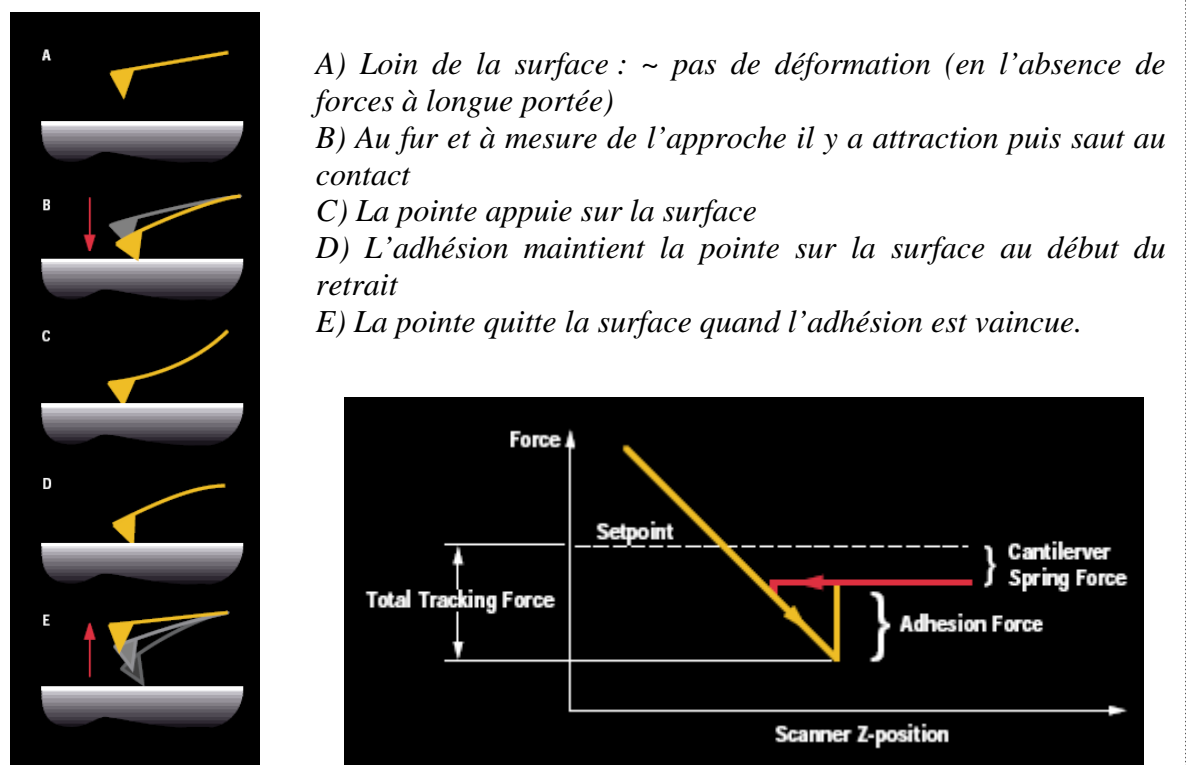


Figure I-2 : *Construction d'une courbe force-distance en AFM. Figures d'après (4).*

B – Modes d'imagerie.

Quel que soit le mode d'imagerie, le balayage latéral de la surface est effectué ligne par ligne. La surface totale balayée peut aller jusqu'à quelques milliers de μm^2 ; la surface

maximale précise dépend du piézoélectrique utilisé. La résolution latérale atteinte sur les objets biologiques est de l'ordre de quelques nanomètres et la résolution verticale de l'ordre de quelques angströms. L'analyse des différents régimes de forces d'interaction pointe-surface en fonction de la distance permet de récapituler comment se fait l'imagerie dans les différents modes de fonctionnement : contact, non contact, contact intermittent (figure I-3).

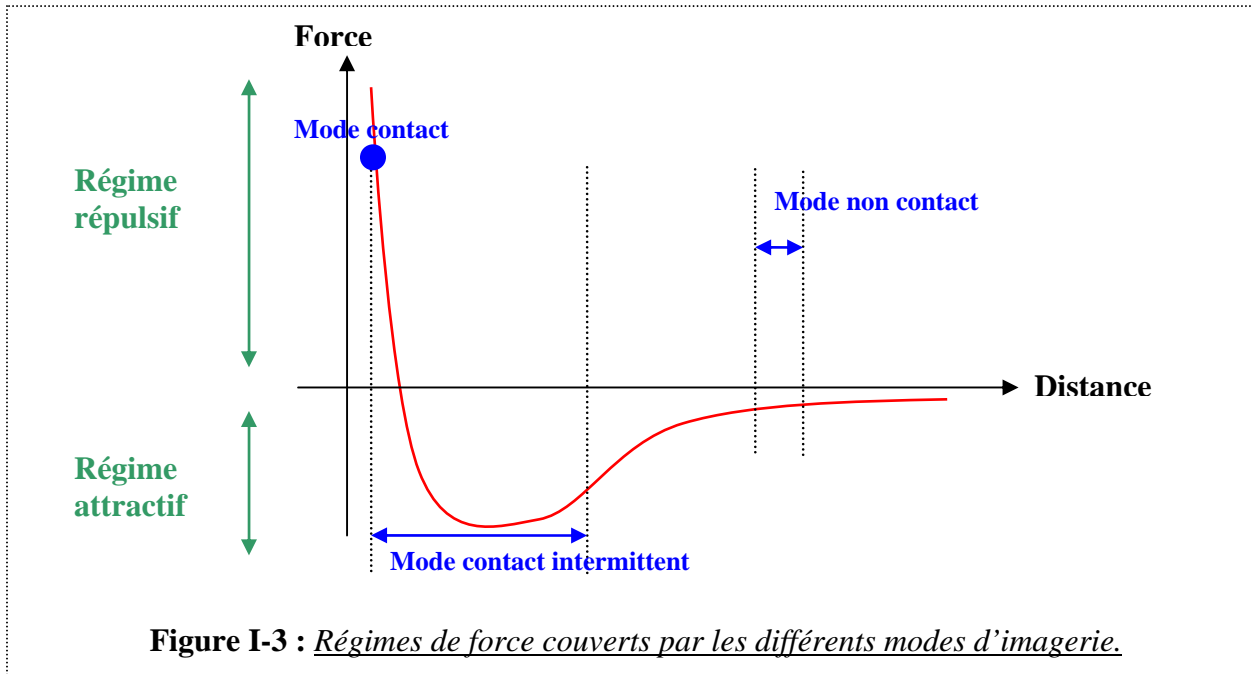


Figure I-3 : Régimes de force couverts par les différents modes d'imagerie.

1. Mode contact.

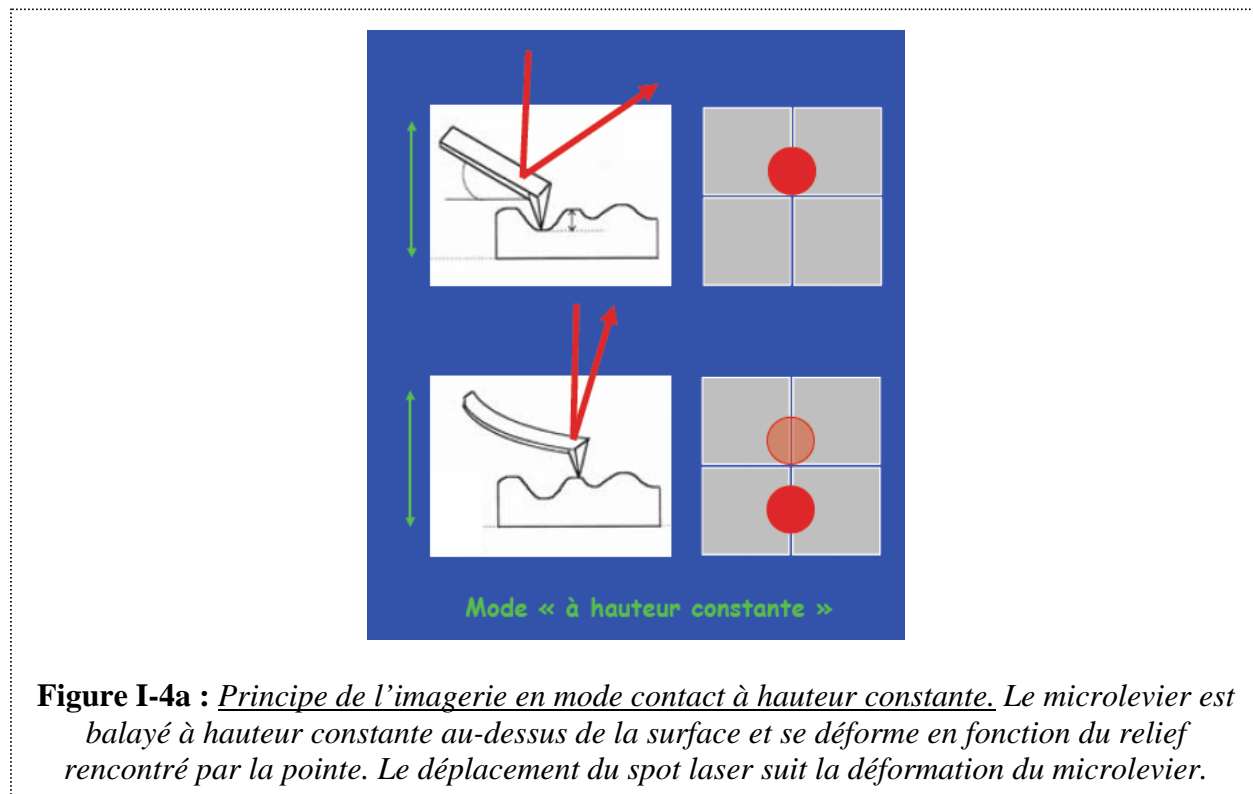


Figure I-4a : Principe de l'imagerie en mode contact à hauteur constante. Le microlevier est balayé à hauteur constante au-dessus de la surface et se déforme en fonction du relief rencontré par la pointe. Le déplacement du spot laser suit la déformation du microlevier.

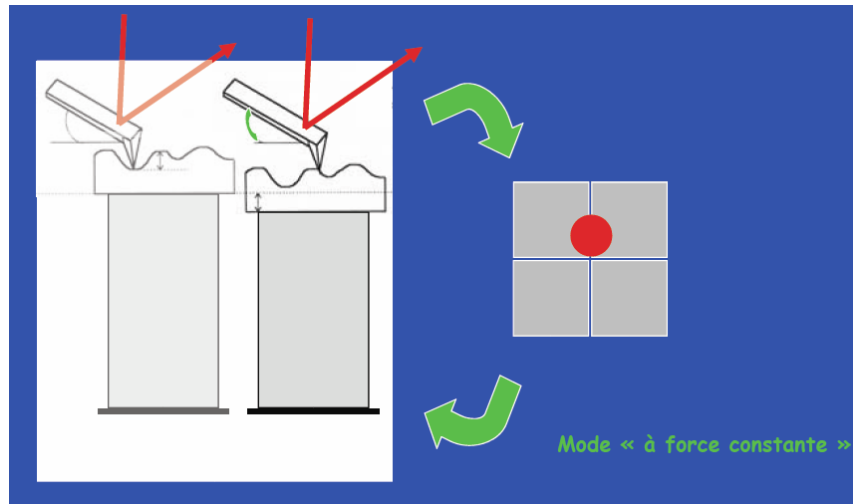


Figure I-4b : *Principe de l'imagerie en mode contact à force constante. La position verticale de l'échantillon est ajustée en permanence grâce à une boucle électronique de rétroaction pour maintenir la déflexion du microlevier à une valeur constante. L'image du relief de la surface est reconstruite à partir des corrections de la position verticale de l'échantillon.*

Le mode contact est le premier mode d'imagerie AFM à avoir été développé. La force d'interaction entre la pointe et la surface reste dans le régime répulsif. Ce mode d'imagerie peut fonctionner soit à hauteur constante (le microlevier est balayé à une hauteur constante au-dessus de la surface) soit à force constante (la force avec laquelle le microlevier vient palper la surface est maintenue constante au cours du balayage par l'intermédiaire d'une rétroaction) (**figure I-4**). Dans les deux cas une image de la topographie de la surface est obtenue. Le mode contact est simple à mettre en œuvre et rapide, mais des forces de frottement importantes sont induites entre la pointe et la surface. Celles-ci risquent de dégrader les objets biologiques, ce qui limite beaucoup l'utilisation de ce mode d'imagerie en biologie.

2. Mode non contact.

Dans ce mode de fonctionnement on fait osciller le microlevier à sa fréquence de résonance avec une petite amplitude d'oscillation et relativement loin de la surface. Dans ces conditions la pointe n'est pas en contact avec la surface : la force d'interaction entre la pointe et la surface reste hors du régime répulsif à courte distance (d'où le nom de mode non contact). Le gradient de la force a pour effet de décaler la fréquence de résonance du microlevier. Comme les forces d'interaction pointe-surface décroissent avec la distance, le décalage est vers les basses fréquences dans le cas d'une force attractive (gradient positif) ou vers les hautes fréquences dans le cas d'une force répulsive (gradient négatif). A fréquence d'excitation du microlevier fixée, l'amplitude d'oscillation renseigne donc sur le gradient de force local. Ce mode d'imagerie est essentiellement utilisé pour l'analyse de forces à longue portée du type force magnétique ou force électrostatique, mais il n'est pas utilisé en biologie.

3. Mode contact intermittent.

En mode contact intermittent le microlevier oscille à une fréquence fixée, légèrement inférieure à sa fréquence de résonance libre, et la pointe n'atteint le régime répulsif qu'en bout d'oscillation, où elle vient effleurer la surface. L'oscillation du microlevier est généralement

excitée par la vibration d'un cristal piézoélectrique (**figure I-5**) ; ce mode d'excitation, appelé mode acoustique, est disponible de manière standard sur les AFM commerciaux.

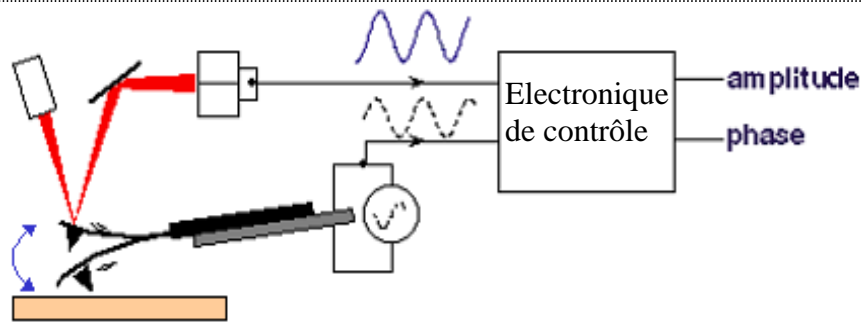


Figure I-5 : *Mode d'excitation acoustique. L'oscillation du microlevier est excitée par la vibration d'un cristal piézoélectrique.*

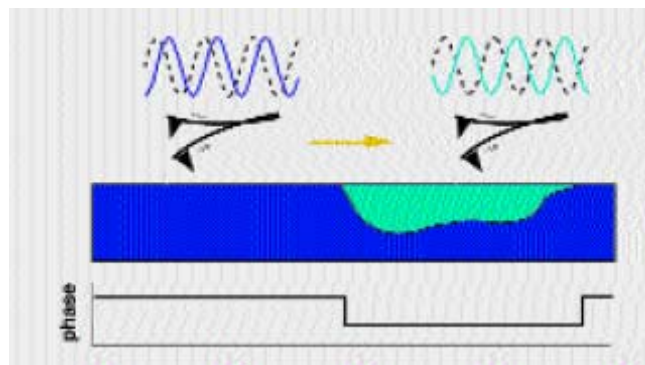


Figure I-6a : *Imagerie de phase : principe. Le déphasage entre le signal d'excitation et la réponse du microlevier dépend des propriétés mécaniques locales de la surface. Figure tirée de (5).*

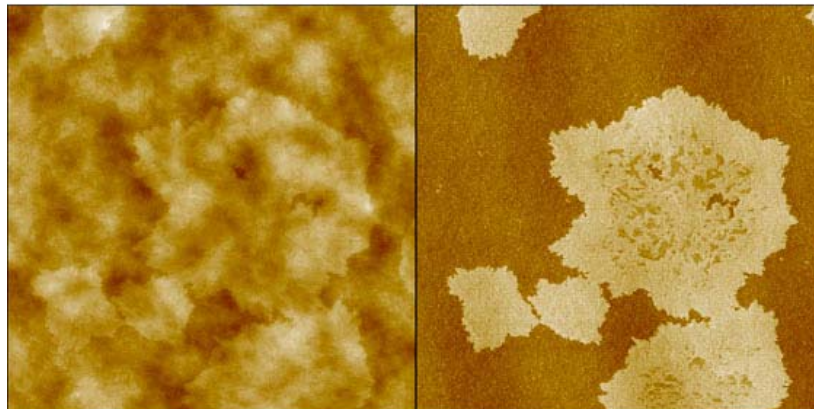


Figure I-6b : *Imagerie topographique et imagerie de phase : exemple.*

Observation de la surface d'un polyuréthane. Scan : 5 μm x 5 μm .

Gauche : image topographique, échelle en Z 60 nm. Droite : image de phase, échelle en Z 50 degrés ; les zones claires indiquent un déphasage important, correspondant à des zones de plus grande élasticité de la surface. Figure d'après (6).

L'amplitude d'oscillation est asservie à une valeur constante pendant le balayage à l'aide d'une boucle électronique de rétroaction PID (Proportionnelle, Intégrale et Dérivée) pour reconstruire une image de la topographie de la surface. Le déphasage entre l'excitation et la réponse du microlevier est également porteur d'information. Il peut être utilisé pour

construire une autre image, appelée image de phase, qui reflète principalement la dissipation d'énergie par l'oscillateur en fonction des propriétés mécaniques locales de la surface (7) (**figure I-6**).

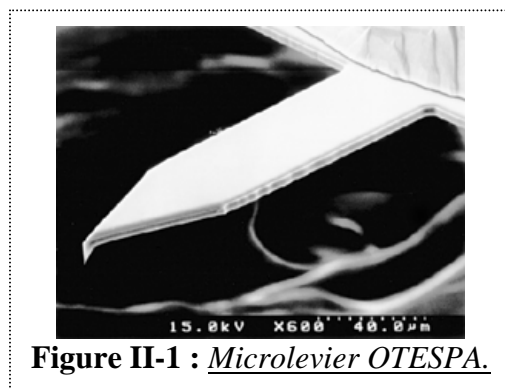
Les forces appliquées sur l'échantillon sont plus réduites qu'en mode contact : le temps de contact, très court, n'induit pratiquement pas de forces de frottement sur l'échantillon, et empêche une adhésion entre la pointe et la surface. En raison de ces forces réduites, c'est un mode très utilisé, en particulier pour la visualisation d'échantillons fragiles tels que les macromolécules biologiques.

II – Mode contact intermittent : aspects instrumentaux.

Différents paramètres instrumentaux sont à prendre en compte pour utiliser le mode contact intermittent de manière satisfaisante. Les propriétés mécaniques du microlevier oscillant doivent être adaptées à l'application envisagée (notamment le fonctionnement à l'air ou en milieu liquide). La caractérisation de la courbe de résonance libre (loin de la surface) est une étape indispensable dans la mise en œuvre de ce mode d'imagerie ; la qualité et la forme de cette courbe dépendent à la fois du mode d'excitation du microlevier, des propriétés physiques du microlevier et du milieu d'imagerie. Près de la surface et *a fortiori* en situation de contact intermittent, l'oscillation dépend de plus de l'interaction avec la surface. La modélisation des forces d'interaction pointe-surface à l'air ou en milieu liquide est un sujet complexe, encore plus difficile à aborder dans le cas d'objets individuels mous et hydratés comme des macromolécules biologiques et pourtant nécessaire pour un contrôle fin de cette force. Enfin la fréquence d'acquisition des images est une limitation majeure des AFM commerciaux actuels pour l'imagerie résolue en temps en milieu liquide.

A. Utilisation du mode contact intermittent à l'air.

En mode contact intermittent à l'air, on utilise typiquement des microleviers de constante de raideur ~ 50 nN/nm et de fréquence de résonance ~ 300 kHz (du type Olympus OTESPA, **figure II-1**). Cette raideur de microlevier est suffisante pour vaincre la force de capillarité (typiquement de l'ordre de 50 nN) entre la pointe et le film d'eau qui recouvre la surface en atmosphère ambiante.



1. Propriétés de la résonance.

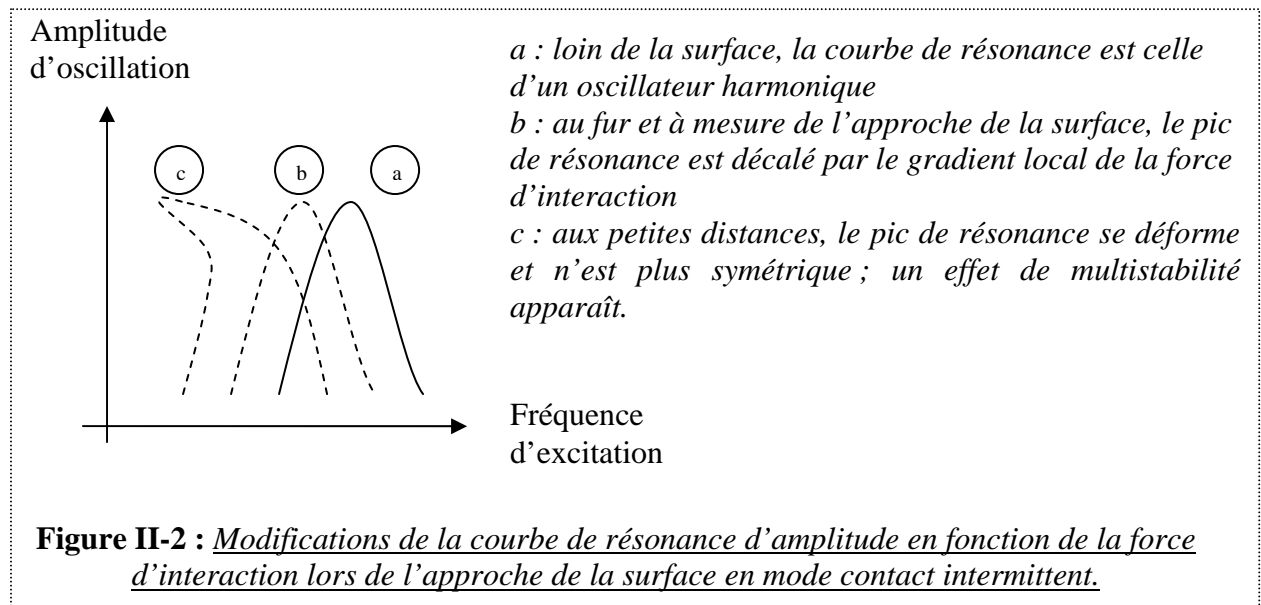
A l'air, loin de la surface, la courbe de résonance du microlevier est quasiment celle d'un oscillateur harmonique (**figure II-2a**). Le facteur de qualité Q reflète l'étroitesse relative du pic de résonance du microlevier ; en notant f_{res} la fréquence de résonance et Δf la largeur du pic de résonance, Q est donné par :

Equation 1 :

$$Q = \frac{f_{res}}{\Delta f}$$

Pour les microleviers décrits ci-dessus le facteur de qualité de la résonance est typiquement de l'ordre de 300.

La fréquence de résonance se décale au fur et à mesure de l'approche, en fonction de l'interaction pointe-surface, de manière équivalente au mode non contact (**figure II-2b**). En situation de contact intermittent, s'ajoute à ce décalage une déformation du pic de résonance, qui devient dissymétrique ; il faut alors utiliser un modèle d'oscillateur non linéaire pour décrire le système (**figure II-2c**). D'un point de vue pratique, cette non-linéarité a pour conséquence la possibilité de plusieurs points de fonctionnement stables, en fonction des paramètres d'interaction pointe-surface et de commande (plusieurs amplitudes d'oscillation possibles pour une même fréquence d'excitation) (8,9).



2. Modélisation de l'interaction pointe-surface.

La pointe est essentiellement caractérisée par son rayon de courbure R_c . Il est de l'ordre de 10-20 nm pour les microleviers que nous utilisons, mais varie d'un microlevier à l'autre. Quand les objets imagés sont de petite taille leurs dimensions latérales apparentes sont fortement élargies par rapport à leurs dimensions latérales réelles, essentiellement en fonction de R_c . Pour décrire l'effet du contact pointe-surface sur l'image d'un petit objet comme l'ADN, on peut considérer en première approximation un modèle de sphères dures (**figure II-3**), qui indique que :

Equation 2 :

$$D_{app} = 4\sqrt{R_{obj} \cdot R_c}$$

D_{app} : diamètre apparent de la sphère objet

R_{obj} : rayon réel de la sphère objet

La dimension verticale des objets observés doit également être interprétée avec précaution : en raison de leurs propriétés mécaniques particulières et de leur petite taille, les

hauteurs mesurées pour les macromolécules biologiques dépendent beaucoup des conditions de fonctionnement choisies pour l'imagerie. Plusieurs modèles existent pour décrire la mécanique du contact entre la pointe et la surface (voir par exemple (10)) ou des polymères en phase condensée (voir par exemple (11)). Il est beaucoup plus difficile de décrire l'interaction avec des macromolécules individuelles sur la surface comme l'ADN (9) ou les protéines.

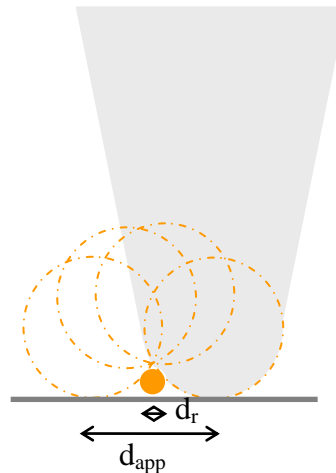


Figure II-3 : *Elargissement apparent de l'ADN par la pointe lors du balayage. Le rayon de courbure de l'apex de la pointe AFM est en général bien supérieur au diamètre de l'ADN ; en conséquence l'ADN apparaît sur l'image AFM avec une largeur apparente d_{app} bien supérieure à sa largeur réelle d_r .*

B. Utilisation du mode contact intermittent en milieu liquide.

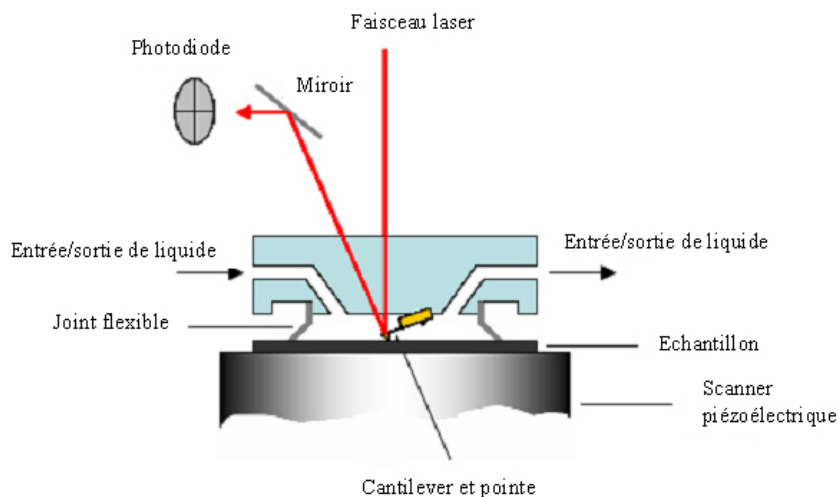


Figure II-4 : *Schéma de la cellule liquide de l'AFM Multimode.*

En milieu liquide, notre support du microlevier (cellule liquide, [figure II-4](#)) ne peut exciter l'oscillation en mode acoustique qu'à des fréquences basses, typiquement jusqu'à ~30 kHz. Il faut donc des microleviers dont la fréquence de résonance en liquide soit suffisamment basse. Comme il n'y a plus de force de capillarité entre la pointe et la surface, il est de plus possible d'utiliser des microleviers beaucoup plus souples (typiquement avec une constante de raideur ~0,05 nN/nm) que ceux utilisés en mode contact intermittent à l'air. Les

microleviers habituellement utilisés pour l'imagerie en mode contact (type Veeco DNP ou Olympus OTR4, **figure II-5**) satisfont ces critères.

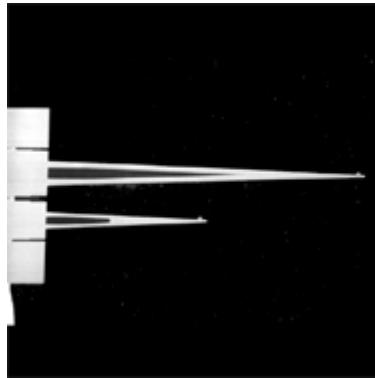


Figure II-5 : *Microleviers OTR4. Les deux microleviers sont respectivement longs de 100 et 200 μm et larges de 15 et 30 μm (valeurs nominales).*

1. Modes d'excitation de l'oscillation.

En milieu liquide, avec le mode d'excitation acoustique, des résonances annexes viennent parasiter la réponse du microlevier et rendent difficile l'identification du vrai pic de résonance. La possibilité d'obtenir des images n'est pas un critère suffisant puisqu'il est souvent possible d'obtenir des images satisfaisantes en fixant la fréquence d'excitation au niveau de différents pics. Deux autres modes d'excitation ont été proposés pour obtenir une résonance bien identifiée en milieu liquide : un mode électrostatique (12) et un mode magnétique (13).

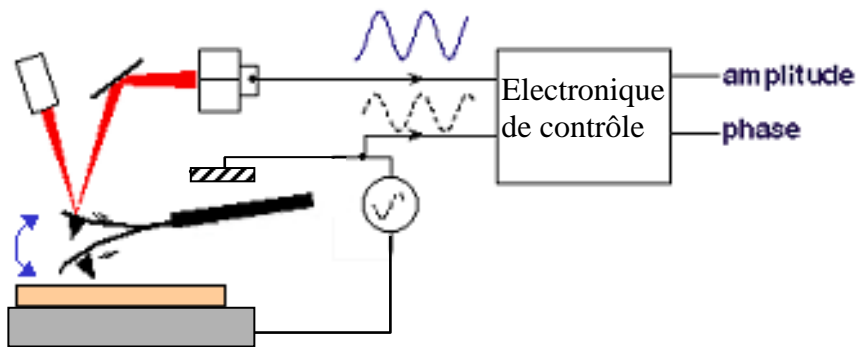
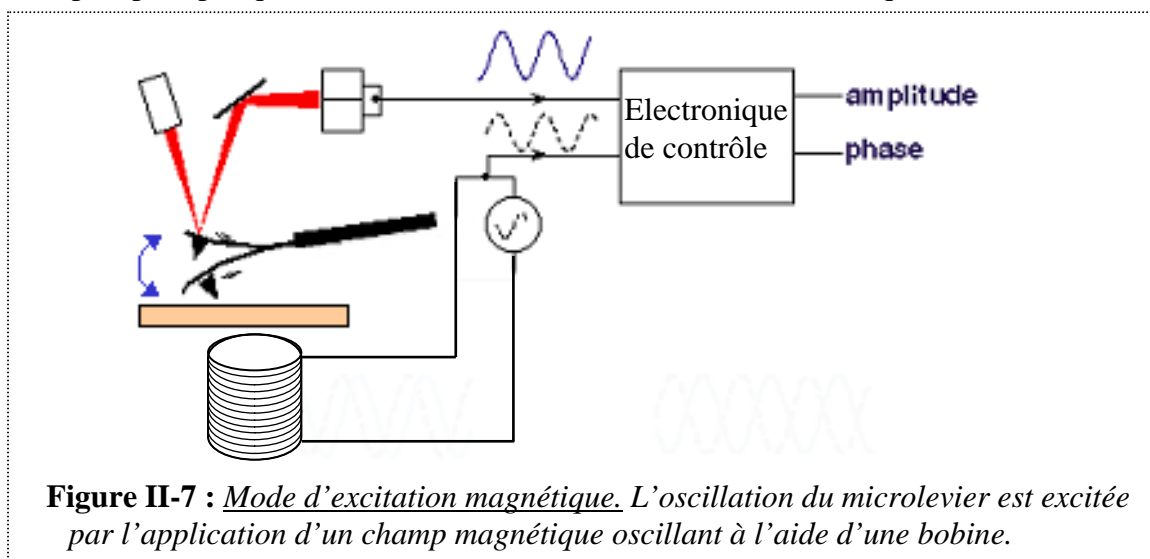


Figure II-6 : *Mode d'excitation électrostatique. L'oscillation du microlevier est excitée par l'application d'une différence de potentiel alternative entre deux plaques métalliques.*

Le mode électrostatique permet d'exciter l'oscillation d'un microlevier standard par application d'une différence de potentiel alternative entre deux plaques métalliques situées de part et d'autre du microlevier (**figure II-6**). Le champ électrique est plus intense au niveau de la pointe et c'est donc essentiellement à ce niveau que la force électrique agit. Ce mode fonctionne bien à l'air et a été validé en milieu liquide dans l'eau et dans le KCl jusqu'à une concentration de 100 mM (12). Cependant il est nécessaire d'appliquer une différence de potentiel très importante pour arriver à asservir, probablement à cause d'effets d'écrantage électrostatique, et les amplitudes d'oscillation obtenues sont faibles (de l'ordre du nm), ce qui rend l'approche pointe-surface particulièrement délicate. Comme ce mode reste difficile à mettre en œuvre en milieu liquide nous ne l'avons pas utilisé.

Le mode magnétique permet d'exciter l'oscillation d'un microlevier magnétique par application d'une force magnétique sur la pointe (**figure II-7**). Il est plus facile à mettre en œuvre en milieu liquide que le mode électrostatique mais il utilise des microleviers particuliers, partiellement revêtus d'une couche métallique magnétique (cobalt et/ou fer). Les microleviers magnétiques commerciaux ont ce dépôt sur toute leur longueur, la force magnétique d'excitation agit donc sur toute la longueur du microlevier. Pour obtenir une excitation plus fine il faut réaliser le dépôt seulement à l'extrémité du microlevier, au-dessus de la pointe ; cela nécessite l'utilisation d'un masque et les microleviers obtenus ont des propriétés magnétiques assez hétérogènes.

Une comparaison du fonctionnement en mode d'excitation acoustique et en mode d'excitation magnétique du même microlevier en milieu liquide est faite dans (14). Le pic de résonance en mode magnétique est facile à identifier et de forme proche d'un pic d'oscillateur harmonique, tandis qu'une forêt de pics sont présents sur le spectre de résonance en mode acoustique. Cependant les mesures de largeur et/ou hauteur effectuées sur de l'ADN et sur des bicouches phospholipidiques avec les deux modes donnent des résultats équivalents (14).



A la différence du mode électrostatique, le mode magnétique est implémenté sur certains appareils commerciaux. Mais à ma connaissance il n'améliore pas sensiblement les images et il est peu utilisé ; le mode acoustique reste privilégié, grâce à sa simplicité de mise en œuvre. Par conséquent j'ai travaillé exclusivement avec le mode d'excitation acoustique.

2. Facteur de qualité de la résonance.

Le facteur de qualité de la résonance en milieu liquide est de l'ordre de quelques unités, bien inférieur (environ deux ordres de grandeur) au facteur de qualité à l'air. L'ordre de grandeur de la force appliquée à l'échantillon peut être estimé à partir de la force F nécessaire pour exciter à sa fréquence de résonance un microlevier de raideur k et d'amplitude d'oscillation libre A (15):

Equation 3 :

$$F = \frac{kA}{Q}$$

Avec des ordres de grandeur typiques ($Q \sim 2$ en milieu liquide, $k \sim 0,05$ nN/nm, $A \sim 4$ nm), cette force est de l'ordre de 0,1 nN.

Il est possible de diminuer cette force en augmentant le facteur de qualité apparent du système, à l'aide d'un circuit électronique supplémentaire qui exerce une rétroaction positive (système appelé *Q control*). Le *Q control* permet aussi de faire mieux ressortir le pic de résonance, même avec le mode d'excitation acoustique ; une comparaison des spectres de résonance en mode d'excitation acoustique ou magnétique avec ou sans *Q control* est faite par exemple par Tamayo & al (15) (figure II-8). Notre Multimode/Nanoscope III n'est pas équipé de ce système mais il est implémenté sur les nouveaux AFMs commerciaux (par exemple le contrôleur Nanoscope IV de Veeco Instruments). A notre connaissance, le *Q control* reste cependant peu utilisé.

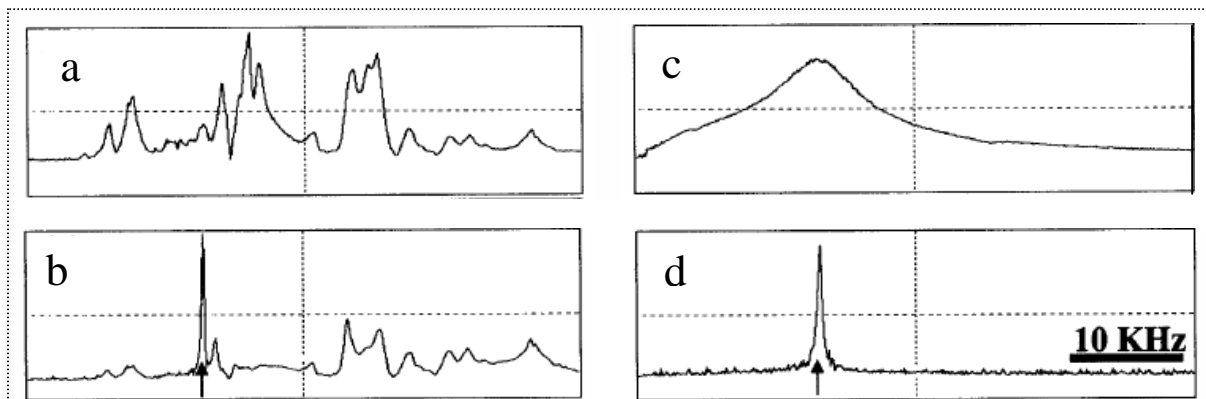


Figure II-8 : *Effet du Q control sur les spectres de résonance en milieu liquide.*

a : excitation acoustique ; b : excitation acoustique et Q control.

c : excitation magnétique ; d : excitation magnétique et Q control.

Adapté de (15).

Remarquons que le temps caractéristique de réaction τ de l'oscillateur est donné par :

Equation 4 :

$$\tau \approx \frac{Q}{f_{res}}$$

Or l'oscillation doit avoir le temps d'atteindre un régime permanent au niveau de chaque pixel de l'image pour être en mode contact intermittent vrai. Avec une fréquence de résonance de l'ordre de 10 kHz en liquide et un taux d'échantillonnage de 512 pixels/ligne cela impose une limite supérieure de fréquence de balayage des lignes d'environ 10 Hz en milieu liquide. Si la fréquence de balayage est supérieure, le régime permanent n'est pas atteint. Or la force appliquée est plus importante en régime transitoire. Pour limiter la durée du régime transitoire, il ne faut donc pas trop augmenter Q .

3. Modélisation de l'interaction pointe-surface.

Il faut analyser le comportement oscillant d'un microlevier au voisinage d'une surface, en milieu liquide. Une difficulté majeure est de comprendre et bien modéliser l'influence du mouvement du liquide « coincé » entre la pointe et la surface (16-18). Pour osciller le microlevier doit déplacer ce liquide, mais la viscosité du liquide s'y oppose. Comme le microlevier est incliné par rapport à la surface, cet effet n'est pas réparti de manière

homogène le long du microlevier ; il est plus intense au niveau de la pointe, et se fait d'autant plus sentir que la distance à la surface est petite. Dans le cas d'un microlevier rectangulaire et pour des distances pointe-surface dans la gamme des μm , un modèle mathématique a été établi pour décrire cet effet hydrodynamique. Il est en bon accord avec les données expérimentales obtenues en NaCl 150 mM NaH_2PO_4 5 mM pH 7,5 (16).

La force d'interaction entre la pointe et la surface aux courtes distances, dans la gamme des nanomètres, met également en jeu des interactions de Van der Waals et des interactions électrostatiques, qui peuvent être décrites en utilisant la théorie DLVO (19). Müller et al ont proposé un modèle prenant à la fois en compte l'interaction de la pointe avec la surface et l'interaction d'une petite protrusion sur la pointe avec une molécule biologique, dans le cas du mode contact (20). D'après ce modèle, le terme de Van der Waals se fait surtout sentir aux très courtes distances et dépend seulement de la forme et de la nature de la pointe et de la surface. Le terme électrostatique est en général à plus longue portée et dépend des densités de charge de la pointe et de la surface mais également de la concentration des ions en solution et du pH, qui affectent l'écrantage de cette composante. Bien que ce modèle ne décrive que la situation du mode contact, il nous donne aussi une indication des paramètres dont dépend l'interaction pointe-surface en mode contact intermittent.

La difficulté de modélisation de ces différents effets n'empêche cependant pas de travailler et de faire de l'imagerie en milieu liquide.

C. Temps d'acquisition des images.

Les paramètres importants déterminant le temps d'acquisition des images sont récapitulés ci-dessous : les paramètres ne pouvant pas être modifiés (intrinsèques à la construction de l'instrument), les paramètres pour lesquels il existe une latitude de choix avant l'expérience (caractéristiques du microlevier), et les paramètres sur lesquels il est possible d'agir pendant l'expérience (paramètres d'imagerie). C'est surtout pour l'AFM en milieu liquide qu'il est important d'augmenter au maximum la fréquence d'acquisition des images, tout en conservant une résolution suffisante, afin d'obtenir des informations dynamiques fines sur le système étudié.

1. Paramètres de construction intrinsèques à l'instrument.

1.1. Bande passante du convertisseur RMS-DC.

Le convertisseur RMS-DC sert à mesurer la valeur efficace du signal de réponse qui représente l'amplitude d'oscillation du microlevier. En fonction de la fréquence de résonance f_c du microlevier sa bande passante f_d détermine le nombre de périodes d'oscillations n_o utilisées pour la mesure :

Equation 4 :

$$n_o = \frac{f_c}{f_d}$$

Par exemple avec un microlevier oscillant à 30 kHz en milieu liquide et un convertisseur RMS-DC de bande passante $f_d = 5$ kHz, $n_o = 6$ (21). En concevant un convertisseur avec une bande passante plus large, la mesure peut être faite plus rapidement.

1.2. Bande passante de la rétroaction (boucle PID + scanner).

Le système de rétroaction sert à garder constante l'amplitude d'oscillation du microlevier lors du balayage de la surface. Sa bande passante f_b doit être adaptée aux fréquences spatiales w rencontrées à la vitesse de balayage V , avec la contrainte (22) :

Equation 5 :

$$f_b \geq \frac{V}{w}$$

f_b est limitée par la fréquence de résonance du scanner piézoélectrique plus que par l'électronique de la boucle PID (PID : Proportionnelle, Intégrale et Dérivée). Dans le système d'Ando et al (22), f_b est d'environ 60 kHz ce qui impose comme valeur limite supérieure 120 $\mu\text{m/s}$ pour la vitesse de balayage V si la fréquence spatiale considérée w est de 2 nm.

2. Fréquence de résonance des microleviers.

En mode contact intermittent, le microlevier doit osciller d'au moins un cycle pour chaque pixel de l'image afin que soit mesurée la modification d'amplitude due à l'interaction avec la surface. Comme les microleviers sont excités au voisinage de leur fréquence de résonance, plus celle-ci est élevée, plus vite la mesure est effectuée. Dans l'exemple d'un microlevier rectangulaire, la fréquence de résonance f_c et la raideur k sont données par les formules suivantes (22) :

Equation 6 :

$$f_c = 0,56 \frac{d}{L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}$$

Equation 7 :

$$k = \frac{wd^3}{4L^3} E$$

avec

- d : épaisseur du microlevier
- L : longueur du microlevier
- w : largeur du microlevier
- E : module d'Young du matériau
- ρ : densité du matériau

En fabriquant des microleviers de petites dimensions on augmente la fréquence de résonance tout en gardant une constante de raideur faible. La fréquence d'acquisition des images peut alors être augmentée (22,23).

3. Paramètres d'imagerie.

3.1. Nombre de pixels de l'image.

Le temps t_{im} d'acquisition de l'image est donné par :

Equation 8 :

$$t_{im} = N_L t_L = \frac{N_L}{f_L}$$

où N_L est le nombre lignes, t_L le temps mis pour parcourir chaque ligne de l'image, f_L la fréquence de balayage des lignes. Diminuer le nombre de pixels de l'image permet donc de réduire le temps d'acquisition ; il faut conjointement diminuer la taille de la zone scannée du même facteur, pour ne pas perdre en résolution (cela revient à garder la même taille absolue de pixel).

Si la résolution maximale n'est pas nécessaire, le nombre de pixels peut être diminué (et donc t_{im} augmenté) sans réduire la taille de la zone scannée (ceci implique que la taille absolue du pixel augmente). Un tel compromis entre résolution et rapidité d'acquisition des images peut être adéquat pour suivre la dynamique des complexes ADN-protéines sur la surface.

3.2. Le problème de la dérive.

En général au cours des expériences d'AFM il se produit entre les images une dérive plus ou moins rapide, d'origine à la fois thermique et mécanique. Le problème existe pour l'observation AFM à l'air, mais il est accentué en milieu liquide, où la dérive cumulée peut rapidement atteindre plusieurs centaines de nm, avec le risque que les molécules d'intérêt ne soient alors plus dans la zone balayée. J'ai mesuré dans mes expériences une vitesse de dérive atteignant typiquement 3 nm/s (soit environ 200 nm/min). Le joint flexible qui assure la jonction et l'étanchéité entre la cellule liquide et la surface de l'échantillon a une grande influence sur la dérive ; les nouveaux joints commercialisés par Veeco Instruments, avec un profil en S (**figure II-9**), sont de ce point de vue bien plus performants que les anciens joints toroïdaux.



Compenser la dérive nécessite habituellement que l'opérateur réajuste régulièrement la zone scannée en imposant un *offset*, mais cela interrompt la séquence d'enregistrement d'images. Pour minimiser ce problème, une équipe hollandaise a mis au point une méthode de corrélation des paires d'images successives qui permet d'ajuster la zone scannée entre chaque capture d'image. Ils ont pu par exemple suivre un plasmide pendant environ 30 minutes avec une dérive cumulée inférieure à 10 nm (21).

4. Performances.

4.1. Avec un AFM commercial.

L'AFM Multimode utilisé au laboratoire est associé à l'électronique de contrôle Nanoscope IIIa. Pour l'observation à l'air, c'est typiquement une fréquence de balayage des lignes entre 0,5 et 1,5 Hz qui est choisie pour observer les macromolécules biologiques immobilisées sur la surface, ce qui pour une image de 512 lignes donne un temps d'acquisition par image de quelques minutes. Pour l'observation en milieu liquide, il est possible de réaliser un balayage plus rapide ; des séquences avec une image environ toutes les 6-8 secondes et une résolution satisfaisante peuvent être enregistrées. Des exemples de séquences d'images enregistrées au cours de ce travail de thèse sont présentés aux **chapitres 3** et **5**.

4.2. Avec un AFM spécialisé.

A ma connaissance, c'est avec l'AFM développé par Ando et al (22) que la plus haute fréquence d'acquisition des images a été atteinte, en milieu liquide, après amélioration des principaux facteurs limitants présentés précédemment. Cette équipe a mis au point un AFM fonctionnant avec des microleviers de petite dimension (longueur ~10 μm , épaisseur 140 nm, largeur 2 μm), pour concilier fréquence de résonance élevée (450-650 kHz en milieu liquide) et constante de raideur faible (estimée à 150-280 pN/nM). Ils ont conjointement conçu un nouveau type de convertisseur RMS-DC qui n'a besoin que d'une demi-période de signal pour fonctionner. Le système de détection optique de la déflexion du microlevier a été adapté pour obtenir une taille de spot laser (2-3 μm seulement) adaptée à la petite taille des microleviers. Ils ont également fabriqué un nouveau type de scanner. Enfin, le traitement des données par l'ordinateur a été optimisé. Avec toutes ces améliorations, le temps d'acquisition d'une image de 100 x 100 pixels a été réduit à 80 ms. Le fonctionnement en milieu liquide pour suivre une biomolécule sur la surface est validé avec l'observation sur un champ de 240 x 240 nm^2 des mouvements d'une molécule de myosine V sur une surface de mica. Cependant à ma connaissance aucun autre travail l'utilisant en biologie n'a été publié à ce jour.

III – Principales applications de l'AFM en biologie.

L'AFM a un potentiel énorme, principalement grâce à la possibilité de travailler en milieu liquide et ainsi de se rapprocher des conditions physiologiques. L'AFM permet déjà d'aborder un large éventail de sujets biologiques. Cependant l'analyse des paramètres biophysiques des expériences n'est pas toujours prise en compte de manière suffisamment approfondie pour passer de la faisabilité de l'enregistrement des données à la validation d'une interprétation biologique. Les paragraphes suivants indiquent brièvement les principaux domaines d'application actuels de l'AFM en biologie, le lecteur se référera par exemple à (25), (26) et (27) pour des revues plus détaillées.

A. Biomolécules.

1. Imagerie.

Les macromolécules biologiques sont des objets dont les dimensions sont typiquement dans la gamme de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres. Il est nécessaire que le substrat utilisé soit extrêmement plan et propre pour pouvoir observer d'aussi petits objets ; le mica est le plus utilisé, car il répond très bien à ces exigences. La difficulté est ensuite d'amener et de maintenir les molécules sur la surface du substrat. L'adsorption des macromolécules biologiques dépend beaucoup de leur nature et de leurs propriétés physico-chimiques, qui déterminent l'interaction avec la surface. Diverses « recettes » expérimentales ont été établies, et de nombreux types de macromolécules individuelles ont déjà pu être étudiés : acides nucléiques (ADN, ARN), protéines, polysaccharides... (25). L'étude de l'ADN et des interactions ADN-protéines fait l'objet de très nombreux travaux ; nous y reviendrons de manière approfondie au **chapitre 3**. D'autres assemblages supramoléculaires comme des fibrilles (28) ou des éléments du cytosquelette des cellules (filaments d'actine, microtubules) (26) sont aussi étudiés à l'aide de l'AFM.

2. Courbes force-distance.

Les courbes force-distance ont mené à de très nombreuses applications (pour une revue voir (3)). En biologie, il s'agit principalement d'étudier des forces d'interaction intramoléculaires (en tirant sur les extrémités d'une molécule d'ADN, d'une protéine,...) (voir **chapitre 1**) ou des forces d'interactions intermoléculaires (entre un récepteur et son ligand, un anticorps et son antigène,...(29)) ; on parle habituellement de « spectroscopie de force ». La faisabilité de ces études est déjà largement démontrée, mais l'interprétation des données issues de courbes force-distance dépend du modèle physique utilisé pour décrire la mécanique de la macromolécule et reste en général délicate.

B. Membranes

1. Imagerie.

Les membranes, qu'il s'agisse de membranes natives isolées (20) ou de systèmes membranaires reconstitués (30), sont des échantillons très plans, peu rugueux, dont la surface peut être imagée en mode contact en milieu liquide, à condition de bien contrôler la force appliquée par la pointe (20). L'AFM est par exemple capable de donner des informations sur l'existence, la forme et la taille de microdomaines membranaires (30) ou sur la cinétique de formation et de fusion de bicouches lipidiques (31). En augmentant la force exercée sur la membrane il est possible d'effectuer de la nanodissection et de défaire la couche superficielle pour exposer et observer une couche inférieure (32). Les membranes peuvent également être le support de la formation de cristaux 2D de protéines ; l'AFM permet alors d'obtenir des informations sur la structure de surface et la conformation des protéines (33).

2. Courbes force-distance.

Des travaux alternant imagerie à très haute résolution et enregistrement de courbes force-distance ont permis de caractériser au niveau de protéines membranaires individuelles des forces intra- ou intermoléculaires (32) (**Figure III-1**).

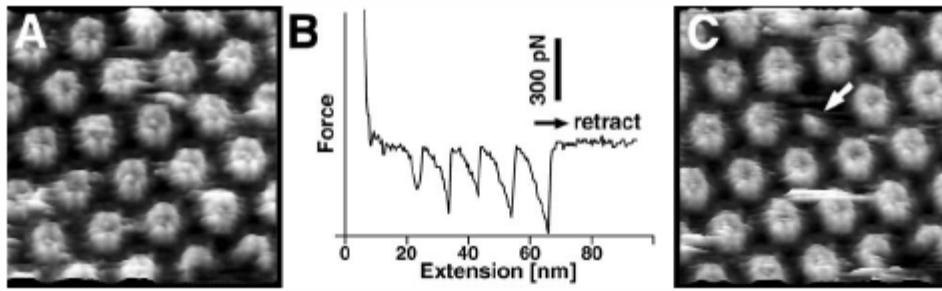


Figure III-1 : *Etude des protéines d'une couche membranaire native de bactérie.*

A, C : Topographie de la surface observée en mode contact en milieu liquide avant (A) et après (C) l'enregistrement de la courbe force-distance présentée en B ; la distance entre les centres des protéines est de 18 nm et l'échelle en Z est de 3 nm.

B : Courbe force-distance enregistrée au niveau d'une protéine individuelle, dont la position sur l'image AFM est donnée par la flèche blanche en C.

Figures d'après (32).

C. Cellules.

1. Imagerie.

La possibilité de travailler en milieu liquide a aussi stimulé de nombreux travaux sur les cellules. Ce sont des objets dont la taille (dimensions typiques dans la gamme 1-100 μm) est proche des extensions limites verticales et latérales du piézoélectrique de l'AFM. Leur préparation pour l'observation en AFM n'est pas simple ; différentes approches pour les immobiliser sur une surface ont été développées (25). Ce sont des objets fragiles, déformables, de forme irrégulière, et le mode d'imagerie contact intermittent est souvent préféré au mode contact, en raison des forces de frottement réduites exercées sur l'échantillon (34). En complément de l'imagerie topographique, l'imagerie de phase apporte des informations sur les propriétés mécaniques locales de la cellule (27). Des procédés de fixation peuvent être utilisés pour rigidifier les cellules et faciliter leur observation. Avec les AFMs commerciaux les plus récents, les images AFM peuvent être collectées en même temps que des images de microscopie optique en lumière blanche ou en fluorescence, sur le même échantillon (27) ([figure III-2](#)). Des phénomènes dynamiques comme par exemple la motilité d'une cellule (35) ou la division d'une cellule (36) peuvent être suivis avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques minutes en AFM, en parallèle du suivi en microscopie optique.

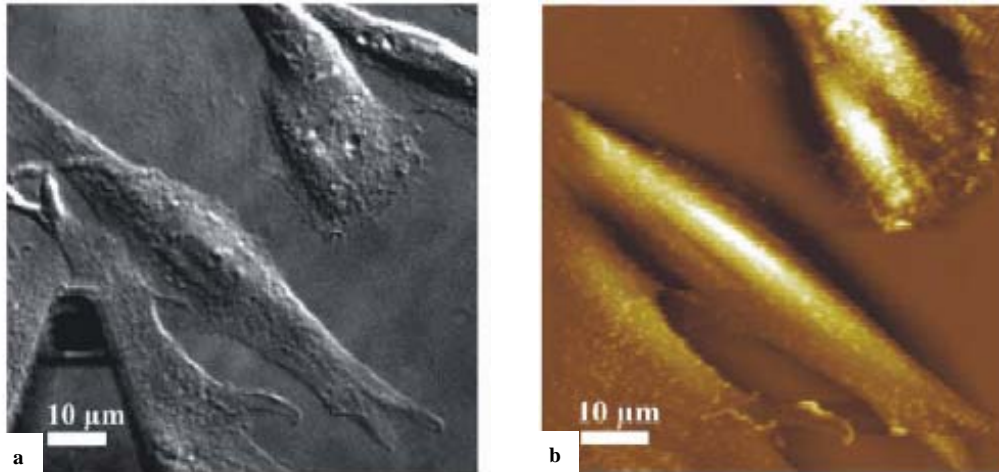


Figure III-2 : *Observation simultanée en microscopie optique (a) et en AFM en mode contact (b) de cellules fixées à la glutaraldéhyde. AFM : scan 70 µm x 70 µm ; échelle en Z 3 µm. Images tirées de (37).*

2. Courbes force-distance.

Les courbes force-distance commencent à être utilisées pour analyser des propriétés mécaniques des cellules vivantes, comme l'adhérence entre cellules (38), ou les propriétés élastiques locales des cellules (39). L'interprétation des résultats au-delà de la propriété mécanique apparente reste cependant délicate : une cellule est un objet très complexe à modéliser, composé de constituants aux propriétés mécaniques très diverses (membrane, cytosquelette,...) et capables de se déformer dynamiquement dans les conditions d'étude en milieu liquide.

D. CryoAFM.

Les objets biologiques étudiés en AFM décrits ci-dessus sont des objets mous, qui peuvent être assez facilement déformés par la pointe AFM, même dans des conditions d'imagerie suffisamment douces pour éviter de les endommager. Cette déformabilité contribue à limiter la résolution obtenue. L'imagerie à température cryogénique (typiquement, à moins de 100 K) est une piste explorée depuis environ une dizaine d'années pour atteindre une résolution supérieure, grâce au durcissement des objets à ces températures, et à la diminution considérable de l'agitation thermique. Cette approche a déjà été réalisée sur quelques systèmes (par exemple immunoglobulines, myosine, ADN, virus, globules rouges, revus dans (40)) mais n'est pas simple à mettre en œuvre tant sur le plan technique que sur le plan de la préparation des échantillons, et reste à ce jour très peu utilisée.

Conclusion.

L'AFM est un outil qui présente plusieurs modes de fonctionnement. Ceux-ci permettent d'étudier des objets biologiques comme les macromolécules, les membranes ou les cellules par différentes approches (mesure de forces, imagerie topographique,...). En imagerie, le mode contact intermittent est le plus performant pour limiter les forces exercées par la pointe AFM sur l'objet, et présente donc un intérêt particulier. Le potentiel de l'AFM notamment pour l'observation en milieu liquide a déjà stimulé de nombreux travaux en biologie sur les différents types d'objets. Les principaux progrès techniques nécessaires

concernent le contrôle fin de l'interaction pointe-échantillon et l'augmentation de la fréquence d'acquisition des images. Pour mieux répondre aux problématiques biologiques abordées ce sont aussi des progrès méthodologiques qui doivent être accomplis. L'obtention et la validation d'informations biologiques nouvelles à partir des données AFM requièrent de dépasser les approches encore souvent empiriques par une analyse et une optimisation rigoureuses des paramètres de préparation et d'observation des échantillons.

Bibliographie du chapitre 2.

1. Binnig, G., H. Rohrer, C. Gerber, and E. Weibel. 1982. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* 49:57-61.
2. Binnig, G., C. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56:930-933.
3. Butt, H., B. Capella, and M. Kappl. 2005. Force measurements with the atomic force microscope : technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* 59:1-152.
4. Prater, C. B., P. Maivald, K. Kjoller, and M. Heaton. 1995. Probing nanoscale forces with the atomic force microscope. *Veeco Application Note*.
5. Babcock, K. and C. Prater. 2004. Phase imaging : beyond topography. *Veeco Application Note*.
6. Revenko, I., Y. Tang, and J. Santerre. 2001. Surface structure of polycarbonate urethanes visualized by atomic force microscopy. *Surface Science* 491:346-354.
7. Anczykowski, B., B. Gotsmann, H. Fuchs, J. P. Cleveland, and V. B. Elings. 1999. How to measure energy dissipation in dynamic mode atomic force microscopy. *Applied Surface Science* 140:376-382.
8. Frétiigny, C. Les microscopies de force : aspects expérimentaux et applications. Document de cours.
9. Nony, L. 2000. Analyse de la microscopie de force dynamique : application à l'étude de l'ADN. Thèse de doctorat de l'Université Bordeaux 1.
10. Piétrement, O. 2000. Imagerie et caractérisation nanomécanique des surfaces par Microscopie à Force Atomique. Thèse de doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardennes.
11. Basire, C. 1998. Contact, adhésion et frottement à l'échelle sub-micrométrique. Etude expérimentale sur des matériaux viscoélastiques. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6.
12. Frétiigny, C., D. Michel, B. Brocart, and C. Basire. 1999. Electrostatic forces for mechanical studies in AFM. The 1st International Conference on Scanning Probe Microscopy of Polymers, Santa Barbara (USA).
13. Han, W., S. Lindsay, and T. Jing. 1996. A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Applied Physics Letters* 69:4111-4113.
14. Revenko, I. and R. Proksch. 2000. Magnetic and acoustic tapping mode microscopy of liquid phase phospholipid bilayers and DNA molecules. *Journal of Applied Physics* 87:526-533.

15. Tamayo, J., A. Humphris, and M. Miles. 2000. Piconewton regime dynamic force microscopy in liquid. *Applied Physics Letters* 77:582-584.
16. Rankl, C., V. Pastushenko, F. Kienberger, C. M. Stroh, and P. Hinterdorfer. 2004. Hydrodynamic damping of a magnetically oscillated cantilever close to a surface. *Ultramicroscopy* 100:301-308.
17. Maali, A., C. Hurth, C. Jai, T. Cohen-Bouhacina, R. Boisgard, and J. P. Aimé. 2004. Mesure des fonctions hydrodynamiques d'un microlevier oscillant encastré-libre. Forum des microscopies à sonde locale - Ax les Thermes - Bonascre (France).
18. Schäffer, T., J. Cleveland, F. Ohnesorge, D. Walters, and P. Hansma. 1996. Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid. *Journal of Applied Physics* 80:3622-3627.
19. Israelachvili, J. 1991. Intermolecular and surface forces. Academic Press Limited, London 2nd edition.
20. Muller, D. J., D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Muller, and A. Engel. 1999. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophys J* 76:1101-1111.
21. van Noort, S. J., K. O. van Der Werf, B. G. de Grooth, and J. Greve. 1999. High speed atomic force microscopy of biomolecules by image tracking. *Biophys J* 77:2295-2303.
22. Ando, T., N. Kodera, D. Maruyama, E. Takai, K. Saito, and A. Toda. 2002. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *Jpn. J. Appl. Phys.* 41:4851-4856.
23. Kindt, J. H., J. A. Cutroni, T. Gutsman, and P. K. Hansma. 2003. New atomic force microscopes (AFM) for the study of enzymatic properties and processes. *AAPPS Bulletin* 13.
24. 2003. New silicone O-ring for fluid cantilever holders. Veeco Application Note.
25. Morris, V. J., A. R. Kirby, and A. P. Gunning. 1994. *Atomic Force Microscopy for biologists*. Imperial College Press.
26. Giocondi, M. C., P. E. Milhiet, E. Lesniewska, and C. Le Grimellec. 2003. [Atomic force microscopy: from cellular imaging to molecular manipulation]. *Med Sci (Paris)* 19:92-99.
27. Alessandrini, A. and P. Facci. 2005. AFM : a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology* 16:R65-R92.
28. Ding, T. T. and J. D. Harper. 1999. Analysis of amyloid-beta assemblies using tapping mode atomic force microscopy under ambient conditions. *Methods Enzymol* 309:510-525.

29. Lin, S., J.-L. Chen, L.-S. Huang, and H.-W. Lin. 2005. Measurement of the forces in protein interactions with atomic force microscopy. *Current proteomics*. 2:55-81.
30. Milhiet, P. E., M. C. Giocondi, and C. Le Grimellec. 2003. AFM imaging of lipid domains in model membranes. *ScientificWorldJournal* 3:59-74.
31. Richter, R., A. Mukhopadhyay, and A. Brisson. 2003. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys J* 85:3035-3047.
32. Fotiadis, D., S. Scheuring, S. A. Muller, A. Engel, and D. J. Muller. 2002. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron* 33:385-397.
33. Reviakine, I. I., W. Bergsma-Schutter, and A. Brisson. 1998. Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM. *J Struct Biol* 121:356-361.
34. Lesniewska, E., P. E. Milhiet, M. C. Giocondi, and C. Le Grimellec. 2002. Atomic force microscope imaging of cells and membranes. *Methods Cell Biol* 68:51-65.
35. Oberleithner, H., G. Giebisch, and J. Geibel. 1993. Imaging the lamellipodium of migrating epithelial cells in vivo by atomic force microscopy. *Pflugers Arch* 425:506-510.
36. Matzke, R., K. Jacobson, and M. Radmacher. 2001. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat Cell Biol* 3:607-610.
37. Madl, J., S. Rhode, H. Stangl, H. Stockinger, P. Hinterdorfer, G. J. Schutz, and G. Kada. 2006. A combined optical and atomic force microscope for live cell investigations. *Ultramicroscopy* 106:645-651.
38. Benoit, M. and H. E. Gaub. 2002. Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs* 172:174-189.
39. Matzke, R., K. Jacobson, and M. Radmacher. 2001. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nature Cell Biol* 3:607-610.
40. Shao, Z. and Y. Zhang. 1996. Biological cryo atomic force microscopy: a brief review. *Ultramicroscopy* 66:141-152.

Chapitre 3

Adsorption et étalement de l'ADN
sur le mica.

PLAN DU CHAPITRE 3

Introduction	67
I – Données initiales sur l’adsorption et l’étalement de l’ADN pour l’observation AFM.	67
A. Présentation du substrat AFM, le mica.	67
B. Problématique de l’étalement de l’ADN sur la surface.	68
C. Problématique de l’observation des interactions ADN-protéines par AFM.	68
D. Méthode des cations divalents.	69
1. <i>Données principales sur l’adsorption.</i>	69
2. <i>Applications.</i>	71
2.1. <i>Observation à l’air.</i>	71
2.2. <i>Observation en milieu liquide.</i>	71
E. Méthodes de fonctionnalisation par des groupes chargés positivement.	72
1. <i>AP-mica.</i>	72
2. <i>Surfaces dérivées de l’AP-mica.</i>	73
2.1. <i>TO-mica</i>	73
2.2. <i>GD-mica</i>	74
3. <i>Autres fonctionnalisations</i>	74
F. Discussion.	74
II – Etude de la force d’adsorption de l’ADN sur le mica	75
A. Modélisation des forces d’interactions électrostatiques ADN-mica.	76
1. <i>Force d’interaction des doubles couches électriques.</i>	76
1.1. <i>Simplifications du problème.</i>	76
1.2. <i>Calcul de la pression entre les deux surfaces chargées.</i>	77
1.3. <i>Evolution de la pression avec d et σ_a.</i>	79
2. <i>Force associée aux corrélations de position entre cations.</i>	80
2.1. <i>Calcul de la force.</i>	81
2.2. <i>Effet de l’écrantage des charges en fonction de la force ionique.</i>	82
2.3. <i>Effet de la compétition entre cations monovalents et divalents.</i>	84
3. <i>Comparaison des forces de répulsion et d’attraction.</i>	86
B. Etude expérimentale de l’effet de la charge de la surface et des concentrations en cations sur l’adsorption de l’ADN.	87
1. <i>Matériels et méthodes.</i>	87
1.1. <i>ADN</i>	87
1.2. <i>Microscopie électronique à transmission.</i>	87
1.3. <i>Modification de la charge de la surface : utilisation d’ions nickel.</i>	88
1.4. <i>Observation par AFM à l’air.</i>	88
1.5. <i>Observation par AFM en milieu liquide.</i>	88
2. <i>Effet d’un prétraitement par les ions nickel.</i>	88
3. <i>Effet des concentrations en cations monovalents et divalents.</i>	89
3.1. <i>Etude expérimentale de la force d’adsorption de l’ADN sur le mica.</i>	89
3.2. <i>Adsorption réversible sur mica prétraité par des ions nickel</i>	91
C. Discussion	91
1. <i>Discussion du modèle proposé</i>	91
2. <i>Discussion des applications à l’étude des complexes ADN-protéines</i>	92
Conclusion	93

III - Recherche d'un système d'ancrage des extrémités de l'ADN sur le mica entre deux plots distants. 93

A. Matériel et méthodes	94
1. Préparation d'ADN fonctionnalisé à une ou deux extrémités.....	94
2. Plots couplés aux extrémités en une étape de réaction.	95
2.1. Préparation des complexes streptavidine-extrémités biotinylées d'ADN.	96
2.2. Préparation des complexes streptavidine peroxydase-extrémités biotinylées d'ADN.....	97
2.3. Préparation des complexes IgG anti digoxygénine-extrémités digoxygénines d'ADN.....	98
3. Plots couplés aux extrémités en deux étapes de réaction.....	98
4. Microscopie électronique à transmission.	99
5. Méthodologies de test de l'ancrage des plots à la surface.	99
5.1. Méthodologie générale.....	99
a. Plots seuls.....	99
b. Complexes ADN-plots.	100
5.2. Préparation des micas pour l'observation à l'air.....	100
5.3. Préparation pour l'observation en milieu liquide.....	101
5.4. Mesures.	103
B. Résultats et discussion.	103
1. Streptavidine.....	103
1.1. Plots seuls sur mica non prétraité.....	103
1.2. Complexes ADN-plots sur mica non prétraité.	104
1.2 Plots seuls sur mica prétraité nickel.	105
1.3 Complexes ADN-plots sur mica prétraité nickel.....	106
2. Streptavidine-peroxydase.	106
3. IgG anti-digoxygénine.....	109
4. ADN simple brin biotinylé.....	110
4.1. Mica non prétraité nickel.	110
4.2. Mica prétraité nickel.	111
5. Etiquette histidine biotinylée.....	113
5.1. Tests de détection des étiquettes histidine sur la surface.....	114
5.2. Tests d'adsorption et de désorption de l'ADN et des complexes ADN-streptavidine.	115
6. BSA biotinylée.....	116
6.1. Plots seuls.....	116
6.2. Tests d'ancrage avec la BSA préadsorbée sur la surface.....	117
6.3. Tests d'ancrage des complexes ADN-streptavidine-BSA préformés.....	119
Conclusion	121

Conclusion générale du chapitre..... 122

Bibliographie du chapitre 3..... 123

Annexe C3-1.130

Annexe C3-2.131

Annexe C3-3.132

CHAPITRE 3

Adsorption et étalement de l'ADN sur le mica.

Introduction

L'étude de l'ADN et des complexes ADN-protéines par AFM nécessite d'adsorber et d'étaler les molécules sur la surface d'un substrat. Les conditions d'interaction entre ces biomolécules et la surface doivent autant que possible maintenir les propriétés natives des molécules (structure, conformation, réactivité biologique,...). Une grande partie des travaux d'AFM dans ce domaine s'est déjà focalisée sur les problématiques biologiques (étude de l'ADN ou d'une interaction ADN-protéine particulière), alors que les méthodologies de préparation des échantillons restent souvent empiriques. C'est pourquoi le laboratoire a entrepris depuis plusieurs années une approche fondamentale et systématique de caractérisation des étalements d'ADN, en commençant par l'étude des substrats de mica et de l'influence de la composition du tampon (1). Le travail décrit dans ce chapitre s'inscrit dans la continuité de cette approche. Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé à la compréhension de l'interaction ADN-surface et à la mise en place d'un système d'ancrage de l'ADN à la surface par ses extrémités.

I – Données initiales sur l'adsorption et l'étalement de l'ADN pour l'observation AFM.

A. Présentation du substrat AFM, le mica.

Le mica, en raison de sa planéité une fois clivé et de ses propriétés de surface, est la surface la plus utilisée en AFM pour déposer les molécules biologiques, même si d'autres surfaces ont parfois été utilisées : verre, silicium, graphite HOPG, or, bicouches lipidiques supportées (2). Il existe différentes familles de micas, de natures chimiques légèrement différentes, dont l'utilisation comme substrat d'étalement de l'ADN a été comparée au laboratoire, pendant le travail de thèse de Sylvie Boichot (1). Une grande variabilité en fonction du type de mica (muscovite, biotite, phlogopite, lépidolite), dans des conditions d'adsorption identiques, a été mise en évidence. Le mica muscovite est le plus couramment utilisé en AFM. Ce matériau a une structure cristallographique en feuillets de silicates reliés par des couches d'ions potassium (**figure I-1**). Il est facile d'obtenir par clivage une surface dont la propreté et la planéité à l'échelle atomique sont bien adaptées à l'imagerie de macromolécules individuelles comme l'ADN et les protéines. La séparation lors du clivage se fait au niveau des plans d'ions potassium (K^+) interfoliaires. Les ions K^+ se répartissent globalement de manière équitable entre les deux faces. Cependant il existerait sur chaque face de grands domaines dans lesquels le potassium se trouve soit en excès soit en défaut plutôt qu'organisé en réseau bien ordonné (3). La charge de la surface du mica clivé est donc globalement négative mais cette charge négative n'est pas répartie de manière homogène. De plus, en présence de liquide déposé sur la surface, il se produit un échange entre les ions K^+ de la surface et les cations de la solution ; cet échange se fait aussi de manière hétérogène (4).

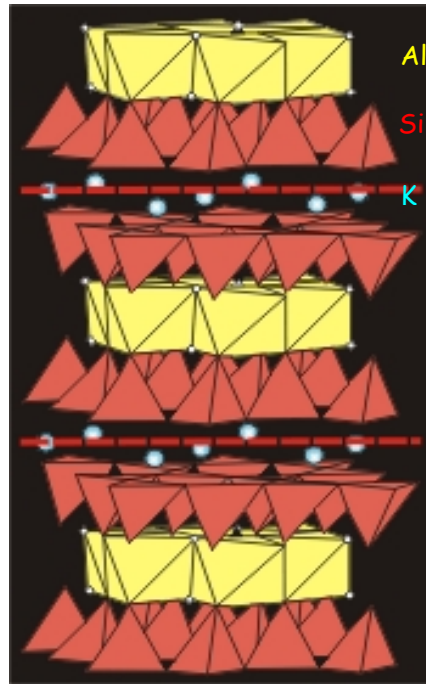


Figure I-1 : *Structure en feuillets du mica muscovite. Formule : $KAl_2[AlSi_3]O_{10}(OH)_2$.*

B. Problématique de l'étalement de l'ADN sur la surface.

Il est nécessaire de bien étaler les molécules d'ADN sur la surface du substrat, pour leur observation. La problématique de l'étalement en AFM sur le mica a été reprise à la suite des travaux menés antérieurement en MET sur le carbone.

Un bon étalement d'ADN est caractérisé principalement par le maintien de la structure et de l'état de l'ADN et le maintien de sa conformation (malgré le changement de dimensionnalité 3D=>2D). En MET, avec la méthode de Dubochet (5) que nous utilisons au laboratoire, les propriétés tridimensionnelles de la molécule d'ADN sont partiellement maintenues (6) et il est possible d'établir des cartes de courbure de l'ADN en bon accord avec les modèles théoriques (7). L'analyse statistique de la conformation des molécules sur la surface permet de quantifier à la fois la courbure et la flexibilité locales de l'ADN, en fonction de la séquence (8). Ces méthodes de caractérisation en MET sont une bonne référence et leur application peut être transposée à la caractérisation de l'étalement en AFM.

Les méthodes pour étaler les molécules d'ADN sur le mica, qui ont émergé empiriquement, sont l'utilisation de cations divalents (comme le magnésium), ou la fonctionnalisation de la surface en la modifiant chimiquement par des groupes chargés positivement (comme les silanes). Les propriétés de l'étalement sont déterminées par les propriétés de surface et les interactions ADN-mica et sont donc différentes en fonction de l'approche utilisée pour amener l'ADN sur la surface. Pour l'observation à l'air, le dépôt est suivi d'une étape de séchage des molécules sur la surface. Par contre avec l'observation en milieu liquide les molécules (ADN et protéines) restent dans leur état hydraté natif pendant l'expérience.

C. Problématique de l'observation des interactions ADN-protéines par AFM.

L'étude des complexes ADN-protéines à partir de l'observation en AFM peut être abordée soit sur des complexes préformés avant leur dépôt sur le mica, soit en testant la formation des complexes sur la surface, après adsorption de l'ADN. Il faut en tout cas

analyser l'influence de la surface sur l'assemblage/la stabilité/le désassemblage des complexes ; cela n'est faisable qu'en testant des conditions variées d'adsorption des molécules sur la surface.

En travaillant en milieu liquide on peut en plus chercher à suivre l'évolution dynamique des complexes, l'exigence supplémentaire étant alors d'obtenir un compromis entre accroche à la surface et disponibilité des molécules. Les molécules doivent pouvoir interagir assez librement (nécessité d'une « faible » accroche) tout en étant imagées correctement (nécessité d'une « forte » accroche). La possibilité de travailler en milieu liquide en AFM a suscité de grands espoirs pour l'analyse du comportement des protéines le long de l'ADN. En effet, avec une résolution spatiale de quelques nanomètres et une fréquence d'acquisition des images qui s'améliore au fur et à mesure des progrès techniques, il est légitime de penser pouvoir à terme caractériser par exemple la cinétique de déplacement d'un moteur moléculaire le long de l'ADN ou la cinétique d'assemblage ou de désassemblage d'un filament protéique sur l'ADN.

L'observation en milieu liquide doit cependant s'inscrire dans la continuité de la démarche d'observation à l'air, puisque les interactions des biomolécules avec la surface sont de même nature.

D. Méthode des cations divalents.

Commençons par présenter la méthode des cations divalents, actuellement la plus utilisée pour visualiser par AFM l'ADN et les complexes ADN-protéines sur une surface de mica.

1. Données principales sur l'adsorption.

La première utilisation de cations divalents dans la préparation d'un échantillon d'ADN pour l'AFM remonte au début des années 1990 (9). Bezanilla *et al* (10) ont ensuite montré en 1995 que l'utilisation de cations divalents ou multivalents augmente la quantité d'ADN qui s'adsorbe sur le mica, tandis que l'utilisation de cations monovalents diminue cette quantité. En 1996, Hansma *et al* (11) ont examiné l'effet de la nature du cation divalent utilisé et suggéré que le rayon cationique et l'enthalpie d'hydratation sont déterminants dans l'interaction du cation avec le mica. En particulier, le nickel, de rayon ionique (0,73 Å) proche de celui du magnésium (0,65 Å), a une enthalpie d'hydratation particulièrement élevée qui pourrait justifier une interaction plus forte du nickel avec le mica, donc une meilleure adsorption de l'ADN en présence de ce cation.

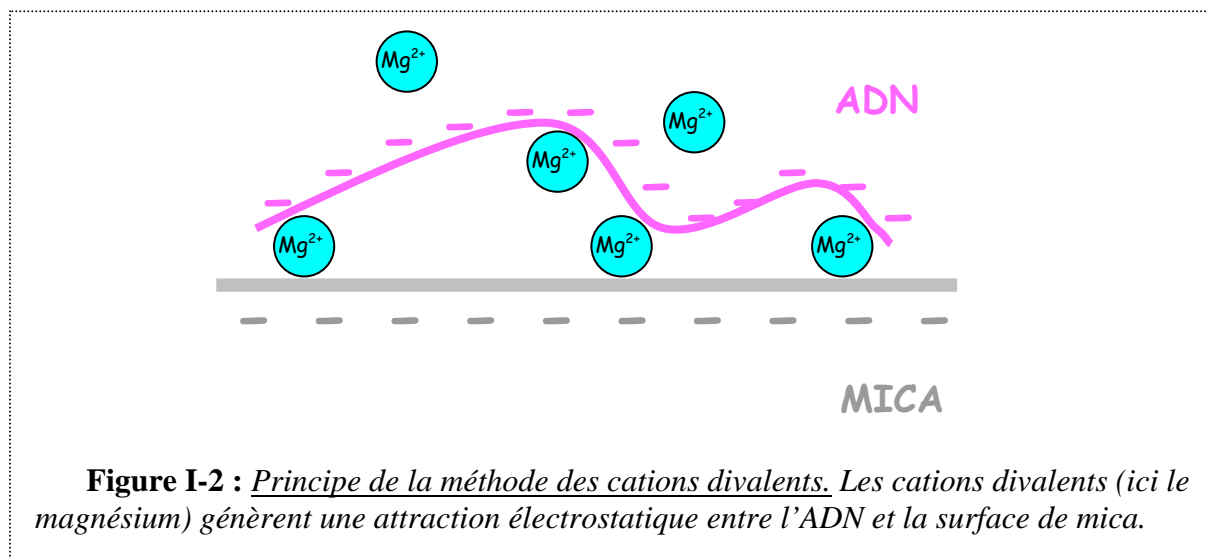
Les résultats obtenus au laboratoire confirment une interaction plus importante du nickel avec la surface. Nos observations en XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) montrent que les ions Mg^{2+} ne s'échangent pas significativement avec les ions K^+ à la surface du mica. Par contre, nous avons mis en évidence un échange entre Ni^{2+} et K^+ . Le nickel se présente sous deux formes sur la surface de mica : $NiOH^+$ et Ni^{2+} ; la deuxième forme indique qu'il est possible d'avoir une inversion locale de la charge du mica.

La nature du tampon a aussi une influence sur l'interaction ADN-surface : l'étalement obtenu est différent avec le Tris (qui porte une charge positive) et avec l'Hepes (qui porte une charge négative et deux charges positives) (1).

Le travail fondamental sur la caractérisation de l'étalement en AFM a été abordé par Rivetti *et al* (12) en s'inspirant des méthodes développées au laboratoire pour la MET (6-8,13,14). Ce groupe a examiné, sur la base de l'étude des longueurs de persistance, avec des mesures de distance bout à bout des molécules d'ADN si la conformation globale des molécules d'ADN adsorbées sur le mica reflétait leur conformation en solution, en fonction

notamment du traitement de la surface de mica et de la longueur des fragments d'ADN. Quand la surface du mica n'est pas traitée les molécules adoptent sur la surface une conformation bien décrite par un modèle de *Worm-Like Chain* à deux dimensions (« équilibration 2D ») ; pour les fragments longs (>2700 paires de bases) il faut de plus prendre en compte les effets de volume exclu dans la modélisation. Avec certains traitements de surface l'adsorption est plus brutale et le piégeage rapide des molécules sur la surface donne plutôt des conformations du type « projection 3D → 2D » de la chaîne d'ADN. Par la suite, les méthodes de caractérisation de la conformation locale de l'ADN par des cartes de courbure, développées pour la MET, ont aussi été reprises et appliquées en AFM (15,16). Cette approche est plus fine que la seule caractérisation de la distance bout à bout des molécules, même si les résultats obtenus au laboratoire montrent une bien meilleure fiabilité en MET qu'en AFM dans les conditions d'étalement actuellement utilisées.

Aucune étude systématique n'a encore été entreprise pour analyser ces aspects en fonction des conditions ioniques d'adsorption. Depuis les études pionnières évoquées ci-dessus, la plupart des observations à l'air ou en milieu liquide menées sur l'ADN et les complexes ADN-protéines utilisent de manière empirique des solutions avec des cations divalents (en général Mg^{2+} , **figure I-2**) à une concentration dans la gamme 1-10 mM, et des cations monovalents (en général Na^+) à une concentration dans la gamme 1-20 mM (bien inférieure à la concentration physiologique en $NaCl \sim 150$ mM) ou même sans cations monovalents. Il n'est pas étonnant que les gammes de concentrations soient semblables pour les observations à l'air ou en milieu liquide puisque les interactions avec la surface ont lieu en milieu liquide dans les deux cas.



Il existe une exigence supplémentaire spécifique pour l'observation en milieu liquide : l'obtention impérative d'une adsorption des molécules suffisamment stable pour permettre l'imagerie, mais suffisamment lâche pour ne pas empêcher les interactions dynamiques. Chaque équipe applique sa propre recette, dans le cadre des gammes de concentrations évoquées ci-dessus ; deux résultats semblent cependant de portée plus générale :

- Bezanilla *et al* mettent en évidence l'intérêt de prétraiter la surface du mica avec des ions nickel (17) : sur mica prétraité magnésium ou sur mica non prétraité l'adsorption est trop faible tandis que le prétraitement nickel combiné à l'utilisation du mode contact intermittent permet d'observer des molécules d'ADN mobiles sur la surface.
- Guthold *et al* (18) indiquent que la concentration en cations monovalents dans la solution de dépôt doit être inférieure à environ 1/5 de la concentration en cations divalents,

indépendamment de la valeur de ces concentrations - sinon les molécules d'ADN ne s'adsorbent pas suffisamment à la surface pour être observées correctement.

Le problème spécifique de la préparation pour l'observation en AFM à l'air est la nécessité d'une étape de séchage de la surface après l'étape d'adsorption, pendant laquelle les conditions d'interaction avec la surface ne sont plus vraiment maîtrisées. La reproductibilité dans l'étalement de l'ADN est considérablement améliorée en rinçant la surface à l'acétate d'uranyle à la fin de la phase d'adsorption, avant le séchage, sans que le mécanisme physico-chimique d'action de l'acétate d'uranyle soit encore compris.

2. Applications.

2.1. Observation à l'air.

L'observation à l'air associée à la méthode des cations divalents est essentiellement utilisée pour cartographier les complexes ADN-protéines immobilisés sur le mica. Le lecteur se réfèrera à la partie « *Mapping DNA-protein complexes in air* » de la note d'application rédigée pour Veeco Instruments (**annexe C3-1**) pour des exemples. De nombreux autres exemples sont décrits dans la littérature, et revus en particulier dans (19), dans (20) (complexes de l'ADN avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN) et (21) (complexes avec des protéines impliquées dans la transcription). Dans une moindre mesure, l'observation à l'air est également utilisée pour étudier l'effet de la liaison à l'ADN de ligands non protéiques. Il s'agit par exemple de composés trop petits pour être visualisés directement mais dont l'effet est détectable car ils changent la longueur de contour des molécules d'ADN en s'intercalant entre les paires de bases (22-24). D'une manière générale, ces types d'utilisation de l'observation en AFM sont assez comparables à ceux de l'observation en MET, sans que l'AFM apporte à ce jour beaucoup d'informations vraiment nouvelles par rapport à la MET. Chaque groupe appliquant sa propre recette pour l'adsorption et l'étalement, le plus souvent sans caractérisation quantitative, il est de plus difficile de vraiment comparer les résultats obtenus dans les différentes études AFM.

2.2. Observation en milieu liquide.

L'observation en milieu liquide ouvre la possibilité de suivre l'évolution des systèmes avec une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre et une fréquence d'acquisition des images de l'ordre de 20-30 secondes ou même de la minute. Cela doit permettre d'analyser la dynamique de structures particulières d'ADN ou de complexes ADN-protéines individuels, même si l'échelle de temps n'est actuellement pas encore compatible avec la cinétique biologique des phénomènes. Différents types d'ADN linéaires ou circulaires et différents complexes ADN-ligand (25,26), ADN-enzyme (18,27-29) ou ADN-facteur de transcription (30,31) ont été étudiés, dans les années qui ont suivi l'invention du mode d'imagerie contact intermittent et son application en milieu liquide (32).

Les travaux sur les complexes ADN-ARN polymérase (18,27,28) ont montré que l'enzyme est capable de se lier à l'ADN adsorbé (27) et que les complexes adsorbés sur le mica conservent une activité biologique (28). Cependant l'activité enzymatique (~40-50% des complexes actifs sur la surface) et la vitesse de transcription (~1 nucléotide/seconde) de l'ADN sur le mica sont moindres, comparées à l'activité (~70-80% des complexes actifs en solution) et la vitesse (~5 nucléotides/s) de la même réaction réalisée en solution (18). L'ADN adsorbé sur la surface est aussi sensible à la dégradation par la DNase I (17,33). Les autres études montrent simplement des événements de liaison ou de dissociation de protéines à l'ADN (29-31). En général les mobilités de l'ADN et des protéines sur la surface varient

considérablement d'une expérience à l'autre, dans des conditions identiques de tampon. Ce manque de reproductibilité est attribué à la variabilité des propriétés de surface du mica. De plus, au niveau d'une molécule unique d'ADN, certaines parties sont mobiles et certaines sont plus fortement attachées. Le mouvement des protéines sur l'ADN peut être affecté à la fois par cette adsorption plus ou moins forte des différentes parties de l'ADN (29) et par le balayage par la pointe (31).

Ces différents essais ont montré une certaine faisabilité, mais ce type d'observations est encore loin de répondre aux attentes de la biologie, en raison des limitations de l'instrumentation (fréquence d'acquisition des images) mais aussi et principalement en raison du manque de maîtrise des interactions biomolécules-surface. Il est actuellement moins difficile de réaliser les observations à l'air, les tests de différentes conditions d'adsorption pouvant servir à déterminer des conditions de faisabilité de l'observation en milieu liquide.

E. Méthodes de fonctionnalisation par des groupes chargés positivement.

Alternativement à la méthode des cations divalents, des fonctionnalisations chimiques de la surface du mica ont été mises au point pour y maintenir les molécules d'ADN et les complexes ADN-protéines. Il s'agit essentiellement de fonctionnalisations de surface par des silanes. Des variantes incluent une étape supplémentaire de fonctionnalisation chimique, agissant sur les silanes, pour accrocher d'autres groupes réactifs sur la surface. L'intérêt revendiqué de ces surfaces est de permettre une accroche de l'ADN dépendant peu des conditions ioniques dans la solution de dépôt.

1. AP-mica.

Une méthode chimique de fonctionnalisation de la surface du mica par des groupes 3-aminopropyltriethoxy silanes (APTES, **figure I-3**) (34,35) a été mise au point en 1992-1993 par le groupe de Lyubchenko et Lindsay. Elle est depuis ponctuellement reprise par d'autres groupes (2,36). L'accroche des groupes silanes se fait sur les groupes silanols présents naturellement à la surface du mica. La surface obtenue est habituellement appelée AP-mica. Les groupes aminés des silanes sont positivement chargés à pH physiologique ($pK_a \sim 10$) (37). Leur densité est typiquement de l'ordre d'un groupe tous les 25 nm (38). Ils permettent une accroche de l'ADN peu dépendante des conditions de tampon (39). L'accroche est suffisante pour maintenir l'ADN sur la surface même en l'absence de cations divalents et l'ADN ne peut être désorbé de l'AP-mica qu'en montant à des concentrations en sel monovalent particulièrement élevées (0,5-2 M) (38). L'interaction de l'ADN avec la surface est assez forte et la conformation de l'ADN sur la surface ressemble à une projection 3D→2D de la conformation en solution (40,41).

La surface d'AP-mica est surtout utilisée pour l'étude de l'ADN non complexé à des protéines. Le comportement de différents types d'ADN a été analysé, à l'air ou en milieu liquide (pour une revue voir (39)). En milieu liquide, l'ADN reste sur la surface d'AP-mica même en l'absence de cations divalents et conserve un degré de mobilité suffisant pour permettre des changements conformationnels, dont la dynamique peut être suivie par imagerie AFM (38,39,42,43). Mais la forte interaction ADN-surface restreint cette dynamique et fait que la cinétique est beaucoup moins rapide sur la surface qu'en solution, comme dans l'exemple de la migration de branches au niveau des jonctions de Holliday (42). On obtient plutôt des informations sur la gamme de changements conformationnels de la structure que sur l'échelle de temps « réelle » de ces changements (39).

D'autres silanes que l'APTES peuvent être utilisés. Une variante récente de l'AP-mica utilise du 1-(3-aminopropyl)silatrane (APS-mica) (44). La surface d'APS-mica est moins réactive que celle d'AP-mica mais l'étude de la cinétique d'adsorption sur la surface suggère que les molécules s'y lient irréversiblement. Différents types de structures ont déjà été étudiés sur l'APS-mica (44-46). Comme sur l'AP-mica, les segments de molécules d'ADN conservent une certaine mobilité en liquide et l'AFM permet de suivre une certaine dynamique d'évolution des structures (44,46). La nature et la densité des silanes utilisés sont déterminantes pour l'étalement : dans d'autres variantes, avec des silanes terminés par des groupes polyamines ressemblant à la spermidine ou à la putrescine (cations multivalents connus pour permettre une condensation de l'ADN en 2D), l'ADN n'est pas étalé mais différents degrés de condensation en tores ou en bâtonnets sur la surface sont observés (47).

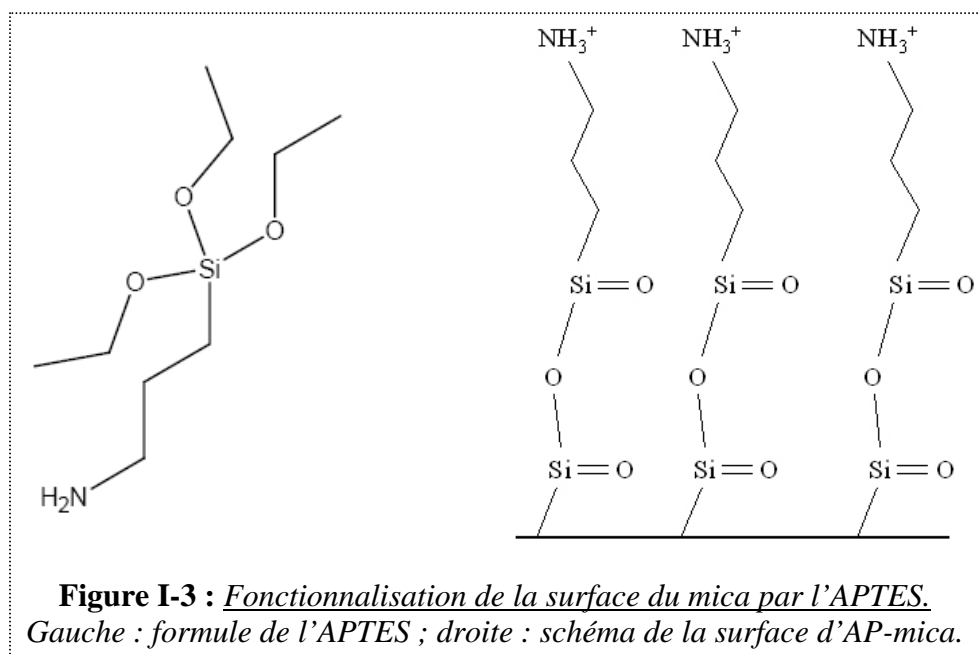


Figure I-3 : Fonctionnalisation de la surface du mica par l'APTES.
Gauche : formule de l'APTES ; droite : schéma de la surface d'AP-mica.

Très peu de complexes ADN-protéines ont à ce jour été caractérisés sur les surfaces silanisées, vraisemblablement parce que la forte interaction avec la surface entraîne des changements importants dans les complexes lors de l'adsorption. Les quelques complexes ADN-protéines étudiés le sont en général après une fixation à la glutaraldéhyde qui permet de les figer avant l'adsorption sur le mica silanisé (voir par exemple (48,49)).

2. Surfaces dérivées de l'AP-mica

Une fois traité par un silane tel que l'APTES, la surface de mica peut éventuellement subir des modifications chimiques supplémentaires. Ainsi plusieurs surfaces dérivées de l'AP-mica, avec des réactivités chimiques différentes, ont été mises au point : AP-mica modifié par un dérivé du psoralène, le trioxalène (TO-mica) (50), AP-mica modifié par de la glutaraldéhyde (GD-mica) (51).

2.1. TO-mica

L'accroche de l'ADN à la surface est forte, grâce à la réticulation chimique covalente entre le trioxalène et les bases pyrimidiques (C,T) de l'ADN, induite par les UV (50) : résistance à des rinçages au SDS ou au NaCl 2M, qui n'emportent que les molécules non covalamment liées à la surface. Mais l'étalement de l'ADN sur les surfaces de TO-mica est

beaucoup moins bon que sur les surfaces d'AP-mica, avec la présence de courbures brusques ou même de pliures (*kinks*). A notre connaissance, ce type de surface n'est pas couramment utilisé.

2.2. GD-mica

Le GD-mica présente des groupes d'aldéhydes réactifs sur la surface, capables de former des adduits stables avec les résidus lysine des protéines. Cette surface n'est à notre connaissance utilisée que dans le groupe de Lindsay, et spécifiquement dans des études en milieu liquide sur la chromatine reconstituée (51-55). La chromatine en solution est elle-même fixée par du glutaraldéhyde (53,54). Dans de telles conditions les protéines histones restent immobilisées sur la surface de GD-mica (51).

3. Autres fonctionnalisations

D'autres types de fonctionnalisation, qui ne nécessitent qu'un prétraitement assez rapide de la surface du mica, commencent également à être utilisés. Le mica traité à la poly-L-lysine (56) ou à la poly-L-ornithine (41) permet de maintenir l'ADN sur la surface pour l'imagerie à l'air ou en milieu liquide de manière assez similaire à l'AP-mica (41). La lysine est un acide aminé chargé positivement à pH physiologique, l'ornithine est son homologue avec un CH₂ de moins dans la chaîne carbonée. Sur ces surfaces, la conformation de l'ADN ressemble davantage à une projection 3D→2D de la conformation en solution qu'à une conformation issue d'une équilibration 2D sur la surface (41).

F. Discussion.

L'AFM a été déjà utilisé pour observer différents états d'ADN (linéaire, circulaire,...double brin, simple brin,...), nu ou complexé avec des protéines. La plupart des études ont été axées davantage sur la problématique biologique sous-jacente que sur les conditions d'étalement de l'ADN et des complexes sur la surface. Pourtant, la maîtrise de ces conditions et la qualité de l'étalement devraient être les prérequis de ce type d'étude. Même si des observations intéressantes et nouvelles ont parfois été obtenues, il est difficile de valider l'ensemble des travaux déjà réalisés. Ce sont essentiellement des recettes appliquées empiriquement, fondées sur la méthode des cations divalents ou la méthode de fonctionnalisation par des groupes chargés positivement, qui sont utilisées pour assurer l'étalement de l'ADN. Cependant certains efforts ont déjà été faits pour caractériser les propriétés de l'ADN sur la surface et déterminer l'impact de l'étalement.

La mesure de la longueur de contour de l'ADN permet, connaissant son nombre de paires de bases, d'estimer le pas moyen de la double hélice. Certains auteurs ont utilisé le pas moyen mesuré à partir d'images AFM comme un premier critère de caractérisation de l'étalement. En général, dans ces travaux publiés, une valeur proche de celle de la forme B de l'ADN (0,34 nm par paire de base) est obtenue, ce qui est plutôt satisfaisant. Mais l'écart-type autour de cette valeur, quand il est précisé, est très important, et ce paramètre s'avère très insuffisant pour juger de la qualité de l'étalement. La méthode de Rivetti *et al* (57) reprise de la MET, qui utilise le modèle de la *Worm-Like Chain* et la distribution statistique des distances bout-à-bout des molécules d'ADN, a souvent été reprise pour caractériser l'étalement global des molécules, en fonction des conditions d'adsorption. La longueur de persistance de l'ADN peut être estimée à partir de cette approche, mais dépend des conditions d'adsorption et des propriétés de la surface. Les conditions d'adsorption douce où l'ADN s'équilibre sur la surface sont considérées préférables aux conditions d'adsorption fortes où

l'ADN est en quelque sorte projeté sur la surface. Les approches de caractérisation de la courbure et de la flexibilité locales de l'ADN issues de la MET peuvent aussi être appliquées en AFM, pour des molécules d'ADN adsorbées dans des conditions d'équilibration sur la surface ; mais il reste des efforts méthodologiques à mener pour obtenir des résultats aussi satisfaisants qu'en MET.

Dans le cas des complexes ADN-protéines aucune des deux méthodes d'accroche et d'étalement de l'ADN n'est à ce jour vraiment satisfaisante. Avec la méthode des cations divalents il est difficile de varier beaucoup les conditions ioniques de la solution, et en particulier de travailler à concentration élevée en sel monovalent (dans les conditions physiologiques, NaCl ~ 150 mM) tout en conservant une adsorption suffisante. Les méthodes de fonctionnalisation de surface décrites ne sont pas satisfaisantes non plus : il est plus facile de varier les conditions ioniques car les points d'accroche entre l'ADN ou les protéines et les fonctions de surface sont forts, mais cette accroche forte affecte beaucoup le comportement des molécules, ce qui suscite l'utilisation de glutaraldéhyde pour fixer les complexes avant l'adsorption. En général aucun travail n'est fait pour étudier les complexes dans différentes conditions d'adsorption et d'étalement de l'ADN ; cela suppose implicitement que des conditions choisies empiriquement sont considérées suffisamment fiables pour aborder la problématique biologique. Or il est évident, en particulier avec les observations en milieu liquide, que ces conditions ont une influence majeure sur les observations. L'analyse du même système dans des conditions différentes de traitement de surface et/ou de solution devrait donc être un préalable à l'interprétation biologique des expériences, pour l'observation à l'air comme pour l'observation en milieu liquide.

Il ressort de ce bilan la nécessité d'une approche encore plus rationnelle de l'adsorption et de l'étalement de l'ADN. Il en ressort aussi la nécessité de la caractérisation de l'influence de la surface et des conditions de la solution sur les observations. Le laboratoire s'est engagé depuis plusieurs années dans cette démarche. La méthode des cations divalents a été préférée aux méthodes de fonctionnalisation par des groupes chargés positivement en raison de la difficulté de fonctionnaliser les micas de manière contrôlable et homogène par les silanes, de l'étalement plus doux de l'ADN sur la surface et de la possibilité de moduler l'interaction ADN-mica en jouant sur les conditions de la solution de dépôt avec la méthode des cations divalents (même si au début de cette thèse les paramètres importants ne sont pas encore maîtrisés).

II – Etude de la force d'adsorption de l'ADN sur le mica

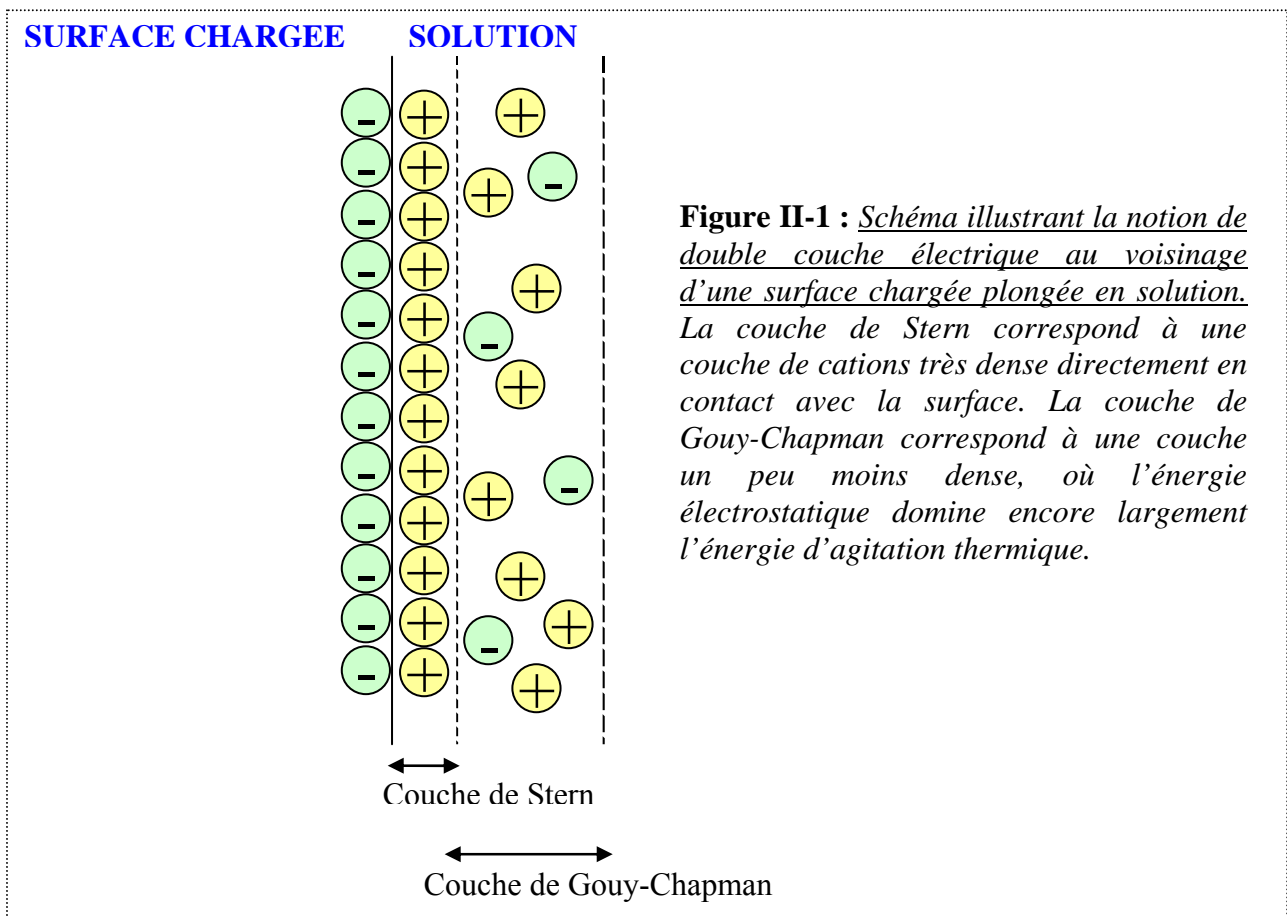
Il faut en premier lieu résoudre les problèmes méthodologiques de compréhension et de maîtrise des interactions ADN-surface pour pouvoir aller plus loin que ce qui a déjà été réalisé en AFM. Les données empiriques sur la méthode des cations divalents indiquent quelques paramètres importants pour l'adsorption de l'ADN sur le mica. L'influence du prétraitement du mica et des concentrations en cations suggère une origine essentiellement électrostatique des interactions entre l'ADN et la surface. Mais au début de ce travail de thèse, leur compréhension est encore essentiellement qualitative, insuffisante pour permettre à l'expérimentateur de moduler rationnellement la force d'adsorption de l'ADN sur le mica. Nous nous sommes alors attachés à développer un modèle semi-quantitatif pour décrire les forces électrostatiques d'interaction entre l'ADN et le mica (partie **A**), et à tester expérimentalement sa validité (partie **B**). Nous présentons ici les résultats de ce travail (58,59).

A. Modélisation des forces d'interactions électrostatiques ADN-mica.

1. Force d'interaction des doubles couches électriques.

1.1. Simplifications du problème.

D'un point de vue électrostatique, la surface de mica est une surface plane chargée, auprès de laquelle les ions se distribuent selon un modèle type *double couche électrique*. Le modèle actuel de la double couche électrique est le modèle de Gouy-Chapman-Stern, qui fait intervenir une couche dense de cations au contact direct de la surface (couche de Stern) et une couche diffuse de cations qui se répartissent en fonction de la compétition entre l'agitation thermique et les interactions électrostatiques (couche de Gouy-Chapman) (**figure II-1**). Dans ce modèle, les ions sont décrits par des charges ponctuelles. Nous pouvons aussi l'utiliser pour décrire la répartition des charges au voisinage de l'ADN. En effet, l'ADN, habituellement décrit comme un cylindre chargé, peut être traité comme une surface plane chargée à condition que la force ionique soit dans la gamme 100 mM – 1 M (60). Aux forces ioniques inférieures, dans la gamme 10 mM – 100 mM, la géométrie cylindrique de l'ADN doit être prise en compte mais pour simplifier, nous considérons pour notre modèle semi-quantitatif que l'approximation plane reste suffisante dans toute la gamme 10 mM – 1 M.



Dans l'approche initiée par Manning (61) une seule couche dense de cations au voisinage de la surface est considérée, dont l'épaisseur λ_z pour l'ADN (60) ou le mica, est donnée par :

Equation 1 :

$$\lambda_z = \frac{e}{4\pi\sigma l_b z}$$

e : charge de l'électron

σ : charge de la surface

l_b : longueur de Bjerrum

z : valence du contre-ion

λ_z correspond à la distance entre une charge ponctuelle de valence z et d'énergie $k_B T$ et une surface chargée avec la densité de charge σ . L'autre longueur caractéristique de la compétition entre l'agitation thermique et les interactions électrostatiques, qui intervient dans l'expression de λ_z , est la longueur de Bjerrum l_b . Celle-ci correspond d'un point de vue physique à la distance entre une particule de charge e et d'énergie $k_B T$ et une autre particule de charge e. Elle est donnée par :

Equation 2 :

$$l_b = \frac{e^2}{\epsilon k_B T}$$

ϵ : constante diélectrique du milieu

k_B : constante de Boltzmann

T : température

l_b vaut environ 0,7 nm dans l'eau à 20°C. Pour l'ADN, $\sigma_{ADN} \sim -10^{18} \text{ e.m}^{-2}$ (60), et pour le mica, $\sigma_{mica} \sim -2.10^{18} \text{ e.m}^{-2}$ (62), donc pour les cations divalents, $\lambda_z = 0,0595 \text{ nm}$ (ADN) et $\lambda_z = 0,0297 \text{ nm}$ (mica).

La densité surfacique de charge nette du mica (σ_a) ou de l'ADN (σ_b) est donnée par la somme de la densité surfacique de charge σ_{mica} ou σ_{ADN} et de la densité de charge associée à la couche condensée de cations d'épaisseur λ_z . Pour le mica, σ_a dépend du prétraitement éventuel de la surface par des cations ; pour l'ADN, $\sigma_b \sim 0,15 \sigma_{ADN}$ (60). Si la distance d entre l'ADN et le mica est inférieure au rayon de l'ADN ($r = 1 \text{ nm}$) nous pouvons alors ramener le calcul de l'interaction entre les doubles couches électriques du mica et de l'ADN au calcul de la pression agissant entre deux plans de densités de charges respectives σ_a et σ_b . Dans notre modèle, pour simplifier, nous considérons que cette approximation est valide aussi aux distances d supérieures à r.

1.2. Calcul de la pression entre les deux surfaces chargées.

L'invariance translationnelle du problème de l'interaction entre deux plans chargés le ramène à une dimension x perpendiculaire aux plans (**figure II-2**). La pression P entre les plans chargés s'exprime d'après (63) à partir du potentiel électrostatique réduit ϕ comme :

Equation 3 :

$$P(d) = \frac{k_B T}{d l_b} \int_0^d dx \left(\frac{1}{2} \left(\frac{d\varphi}{dx} \right)^2 - \frac{d}{dx} \left(\frac{d\varphi}{dx} \right) \right)$$

$$\varphi(x) = e\psi(x)/k_B T$$

$\psi(x)$: potentiel électrostatique

Le premier terme de $P(d)$ représente la pression d'agitation thermique, il est toujours répulsif. Le deuxième terme représente la pression électrostatique, il peut être répulsif ou attractif en fonction du signe de σ_a et σ_b .

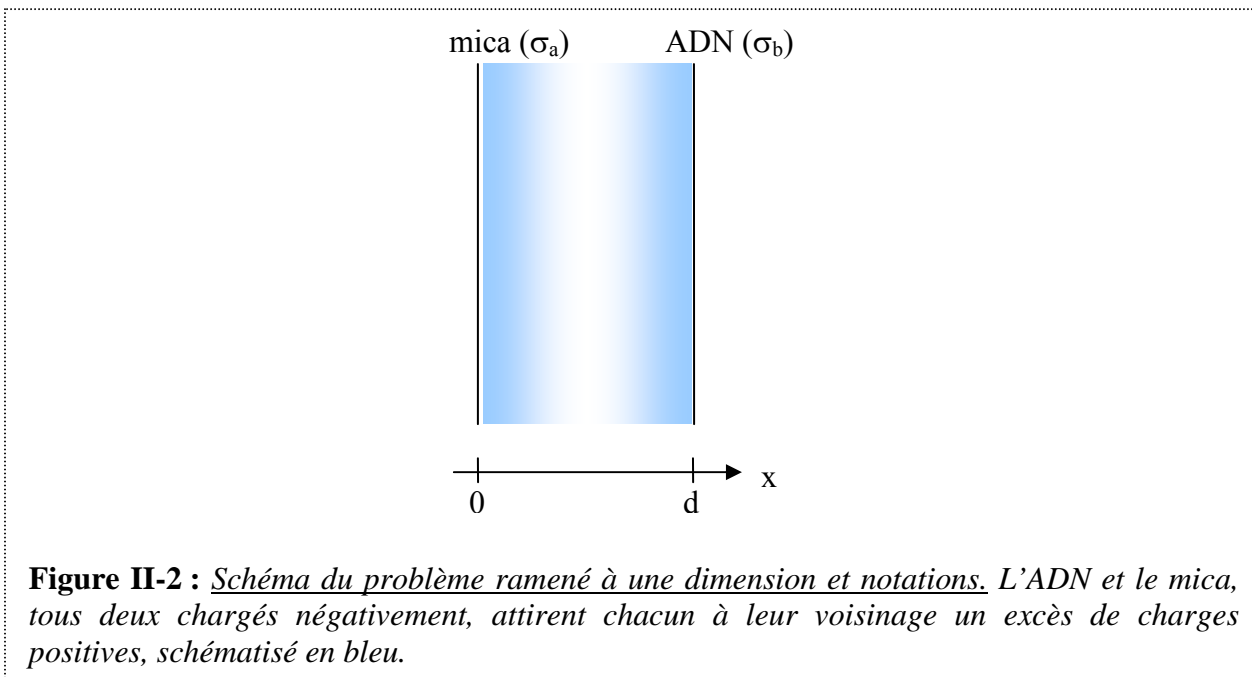


Figure II-2 : *Schéma du problème ramené à une dimension et notations. L'ADN et le mica, tous deux chargés négativement, attirent chacun à leur voisinage un excès de charges positives, schématisé en bleu.*

Le potentiel électrostatique du à la double couche électrique est décrit en utilisant la théorie de Poisson-Boltzmann standard, théorie de champ moyen dans laquelle les ions sont assimilés à des charges ponctuelles et dans laquelle chaque ion « voit » les autres ions seulement par l'intermédiaire du potentiel électrostatique. L'équation de Poisson-Boltzmann s'écrit :

Equation 4 :

$$\frac{d^2\varphi(x)}{dx^2} + \kappa^2 e^{-\varphi(x)} = \frac{l_b}{z} n(x)$$

κ : constante dépendant des conditions aux limites

$n(x)$: concentration de charges en solution à une distance x de la surface de référence (le mica)

Les conditions aux limites sur le champ électrique perpendiculaire s'écrivent au niveau des surfaces du mica ($x=0$) et de l'ADN ($x=d$):

Equations 5 et 6:

$$\left. \frac{d\varphi(x)}{dx} \right|_{x=0} = -\frac{\sigma_a l_b}{ze}$$

$$\left. \frac{d\varphi(x)}{dx} \right|_{x=d} = -\frac{\sigma_b l_b}{ze}$$

z : valence des cations

P est obtenue à partir des équations 3, 5 et 6 qui produisent le système d'équations suivant (63) :

si $P(d) < 0$ (force attractive) :

Equation 7 :

$$|P(d)| = \frac{k_B T}{2l_b} \left[\sigma_a \sigma_b \left(\frac{l_b}{ze} \right)^2 + \frac{l_b (\sigma_a + \sigma_b)}{ze} \sqrt{\frac{2l_b |P(d)|}{k_B T}} \coth \left(\sqrt{\frac{2l_b |P(d)|}{k_B T}} d \right) \right]$$

si $P(d) > 0$ (force répulsive) :

Equation 8 :

$$P(d) = \frac{k_B T}{2l_b} \left[\sigma_a \sigma_b \left(\frac{l_b}{ze} \right)^2 + \frac{l_b (\sigma_a + \sigma_b)}{ze} \sqrt{\frac{2l_b P(d)}{k_B T}} \cot \operatorname{an} \left(\sqrt{\frac{2l_b P(d)}{k_B T}} d \right) \right]$$

Les équations 7 et 8 indiquent que la pression entre les deux plans dépend

- de la distance d entre le mica et l'ADN
- des densités de charges de surface σ_a et σ_b des deux plans
- mais pas de la concentration des cations en solution.

1.3. Evolution de la pression avec d et σ_a .

Pour examiner dans quel sens varie P en fonction de d et de σ_a , il faut ensuite résoudre les équations 7 et 8, ce qui n'est possible que numériquement. La variation de P en fonction de d pour différents rapports σ_a/σ_b est représentée en **figure II-3**.

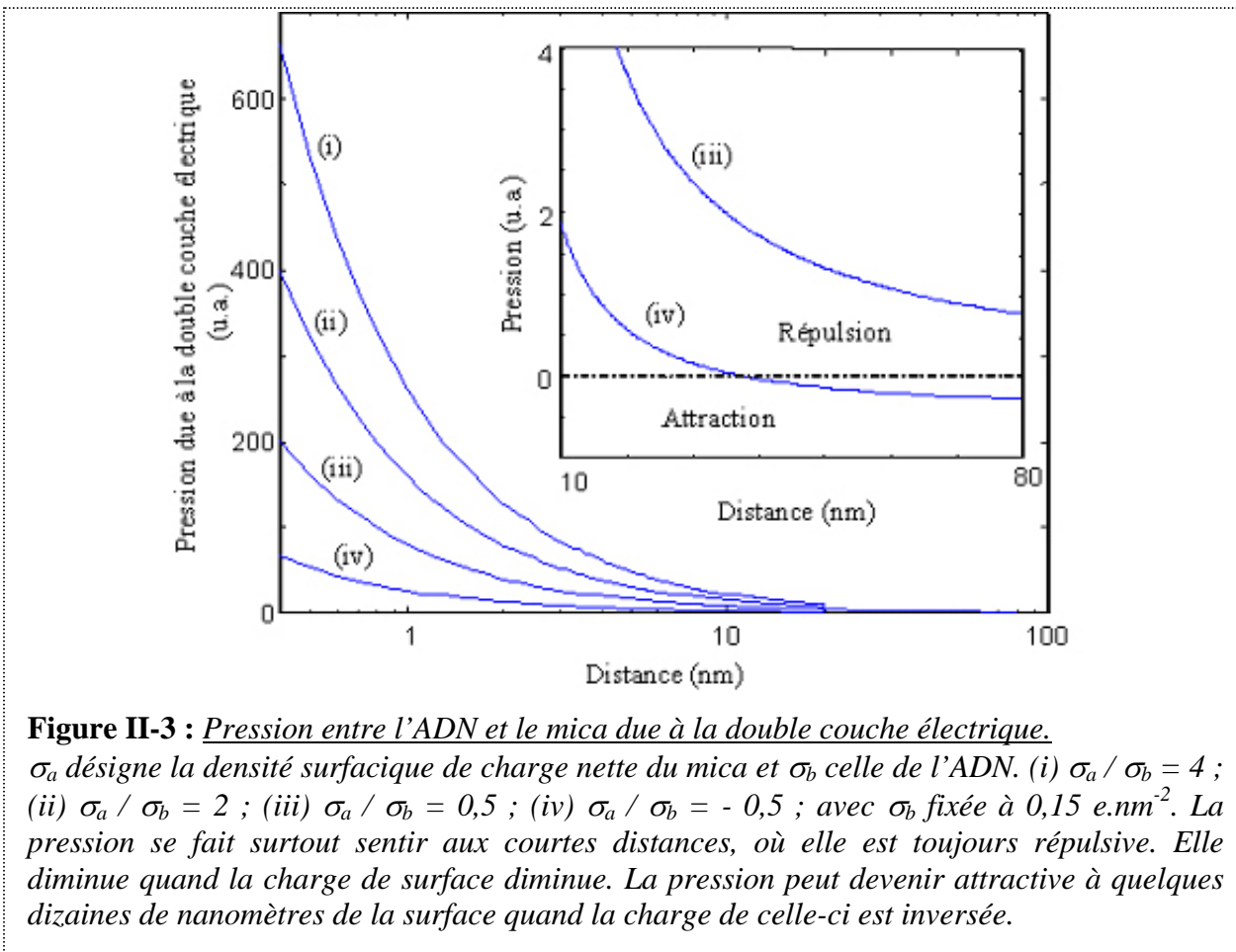
Quand σ_a et σ_b sont de même signe, l'interaction électrostatique entre le mica et l'ADN est d'autant plus réduite que le mica est moins chargé (σ_a réduite). De plus, si la charge de surface du mica est rendue positive, P devient attractive au-delà d'une certaine distance d_0 telle que $P(d_0) = 0$ donnée par :

Equation 9 :

$$d_0 = 2 \frac{ze}{l_b} \left| \frac{1}{\sigma_a} + \frac{1}{\sigma_b} \right|$$

A partir de cette distance, l'interaction électrostatique, attractive puisque le mica et l'ADN sont de charges opposées, l'emporte sur la pression de répulsion due à l'agitation thermique. Ce résultat aide à comprendre qu'en prétraitant la surface du mica par des ion Ni^{2+} , capables d'inverser la charge de surface du mica, l'adsorption de l'ADN sur le mica puisse être facilitée (17). Mais quel que soit le signe de σ_a , la pression est toujours répulsive aux courtes

distances : l'agitation thermique, qui a tendance à repousser les deux surfaces, l'emporte en effet sur l'interaction électrostatique. La force d'interaction entre les doubles couches électriques du mica et de l'ADN n'explique donc pas l'adsorption de l'ADN sur le mica. Il doit exister une autre force, capable de l'emporter au moins à courte distance sur la répulsion.



2. Force associée aux corrélations de position entre cations.

Nous avons développé l'hypothèse que cette force attractive capable de vaincre la répulsion associée aux doubles couches électriques soit liée aux corrélations de position entre les cations condensés sur la surface du mica et les cations condensés sur l'ADN. Les charges de l'ADN et du mica qui interagissent étant en vis-à-vis, nous utilisons pour simplifier le calcul théorique un modèle simple qui représente l'ADN et la surface de mica par deux lignes de charge parallèles.

2.1. Calcul de la force.

L'hamiltonien H pour les interactions électrostatiques non échantées entre les deux lignes de charges s'écrit (64) :

Equation 10 :

$$H = \frac{e^2}{2\varepsilon} \sum_i \sum_j \frac{(1 - z_i \phi_i)(1 - z_j \phi_j)}{\sqrt{x_{i,j}^2 + d^2}}$$

i : indice des sites des charges du mica

j : indice des sites des charges de l'ADN

d : distance entre les couches de cations de l'ADN et du mica

z_i : valence du i^{e} cation

$\sqrt{x_{i,j}^2 + d^2}$: distance entre le j^{e} site de l'ADN et le i^{e} site du mica

ϕ_i : variable d'occupation du i^{e} site ; vaut 1 s'il est occupé par un cation, 0 s'il ne l'est pas

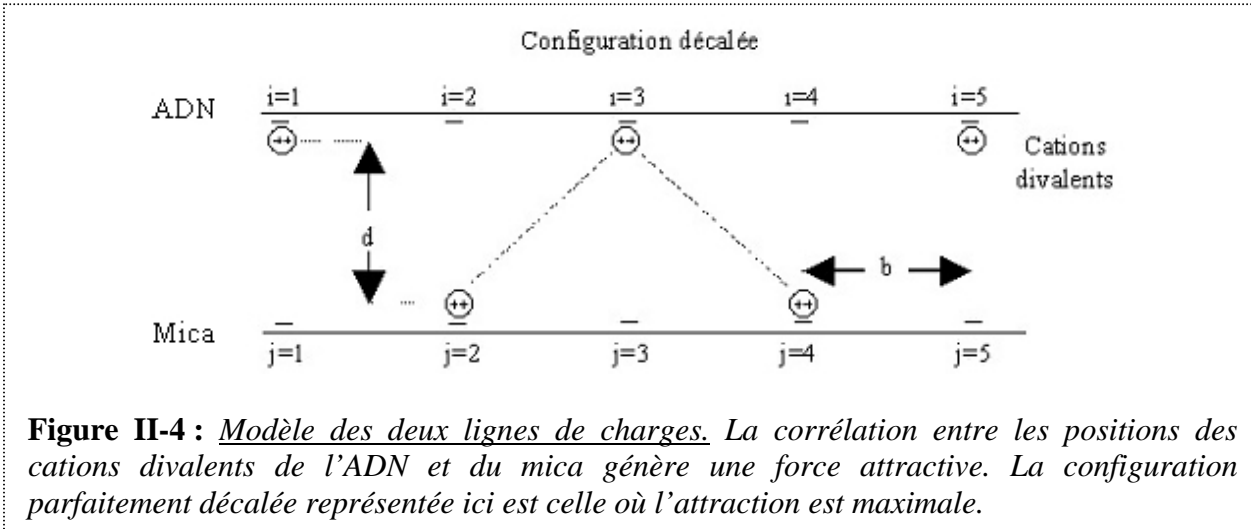


Figure II-4 : Modèle des deux lignes de charges. La corrélation entre les positions des cations divalents de l'ADN et du mica génère une force attractive. La configuration parfaitement décalée représentée ici est celle où l'attraction est maximale.

Nous faisons l'hypothèse que les charges sont réparties uniformément le long des lignes représentant l'ADN et le mica. Pour l'ADN, la distance moyenne est de $b = 1$ nm, en considérant que la charge de surface est de $\sigma_{DNA} = 1 \text{ e.nm}^{-2}$ (60). Pour le mica, la distance entre deux charges sur la surface est d'environ $b' = 0,707$ nm, en considérant une charge de surface de $\sigma_{mica} \sim - 2.10^{18} \text{ e.m}^{-2}$ (62). La force F_c due aux corrélations entre les positions des cations sur le mica et sur l'ADN s'écrit alors (64):

Equation 11 :

$$F_c(d) = \frac{e^2 d}{\varepsilon} \sum_{i,j} \frac{(1 - z_j \phi_j)(1 - z_i \phi_i)}{(x_{i,j}^2 + d^2)^{\frac{3}{2}}}$$

Dans ce modèle, la contribution des cations monovalents est nulle ($1 - z_k \phi_k = 0$), seuls les cations de valence 2 ou supérieure peuvent générer un terme d'attraction ; dans la suite nous ne considérons que les cations divalents.

La configuration énergétiquement la plus favorable est celle où les charges sur l'ADN et sur le mica sont décalées d'un site comme représenté sur la **figure II-4**. Pour simplifier le

calcul de la force de corrélation dans cette configuration, nous prenons $b' = b = 1$ nm. La **figure II-5** représente l'évolution de F_c avec la distance, dans la configuration où les cations divalents sont parfaitement décalés, et pour un ADN de 1440 paires de bases. La force est attractive et son effet se fait surtout sentir aux courtes distances $d < b = 1$ nm.

Mais les deux lignes de charge ne peuvent adopter une configuration parfaitement décalée qu'à une température de 0 K. A la température ambiante, l'agitation thermique perturbe la distribution des cations le long de l'ADN et du mica. Les cations sont d'autant plus libres de se mouvoir sous l'effet de l'agitation thermique que les interactions électrostatiques se font moins sentir, c'est-à-dire sont plus écrantées.

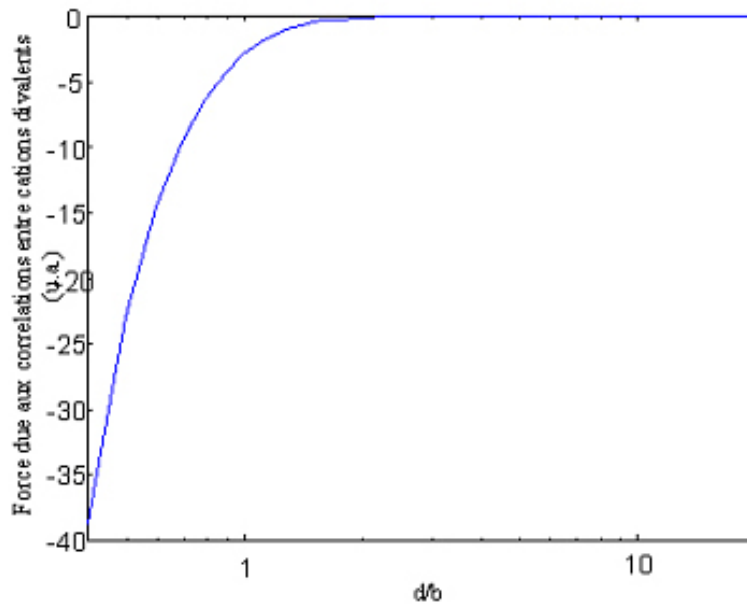


Figure II-5 : *Evolution de la force d'attraction avec la distance dans le modèle des lignes de charges. La force est calculée pour un ADN de 1440 paires de bases et la distance est normalisée par b , distance entre les sites des lignes de charge. L'attraction se fait surtout sentir aux courtes distances (de l'ordre du nm).*

2.2. Effet de l'écrantage des charges en fonction de la force ionique.

La longueur de Debye λ_D correspond à la longueur caractéristique d'écrantage du potentiel électrostatique en solution aqueuse. Elle s'exprime en nanomètres comme :

Equation 12 :

$$\lambda_D = \frac{0.33}{\sqrt{I}}$$

avec I la force ionique de la solution, définie par :

Equation 13 :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 n_{bi}$$

avec n_{bi} : concentration de l'espèce i , en sommant sur toutes les espèces ioniques i de la solution.

L'écrantage des interactions électrostatiques se fait sur une distance d'autant plus courte que la force ionique est élevée. $\lambda_D \sim 1$ nm dans l'eau pour $I = 100$ mM.

Pour discuter qualitativement de l'effet de la force ionique sur la force d'attraction, nous analysons la probabilité $\phi_{i=j}$ d'une configuration face à face lorsque les charges sont écrantées :

Equation 14 :

$$\phi_{i=j} = \frac{a}{a+b}$$

avec

Equation 15 :

$$a = e \left(\frac{\frac{d}{e^{\frac{d}{\lambda_D}}} - \frac{2e}{\lambda_D} \frac{\sqrt{d^2+b^2}}{\sqrt{d^2+b^2}} + \dots}{\varepsilon \cdot k_B T} \right)$$

et

Equation 16 :

$$b = e \left(\frac{\frac{d}{e^{\frac{d}{\lambda_D}}} - \frac{2e}{\lambda_D} \frac{\sqrt{d^2+b^2}}{\sqrt{d^2+b^2}} + \dots}{\varepsilon \cdot k_B T} \right)$$

où les interactions entre les charges sont décrites par des potentiels de Coulomb écrantés, de la forme générale :

Equation 17 :

$$V = \frac{Q}{\varepsilon \cdot r} e^{-\frac{r}{\lambda_D}}$$

L'évolution de $\Phi_{i=j}$ en fonction de la distance à différentes forces ioniques est donnée en [figure II-6](#).

- Aux courtes distances ADN-mica ($d \ll l_b$), l'énergie électrostatique moyenne entre deux cations est supérieure à $k_B T$ et la probabilité d'une position non décalée est très faible ; l'écrantage et I n'ont pas d'effet sur la force d'attraction.

- Aux distances intermédiaires ($l_b/10 < d < b$) nous distinguons le cas $I < 100$ mM et le cas $I > 100$ mM :

* pour $I < 100$ mM, $\lambda_D > l_b \sim b$ et les interactions électrostatiques entre cations sont capables de maintenir une configuration décalée assez stable ; l'attraction de l'ADN sur le mica dépend peu de I et est peu perturbée par l'agitation thermique des cations.

* pour $I \geq 100$ mM, la probabilité qu'un cation occupe une position non décalée augmente considérablement ; en effet $\lambda_D < l_b$, donc la force de corrélation entre les cations est écrantée de manière significative et l'agitation thermique est capable d'inhiber les corrélations entre les cations.

- Aux distances ADN-mica supérieures à l_b , quelle que soit la force ionique, les interactions électrostatiques entre l'ADN et le mica sont vaincues par l'agitation thermique et les corrélations de position entre les cations deviennent très faibles.

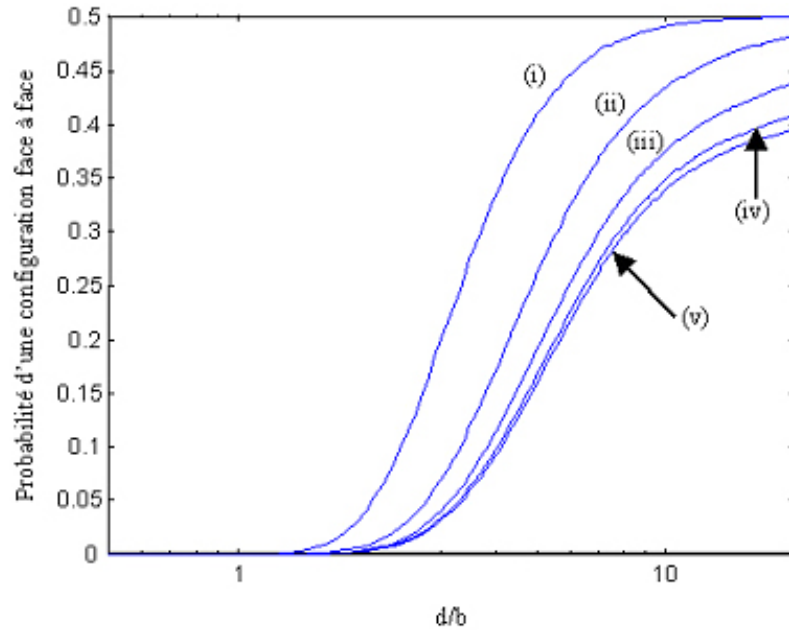


Figure II-6 : *Probabilité d'occupation d'une configuration non décalée dans le modèle des lignes de charge, en fonction de la distance et de la force ionique. (i) $I = 1 \text{ M}$; (ii) $I = 100 \text{ mM}$; (iii) $I = 10 \text{ mM}$; (iv) $I = 1 \text{ mM}$; (v) $I = 0,1 \text{ mM}$. La valeur 0,5 de la probabilité $\phi_{i=j}$ correspond à une répartition aléatoire aux différents sites des lignes de charge, donc à une absence de corrélation entre les cations de l'ADN et du mica. La valeur 0 correspond à une répartition en configuration parfaitement décalée.*

Aux courtes distances ADN-mica ($d < b$), I ne défavorise pas la configuration décalée. Aux distances supérieures, pour $I < 100 \text{ mM}$, l'augmentation de I défavorise peu la configuration décalée ; pour $I > 100 \text{ mM}$ l'augmentation de I défavorise nettement plus la configuration décalée.

2.3. Effet de la compétition entre cations monovalents et divalents.

Comme nous l'avons montré, seules les corrélations entre les cations divalents ou de valence supérieure génèrent un terme de force attractive. Mais les cations monovalents entrent néanmoins en compétition avec les cations divalents pour la neutralisation des surfaces chargées de l'ADN et du mica. Les densités surfaciques en cations monovalents et divalents sur l'ADN et le mica sont donc déterminantes pour la force attractive.

Pour les relier aux concentrations en volume, nous utilisons à nouveau la théorie de Poisson-Boltzmann. Les concentrations en cations monovalents (n_{s1}) et divalents (n_{s2}) sur la surface s'écrivent :

Equations 18 et 19 :

$$n_{s1} = n_{b1} \cdot e^{e\psi/k_B T}$$

$$n_{s2} = n_{b2} \cdot e^{2e\psi/k_B T}$$

avec

n_{b1} : concentration en cations monovalents dans la solution

n_{b2} : concentration en cations divalents dans la solution

Ψ : potentiel électrostatique au niveau de la surface

La concentration n_s de contre-ions en surface s'écrit :

Equation 20 :

$$n_s = n_{s1} + n_{s2}$$

La dépendance de n_{s2} vis-à-vis de n_{b1} et n_{b2} s'obtient en résolvant l'équation du second degré (60):

Equation 21 :

$$Y\hat{n}_{s2}^2 - (2Y + 1)\hat{n}_{s2} + Y = 0$$

avec :

Equation 22 :

$$\hat{n}_{s2} = \frac{n_{s2}}{n_s}, \text{ densité surfacique réduite en cations divalents}$$

et

Equation 23 :

$$Y = \frac{n_{b2} \cdot n_s}{n_{b1}^2}$$

où n_s est la concentration de contre-ions en surface. n_s est reliée à λ_z par :

Equation 24 :

$$n_s = \frac{\sigma}{2ze\lambda_z}$$

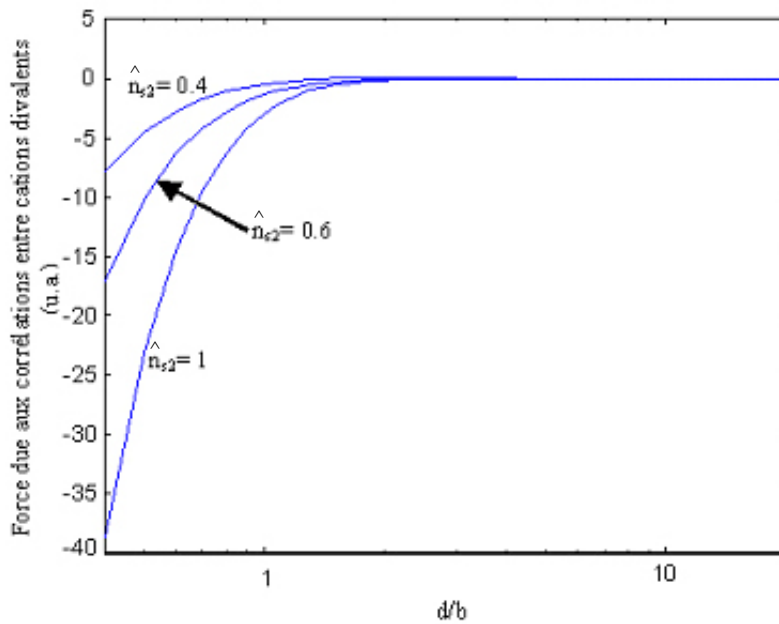
n_s vaut $\sim 6,6$ M pour l'ADN et ~ 26 M pour le mica.

Dans le cadre de ce modèle, la valeur de n_{s2} reste inchangée quand n_{b1} et n_{b2} varient à n_{b2} / n_{b1} constant. La force d'attraction reste de même inchangée à n_{b2} / n_{b1} constant, tant que l'écrantage électrostatique reste négligeable (soit si $I < 100$ mM).

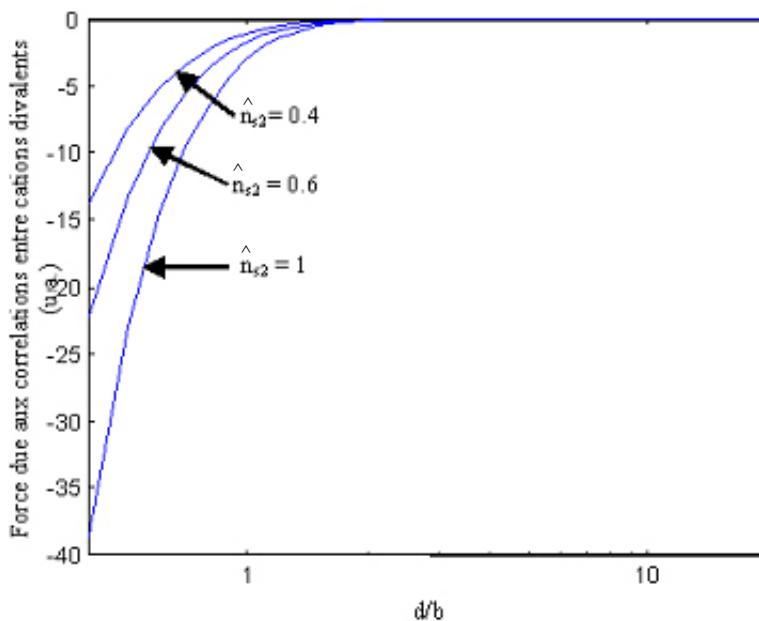
La **figure II-7** montre que la force d'attraction est très sensible à la densité surfacique réduite de cations divalents n_{s2} . Quand le mica est prétraité par les ions nickel, nous considérons dans notre modèle la ligne de cations du mica comme fixe et la compétition entre cations monovalents et divalents n'agit que sur les sites de l'ADN. La **figure II-7b** comparée à la **figure II-7a** montre qu'à n_{s2} fixée et de faible valeur, la force d'attraction est plus importante sur mica prétraité.

Figure II-7 : *Force d'attraction entre l'ADN et le mica en fonction de la densité relative en cations divalents en surface.*

a : mica non prétraité



b : mica prétraité par des ions Ni²⁺



La force d'attraction se fait surtout sentir aux courtes distances. Elle est plus importante sur mica prétraité par des ions Ni²⁺. Elle augmente avec la densité relative en cations divalents en surface (\hat{n}_{s2}).

3. Comparaison des forces de répulsion et d'attraction.

Aux grandes distances, pour les surfaces de même charge, la force de répulsion varie en $1/d^2$ tandis que les interactions de corrélation varient en $(e^{-d/\lambda_D})/d$, et diminuent ainsi plus

vite. La répulsion l'emporte donc en général sur l'attraction. Si la charge du mica est inversée, cependant, nous avons vu que la pression entre le mica et l'ADN peut devenir attractive au-delà de la distance d_0 (voir équation 9). Dans ce cas l'ADN peut être maintenu proche de la surface.

Aux courtes distances, la force de répulsion varie en $1/d$ tandis que la force d'attraction varie en $1/d^2$. La force d'attraction l'emporte et il y a possibilité d'une forte adsorption de l'ADN sur la surface de mica.

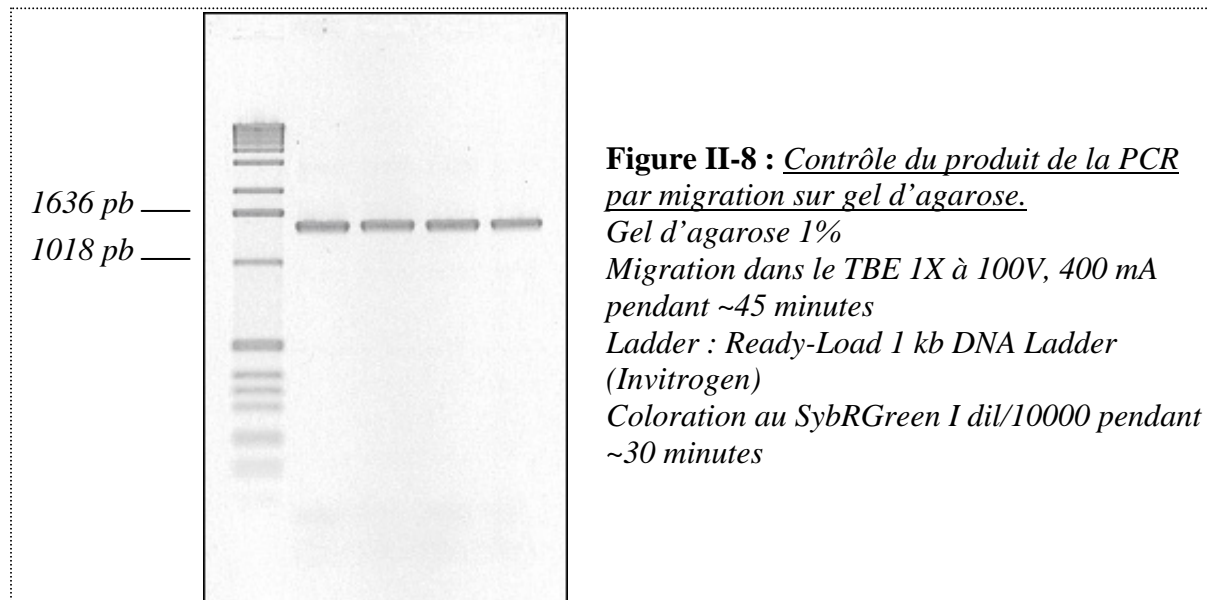
B. Etude expérimentale de l'effet de la charge de la surface et des concentrations en cations sur l'adsorption de l'ADN.

Nous avons établi un modèle pour décrire les mécanismes électrostatiques d'adsorption de l'ADN, en fonction de trois paramètres principaux : charge de la surface de mica (en fonction du prétraitement), concentration en cations monovalents et concentration en cations divalents dans la solution. Nous avons d'autre part étudié expérimentalement l'effet de ces trois paramètres sur l'adsorption de l'ADN.

1. Matériels et méthodes.

1.1. ADN

L'ADN utilisé est un fragment de 1440 paires de bases obtenu par amplification PCR d'un fragment correspondant à la séquence du plasmide pBR322 comprise entre les paires de bases 2576 et 4016. Le produit issu de la PCR est purifié sur une colonne échangeuse d'anions MiniQ (Amersham) à l'aide d'un système de chromatographie liquide SMART. Après une précipitation dans l'éthanol, l'ADN est resuspendu dans un tampon Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM. L'homogénéité de longueur de l'ADN et la propreté de la préparation sont contrôlées par migration sur gel d'agarose 1% (**figure II-8**) et par des mesures de longueur en MET.



1.2. Microscopie électronique à transmission.

Nous utilisons comme support un film mince de carbone déposé sur une grille à trous en cuivre (600 Mesh). Les grilles carbonées sont placées dans une cloche à vide où elles sont

chargées positivement par dépôt d'un plasma de pentylamine (5,65). Cinq μL de solution avec l'ADN à environ $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ sont ensuite déposés sur la grille. Au bout d'une minute, la grille est rincée à l'acétate d'uranyle 2% puis séchée par absorption du liquide sur du papier filtre sans cendres. Les observations de microscopie électronique sont faites sur un microscope LEO Zeiss 902, en fond noir annulaire, avec élimination des électrons inélastiques en utilisant le spectromètre de perte d'énergie (mode *zero loss*) pour augmenter le contraste.

1.3. Modification de la charge de la surface : utilisation d'ions nickel.

Sur mica non traité, les cations Mg^{2+} en général ajoutés au tampon de dépôt de l'ADN pour amener les molécules sur la surface n'ont pas une grande affinité pour la surface de mica, en comparaison avec les ions Ni^{2+} , qui peuvent former toute une gamme de complexes avec la surface du mica (11). L'agitation thermique peut donc déplacer beaucoup plus facilement les cations Mg^{2+} que les cations Ni^{2+} et il est possible, en prétraitant la surface du mica par des ions nickel, de neutraliser la surface du mica ou même d'inverser localement sa charge de manière stable.

Pour les expériences des paragraphes 2 et 3.2 ci-après, la surface de mica prétraité nickel a été préparée en déposant $20 \mu\text{L}$ d'une solution de NiCl_2 10 mM à la surface d'un mica fraîchement clivé. Au bout d'une minute, la surface est rincée avec un grand volume d'eau millipore, puis séchée à l'aide de papier filtre sans cendres. Le dépôt de la solution d'ADN est ensuite effectué.

1.4. Observation par AFM à l'air.

Pour les observations à l'air du paragraphe 3.1, la concentration finale d'ADN utilisée est de $0,2 \mu\text{g}/\text{mL}$. La dilution est faite dans un tampon avec le Tris à 10 mM pH 7,5 et les concentrations en MgCl_2 et NaCl adéquates (voir **tableau II-1** page 79). L'AFM utilisé est un Multimode associé au contrôleur Nanoscope IIIa. Les microleviers en nitrure de silicium utilisés proviennent de chez Olympus (référence AC160TS) et ont des fréquences de résonance comprises entre 250 et 350 kHz.

1.5. Observation par AFM en milieu liquide.

Pour les observations en milieu liquide des paragraphes 2 et 3.2, la concentration finale d'ADN utilisée est de $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$. La dilution est faite dans le tampon de dépôt initial Tris 10 mM pH 7,5 MgCl_2 2 mM NaCl 10 mM. Cinq μL de cette solution sont déposés sur le mica traité par des ions nickel. La cellule liquide AFM est ensuite mise en place et le volume complété pour la remplir. Les changements de tampon sont effectués par les conduits d'entrée et de sortie de la cellule liquide AFM, à l'aide des tuyaux et de la seringue commercialisés avec la cellule.

2. Effet d'un prétraitement par les ions nickel.

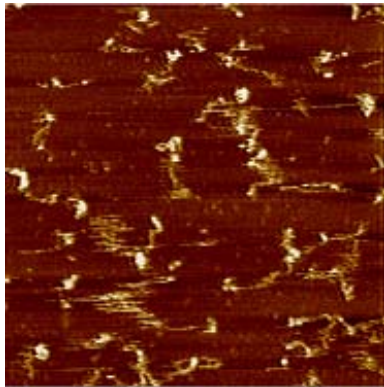
Expérimentalement, nous constatons que les molécules d'ADN adsorbées sur mica non prétraité sont beaucoup plus mobiles sur la surface et beaucoup plus difficiles à imager par AFM en milieu liquide (**figure II-9a**) que les molécules adsorbées sur mica prétraité par des ions nickel (**figure II-9b**) (59).

Figure II-9 Observation de l'ADN sur mica non prétraité et sur mica prétraité nickel.

a : Mica non prétraité

Gauche : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 20 mM NaCl 2 mM

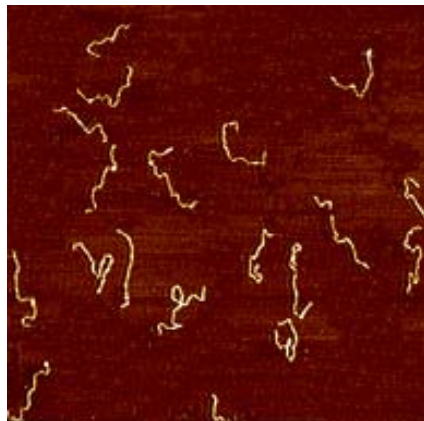
Droite : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM après un rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM



Scans : 2 x 2 μm²
Echelle en Z : 3 nm

Sur mica non prétraité, le rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM fait partir les molécules de la surface.

b : Mica prétraité



Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM

Scan : 2,5 x 2,5 μm²

Echelle en Z : 4 nm

L'ADN est beaucoup moins mobile et plus facile à imager sur mica prétraité nickel que sur mica non prétraité, même à concentration inférieure en Mg et concentration supérieure en NaCl (comparer avec l'image de gauche [figure II-9a](#)).

3. Effet des concentrations en cations monovalents et divalents.

3.1. Etude expérimentale de la force d'adsorption de l'ADN sur le mica.

Nous savons grâce au travail de Rivetti *et al* (12) que les molécules d'ADN faiblement adsorbées sont capables de s'équilibrer dans une conformation 2D sur la surface du mica. La distance bout à bout moyenne h mesurée est alors :

Equation 24 :

$$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \cong 2\sqrt{L_p L}$$

L_p : longueur de persistance de l'ADN

L : longueur des molécules d'ADN utilisées

Pour les molécules fortement adsorbées, les molécules ont subi une adsorption rapide sur la surface et une projection 3D => 2D pour laquelle h est donnée par :

Equation 25 :

$$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \cong \sqrt{(4/3)L_p L}$$

Ainsi, les mesures de distance bout à bout des molécules d'ADN sont une bonne indication de la force d'adsorption sur le mica.

Nous avons comparé les distances bout à bout moyennes pour différentes combinaisons de concentrations en NaCl et MgCl₂ récapitulées dans le **tableau II-1**, avec les valeurs de la force ionique et du rapport [MgCl₂]/ [NaCl]² correspondant.

[MgCl ₂] (mM)	[NaCl] (mM)	I (mM)	[MgCl ₂]/ [NaCl] ²	$\hat{n}_{s,2}$
2	5	11	0,08	$\hat{n}_{s,2} \cong 0,95$
6	9	27	0,07	
20	15	75	0,08	
60	30	210	0,07	
200	50	650	0,08	
2	50	56	0,0008	$\hat{n}_{s,2} \cong 0,65$
6	90	108	0,0007	
20	150	210	0,0008	
60	300	480	0,0007	
200	500	1100	0,0008	

Tableau II-1 : Gamme de concentrations en MgCl₂ et NaCl pour deux densités surfaciques réduites en cations divalents ($\hat{n}_{s,2}$) différentes.

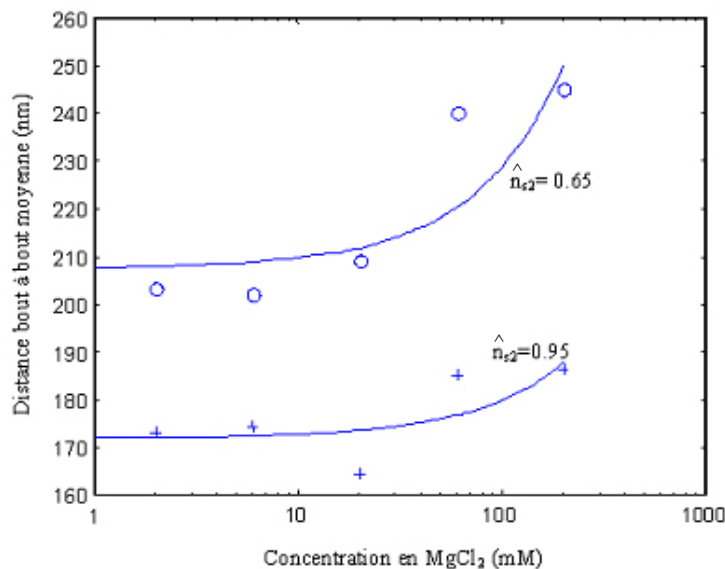


Figure II-10 : Distance bout à bout moyenne en fonction de la concentration en MgCl₂, pour deux rapports [MgCl₂]/[NaCl]² différents. [MgCl₂]/[NaCl]² ~ 0,0008 correspond à $\hat{n}_{s,2} \sim 0,65$; [MgCl₂]/[NaCl]² ~ 0,08 correspond à $\hat{n}_{s,2} \sim 0,95$. A faible force ionique (typiquement, $I < 100$ mM) la distance bout-à-bout moyenne D , qui reflète la force d'adsorption, garde une valeur assez constante à $\hat{n}_{s,2}$ fixé et [MgCl₂] variable. A plus haute force ionique, l'écrantage de l'attraction électrostatique diminue la force d'adsorption et D a tendance à augmenter.

La **figure II-10** représente l'évolution de la distance bout à bout moyenne des molécules d'ADN en fonction de la concentration en magnésium. Il est bien clair que la distance bout à bout n'est pas dépendante de la seule force ionique. Tant que la force ionique reste basse ($I < 100$ mM en ordre de grandeur), la seule dépendance significative est vis-à-vis de $\hat{n}_{s,2}$. A force ionique plus élevée, il se surajoute à la dépendance principale vis-à-vis de $\hat{n}_{s,2}$ une augmentation significative avec la force ionique.

3.2. Adsorption réversible sur mica prétraité par des ions nickel

Nous avons comparé par observation AFM en milieu liquide l'adsorption par les cations divalents et la désorption par les cations monovalents sur du mica non prétraité et sur du mica prétraité par des ions nickel. Sur le mica non prétraité, en repassant en Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM après un rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM, les molécules d'ADN sont parties de la surface (**figure II-9a**). Par contre, sur le mica prétraité par les ions Ni²⁺, les molécules d'ADN ne sont pas emportées par le rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM. Dans le tampon de rinçage elles ne peuvent presque plus être imagées, mais elles peuvent ensuite à nouveau être observées correctement en repassant en Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM (**figure II-11**) (59). Nous avons ainsi la possibilité d'effectuer des changements réversibles de la force d'adsorption des molécules d'ADN sur mica prétraité nickel.



Figure II-11 : *Modulation de l'adsorption sur mica prétraité nickel.* Gauche : Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM ; centre et droite : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM. Sur mica prétraité nickel, même à concentration élevée en sel monovalent les molécules d'ADN ne quittent pas la surface. Il est possible d'alterner réversiblement entre des conditions où l'ADN est peu adsorbé (et très disponible pour interagir avec des ligands) et des conditions où l'ADN est fortement adsorbé (et moins disponible pour interagir avec des ligands). Même quand l'ADN est fortement adsorbé, il reste mobile sur la surface.

C. Discussion

1. Discussion du modèle proposé

Nous considérons que les forces d'interaction entre l'ADN et le mica sont essentiellement d'origine électrostatique et médiées par les cations de la solution. Notre modèle décrit une première force toujours répulsive entre l'ADN et le mica aux courtes distances, mais qui peut devenir attractive non loin de la surface quand la charge de surface du mica est inversée. Il décrit aussi une deuxième force, attractive, reposant sur les corrélations de position entre les nuages de cations divalents de l'ADN et du mica. Cette force attractive ne peut l'emporter sur la force répulsive qu'aux courtes distances. Elle dépend essentiellement

du rapport [divalents] / [monovalents]² dans la solution et a tendance à s'affaiblir aux forces ioniques élevées, à cause de l'écrantage des interactions électrostatiques.

Nos observations expérimentales sont en accord avec le modèle présenté. Nous observons en effet que l'inversion de la charge de la surface par un prétraitement aux ions nickel permet : 1), une adsorption plus forte de l'ADN sur la surface et 2), en rinçant la solution de cations divalents par une solution de cations monovalents, les molécules d'ADN restent proches de la surface. De plus la force d'adsorption, reflétée par la distance bout à bout moyenne des molécules d'ADN adsorbées, varie peu à $r = [\text{Mg}^{2+}]/[\text{Na}^+]^2$ constant, et à r constant ne montre un affaiblissement qu'à force ionique élevée.

Notre travail demeure actuellement le seul à proposer un cadre théorique et expérimental aussi argumenté pour décrire les interactions électrostatiques déterminant l'adsorption de l'ADN sur le mica. Il a d'ailleurs initié de nouvelles réflexions sur le sujet puisqu'une équipe anglaise a publié en 2004 des observations en milieu liquide (66) montrant l'adsorption d'ADN pBR322 sur le mica en présence des seuls cations monovalents K^+ et Na^+ dans la solution ; le tampon utilisé est du PBS 0,1X pH 7,3 (le PBS 1X étant du phosphate 10 mM pH 7,4 KCl 2,7 mM NaCl 137 mM). Cependant ni notre modèle ni nos observations ne nous indiquent la possibilité d'une bonne adsorption de l'ADN sur la surface en présence seulement de cations monovalents.

Notre travail suggère des moyens de moduler la force d'adsorption de l'ADN sur le mica qui sont, d'un point de vue qualitatif, tout à fait validés expérimentalement. Ce cadre de conditions expérimentales constitue un référentiel très utile. Nous nous en servons dans la recherche d'un système d'ancrage des extrémités de l'ADN sur le mica entre deux plots distants, que nous allons décrire dans la partie **III** du présent chapitre.

2. Discussion des applications à l'étude des complexes ADN-protéines

Pour l'expérimentaliste qui étudie la dynamique des complexes ADN-protéines, il est important de pouvoir travailler à force ionique relativement élevée, pour se rapprocher de conditions « physiologiques » ($[\text{NaCl}] \sim 150 \text{ mM}$). Nous voyons qu'avec la dépendance en $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{Na}^+]^2$ de la force d'attraction, il est possible d'augmenter considérablement la concentration en NaCl dans la solution, à condition d'augmenter aussi la concentration en MgCl_2 . Ceci n'a à notre connaissance pas été réalisé à ce jour dans les études de complexes ADN-protéines par AFM et ce résultat ouvre ainsi une perspective intéressante.

L'autre point important est la possibilité de garder les molécules d'ADN proches de la surface même à concentration en NaCl élevée, en utilisant le mica prétraité par les ions Ni^{2+} . Avec la cellule liquide AFM, cela permet de changer de manière réversible les conditions d'adsorption pendant une expérience, sans faire complètement partir les molécules d'ADN de la surface. Comme les expériences pionnières d'AFM en milieu liquide sur les complexes ADN-protéines l'ont montré, l'un des points essentiels est d'avoir un compromis entre adsorption forte de l'ADN (favorisant l'imagerie des complexes) et adsorption faible (pour ne pas trop restreindre l'évolution dynamique des complexes, gênée par la surface). Les changements réversibles de la force d'adsorption pourraient par exemple permettre de former les complexes avec les protéines dans des conditions d'adsorption faible, puis de les observer à force d'adsorption plus élevée, ces deux étapes pouvant être répétées.

Plus récemment, notre groupe a proposé d'utiliser des cations trivalents (spermidine, cobalt hexamine) pour l'adsorption de l'ADN, au lieu d'utiliser des cations divalents. Les cations trivalents sont généralement utilisés pour condenser l'ADN, mais à concentration faible (quelques dizaines de μM), ils permettent une adsorption efficace de l'ADN et de travailler jusqu'à des concentrations en NaCl de 300 mM (67).

Conclusion

Nous avons proposé une explication de l'adsorption de l'ADN sur le mica à l'aide de modèles électrostatiques des interactions ADN-cations-mica qui est cohérente avec nos observations expérimentales principales sur l'adsorption de l'ADN sur le mica. Nous disposons ainsi maintenant d'un référentiel assez précis de concentrations en cations monovalents et divalents, qui déterminent la force d'adsorption de l'ADN sur cette surface. Cela permet à l'expérimentateur de les faire varier pour satisfaire différents compromis entre une accroche forte favorisant l'imagerie et une accroche faible favorisant la disponibilité de l'ADN pour interagir avec les ligands. Nous avons aussi validé une méthode de variation réversible de la force d'adsorption sur mica prétraité nickel.

L'étude du comportement de protéines le long de l'ADN par observation AFM en milieu liquide nécessite en plus un ancrage de l'ADN au niveau de ses extrémités, entre des plots suffisamment distants pour l'obtention de molécules tendues. Ce développement constitue l'étape suivante de notre travail, présentée dans la partie **III**.

III - Recherche d'un système d'ancrage des extrémités de l'ADN sur le mica entre deux plots distants.

Nous avons cherché à associer un ancrage contrôlé à la surface à une possibilité de moduler l'interaction avec la surface dans un concept de molécule d'ADN ancrée par ses extrémités. Ceci nécessite de fonctionnaliser les extrémités des molécules d'ADN et de trouver un système de plots¹ distants immobilisés sur la surface entre lesquels ancrer les molécules.

Les systèmes d'accroche des extrémités de l'ADN sur des plots disposés sur une surface ont été très étudiés ces dernières années car ils constituent un enjeu majeur en biotechnologie, notamment pour les puces à ADN. Le silicium est l'une des surfaces les plus utilisées, car toutes les méthodes de lithographie de la microélectronique peuvent être employées pour graver des motifs sur la surface, avec une haute densité. Le verre est aussi une surface très utilisée, avec de nombreux traitements de surface mis au point. Cependant les systèmes de plots adressables qui sont réalisés sur ces surfaces ont en général des dimensions de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de μm de côté. De plus, l'accroche des molécules d'ADN sur ces plots de grande dimension n'est pas contrôlée à l'échelle de la molécule individuelle mais, au mieux, à l'échelle de l'ensemble du plot, et sans aucune maîtrise de l'étalement des molécules. Ces systèmes sont bien adaptés aux méthodes de détection optiques habituellement utilisées pour les puces à ADN, dont la résolution est de l'ordre de 200 nm, mais ne sont absolument pas applicables au type d'étude présenté ici, où la surface doit être réellement plane, où la nature de l'observation est différente, et où l'échelle d'analyse est réellement de l'ordre du nanomètre. Nous avons en particulier écarté l'utilisation d'une surface d'or malgré la facilité de couplage avec les extrémités thiolées d'ADN, car l'ADN s'étale mal sur ce type de surface. Il n'est pas non plus envisageable de réaliser des plots d'or sur le mica, car l'or n'accroche pas suffisamment fortement sur le mica.

Nous avons choisi d'essayer d'accrocher les extrémités de l'ADN à la surface du mica par des molécules ayant une interaction avec la surface différente de celle de l'ADN. Nous avons testé trois systèmes de plots couplés aux extrémités d'ADN en une seule étape de réaction (streptavidine, streptavidine-peroxydase, IgG) et trois systèmes couplés aux

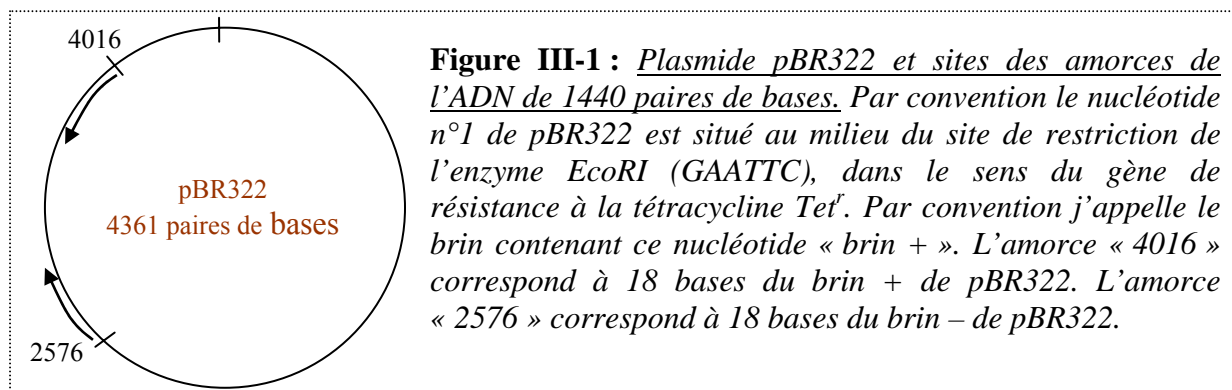
¹ Le terme « plots » désigne les différents systèmes attachés aux extrémités de l'ADN, sans présumer de leur capacité ou non à ancrer l'ADN sur la surface de mica.

extrémités d'ADN en deux étapes de réaction (ADN simple brin biotinylé, étiquette histidine biotinylée, BSA biotinylée).

La stabilité de l'ancrage des extrémités à la surface doit être testée par rapport au référentiel d'adsorption et de désorption de l'ADN mis au point précédemment (**partie II** de ce chapitre). L'ancrage doit résister aux changements de concentrations en cations dans la solution qui permettent de contrôler la force de l'interaction entre le reste de la molécule d'ADN et la surface. Il doit aussi être suffisamment fort pour résister au balayage par la pointe AFM (réciproquement, le balayage par la pointe doit être suffisamment doux pour ne pas détacher les plots de la surface). Enfin dans le système final la distance entre les plots devra être proche de la longueur de la molécule d'ADN, pour l'application à l'étude du comportement des protéines le long de l'ADN.

A. Matériel et méthodes

1. Préparation d'ADN fonctionnalisé à une ou deux extrémités



Pour les tests d'ancrage de l'ADN entre des plots, nous avons surtout travaillé avec un fragment d'ADN de 1440 paires de bases correspondant aux paires de bases 2576 à 4016 du plasmide pBR322 (**figure III-1**) et fonctionnalisé à l'une et/ou l'autre de ses extrémités. Cet ADN est préparé par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), une réaction en chaîne qui permet d'obtenir de grandes quantités d'ADN double brin linéaire, homogène en séquence et longueur. Les limites de la séquence amplifiée sont définies par les amorces utilisées. Celles-ci peuvent porter chacune un groupe fonctionnel qui définit alors la fonction aux extrémités de l'ADN (**tableau III-1**). La PCR a été réalisée avec l'enzyme Taq polymérase (New England Biolabs). Le produit de la PCR, contrôlé par migration sur gel d'agarose 1%, est purifié sur colonne échangeuse d'anions « MiniQ » avec élution par un gradient de NaCl entre 200 mM et 1 M. Une précipitation dans l'éthanol puis une resuspension en solution tampon (Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM) permettent d'obtenir une solution dessalée et concentrée d'ADN de 1440 paires de bases, avec des extrémités fonctionnalisées (**tableau III-2**). La qualité de la préparation finale est contrôlée par microscopie électronique à transmission pour vérifier sa pureté et l'homogénéité des longueurs des molécules. La concentration de la solution est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm sur un appareil Genequant (Pharmacia).

Séquence des amorces (fournisseur : MWG)	Fonctionnalisation		
	Ø	Biotine en 5'	Digoxygénine en 5'
5'-CGA CGC TCA AGT CAG AGG-3'	2576	b2576	d2576
5'-GGA TCT CAA CAG CGG TTA-3'	4016	b4016	d4016

Tableau III-1 : Désignation des amorces utilisées pour la préparation d'un ADN de 1440 paires de bases.

Combinaison d'amorces	Fonctionnalisation	Désignation de l'ADN
2576, 4016	-	1440
2576, 4016b	Biotine en 5' brin +	1440b
2576b, 4016	Biotine en 5' brin -	b1440
2576b, 4016b	Biotines en 5' brins + et -	b1440b
2576d, 4016	Digoxygénine en 5' brin +	d1440
2576, 4016d	Digoxygénine en 5' brin -	1440d
2576d, 4016d	Digoxygénines en 5' brins + et -	d1440d

Tableau III-2 : Combinaisons d'amorces, fonctions aux extrémités, et désignation des ADN.

2. Plots couplés aux extrémités en une étape de réaction.



C'est un avantage de pouvoir coupler des plots aux extrémités de l'ADN en une seule étape de réaction. Nous avons d'abord testé l'utilisation de streptavidine pour réaliser l'ancrage sur la surface. Nous avons aussi envisagé d'utiliser des protéines directement attachées à la streptavidine, et nous avons commencé par tester la protéine fusion streptavidine-peroxydase. Nous avons élargi le champ d'investigation à d'autres systèmes de fonctionnalisation des extrémités, en commençant par la digoxygénine et les anticorps anti digoxygénine.

Le schéma de principe du système d'ancrage souhaité est représenté en **figure III-2**, et les caractéristiques des solutions mères de protéine utilisées sont récapitulées dans le **tableau III-3**.

Figure III-2 : *Systèmes nécessitant une seule étape de couplage ADN-plots : schéma de principe.*



Systemes testés :

	
<i>Streptavidine</i>	<i>Biotine</i>
<i>Streptavidine-peroxydase</i>	<i>Biotine</i>
<i>IgG anti-digoxygénine</i>	<i>Digoxygénine</i>

Nom	Fournisseur	Tampon de resuspension	Masse molaire	Concentration de stockage
Streptavidine	Promega	Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM	60 kDa	1 mg/mL ~17 μ M
Streptavidine peroxydase	Sigma	PBS	104 kDa	1 mg/mL ~ 10 μ M
IgG anti-digoxygénine	Roche	PBS	~150 kDa	0,2 mg/mL ~ 1,5 μ M

Tableau III-3 : Plots couplés aux extrémités en une étape de réaction.

PBS : *Phosphate Buffered Saline* (phosphate 10 mM pH 7,4 KCl 2,7 mM NaCl 137 mM)

2.1. Préparation des complexes streptavidine-extrémités biotinylées d'ADN.

La biotine est une petite molécule de 224 Da. La streptavidine est un tétramère de 60 kDa, qui possède au total quatre sites de fixation pour la biotine (68,69) (**figure III-3**). L'énergie de la liaison biotine-streptavidine est d'environ 35 kT, donc légèrement plus faible que celle d'une liaison covalente (kT~1/40 d'eV et l'énergie d'une liaison covalente est de l'ordre de l'eV).

La concentration relative streptavidine/extrémités biotinylées est un paramètre important de la préparation des complexes. Jusqu'à quatre extrémités biotinylées peuvent en principe se fixer à chaque molécule de streptavidine. Dans la pratique quand la concentration en streptavidine dans le mélange réactionnel est proche de la concentration en extrémités d'ADN (typiquement [ADN]~1 nM et [streptavidine]~2 nM), on obtient une proportion importante (jusqu'à 80-90%) de molécules d'ADN refermées sur elles-mêmes par la streptavidine. Pour obtenir une majorité de molécules d'ADN avec une streptavidine à chaque extrémité, le mélange réactionnel doit contenir un large excès de streptavidine (typiquement [ADN] ~ 10 nM et [streptavidine] ~ 1 μ M) ; dans ce cas après la réaction une étape de purification sur tamis moléculaire est nécessaire pour éliminer l'excès de streptavidine et obtenir une solution de complexes ADN biotinylé-streptavidine purifié. Nous avons utilisé une colonne superose 6B (Amersham) et élué avec du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM. Le complexe ADN biotinylé-streptavidine est élué dans le volume exclu tandis que la streptavidine seule est retardée par la colonne. Un exemple de complexe, avec une streptavidine à chaque extrémité, est donné en **figure III-4**. Le rendement de la réaction peut être estimé par comptage sur les images observées à l'air. En ne retenant que les molécules de longueur correcte et présentant sans ambiguïté une streptavidine à chaque extrémité, les meilleurs rendements obtenus sont de 60-70%. Pour les complexes 1440b-streptavidine ou b1440-streptavidine les meilleurs rendements obtenus sont de 70-80%.

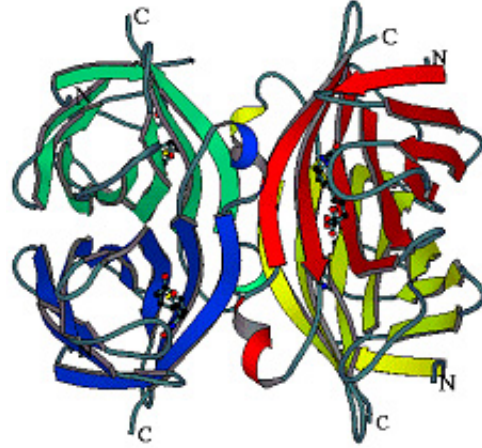
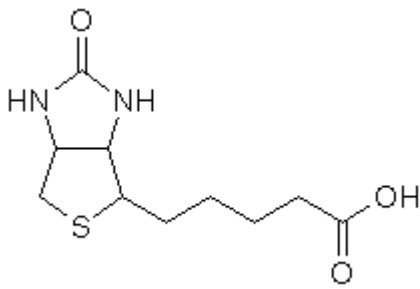


Figure III-3 : Biotine et streptavidine.

Gauche, formule chimique de la biotine.

Droite, structure tridimensionnelle du tétramère de streptavidine, d'après <http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html>

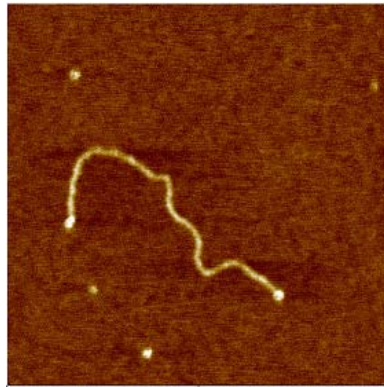


Figure III-4 : ADN b1440b après complexation avec une streptavidine à chaque extrémité.

AFM à l'air ; scan : 500 nm x 500 nm ; échelle en Z : 3 nm.

2.2. Préparation des complexes streptavidine peroxydase-extrémités biotinylées d'ADN.

La préparation de ces complexes est tout à fait analogue à la préparation des complexes avec la streptavidine aux extrémités. L'ADN biotinylé à une ou deux extrémités est incubé avec un excès de streptavidine-peroxydase, et l'excès de protéine est ensuite éliminé par purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6B (Amersham), élution avec du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM). Un exemple de complexe, avec une streptavidine-peroxydase à une seule extrémité, est donné en **figure III-5** ; les meilleurs rendements obtenus sont de 70-80%. Pour les complexes b1440b-streptavidine peroxydase les meilleurs rendements obtenus sont de 60-70%.

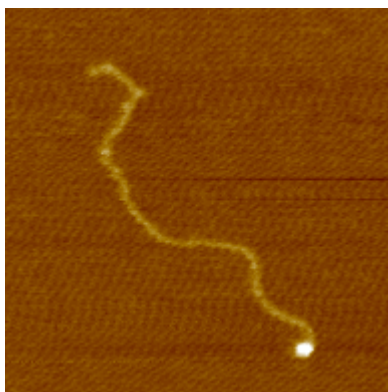


Figure III-5 : ADN 1440b après complexation avec une molécule de streptavidine-peroxydase.
AFM à l'air.

Scan : 375 x 375 nm.

Echelle en Z : 5 nm.

2.3. Préparation des complexes IgG anti digoxygénine-extrémités digoxygénines d'ADN.

De même la préparation des complexes entre l'ADN modifié par des digoxygénines aux extrémités et les anticorps anti-digoxigénine requiert la réaction avec un excès d'anticorps et une étape de purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6B (Amersham), élution avec du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM). Un exemple de complexe, avec un anticorps anti-digoxigénine à une extrémité, est donné en **figure III-6** ; les meilleurs rendements obtenus sont de 60-70 %. Il est plus difficile de préparer les complexes d'ADN-anticorps anti-digoxigénine, un taux de circularisation très élevé est obtenu même en incubant l'ADN avec un large excès d'anticorps.

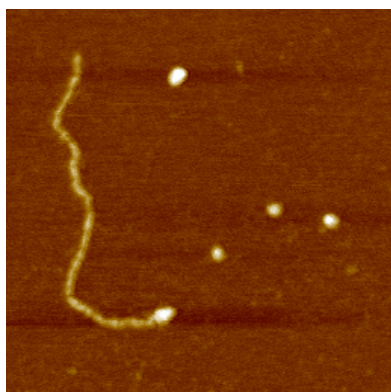


Figure III-6 : ADN 1440d après formation d'un complexe avec un anticorps IgG anti-digoxigénine.
AFM à l'air.

Scan : 500 nm x 500nm.

Echelle en Z : 5 nm.



3. Plots couplés aux extrémités en deux étapes de réaction.

Nous avons aussi envisagé des systèmes plus complexes nécessitant 2 étapes de réaction pour le couplage aux extrémités d'ADN. La streptavidine sert à faire la jonction entre l'extrémité d'ADN et le plot biotinylé. L'utilisation d'ADN simple brin, d'étiquettes histidine ou de BSA biotinylés pour réaliser les plots a été testée, avec un schéma de principe en **figure III-7**. Dans le cas de l'ADN simple brin, il est même possible de s'affranchir de l'utilisation de streptavidine en utilisant des constructions d'ADN particulières qui seront présentées dans la partie Résultats. Les caractéristiques des solutions mères des trois types de plots sont récapitulées dans le **tableau III-4**. Les différentes méthodes de préparation des complexes utilisées seront décrites au cas par cas dans la partie Résultats.

Figure III-7 : *Systèmes nécessitant deux étapes de couplage ADN-plots : schéma de principe.*



Systèmes testés :

	
<i>ADN simple brin biotinylé</i>	<i>Streptavidine</i>
<i>Etiquette histidine biotinylée</i>	<i>Streptavidine</i>
<i>BSA biotinylée</i>	<i>Streptavidine</i>

Nom	Fournisseur	Tampon de resuspension	Masse molaire	Concentration de stockage
ADN simple brin biotinylé	MWG	TE	330 Da / base	200 μ M en molécules
Etiquette histidine biotinylée	Epytop	TFA 0,1% dans H ₂ O	1177 Da	1 mg/mL \sim 850 μ M
BSA biotinylée	Sigma	PBS	66 kDa	2 mg/mL \sim 30 μ M

Tableau III-4 : *Plots couplés aux extrémités en deux étapes.*

TE : Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM.

TFA : acide trifluoroacétique.

4. Microscopie électronique à transmission.

La préparation des grilles MET suit le même protocole que celui décrit au paragraphe **II – B.1.2** pages 76-77.

5. Méthodologies de test de l'ancrage des plots à la surface.

5.1. Méthodologie générale.

a. Plots seuls.

Les paramètres pris en compte dans l'adsorption sont les suivants :

- quantification du nombre de plots sur la surface en fonction de la concentration en plots de la solution déposée, sur la base d'une gamme 1 nM – 1 μ M
- quantification du nombre de plots après variation des conditions ioniques en termes de cations monovalents (gamme 0-50 mM) et de cations divalents (gamme 0-10 mM) ; seuls les cations Na⁺ et Mg²⁺ ont été testés, même si l'adsorption des plots sur la surface est a priori susceptible de dépendre du type de cation monovalent ou divalent utilisé ;
- quantification en fonction du prétraitement nickel ou non de la surface du mica.

La désorption est étudiée sur la base du référentiel de conditions d'adsorption précédent, suivie d'une augmentation de la force ionique en monovalents (NaCl dans la gamme 100-400 mM).

Ces conditions d'adsorption et de désorption ont dans un premier temps été testées à l'air, ce qui permet d'essayer rapidement des conditions variées. Mais l'observation à l'air nécessite au préalable une étape de rinçage par le tampon d'adsorption (pour enlever les plots non adsorbés) et de séchage de la surface des micas. Des tests préliminaires ont montré la difficulté d'assurer l'homogénéité et la reproductibilité des densités observées sur la surface, ce que nous supposons lié à l'étape de séchage, dont il est difficile d'assurer l'homogénéité sur la surface de l'échantillon, et pendant lequel les conditions de la solution changent de manière non contrôlable. C'est un problème récurrent à toutes les études d'AFM depuis des années.

Ce constat nous a amené à privilégier l'observation en milieu liquide, qui permet une bonne évaluation de l'effet du rinçage par le tampon d'adsorption et surtout permet de s'affranchir complètement de toute étape de séchage de la surface. Compte tenu du nombre de conditions proposées et des exigences de l'observation en milieu liquide, nous nous sommes limités essentiellement à tester l'adsorption et la désorption des plots par rapport au référentiel d'adsorption et de désorption de l'ADN sur mica prétraité nickel, tel qu'il a été établi dans la partie **II** du présent chapitre, afin de mettre en évidence un éventuel comportement différentiel des plots par rapport à l'ADN.

b. Complexes ADN-plots.

Sur les complexes avec un plot à chaque extrémité la mesure de la distance bout à bout moyenne des molécules à partir des images observées à l'air permet d'examiner si la présence des plots a un effet sur l'équilibration sur la surface. Comme expliqué dans le travail de Rivetti *et al* (12), si l'interaction surface-plot est forte, l'adsorption des extrémités sur la surface doit se faire de manière relativement brutale et les molécules d'ADN avoir tendance à être projetées sur la surface plutôt qu'à bien s'équilibrer.

Le reste de la démarche est semblable à celle décrite pour les plots seuls : le travail sur mica prétraité nickel dans le référentiel d'adsorption et de désorption de l'ADN établi en **II** et l'observation en milieu liquide sont privilégiés.

Il est intéressant pour les tests d'utiliser aussi des molécules d'ADN avec un plot à une seule extrémité pour comparer en milieu liquide le comportement de l'extrémité libre et de l'extrémité plot sur la surface. Cela permet au-delà de la question de l'adsorption et de la désorption de répondre à la question de la mobilité des plots complexés à l'ADN sur la surface.

5.2. Préparation des micas pour l'observation à l'air

Le volume de solution déposé sur la surface ne peut pas dépasser 10-20 μL , en raison de la surface limitée de la pièce de mica utilisée, et du caractère hydrophile de la surface de mica clivé. Avec ces petits volumes il est préférable d'utiliser un temps de dépôt court, pour limiter au maximum les phénomènes d'évaporation, susceptibles de changer les conditions ioniques de la solution de manière incontrôlée pendant la phase de dépôt.

Sauf cas particuliers précisés le cas échéant dans le paragraphe **B** le protocole que nous avons retenu pour préparer les micas destinés à l'observation à l'air est le suivant :

- clivage du mica
- éventuellement, prétraitement par des ions nickel
- dépôt de 10 μL de solution sur la surface
- attente 1 minute
- quelques gouttes d'acétate d'uranyle 0,2% sont passées sur la surface (seulement quand la solution déposée contient de l'ADN, pour l'étaler)

- rinçage avec de l'eau millipore (~1 mL suffit)
- séchage par absorption du liquide sur du papier filtre sans cendres
- observation.

Toutes les images à l'air ont été obtenues en mode contact intermittent sur un AFM Multimode de Veeco Instruments associé au contrôleur Nanoscope IIIa. Nous avons utilisé pour l'observation à l'air les microleviers OTESPA commercialisés par Veeco ou les microleviers AC160TS commercialisés par Olympus avec une excitation en mode acoustique entre 250 et 350 kHz et une amplitude d'oscillation de quelques nanomètres. Une correction de planéité (*flatten*) est effectuée sur toutes les images brutes avec le logiciel du Nanoscope.

5.3. Préparation pour l'observation en milieu liquide.

Sauf cas particuliers précisés le cas échéant dans le paragraphe **B**, nous avons utilisé pour les expériences en milieu liquide un protocole qui permet de contrôler l'expérience à toutes les étapes d'injection et/ou de rinçage dans la cellule liquide AFM :

- préparation du mica (clivage et éventuellement prétraitement nickel)
- mise en place de la cellule liquide au-dessus du mica
- injection de 50 μL de tampon (sans ADN ni plots) dans la cellule liquide
- observation de la surface pour contrôler sa propreté et celle du tampon
- injection des molécules à adsorber
- observation
- injection de nouvelles molécules ou rinçages par un tampon, etc...

En routine, l'injection et l'aspiration de solution dans la cellule liquide AFM sont faites à la micropipette. Alternativement, pour un contrôle plus précis du flux, nous avons aussi commencé à tester un système de micropompes, afin d'obtenir un contrôle précis du flux traversant la cellule liquide, et ainsi améliorer le contrôle et la reproductibilité des changements de conditions ioniques dans les expériences en milieu liquide. Nous avons connecté la cellule liquide à un appareil de chromatographie de type SMART (Amersham) (**figure III-8**) qui permet de faire passer des débits constants de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$. Dans le système de Guthold *et al* (70), par exemple, le débit utilisé est nettement supérieur, environ 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. La gamme de débits commandée par le SMART est grande (du $\mu\text{L}/\text{min}$ au mL/min), mais les débits élevés ne sont pas utilisés car ils occasionnent des surpressions et des fuites au niveau du joint flexible. En restant à des débits inférieurs à $\sim 100 \mu\text{L}/\text{min}$, le problème de fuite est évité. Nous avons également vérifié qu'à ces faibles débits le passage du flux à travers la cellule liquide ne perturbe pas l'imagerie des molécules adsorbées sur la surface (**figure III-9**).

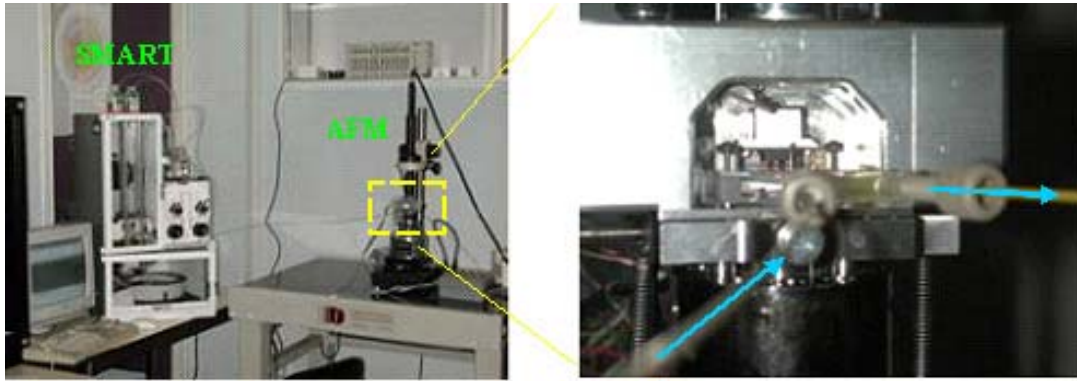
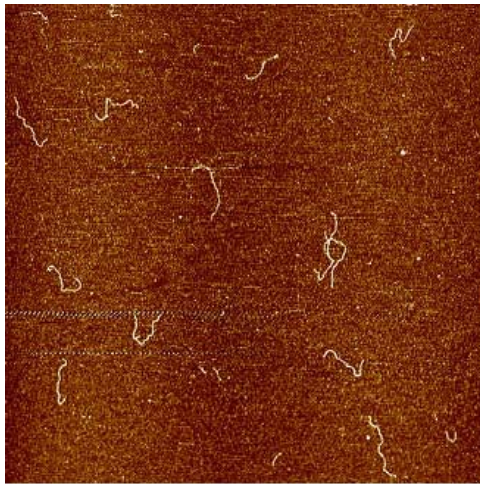


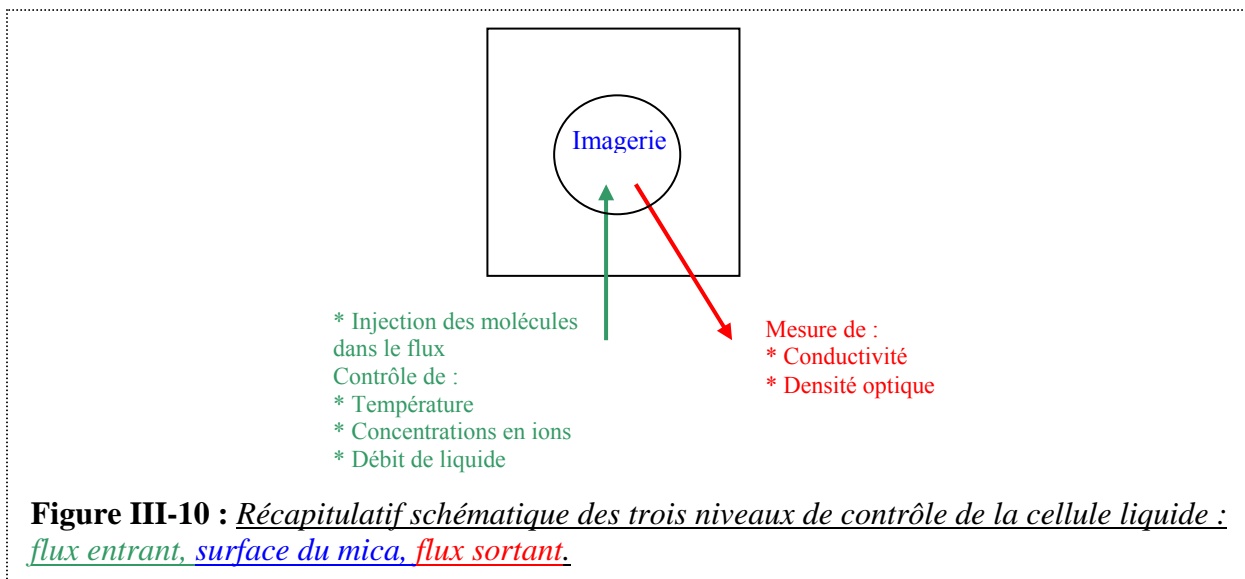
Figure III-8 : *Photographie d'un montage couplant la cellule liquide AFM à un appareil de chromatographie SMART. Gauche, vue générale ; droite, zoom sur la connection à l'entrée et à la sortie de la cellule liquide AFM.*



*ADN de 1440 paires de bases.
Scan : 4 μm x 4 μm .
Echelle en Z : 3 nm.
Fréquence de balayage : 3 Hz.
Flux de liquide : 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.*

Figure III-9 : *Imagerie sous flux de molécules d'ADN adsorbées sur le mica.*

L'appareil SMART a d'autres fonctionnalités utilisables dans les expériences d'AFM en milieu liquide : boucle de microinjection, commande d'un gradient de concentration, contrôle de la température. La boucle de microinjection permet d'injecter l'ADN et les protéines directement dans le flux entrant ensuite dans la cellule liquide AFM. La commande d'un gradient permet de faire varier de manière automatique et graduelle la composition du flux grâce au mélange contrôlé des solutions provenant de deux réservoirs (par exemple une solution de Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 10 mM et une solution de Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM). Enfin un système de refroidissement Peltier peut réguler la température du flux et la maintenir à une valeur de consigne (dans la gamme 10°C – 30 °C), par exemple pour ralentir la cinétique des phénomènes observés. Dans un développement ultérieur, le flux sortant de la cellule liquide pourra être ramené dans l'appareil pour passer dans sa cellule conductimétrique et par une cellule de détection optique. La cellule conductimétrique permettra de suivre l'équilibration des conditions ioniques dans la cellule liquide. La cellule de détection optique permettra de mesurer la Densité Optique (DO) à plusieurs longueurs d'onde, en général 260 et 280 nm, pour détecter le passage des molécules biologiques (ADN ou protéines) circulantes (**figure III-10**).



Toutes les images en milieu liquide ont été obtenues en mode contact intermittent sur un AFM Multimode de Veeco Instruments associé au contrôleur Nanoscope IIIa. Nous avons utilisé pour l'observation en milieu liquide les microleviers contact DNP commercialisés par Veeco Instruments avec une excitation en mode acoustique entre 5 et 20 kHz et une amplitude d'oscillation de quelques nanomètres. Une correction de planéité (*flatten*) est effectuée sur toutes les images brutes avec le logiciel du Nanoscope.

5.4. Mesures.

Pour les mesures de distance bout à bout des molécules d'ADN ou le comptage des plots sur la surface à densité élevée, nous avons en outre utilisé le logiciel de traitement et d'analyse d'images « ImageJ » développé par les *National Institutes of Health* (NIH) américains et distribué sur le site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Les distances bout à bout sont mesurées sur au moins 200 molécules à partir d'images d'ADN contrôle de 1440 paires de bases (extrémités libres) ou d'images des complexes entre ce même ADN et les plots de chaque type (un plot à chacune des deux extrémités) observés à l'air.

Les comptages de plots sont effectués après seuillage et binarisation des images AFM. Le même niveau de seuillage est pris pour les différentes images d'une même expérience ; en revanche il est en général changé d'une expérience à l'autre.

B. Résultats et discussion.

1. Streptavidine.

1.1. Plots seuls sur mica non prétraité.

L'observation à l'air nécessite après la phase d'adsorption une étape de rinçage et de séchage. Nous avons constaté avec la streptavidine que le rinçage de la surface, lorsqu'il est effectué avec le tampon d'adsorption, entraîne à la suite du séchage une répartition hétérogène et non reproductible des plots sur la surface. Cela empêche de corrélérer le nombre de molécules sur la surface avec la concentration en plots de la solution déposée. Le seul moyen trouvé pour améliorer la reproductibilité des observations à l'air concernant la streptavidine

est d'utiliser un rinçage à l'eau après le rinçage avec le tampon d'adsorption, ce qui avait déjà été suggéré par Seong *et al* (71).

La densité observée après un rinçage à l'eau constitue donc notre condition de référence pour l'observation à l'air. En absence comme en présence de cations divalents dans la solution de dépôt, dans la gamme de conditions ioniques testée (MgCl_2 entre 0 et 10 mM, NaCl entre 0 et 50 mM), la streptavidine s'adsorbe sur la surface, sans que ces conditions aient une influence nette et reproductible sur la densité en plots sur la surface. Nous avons en revanche mis en évidence une différence significative en comparant l'effet d'un rinçage à l'eau et l'effet d'un rinçage à haute concentration en sel monovalent : le rinçage par une solution de Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM fait partir la majorité des plots de streptavidine de la surface, que l'adsorption ait été faite en absence ou en présence de cations divalents. Ce résultat est vérifié pour une large gamme de concentrations en streptavidine dans la solution d'adsorption (1 nM à 1 μM) ; l'exemple de la **figure III-11** correspond à une concentration de 100 nM.

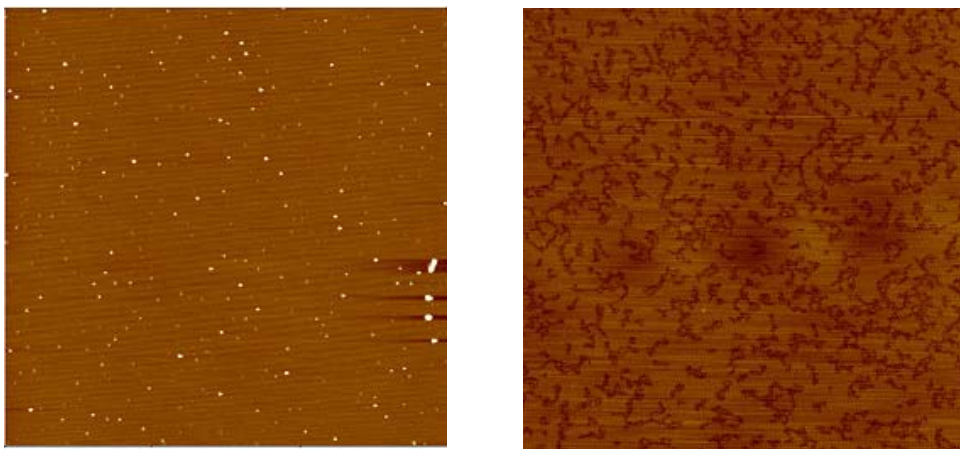


Figure III-11 : Effet d'un rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM sur les plots de streptavidine adsorbés sur mica non traité.

Dépôt : [streptavidine] = 100 nM dans Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM.

Gauche : surface rincée seulement à l'eau ; $\sim 25\text{-}30$ plots/ μm^2 .

Droite : surface rincée au Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM puis à l'eau ; ~ 0 plot/ μm^2 .
AFM à l'air ; scans : $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$; échelle en Z : 5 nm.

Cet effet d'un rinçage à haute force ionique en NaCl est confirmé en milieu liquide, en se limitant à tester la gamme 1 nM-100 nM en streptavidine pour éviter d'atteindre trop vite une densité élevée de plots sur la surface lors de l'adsorption. En injectant la streptavidine en Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM les molécules se déposent sur la surface, et en augmentant la concentration en sel monovalent à Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM les molécules se désorbent de la surface. L'augmentation de la concentration en sels monovalents désorbe la streptavidine de la surface de mica non traité.

1.2. Complexes ADN-plots sur mica non prétraité.

La comparaison entre les distances bout à bout moyennes des molécules d'ADN contrôle (extrémités libres) ou avec une streptavidine à chacune des deux extrémités sur mica non prétraité (**figure III-12**) ne met pas en évidence de différence significative. Ce sont vraisemblablement les interactions ADN-surface médiées par les cations qui dominent ici et on n'est pas suffisamment sensible à ce qui se passe aux extrémités.

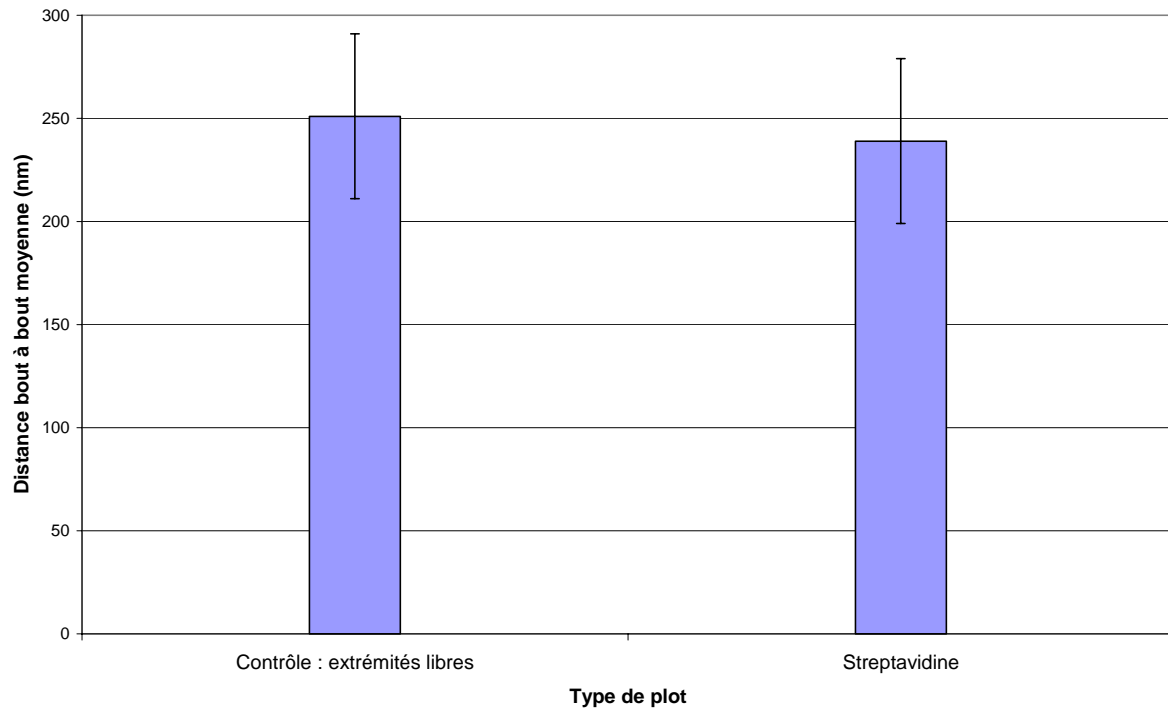
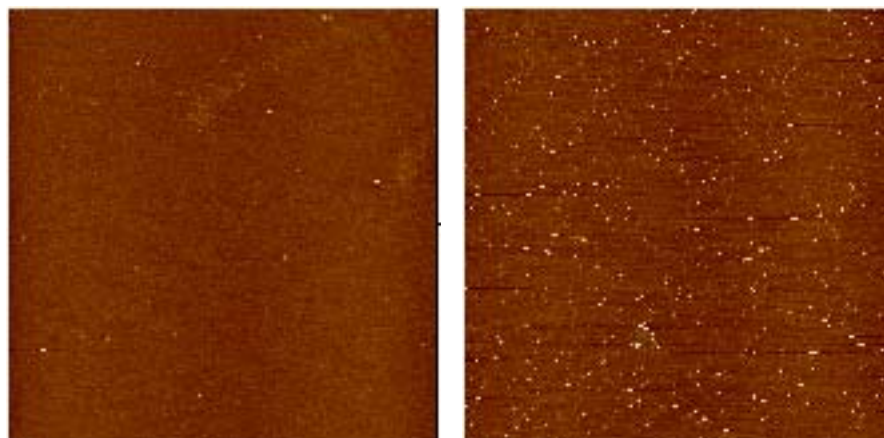


Figure III-12 : *Distance bout à bout moyenne entre les extrémités des molécules d'ADN : comparaison extrémités libres / extrémités streptavidine. ADN de 1440 paires de bases. Mica non prétraité ; tampon de dépôt : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 50 mM.*

1.2 Plots seuls sur mica prétraité nickel.

Nous nous sommes alors demandés si l'interaction de la streptavidine avec le mica prétraité nickel serait plus forte. Pour cela nous avons comparé par observation à l'air l'effet de rinçages à force ionique en NaCl élevée sur la streptavidine adsorbée sur des surfaces de mica non prétraitées et prétraitées par du nickel 1 mM. Par exemple, après une adsorption en tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM à une concentration de streptavidine de 1 μ M, la densité de streptavidine qui reste sur la surface après un rinçage au Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 400 mM est beaucoup plus importante sur mica prétraité nickel que sur mica non prétraité (**figure III-13**).



AFM à l'air.
Scan : 4 x 4 μm .
Echelle en Z : 3 nm.

Figure III-13 : *Evolution de la densité de streptavidine sur la surface en fonction du prétraitement.* La concentration de streptavidine déposée est de 1 μM . Le tampon de dépôt est NaCl 50 mM Tris 10 mM (pH 7,5). Au bout d'une minute les micas ont été rincés au NaCl 400 mM Tris 10 mM (pH 7,5) puis à l'eau.

Gauche : mica non prétraité ; ~ 0-5 plots/ μm^2 .

Droite : mica prétraité par des ions nickel (1 mM) ; ~ 35-40 plots/ μm^2 .

1.3 Complexes ADN-plots sur mica prétraité nickel.

Les observations sur les plots seuls ont indiqué que l'adsorption de la streptavidine est plus robuste sur mica prétraité nickel que sur mica non prétraité vis-à-vis d'un rinçage à haute force ionique en NaCl. L'adsorption sur mica prétraité nickel semble donc plus favorable à une utilisation de la streptavidine comme plot d'ancrage de l'ADN.

Pour comparer le comportement de la streptavidine et celui de l'ADN sur cette surface, nous avons testé en milieu liquide l'accroche de la streptavidine complexée à une extrémité d'ADN. Les complexes sont préparés avec l'ADN 1440b, ce qui permet d'analyser la mobilité de chacune des deux extrémités des molécules sur la surface du mica. Les conditions d'adsorption retenues sont des conditions de bonne adsorption de l'ADN (typiquement, Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM) ; cela aide aussi la streptavidine complexée à l'extrémité biotinylée à venir sur la surface. Nous observons que chacune des deux extrémités (extrémité libre, extrémité liée à une streptavidine) reste mobile sur la surface du mica (déplacement de plusieurs dizaines de nanomètres entre les images successives).

Ces résultats permettent de conclure que dans le référentiel de conditions testées, la streptavidine, malgré une interaction plus forte avec le mica prétraité nickel, n'a pas une adsorption suffisamment robuste pour ancrer l'extrémité de l'ADN à cette surface.

2. Streptavidine-peroxydase.

Nous avons choisi de rajouter une autre protéine à la streptavidine pour tester si une adsorption plus robuste est obtenue. La protéine fusion streptavidine-peroxydase a été testée. La préparation des complexes avec l'ADN biotinylé à une ou deux extrémités est comparable à celle de la streptavidine.

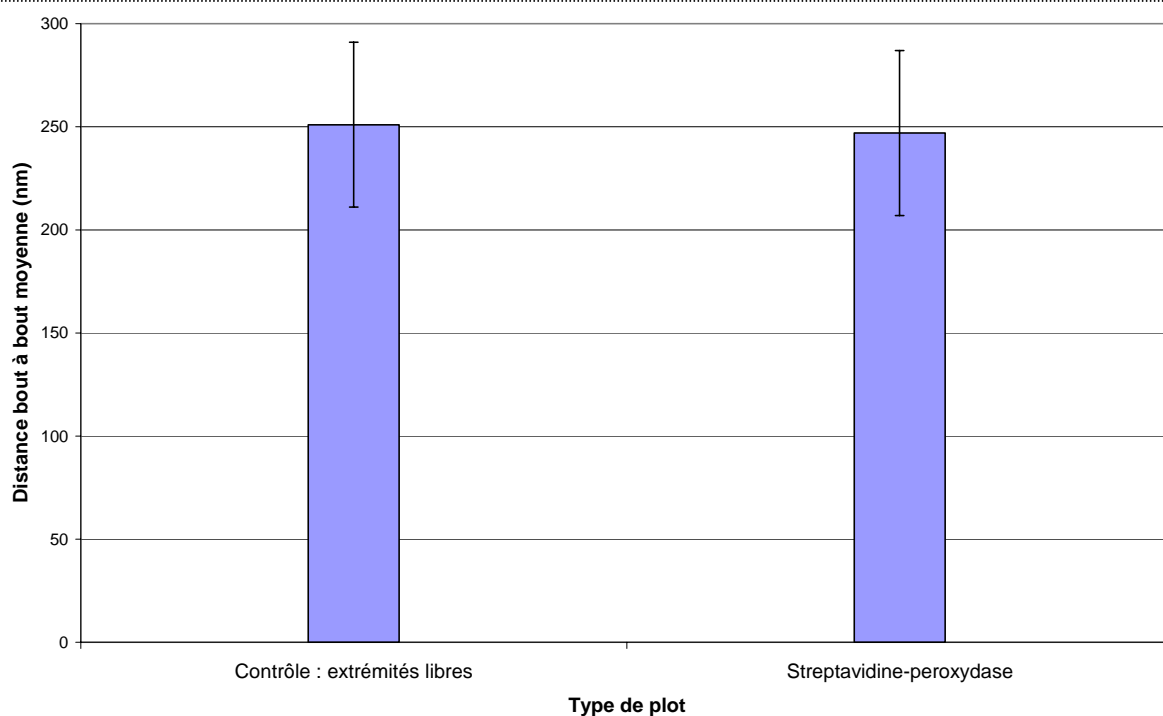


Figure III-14 : *Distance bout à bout moyenne entre les extrémités des molécules d'ADN : comparaison extrémités libres / extrémités streptavidine-peroxydase. ADN de 1440 paires de bases. Mica non prétraité. Tampon de dépôt : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 50 mM.*

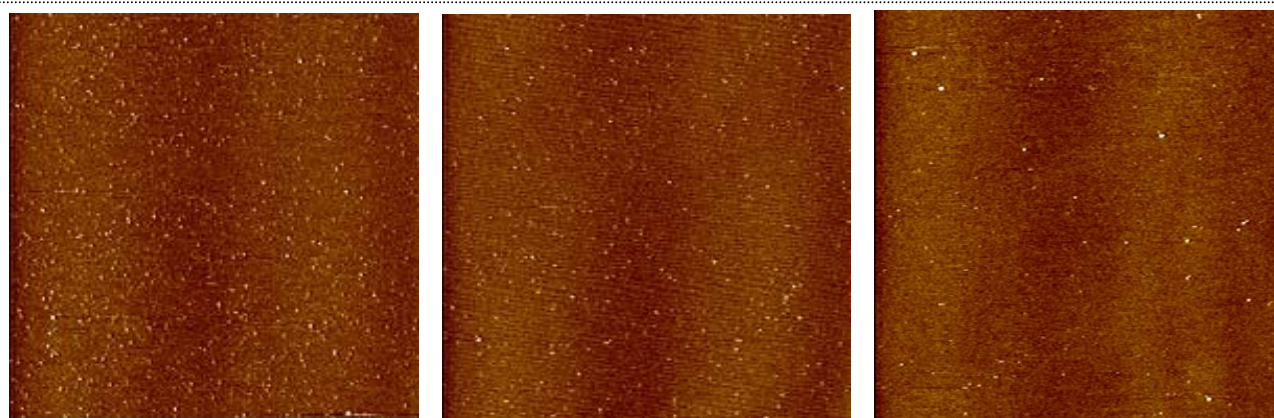


Figure III-15 : *Effet d'un rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM sur les plots de streptavidine-peroxydase adsorbés sur mica prétraité nickel.*

Dépôt : [streptavidine-peroxydase] = 50 nM dans Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM.

Gauche : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM, quelques minutes après le dépôt ; ~25-30 plots / μm².

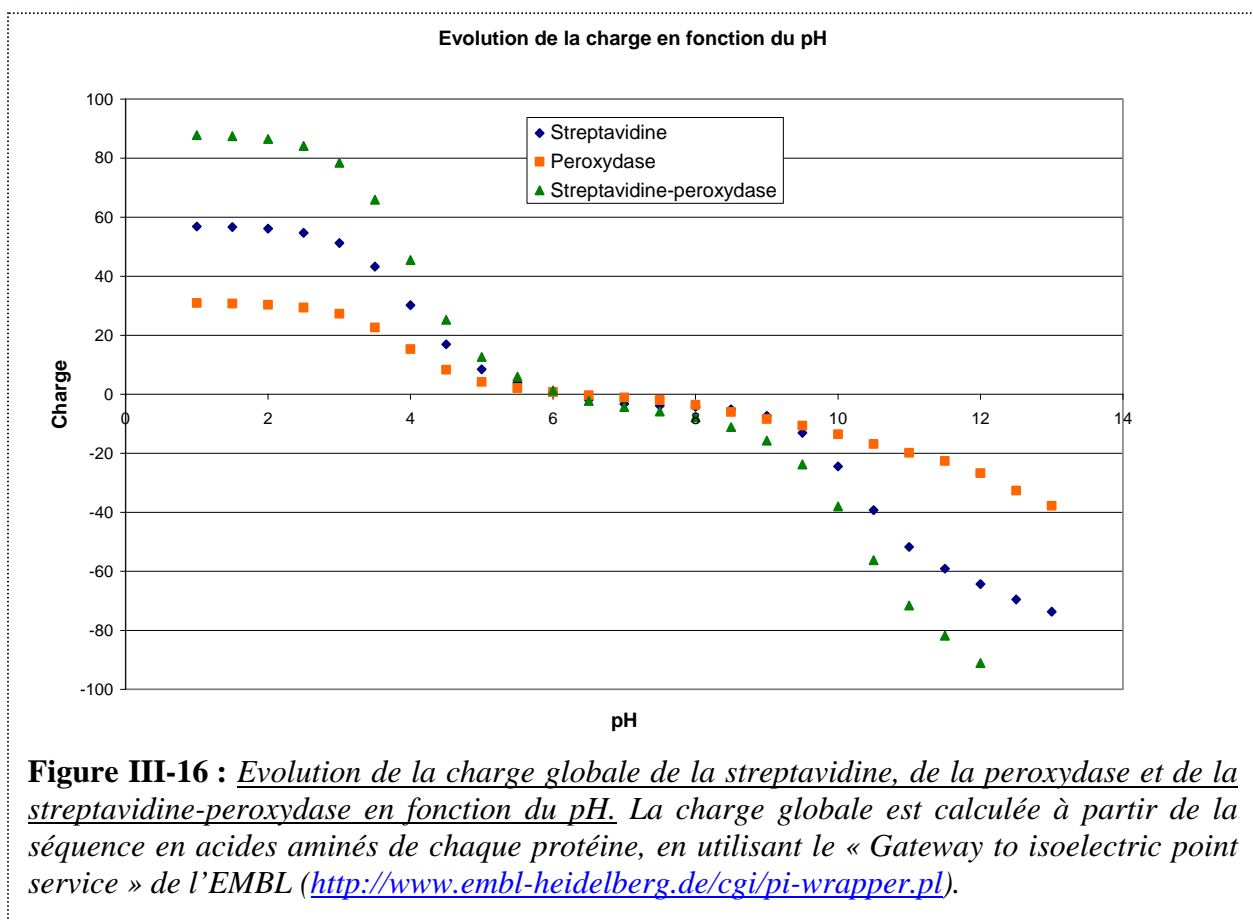
Milieu : 15 minutes après rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM ; ~40-45% des plots sont déjà partis de la surface.

Droite : 2 heures après rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM ; ~70-80% des plots sont partis de la surface.

AFM en milieu liquide ; scans : 4 μm x 4 μm ; échelle en Z : 3 nm.

Sur mica non prétraité, la mesure de la distance bout à bout moyenne des molécules d'ADN avec une streptavidine-peroxydase à chaque extrémité sur mica non prétraité donne un résultat semblable à celui de la streptavidine, sans différence significative avec la mesure sur l'ADN contrôle (**figure III-14**). Nous avons alors retenu la surface de mica prétraité nickel pour poursuivre la comparaison avec le comportement d'adsorption et de désorption de la streptavidine, et privilégié le travail en milieu liquide.

Nous avons d'abord testé l'accroche des plots streptavidine-peroxydase seuls sur cette surface, après avoir adsorbé la streptavidine-peroxydase en Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10mM NaCl 10 mM jusqu'à atteindre une densité satisfaisante sur la surface. Quelques minutes après le passage à Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM, environ 40-45% des plots sont déjà partis de la surface, et le décrochage des plots restants se poursuit au cours du temps, comme illustré en **figure III-15**. L'augmentation de la concentration en sel monovalent suffit donc à désorber les plots de la surface, ce qui est qualitativement comparable au comportement de la streptavidine.



Nous avons ensuite testé l'accroche de complexes 1440b-streptavidine peroxydase sur la surface de mica prétraité nickel par AFM en milieu liquide, pour comparer le comportement d'une extrémité libre et d'une extrémité liée à la streptavidine-peroxydase. Les conditions ioniques choisies font que l'ADN aide à amener la streptavidine-peroxydase sur la surface : le tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM correspond à des conditions de bonne adsorption de l'ADN. Nous observons cependant que les deux extrémités des molécules d'ADN (l'extrémité libre et l'extrémité liée à la streptavidine-peroxydase) restent complètement mobiles sur la surface. Ce résultat est comparable à celui obtenu avec la streptavidine.

La présence de la peroxydase (44 kDa), plus petite que la streptavidine (60 kDa), semble peu changer l'interaction de celle-ci avec la surface. Dans la zone de pH

physiologique (7-8), la streptavidine et la streptavidine-peroxydase ont aussi une charge proche, comme le montre la **figure III-16**. En supposant que comme pour l'ADN, les interactions avec la surface soient essentiellement d'origine électrostatique, cela pourrait aussi être un élément d'explication.

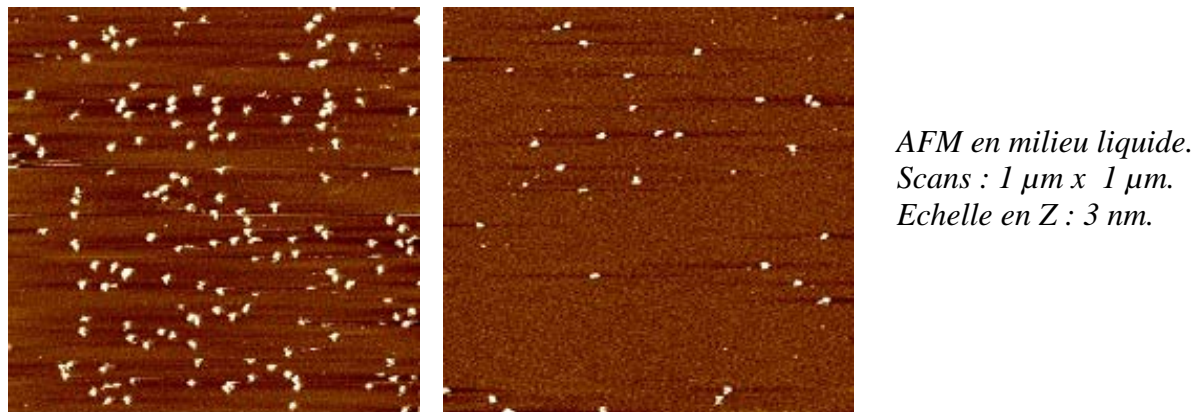
Cependant la charge calculée à partir de la séquence en acides aminés ne représente pas la charge réellement disponible pour interagir avec la surface : la charge n'est pas répartie uniformément le long de la chaîne d'acides aminés et le repliement tridimensionnel des protéines fait que certaines charges, situées vers l'intérieur de la structure, ne sont pas disponibles. De plus, la fixation à la surface peut changer la conformation de la protéine, et modifier la disponibilité de ses charges (72). L'analyse des interactions avec la surface s'avère ainsi encore plus complexe que pour l'ADN.

Plutôt que de tester d'autres composés associés à la streptavidine, nous avons alors préféré changer complètement de système et nous sommes passés aux anticorps anti-digoxygénine.

3. IgG anti-digoxygénine.

Cette idée s'inspire des travaux effectués avec les pinces magnétiques, où des extrémités d'ADN fonctionnalisées par la digoxygénine sont souvent utilisées pour attacher l'ADN à une surface de verre couverte d'anticorps anti-digoxygénine. Nous avons testé si l'interaction avec le mica est également assez forte pour ancrer les extrémités de l'ADN.

La difficulté à obtenir des complexes avec un anticorps à chaque extrémité de l'ADN a empêché la réalisation de mesures de distance bout à bout moyenne. Nous nous limitons pour ce système à présenter les résultats obtenus en milieu liquide dans le référentiel d'adsorption et de désorption de l'ADN sur mica prétraité nickel, en commençant par le cas des anticorps seuls.



*AFM en milieu liquide.
Scans : 1 μm x 1 μm .
Echelle en Z : 3 nm.*

Figure III-17 : Effet d'un rinçage Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM sur les plots IgG anti-digoxygénine adsorbés sur mica prétraité nickel.

Dépôt : [streptavidine-peroxydase] = 50 nM dans Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM.

Gauche : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM, quelques minutes après le dépôt ; ~110 plots / μm^2 .

Droite : 15 minutes après rinçage Tris 20 mM pH 7,5 NaCl 200 mM ; ~70-80% des plots sont partis de la surface.

En milieu liquide, après adsorption des anticorps en Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM, nous avons observé quelques minutes après le passage à Tris 10 mM pH 7,5

NaCl 200 mM qu'environ 70-80% des anticorps se sont décollés de la surface (**figure III-17**). Ainsi, l'augmentation de la concentration en NaCl décroche les molécules de la surface. Nous avons ensuite utilisé un ADN 1440d, complexé à une digoxygénine à une seule de ses extrémités et testé l'accroche directement en milieu liquide. Dans un tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM (c'est-à-dire des conditions de bonne adsorption de l'ADN), les deux extrémités des molécules - l'extrémité libre et l'extrémité digoxygénine complexée avec l'anticorps - sont mobiles sur la surface. Nous n'avons donc pas retenu ces anticorps pour ancrer les extrémités d'ADN sur le mica prétraité nickel.

4. ADN simple brin biotinylé.

L'idée de tester l'ADN simple brin pour ancrer l'ADN double brin à la surface se fonde sur le travail d'Allemand *et al* sur le peignage de l'ADN. Il y est indiqué que dans une situation où il y a une certaine dénaturation au niveau des extrémités de l'ADN double brin, celles-ci ont une affinité particulière pour les surfaces (73).

Nous avons donc testé l'utilisation de plots d'ADN simple brin pour ancrer les extrémités de l'ADN sur le mica, en commençant par des petits ADN simple brin linéaires biotinylés, sur mica non prétraité. Nous avons utilisé des fragments d'ADN simple brin de 50 bases, biotinylés en 5', dont la séquence (une suite répétée de CAA ACC) ne permet pas d'appariement intramoléculaire de type liaison Watson-Crick, afin de conférer à nos fragments une réactivité envers la surface a priori meilleure.

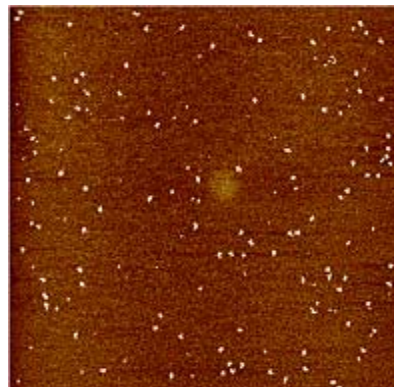
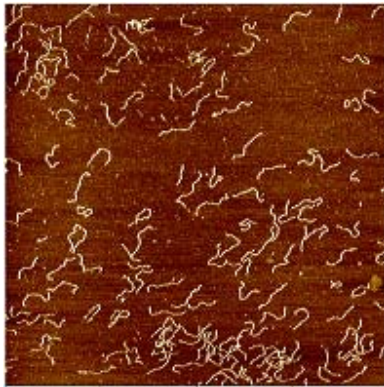
L'ADN simple brin est connu pour ne pas s'étaler sur les surfaces et rester sous forme globulaire. Les fragments d'acides nucléiques simple brin d'aussi petite taille apparaissent donc sous forme de petits globules sur la surface (74,75). Leur taille est comparable à celle des corpuscules parasites qui sont fréquemment observés sur la surface lors des expériences d'AFM, notamment en milieu liquide, ce qui les rend difficiles à identifier sans ambiguïté (75). Plutôt que de tester directement l'accroche sur les petits ADNs simple brin, nous avons voulu utiliser la streptavidine, de taille suffisante pour une visualisation et un comptage directs plus fiables des plots sur la surface.

4.1. Mica non prétraité nickel.

Comme montré en 1.1, l'accroche de la streptavidine sur le mica non prétraité ne résiste pas aux rinçages Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM. Si les petits fragments d'ADN simple brin biotinylés s'accrochaient bien sur le mica, ils seraient capables d'y retenir la streptavidine face à cette augmentation de la concentration en sel monovalent. Nous avons testé deux stratégies, en milieu liquide : injection de l'ADN simple brin dans la cellule liquide une heure avant l'injection de streptavidine, ou préincubation de l'ADN simple brin une heure avec la streptavidine avant l'injection du mélange dans la cellule liquide. Dans les deux cas nous n'avons pas clairement constaté une meilleure accroche de la streptavidine sur la surface en présence des ADNs simple brin par rapport aux expériences contrôle sans ADN simple brin (injection de la streptavidine seule), dans toute la gamme de conditions ioniques d'adsorption testée, en absence comme en présence de cations divalents. Nous avons alors décidé de travailler avec des ADNs simple brin de plus grande taille, faciles à visualiser sur la surface et a priori également susceptibles d'assurer une meilleure accroche.

Nous avons comparé par AFM à l'air le dépôt d'ADN de 1440 paires de bases et d'ADN de 1440 paires de bases dénaturé, dans les mêmes conditions de tampon et en présence de cations divalents (magnésium 5 mM), sur mica non prétraité. Les plots d'ADN simple brin sont suffisamment longs pour être faciles à identifier sans ambiguïté sur la surface et montrent une nette différence d'étalement par rapport à l'ADN double brin (**figure III-18**).

Mais nous n'avons pas mis en évidence de différence vis-à-vis de la désorption par le NaCl 200 mM de l'ADN non dénaturé et de l'ADN dénaturé.

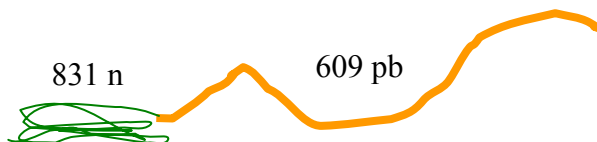


AFM à l'air.
Scans : 4 μm x 4 μm
Echelle en Z : 3 nm.

Figure III-18 : Différence d'étalement sur le mica entre l'ADN double brin et l'ADN simple brin. Longueur de l'ADN double brin : 1440 pb. Longueur de l'ADN simple brin : 1440 n. Mica non prétraité ; [MgCl₂] = 5 mM.

4.2. Mica prétraité nickel.

Nous avons aussi fait cette comparaison simple brin/double brin sur mica prétraité nickel en utilisant un ADN simple brin de 6400 nucléotides (M13) observé en milieu liquide. A basse concentration en sel monovalent (Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM NaCl 2 mM), l'ADN simple brin est adsorbé et bien visible sur la surface. Après passage en Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM, il devient peu ou pas visible. Qualitativement, ce comportement vis-à-vis de l'adsorption et de la désorption n'est pas différent de celui de l'ADN double brin.



AFM à l'air.
Scan : 250 x 500 nm.
Echelle en Z : 3 nm.

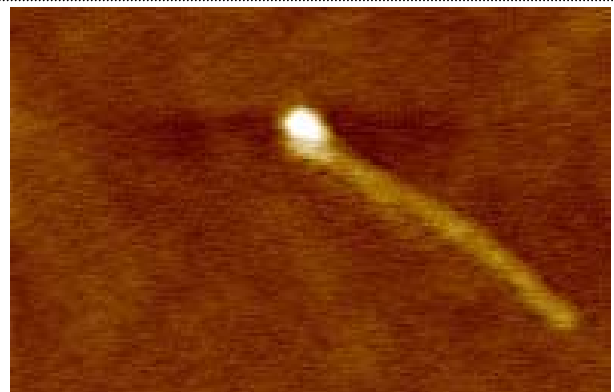


Figure III-19 : Construction hybride d'ADN simple et double brin observée en AFM à l'air.

Pour une comparaison directe nous avons étudié l'adsorption et la désorption d'une construction d'ADN hybride comportant une partie simple brin de 831 nucléotides et une partie double brin de 609 paires de bases, mise au point et préparée au laboratoire comme décrit dans (76) (**figure III-19**). Sur mica prétraité par des ions nickels, en AFM en milieu liquide, la partie double brin est capable de tourner autour de la partie simple brin, qui forme donc un plot d'ancrage, tant que l'on reste à basse concentration en sel monovalent (Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM) (**figure III-20**). Lorsque la concentration en sel monovalent est augmentée (Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM), le plot ne reste par contre pas mieux attaché à la surface que la partie double brin. Un ADN hybride avec une partie double brin centrale de 881 paires de bases et des extrémités simple brin de 279 et 285 nucléotides a ensuite été préparé au laboratoire (**figure III-21**). Les tests avec observation en milieu liquide

montrent sur certaines molécules une accroche plus forte par les extrémités, mais l'interaction pointe-surface pourrait ici être un paramètre crucial et au bout de quelques dizaines de secondes les extrémités perdent leur immobilité et la molécule se déplace sur la surface (**figure III-22**).

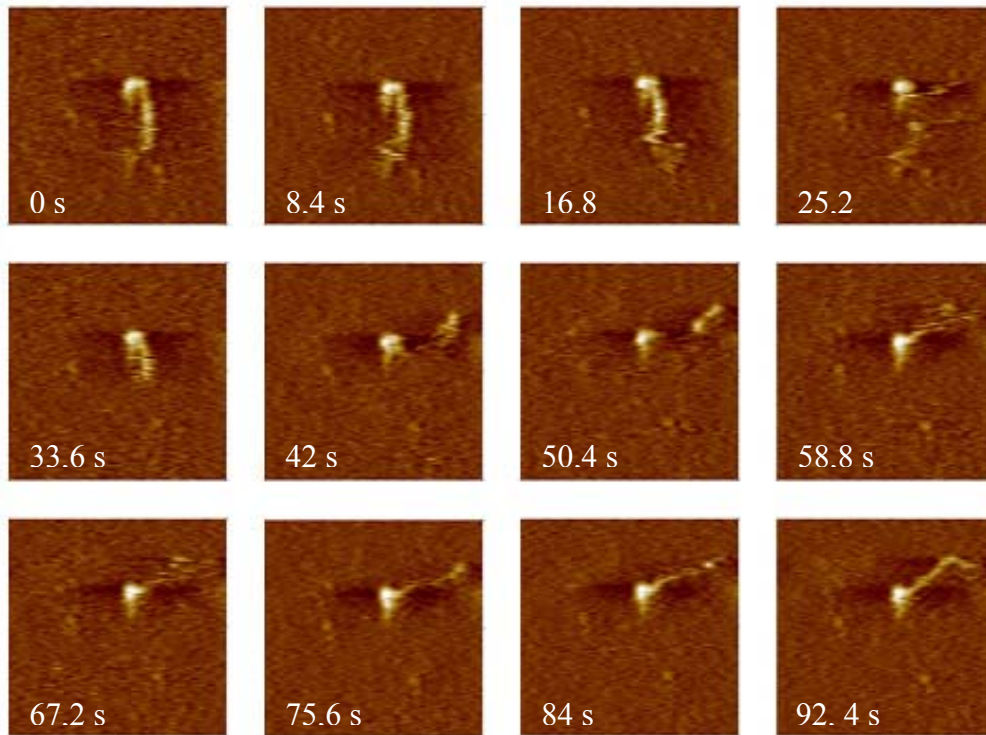
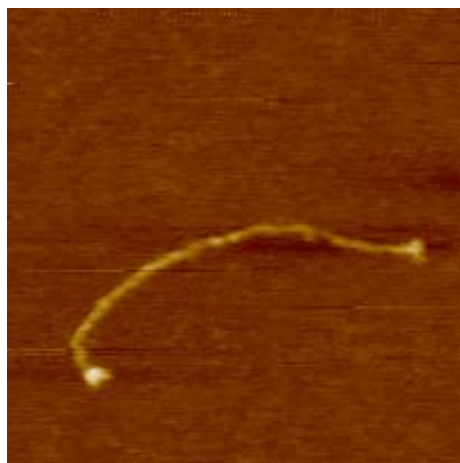


Figure III-20 : *Accroche différentielle sur le mica des parties simple brin et double brin d'une construction hybride. L'ADN double brin est beaucoup plus mobile sur la surface que la partie simple brin. AFM en milieu liquide ; une image toutes les 8,4 s ; scan : 500 nm x 500 nm ; échelle en Z : 5 nm.*



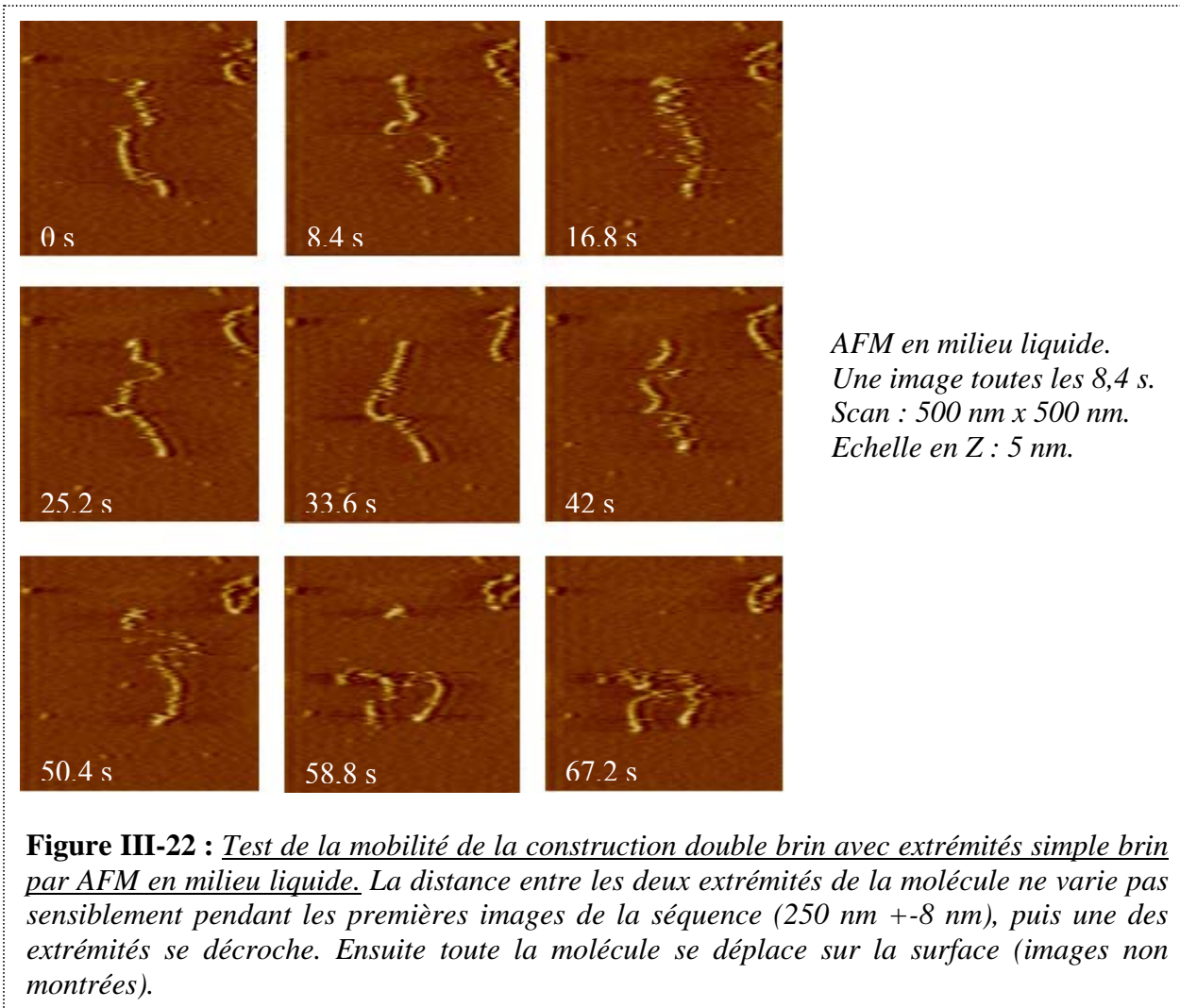
*Longueur de la partie double brin : 881 pb.
Longueur des extrémités simple brin : 279 et 285 n.*

*AFM à l'air.
Scan : 375 nm x 375 nm.
Echelle en Z : 5 nm.*

Figure III-21 : *Observation en AFM à l'air d'une construction hybride d'ADN double brin avec deux extrémités ADN simple brin.*

L'ancrage par l'ADN simple brin est donc possible mais il est limité aux conditions de bonne adsorption du référentiel de conditions établi pour l'ADN double brin. Il nécessite des longueurs d'ADN simple brin importantes et semble également très sensible à l'interaction

avec la pointe AFM lors du balayage en milieu liquide. Au vu de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que le mécanisme d'adsorption de l'ADN simple brin sur la surface est proche de celui de l'ADN double brin. La grande différence d'étalement et la haute densité (grande proximité) des points d'adsorption de l'ADN simple brin pourraient être les caractéristiques qui le rendent beaucoup moins mobile que l'ADN double brin sur la surface de mica.



5. Etiquette histidine biotinylée.

L'ion nickel Ni^{2+} est capable de se complexer fortement avec l'histidine ; cette propriété est utilisée notamment dans la purification de protéines recombinantes possédant une séquence d'acides aminés ajoutée riche en histidine appelée étiquette histidine. Il était donc légitime de vouloir mettre à profit l'interaction forte qui existe entre les ions nickel et l'acide aminé histidine.

Biotine---bras espaceur---HHHHHH---CONH₂

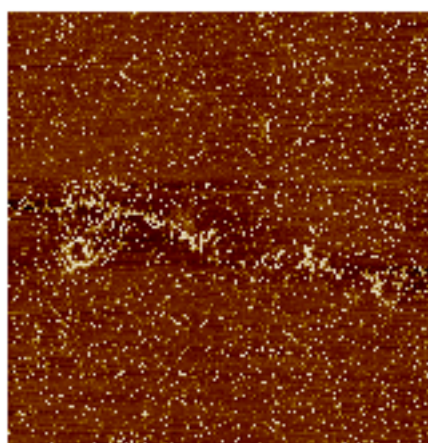
Figure III-23 : *Schéma de l'étiquette histidine.*

L'étiquette histidine a déjà été utilisée en imagerie AFM, pour immobiliser des anticorps sur une surface de mica prétraitée par des ions nickel (77). Pour ce faire un peptide

HWHHHP contenant donc quatre histidines a été ajouté à l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de l'anticorps. Ces anticorps sont laissés 10 minutes sur la surface d'un mica prétraité par des ions nickel (NiCl_2 1 mM pendant 1 minute, rinçage à l'eau, séchage). Après rinçage pour faire partir de la cellule liquide AFM les anticorps non adsorbés, la surface est observée par imagerie AFM en milieu liquide (tampon PBS). Les anticorps avec étiquette histidine ne sont pas déplacés sur la surface par la pointe AFM, tandis que dans l'expérience contrôle, les anticorps sans étiquette histidine sont déplacés. Nous avons vérifié la faisabilité au laboratoire sur une autre protéine (la topoisomérase VI) munie d'une étiquette histidine et constaté qu'elle s'accroche aussi fortement sur le mica. Ces données préliminaires nous ont incité à tester l'utilisation d'étiquettes histidine biotinylées pour réaliser l'ancrage des extrémités de l'ADN. Nous avons utilisé une étiquette histidine biotinylée, constituée d'un enchaînement de 6 histidines, d'un bras espaceur, et d'une biotine (figure III-23).

5.1. Tests de détection des étiquettes histidine sur la surface.

Nous avons d'abord étudié la fonctionnalisation de la surface de mica prétraité nickel par les étiquettes histidine. Un moyen de détection direct ou indirect des étiquettes histidine est nécessaire pour analyser leur densité sur la surface. Or les étiquettes histidine sont trop petites pour être visualisées directement par imagerie AFM. Nous avons envisagé des méthodes de détection indirectes de la présence des étiquettes histidine sur la surface de mica prétraité nickel.



AFM à l'air.
Scan : 4 x 4 μm .
Echelle en Z : 3 nm.

Figure III-24 : *Evolution de la densité de streptavidine sur la surface en fonction du prétraitement.* La concentration de streptavidine déposée est de 1 μM . Le tampon de dépôt est Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM. Au bout d'une minute les micas ont été rincés au Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 400 mM puis à l'eau.

Gauche : mica prétraité par des ions nickel (1 mM).

Droite : mica prétraité par des ions nickel (1 mM) puis des étiquettes histidine (100 nM).

Nous avons pensé initialement pouvoir révéler leur présence sur la surface à l'aide de streptavidine et pouvoir corréler la concentration en étiquette déposée avec la densité de streptavidine sur la surface. Dans ce but nous avons comparé par observation à l'air l'adsorption de la streptavidine sur des surfaces de mica prétraitées seulement par du nickel ou prétraitées par du nickel puis une solution d'étiquettes histidine, pour différentes concentrations en étiquettes (0,1 nM à 100 μM). Sur mica prétraité par le nickel et les étiquettes nous avons testé le dépôt en tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM d'une solution de streptavidine, à une concentration élevée (1 μM) pour augmenter la probabilité de

rencontre avec les étiquettes histidine biotinyllées sur la surface. Le rinçage par du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 400 mM laisse une densité de streptavidine sur la surface très importante, quelle que soit la concentration en étiquettes histidine utilisée, sans que les variations en densité de streptavidine sur la surface soient corrélées à la concentration en étiquettes histidine déposée. L'expérience contrôle sur mica prétraité seulement par le nickel montre que la densité de streptavidine est aussi très importante (**figure III-24**). Ces données suggèrent que l'accroche spécifique de la streptavidine sur les étiquettes histidine biotinyllées, si elle a bien lieu, est masquée par une adsorption non spécifique liée au traitement nickel de la surface. En milieu liquide aucune différence reproductible n'est mise en évidence pour l'adsorption et la désorption de la streptavidine entre les micas prétraités nickel puis étiquettes histidine et les micas prétraités seulement au nickel.

Une méthode optique d'estimation de la densité en étiquettes histidine sur la surface de mica a récemment été publiée par Pierres *et al* (78). Ils utilisent de la streptavidine conjuguée à un fluorophore pour estimer la densité de biotine accessible sur la surface, ou bien des étiquettes histidine couplées à un fluorophore, et la microscopie confocale. Ce travail confirme l'existence d'une accroche non spécifique de la streptavidine sur le mica prétraité par des ions nickel. De plus, la densité en étiquettes histidine biotinyllées sur la surface estimée par cette méthode varie de manière très non linéaire avec la concentration déposée, et des variations jusqu'à environ 30% sont observées en répétant l'expérience à une concentration donnée.

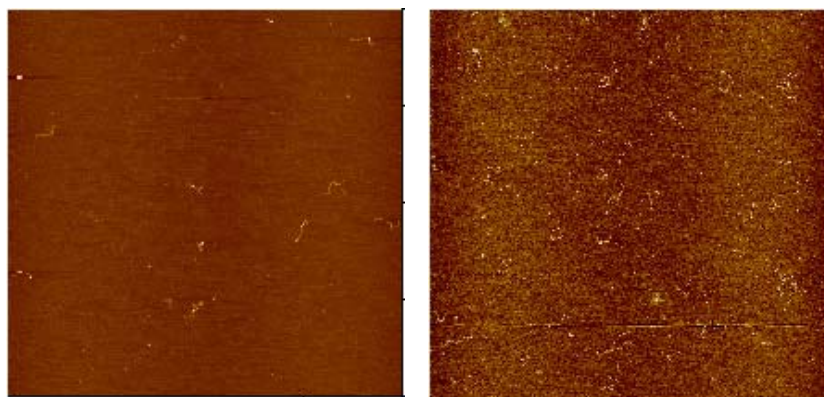
5.2. Tests d'adsorption et de désorption de l'ADN et des complexes ADN-streptavidine.

Puisque nous ne connaissons pas la densité effective d'étiquettes histidine sur la surface dans nos conditions de dépôt, nous avons effectué la suite des observations en continuant à tester une large gamme de concentrations en étiquettes histidine pour traiter la surface. Nous avons d'abord testé l'adsorption et la désorption de l'ADN seul, puis l'adsorption et la désorption de l'ADN complexé à la streptavidine.

En comparant par observation à l'air l'adsorption d'ADN biotinyllé seul (non complexé à la streptavidine) sur les micas traités par le nickel, avec ou sans traitement par les étiquettes histidine, nous n'obtenons pas de différences bien reproductibles en termes de densité sur la surface. Cependant, aux concentrations en étiquettes histidine dans la gamme 0,1-10 nM, l'ADN apparaît moins bien étalé sur la surface que dans la gamme 100 nM-100 μ M.

Nous nous sommes limités à cette gamme de concentrations en étiquettes histidine (100 nM – 100 μ M) pour tester l'adsorption des complexes ADN-streptavidine. Le complexe ADN-streptavidine est déposé sur les surfaces traitées par le nickel et/ou les étiquettes histidine dans un tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM ; la surface est rincée à l'eau et séchée au bout d'une minute puis observée à l'air. Dans l'expérience contrôle sans prétraitement nickel avant le traitement par les étiquettes histidine, il n'y a quasiment pas d'ADN sur la surface, tandis qu'un différentiel positif de concentration des complexes ADN biotinyllé-streptavidine entre les micas prétraités nickel puis histidine et les micas prétraités nickel est observé (**figure III-25**) Ceci suggère une meilleure adsorption de l'ADN sur le mica traité par nickel puis étiquettes histidine ; cependant l'observation en milieu liquide ne confirme pas de manière reproductible cette différence d'adsorption. Le comportement des complexes vis-à-vis de la désorption (augmentation de la concentration en sel monovalent à Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM) sur mica prétraité nickel et mica prétraité nickel puis étiquettes n'est pas non plus clairement différent en milieu liquide. Dans nos expériences, les interactions spécifiques entre la streptavidine et la biotine des étiquettes sont donc

vraisemblablement masquées par des interactions non spécifiques streptavidine-surface et ADN-surface assez variables.



AFM à l'air.
Scans : $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$.
Echelle en Z : 3 nm.

Figure III-25 : Complexes ADN-streptavidine sur surface de mica prétraité nickel sans ou avec traitement étiquettes histidine. La densité de complexes sur la surface est environ 3 fois plus grande sur le mica traité nickel et étiquettes histidine.

Gauche : mica prétraité nickel 1 mM ; complexe b1440-streptavidine ~ 1 nM ; tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM.

Droite : mica prétraité nickel 1 mM puis étiquettes histidine 10 μM ; complexe b1440-streptavidine ~ 1 nM ; tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM.

6. BSA biotinylée.

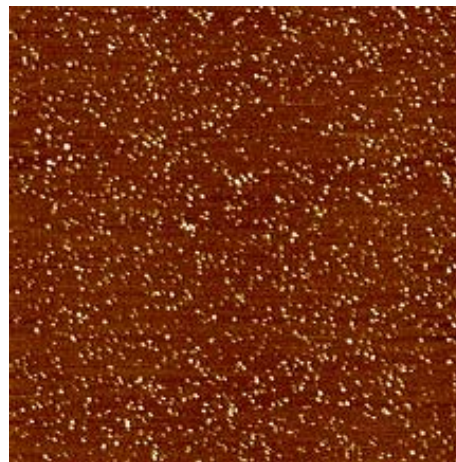
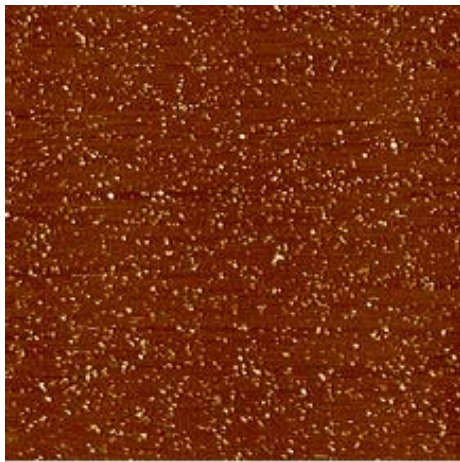
L'albumine de sérum bovin (BSA pour *Bovine Serum Albumin*) est une protéine ayant un rôle de transporteur dans le sang, capable de se lier à de très nombreux éléments circulants, en particulier des éléments protéiques. En raison de ces propriétés de fixation non spécifique elle est aussi utilisée en biochimie, notamment pour passer les parois des tubes de réaction en s'y collant à la place des protéines d'intérêt. En AFM elle est souvent utilisée pour fonctionnaliser les pointes en nitrure de silicium, en particulier dans les expériences de mesure de forces entre la biotine et la streptavidine (79). Le lecteur intéressé par une présentation plus générale de la BSA consultera par exemple la référence (80). Nous avons pensé que les propriétés d'adhésion de cette protéine sur le mica seraient aussi assez bonnes et avons donc testé la possibilité de réaliser l'ancrage à l'aide de plots de BSA biotinylée.

6.1. Plots seuls.

Nous avons d'abord vérifié la robustesse de l'adsorption de la BSA vis-à-vis des changements de conditions ioniques de la solution nécessaires pour moduler l'adsorption de l'ADN. Sur mica prétraité nickel, l'observation en milieu liquide montre qu'après une adsorption en Tris 10 mM pH 7,5 MgCl_2 10 mM NaCl 10 mM, la BSA reste bien accrochée à la surface après le passage en Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM. Typiquement au moins 85% des molécules résistent au rinçage par ce tampon (figure III-26).

Dans une étude sur la mesure de l'adhésion de protéines sur des monocouches autoassemblées (*Self-Assembled Monolayers* ou SAMs) sur substrat d'or, c'est sur les composés terminés par des OH que la BSA a la force d'adhésion la plus forte (81). Or la surface de mica comprend de nombreux groupes silanols Si-OH ; ce pourrait être un des points impliqués dans son interaction particulière avec le mica. D'autre part la BSA peut former des adduits covalents avec des métaux variés, dont le Ni^{2+} (80). Ce pourrait être impliqué dans la bonne adsorption de la BSA sur le mica prétraité par des ions nickel.

C'est la seule des molécules testées qui résiste au test de désorption par le NaCl sur cette surface ; il est donc très intéressant d'explorer l'utilisation de ce système pour les plots d'ancrage de l'ADN.



*AFM en milieu liquide.
Scans : 4 μm x 4 μm .
Echelle en Z : 5 nm.*

Figure III-26 : *Test de l'accroche de la BSA sur mica prétraité nickel.* Plus de 85 % des molécules de BSA sont restées sur la surface malgré le rinçage par la solution de Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM.

Gauche : Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM.

Droite : Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM.

6.2. Tests d'ancrage avec la BSA préadsorbée sur la surface.

Nous avons d'abord étudié les moyens d'attacher les molécules d'ADN par leurs extrémités aux plots de BSA biotinylée préadsorbés sur la surface, à l'aide du complexe biotine-streptavidine. Nous avons testé deux approches :

- adsorption de la BSA sur la surface, puis ajout de la streptavidine, puis ajout de l'ADN biotinylé (a)
- adsorption de la BSA, puis ajout des complexes ADN-streptavidine (b)

(a) On adsorbe d'abord la BSA sur la surface, jusqu'à atteindre une densité en plots satisfaisante. Une fois cette densité atteinte un rinçage est effectué avec le tampon de dépôt de la BSA pour emmener les protéines non encore adsorbées et ainsi arrêter l'adsorption. La streptavidine est alors injectée, à concentration élevée afin de favoriser la rencontre avec les plots de BSA sur la surface. L'étape suivante consiste en un rinçage par du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM afin d'éliminer de la surface la streptavidine adsorbée non complexée à la BSA biotinylée.

Ce rinçage fonctionne correctement sur mica non prétraité. L'ADN biotinylé aux deux extrémités (b1440b) est ensuite ajouté en excès ; le tampon (Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM) contient des cations divalents pour amener l'ADN sur la surface. Une nouvelle étape de rinçage par du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM permet finalement de faire partir de la surface l'ADN biotinylé non ancré aux plots de BSA+ streptavidine. Au cours des essais de ce procédé, quelques molécules semblant attachées entre deux plots ont été visualisées mais elles sont difficiles à observer en raison de la grande mobilité de l'ADN sur le mica non prétraité. Le rendement en molécules avec une BSA à chaque extrémité ne peut pas être évalué avec précision car la streptavidine et le complexe BSA-streptavidine aux extrémités de l'ADN ont des tailles très proches (voir 6.3 et [figure III-28](#)).

Sur mica prétraité nickel, le rinçage par du Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM après l'injection de streptavidine ne permet pas de faire suffisamment partir de la surface l'excès de streptavidine non complexé à la BSA et ce protocole ne peut donc pas être appliqué.

(b) Afin d'éviter cette étape de rinçage de l'excès de streptavidine, nous avons envisagé d'adsorber seulement la BSA sur la surface, et d'ajouter ensuite le complexe ADN-streptavidine préformé et purifié.

Cette approche a d'abord été testée à l'air sur mica non prétraité, en préadsorbant la BSA sur la surface, et en ajoutant ensuite le complexe streptavidine-ADN biotinylé aux extrémités purifié sur tamis moléculaire. Après adsorption du complexe pendant 10 minutes en présence de cations divalents, le mélange sur la surface est dilué dans un tampon à force ionique élevée en sel monovalent (Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 100 mM) pour arrêter l'adsorption et faire partir de la surface les complexes ADN-streptavidine qui ne se sont pas liés à la BSA biotinylée. Au bout de 30 minutes le tampon est capté à l'aide d'un papier filtre et le mica est rincé par quelques gouttes d'acétate d'uranyle, séché puis observé à l'air. Nous constatons que les molécules d'ADN qui restent sur la surface sont bien liées à des plots de BSA (**figure III-27**). La BSA biotinylée commerciale utilisée est multibiotinylée : en moyenne, d'après le fournisseur, chaque protéine comporte, selon le lot utilisé, entre 10 et 16 biotines, ce qui explique que de tels associations puissent se former sur la surface. Les propriétés de diffusion et d'adsorption des complexes ADN-streptavidine sont différentes sur la surface de mica prétraité nickel, mais ce problème lié à la BSA multibiotinylée y intervient aussi.

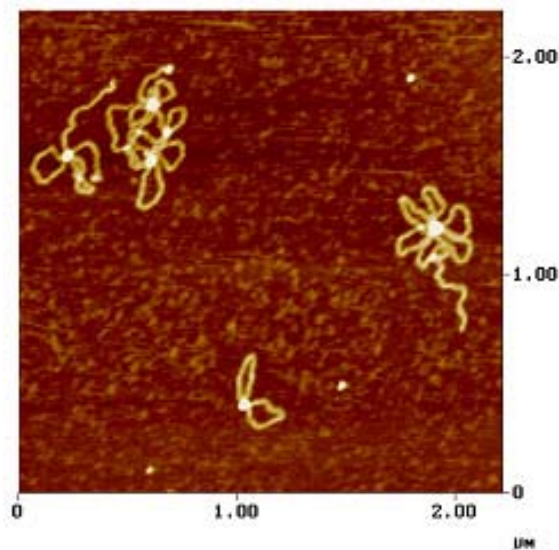


Figure III-27 : Accroche des extrémités ADN-streptavidine à la BSA biotinylée préadsorbée sur la surface : formation de multimères refermés. AFM à l'air ; échelle en Z : 3 nm.

Dans l'exemple illustré ici, la BSA (concentration de dépôt : 100 nM, tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM) a été préadsorbée pendant 4 minutes sur la surface. Le complexe ADN-streptavidine purifié a ensuite été ajouté (concentration ~ 1 ng/ μ L, tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 5 mM) et laissé à adsorber pendant 10 minutes. ~ 50 μ L de Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 100 mM ont alors été ajoutés. Au bout de 30 minutes le tampon a été capté à l'aide d'un papier filtre, le mica rincé par quelques gouttes d'acétate d'uranyle puis séché.

6.3. Tests d'ancrage des complexes ADN-streptavidine-BSA préformés.

Les difficultés expérimentales rencontrées dans l'ancrage des complexes ADN-streptavidine aux plots de BSA préadsorbés sur la surface nous ont conduit à envisager une autre méthode.

Afin d'éviter au maximum la formation de multimères comme en (b), deux étapes de purification sont mises en place. La première purification suit l'étape habituelle de préparation du complexe ADN biotinylé-streptavidine. Ensuite le complexe ADN biotinylé-streptavidine purifié est mis en présence d'un excès de BSA biotinylée ; après un temps de réaction de 15 minutes le mélange est passé sur colonne superose 6B (Amersham) pour éliminer l'excès de BSA n'ayant pas réagi.

Le dépôt sur mica prétraité nickel de la solution d'ADN issue de cette seconde purification donne un très mauvais étalement de l'ADN sur la surface lorsqu'on travaille à concentration élevée en BSA ($\sim 1 \mu\text{M}$). Ce problème pourrait être lié à un phénomène d'agrégation de la BSA ; la formation d'agrégats solubles est en effet décrite dans la littérature (références dans (80)). A des concentrations plus basses de BSA (gamme 1-100 nM), la difficulté est d'être sûr que la BSA est bien présente aux extrémités des molécules d'ADN. En effet, d'après nos observations, la taille du complexe streptavidine-BSA apparaît avec une taille souvent très proche de la taille de la streptavidine (**figure III-28**). Il est donc généralement impossible de conclure sur la présence de BSA aux extrémités par la simple observation des images AFM observées à l'air ou en milieu liquide.

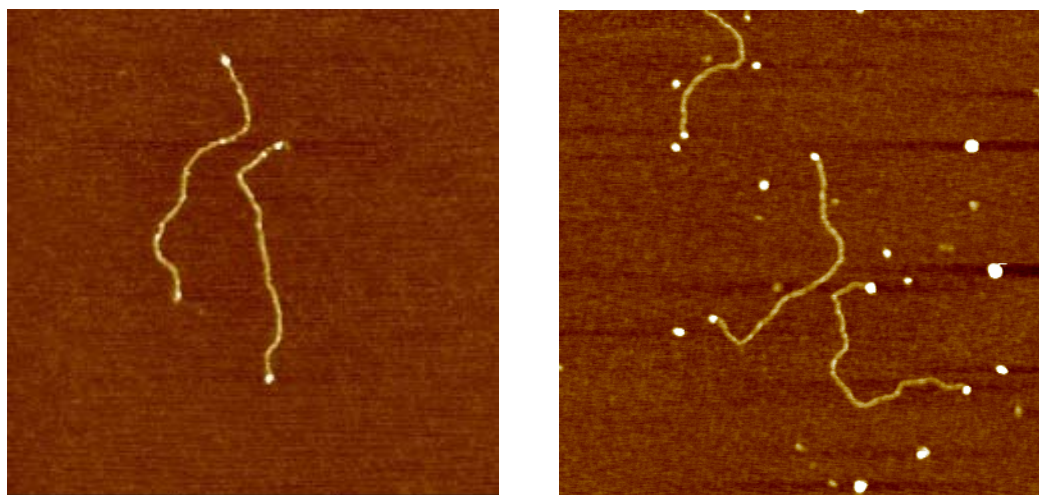


Figure III-28 : Complexes aux extrémités avec la streptavidine seule ou avec la BSA : les tailles des globules aux extrémités sont souvent peu différentes.

Gauche : complexes ADN-streptavidine ; droite : complexes ADN-streptavidine-BSA. AFM à l'air ; scan : 750 nm x 750 nm ; échelle en Z : 3 nm.

Plutôt que de travailler en grand excès de BSA pour faire les complexes avec l'ADN-streptavidine, nous avons alors cherché à travailler sans purification après la réaction avec la BSA. Nous avons mis au point une méthode indirecte pour conclure à la présence de BSA aux extrémités du complexe ADN-streptavidine, qui consiste à examiner l'évolution du taux de circularisation des complexes ADN-streptavidine à différentes concentrations de BSA. La microscopie électronique à transmission permet pour différents mélanges du complexe ADN-streptavidine, avec la BSA ajoutée à différentes concentrations, de quantifier assez rapidement le pourcentage de molécules linéaires et de molécules circularisées pour chacun des mélanges.

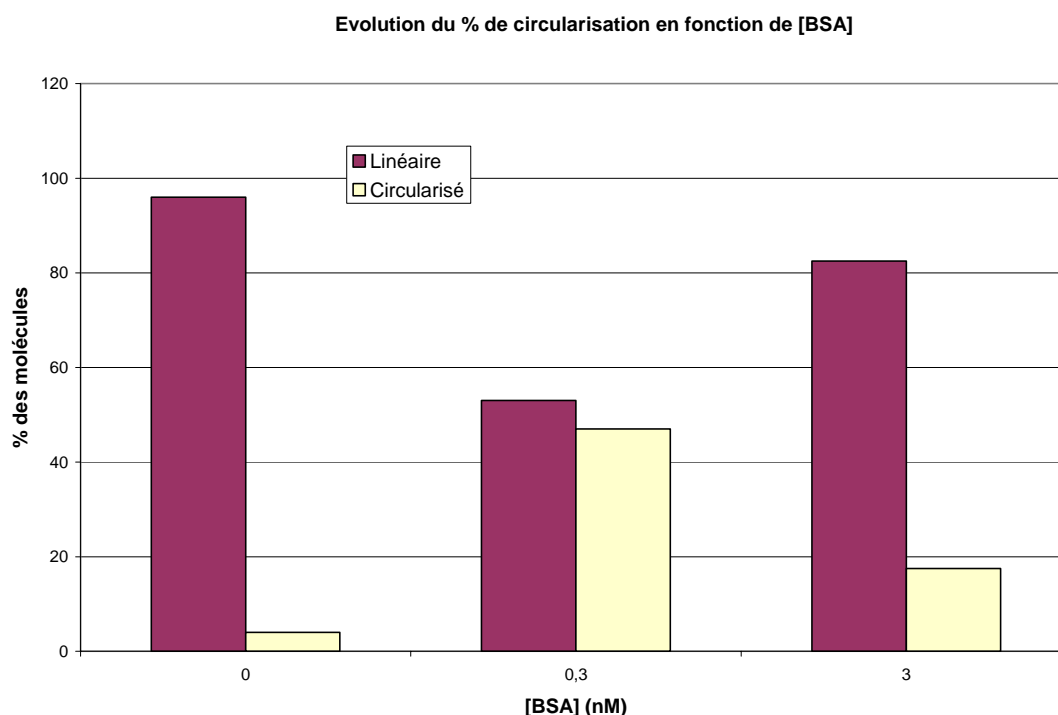


Figure III-29 : *Préparation des complexes avec la BSA : détermination d'une concentration en BSA suffisante pour obtenir une majorité de complexes non refermés. Pour une concentration en complexes ADN-streptavidine d'environ 1 nM, la concentration en BSA de 3 nM est bien adaptée. La concentration de 3 nM est aussi suffisamment basse pour qu'il ne soit pas nécessaire de purifier le mélange réactionnel. Notons que quelques molécules d'ADN (~5%) sont déjà refermées par la streptavidine en l'absence de BSA.*

Ceci nous a permis indirectement de déterminer une concentration de BSA à laquelle une majorité des molécules possède une BSA à chacune de ses extrémités. En l'absence d'étape de purification il est nécessaire de ne pas dépasser quelques nM de concentration en BSA sinon la surface des grilles (ou du mica) présente une couverture en BSA trop grande. Dans le cas de l'expérience présentée ici, où la concentration en complexes ADN-streptavidine est estimée être d'environ 1 nM, la concentration en BSA de 3 nM est bien adaptée (**figure III-29**) : plus de 80% des molécules d'ADN portent une BSA à chaque extrémité. Ces conditions de référence permettent :

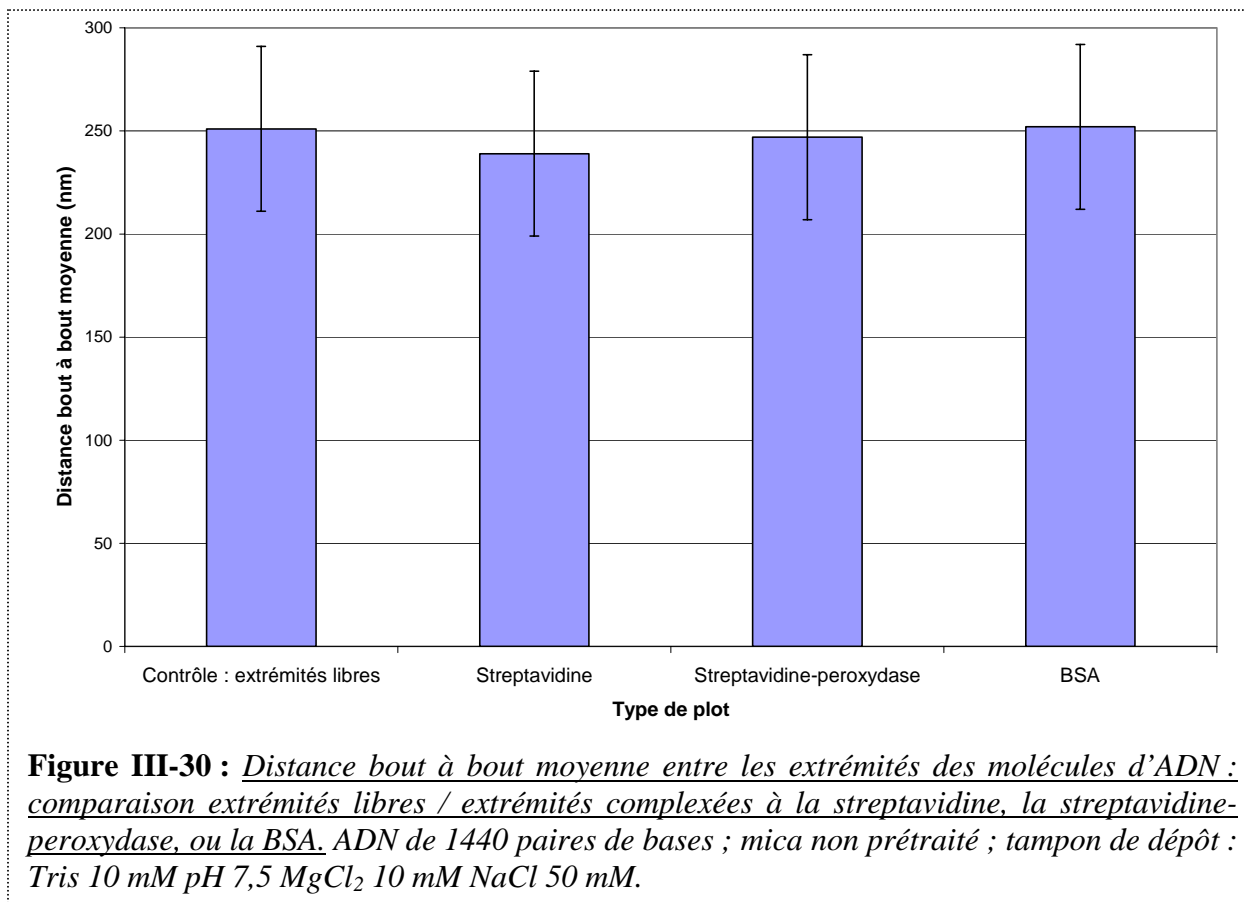
- d'éviter la formation de multimères (plusieurs molécules d'ADN reliées à la même molécule de BSA)
- d'être sûr de la présence d'une molécule de BSA à chaque extrémité de la grande majorité des molécules d'ADN.

Sur mica non prétraité, la mesure de distance bout à bout moyenne pour les molécules d'ADN avec une BSA à chaque extrémité donne un résultat semblable à celui obtenu pour la streptavidine et la streptavidine-peroxydase : pas de différence significative avec le contrôle (**figure III-30**). Cela donne du poids à l'hypothèse que ce soient les interactions ADN-surface médiées par les cations qui dominent et qu'on ne soit pas suffisamment sensible à ce qui se passe aux extrémités. L'effet de la protéine liée aux extrémités serait peut-être plus sensible en utilisant un ADN plus court, ce qui n'a pas été testé.

Ce protocole de préparation des complexes ADN-streptavidine-BSA a ensuite été utilisé pour des tests en milieu liquide. Nos observations sur mica prétraité nickel sur les complexes avec une BSA à chaque extrémité en tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM

NaCl 10 mM montrent en général une mobilité des deux extrémités de l'ADN. L'ouverture des quelques complexes circularisés par la BSA présents sur la surface parmi les nombreux complexes non circularisés suggère même que l'interaction de la BSA avec la pointe AFM a tendance à défaire les plots de BSA.

Les mêmes conditions de concentration en complexe ADN-streptavidine et en BSA ont été retenues pour la préparation de complexes avec une BSA à une seule extrémité. Les tests en milieu liquide pour comparer la mobilité d'une extrémité libre d'ADN et d'une extrémité liée à la BSA, vont dans le même sens puisque les deux extrémités des molécules (extrémité libre, extrémité liée à la BSA) restent majoritairement mobiles sur la surface, même dans des conditions de bonne adsorption de l'ADN (Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM).



Conclusion

Parmi les différents systèmes de plots que nous avons étudiés, l'utilisation de BSA biotinylée est l'option qui s'avère la plus favorable à un ancrage des extrémités de l'ADN sur le mica, même si la maîtrise du système en milieu liquide pose encore des problèmes.

Dans l'approche finalement retenue pour la préparation des complexes ADN-streptavidine-BSA qui consiste à les préformer avant l'adsorption sur la surface, nous envisageons d'utiliser des systèmes de ligands intercalateurs dont la fixation à l'ADN est réversible, afin d'obtenir des molécules d'ADN assez tendues lors de l'adsorption des complexes sur la surface. L'utilisation de bromure d'éthidium pourrait par exemple être testée, car sa liaison à l'ADN est réversible en présence de magnésium. Les autres méthodes habituellement utilisées pour étendre des molécules d'ADN, récapitulées par exemple dans (2), utilisent des propriétés d'écoulement et/ou de séchage des fluides que nous ne pouvons pas actuellement mettre en œuvre dans la cellule liquide AFM.

Les propriétés dynamiques des molécules d'ADN peuvent être modifiées à cause de l'ancrage des extrémités à la surface. C'est difficile à caractériser au stade d'avancement actuel de ce travail, mais un autre groupe a commencé à examiner cette question, avec une autre stratégie d'ancrage, sur une autre surface et avec un dispositif d'observation optique. Dans cette étude (82) les molécules d'ADN sont attachées à une surface de verre couverte de polystyrène par un procédé dérivé du peignage moléculaire. Il y est établi que la proximité des molécules d'ADN à une surface rigide et leur ancrage par les extrémités n'altère pas significativement la dynamique de leurs fluctuations transverses. Ceci indique que notre stratégie d'ancrage de l'ADN par les extrémités pourrait bien effectivement maintenir une liberté de mouvement de l'ADN entre les deux plots.

Conclusion générale du chapitre

Dans ce chapitre nous avons rappelé les problématiques de l'étalement de l'ADN sur le mica et de l'étude des interactions ADN-protéines par AFM, et les méthodes de préparation des échantillons utilisées. Nous avons retenu pour nos travaux la méthode des cations divalents, dans laquelle l'ADN est adsorbé sur la surface du mica grâce à des interactions électrostatiques médiées par les cations divalents. Au début de ce travail de thèse, cette approche était encore utilisée de manière empirique. C'est pourquoi la compréhension et la maîtrise de l'interaction ADN-surface ont été au cœur du travail réalisé.

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis d'expliquer semi-quantitativement le rôle des cations divalents et monovalents et du prétraitement du mica par le nickel dans l'interaction ADN-surface. Les modèles électrostatiques simples proposés sont en bonne correspondance avec les observations expérimentales. D'après notre modèle, la force d'adsorption de l'ADN sur la surface est proportionnelle au rapport $[Mg^{2+}]/[Na^+]^2$; elle peut être gardée constante même à force ionique élevée à condition d'augmenter dans le bon rapport la concentration en cations divalents. L'utilisation de mica prétraité nickel favorise l'adsorption de l'ADN et permet de garder les molécules proches de la surface même à haute force ionique.

Nous avons ensuite utilisé ce référentiel de conditions ioniques pour chercher un système d'ancrage des extrémités de l'ADN sur le mica entre deux plots distants. Parmi les différents systèmes testés, et même s'il reste des difficultés expérimentales, l'utilisation de BSA biotinyllée associée aux extrémités de l'ADN par l'intermédiaire de streptavidine est la voie la plus favorable. Associé au contrôle de la force d'adsorption de l'ADN sur le mica, le système de plots distants est destiné à étudier en milieu liquide le comportement dynamique de protéines le long de l'ADN, dans des conditions ioniques variées.

Il est en effet essentiel de pouvoir étudier les complexes ADN-protéines dans des conditions les plus variées possibles, à la fois parce que l'assemblage et le désassemblage entre les protéines et l'ADN dépend des conditions ioniques, et parce que les conditions d'adsorption sur la surface sont susceptibles d'avoir un effet sur l'interaction entre l'ADN et les ligands.

Bibliographie du chapitre 3.

1. Boichot, S. 2000. Immobilisation de molécules d'ADN sur mica pour leur étude en microscopie à force atomique. Application à l'analyse des modifications induites par un rayonnement ionisant. Thèse de doctorat de l'Université de Franche-Comté.
2. Liu, Z., Z. Li, H. Zhou, G. Wei, Y. Song, and L. Wang. 2005. Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid. *Microsc Res Tech* 66:179-185.
3. Dorel, S. 2000. Nanostructuration de la muscovite : une étude par diffraction d'électrons lents en mode oscillant. Thèse de doctorat de l'Université de Paris Sud-Orsay:116-118.
4. Pashley, R. M. and J. N. Israelachvili. 1984. DLVO and hybridation forces between mica surfaces in Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} chloride solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 97:446-455.
5. Dubochet, J., M. Ducommun, M. Zollinger, and E. Kellenberger. 1971. A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *J Ultrastruct Res* 35:147-167.
6. Joanicot, M. and B. Revet. 1987. DNA conformational studies from electron microscopy. I. Excluded volume effect and structure dimensionality. *Biopolymers* 26:315-326.
7. Muzard, G., B. Théveny, and B. Revet. 1990. Electron microscopy mapping of pBR322 DNA curvature. Comparison with theoretical models. *EMBO J* 9:1289-1298.
8. Théveny, B., D. Coulaud, M. Le Bret, and B. Revet. 1988. Local Variations of Curvature and Flexibility along DNA Molecules Analyzed from Electron Micrographs. In *Structure and Expression*. M. Sundaralingam, editor. Adenine Press.
9. Vesenka, J., M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delain, and C. Bustamante. 1992. Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. *Ultramicroscopy* 42-44 (Pt B):1243-1249.
10. Bezanilla, M., S. Manne, D. E. Laney, Y. L. Lyubchenko, and H. G. Hansma. 1995. Adsorption of DNA to mica, silylated mica, and minerals: characterization by atomic force microscopy. *Langmuir* 11:655-659.
11. Hansma, H. G. and D. E. Laney. 1996. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 70:1933-1939.
12. Rivetti, C., M. Guthold, and C. Bustamante. 1996. Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* 264:919-932.
13. Frontali, C., E. Dore, A. Ferrauto, E. Gratton, A. Bettini, M. R. Pozzan, and E. Valdevit. 1979. An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs. *Biopolymers* 18:1353-1373.

14. Frontali, C. 1988. Excluded-volume effect on the bidimensional conformation of DNA molecules adsorbed to protein films. *Biopolymers* 27:1329-1331.
15. Scipioni, A., C. Anselmi, G. Zuccheri, B. Samori, and P. De Santis. 2002. Sequence-dependent DNA curvature and flexibility from scanning force microscopy images. *Biophys. J.* 83:2408-2418.
16. Zuccheri, G., A. Scipioni, V. Cavaliere, G. Gargiulo, P. De Santis, and B. Samori. 2001. Mapping the intrinsic curvature and flexibility along the DNA chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3074-3079.
17. Bezanilla, M., B. Drake, E. Nudler, M. Kashlev, P. K. Hansma, and H. G. Hansma. 1994. Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope. *Biophys J* 67:2454-2459.
18. Guthold, M., X. Zhu, C. Rivetti, G. Yang, N. H. Thomson, S. Kasas, H. G. Hansma, B. Smith, P. K. Hansma, and C. Bustamante. 1999. Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biophys. J.* 77:2284-2294.
19. Lyubchenko, Y. L., B. L. Jacobs, S. M. Lindsay, and A. Stasiak. 1995. Atomic force microscopy of nucleoprotein complexes. *Scanning Microsc* 9:705-724.
20. Janicijevic, A., D. Ristic, and C. Wyman. 2003. The molecular machines of DNA repair: scanning force microscopy analysis of their architecture. *J Microsc* 212:264-272.
21. Dame, R. T., C. Wyman, and N. Goosen. 2003. Insights into the regulation of transcription by scanning force microscopy. *J Microsc* 212:244-253.
22. Tseng, Y. D., H. Ge, X. Wang, J. M. Edwardson, M. J. Waring, W. J. Fitzgerald, and R. M. Henderson. 2005. Atomic force microscopy study of the structural effects induced by echinomycin binding to DNA. *J Mol Biol* 345:745-758.
23. Berge, T., E. L. Haken, M. J. Waring, and R. M. Henderson. 2003. The binding mode of the DNA bisintercalator luzopectin investigated using atomic force microscopy. *J Struct Biol* 142:241-246.
24. Berge, T., N. S. Jenkins, R. B. Hopkirk, M. J. Waring, J. M. Edwardson, and R. M. Henderson. 2002. Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 30:2980-2986.
25. Martin, A. L., M. C. Davies, B. J. Rackstraw, C. J. Roberts, S. Stolnik, S. J. Tendler, and P. M. Williams. 2000. Observation of DNA-polymer condensate formation in real time at a molecular level. *FEBS Lett* 480:106-112.

26. Pope, L., M. Davies, C. Laughton, C. Roberts, S. Tendler, and P. Williams. 1999. Intercalation-induced changes in DNA supercoiling observed in real-time by atomic force microscopy. *Anal. Chim. Acta* 400:27-32.
27. Guthold, M., M. Bezanilla, D. A. Erie, B. Jenkins, H. G. Hansma, and C. Bustamante. 1994. Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12927-12931.
28. Kasas, S., N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev, and P. K. Hansma. 1997. Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry* 36:461-468.
29. van Noort, S. J., K. O. van der Werf, A. P. Eker, C. Wyman, B. G. de Groot, N. F. van Hulst, and J. Greve. 1998. Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope. *Biophys J* 74:2840-2849.
30. Baumgarth, B., F. W. Bartels, D. Anselmetti, A. Becker, and R. Ros. 2005. Detailed studies of the binding mechanism of the Sinorhizobium meliloti transcriptional activator ExpG to DNA. *Microbiology* 151:259-268.
31. Jiao, Y., D. I. Cherny, G. Heim, T. M. Jovin, and T. E. Schaffer. 2001. Dynamic interactions of p53 with DNA in solution by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* 314:233-243.
32. Hansma, P., J. Cleveland, M. Radmacher, D. Walters, P. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. Hansma, C. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V. Elings. 1994. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters* 64:1738.
33. Abdelhady, H. G., S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. Tendler, and P. M. Williams. 2003. Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I. *Nucleic Acids Res* 31:4001-4005.
34. Lyubchenko, Y. L., A. A. Gall, L. S. Shlyakhtenko, R. E. Harrington, B. L. Jacobs, P. I. Oden, and S. M. Lindsay. 1992. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA. *J Biomol Struct Dyn* 10:589-606.
35. Lyubchenko, Y., L. Shlyakhtenko, R. Harrington, P. Oden, and S. Lindsay. 1993. Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2137-2140.
36. Umemura, K., M. Ishikawa, and R. Kuroda. 2001. Controlled immobilization of DNA molecules using chemical modification of mica surfaces for atomic force microscopy: characterization in air. *Anal Biochem* 290:232-237.
37. Ballardur, V., A. Theretz, and B. Mandrand. 1997. Determination of the main forces driving DNA oligonucleotide adsorption onto aminated silica wafers. *J. Colloid Interf. Sci.* 194:408-418.

38. Lyubchenko, Y. L. and L. S. Shlyakhtenko. 1997. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:496-501.
39. Lyubchenko, Y. L. 2004. DNA structure and dynamics: an atomic force microscopy study. *Cell Biochem Biophys* 41:75-98.
40. Kaji, N., M. Ueda, and Y. Baba. 2001. Direct measurement of conformational changes on DNA molecule intercalating with a fluorescence dye in an electrophoretic buffer solution by means of atomic force microscopy. *Electrophoresis* 22:3357-3364.
41. Podesta, A., L. Imperadori, W. Colnaghi, L. Finzi, P. Milani, and D. Dunlap. 2004. Atomic force microscopy study of DNA deposited on poly L-ornithine-coated mica. *J Microsc* 215:236-240.
42. Lushnikov, A. Y., A. Bogdanov, and Y. L. Lyubchenko. 2003. DNA recombination: holliday junctions dynamics and branch migration. *J Biol Chem* 278:43130-43134.
43. Shlyakhtenko, L. S., V. N. Potaman, R. R. Sinden, and Y. L. Lyubchenko. 1998. Structure and dynamics of supercoil-stabilized DNA cruciforms. *J Mol Biol* 280:61-72.
44. Shlyakhtenko, L. S., A. A. Gall, A. Filonov, Z. Cerovac, A. Lushnikov, and Y. L. Lyubchenko. 2003. Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials. *Ultramicroscopy* 97:279-287.
45. Tiner, W. J., Sr., V. N. Potaman, R. R. Sinden, and Y. L. Lyubchenko. 2001. The structure of intramolecular triplex DNA: atomic force microscopy study. *J Mol Biol* 314:353-357.
46. Shlyakhtenko, L. S., V. N. Potaman, R. R. Sinden, A. A. Gall, and Y. L. Lyubchenko. 2000. Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies. *Nucleic Acids Res* 28:3472-3477.
47. Fang, Y. and J. H. Hoh. 1999. Cationic silanes stabilize intermediates in DNA condensation. *FEBS Lett* 459:173-176.
48. Lushnikov, A. Y., V. N. Potaman, E. A. Oussatcheva, R. R. Sinden, and Y. L. Lyubchenko. 2006. DNA Strand Arrangement within the SfiI-DNA Complex: Atomic Force Microscopy Analysis. *Biochemistry* 45:152-158.
49. Potaman, V. N., L. S. Shlyakhtenko, E. A. Oussatcheva, Y. L. Lyubchenko, and V. A. Soldatenkov. 2005. Specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to cruciform hairpins. *J Mol Biol* 348:609-615.
50. Shlyakhtenko, L. S., A. A. Gall, J. J. Weimer, D. D. Hawn, and Y. L. Lyubchenko. 1999. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate. *Biophys J* 77:568-576.

51. Wang, H., R. Bash, J. G. Yodh, G. L. Hager, D. Lohr, and S. M. Lindsay. 2002. Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin. *Biophys J* 83:3619-3625.
52. Wang, H., R. Bash, S. M. Lindsay, and D. Lohr. 2005. Solution AFM studies of human Swi-Snf and its interactions with MMTV DNA and chromatin. *Biophys J* 89:3386-3398.
53. Wang, H., R. Bash, J. G. Yodh, G. Hager, S. M. Lindsay, and D. Lohr. 2004. Using atomic force microscopy to study nucleosome remodeling on individual nucleosomal arrays in situ. *Biophys J* 87:1964-1971.
54. Stroh, C., H. Wang, R. Bash, B. Ashcroft, J. Nelson, H. Gruber, D. Lohr, S. M. Lindsay, and P. Hinterdorfer. 2004. Single-molecule recognition imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12503-12507.
55. Bash, R., H. Wang, J. Yodh, G. Hager, S. M. Lindsay, and D. Lohr. 2003. Nucleosomal arrays can be salt-reconstituted on a single-copy MMTV promoter DNA template: their properties differ in several ways from those of comparable 5S concatameric arrays. *Biochemistry* 42:4681-4690.
56. Bussiek, M., N. Mucke, and J. Langowski. 2003. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution. *Nucl. Acids. Res.* 31:e137-.
57. Rivetti, C., M. Guthold, and C. Bustamante. 1996. Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J Mol Biol* 264:919-932.
58. Pastré, D., O. Piétremont, S. Fusil, F. Landousy, J. Jeusset, M. O. David, L. Hamon, E. Le Cam, and A. Zozime. 2003. Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study. *Biophys J* 85:2507-2518.
59. Piétremont, O., D. Pastré, S. Fusil, J. Jeusset, M.-O. David, F. Landousy, L. Hamon, A. Zozime, and E. Le Cam. 2003. Reversible binding of DNA on NiCl₂ treated mica by varying the ionic strength. *Langmuir* 19:2536-2539.
60. Rouzina, I. and V. A. Bloomfield. 1996. Competitive electrostatic binding of charged ligands to polyelectrolytes: planar and cylindrical geometries. *J. Phys. Chem.* 100:4292-4304.
61. Manning, G. S. 1978. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* 11:179-246.
62. Pashley, R. M. 1982. Hydration forces between mica surfaces in electrolyte solutions. *Advances in Colloid and Interface Science* 16:57-62.
63. Lau, A. W. C. 2000. Fluctuation and correlation effect in electrostatics of highly-charged surface. Thesis of the University of Santa Barbara, California.

64. Arenzon, J. J., J. F. Stilek, and Y. Levin. 1999. Simple model for attraction between like-charged polyions. *Eur. Phys. J. B* 12:79-82.
65. Le Cam, E., E. Delain, F. Culard, and J. A. Cognet. 2000. DNA -protein interactions - A practical approach. Chapter 24 : DNA-protein complexes analysed by electron microscopy and cryo-microscopy. Edited by Andrew Travers and Malcolm Buckle. Oxford University Press.:337-350.
66. Ellis, J. S., H. G. Abdelhady, S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendlers, and P. M. Williams. 2004. Direct atomic force microscopy observations of monovalent ion induced binding of DNA to mica. *J Microsc* 215:297-301.
67. Pastré, D., L. Hamon, F. Landousy, I. Sorel, M. O. David, A. Zozime, E. Le Cam, and O. Piétrement. 2006. Anionic polyelectrolyte adsorption on mica mediated by multivalent cations: a solution to DNA imaging by atomic force microscopy under high ionic strengths. *Langmuir* 22:6651-6660.
68. Green, N. M. 1975. Avidin. *Adv Protein Chem* 29:85-133.
69. Green, N. M. 1990. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* 184:51-67.
70. Guthold, M., X. Zhu, C. Rivetti, G. Yang, N. H. Thomson, S. Kasas, H. G. Hansma, B. Smith, P. K. Hansma, and C. Bustamante. 1999. Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biophys J* 77:2284-2294.
71. Seong, G. H., Y. Yanagida, M. Aizawa, and E. Kobatake. 2002. Atomic force microscopy identification of transcription factor NFkappaB bound to streptavidin-pin-holding DNA probe. *Anal Biochem* 309:241-247.
72. Gray, J. J. 2004. The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol* 14:110-115.
73. Allemand, J. F., D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, and V. Croquette. 1997. pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys J* 73:2064-2070.
74. Hansma, H. G., I. Revenko, K. Kim, and D. E. Laney. 1996. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 24:713-720.
75. Fay, M. J., N. G. Walter, and J. M. Burke. 2001. Imaging of single hairpin ribozymes in solution by atomic force microscopy. *Rna* 7:887-895.
76. Vahsen, N., C. Cande, P. Dupaigne, F. Giordanetto, R. T. Kroemer, E. Herker, S. Scholz, N. Modjtahedi, F. Madeo, E. Le Cam, and G. Kroemer. 2006. Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene* 25:1763-1774.

77. Ill, C. R., V. M. Keivens, J. E. Hale, K. K. Nakamura, R. A. Jue, S. Cheng, E. D. Melcher, B. Drake, and M. C. Smith. 1993. A COOH-terminal peptide confers regiospecific orientation and facilitates atomic force microscopy of an IgG1. *Biophys J* 64:919-924.
78. Pierres, A., D. Touchard, A. M. Benoliel, and P. Bongrand. 2002. Dissecting streptavidin-biotin interaction with a laminar flow chamber. *Biophys J* 82:3214-3223.
79. Yuan, C., A. Chen, P. Kolb, and V. T. Moy. 2000. Energy landscape of streptavidin-biotin complexes measured by atomic force microscopy. *Biochemistry* 39:10219-10223.
80. Friedli. <http://www.friedli.com/research/research.html>.
81. Wang, M. S., L. B. Palmer, J. D. Schwartz, and A. Razatos. 2004. Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the atomic force microscope. *Langmuir* 20:7753-7759.
82. Crut, A., D. Lasne, J. F. Allemand, M. Dahan, and P. Desbiolles. 2003. Transverse fluctuations of single DNA molecules attached at both extremities to a surface. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 67:051910.

Annexe C3-1

Probing DNA-protein interactions with Atomic Force Microscopy.

F. Landousy and E. Le Cam. 2005.

Application note, *Veeco Instruments*.

Ce document écrit pour la société Veeco Instruments présente les possibilités offertes par l'AFM dans l'étude de l'ADN et des interactions ADN-protéines. L'observation à l'air est principalement utilisée pour l'analyse quantitative de la courbure et de la flexibilité locales de l'ADN, des déformations de l'ADN induite par la liaison de protéines, et la cartographie des complexes ADN-protéines. La spécificité majeure de l'AFM par rapport à la microscopie électronique à transmission est la possibilité de travailler en milieu liquide, pour effectuer des mesures de force entre ADN et protéines ou observer l'évolution dynamique de complexes nucléoprotéiques sur la surface, au cours du temps. La faisabilité de ces différentes applications est démontrée, cependant, pour améliorer les méthodes encore empiriques de préparation des échantillons pour l'imagerie, le laboratoire développe de nouvelles approches. Celles-ci prennent en compte la force d'adsorption et l'étalement de l'ADN sur le mica, son accessibilité et sa réactivité, dans la caractérisation des complexes avec les ligands.



Probing DNA-Protein Interactions with Atomic Force Microscopy

By: Fabrice Landousy, Eric Le Cam
Laboratoire de Microscopie Moléculaire et
Cellulaire, UMR 8126 CNRS-IGR-UPS
Interactions Moléculaire et Cancer - Institut
Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

Introduction

Large, multi-component protein assemblies are involved in many DNA transactions such as recombination, replication, transcription, and repair. In order to progress in the understanding of different key steps of these mechanisms, it is imperative to analyze the structure of the DNA-protein complexes involved and the dynamic interactions that govern their assembly, function, and disassembly. These complexes are usually studied *in-vitro* using a combination of biochemical and biophysical methods. A direct visualization technique such as AFM imaging is unique in that it allows one to characterize mechanisms involved in DNA-protein recognition and DNA-protein complex formation in different conditions (air and liquids of varying composition) with nanometer resolution. By comparison, other single molecule techniques such as optical or magnetic tweezers give indirect measurements based on the mechanical properties of single DNA molecules, and place severe restrictions on DNA size. Fluorescence microscopy can be used in conjunction with such approaches, but requires staining of either the DNA or the proteins and has relatively low resolution (about 200 nanometers). Owing to successive improvements to sample preparation and experimental methodology – along with instrumentation progress, most notably the invention of TappingMode and the ability to operate in fluid – AFM has indeed become a powerful and

complementary tool to probe DNA-protein interactions at the single molecule level. The purpose of this application note is mainly to illustrate the potentialities of AFM imaging in the analysis of the architecture and dynamics of DNA-protein complexes, while introducing readers to the issue of DNA-protein complexes adsorption, key for rationalizing sample preparation.

Mapping DNA-protein complexes in air

Nucleic acids were among the first biological samples imaged with the scanning tunneling microscope¹, the precursor to AFM. It was recognized that by raster scanning a very sharp tip across the sample surface, a topographical map of DNA could be made based on the tip-sample interactions. Nanometer resolution imaging of DNA with the AFM has nowadays become routine, and has been extensively applied to the mapping of DNA-protein complexes. Sample preparation for AFM only uses very small quantities of DNA and proteins, in the range of a few nanograms or a few femtomoles. The most common way to image nucleoprotein complexes with the AFM is to deposit the molecules onto an atomically flat substrate such as mica. Adsorption of DNA on the substrate is usually promoted by using a buffer containing Ni^{2+} , Mg^{2+} , or other divalent cations that favor the interaction between the negatively



Figure 1. Mix of relaxed and supercoiled pTZ18R DNA plasmids adsorbed onto mica and imaged in air.

DNA length: 2861 base pairs.
1.5µm x 1.5µm scan.

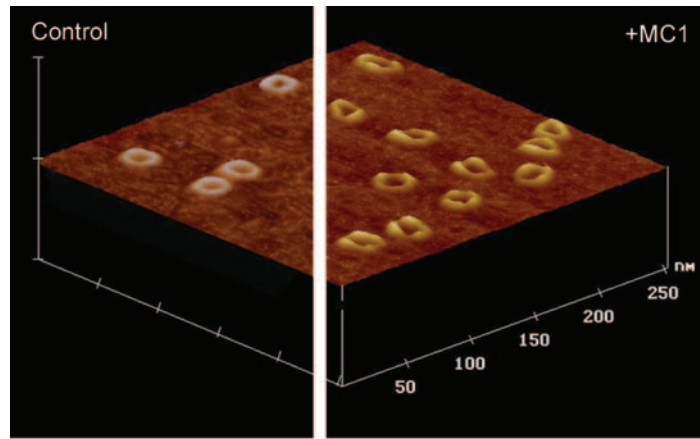
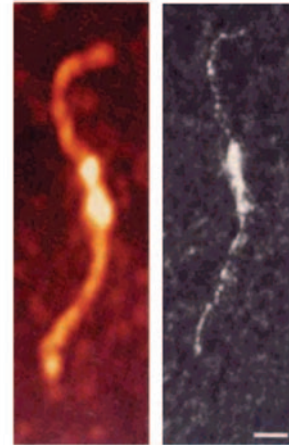


Figure 2. DNA minicircles naked (left) or complexed to the MC1 protein (right). The height of naked minicircles is very regular whereas minicircles bound to MC1 show important height variations, due to the torsion induced by the binding of one or two MC1 per minicircle.

DNA length: 207 base pairs.
250nm x 250nm scans.



b.

charged DNA and the negatively charged mica. Under such conditions of adsorption, the molecules are able to move and equilibrate thermodynamically on the surface² and good spreading of DNA on the surface can be obtained. The sample is then dried, after which the DNA or DNA-protein complexes are easily imaged in air.

As with transmission electron microscopy (TEM), it is possible to analyze different kinds of DNA fragments – linear DNA, supercoiled or relaxed closed circular DNA such as plasmids (Figure 1) or minicircles (Figure 2) - and to characterize different types of DNA-protein complexes. Unlike TEM, however, AFM does not require the use of a staining agent to visualize the biomolecules. Moreover, it provides true topographical information, which can better distinguish features compared to purely 2D images from TEM. For example, AFM allowed the unambiguous identification of binding of Fur protein to two adjacent, yet distinct, promoters

along the DNA molecule shown in Figure 3³. In addition to mapping of protein position along DNA molecules, local DNA curvature and flexibility⁴, or deformation of DNA upon protein binding, such as bending^{5,6} or wrapping^{7,9}, can be quantitatively analyzed by AFM.

DNA bending induced by proteins on linear DNA fragments can be determined by direct angle measurements. Such deformations have been illustrated with architectural proteins such as MC1, which induces a kink angle of 116° ¹⁰ and spatial deformation within DNA minicircles (Figure 2)^{5,11}. Recognition of damage sites by proteins involved in DNA repair is also frequently related to DNA bending. DNA glycosylases such as hOGG1 recognize lesion sites, as demonstrated by mapping of the complexes (Figure 4), and hOGG1 induces a mean bending angle of 70° . Refinement of methods used to analyze bending angles is described in Cognet et al.¹²

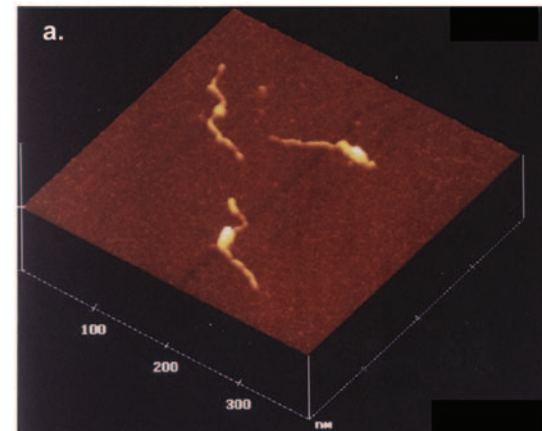


Figure 3. Visualization of Fur-DNA complexes by AFM. (a) 3D representation ; 400nm x 400nm scan ; Z scale 25nm (b) High magnification image compared to that of a similar molecule observed by dark field Transmission Electron Microscopy; the constriction observed in the Fur coat by AFM corresponds to the occupation of the two adjacent promoters of the aerobactin gene.

DNA length: 645 base pairs.
Scale bar: 20nm.

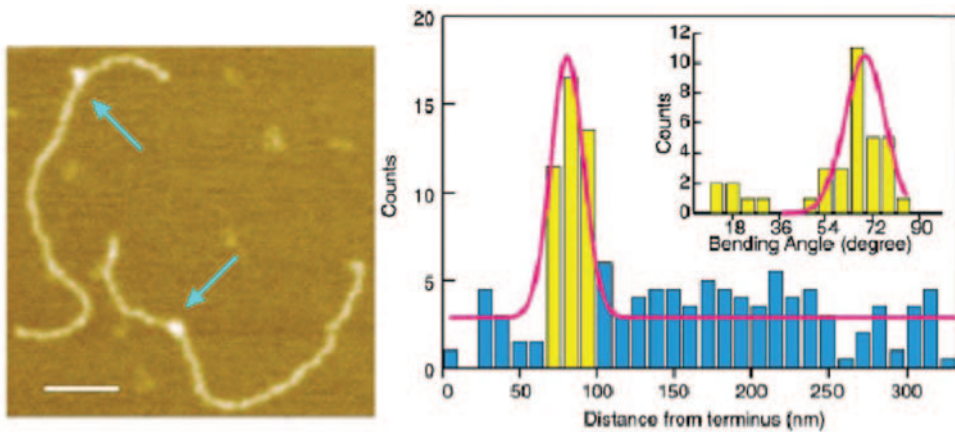


Figure 4. hOGG1 is one of the DNA glycosylases responsible for the recognition and removal of damaged bases from the genome. Protein position on damaged DNA molecules (as indicated by arrows) is well correlated with the position of the lesion site. Measurements of bending angles indicate a mean angle value of 70°.

DNA length: 1024 base pairs, with a lesion site 245 base pairs from one end.
Scale bar: 50nm.

The wrapping of DNA bound to proteins is well illustrated in the case of a chromatin fiber¹³, where each nucleosomal core particle is able to wrap 146 base pairs of DNA. DNA wrapping associated with complex formation is characterized by a shortening of the apparent DNA length in AFM images. Interestingly a few proteins involved in promoters regulation have been described to wrap DNA to form small loops. For instance, LrpC from *B. subtilis* wraps DNA in a right-handed superhelix to promote positive supercoiling and AFM has allowed to understand the assembly of the complex; the formation of these nucleosome-like structures results from a polymerisation of LrpC along DNA and an oligomerisation induced by curved DNA (Figure 5)⁷. The implication of wrapping in DNA regulation has also been illustrated for DNA gyrase, which promotes negative supercoiling by wrapping DNA in a left-handed helix. AFM has also been used to demonstrate a complete loss of

wrap in the DNA-gyrase complexes (Figure 6) 9 in the presence of ADPNP cofactor .

Numerous other DNA-protein complexes have also been studied by AFM in air, and we invite readers to refer to more complete reviews¹⁴⁻¹⁶. These examples demonstrate that AFM imaging in air, combined with careful choice and control of biomolecules and immobilization conditions, can provide useful qualitative and quantitative characterization of nucleoprotein complexes. Although inferred from DNA molecules and complexes immobilized and dried on the surface, such data already offer a good basis for understanding the behavior of individual proteins along DNA molecules. However in order to go one step further and probe dynamic aspects directly, it is necessary to study DNA-protein complexes still able to evolve during the AFM observation, and thus to work in liquid.

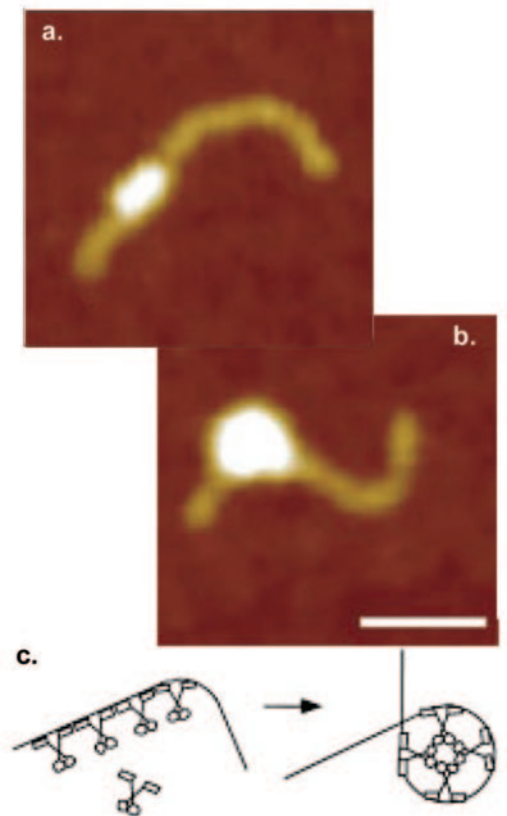


Figure 5. AFM visualization of LrpC-DNA complexes; (a) without wrapping, (b) with wrapping of DNA. Interaction of LrpC with flexible/curved DNA is able to induce a complete wrapping of the DNA around the protein to form a nucleosome-like structure (radius of curvature: 4.5nm), as schematized in (c).

DNA length: 331 base pairs.
Scale bar: 100nm.

Probing DNA-protein interactions in liquid

This is made possible by the use of a fluid cell, which forms a closed fluid volume around the cantilever and sample surface (Figure 7). Working in liquid maintains DNA and proteins in their native state and allows the possibility of varying external parameters such as buffer conditions in the course of an experiment. Indeed within the last decade the emergence of single molecule force measurement techniques and of single molecule imaging techniques, including AFM in liquid, has created new opportunities to analyze the dynamics of DNA-protein interactions. One can imagine that the greatest synergy will be achieved by using complementary methods, particularly these which allow a direct

visualization, and more traditional biochemical and biophysical approaches. AFM has a special preferred position concerning direct time-resolved visualization of biological systems in liquid.

Sensing DNA-protein interaction forces

The same cantilevers that can be used to image with AFM can also be used to measure nanoscale forces. The softest cantilevers have spring constants on the order of 0.01 N/m (or 10 pN/nm), which allows the AFM to measure forces in the piconewton range. These forces can be measured as the tip approaches the sample, contacts the surface, and then retracts from the sample, producing a "force-distance"

curve with piconewton range force resolution and sub-nanometer distance resolution. This force and distance regime matches well with both intermolecular interactions (such as between DNA and proteins) as well as intramolecular interactions (such as in protein folding). Readers can find a detailed overview of the use of AFM as a force measurement tool in another Veeco Application Note¹⁷.

In the case of intermolecular DNA-protein interactions¹⁸⁻²⁰, the prototypical experiment involves covalently attaching the ligand to the cantilever tip and bringing it into contact with the surface, where it interacts with its target to form a complex. Upon retraction, this complex is increasingly loaded until it finally ruptures. Repeating this process in different conditions with the same tip and surface produce distributions of unbinding strength probability, which allows one to estimate thermodynamic parameters related to the energy barriers involved in the interactions. This methodology has been used to study the DNA-protein interaction between the transcriptional activator ExpG (*S. meliloti* bacterium) and three domains of a promoter region¹⁹. In these studies ExpG proteins were

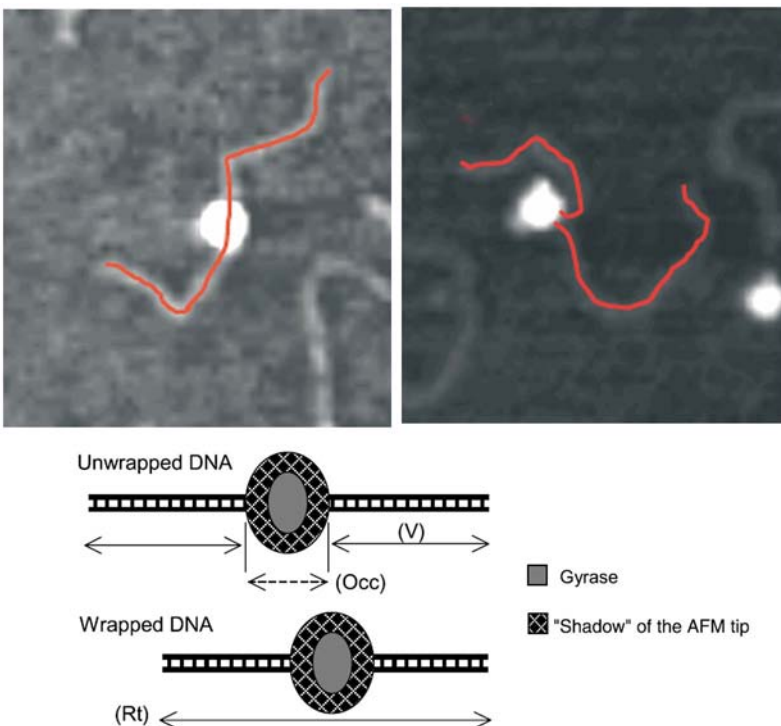


Figure 6. AFM measurements reveal whether DNA-gyrase complexes are (A): unwrapped (in the presence of ADPNP) or (B): wrapped (in the absence of ADPNP). The red lines show how the read-trough DNA length (Rt) and visible DNA length (V) were respectively measured. Schematic in (C) illustrates the difference in contour length between wrapped and unwrapped DNA molecules.

DNA length: 1070 base pairs.
Scale bar: 100nm.

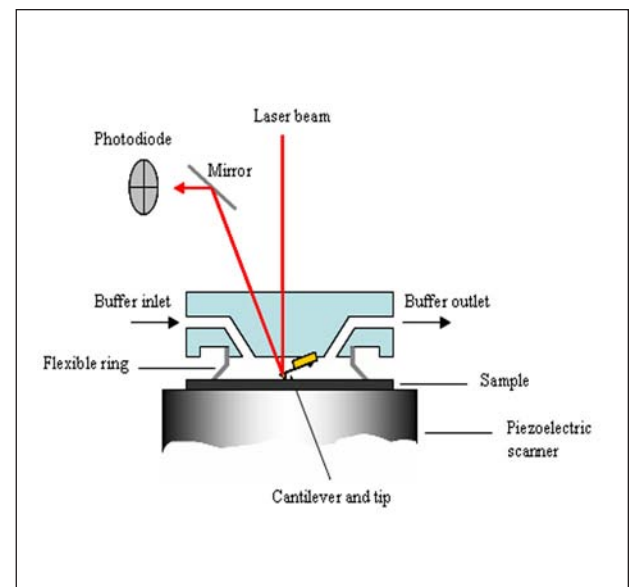


Figure 7. Cross section schematic of the AFM fluid cell setup

attached to a silanized mica surface and DNA wild type or mutated fragments were attached to the tip. Unbinding force measurements revealed that only one binding site within the promoter (core region) determines DNA recognition by ExpG (Figure 8), whereas two adjacent domains (box 1 and 2) affect the stability of the DNA-protein complex.

Visualizing dynamic DNA-protein interaction

Imaging dynamic events at the single molecule level is a fascinating and potentially powerful way to investigate DNA-protein interactions. The use of tapping mode in liquid allows one to observe DNA-protein complexes in a physiological environment, and to record their evolution over the course of time. A number of pioneering works have demonstrated the feasibility of these studies and their ability to measure dynamics parameters that describe the interactions. The dynamic behavior (over a timescale of minutes) of different types of complexes such as DNA with RNA polymerase^{21,22}, photolyase²³, p53²⁴ or DNase I^{25,26} have been investigated by AFM in liquid. For example, the RNA polymerase-DNA complex has been studied in different buffer conditions and in different situations, either where RNAP is stably bound to the mica surface and the sliding of DNA is characterized (Figure 9)²² or, conversely, where the sliding of RNAP along immobilized DNA is analyzed²¹.

Efforts are now being made to improve and rationalize further sample preparation methods for this kind of experiments. Indeed the complexes must be imaged with sufficient resolution but also with good control of interactions with the sample surface and good knowledge of their influence on DNA-protein interactions. Actually each

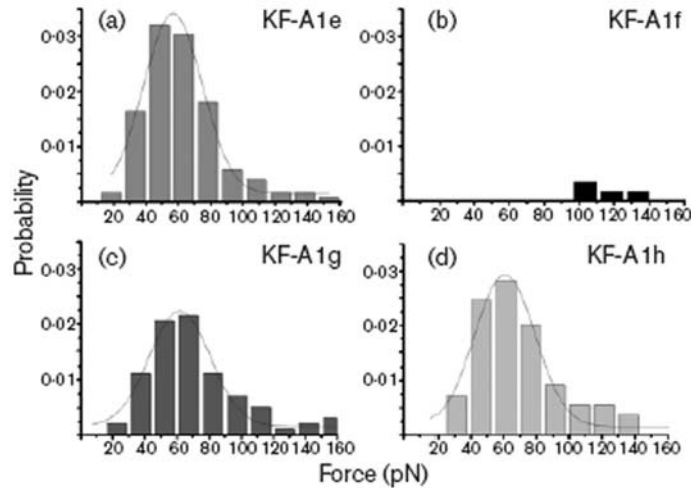


Figure 8. Unbinding force histogram between ExpG and (a) the wild-type DNA sequence, (b) the DNA sequence mutated in the core region, (c) and (d) DNA sequences mutated respectively in box 1 or box 2. Only the core region appears to be determinant for the DNA recognition by ExpG.

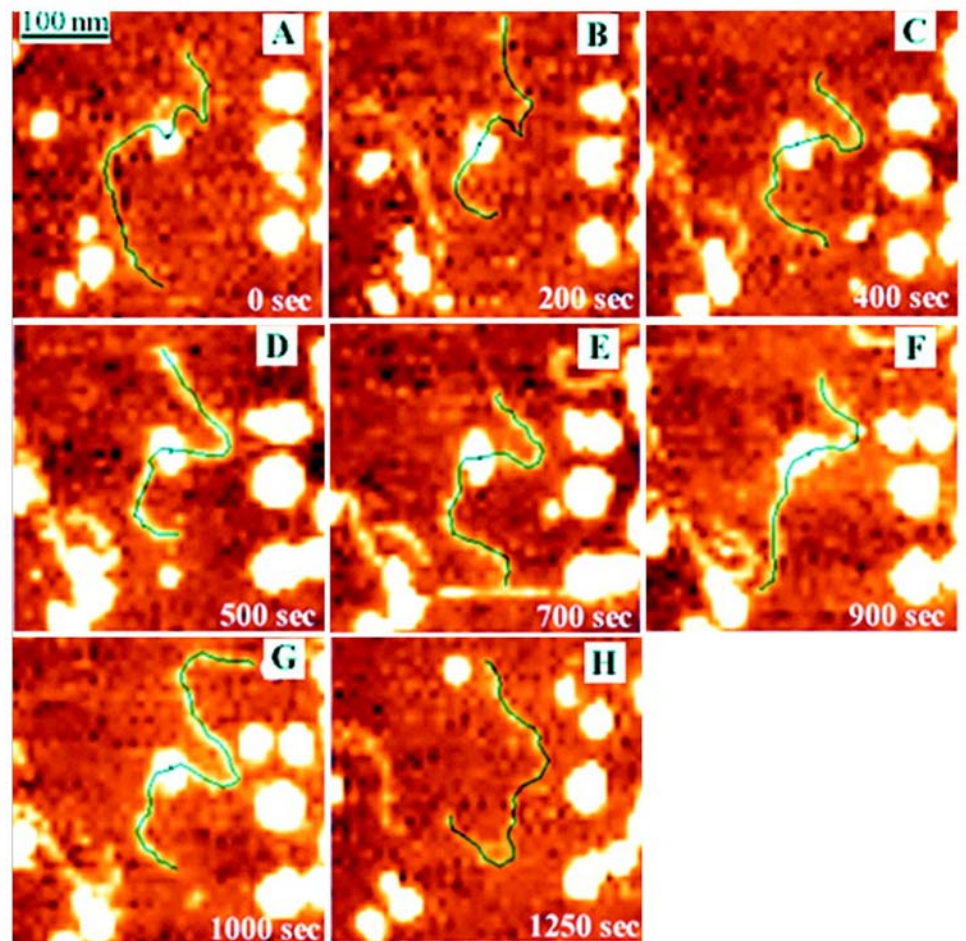


Figure 9. Characterization of the sliding of DNA along RNA polymerase. The DNA contour is traced with a thin line and the center of the RNAP is marked with a dot. The elapsed time after the initial observation of the complex is indicated above each image. Analysis of the sliding of the DNA molecule relatively to RNAP was shown to be consistent with a 1D random walk.

DNA length: 1001 base pairs.
Scan size: 350nm x 350nm.

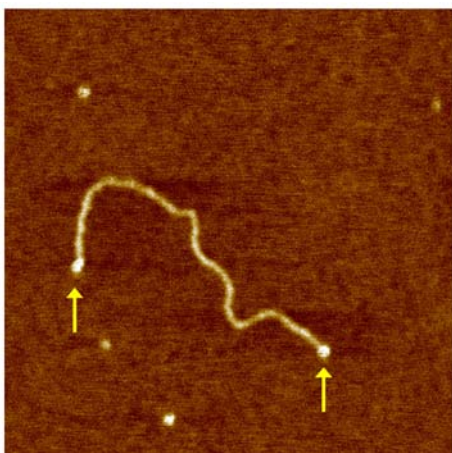


Figure 10. Streptavidin-biotinylated DNA complex; one streptavidin protein is bound to each extremity (arrows).

DNA length: 1444 base pairs.
500nm x 500nm scan.

kind of DNA-protein complex must be considered as an overall system, where specific versus non specific interactions in the DNA-protein complex and interactions with the surface are both very dependent on the ionic conditions in the buffer.

The main actor of the binding to the surface is usually the adsorption of the DNA molecules. The presence of divalent cations (such as Mg^{2+} or Ni^{2+}) and a low concentration of monovalent cations (such as Na^+ or K^+) in the buffer are known to enable reliable imaging of DNA molecules on mica. Recently, the forces acting between DNA and mica and their dependence on monovalent and divalent ion concentrations have been investigated and a rationalized framework describing the issue of DNA adsorption has been proposed²⁷. Various attempts have also been made to design more deliberate and specific DNA

attachment methods. One approach is to functionalize the mica surface with amino groups (APTES), which allows attachment of DNA molecules on the surface at random positions along the DNA chain, without the requirement of divalent cations in the buffer. This method has been used to image the dynamics of DNA structures such as supercoiled plasmids or Holliday junctions over the course of time²⁸. Alternatively, the authors of this note are developing a strategy to tether the biotinylated ends of linear DNA molecules to mica using the biotin-streptavidin complex (Figure 10) and biotinylated tethers immobilized on the surface.

Sample preparation for imaging dynamic DNA-protein interactions in liquid essentially requires satisfying a compromise between the necessity to bring the DNA molecules onto the substrate surface and the necessity to conserve their mobility and their accessibility to the proteins. As a tool to modulate DNA accessibility and reactivity, we have designed a system has been designed in which one can alternately switch between various DNA adsorption conditions during a single AFM experiment. This is done by using mica pretreated with nickel ions to keep the molecules on the surface and varying the monovalent and divalent ion concentrations in the buffer to change the adsorption strength^{27,29}. We have then started to examine the influence of adsorption strength on the binding of small ligands (ethidium bromide³⁰, bleomycin³¹) to DNA. Naturally we wish to extend this work to more challenging DNA-protein complexes and work toward this goal is currently under way.

Conclusion

The AFM instrument has become indispensable for probing DNA-protein interactions at the single molecule level. This application note only covers a few examples of the knowledge that AFM has brought forth. Imaging immobilized DNA-protein complexes in air has essentially shed light on their architecture. Now, by working in physiological buffer, it is possible to directly image dynamic interactions and to probe the actual interaction forces. We foresee a whole new range of fascinating DNA-protein interaction studies yet to come based on this solid foundation of successful investigations and on increasingly rationalized approaches to sample preparation, that should be combined with the development of more biology-oriented AFM instruments.

Acknowledgements

The authors thank O. Piétrement, D. Pastré and A. Justome for critical discussions and reviews during manuscript preparation and thank B. Ohler for his guidance in the application note preparation.

F.L. gratefully acknowledges support from Veeco Instruments and from the Centre National de la Recherche Scientifique during his thesis work.

References

1. Beebe, T.P., et al., *Direct observation of native DNA structures with the scanning tunneling microscope*. *Science*, 1989. 243(4889): p. 370-2.
 2. Rivetti, C., et al., *Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis*. *J. Mol. Biol.*, 1996. 264(5): p. 919-32.
 3. Le Cam E., et al., *Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6; 91(25):11816-20
 4. Scipioni, A., et al., *Sequence-dependent DNA curvature and flexibility from scanning force microscopy images*. *Biophys. J.*, 2002. 85(5): p. 2408-18.
 5. Larquet, E., et al., *Complementarity of microscopies in the structural analysis of DNA minicircles associated to protein MC1*. *C R Acad. Sci. III*, 1996. 319(6): p. 461-71.
 6. Chen, L., et al., *Direct visualization of a DNA glycosylase searching for damage*. *Chem. Biol.*, 2002. 9(3): p. 345-50.
 7. Beloin, C., et al., *Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the Bacillus subtilis LrpC protein*. *J. Biol. Chem.*, 2003. 278(7): p. 5333-42.
 8. Rivetti, C., et al., *Wrapping of DNA around the E. coli RNA polymerase open promoter complex*. *EMBO J.*, 1999. 18(16): p. 4464-75.
 9. Heddle, J.G., et al., *Nucleotide binding to DNA gyrase causes loss of DNA wrap*. *J. Mol. Biol.*, 2004. 337(3): p. 597-610.
 10. Le Cam, E., et al., *DNA bending induced by the archaeobacterial histone-like protein MC1*. *J Mol Biol.* 1999 Jan 22;285(3):1011-21.
 11. Toulme, F., et al., *Conformational changes of DNA minicircles upon the binding of the archaeobacterial histone-like protein MC1*. *J. Biol. Chem.*, 1995. 270(11): p. 6286-91.
 12. Cognet, J.A., et al., *Static curvature and flexibility measurements of DNA with microscopy. A simple renormalization method, its assessment by experiment and simulation*. *J. Mol. Biol.*, 1999. 285(3): p. 997-1009.
 13. Zlatanova, J. and S.H. Leuba, *Chromatin fibers, one-ata-time*. *J. Mol. Biol.*, 2003. 331(1): p. 1-19.
 14. Lyubchenko, Y.L., et al., *Atomic force microscopy of nucleoprotein complexes*. *Scanning Microsc.*, 1995. 9(3): p. 705-25.
 15. Dame, R.T., et al., *Insights into the regulation of transcription by scanning force microscopy*. *J. Microsc.*, 2003. 212(Pt 3): p. 244-53.
 16. Janicijevic, A., et al., *The molecular machines of DNA repair: scanning force microscopy analysis of their architecture*. *J. Microsc.*, 2003. 212(Pt 3): p. 264-72.
 17. Prater, C.B., et al., *Probing Nano-Scale Forces with the Atomic Force Microscope*, Veeco Instruments Application Note.
-

-
18. Bartels, F.W., et al., *Specific binding of the regulatory protein ExpG to promoter regions of the galactoglucan biosynthesis gene cluster of Sinorhizobium meliloti—a combined molecular biology and force spectroscopy investigation.* J. Struct. Biol., 2003. 143(2): p. 145-52.
 19. Baumgarth, B., et al., *Detailed studies of the binding mechanism of the Sinorhizobium meliloti transcriptional activator ExpG to DNA.* Microbiology, 2005. 151(Pt 1): p. 259-68.
 20. Kuhner, F., et al., *LexA-DNA bond strength by single molecule force spectroscopy.* Biophys. J., 2004. 87(4): p. 2683-90.
 21. Guthold, M., et al., *Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. 91(26): p. 12927-31.
 22. Guthold, M., et al., *Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by Escherichia coli RNA polymerase.* Biophys. J., 1999. 77(4): p. 2284-94.
 23. van Noort, S.J., et al., *Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope.* Biophys. J., 1998. 74(6): p. 2840-9.
 24. Jiao, Y., et al., *Dynamic interactions of p53 with DNA in solution by time-lapse atomic force microscopy.* J. Mol. Biol., 2001. 314(2): p. 233-43.
 25. Abdelhady, H.G., et al., *Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I.* Nucleic Acids Res., 2003. 31(14): p. 4001-5.
 26. Bezanilla, M., et al., *Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope.* Biophys. J., 1994. 67(6): p. 2454-9.
 27. Pastré, D., et al., *Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study.* Biophys. J., 2003. 85(4): p. 2507-18.
 28. Lyubchenko, Y.L., *DNA structure and dynamics: an atomic force microscopy study.* Cell Biochem. Biophys., 2004. 41(1): p. 75-98.
 29. Piétrement, O., et al., *Reversible Binding of DNA on NiCl₂-Treated Mica by Varying the Ionic Strength.* Langmuir, 2003. 19(7): p. 2536-9.
 30. Pastré, D., et al., *Study of the DNA/ethidium bromide interactions on mica surface by atomic force microscope: influence of the surface friction.* Biopolymers, 2005. 77(1): p. 53-62.
 31. Piétrement, O., et al., *Studying the effect of a charged surface on the interaction of bleomycin with DNA using an atomic force microscope.* Eur. Biophys. J., 2005. 34(3): p. 200-7.

Annexe C3-2

Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study.

Pastré, D., O. Pietrement, S. Fusil, F. Landousy, J. Jeusset, M. O. David, L. Hamon, E. Le Cam, and A. Zozime. 2003.

Biophys J 85:2507-2518.

Cet article correspond à la forme publiée des résultats théoriques et expérimentaux sur les forces d'interactions entre l'ADN et le mica présentés dans ce chapitre. Des modèles simples sont proposés pour décrire la force de répulsion entre les doubles couches électriques et la force d'attraction due aux corrélations entre les cations divalents qui agissent entre l'ADN et le mica. Il est montré que la force d'adsorption dépend alors des densités surfaciques relatives des cations monovalents et divalents sur la surface du mica, et que la force d'adsorption peut être augmentée à l'aide d'un prétraitement par les ions nickel. Ces résultats théoriques sont validés par une étude expérimentale de la force d'adsorption de l'ADN sur le mica sur la base de mesures de distances bout à bout des molécules d'ADN observées à l'air dans différentes conditions d'adsorption.

Adsorption of DNA to Mica Mediated by Divalent Counterions: A Theoretical and Experimental Study

David Pastré,* Olivier Piétrement,[†] Stéphane Fusil,* Fabrice Landousy,[†] Josette Jeusset,[†] Marie-Odile David,* Loïc Hamon,* Eric Le Cam,[†] and Alain Zozime*

*Laboratoire Milieux Nanométriques, Université d'Evry, 91025 Évry Cedex, France; and [†]Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, UMR 8126 CNRS-IGR-UPS, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France

ABSTRACT The adsorption of DNA molecules onto a flat mica surface is a necessary step to perform atomic force microscopy studies of DNA conformation and observe DNA-protein interactions in physiological environment. However, the phenomenon that pulls DNA molecules onto the surface is still not understood. This is a crucial issue because the DNA/surface interactions could affect the DNA biological functions. In this paper we develop a model that can explain the mechanism of the DNA adsorption onto mica. This model suggests that DNA attraction is due to the sharing of the DNA and mica counterions. The correlations between divalent counterions on both the negatively charged DNA and the mica surface can generate a net attraction force whereas the correlations between monovalent counterions are ineffective in the DNA attraction. DNA binding is then dependent on the fractional surface densities of the divalent and monovalent cations, which can compete for the mica surface and DNA neutralizations. In addition, the attraction can be enhanced when the mica has been pretreated by transition metal cations (Ni^{2+} , Zn^{2+}). Mica pretreatment simultaneously enhances the DNA attraction and reduces the repulsive contribution due to the electrical double-layer force. We also perform end-to-end distance measurement of DNA chains to study the binding strength. The DNA binding strength appears to be constant for a fixed fractional surface density of the divalent cations at low ionic strength ($I < 0.1$ M) as predicted by the model. However, at higher ionic strength, the binding is weakened by the screening effect of the ions. Then, some equations were derived to describe the binding of a polyelectrolyte onto a charged surface. The electrostatic attraction due to the sharing of counterions is particularly effective if the polyelectrolyte and the surface have nearly the same surface charge density. This characteristic of the attraction force can explain the success of mica for performing single DNA molecule observation by AFM. In addition, we explain how a reversible binding of the DNA molecules can be obtained with a pretreated mica surface.

INTRODUCTION

Atomic force microscopy (AFM) is a useful technique for imaging DNA and DNA-protein complexes on ultraflat surfaces (Allison et al., 1996; Cary et al., 1997; Guthold et al., 1994; van Noort et al., 1998). This microscope generates a three-dimensional (3D) image by probing the sample surface with a sharp tip attached to the end of a flexible cantilever. One of the most attractive features of AFM is that it can operate in liquid, making it possible to image DNA under biological conditions. The key element is to preserve the activity and integrity of the specimen. This requirement is not easy to reach because it implies that DNA molecules should be loosely attached to move freely above the surface. The most popular substrate in this respect is muscovite mica, a highly negatively charged surface. Those crystals exhibit a large degree of basal cleavage, allowing them to be split into atomically flat sheets. Weak electrostatic attachment of the DNA to the surface is obtained by using divalent cations (Mg^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} ...) in the buffer and either with a pretreated mica (Bezanilla et al., 1994; Thundat et al., 1992; Vesenka et al., 1992) or not (Han et al., 1997; Jiao et al., 2001; Thomson et al., 1996). Let us add that Mg^{2+} ion

is generally preferred, for binding DNA to mica, to the transition metal cations that coordinate strongly to the DNA bases (Rouzina and Bloomfield, 1996b).

Based on this principle, mica has been successfully used in numberless studies especially for AFM imaging of moving double-stranded DNA and DNA-protein complexes in liquid (Guthold et al., 1994; Jiao et al., 2001; van Noort et al., 1998). The point is that the process allowing the adsorption of DNA on the mica surface is still unclear. Generally, authors refer to a "salt bridge" effect between the negatively charged mica surface and the negatively charged DNA that is mediated by the divalent or higher valence cations (Shao et al., 1996). Some AFM studies have been done to understand the process that binds DNA to mica (Bustamante and Rivetti, 1996; Hansma and Laney, 1996). However, several features of the DNA adsorption are still not understood, regarding the respective role of divalent and monovalent ions concentrations and the effect of mica pretreatment by various cations like Ni^{2+} (Bezanilla et al., 1994) or Al^{3+} (Weisenhorn et al., 1990). Obviously, the origin of the force that attracts DNA molecules onto the surface has not been established so far. It is important to know how the mica surface interacts with DNA while studying its biological function (Vainrub and Pettitt, 2000). The observation of DNA molecules by AFM could otherwise lead to misinterpretations. Indeed, the DNA molecules could be particularly sensitive to the surface influence

Submitted January 23, 2003, and accepted for publication May 28, 2003.

Address reprint requests to Olivier Piétrement, Tel.: 33-1-42-11-63-06; Fax: 33-1-42-11-54-94; E-mail: Olivier.Pietrement@igr.fr.

© 2003 by the Biophysical Society

0006-3495/03/10/2507/12 \$2.00

because a major part of the DNA/protein interactions are electrostatic (Saecker and Record, 2002).

In this article, we study both theoretically and experimentally the forces involved in the negatively charged polyelectrolytes (DNA) binding to a flat negatively charged surface (mica). The theoretical study is carried out by using simple analytical models to qualitatively describe the DNA binding to mica surface. We suppose that only two forces play a major role on the DNA adsorption: the electrical double-layer repulsion between the counterion clouds of DNA and mica (Israelachvili, 1992; Lau and Pincus, 1999; Pashley, 1982), and the force due to the correlations between the counterion clouds (Arenzon et al., 1999; Kjellander and Marrelja, 1986; Levin, 1999; Ray and Manning, 1994; Rouzina and Bloomfield, 1996a,b). The electrical double-layer force can be well described by using the standard Poisson-Boltzmann (P-B) equation that encapsulates a mean-field approach to the many-body problem of mobile ions between two charged surfaces (Israelachvili, 1992; Lau and Pincus, 1999; Ni et al., 1999). To use this model, we assume that DNA can be treated as a charged surface (Rouzina and Bloomfield, 1996a,b).

For the study of the attraction force due to the counterion correlations, we select a simple model that determines the force induced by the correlations of the counterions in a mean-field theory by a very simple two-dimensional (2D) model involving two lines of negative charges (Arenzon et al., 1999). One line of charges represents the DNA and the other one represents the mica surface. We develop this model by adding the effect of thermal fluctuations that can lead to a lower binding strength, and the effect of the binding competition between divalent and monovalent cations. In addition, this model allows us to study the effect of mica pretreatment by divalent transition metal ions (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} ...). These ions remain generally strongly bound to the mica surface (Gier and Johns, 2000; Koppelman and Dillard, 1977; Pashley and Israelachvili, 1984), which improves the DNA binding during AFM experiments in liquid (Bezanilla et al., 1994; Piétrement et al., 2003).

We also investigate the effect of the competition between monovalent/divalent cations on the DNA binding strength by AFM. This experimental study can indicate if the DNA adsorption is due to the counterion correlations. However, the DNA/mica binding strength cannot be easily reached by AFM. We choose to measure end-to-end distances of the DNA molecules: large end-to-end distances indicate that the DNA molecules are loosely bound to the surface whereas shorter end-to-end distances reflect the strong adsorption of the molecules.

In the last section of this article, we study the short-range and long-range limits of the attractive and repulsive forces. A possible explanation of the reversible binding of DNA previously obtained on pretreated mica (Piétrement et al., 2003) is advanced. In addition, we describe the effect of the surface charge density on the DNA adsorption

that can explain the ability of mica to adsorb DNA molecules.

THEORY

The adsorption of polyelectrolytes onto oppositely charged surfaces has been the aim of several works. Either numerical or analytical approaches have been developed to describe the force involved in the polyelectrolytes adsorption (Beltrán et al., 1991; Netz and Joanny, 1999; van der Schee and Lyklema, 1984). If the polyelectrolytes and the surface are like charged, the interaction between them is generally repulsive. The so-called electrical double-layer force (Israelachvili, 1992) repels the two surfaces. This force is in fact the sum of the electrostatic repulsion between the counterion clouds and the thermal pressure, and is well described by solving the P-B equation. Because AFM experiments have brought experimental evidence that DNA can be strongly adsorbed onto the mica surface, an attraction force should occur to pull the negatively charged DNA backbone onto the negatively charged mica surface. The attractive hydrophobic force (Craig et al., 1998; Israelachvili, 1992) between the mica surface and DNA polyelectrolyte could be involved in this binding. Nevertheless, this force should not play a key role in the DNA adsorption because the attraction of the DNA molecules to the surface is strongly dependent on the presence of divalent cations that neutralize both the mica surface and the DNA backbone, which suggests that the attraction force has an electrostatic origin. The electrostatic attraction between like charged particles has been already observed for polyelectrolytes and has been the aim of several theoretical studies (Arenzon et al., 1999; Kjellander and Marrelja, 1986; Komyshev and Leikin, 1999; Levin, 1999; Ray and Manning, 1994; Rouzina and Bloomfield, 1996a,b; Sitko et al., 2003). This force comes from the correlations of the counterions between two like-charged polyelectrolytes and, for example, is involved in the DNA condensation mediated by multivalent cations. The main characteristic of this mechanism is its short range and its strong dependence on the surface competition between the divalent and the monovalent counterions.

In this section we use a simple model to assess the influences of the double electrical layer force and the force due to the counterion correlations acting between DNA and mica.

Double-layer electrical forces between mica and DNA

To perform this study we assume that only the divalent counterions neutralize the DNA molecules and the mica surface. Highly charged polyions like DNA can be treated as a charged plane surface provided that the ionic strength is higher than 0.1 M and is lower than 1 M (Rouzina and Bloomfield, 1996a,b). For ionic strength between 0.01 and

0.1 M, the cylindrical geometry of the DNA molecules should be taken into account but planar approximation can provide interesting information for a qualitative description of the electrostatic forces acting on DNA and mica. At such ionic strength and for diluted DNA solution (we use a concentration of DNA lower than 1 $\mu\text{g/ml}$), the counterions form a thin condensed layer on DNA (Manning, 1978). Its thickness λ_z depends only on the valence of the counterions and on the surface charge density, but does not depend on the bulk salt concentration (Rouzina and Bloomfield, 1996b):

$$\lambda_z = \frac{e}{4\pi\sigma l_b z}, \quad (1)$$

where e is the electron charge, z the ion valence, σ the surface charge, and l_b the Bjerrum length equals:

$$l_b = \frac{e^2}{\epsilon k_B T}, \quad (2)$$

where ϵ is the dielectric constant, k_B the Boltzmann constant, and T the temperature.

The relation in Eq. 1 is valid for the DNA surface ($\lambda_z = 0.0595$ nm for $z = 2$) and the mica surface ($\lambda_z = 0.0297$ nm for $z = 2$). As we assume that DNA can be considered as a charged plane, we can obtain an analytical expression of the electrical double-layer force. Indeed, the problem is then reduced to the simple calculation of the pressure acting on two planes in the presence of divalent counterions. The two planes correspond to the mica and DNA surfaces with surface charge density σ_a and σ_b , respectively. This approximation is suitable if the distance between DNA and mica is lower than R the radius of the DNA molecule ($R \approx 1$ nm). However this approximation is used for larger distance as well as to obtain qualitative information. Due to translational invariance, the P-B equation for this problem is one-dimensional and thus the normalized electrostatic potential $\varphi(x)$ and the external charge density $n(x)$ due to the two charged surfaces depend only on the axis (x) perpendicular to the charged planes. The P-B equation for a single plane can be written as (Lau and Pincus, 1999):

$$\frac{d^2\varphi(x)}{dx^2} + \kappa^2 e^{-\varphi(x)} = \frac{l_b}{z} n(x), \quad (3)$$

$$|P(d)| = \frac{k_B T}{2l_b} \left[\sigma_a \sigma_b \left(\frac{l_b}{ze} \right)^2 + \frac{l_b(\sigma_a + \sigma_b)}{ze} \sqrt{\frac{2l_b |P(d)|}{k_B T}} \coth \left(\sqrt{\frac{2l_b |P(d)|}{k_B T}} d \right) \right] \quad \text{if } P(d) < 0, \quad (6)$$

$$P(d) = \frac{k_B T}{2l_b} \left[\sigma_a \sigma_b \left(\frac{l_b}{ze} \right)^2 + \frac{l_b(\sigma_a + \sigma_b)}{ze} \sqrt{\frac{2l_b P(d)}{k_B T}} \cot \text{an} \left(\sqrt{\frac{2l_b P(d)}{k_B T}} d \right) \right] \quad \text{if } P(d) > 0. \quad (7)$$

where κ is a constant depending only on boundary conditions. Note also that we use the normalized electrostatic potential $\varphi(x) = e\psi(x)/k_B T$. The boundary conditions for two charged planes with a surface charge density σ_a at $x = 0$ and σ_b at $x = d$ can be written:

$$\left. \frac{d\varphi(x)}{dx} \right|_{x=0} = -\frac{\sigma_a l_b}{ze}$$

$$\left. \frac{d\varphi(x)}{dx} \right|_{x=d} = -\frac{\sigma_b l_b}{ze}, \quad (4)$$

where d is the distance between the two surfaces.

This approach has already been used to describe the electrical double-layer force acting on the mica surface to interpret surface force experiments (Pashley, 1982). It is assumed that the adsorbed ions determine the net surface charge of the two surfaces. The net surface charge density (σ_a for mica; σ_b for DNA) is given by the sum of the adsorbed ion density and the known surface charge density ($\sigma_{\text{mica}} \approx -2.10^{18}$ e.m $^{-2}$ for the mica and $\sigma_{\text{DNA}} \approx -10^{18}$ e.m $^{-2}$ for DNA, with e the electron charge). The double-layer potential is supposed to be situated at a plane just outside the adsorbed ion layer. As the net surface charge density of the mica depends on the mica pretreatment, we study the pressure acting between the two surfaces for different ratios σ_a/σ_b . Furthermore we assume that the net surface charge density of the DNA is constant and is $\sim 15\%$ of its surface charge. This value is obtained by considering that the adsorbed divalent cations are those for which the electrostatic attraction to DNA is larger than the thermal energy $k_B T$.

The pressure $P(d)$ between the two planes is given by the following equation (Lau, 2000):

$$P(d) = \frac{k_B T}{d l_b} \int_0^d dx \left(\frac{1}{2} \left(\frac{d\varphi}{dx} \right)^2 - \frac{d}{dx} \left(\frac{d\varphi}{dx} \right) \right), \quad (5)$$

where d is the distance of separation between the adsorbed ion layers.

The first term of the integral represents the thermal pressure of the counterions whereas the second one is the electrostatic stress of the counterion clouds. The thermal pressure can give a repulsive force in the short range even if the two planes are oppositely charged. From Eqs. 4 and 5, the pressure can be obtained by solving numerically the following system of transcendental equations (Lau, 2000):

$P(d)$ is positive if the force is repulsive and negative if the force is attractive. Let us note that the pressure between the two planes does not depend on the bulk divalent concentration, which seems obvious because the electrical double-layer density profile is not influenced by the bulk salt concentration. In fact, it depends only on the valence of the

counterions and on the surface charge density of the two planes.

Fig. 1 represents the pressure between the mica surface and the DNA surface versus the distance d for different mica surface charges. We notice that the repulsion is considerably smaller for a lower mica surface charge. Therefore, we can expect that NiCl_2 pretreatment enhances DNA binding onto mica. Let us remind that Ni^{2+} ions (and transition metal ions) can form a large range of complexes with the mica surface compared to Mg^{2+} ions (Hansma and Laney, 1996). In particular, Ni^{2+} ions are able to form $(\text{Ni-OH})^+$ hydroxyl complexes (Gier and Johns, 2000; Koppelman and Dillard, 1977) thanks to their high ionic potential. The strong adsorption of Ni^{2+} ions during pretreatment neutralizes the mica surface if the major part of the potassium ions is exchanged with the Ni^{2+} ions. We can also expect a charge inversion. However, the force between the surfaces is generally still repulsive for the short range (Lau and Pincus, 1999). The reason is that the repulsive thermal force, due to the entropy loss of the counterion clouds, is stronger near the surface even if the mica surface charge is partially reversed by pretreatment. The pressure between the two oppositely charged surfaces becomes attractive for the large distances (see Fig.1). More precisely the electrostatic attraction overcomes the thermal repulsion if $d \geq d_0$; $d_0 = 2(z_e/l_b)|(1/\sigma_a + 1/\sigma_b)|$ (the distance d_0 is obtained by solving $P(d_0) = 0$).

The pretreatment by transition metal cations helps to adsorb DNA on mica because it neutralizes the mica surface

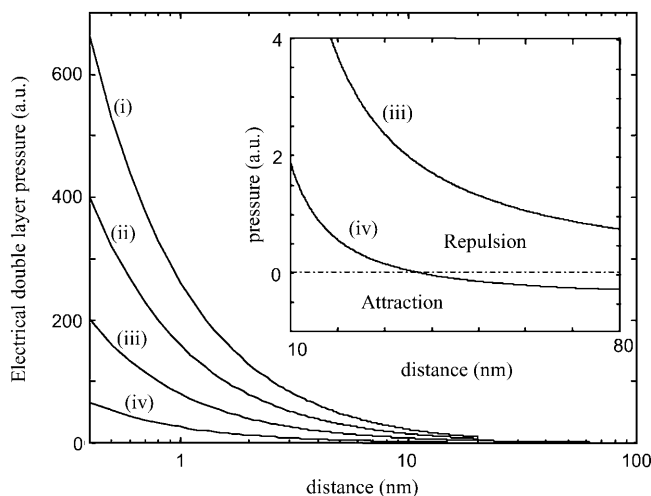


FIGURE 1 Electrical double-layer pressure acting between the mica and the DNA surface for several σ_a/σ_b ratios, with σ_a and σ_b the net surface charge densities of the mica and DNA surfaces, respectively: (i) $\sigma_a/\sigma_b = 4$ with $\sigma_b = 0.15 \text{ e.nm}^{-2}$ (net surface charge of DNA); (ii) $\sigma_a/\sigma_b = 2$; (iii) $\sigma_a/\sigma_b = 0.5$, (iv) $\sigma_a/\sigma_b = -0.5$. The repulsive pressure is weaker if the mica surface is less charged. Lower surface charge can be obtained through mica pretreatment by divalent cations. If the DNA and the mica surface are oppositely charged ($\sigma_a/\sigma_b = -0.5$), the electrical double force can become attractive for a distance of separation larger than d_0 (see the inset and the text for the d_0 value).

charge and then weakens the repulsive pressure. However, another kind of electrostatic force is required to explain the DNA adsorption. Indeed, to generate a strong attraction between the DNA and the mica, the two bodies should attract each other via a short-ranged force.

Attraction between two oppositely charged bodies

Highly charged surfaces in solution containing multivalent electrolytes can attract each other electrostatically through correlations in their shared counterion environments. To study the mechanism of this phenomenon, we use a simple model, which considers that DNA and mica surfaces are represented by two parallel lines of charges (Arenzon et al., 1999). Even if it is a rough approximation, it is particularly suitable to obtain qualitative information. We also assume that the only effect of the counterion association is a local renormalization of the surface charge and that the counterions are considered as point-like charges (Rouzina and Bloomfield, 1996b). The Hamiltonian H for the unscreened electrostatic interactions between the DNA line of charges and the mica line of charges takes a particularly simple form (Arenzon et al., 1999):

$$H = \frac{e^2}{2\epsilon} \sum_i \sum_j \frac{(1 - z_i \phi_i)(1 - z_j \phi_j)}{\sqrt{x_{ij}^2 + d^2}}, \quad (8)$$

where i is the label of the mica sites and j is the label of the DNA sites. It is important to note that d is the distance between the DNA/mica counterion layers. z_j is the valence of the j^{th} ion and $\sqrt{x_{ij}^2 + d^2}$ is the distance between the j^{th} DNA site and i^{th} mica site. ϕ_j or ϕ_i are the occupation variables of the sites. $\phi_j = 0$ if the j^{th} site is unoccupied whereas $\phi_j = 1$ if the j^{th} site is occupied. The charge sites onto the line are supposed to be spaced uniformly. For DNA, the mean distance between two charges is $b \cong 1 \text{ nm}$, which is obtained by considering the DNA surface charge $\sigma_{\text{DNA}} = 1 \text{ e.nm}^{-2}$ (Rouzina and Bloomfield, 1996b). For the mica, the distance between two charges is about $1/\sqrt{2} \text{ nm}$ (Pashley, 1982).

The force generated by the counterion correlations on the DNA line and the mica surface is then (Arenzon et al., 1999):

$$F_c(d) = \frac{e^2 d}{\epsilon} \sum_{ij} \frac{(1 - z_j \phi_j)(1 - z_i \phi_i)}{(x_{ij}^2 + d^2)^{3/2}}. \quad (9)$$

The optimum occupation variables of the sites are determined through the minimization of the free energy which, in turn, involves that the counterions of the DNA line with respect to the surface adopt a staggered configuration (Arenzon et al., 1999). It seems logical that the staggered configuration minimizes the free energy because if the site of one line is occupied and the parallel site of the second line remains vacant, the electrostatic repulsion between the two lines is weaker (see Fig. 2).

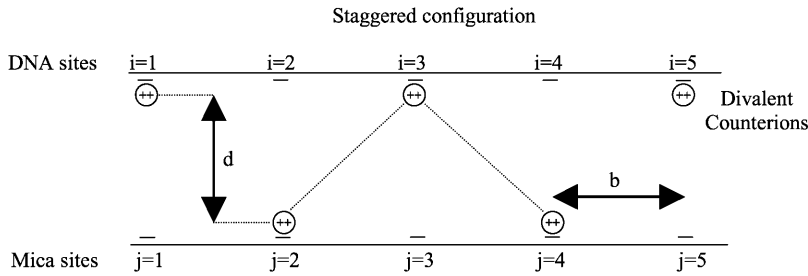


FIGURE 2 Position of the counterions in the staggered configuration. The labels i and j define the charged site position on the DNA and mica surfaces, respectively.

To simplify the calculations, we assume that only divalent counterions participate in the two lines' neutralization and we take $b' \cong b = 1$ nm. Fig. 3 is the plot of $F_c(d)$ for a perfect staggered configuration. It can be observed that the force is attractive and intervenes for the short distances $d < b$. As the range of the attraction is given by b , the separation between two sites along the lines, a short range is expected for highly charged bodies like DNA and mica. The curve on Fig. 3 represents the force obtained by neglecting the influences of the thermal motion and the competition between the monovalent/divalent cations, which can strongly influence the attraction mechanism.

Effect of the ionic strength on the thermal motion

We have assumed that the two lines of charges adopt a perfect staggered configuration, which in fact happens only for $T = 0$ K. Thermal motion at ambient temperature can perturb the counterion distribution and thus can weaken the attraction force. The ionic strength plays a key role in this mechanism

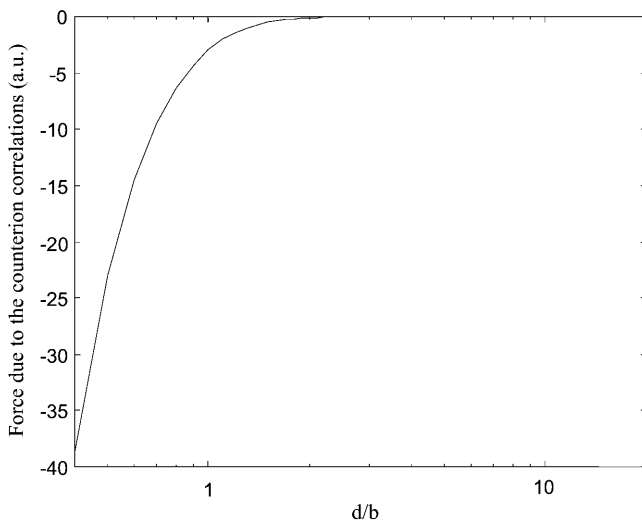


FIGURE 3 Attraction force generated by the counterions shared between the DNA and the mica. We assume that only the divalent counterions can participate in the surface neutralization and we neglect the effect of thermal motion ($T = 0$ K). b is the distance of separation between the counterion sites and d represents the distance between the DNA and mica counterion layers. The calculations are performed for a 1444-bp DNA.

because the cations are more likely to move if the electrostatic interactions are screened. To study the influence of the ionic strength on the attraction force, we discuss qualitatively its effect through the probability for one counterion to be placed in a nonstaggered position under ambient temperature:

$$\phi_{i=j} = \frac{a}{a+b}, \tag{10}$$

with:

$$a = \exp\left(\frac{-e^2}{\epsilon k_B T} \left(\frac{e^{-(d/\lambda_D)}}{d} - \frac{2e^{-(\sqrt{d^2+b^2}/\lambda_D)}}{\sqrt{d^2+b^2}} + \dots \right)\right), \tag{11a}$$

$$b = \exp\left(\frac{e^2}{\epsilon k_B T} \left(\frac{e^{-(d/\lambda_D)}}{d} - \frac{2e^{-(\sqrt{d^2+b^2}/\lambda_D)}}{\sqrt{d^2+b^2}} + \dots \right)\right), \tag{11b}$$

whereas the probability for a staggered position is:

$$\phi_{i=j+1} = \frac{b}{a+b}. \tag{12}$$

These probabilities are based on the interaction of one counterion with the nearest counterions of the other line assuming that the distance between two sites on the same line is b and the nearest counterions adopt a staggered configuration. λ_D is the Debye length that defines the screening length of the electrostatic potential in water and is expressed in nanometers as:

$$\lambda_D = \frac{0.33}{\sqrt{I}}, \tag{13}$$

with I the ionic strength of the solution (summing over all ions species i):

$$I = 1/2 \sum_i z_i^2 n_{bi}, \tag{14}$$

where z_i and n_{bi} are the valence and the bulk concentration of each species, respectively.

Let us separate the short distances of separation from the intermediate distances:

For the short distances of separation ($d \ll b$), the probability of nonstaggered position is very small because the average electrostatic energy between two

counterions, that is proportional to $e^2/\epsilon d$, is larger than the thermal energy $k_B T$. (Let us recall that the Bjerrum length l_b , ~ 0.7 nm in water, is the distance for which the electrostatic potential of two charges equals their thermal energy).

For the intermediate distances $l_b/10 < d < b$; we distinguish the high ionic strength ($I \geq 0.1$ M) and the low ionic strength environment ($I < 0.1$ M). Fig. 4 represents the probability for a nonstaggered position of the counterions versus the distance between the two lines for different ionic strengths.

At low ionic strength ($I < 0.1$ M), the Debye length is larger than the Bjerrum length. The electrostatic interactions between counterions can then maintain a pretty stable staggered configuration provided that b is not significantly larger than l_b . This condition is satisfied for highly charged bodies like DNA and mica. We can see in Fig. 4 that the probability for a nonstaggered position is lower than 0.35 if $d < b$ and just slightly depends on the ionic strength. Thus, the DNA attraction to mica is not ionic strength dependent for $I < 0.1$ M and the thermal motion perturbs weakly the DNA attraction.

Concerning higher ionic strength ($I \geq 0.1$ M), we observe in Fig. 4 that ionic strength strongly enhances the probability that a counterion occupies a nonstaggered position if $I \geq 0.1$ M. As a consequence, the DNA can become loosely attached to the surface. More generally, the force due to the correlations between the counterions is significantly screened provided that $\lambda_D < b$ (for DNA, it comes I

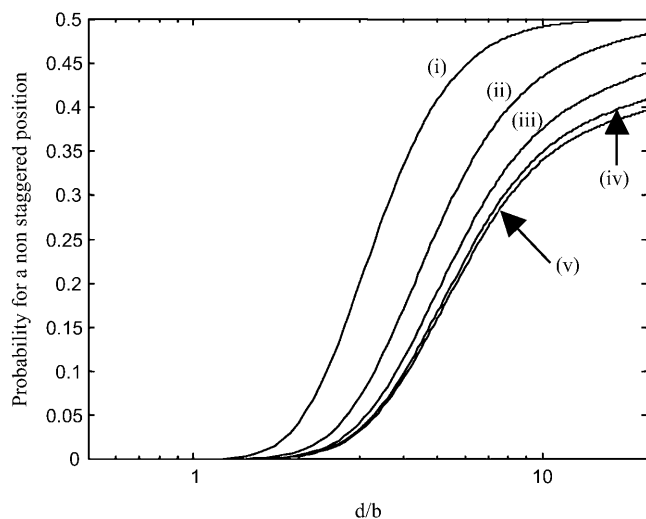


FIGURE 4 Plot of the occupation probability $\phi_{i=j}$ of a counterion in a nonstaggered configuration for (i) $I = 1$ M; (ii) $I = 0.1$ M; (iii) $I = 10$ mM; (iv) $I = 1$ mM; (v) $I = 0.1$ mM. If $\phi_{i=j} = 0.5$, the counterions are randomly distributed in the different sites: no adsorption due to the counterion correlation is attempted. We can see that the probability of a nonstaggered position is enhanced at higher ionic strength ($I \geq 0.1$ M) due to the screening effect of the ions.

≥ 0.1 M). Therefore, the thermal motion can inhibit the correlation between the counterions.

We shall also distinguish whether the mica has been pretreated or not. On untreated mica, the Mg^{2+} counterions that are generally added to the buffer for DNA binding to mica do not have a great affinity with the mica surface. The correlations of the Mg^{2+} counterions can therefore be perturbed by thermal agitation. On the other hand, Ni^{2+} ions (or other divalent transition metal cations) adsorbed at the mica surface after pretreatment are strongly bound to the mica surface (Gier and Johns, 2000) and can be considered fixed. As a consequence, adsorbed Ni^{2+} counterions can hardly be removed by thermal motion. This effect can partly explain why the divalent ions (Gier and Johns, 2000) pretreatment can enhance the DNA adsorption. Let us add that a strong attraction between two mica surfaces, in the presence of strongly bound divalent cations, has already been observed during surface force experiments in liquid (Pashley, 1982).

Effect of the competition between monovalent and divalent cations

One of the major features of the attraction force is its dependence upon the valence of the counterions. This force is attractive provided that the cations are divalent or of higher valence. The correlations of the monovalent cations do not contribute to the attraction force due to the $(1 - z_i \phi_i)$ terms in Eq. 9. Therefore, the adsorption is monitored by the binding competition between monovalent and divalent cations on the two surfaces. High surface density of monovalent cations can inhibit DNA attraction to the mica surface. Let us calculate the fractional DNA surface density of the divalent cation n_{s2} , which is the ratio of the divalent counterion surface density to the total surface density of the counterions. We can use a simple model to study the competitive electrostatic binding of monovalent and divalent counterions to mica. This model can be applied to DNA as well (Rouzina and Bloomfield, 1996b). With the P-B equation, it comes:

$$\begin{aligned} n_{s1} &= n_{b1} e^{e\psi/k_B T} \\ n_{s2} &= n_{b2} e^{2e\psi/k_B T}, \end{aligned} \quad (15)$$

where n_{b1} is the monovalent salt bulk concentration and n_{b2} is the divalent salt bulk concentration. n_{s1} is the fractional surface density of the monovalent cation. For this approach the effect of ion size and the specific surface/cation interactions are not taken into account, however, some improvements can be performed to adjust this model (Rouzina and Bloomfield, 1996a). The fractional surface density of the divalent cations versus the bulk concentration of the monovalent and divalent cations is obtained by solving this simple equation (Rouzina and Bloomfield, 1996b):

$$Y n_{s2}^2 - (2Y + 1) n_{s2} + Y = 0, \quad (16)$$

with:

$$Y = \frac{n_{b2}n_s}{n_{b1}^2}, \quad (17)$$

where n_s is the surface concentration of the counterions ($n_s \cong 6.6$ M for DNA; $n_s \cong 16$ M for mica). We remark that the fractional values of the divalent surface densities are constant for a given ratio n_{b2}/n_{b1}^2 , this characteristic implies that the force due to the counterion sharing is constant provided that $I < 0.1$ M.

To study the effect of divalent/monovalent salt competition, we plot the correlation force due to the counterion correlations for different n_{s2} values that correspond to a given n_{b2}/n_{b1}^2 ratio. The theoretical curves have been obtained by randomly filling the different sites of the two lines with divalent cations or monovalent cations so that the fractional counterion densities (n_{s1}, n_{s2}) for DNA and (n'_{s1}, n'_{s2}) for the mica are equal to the theoretical values calculated above. We assume in this section that the divalent counterions adopt a perfect staggered configuration and that the effect of the thermal motion can be neglected.

Fig. 5 A represents the force due to the counterion correlations for different n_{s2} values on the DNA surface for untreated mica, which means that the monovalent cations can compete for both the DNA and mica sites. We can see that the attraction force is greatly sensitive to the n_{s2} value. This effect is a constraint for the experimentalist, which cannot raise the monovalent salt concentration up to the physiological conditions without releasing DNA molecules from the surface.

Fig. 5 B represents the attractive force that pulls DNA on mica while mica has been pretreated by divalent transition metal cations. We assume that the divalent cations adsorbed during pretreatment cannot be removed due to their high binding affinity. Thus, the competition between monovalent and divalent cations acts only on the DNA sites and does not act on the mica sites. We can see in Fig. 5 B that the attraction force is stronger than the attraction force acting on untreated mica for the low n_{s2} values. In that respect, strongly adsorbed cations are more efficient to bind DNA via counterion correlations, which is in full agreement with experimental evidence on the strong adsorption of DNA on pretreated mica (Bezanilla et al., 1994; Piétrement et al., 2003; Thundat et al., 1992; Weisenhorn et al., 1990).

Hydration forces between the surfaces

The hydration forces arise when hydrated counterions are prevented from desorption as the two interacting surfaces approach (Israelachvili, 1992; Pashley, 1982). Dehydration of the cations leads to a strong repulsive hydration force. This repulsive force can be characterized by an exponential decaying force that overcomes the attractive force if the distance between the surfaces is shorter than the hydrated diameter of the counterions. For Mg^{2+} ions, the hydrated radius is 4.3 Å whereas for Na^+ ions the hydrated radius is 3.6 Å (Israelachvili, 1992). It can be remarked that the

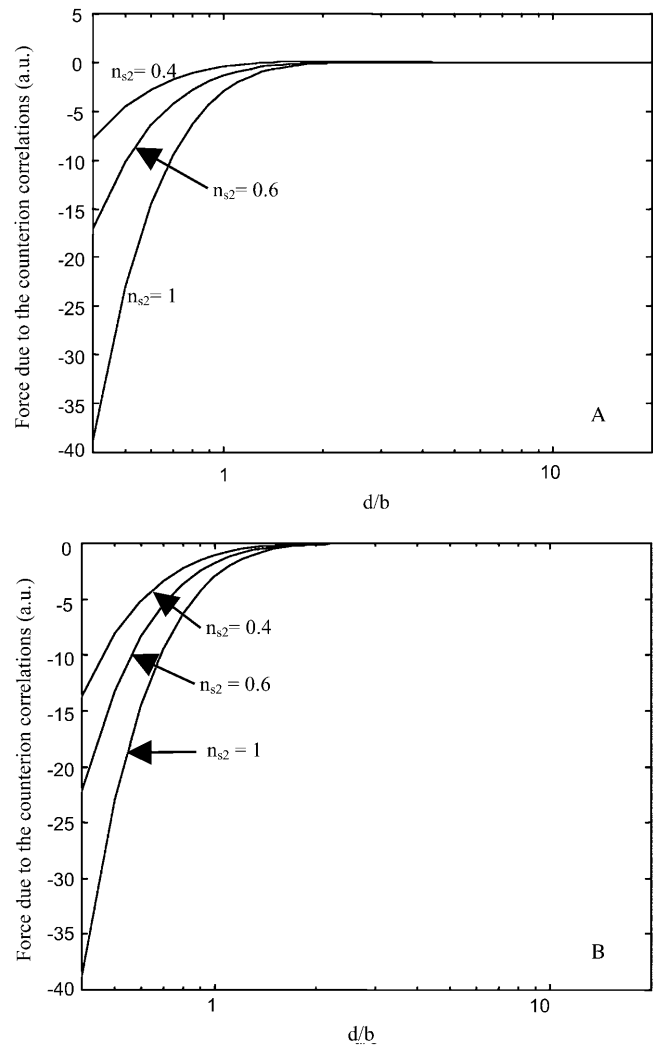


FIGURE 5 Effect of the competitive binding between monovalent and divalent cations on the attraction force due the correlations of the counterions where n_{s2} is the fractional divalent surface density of DNA. (A) For untreated mica, it should be remarked that the attraction force is weaker if the surface concentration of the divalent cation is lower. (B) For $NiCl_2$ pretreated mica, we can see that the mica pretreatment allows a higher binding strength compared to an untreated surface. It is assumed that the monovalent cations can compete with the divalent cations for the DNA neutralization but not for the mica neutralization if the mica has been pretreated.

hydrated radius of these ions is relatively small and the hydration forces should intervene at a shorter distance compared to the attraction force allowing the DNA adsorption. However, the adsorption of the DNA molecules can be inhibited by counterions with larger hydrated radius.

EXPERIMENTAL STUDY

Materials and methods

Atomic force microscope

These experiments were carried out using a Nanoscope IIIa atomic force microscope (Digital Instruments, Veeco, Santa

Barbara, CA). We used Olympus (Hamburg, Germany) silicon cantilevers AC160TS with resonant frequencies contained between 250 and 350 kHz. The scan frequency was typically 1 Hz per line and the modulation amplitude was about a few nanometers.

DNA samples

Twenty microliters of a 10 mM NiCl₂ solution was deposited onto the surface of a freshly cleaved mica (muscovite) for 1 min. Then, the mica was thoroughly rinsed with pure water (Molsheim, France) and dried. DNA fragments of 1444 bp were obtained from pBR322 plasmid (position 2576-4020) by polymerase chain reaction (PCR) amplification. PCR product is purified on an anion exchange monoQ column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) with a SMART system (Amersham Biosciences), ethanol precipitated and suspended in TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1mM). DNA length and the quality of the preparation were analyzed by 1% agarose gel and by electron microscopy (Beloin et al., 2003).

DNA molecules were diluted to a concentration of 0.2 μg/ml in a buffer solution containing 10 mM Tris and different MgCl₂ and NaCl concentrations (see below). A 5-μl droplet of DNA solution is deposited onto the NiCl₂-treated mica for 1 min. Then, the sample is thoroughly rinsed with the imaging solution. The drying step is performed after using a 0.02% diluted uranyl acetate solution for fixing the DNA molecules in their conformations (Revet and Fourcade, 1998).

RESULTS

Several experimental facts tend to indicate that the mica surface attracts DNA through counterion correlations because this force is strongly influenced by the relative bulk concentration of monovalent and divalent salts. Indeed, the addition of monovalent salt to the deposition buffer in the AFM cell can lead to release of the DNA molecules from the surface. High fractional bulk concentration of divalent salt favors the DNA binding and is generally used for imaging DNA by AFM (Allison et al., 1996; Bustamante and Rivetti, 1996; Cary et al., 1997; Guthold et al., 1994; Jiao et al., 2001; Thomson et al., 1996; Thundat et al., 1992; van Noort et al., 1998; Vesenska et al., 1992). These observations are consistent with the fact that the attraction force is monitored by the competition between monovalent ions and divalent ions, but more precise results are needed for this study.

We show previously that attraction force due to the counterion sharing is constant for a given $[Mg^{2+}]/[Na^+]^2$ ratio. This law can be very useful to the experimentalists and can provide a direct demonstration that the attraction is due to the counterion sharing. By varying the $[Mg^{2+}]/[Na^+]^2$ ratio, we can see if the binding strength of the DNA molecules is monitored by the divalent/monovalent cation

competition binding. In addition the effect of the ionic strength on the DNA binding strength can be studied by keeping n_{s2} constant for different MgCl₂ and NaCl concentrations.

Before processing AFM experiments, it is first required to find a way to study the DNA binding strength. It has been demonstrated that loosely bound molecules are able to equilibrate in a 2D conformation leading to the mean square of the end-to-end distance value h (Rivetti et al., 1996):

$$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \cong \sqrt{4PL}, \quad (18)$$

where P is the persistence length and L is the length of the DNA molecules.

If the molecules are strongly bound to the surface, the three-dimensional molecules could be projected onto the surface because the force that attracts the molecule is stronger and accelerates the molecule adsorption. The mean square of the end-to-end distance for a 3D/2D projection becomes (Rivetti et al., 1996):

$$\sqrt{\langle h^2 \rangle} \cong \sqrt{4/3PL}. \quad (19)$$

Thus, the DNA end-to-end distance is lower for a direct projection, which means that the end-to-end distance can be a very suitable parameter to study the DNA binding strength. The shorter the end-to-end distance is, the stronger the binding is. To measure the end-to-end distances we choose to work on treated mica because NiCl₂ pretreatment contributes to a better uniformity of the mica surface potential and allows us to bind DNA with a lower n_{s2} value. All the measurements are performed at least on 200 molecules and in air. All molecules with suspicious path and/or length were excluded from the analysis. The DNA lengths and end-to-end distances were measured with Scion Imaging software (Scion Corp., Frederick, MD).

These studies cannot be performed in liquid because moving DNA molecules are very difficult to image by AFM. Furthermore, for a n_{s2} value lower than 0.85 it appears that the atomic force microscope tip removes the DNA molecules from the surface and the images become very fuzzy. After the deposition of the diluted DNA solution onto the mica, the mica is rinsed with the deposition buffer, to remove DNA molecules in excess in the solution. Then, we fix the adsorbed DNA molecules in their conformations thanks to uranyl acetate and we dry the sample using filter paper.

We choose Tris buffer to maintain a stable pH (pH = 7.5) because Tris molecules carry a single positive charge in solution, which slightly perturbs the measurements contrarily to Hepes buffer that enhances the DNA attraction onto the mica surface due to its two positive charges (Bezanilla et al., 1995). Let us also remark that Tris ions can compete with Mg²⁺ ions for the DNA neutralization at very low ionic strength ($I < 0.03$ M) and can slightly reduce the relative Mg²⁺ surface concentration.

The end-to-end distance is measured for $n_{s2} \approx 0.95$ and $n_{s2} \approx 0.65$, and for five different concentrations of MgCl_2 and NaCl :

$$n_{s2} \cong 0.95 \left\{ \begin{array}{l} [\text{MgCl}_2] = 2 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 5 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 6 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 9 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 20 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 15 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 60 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 30 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 200 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 50 \text{ mM} \end{array} \right. ,$$

$$n_{s2} \cong 0.65 \left\{ \begin{array}{l} [\text{MgCl}_2] = 2 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 50 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 6 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 90 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 20 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 150 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 60 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 300 \text{ mM} \\ [\text{MgCl}_2] = 200 \text{ mM}, \quad [\text{NaCl}] = 500 \text{ mM} \end{array} \right. .$$

Figs. 6 and 7 present experimental results with AFM. Concerning $n_{s2} = 0.95$, this relatively high fractional surface concentration of Mg^{2+} ions should correspond to a strong DNA binding onto the mica. Fig. 6 shows a set of AFM images of DNA molecules for $n_{s2} = 0.95$. We observe that the molecules are trapped onto the surface and several crossovers indicate that the molecules have been projected. The molecules conformation is nearly the same for the different buffers whereas the ionic strength varies over several orders of magnitude. However, the end-to-end distance on Fig. 8 is larger at high ionic strength ($I > 0.1$ M), which indicates that DNA binding is weaker.

The same experiments are also performed for n_{s2} equal to 0.65. For low n_{s2} value, the DNA molecules are loosely attached on the mica surface and cannot be observed by AFM in liquid. Fig. 7 shows a set of AFM images of DNA molecules for $n_{s2} = 0.65$. We can see that just a few crossovers are observed: the molecules can equilibrate onto the surface. So the end-to-end distances (see Fig. 7) are larger than for $n_{s2} = 0.95$: lowering n_{s2} weakens the binding strength. Let us note that the binding strength is larger for $[\text{MgCl}_2] = 2$ mM and $[\text{NaCl}] = 50$ mM solution ($n_{s2} = 0.95$) than for $[\text{MgCl}_2] = 200$ mM and $[\text{NaCl}] = 50$ mM solution ($n_{s2} = 0.65$), which emphasizes that the binding is not only governed by the ionic strength.

We can also remark that the end-to-end distances are generally greater if the ionic strength is raised up to 0.1 M, whatever the fixed n_{s2} value is. At such a high ionic strength,

the molecules are certainly more loosely attached to the surface because the Debye length is lower than $b \cong 1$ nm, which is nearly equal to the range of the attraction force due to the counterion sharing. Therefore, the counterion distribution is perturbed by the thermal motion. It is remarkable to note in Fig. 8 that the ionic strength effect becomes significant at around 0.1 M, as predicted theoretically.

DISCUSSION

Attraction force due to the correlations of the counterions seems to be involved in the electrostatic adsorption of DNA. However, there is one point still to elucidate: is the attraction force larger than the electrical double-layer repulsion force and which parameters can define whether DNA is adsorbed on the surface or not? To answer these questions we study the asymptotic values of the DNA/surface forces in the short- and long-range limits.

Let us first consider the force acting on the polyelectrolyte in the large distance limit. From Eq. 7, if the two surfaces are like-charged, the limiting value of the electrical double-layer pressure is:

$$P(d) \cong \frac{k_B T}{l_b d^2}. \quad (20)$$

Concerning the attraction mediated by counterion sharing, this force is sharply reduced in the long range because of the thermal effect on the counterion distribution. Thus, the electrical double-layer force generally overcomes the attraction force for the long distance limit ($d \gg l_b$). The force is therefore not attractive if the surface and the polyelectrolyte are both negatively charged (or positively charged).

The long-range force can be attractive if the surface and the polyelectrolyte are oppositely charged. For mica, the net surface charge density can be reversed after pretreatment by transition metal cations. The long-range force can become attractive (see Fig. 1) and a reversible binding of the polyelectrolytes can be obtained (Piétrement et al., 2003). Indeed, if the n_{s2} value is decreased by adding monovalent salt to a divalent salt solution the binding strength becomes

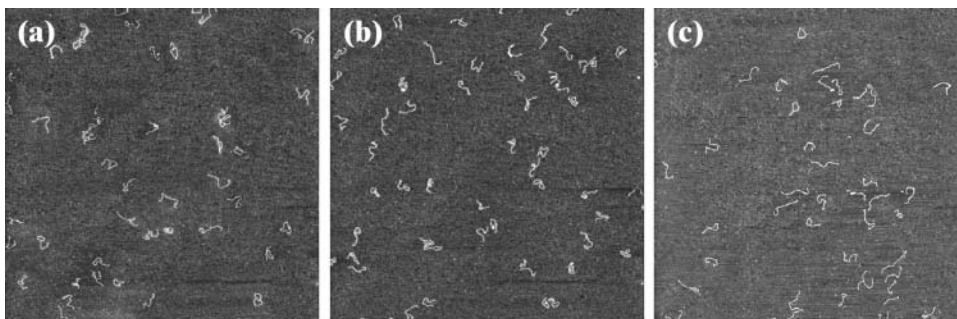


FIGURE 6 AFM images of the 1444-bp DNA fragments deposited onto mica for a n_{s2} value equal to 0.96 and with three different concentrations of MgCl_2 and NaCl : (a) $[\text{MgCl}_2] = 6$ mM and $[\text{NaCl}] = 9$ mM; (b) $[\text{MgCl}_2] = 20$ mM and $[\text{NaCl}] = 15$ mM; (c) $[\text{MgCl}_2] = 60$ mM and $[\text{NaCl}] = 30$ mM. Scan area, $4 \times 4 \mu\text{m}^2$; z range, 3 nm; scan frequency, 1 Hz.

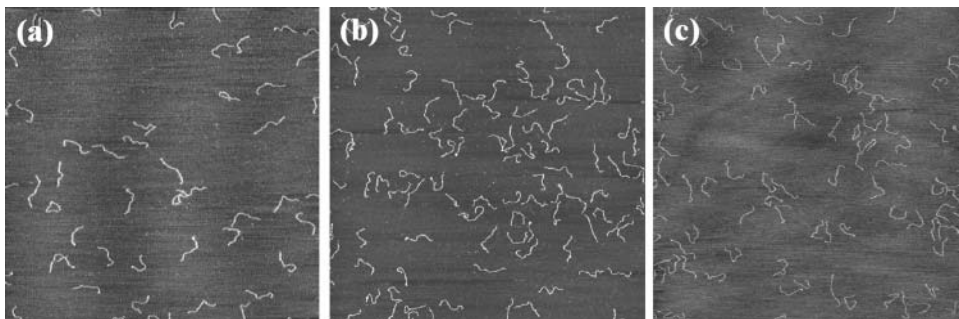


FIGURE 7 AFM images of the 1444-bp DNA fragments deposited onto mica for a n_{s2} value equal to 0.65 and with three different concentrations of MgCl_2 and NaCl : (a) $[\text{MgCl}_2] = 6$ mM and $[\text{NaCl}] = 90$ mM; (b) $[\text{MgCl}_2] = 20$ mM and $[\text{NaCl}] = 150$ mM; (c) $[\text{MgCl}_2] = 60$ mM and $[\text{NaCl}] = 300$ mM. Compared with Fig. 6, we can observe that DNA molecules have a more released shape, whereas they appear more condensed with a lot of crossovers for $n_{s2} = 0.95$. Scan area, $4 \times 4 \mu\text{m}^2$; z range, 3 nm; scan frequency, 1 Hz.

weaker but the long-range attractive force can prevent the DNA from being released in the solution. If n_{s2} is raised up, the molecule can bind tightly to the mica surface again.

For the short-range limit $d \ll l_b$, the double electrical layer pressure can be written ($\sigma_a \cong \sigma_{\text{mica}}$, $\sigma_b \cong \sigma_{\text{DNA}}$ in the short range):

$$P_{\text{repulsion}}(d) \approx k_B T \left| \frac{\sigma_a + \sigma_b}{zed} \right|, \quad (21)$$

whereas the pressure limit of the attraction force is:

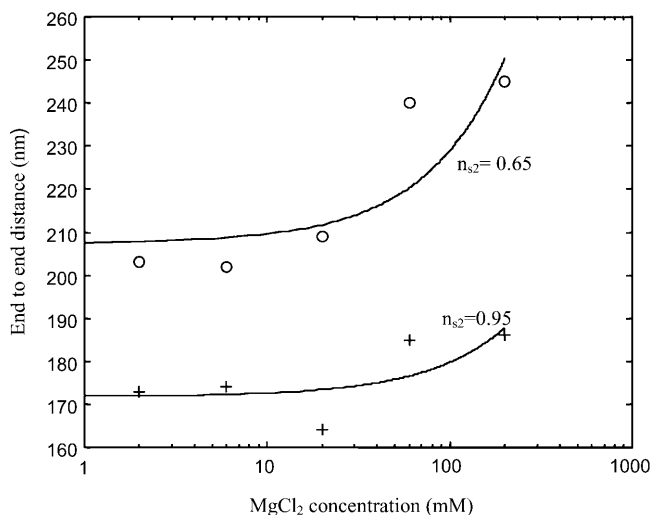


FIGURE 8 End-to-end distances for different buffers versus Mg^{2+} ions concentration: (top trace) $n_{s2} \cong 0.95$ obtained for six different buffers: $[\text{MgCl}_2] = 2$ mM and $[\text{NaCl}] = 5$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 6$ mM and $[\text{NaCl}] = 9$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 20$ mM and $[\text{NaCl}] = 15$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 60$ mM and $[\text{NaCl}] = 30$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 200$ mM and $[\text{NaCl}] = 50$ mM. (Bottom trace) $n_{s2} \cong 0.65$ obtained for six different buffers: $[\text{MgCl}_2] = 2$ mM and $[\text{NaCl}] = 50$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 6$ mM and $[\text{NaCl}] = 90$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 20$ mM and $[\text{NaCl}] = 150$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 60$ mM and $[\text{NaCl}] = 300$ mM; $[\text{MgCl}_2] = 200$ mM and $[\text{NaCl}] = 500$ mM. The error bar of the end-to-end measurements is about ± 30 nm and can hardly be improved by increasing the number of observed molecules. The experimental values of the end-to-end distances have been fitted by a polynomial function to observe the evolution of the end-to-end distances. We observe that the end-to-end distances appear to be nearly constant at low ionic strength for a given value of n_{s2} . However, for the high ionic strength ($I \geq 0.1$ M), the end-to-end distances are slightly larger for both $n_{s2} = 0.95$ and $n_{s2} = 0.65$.

$$P_{\text{attraction}}(d) \approx -\frac{e|\sigma_m|}{\varepsilon d^2} \approx -\frac{k_B T l_b}{d^2} \left| \frac{\sigma_m}{e} \right|, \quad (22)$$

where $\sigma_m = \min(\sigma_a, \sigma_b)$. $1/\sqrt{|\sigma_m/e|}$ is proportional to the distance between two counterions on the lower-charged surface. The divalent counterions of this surface experience a coulombic force with an unoccupied site on the higher-charged surface.

The attraction force can bind tightly DNA to the surface in the short range because the repulsive pressure of the electrical double-layer scales like $1/d$ whereas the pressure of the attraction force scales like $1/d^2$. We can consider the distance d^* that defines the limit where the attraction overcomes the repulsion:

$$d^* \approx l_b \left| \frac{\sigma_m}{\sigma_a + \sigma_b} \right|. \quad (23)$$

Therefore d^* is proportional to $\sigma_m/(\sigma_a + \sigma_b)$, which indicates that the attraction overcomes the repulsion at the largest distance d^* if σ_a (surface) $\cong \sigma_b$ (polyelectrolyte). Only a highly charged surface can attract the highly charged DNA molecules. Because the surface charge densities of the mica and DNA are nearly the same, this equation provides a direct demonstration of the mica ability to adsorb DNA compared to other less-charged surfaces. Silica is a slightly negatively charged surface compared to DNA and DNA molecules cannot be adsorbed on this surface by adding only divalent cations.

CONCLUSION

Attraction force due to the correlations of the shared counterions between the DNA molecules and the mica can generate a strong adsorption of the DNA molecules in the presence of divalent cations or higher valence cations. Mica and DNA have nearly the same surface charge. In this case, the theoretical results indicate that this configuration is suitable for the DNA binding: bodies that have a surface charge concentration of the same order of magnitude can attract each other through correlation of their counterion clouds.

In addition, we have demonstrated that the adsorption strength can be monitored by adding monovalent cations that

can compete with divalent cations for the DNA and mica neutralization. Low surface concentration of divalent cations leads to a very loose attachment of the DNA to the surface. Concerning the effect of the ionic strength, it appears that the binding of the DNA molecules is affected by the screening effect of the ions if $\lambda_D < b$.

To enhance the binding, pretreatment with divalent metal cations or higher valence cations can be performed. Pretreatment lowers the net surface charge of the mica and then reduces the repulsive pressure due to the interpenetrating counterion clouds. Moreover, strongly adsorbed transition metal cations are hardly exchanged with monovalent cations and do not experience thermal fluctuation, which strengthens the binding.

REFERENCES

- Allison, D. P., P. S. Kerper, M. J. Doktycz, J. A. Spain, P. Modrich, F. W. Larimer, T. Thundat, and R. J. Warmack. 1996. Direct atomic force microscope imaging of EcoRI endonuclease site specifically bound to plasmid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:8826–8829.
- Arenzón, J. J., J. F. Stille, and Y. Levin. 1999. Simple model for attraction between like-charged polyions. *Eur. Phys. J. B*. 12:79–82.
- Beloin, C., J. Jeusset, B. Revet, G. Mirambeau, F. Le Hegarat, and E. Le Cam. 2003. Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the bacillus subtilis LrpC protein. *J. Biol. Chem.* 278:5333–5342.
- Beltrán, S., H. H. Hooper, H. W. Blanch, and J. M. Prausnitz. 1991. Monte Carlo study of polyelectrolyte adsorption: isolated chains on a planar charged surface. *Macromolecules*. 24:3178–3184.
- Bezanilla, M., B. Drake, E. Nudler, M. Kashlev, P. K. Hansma, and H. G. Hansma. 1994. Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope. *Biophys. J.* 67:2454–2459.
- Bezanilla, M., S. Manne, D. E. Laney, Y. L. Lyubchenko, and H. G. Hansma. 1995. Adsorption of DNA to mica, silylated mica, and minerals: characterization by atomic force microscopy. *Langmuir*. 11:655–659.
- Bustamante, C., and C. Rivetti. 1996. Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25:395–429.
- Cary, R. B., S. R. Peterson, J. Wang, D. G. Bear, E. M. Bradbury, and D. J. Chen. 1997. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:4267–4272.
- Craig, V. S. J., B. W. Ninham, and R. M. Pashley. 1998. Study of the long-range hydrophobic attraction in concentrated salt solutions and its implications for electrostatic models. *Langmuir*. 14:3326–3332.
- Gier, S., and W. D. Johns. 2000. Heavy metal-adsorption on micas and clay minerals studied by X-ray photoelectron spectroscopy. *Applied Clay Science*. 16:289–299.
- Guthold, M., M. Bezanilla, D. A. Erie, B. Jenkins, H. G. Hansma, and C. Bustamante. 1994. Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:12927–12931.
- Han, W., S. M. Lindsay, M. Dlakic, and R. E. Harrington. 1997. Kinked DNA. *Nature*. 386:563–564.
- Hansma, H. G., and D. E. Laney. 1996. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 70:1933–1939.
- Israelachvili, J. N. 1992. Intermolecular and Surface Forces. Academic Press Inc., San Diego.
- Jiao, Y., D. I. Cherny, G. Heim, T. M. Jovin, and T. E. Schaffer. 2001. Dynamic interactions of p53 with DNA in solution by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 314:233–243.
- Kjellander, R., and S. Marrelja. 1986. Double-layer interaction in the primitive model and the corresponding Poisson-Boltzmann description. *J. Phys. Chem.* 90:1230–1232.
- Koppelman, M. H., and J. D. Dillard. 1977. A study of the adsorption of Ni(II) and Cu(II) by clay minerals. *Clays Clay Miner.* 73:457–462.
- Komyshv, A. A., and S. Leikin. 1999. Electrostatic zipper motif for DNA aggregation. *Phys. Rev. Lett.* 82:4138–4141.
- Lau, A. W. C. 2000. Fluctuation and Correlation Effect in Electrostatics on Highly Charged Surface. University of California, Santa Barbara, CA.
- Lau, A. W. C., and P. Pincus. 1999. Binding of oppositely charged membranes and membrane reorganization. *Eur. Phys. J. B*. 10:175–180.
- Levin, Y. 1999. When do like charges attract? *Physica A*. 265:432–439.
- Manning, G. S. 1978. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q. Rev. Biophys.* 11:179–246.
- Netz, R. R., and J.-F. Joanny. 1999. Adsorption of semiflexible polyelectrolytes on charged planar surfaces: charge compensation, charge reversal, and multilayer formation. *Macromolecules*. 32:9013–9025.
- Ni, H., C. F. Anderson, and M. T. Record, Jr. 1999. Quantifying the thermodynamic consequences of cation (M²⁺, M⁺) accumulation and anion (X⁻) exclusion in mixed salt solutions of polyanionic DNA using Monte Carlo and Poisson-Boltzmann calculations of ion-polyion preferential interaction coefficients. *J. Phys. Chem. B*. 103:3489–3504.
- Pashley, R. M. 1982. Hydration forces between mica surfaces in electrolyte solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 16:57–62.
- Pashley, R. M., and J. N. Israelachvili. 1984. DLVO and hybridization forces between mica surfaces in Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ chloride solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 97:446–455.
- Piétremont, O., D. Pastré, S. Fusil, J. Jeusset, M.-O. David, F. Landousy, L. Hamon, A. Zozime, and E. Le Cam. 2003. Reversible binding of DNA on NiCl₂ treated mica by varying the ionic strength. *Langmuir*. 19:2536–2539.
- Ray, J., and G. S. Manning. 1994. An attractive force between two rodlike polyions mediated by the sharing of condensed counterions. *Langmuir*. 10:2450–2461.
- Revet, B., and A. Fourcade. 1998. Short unligated sticky ends enable the observation of circularised DNA by atomic force and electron microscopies. *Nucleic Acids Res.* 26:2092–2097.
- Rivetti, C., M. Guthold, and C. Bustamante. 1996. Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* 264:919–932.
- Rouzina, I., and V. A. Bloomfield. 1996a. Competitive electrostatic binding of charged ligands to polyelectrolytes: planar and cylindrical geometries. *J. Phys. Chem.* 100:4292–4304.
- Rouzina, I., and V. A. Bloomfield. 1996b. Influence of ligand spatial organization on competitive electrostatic binding to DNA. *J. Phys. Chem.* 100:4305–4313.
- Saecker, R. M., and M. T. Record, Jr. 2002. Protein surface salt bridges and paths for DNA wrapping. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:311–319.
- Shao, Z., J. Mou, D. M. Czajkowsky, J. Yang, and J. Y. Yuan. 1996. Biological atomic force microscopy: what is achieved & what is needed. *Advances in Physics*. 45:1–86.
- Sitko, J. C., E. M. Mateescu, and H. G. Hansma. 2003. Sequence-dependent DNA condensation and the electrostatic zipper. *Biophys. J.* 84:419–431.
- Thomson, N. H., S. Kasas, B. L. Smith, H. G. Hansma, and P. K. Hansma. 1996. Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging. *Langmuir*. 12:5905–5908.
- Thundat, T., X.-Y. Zheng, S. L. Sharp, D. P. Allison, D. C. Joy, and T. L. Ferrell. 1992. Calibration of atomic force microscope tips using biomolecules. *Scanning Microsc.* 6:903–910.

- Vainrub, A., and B. M. Pettitt. 2000. Thermodynamics of association to a molecule immobilized in an electric double layer. *Chemical Physics Letters*. 323:160–166.
- van der Schee, H. A., and J. Lyklema. 1984. A lattice theory of polyelectrolyte adsorption. *J. Phys. Chem.* 88:6661–6667.
- van Noort, S. J., K. O. van der Werf, A. P. Eker, C. Wyman, B. G. de Groot, N. F. van Hulst, and J. Greve. 1998. Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope. *Biophys. J.* 74:2840–2849.
- Vesenka, J., M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delain, and C. Bustamante. 1992. Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope. *Ultramicroscopy*. 42–44:1243–1249.
- Weisenhorn, A. L., H. E. Gaub, H. G. Hansma, R. L. Sinsheimer, G. L. Kelderman, and P. K. Hansma. 1990. Imaging single-stranded DNA, antigen-antibody reaction and polymerized Langmuir-Blodgett films with an atomic force microscope. *Scanning Microsc.* 4:511–516.

Annexe C3-3

Reversible binding of DNA on NiCl₂ treated mica by varying the ionic strength.

Piétrement, O., D. Pastré, S. Fusil, J. Jeusset, M.-O. David, F. Landousy, L. Hamon, A. Zozime, and E. Le Cam. 2003.

Langmuir 19:2536-2539.

Cette étude expérimentale en milieu liquide montre l'intérêt d'utiliser du mica prétraité nickel pour l'adsorption de l'ADN sur le mica. Sur mica non prétraité l'augmentation de la force ionique en sel monovalent fait irréversiblement partir l'ADN sur la surface, tandis que sur mica prétraité nickel, il est possible d'alterner réversiblement entre des conditions de forte adsorption où l'ADN est facile à observer et des conditions de faible adsorption où l'ADN est difficile à observer mais reste sur la surface.

Reversible Binding of DNA on NiCl₂-Treated Mica by Varying the Ionic Strength

Olivier Piétrement,[†] David Pastré,^{*,‡} Stéphane Fusil,[‡] Josette Jeusset,[†] Marie-Odile David,[‡] Fabrice Landousy,[†] Loïc Hamon,[‡] Alain Zozime,[‡] and Eric Le Cam[†]

Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, UMR 8126 CNRS, Institut Gustave-Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France, and Laboratoire Milieux Nanométriques, Université d'Evry, Rue du Pere Jarlan, 91025 Evry Cedex, France

Received December 3, 2002. In Final Form: January 22, 2003

The atomic force microscope is a key tool for investigating DNA conformation and DNA–protein interactions in liquid. The main advantage of this technique is that moving molecules can be studied in real time provided that molecules are sufficiently bound to the surface. Mg²⁺ ions with a very low concentration of monovalent salt are generally used to attach DNA on mica because monovalent counterions inhibit the DNA electrostatic attraction with the surface. However, monovalent counterions at physiological concentrations are necessary to obtain specific DNA/protein interactions. To solve this problem, we propose a new protocol to obtain a reversible binding of DNA on NiCl₂-pretreated mica. This protocol uses Mg²⁺ ions for monitoring DNA attachment on NiCl₂-pretreated mica, which allows the DNA molecules to remain bound to the surface even at high NaCl concentration thanks to Ni²⁺ ions adsorbed on the surface.

Introduction

Since the invention of tapping mode, the atomic force microscope (AFM) has become a widely used tool for imaging biological processes in liquids. The AFM has notably shown its ability to study properties of DNA, alone or in interactions with different proteins.^{1–6} Nevertheless, several problems are still unresolved. Indeed, different requirements are necessary to perform DNA–protein experiments with the AFM in biological conditions:

Suitable substrates should combine atomic flatness and biocompatibility. Various substrates have been proposed, but mica remains up to now the most convenient surface for DNA imaging. Immobilization of DNA on mica is based on adsorption from solution where a net attractive force is pulling the molecules onto the mica surface. Weak electrostatic attachment of the DNA to the surface is obtained by adding divalent cations (Mg²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, etc.) into the buffer, either with a pretreated mica^{7–9} or without.^{10–12}

DNA molecules should be accessible to protein and then should not be too firmly attached to the substrate surface. The direct visualization of the protein/DNA interactions on mica in a dynamic way has been the aim of several works.^{2,3,5,13–15} However, moving DNA molecules are very difficult to image because the AFM tip pulls them during the scan, even in tapping mode. Therefore, AFM images of DNA can be very fuzzy.

Experimental conditions should guarantee the specific activity of protein. This implies working under a high monovalent salt concentration. Unfortunately, a high monovalent salt concentration removes the DNA molecules from the surface because the monovalent ions screen the electrostatic interactions and compete with divalent ions for neutralizing the DNA and the surface. To our knowledge, no AFM studies on DNA/protein interactions in liquid are dealing with a monovalent salt concentration higher than 50 mM. Indeed, the presence of divalent cations in a range from 4 to 10 mM and a low monovalent salt concentration are generally used to keep the DNA/surface attraction. These buffer solutions for DNA imaging may thus favor nonspecific DNA/protein interactions.²

As pointed out by Thomson et al.,¹² reversible binding to mica may be a suitable solution to study DNA dynamics by AFM. Indeed, the best compromise would be to let the molecules be free to interact with the proteins under high ionic strength and, then, to image them by using a lower monovalent salt concentration to strengthen the binding.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (33) 1 69 47 03 03. Fax: (33) 1 69 47 76 72. E-mail: D.Pastre@iut.univ-evry.fr.

[†] Institut Gustave-Roussy.

[‡] Université d'Evry.

(1) Le Cam, E.; Fréchon, D.; Barray, M.; Fourcade, A.; Delain, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 11816–11820.

(2) Guthold, M.; Bezanilla, M.; Erie, D. A.; Jenkins, B.; Hansma, H. G.; Bustamante, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 12927–12931.

(3) Lyubchenko, Y. L.; Jacobs, B. L.; Lindsay, S. M.; Stasiak, A. *Scanning Microsc.* **1995**, *9*, 705–727.

(4) Allisson, D. P.; Kerper, P. S.; Dorkycz, M. J.; Spain, J. A.; Modrich, P.; Larimer, F. W.; Thundat, T.; Warmack, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 8826–8829.

(5) Révet, B.; Fourcade, A. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2092–2097.

(6) Van Noort, S. T. J.; van der Werf, K. O.; Eker, A. P. M.; Wyman, C.; de Grooth, B. G.; van Hulst, N. F.; Greve, J. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2840–2849.

(7) Bustamante, C.; Vesenka, J.; Tang, C. L.; Rees, W.; Guthold, M.; Keller, R. *Biochemistry* **1992**, *31*, 22–26.

(8) Thundat, T.; Allison, D. P.; Warmack, R. J.; Ferrell, T. L. *Ultramicroscopy* **1992**, *42–44*, 1101–1106.

(9) Bezanilla, M.; Drake, B.; Nudler, E.; Kashlev, M.; Hansma, P. K.; Hansma, H. G. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2454–2459.

(10) Vesenka, J.; Guthold, M.; Tang, C. L.; Keller, D.; Delain, E.; Bustamante, C. *Ultramicroscopy* **1992**, *42*, 1243–1249.

(11) Thundat, T.; Allison, D. P.; Warmack, R. J.; Brown, G. M.; Jacobson, K. B.; Schrick, J. J.; Ferrell, T. L. *Scanning Microsc.* **1992**, *6*, 911–918.

(12) Thomson, N. H.; Kasas, S.; Smith, B.; Hansma, H. G.; Hansma, P. K. *Langmuir* **1996**, *12*, 5905–5908.

(13) Bustamante, C.; Rivetti, C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 395–429.

(14) Cary, R. B.; Peterson, S. R.; Wang, J.; Bear, D. G.; Morton Bradbury, E.; Chen, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *74*, 2840–2849.

(15) Jiao, Y.; Cherny, D. I.; Heim, G.; Jovin, T. M.; Schäffer, T. E. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 221–231.

The aim of this work is to reach a good compromise which allows specific protein interactions with DNA molecules and good imaging conditions by using reversible binding. We propose a simple method to control the fixation of DNA molecules on a mica surface. This method optimizes accessibility and biological activity of DNA. First, we treat mica by depositing a 10 mM NiCl_2 solution onto a freshly cleaved surface. NiCl_2 treatment contributes to a better uniformity of the surface potential, and Ni^{2+} ions can be strongly bound to the mica surface so that they can hardly be exchanged with monovalent counterions. Then, the DNA molecule deposition is achieved. By using several buffers with various NaCl and MgCl_2 concentrations, it is possible to switch between different conditions in which the DNA molecules are more or less strongly bound to the mica surface. This reversible binding can be repeated during several cycles. One of the major advantages of this technique is the ability to increase the NaCl concentration in order to favor specific DNA–protein interactions. In this case, the DNA molecules are nearly free to move above the surface and the influence of the substrate is minimized.

Materials and Methods

Atomic Force Microscope. These experiments were carried out using a Nanoscope III AFM (Digital Instrument, Veeco) and a Plexiglas tapping-mode fluid cell with a sealing ring. We used V-shaped silicon nitride cantilevers 100 μm long with resonant frequencies in liquids contained between 26 and 32 kHz. The scan frequency was typically 5 Hz per line, and the modulation amplitude was about a few nanometers. The AFM cell was cleaned with ethanol before each use.

DNA Samples. A 10 mM NiCl_2 solution (20 μL) was deposited onto the surface of a freshly cleaved mica (muscovite) sample for 1 min. The mica was then thoroughly rinsed with pure water (MilliQ, Millipore) and dried with a filter paper.

DNA fragments of 1444 base pairs were obtained from pBR322 plasmids by PCR amplification (position, 2576–4020). DNA molecules were diluted to a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in a buffer solution (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl_2). A 5 μL droplet of DNA solution is deposited onto the NiCl_2 -treated mica. Then, the sample is mounted in the AFM liquid cell that is thoroughly rinsed with the imaging solution via the connected hosing and syringe. No drying step is required. This system allows one to change the solution of the liquid cell as one wants.

Results and Discussion

To control the immobilization of DNA on NiCl_2 -treated mica, it is necessary to understand the effects of Mg^{2+} ions and Ni^{2+} ions on DNA electrostatic binding. Adding MgCl_2 or other divalent salts to the deposition buffer is necessary to attract DNA molecules to the mica surface. This result is in agreement with former studies: Mg^{2+} ions contribute to the charge neutralization of the DNA backbone,^{16,17} like monovalent counterions, and enhance the electrostatic DNA attraction to the mica surface. The point is that DNA binding mediated by Mg^{2+} is very loose on untreated mica because Mg^{2+} ions do not exhibit a great affinity for mica.^{18–20} As a consequence, DNA binding to the surface for AFM imaging is then limited: DNA molecules can be imaged only by using a solution with a low NaCl concentration ($[\text{NaCl}] \leq 5 \text{ mM}$) and a high MgCl_2 concentration ($[\text{MgCl}_2] \geq 15 \text{ mM}$).

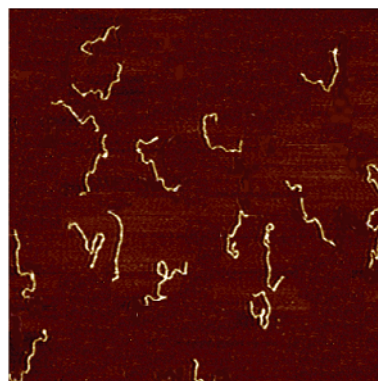


Figure 1. AFM image of DNA molecules on NiCl_2 -treated mica in a 10 mM Tris pH 7.5/10 mM MgCl_2 /10 mM NaCl buffer solution. The DNA molecules are well-defined because they are tightly bound to the mica surface due to the high MgCl_2 concentration and NiCl_2 mica pretreatment. Scan area, $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$; z range, 4 nm; scan frequency, 5 Hz.

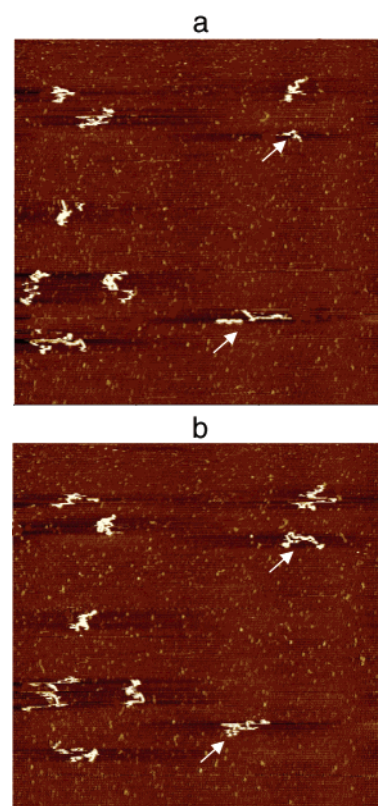


Figure 2. Consecutive AFM images of DNA molecules on NiCl_2 -pretreated mica in a 10 mM Tris pH 7.5/2 mM MgCl_2 /10 mM NaCl buffer solution. With a lower MgCl_2 concentration, we can observe that some molecules are moving at the surface (see arrows). The molecules are loosely bound to mica and appear fuzzy because the AFM resolution is affected by the DNA movements. Scan area, $3 \times 3 \mu\text{m}^2$; z range, 3 nm; scan frequency, 5 Hz.

However, the MgCl_2 concentration used for binding DNA to mica can be considerably reduced ($[\text{MgCl}_2] \leq 10 \text{ mM}$) by using NiCl_2 treatment. This effect has been previously observed by Bezanilla et al.⁹ Ni^{2+} ions are transition metal ions and, unlike Mg^{2+} ions, can form a large range of complexes with the mica surface.²¹ The strong adsorption of Ni^{2+} ions during pretreatment partially neutralizes the mica surface. Therefore, the long-range repulsive force between the diffuse counterion layer on the mica surface

(16) Li, A. Z.; Huang, H.; Re, X.; Qi, L. J.; Marx, K. A. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 964–973.

(17) Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 3152–3164.

(18) Pashley, R. M.; Israelachvili, J. N. *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, *97*, 446–455.

(19) Rabke, C. E.; Wenzler, L. A.; Beebe, T. P., Jr. *Scanning Microsc.* **1994**, *8*, 471–478.

(20) Boichot, S. Ph.D. Thesis, University of Franche-Comté, Besancon, France, 2000.

(21) Hansma, H. G.; Laney, D. E. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1933–1939.

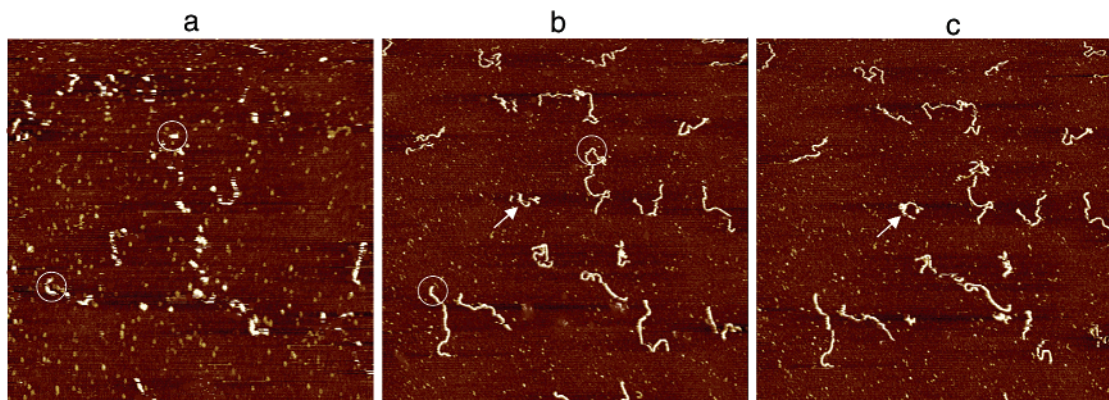


Figure 3. (a) When a 10 mM Tris pH 7.5/200 mM NaCl solution is injected into the liquid cell, no DNA molecules can be imaged by the AFM tip. The high salt concentration partially released the DNA molecules in the solution, but we can still see some bright spots (see circles) attesting to the partial binding. These bright spots correspond to some part of the DNA bound to the mica surface thanks to Ni^{2+} ions. This configuration is perfectly adapted to study DNA–protein interactions because the DNA molecules can move freely above the surface. (b,c) Consecutive images of the same area obtained by injecting 10 mM Tris pH 7.5/5 mM MgCl_2 solution into the liquid cell. DNA molecules appear after a few minutes at the surface. In this way, we obtain a reversible binding of DNA to mica. In addition, we can remark that the contours of some molecules seem to match some bright spots of the preceding image, (a) (see circles). Note that the binding is weak and the molecules are still moving (see arrows). Scan area, $3 \times 3 \mu\text{m}^2$; z range, 3 nm; scan frequency, 5 Hz.

and the DNA counterions is reduced. In addition, the Ni^{2+} ions can create direct bridging between the DNA molecules and the mica surface.

To obtain freely moving DNA on nickel-treated mica, we observe by AFM the DNA adsorption in different buffer conditions. Figure 1 shows an AFM image obtained in a buffer solution of 10 mM Tris pH 7.5/10 mM MgCl_2 /10 mM NaCl. For such a high MgCl_2 concentration ($[\text{MgCl}_2] > 10 \text{ mM}$), DNA molecules are clearly resolved by the AFM. The good lateral resolution means that DNA molecules are very tightly bound on the mica surface, which is not adequate to observe specific DNA–protein interactions. To obtain moving DNA molecules, a deposition buffer with a MgCl_2 concentration lower than 5 mM is required. Figure 2 shows two consecutive images of DNA molecules obtained in a buffer solution of 10 mM Tris pH 7.5/2 mM MgCl_2 /10 mM NaCl. One can see that some DNA molecules can move on the surface. The lateral resolution is affected by the DNA movements, partly induced by the tip scan. This effect cannot be avoided when loosely bound DNA molecules are imaged by the AFM.

We can take advantage of the Ni^{2+} ions' affinity for mica to increase the ionic strength without releasing DNA molecules in the liquid cell. Figure 3 shows an image of DNA molecules after injection of a 10 mM Tris pH 7.5/200 mM NaCl buffer solution into the fluid cell. DNA molecules are no longer visible but are not released from the mica surface. Indeed, we can see some bright spots that correspond to some parts of DNA molecules bound to the surface. DNA molecules are nearly free to move above the surface because only a few segments of the DNA chains are adsorbed when the ionic strength is raised. Such a partial adsorption of DNA chains was also observed theoretically in a Monte Carlo study.²² According to the requirements described in the Introduction, this configuration seems to be perfectly suitable for studying DNA–protein interactions.

If DNA molecules are bound to the surface thanks to Ni^{2+} cations under high ionic strength, it is then possible to bind them again by lowering the NaCl concentration and/or increasing the Mg^{2+} concentration. Figure 3b,c

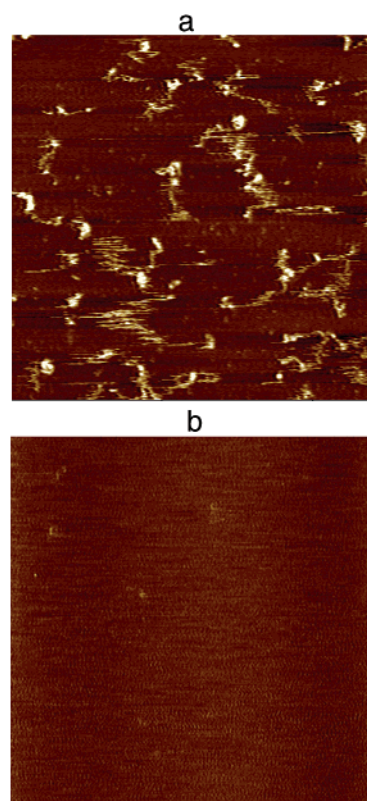


Figure 4. (a) AFM image of DNA molecules on untreated mica in a 10 mM Tris pH 7.5/20 mM MgCl_2 /2 mM NaCl buffer solution. DNA molecules are moving on untreated mica even at high MgCl_2 concentration. Then we inject 10 mM Tris pH 7.5/200 mM NaCl solution into the liquid cell to raise the ionic strength. (b) AFM image of the same surface obtained in 10 mM Tris pH 7.5/5 mM MgCl_2 solution. No DNA molecules are visible anymore. Thus, DNA molecules are definitely released in the liquid cell. Scan area, $2 \times 2 \mu\text{m}^2$; z range, 3 nm; scan frequency, 5 Hz.

shows consecutive images of the same area under a 10 mM Tris pH 7.5/5 mM MgCl_2 buffer solution. DNA molecules appear after a few minutes due to the effect of Mg^{2+} ions that create salt bridges between the surface and the DNA molecules.²³ In this way, we obtain a reversible binding fully compatible with biological re-

(22) Beltrán, S.; Hooper, H. H.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M. *Macromolecules* **1991**, *24*, 3178–3184.

quirements. We can observe that the molecules are slightly moving, which indicates a weaker binding. This procedure is fully reversible: the cycle can be performed on the same sample several times in a row.

The assumption that DNA molecules are still partially bound to the surface for high NaCl concentrations is supported by the fact that the molecules are still imaged. We perform the same experiment on untreated mica. Figure 4a shows an image of DNA molecules obtained under an imaging solution of 10 mM Tris pH 7.5/20 mM MgCl_2 /10 mM NaCl on untreated mica. After the injection of a 10 mM Tris pH 7.5/200 mM NaCl buffer solution, DNA molecules are released in the liquid cell, as for nickel-treated mica. However, DNA molecules are not visible anymore in 10 mM Tris pH 7.5/10 mM NaCl/5 mM MgCl_2 solution, despite increased MgCl_2 concentration. Obviously, NiCl_2 pretreatment is necessary to prevent DNA molecules from being released in the solution containing monovalent counterions at concentrations up to 200 mM.

Conclusion

In the present study, we have established a new protocol to control DNA adsorption on mica. This protocol is suitable

(23) Shao, Z.; Mou, J.-X.; Czajkowsky, D. M.; Yang, J.; Yuan, J.-Y. *Adv. Phys.* **1996**, *45*, 1–86.

for studying DNA/protein interactions because it should allow the DNA molecules to interact freely with the proteins under high salt concentration conditions. It takes advantage of the different behavior of the Mg^{2+} and Ni^{2+} ions to achieve a reversible binding of DNA molecules on mica. Ni^{2+} ions enable a permanent binding of DNA to mica even at high NaCl concentration, and Mg^{2+} ions can be used for monitoring the DNA binding strength. Thus, a three-step procedure is proposed.

First, we can image DNA molecules moving at the surface with the AFM to control the DNA concentration and the quality of the image. Second, we increase the salt concentration up to physiological conditions. At this step, the DNA molecules cannot be imaged anymore but are still bound to the surface due to the permanent presence of Ni^{2+} ions at the surface. The DNA molecules are moving in three dimensions. Third, the salt concentration is decreased and Mg^{2+} ions are added to the solution to image the molecules again.

This process is fully reversible and should allow different specific steps of the formation of DNA–protein complexes, or more generally DNA–ligand interaction, to be studied in liquids with the AFM.

LA026942U

Chapitre 4

Accessibilité et réactivité
de l'ADN adsorbé sur la surface.

PLAN DU CHAPITRE 4

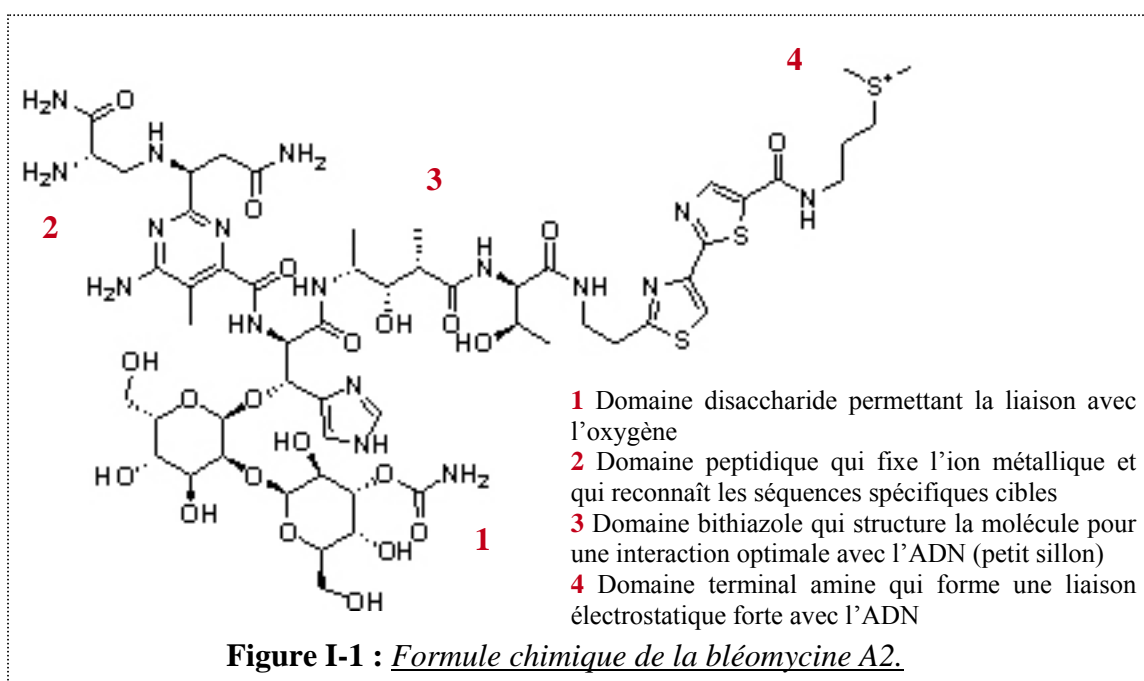
Introduction	135
I – Présentation de la bléomycine.	135
II - Matériels et méthodes.	137
A. Méthodologie de préparation des échantillons.	137
1. <i>Clivage de l'ADN adsorbé sur le mica par la bléomycine.</i>	<i>137</i>
2. <i>Clivage de l'ADN en solution par la bléomycine.</i>	<i>138</i>
3. <i>Paramètres testés.</i>	<i>138</i>
4. <i>Observation AFM.</i>	<i>138</i>
B. Méthode de détermination du nombre moyen de coupures par molécule d'ADN.	138
III – Résultats et discussion.	140
A. Validation de la méthode de détermination de n.	140
B. Etude de l'influence de la surface.	141
1. <i>Evolution de n avec $[Mg^{2+}]$.</i>	<i>141</i>
2. <i>Evolution de n avec $[Ni^{2+}]$.</i>	<i>144</i>
3. <i>Evolution de n avec [bléomycine] et effet de l'ascorbate.</i>	<i>145</i>
Conclusion.....	146
Bibliographie du chapitre 4.....	148
Annexe C4-1.	150

CHAPITRE 4

Accessibilité et réactivité de l'ADN adsorbé sur la surface.

Introduction

Après avoir avancé dans la compréhension et la maîtrise des interactions entre l'ADN et la surface, nous nous sommes posés la question de l'influence de la surface sur les interactions ADN-ligands. Que l'ADN soit simplement adsorbé sur la surface du mica ou y soit de plus ancré par ses extrémités, est-il accessible et réactif pour interagir avec des ligands biologiques (drogues, protéines,...) ? Les interactions ADN-ligands sont-elles semblables à celles observées en solution ? Ayant établi que la force d'adsorption de l'ADN sur le mica est essentiellement déterminée par la charge de la surface et par les concentrations en cations monovalents et divalents (**chapitre 3**), nous avons voulu franchir une étape supplémentaire et développer des méthodes pour caractériser l'effet des interactions entre les molécules et la surface sur l'accessibilité et la réactivité de l'ADN vis-à-vis des ligands. Bien qu'elle soit d'importance centrale, la problématique de l'influence de la surface n'avait jusqu'ici jamais été directement abordée en AFM. Dans une première approche, il est important de choisir un système relativement simple, déjà bien caractérisé d'un point de vue biochimique, avec un ligand dont l'effet sur l'ADN soit simple à observer en AFM ; nous avons choisi comme ligand la bléomycine.



I – Présentation de la bléomycine.

La bléomycine est un ligand soluble de petite taille (~1,5 kDa) et de structure simple (**figure I-1**) par rapport à un composé comme une protéine, en général beaucoup plus gros et plus complexe. Ce glycopeptide antibiotique découvert en 1966 (1) est cytotoxique pour les cellules eucaryotes, et il est aujourd'hui notamment utilisé en chimiothérapie anticancéreuse (2,3). Le produit utilisé pour traiter les patients est en fait un mélange de 11 molécules différant seulement par leur partie amine terminale, la forme la plus abondante étant celle illustrée ci-dessus (bléomycine A2) et que nous avons utilisée. La bléomycine est capable de former un complexe avec le dioxygène O_2 et des métaux de transition présentant une activité redox comme Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ou Cu^{2+} (3).

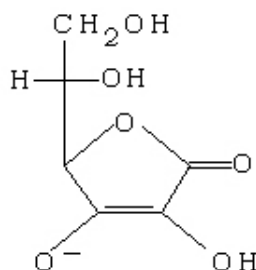


Figure I-2 : *Formule chimique de l'ascorbate.*

La forme complexée avec le fer est la plus active et la plus étudiée ; ses interactions *in vitro* et *in vivo* avec l'ADN en solution sont assez bien caractérisées (4,5). La bléomycine se lie à l'ADN et le clive dans une réaction dépendante de la présence d'ions fer et d'oxygène. Le clivage peut être simple brin ou double brin, avec une préférence pour les séquences 5'-GC-3' ou 5'-GT-3' (6,7). Les coupures simple et double brin impliquent la formation d'un complexe O₂-bléomycine-Fe et des réactions d'oxydoréduction, mais le mécanisme conduisant aux cassures double brin n'est pas encore complètement élucidé. Certains composés sont connus pour avoir un effet activateur sur le clivage de l'ADN par la bléomycine, notamment l'ascorbate (**figure I-2**), qui en régénérant la réactivité de la molécule de bléomycine, lui permet d'effectuer jusqu'à 7 à 8 coupures au lieu d'une seule en l'absence d'ascorbate (8).

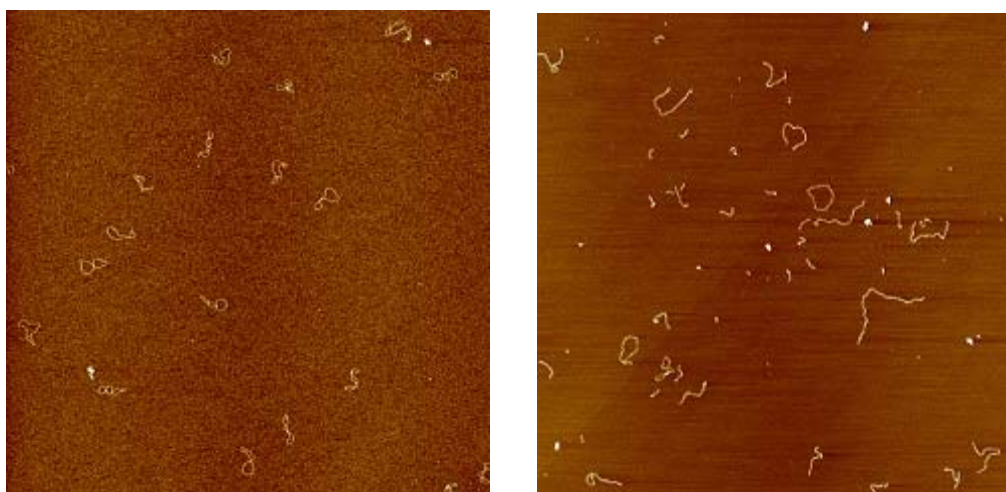


Figure I-3 : *ADN pUC19 intact (gauche) et coupé par la bléomycine (droite). AFM à l'air. Scans 5 μm x 5 μm. Echelle en Z : 3 nm.*

Nous nous sommes intéressés aux cassures double brin par la bléomycine, qui sont beaucoup plus faciles que les cassures simple brin à mettre en évidence en utilisant l'AFM (**figure I-3**). Le clivage de l'ADN est un sujet extrêmement peu abordé en AFM ; seuls des travaux sur la dégradation par l'enzyme DNase I indiquent, très qualitativement, une certaine accessibilité et réactivité de l'ADN adsorbé pour être clivé (9,10). Avant notre travail le clivage de l'ADN par la bléomycine n'avait jamais été étudié par AFM, même qualitativement, et il n'existait pas de méthodologie pour analyser l'influence de la surface sur les interactions ADN-bléomycine. Nous avons donc mis au point une méthode d'estimation du nombre moyen n de cassures double brin par molécule d'ADN à partir de l'analyse des images AFM. Nous avons ensuite utilisé cette méthode de quantification pour comparer n

entre les molécules d'ADN adsorbées sur le mica et les molécules d'ADN en solution, dans des conditions de tampon identiques.

II - Matériels et méthodes.

A. Méthodologie de préparation des échantillons.

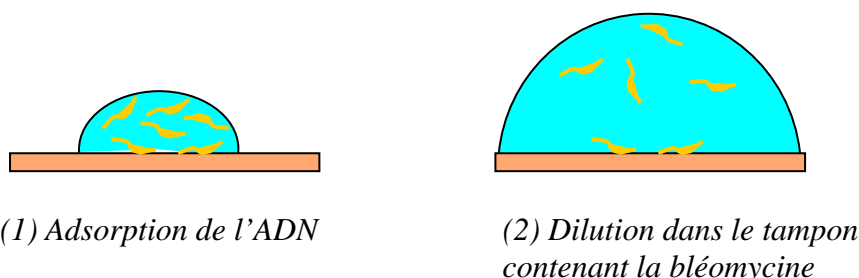
1. Clivage de l'ADN adsorbé sur le mica par la bléomycine.

Il a fallu mettre au point un protocole permettant, après l'adsorption de l'ADN sur la surface, de faire agir la bléomycine tout en limitant au maximum l'arrivée de nouvelles molécules d'ADN sur la surface pendant la durée du clivage. Sinon, l'observation risquerait d'être faussée par la présence sur la surface de molécules coupées par la bléomycine alors qu'elles n'étaient pas encore adsorbées. La méthode utilisée est celle schématisée en **figure II-1**. Nous adsorbons l'ADN sur la mica pendant une minute puis nous diluons par environ un facteur 5 la concentration en ADN lors de l'ajout de la solution de bléomycine. Nous laissons la bléomycine agir pendant 4 minutes, puis nous rinçons et séchons le mica. Nous avons vérifié que dans ces conditions, la grande majorité des molécules observées sur la surface par AFM après l'étape 2 étaient adsorbées sur le mica avant l'ajout du tampon contenant la bléomycine : le nombre de molécules sur la surface obtenu en rinçant et séchant après l'étape (1) représente plus de 90% du nombre de molécules en rinçant et séchant après l'étape (2). Cela permet d'affirmer que plus de 90% des molécules observées étaient déjà adsorbées sur la surface lorsqu'elles ont subi l'action de la bléomycine, et donc que les coupures observées ont très majoritairement eu lieu sur la surface.

Protocole :

Un volume de 4 μL d'ADN pUC19 à 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dilué dans une solution d'Hepes 10 mM pH 7,5 MgCl_2 5 mM est déposé sur un mica (sans prétraitement ou avec prétraitement nickel préalable, voir partie Résultats) pendant 2 minutes (**(figure II-1, étape (1))**). Ensuite 16 μL de solution tampon contenant de la Fe(III)-bléomycine à une concentration adéquate (sans ascorbate ou avec une concentration adéquate d'ascorbate, voir partie Résultats) sont ajoutés (**(figure II-1, étape (2))**). Au bout de 4 minutes l'échantillon est rincé avec de l'acétate d'uranyle 0,02% et séché.

Figure II-1 : *Etude du clivage de l'ADN adsorbé sur le mica par la bléomycine.*



Plus de 90% des molécules d'ADN observées sur la surface s'y sont adsorbées pendant l'étape (1).

2. Clivage de l'ADN en solution par la bléomycine.

Pour analyser le clivage de l'ADN en solution dans des conditions comparables au clivage de l'ADN adsorbé, les volumes et les concentrations en ADN et en bléomycine utilisés sont les mêmes que ci-dessus, avec une dilution de la solution d'ADN d'un facteur 5 lors de l'ajout de la solution de bléomycine. Mais au lieu d'être effectué sur le mica ce mélange est effectué dans un tube eppendorf, et la réaction est arrêtée au bout de 4 minutes en ajoutant de l'EDTA, qui inactive la bléomycine. La solution est ensuite déposée sur une surface de mica en ajoutant du $MgCl_2$ pour adsorber les molécules d'ADN. La bléomycine de la solution déposée étant inactivée par l'EDTA, il est certain que les molécules d'ADN observées sur la surface ont réagi avec la bléomycine en solution et non pas sur la surface du mica, et que les coupures observées ont eu lieu en solution.

Protocole :

Un volume de $4\mu L$ d'ADN pUC19 à $2,5\ \mu g/mL$ est ajouté à $16\ \mu L$ de solution tampon contenant de la Fe(III)-bléomycine (sans ascorbate ou avec une concentration adéquate d'ascorbate, voir partie Résultats). Au bout de quatre minutes la réaction est arrêtée en ajoutant de l'EDTA à $10\ mM$ final. La solution est ensuite déposée sur une surface de mica en ajoutant du $MgCl_2$ pour adsorber les molécules. L'échantillon est finalement rincé avec de l'acétate d'uranyle $0,02\%$ et séché.

3. Paramètres testés.

Les paramètres d'adsorption pris en compte dans l'étude sont la concentration en magnésium et la concentration en nickel de la solution de dépôt. Les paramètres du ligand pris en compte sont la concentration en bléomycine, et l'absence ou la présence d'ascorbate.

En plus d'être un acteur important de l'adsorption (voir **chapitre 3**), le magnésium est connu pour avoir, en solution, un rôle inhibiteur sur le clivage de l'ADN par la bléomycine (11,12). Il n'est pas décrit dans la littérature d'effet particulier inhibiteur ou activateur des cations monovalents sur la coupure de l'ADN par la bléomycine, nous n'avons donc pas testé l'effet de la concentration en cations monovalents. Pour simplifier, nous nous sommes de plus contentés de moduler la concentration en cations divalents dans la solution pour moduler l'adsorption de l'ADN sur la surface, sans faire intervenir les cations monovalents.

4. Observation AFM.

L'observation est faite à l'air sur un AFM Multimode associé au contrôleur Nanoscope IIIa (Veeco Instruments, USA), en mode contact intermittent, avec des microleviers OTESPA (Veeco Instruments, USA).

B. Méthode de détermination du nombre moyen de coupures par molécule d'ADN.

L'utilisation d'ADN double brin circulaire (plasmide pUC19, 2686 paires de bases, surenroulé négativement) facilite la détermination du taux de cassures double brin de l'ADN, l'ADN « intact » (c'est-à-dire ne comportant pas de cassure double brin, mais éventuellement des cassures simple brin) restant sous forme circulaire surenroulée ou relâchée. Le plasmide pUC19 comportant un grand nombre de sites potentiels de coupures, et le choix du site de coupure étant supposé aléatoire, nous reprenons l'hypothèse que la distribution du nombre de cassures double brin des molécules d'ADN par la bléomycine suit une distribution de Poisson

(13). Pour un nombre moyen de coupures n par molécule d'ADN, la probabilité $f_{n,i}$ qu'une molécule d'ADN aie exactement i coupures est alors donnée par :

Equation 1 :

$$f_{n,i} = e^{-n} \frac{n^i}{i!}$$

Nous avons mis au point une méthode d'analyse de la distribution des longueurs de brin observées en microscopie qui permet de remonter au nombre moyen n de coupures par molécule d'ADN. Cette approche est totalement nouvelle. Nous considérons trois cas pour l'exploitation des données expérimentales :

$n < 1$

n est donné par le rapport du nombre de molécules linéaires (avec une seule cassure) sur le nombre de molécules circulaires (sans cassures double brin) :

Equation 2 :

$$n = f_{n,1} / f_{n,0}$$

Il n'y a pas besoin de prendre en compte les rares fragments de plus petite taille éventuellement présents sur les images.

$1 < n < 3$

Les petits fragments doivent être pris en compte. Nous calculons le rapport du nombre de molécules circulaires sur le nombre de molécules linéaires,

Equation 3 :

$$R = \frac{f_{n,0}}{\sum_i f_{n,i}} = \frac{e^{-n}}{\sum_{i=1,2,\dots} e^{-n} \frac{n^i}{i!}}$$

R est estimé expérimentalement par comptage des molécules circulaires et des molécules linéaires. La résolution numérique de l'équation ci-dessus permet ensuite de remonter à n .

En tabulant les valeurs théoriques de R pour n variant entre 1 et 3, on remonte réciproquement à une estimation de n à partir de la valeur expérimentale de R .

$n > 3$

Les longueurs d'au moins 200 molécules sont mesurées sur les images AFM et un histogramme par intervalles de longueur est construit. D'autre part des simulations informatiques sont faites pour au moins 500 molécules, pour différents n , avec une probabilité de coupure respectant la distribution de Poisson. Les fragments obtenus dans la simulation pour chaque n sont classés par intervalles de longueur. La comparaison de l'histogramme expérimental avec les histogrammes établis numériquement permet ensuite d'estimer le nombre moyen de coupures dans l'expérience. Au-delà de $n \sim 7-8$, la présence de nombreux fragments très petits et la difficulté de mesurer précisément leur longueur empêchent une détermination fiable du nombre moyen de coupures.

III – Résultats et discussion.

Nous avons commencé par tester si notre méthodologie permettait de quantifier le taux de coupure moyen n de l'ADN par la bléomycine de manière fiable, puis nous avons étudié l'influence de la surface sur l'évolution de n en fonction des différents paramètres retenus.

A. Validation de la méthode de détermination de n .

Il y a un accord tout à fait satisfaisant entre la distribution des longueurs de fragments attendue si la probabilité de coupure suit une loi de Poisson, et les histogrammes expérimentaux (figure III-1, exemple dans le cas $n=1,65$), ce qui valide le choix de cette description statistique. De plus, nous avons vérifié que lorsque la réaction ADN-bléomycine est réalisée en solution, le nombre de coupures moyen de l'ADN varie linéairement avec la concentration en bléomycine, dans la gamme des nM, en absence comme en présence d'ascorbate (figure III-2). Cette linéarité, en accord avec les données de la littérature (14), valide notre méthode de détermination de n . Nous pouvons alors aborder l'étude de l'influence de la surface et des différents paramètres sur l'évolution de n .

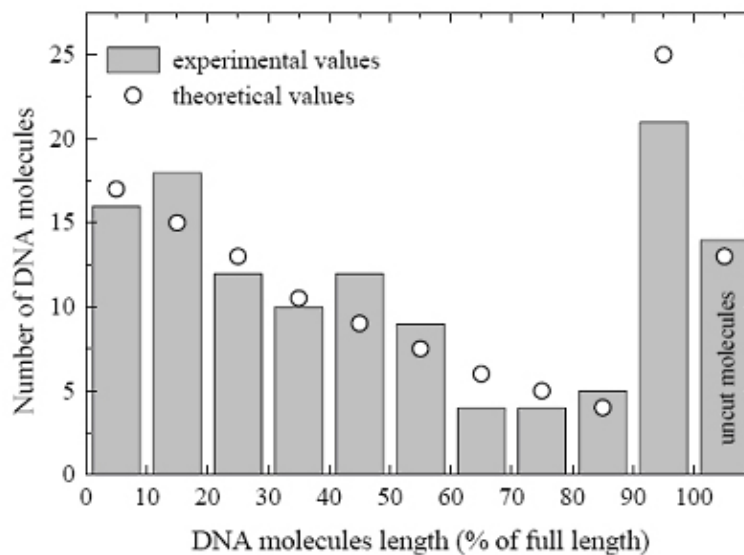


Figure III-1 : *Distribution des longueurs de fragments d'ADN pUC19 pour $n=1,65$. Tampon Hepes 10 mM pH 7.5 MgCl₂ 5 mM, [bléomycine] 300 nM. Figure d'après (15).*

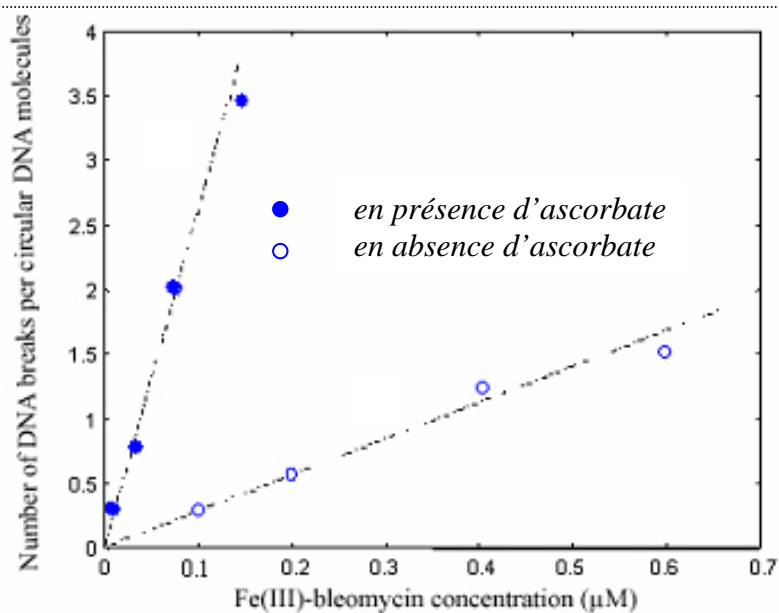


Figure III-2 : *Clivage par la bléomycine en absence ou en présence d'ascorbate pour l'ADN en solution. Figure d'après (15).*

B. Etude de l'influence de la surface.

1. Evolution de n avec $[Mg^{2+}]$.

Nous avons analysé l'évolution de n en fonction de la concentration en magnésium, pour les molécules d'ADN en solution et pour les molécules d'ADN adsorbées. La **figure III-3** montre que quand les molécules sont adsorbées sur la surface, elles sont moins coupées par la bléomycine que les molécules en solution. De plus la variation de n en fonction de la concentration en magnésium est nettement plus faible (dépendance en $[MgCl_2]^{-0,55}$ pour les molécules adsorbées sur la surface et en $[MgCl_2]^{-0,92}$ pour les molécules en solution). L'inhibition du clivage est donc à la fois plus forte sur la surface et moins dépendante de la concentration en magnésium que dans le volume. Il est bien connu qu'en solution, le magnésium inhibe le clivage de l'ADN par la bléomycine (11,12), ce que nous observons bien. Mais c'est la première fois qu'un tel effet différentiel est mis en évidence entre une réaction sur l'ADN adsorbé sur la surface, et sur la même réaction sur l'ADN en solution.

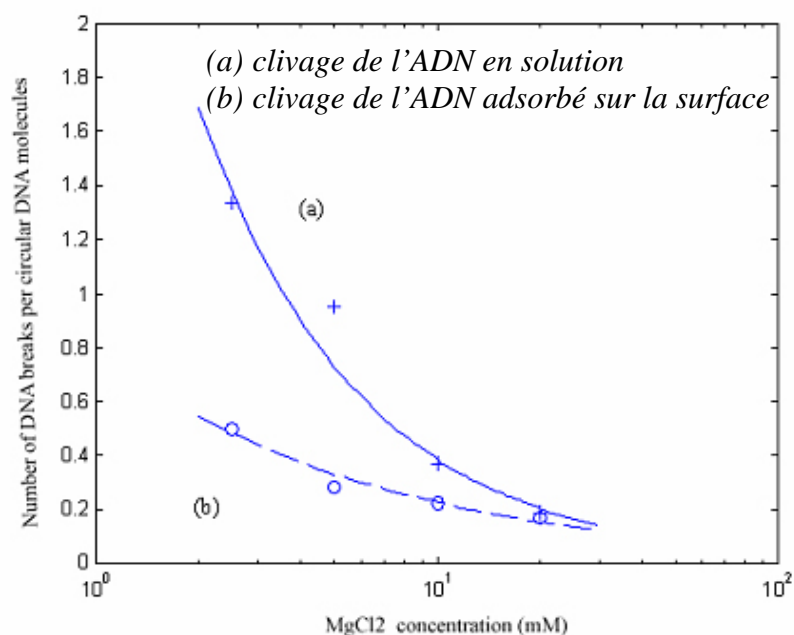


Figure III-3 : *Effet du magnésium sur le clivage.* Les molécules d'ADN adsorbées sur la surface sont moins coupées par la bléomycine et le nombre moyen de coupures varie plus faiblement avec $[Mg^{2+}]$. $[bléomycine] = 30 \text{ nM}$; $[ascorbate] = 100 \text{ } \mu\text{M}$. Figure d'après (15).

Pour essayer d'expliquer ces différences observées entre le clivage en solution et le clivage sur la surface nous nous sommes intéressés aux interactions entre les cations de la solution (magnésium, bléomycine, dont nous avons fait varier les concentrations dans notre étude expérimentale) et la surface du mica. La surface du mica non prétraité étant globalement chargée négativement, la concentration de ces différents cations décroît à partir de la surface. Comme au chapitre précédent, nous utilisons un modèle de double couche électrique et la théorie de Poisson-Boltzmann pour relier les concentrations de ces différentes espèces au niveau de la surface du mica à leurs concentrations en solution. Pour simplifier, comme nous ne faisons pas varier la concentration en Hepes dans notre étude expérimentale, nous ne considérons pas les cations Hepes du tampon dans les équations, bien qu'ils interviennent dans la neutralisation de la surface (rappelons que la molécule d'Hepes porte une charge négative et deux charges positives). De plus, les concentrations en bléomycine utilisées (~1 nM à 1 μM) sont inférieures de plusieurs ordres de grandeur aux concentrations en magnésium utilisées (~1-20 mM), ce qui nous permet de considérer que la neutralisation de surface de mica est uniquement due aux cations Mg^{2+} .

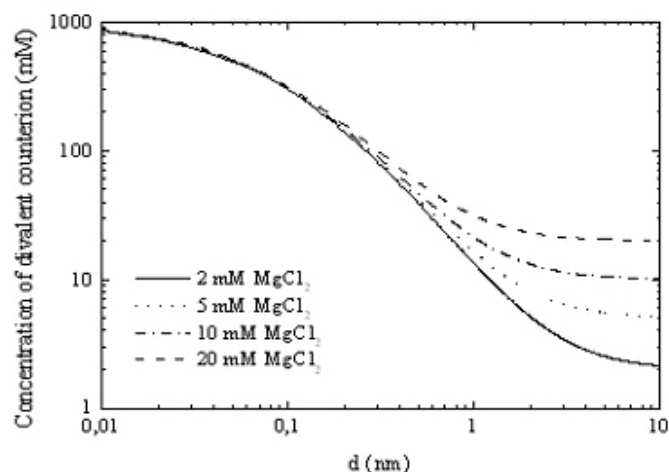


Figure III-4 : *Evolution de la concentration en magnésium en fonction de la distance à la surface.* Dans le modèle électrostatique proposé, aux distances inférieures à 1 nm, la concentration sur la surface dépend peu de la concentration dans la solution. Figure d'après (15).

La décroissance de la concentration en cations à partir de la surface s'exprime à l'aide de l'équation de Poisson-Boltzmann non linéaire (16):

Equation 3 :

$$n(d) = \frac{n_s}{(1 + d/2\lambda_z)^2} + n_b$$

d : distance à la surface

n_b : concentration en magnésium en solution

n_s : concentration en magnésium à la surface du mica (~ 1-6 M)

λ_z : épaisseur de la couche de magnésium condensée sur la surface

La décroissance de $n(d)$ pour plusieurs concentrations en magnésium est indiquée **figure III-4**. Loin de la surface, $n(d)$ tend vers la concentration en volume de magnésium, tandis que très près de la surface ($d < 1$ nm), la concentration en magnésium est beaucoup plus élevée et dépend très peu de la concentration en volume. Dans le modèle d'adsorption présenté au chapitre précédent, les cations doivent être situés à une distance de la surface inférieure à $l_b \sim 0,7$ nm pour assurer l'adsorption des molécules d'ADN. Nous pouvons donc considérer que les molécules d'ADN adsorbées sur la surface sont à l'intérieur d'une couche de magnésium condensée au voisinage de la surface de mica. Ainsi, les concentrations en magnésium autour des molécules d'ADN en solution et des molécules d'ADN adsorbées sur le mica sont très différentes.

Les résultats sur l'ADN adsorbé sont tout à fait cohérents avec ce modèle :

- la concentration réelle en magnésium sur la surface est plus élevée que la concentration en solution, et l'ADN adsorbé est situé dans cette couche de magnésium concentré, d'où une inhibition accrue
- la concentration en magnésium sur la surface varie peu avec la concentration en volume, d'où un facteur de dépendance de n vis-à-vis de $[Mg^{2+}]$ plus faible qu'en solution (0,55 au lieu de 0,92 dans le fit avec une loi en exposant)

La molécule de bléomycine porte une charge positive, avec plusieurs domaines de la molécule qui interviennent dans sa charge globale. Nous appelons z_{eff} sa charge effective, qui doit être proche de la valeur +1 donnée par sa formule chimique. Les équations de Poisson-Boltzmann pour le magnésium et pour la bléomycine s'écrivent :

Equations 4 et 5 :

$$ns_{Mg} = [Mg] e^{\frac{2\psi}{k_B T}}$$

$$ns_{blm} = [Blm] e^{\frac{z_{\text{eff}}\psi}{k_B T}}$$

Elles permettent de relier les concentrations en magnésium et en bléomycine en surface et en volume :

Equation 6 :

$$ns_{blm} = \frac{[Blm]}{[Mg^{2+}]^{\frac{z_{\text{eff}}}{2}}} ns_{Mg}^{\frac{z_{\text{eff}}}{2}}$$

L'équation 6 nous permet d'estimer la charge effective z_{eff} de la bléomycine, en supposant que le nombre de coupures moyen de l'ADN, n , est proportionnel à la concentration de bléomycine sur la surface, ns_{blm} ; avec l'évolution de n en $[MgCl_2]^{-0,55}$ pour l'ADN adsorbé donnée par la courbe expérimentale de la **figure III-3**, nous trouvons $z_{\text{eff}} = 1,1$. Il est tout à fait satisfaisant que cette valeur soit proche de la charge réelle connue pour la bléomycine.

2. Evolution de n avec $[Ni^{2+}]$.

Pour préciser l'effet de la charge de la surface sur le clivage de l'ADN par la bléomycine, nous avons étudié l'évolution de n avec la concentration en Ni^{2+} dans la solution. Dès que la concentration en nickel atteint l'ordre de grandeur du mM, il commence à y avoir forte inhibition du nombre de coupures de l'ADN par la bléomycine (**figure III-5**). La neutralisation, voire l'inversion locale de la charge négative du mica par les ions Ni^{2+} de la solution, peut être aussi obtenue par un prétraitement de la surface du mica par des ions nickel au lieu de leur ajout dans la solution, et une inhibition des coupures est aussi observée.

Les ions nickel sont très réactifs vis-à-vis de la surface de mica et s'associent fortement à elle ; ils sont ainsi capables de neutraliser ou même d'inverser localement la charge de la surface. En considérant que la surface de l'échantillon est de l'ordre de 2 cm^2 , la densité surfacique de charge du mica étant $\sim 2 \text{ e.nm}^{-2}$, le mica non traité présente 4.10^{14} charges négatives. La concentration en nickel à utiliser pour neutraliser cette charge, pour $1 \mu\text{L}$ de solution d'ions nickel ajoutée à la solution déposée, est de l'ordre d'1 mM. Sur la base de ce calcul, aux concentrations en nickel inférieures la charge du mica reste majoritairement négative et aux concentrations supérieures elle est localement positive.

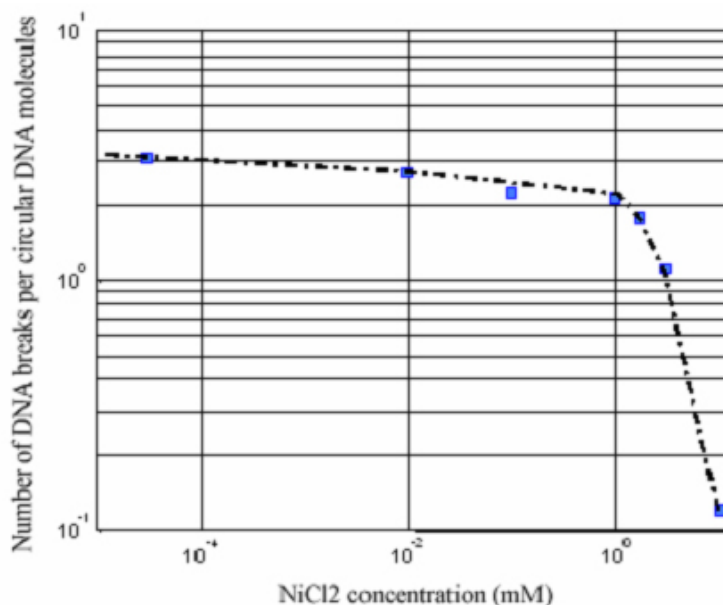


Figure III-5 : *Evolution de n avec la concentration en nickel. n chute dès que les ions Ni^{2+} sont en concentration suffisante pour neutraliser ou inverser localement la charge de la surface. Figure d'après (15).*

La concentration en nickel à partir de laquelle le clivage par la bléomycine commence à être fortement inhibé correspond approximativement à la concentration à partir de laquelle la surface du mica commence à être neutralisée. A des concentrations plus basses la charge de surface du mica ne change pas significativement et la présence de nickel n'influe pas non plus sur l'activité de la bléomycine. La surface, quand elle devient localement chargée positivement, continue de bien adsorber l'ADN grâce aux cations Ni^{2+} , mais a un effet répulsif sur la bléomycine, d'où la diminution du nombre de coupures des molécules d'ADN adsorbées sur la surface.

3. Evolution de n avec [bléomycine] et effet de l'ascorbate.

Nous avons comparé les valeurs de n déterminées pour les molécules d'ADN en surface et en solution en fonction de la concentration en bléomycine, à concentration en magnésium fixée ($MgCl_2$ 5 mM). Comme nous l'avons vu précédemment, en solution n varie linéairement avec les concentrations en bléomycine, dans la gamme des nM, et n augmente considérablement (facteur ~ 8) en présence d'ascorbate (voir [figure III-2](#)). Pour les molécules d'ADN adsorbées sur la surface, la variation en fonction de la concentration en bléomycine n'est plus linéaire. De plus, pour une même concentration de bléomycine, le clivage des molécules adsorbées sur la surface est plus important que le clivage des molécules en solution. Enfin, le facteur d'amplification du clivage par l'ascorbate diminue (facteur $\sim 2,5-3$) ([figure III-6](#)).

Les molécules de bléomycine même adsorbées sur la surface restent actives, puisque nous avons observé qu'un prétraitement de la surface par la bléomycine avant le dépôt de l'ADN donne lieu à du clivage. Dans le cadre du modèle présenté au paragraphe **B.1.**, avec z_{eff} de l'ordre de 1, n_{SMg} de l'ordre de 1 à 6 M, et $[Mg^{2+}]$ de l'ordre de quelques mM dans notre étude expérimentale, la concentration en bléomycine sur la surface est très inférieure à la concentration en magnésium sur la surface. Cependant la concentration en bléomycine sur la surface est supérieure d'environ un ordre de grandeur à la concentration en bléomycine en

solution. Il est donc compréhensible que le clivage de l'ADN adsorbé soit plus important que celui de l'ADN en solution.

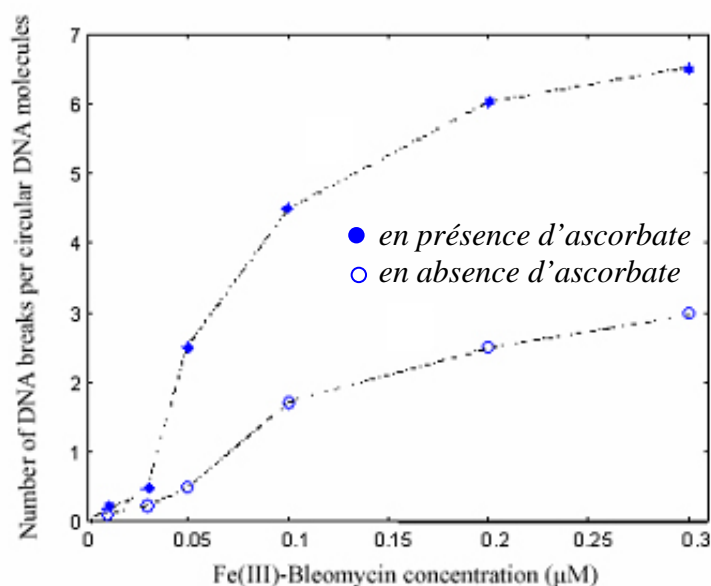


Figure III-6 : *Clivage par la bléomycine en absence ou en présence d'ascorbate pour l'ADN adsorbé sur la surface. Sur la surface le nombre moyen de coupures de l'ADN ne varie plus linéairement avec [bléo]. L'amplification du clivage par l'ascorbate est proportionnellement moindre. Figure d'après (15).*

Il est difficile d'analyser les effets à l'origine de la non-linéarité de la variation de n avec la concentration en bléomycine. La saturation du clivage qui commence vers $[bléomycine] = 300 \text{ nM}$ pourrait être liée à la couche de magnésium condensée sur la surface, qui inhibe partiellement la liaison de la bléomycine à la surface et/ou à l'ADN. En présence d'ascorbate, chargé négativement, l'effet répulsif de la surface chargée elle aussi négativement pourrait contribuer à l'activation moindre sur la surface ($\times 3$) qu'en volume ($\times 8$).

Conclusion.

Cette étude démontre pour la première fois l'importance de prendre en compte l'influence de la surface et des interactions cations-surface dans l'étude des complexes ADN-ligands par AFM : en fonction des conditions expérimentales, nous avons observé une différence de l'efficacité de coupure de l'ADN par la bléomycine selon que l'interaction ADN-ligand a lieu sur la surface de mica ou en solution. Nous avons montré que le clivage des molécules d'ADN par la bléomycine n'évolue pas de la même manière en fonction de deux paramètres d'adsorption (concentration en magnésium, concentration en nickel) et d'autres paramètres liés au clivage (concentration en magnésium, concentration en bléomycine, présence ou absence d'ascorbate) selon que les molécules d'ADN sont en solution ou qu'elles sont adsorbées sur le mica. Nous avons proposé une explication semi-quantitative de ces résultats à l'aide d'un modèle électrostatique d'interaction entre cations et surface. La cohérence entre ce modèle et les résultats expérimentaux est aussi une validation

supplémentaire des hypothèses sur le rôle des cations divalents dans le mécanisme d'adsorption proposé au **chapitre 3**.

L'étude de l'accessibilité de l'ADN vis-à-vis la bléomycine a aussi été appliquée au laboratoire à l'étude des déformations dynamiques et de condensation de l'ADN sous l'effet des polyamines (17). L'analyse du nombre moyen de coupures par la bléomycine en fonction de la concentration en spermidine montre une augmentation forte du taux de coupure avec la concentration en spermidine jusqu'à la transition entre l'état non condensé et l'état condensé de l'ADN. Une fois que l'ADN est condensé, il n'est presque plus accessible et le clivage par la bléomycine devient très faible.

La méthodologie qui a été validée dans le présent chapitre pourrait aussi être appliquée à l'étude de l'accessibilité de l'ADN sur d'autres surfaces que le mica. Un prolongement également intéressant serait de tester cette approche avec un autre ligand capable d'opérer des cassures double brin de manière peu spécifique sur l'ADN, comme par exemple la protéine DNase I.

L'importance de prendre en compte l'influence de la surface dans l'accessibilité de l'ADN vis-à-vis des ligands a aussi été mise en évidence au laboratoire dans une autre étude (18). Le ligand utilisé est un intercalant de l'ADN très connu et très utilisé en biologie, le bromure d'éthidium (BET). La liaison du BET à l'ADN induit un allongement de la molécule d'ADN qui peut être mesuré et relié à la quantité de BET qui s'est liée à l'ADN. Il a été mis en évidence que la force d'adsorption de l'ADN sur la surface influe considérablement sur la quantité de BET qui se lie à l'ADN. Le taux de liaison est plus faible sur mica non traité que sur mica prétraité par des ions nickel, ce qui indique une moindre accessibilité au BET de l'ADN quand il est adsorbé plus fortement.

La surface a également une influence sur les complexes ADN-ligands formés avant l'adsorption, comme cela a récemment été montré au laboratoire dans l'étude d'un premier système ADN-protéine (19). La protéine utilisée est l'enzyme de restriction EcoRI, une protéine de petite taille (31 kDa) très bien caractérisée et très utilisée en biologie moléculaire. Ce travail a montré par comparaison entre les complexes observés sur la surface par AFM et observés en solution par gel retard que la surface de mica modifiait les constantes d'équilibre du complexe ADN/EcoRI et favorisait sa dissociation.

L'ensemble de ces résultats souligne la nécessité de prendre attentivement en compte les conditions d'observation lors des expériences d'AFM. Il est essentiel de caractériser quantitativement l'influence de la surface sur l'association et/ou la dissociation des complexes ADN-ligand étudiés, en fonction des conditions. Idéalement, la confrontation avec une caractérisation biochimique du même système doit permettre de déterminer les conditions d'adsorption de l'ADN où l'influence de la surface est minimisée.

Bibliographie du chapitre 4.

1. Umezawa, H., K. Maeda, T. Takeuchi, and Y. Okami. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 19:200-209.
2. Chen, J. and J. Stubbe. 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-112.
3. Mir, L. M., O. Tounekti, and S. Orłowski. 1996. Bleomycin: revival of an old drug. *Gen Pharmacol* 27:745-748.
4. Burger, R. M. 1998. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chem Rev* 98:1153-1170.
5. Claussen, C. A. and E. C. Long. 1999. Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem. Rev.* 99:2797-2816.
6. Takeshita, M., A. P. Grollman, E. Ohtsubo, and H. Ohtsubo. 1978. Interaction of bleomycin with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5983-5987.
7. D'Andrea, A. D. and W. A. Haseltine. 1978. Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:3608-3612.
8. Buettner, G. R. and P. L. Moseley. 1992. Ascorbate both activates and inactivates bleomycin by free radical generation. *Biochemistry* 31:9784-9788.
9. Bezanilla, M., B. Drake, E. Nudler, M. Kashlev, P. K. Hansma, and H. G. Hansma. 1994. Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 67:2454-2459.
10. Abdelhady, H. G., S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, and P. M. Williams. 2003. Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I. *Nucl. Acids. Res.* 31:4001-4005.
11. Chien, M., A. P. Grollman, and S. B. Horwitz. 1977. Bleomycin-DNA interactions: fluorescence and proton magnetic resonance studies. *Biochemistry* 16:2641-2647.
12. Takeshita, M., A. P. Grollman, and S. B. Horwitz. 1976. Effect of ATP and other nucleotides on the bleomycin-induced degradation of vaccinia virus DNA. *Virology* 69:453-463.
13. Povirk, L. F. and C. W. Houlgrave. 1988. Effect of apurinic/aprimidinic endonucleases and polyamines on DNA treated with bleomycin and neocarzinostatin: specific formation and cleavage of closely opposed lesions in complementary strands. *Biochemistry* 27:3850-3857.
14. Li, W., C. Xia, W. E. Antholine, and D. H. Petering. 2001. Interactions of iron bleomycin, phosphate or cyanide, and DNA: sequence-dependent conformations and reactions. *J Biol Inorg Chem* 6:618-627.

15. Piétrement, O., D. Pastré, F. Landousy, M. O. David, S. Fusil, L. Hamon, A. Zozime, and E. Le Cam. 2005. Studying the effect of a charged surface on the interaction of bleomycin with DNA using an atomic force microscope. *Eur Biophys J* 34:200-207.
16. Rouzina, I. and V. A. Bloomfield. 1996. Influence of ligand spatial organization on competitive electrostatic binding to DNA. *J. Phys. Chem.* 100:4305-4313.
17. Pastré, D., O. Piétrement, F. Landousy, L. Hamon, I. Sorel, M. O. David, E. Delain, A. Zozime, and E. Le Cam. 2006. A new approach to DNA bending by polyamines and its implication in DNA condensation. *Eur Biophys J* 35:214-223.
18. Pastré, D., O. Piétrement, A. Zozime, and E. Le Cam. 2005. Study of the DNA/ethidium bromide interactions on mica surface by atomic force microscope: Influence of the surface friction. *Biopolymers* 77:53-62.
19. Sorel, I., O. Piétrement, L. Hamon, S. Baconnais, E. Le Cam, and D. Pastré. 2006. The EcoRI-DNA complex as a model to investigate protein-DNA interactions by atomic force microscopy. *Biochemistry* In press.

Annexe C4-1

Studying the effect of a charged surface on the interaction of bleomycin with DNA using an atomic force microscope.

Pietrement, O., D. Pastre, F. Landousy, M. O. David, S. Fusil, L. Hamon, A. Zozime, and E. Le Cam. 2005.

Eur Biophys J 34:200-207.

Cet article décrit l'étude quantitative en AFM du clivage de l'ADN par la bléomycine. Une méthode totalement nouvelle est mise au point pour déterminer le nombre de coupures moyen par molécule d'ADN à partir des images AFM. Cette méthode est ensuite utilisée pour comparer le clivage par la bléomycine des molécules d'ADN adsorbées sur le mica et des molécules d'ADN en solution. Une influence de l'adsorption sur la surface sur le clivage est mise en évidence et un modèle électrostatique est proposé pour expliquer les résultats.

Olivier Piétrement · David Pastré · Fabrice Landousy
Marie-Odile David · Stéphane Fusil · Loïc Hamon
Alain Zozime · Eric Le Cam

Studying the effect of a charged surface on the interaction of bleomycin with DNA using an atomic force microscope

Received: 16 May 2004 / Revised: 10 September 2004 / Accepted: 16 September 2004 / Published online: 5 November 2004
© EBSA 2004

Abstract The cleavage of DNA caused by the antitumoral drug bleomycin has been investigated using atomic force microscopy (AFM). This work deals with the effect that adsorbing DNA onto a positively- or negatively-charged surface has on the double-strand cleavage of DNA by Fe(III)/bleomycin. Quantitative analysis of the number of breaks per DNA molecule, in bulk and at the surface of the mica substrate, has been performed by analyzing AFM images. It turns out that the cleavage of DNA is strongly inhibited by a positively-charged surface. Our experiments can be interpreted using a simple electrostatic model. This paper is a first step in the study of DNA accessibility to ligand such as bleomycin, using AFM in liquids.

Keywords Bleomycin · DNA cleavage · Atomic force microscope · Surface

Introduction

Bleomycin (Blm) is a metal-binding glycopeptide antibiotic used in anticancer chemotherapy. This drug binds to and cleaves DNA in a reaction which depends on the presence of ferrous ions and oxygen (Abraham et al. 1999; Burger 1998; Claussen and Long 1999; Petering

et al. 1990; Povirk and Goldberg 1983). Blm induces both double- and single-strand breaks in DNA, and cleavage is reported to occur preferentially at the dinucleotide sequences 5'-GC-3' and 5'-GT-3' (D'Andrea and Haseltine 1978; Takeshita et al. 1978). Double-strand breaks probably occur during a single bleomycin binding event less frequently than single-strand breaks (Steighner and Povirk 1990). The cleavage reaction in cellular and in isolated DNA probably involves chelation of the ferrous ion by the drug, followed by binding of the Fe(III)-bleomycin or Fe(II)-bleomycin complex to DNA.

Studying the influence of the adsorption of DNA on the bleomycin activity may provide qualitative information useful in understanding the activity of bleomycin towards DNA immobilized on a highly-charged surface. In this paper we study the action of bleomycin on DNA molecules adsorbed on a mica surface using an atomic force microscope (AFM). AFM has been used to image DNA-drugs complexes (Berge et al. 2002; Nagami et al. 2002; Pope et al. 2000; Utsuno et al. 2001, 2002) and DNA-protein complexes on ultra-flat surfaces (Allison et al. 1996; Cary et al. 1997; Guthold et al. 1994; Lyubchenko et al. 1995; van Noort et al. 1998). Prior to imaging, it is necessary to adsorb the DNA molecules onto an atomically flat surface. This requirement is generally obtained by using a mica surface and a buffer containing divalent cations. The divalent cations partially neutralize the negatively-charged DNA backbone (Rouzina and Bloomfield 1996a) and the mica surface (Pashley and Israelachvili 1984). Correlations between the DNA and mica counterion clouds arise and generate a net attractive force that leads to adsorption of the DNA molecules onto mica (Pastré et al. 2003). This mechanism is very similar to the one for DNA condensation induced by multivalent cations (Rouzina and Bloomfield 1996b). AFM techniques present two main advantages for studying DNA/drug interactions. First, few biological materials are required (nanomolar DNA molecule concentrations are sufficient to perform DNA imaging). Second, it allows us to study the influence of

Olivier Piétrement and David Pastré have contributed equally to the work.

O. Piétrement (✉) · F. Landousy · E. Le Cam
Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire,
UMR 8126 CNRS-IGR-UPS, Institut Gustave-Roussy,
39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France
E-mail: Olivier.Pietrement@igr.fr
Tel.: +33-1-42116306
Fax: +33-1-42115494

D. Pastré · M.-O. David · S. Fusil · L. Hamon · A. Zozime
Laboratoire d'étude des Milieux Nanométriques,
Université d'Evry, Rue du Père Jarlan,
91025 Evry Cedex, France

the surface substrate on the formation of the drug/DNA complexes. In addition, drugs are generally small ligands that do not interact very strongly with a charged surface, unlike proteins, which are large and highly polarizable. We report the first AFM study of the action of bleomycin on naked DNA molecules adsorbed onto a surface.

This study focuses on bleomycin-induced DNA double-strand cleavage, which can be easily detected by AFM. A method is developed to measure the number of DNA double-strand breaks per molecule by assuming that the distribution of double-strand breaks among DNA molecules follows the Poisson distribution (Povirk and Houlgrave 1988). We show that bleomycin molecules, which are also electrostatically adsorbed onto the mica surface, are responsible for the DNA breaks in adsorbed molecules. A simple model is developed to explain the electrostatic influence of the surface. In addition, the surface potential of the mica surface can be modified by pre-treating the mica surface with Ni^{2+} ions (Piétrement et al. 2003). The point of this is to observe whether the non-specific electrostatic interactions between mica, DNA and bleomycin molecules can modulate the double-strand cleavage of DNA molecules adsorbed onto a surface.

Materials and methods

Bleomycin and DNA plasmid

Bleomycin sulfate (Blenoxane) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Fe(III)-bleomycin was prepared by first dissolving ferric ammonium sulfate dodecahydrate in water and then immediately adding a 10% molar excess of iron to bleomycin (Li et al. 2002). This 1 mM Fe(III)-bleomycin solution was then kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pUC19 plasmid DNA was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Circular DNA molecules allow us to determine the DNA double-strand breakage more easily.

AFM experiments

These experiments were carried out in air using a Multimode AFM Nanoscope IIIa system (Digital Instrument/Veeco, Santa Barbara, CA, USA) in tapping-mode. We used OTESPA cantilevers (Digital Instruments/Veeco, Santa Barbara, CA, USA); the scan frequency was 1 Hz and the modulation amplitude was a few nanometers.

A droplet of DNA solution was deposited onto the mica surface as described below, according to whether the DNA was cleaved in a buffer solution or on a mica surface. All the samples were rinsed with 2–3 drops of 0.02% (w/v) aqueous uranyl acetate in order to fix the DNA molecules in their conformations (Revet and

Fourcade 1998), and they were blotted with filtered paper.

Cleavage of DNA adsorbed onto mica by bleomycin

A 4 μl droplet of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ DNA diluted in a buffer solution (10 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , pH 7.5) was deposited onto a mica substrate (pre-treated or not) for 2 min. Then 16 μl buffer solution containing Fe(III)-bleomycin at a specified concentration (with/without 100 μM ascorbate) was added. Bleomycin was allowed to interact for 4 min and then the sample was rinsed and dried as described above. A dilute DNA solution and a short deposition time are both required to limit the number of adsorbed DNA molecules. We have measured the density of DNA molecules adsorbed onto mica before and after incubation in buffer containing bleomycin. These conditions ensure that more than 90% of the DNA molecules observed on the surface by AFM were adsorbed onto the mica surface prior to the addition of the buffer containing bleomycin.

Cleavage of DNA in solution by bleomycin

A 4 μl droplet of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ DNA solution was added to 16 μl buffer solution containing Fe(III)-bleomycin with or without 100 μM ascorbate. Bleomycin interacts with DNA in 4 minutes. The reaction was stopped by adding 5 μl of 50 mM EDTA solution. The reaction solution was then deposited on a mica surface by adding MgCl_2 for AFM observation, rinsed with aqueous uranyl acetate, and dried.

Results and discussion

AFM measurements of the DNA double-strand breaks

Several techniques have been used previously to study DNA cleavage by bleomycin: gel electrophoresis (Lloyd et al. 1978), viscosity measurements (Povirk and Houlgrave 1988), and fluorescence (Biggins et al. 2000). Microscopy techniques have been used less frequently, which is in part due to the time consuming analysis of the DNA molecules. Lloyd et al. (1979) used electron microscopy to study the intermolecular crosslinking that could be produced by bleomycin on circular DNA. Comparisons between electrophoresis analysis and electron microscopy revealed that images of DNA molecules provide qualitative results as well. Therefore we have focused this study on double-strand breakage, which is easier to quantify by AFM image analysis.

By assuming that the distribution of double-strand breaks among individual molecules follows the Poisson distribution (Povirk and Houlgrave 1988), the probability $f_{n,i}$ that a DNA molecule will have exactly i breaks is equal to:

$$f_{n,i} = e^{-n} \frac{n^i}{i!}, \quad (1)$$

with n being the mean number of double-strand breaks per molecule.

Figure 1 shows images of pUC19 plasmid DNA molecules adsorbed onto a mica surface and cleaved by 0.3 μ M Fe(III)-bleomycin after 4 minutes incubation. Figure 2 shows the distribution in the lengths of the DNA molecules for $n=1.65$. We can see that the experimental results seem to match the distribution in the DNA segment lengths (obtained numerically by assuming a Poisson distribution of the DNA breaks) pretty well:

- For a low level of DNA breaks ($n < 1$), n is given by the ratio between the number of linear DNA molecules with one double-strand break and the number of circular DNA molecules: $n = f_{n,1}/f_{n,0}$.
- In the intermediate range ($1 < n < 3$), the small linear DNA molecules should also be considered in order to improve the reliability of the method. Therefore, we calculate the total number of DNA molecules, and the ratio R of the number of circular DNA to the number of linear DNA molecules is given by:

$$R = \frac{f_{n,0}}{\sum_i i f_{n,i}} = \frac{e^{-n}}{\sum_{i=1,2,\dots} e^{-n} \frac{n^i}{(i-1)!}}. \quad (2)$$

This equation is solved numerically so that n is obtained from the experimentally-estimated value of R derived from AFM image analysis.

- For highly-damaged DNA ($n > 3$), we measure the lengths of at least 200 molecules. Then we determine the number of double-strand breaks n which best fits the theoretical DNA length distribution obtained by using the Poisson distribution.

Interaction between bleomycin and DNA molecules adsorbed onto a surface

The charged mica surface can modify the DNA/ligand interaction via several mechanisms. First, the surface

Fig. 1 **a** AFM image of untreated pUC19 circular DNA. Most of the molecules adopt a supercoiled conformation. **b** AFM image of adsorbed pUC19 circular DNA molecules after reacting for 4 min with 300 nM Fe(III)-bleomycin solution on a mica surface. The nanoscale resolution of the AFM allows the precise classification of each of the DNA molecules as linear or circular. Scan area: $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

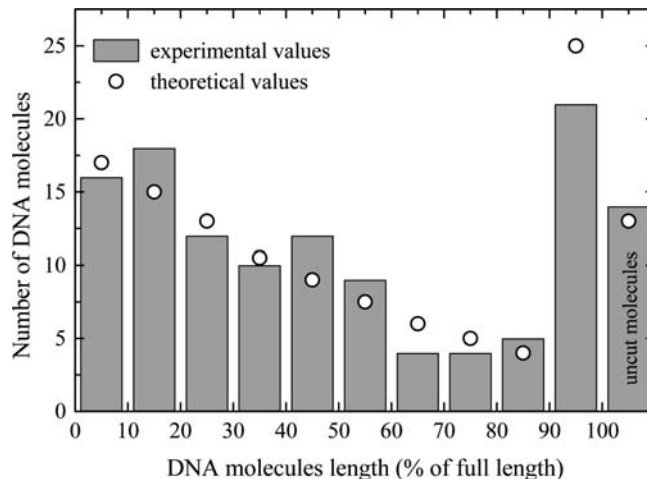
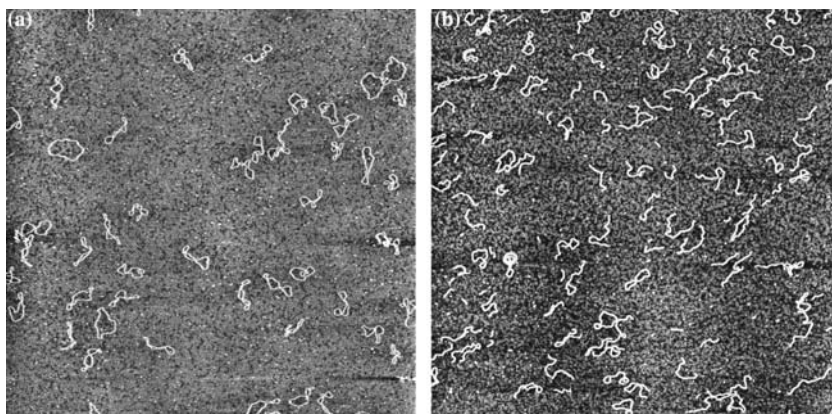


Fig. 2 Distribution of the DNA segment lengths after interaction of pUC19 circular DNA with 300 nM Fe(III)-bleomycin solution on a mica surface. The distribution of DNA segment lengths agrees pretty well with the simulated values, which attests to the validity of the Poisson distribution. To ensure the precision of the method, more than 150 molecules should be analyzed

can interact directly with the bleomycin molecule (only non-specific electrostatic interactions are considered here). Second, the surface can interact indirectly with DNA since its mobility is restrained by adsorption, which could affect the DNA/bleomycin interaction.

Let us start by considering an electrostatic interaction between a charged ligand and a charged surface. On a highly-charged surface the counterions tend to form a thin condensed layer. Using the non-linear Poisson-Boltzmann equation, the decay in the counterion concentration is given by (Rouzina and Bloomfield 1996b):

$$n(d) = \frac{ns}{(1 + (d/2\lambda_z))^2} + n_b, \quad (3)$$

where d is the distance from the surface, n_b is the bulk concentration of the counterions species, ns is the surface concentration of the mica counterion (ns is between 1 and 6 M for a mica surface):

$$\lambda_z = \frac{e}{4\pi\sigma l_{BZ}} \quad (4a)$$

and λ_z is the thickness of the counterion layer:

$$ns = 2\pi(\sigma/e)^2 l_B, \quad (4b)$$

where e is the electron charge, σ is the surface charge density, l_B is the Bjerrum length and z is the counterion valency.

Mg^{2+} and HEPES ions compete for surface neutralization. However, the HEPES ions are poorer competitors than the Mg^{2+} ions because of their size (Rouzina and Bloomfield 1996b), so we can only consider the Mg^{2+} counterions for the calculations. Figure 3 shows the decay of $n(d)$ for various $MgCl_2$ concentrations. The surface concentration of divalent counterions is much higher near the surface because of the condensation phenomenon. In addition, it is easy to see that the surface concentration is only weakly dependent on the bulk concentration for $d < 1$ nm. Theoretical calculations show that the DNA counterions should be located at a distance less than l_B ($\cong 0.7$ nm) from the surface in order to allow the adsorption of DNA (Pastré et al. 2003). Therefore, most of the adsorbed DNA molecules are embedded in the counterion layer in which the concentration of Mg^{2+} ions is weakly dependent on the buffer composition. This effect will be used to control whether the reaction between bleomycin and DNA molecules adsorbed onto mica really takes place on the surface or not, as described below.

Let us estimate the bleomycin concentration near the surface. The bleomycin carries a positive charge via the C-terminal cationic group of bleomycin A_2 that is involved in the DNA electrostatic attraction between DNA and bleomycin (Sakai et al. 1983). However, other bleomycin domains can be electrostatically active, like the DNA binding domain. For such a large ligand, an effective charge z_{eff} can be introduced (Rouzina and Bloomfield 1996b). The surface concentration of bleomycin ns_{blm} is then:

$$ns_{\text{blm}} = \frac{[\text{Blm}]}{[\text{Mg}^{2+}]^{(z_{\text{eff}}/2)}} ns^{(z_{\text{eff}}/2)}. \quad (5)$$

We can assume that $ns_{\text{blm}} \ll ns$ because the bleomycin concentration ($< 1 \mu\text{M}$) used to cleave DNA is lower than the $MgCl_2$ concentration (5 mM) necessary to adsorb DNA molecules onto a mica surface. This equation indicates that the concentration of bleomycin on the mica surface is larger than the concentration of bleomycin in solution. However, the surface concentration of divalent counterions is also very high, which can affect the DNA cleavage.

The mica surface charge can be modified by adding Ni^{2+} ions to the solution. Ni^{2+} ions are highly reactive with the mica, like other transition metal cations. In particular, Ni^{2+} ions are able to form $(\text{Ni-OH})^+$ hydroxyl complexes (Gier and Johns 2000; Koppelman and Dillard 1977) thanks to the high ionic potential of Ni^{2+} . The strong adsorption of Ni^{2+} ions during pre-treatment neutralizes the mica surface if most of the potassium ions are exchanged with the Ni^{2+} ions. The surface charge of the mica can therefore be neutralized or partly reversed by the strongly-adsorbed cations. This mechanism could be exploited to study the electrostatic interaction between the mica surface and the bleomycin. Indeed, a positively-charged surface could repel a positively-charged ligand such as bleomycin.

For all of the figures presented below, we measured the number of DNA breaks per molecule by analyzing at least 200 molecules (see ‘‘Materials and methods’’ section). These experiments were performed using the same buffer and with the same muscovite mica to avoid any additional errors.

Figure 4 represents the number of DNA breaks versus the magnesium concentration in the bulk and on the

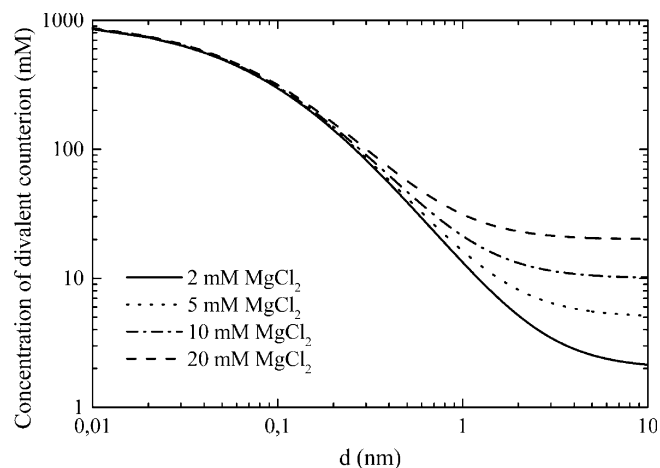


Fig. 3 Variation of the theoretical surface concentration of divalent counterions on a mica surface versus the distance d from the mica. Experiments were performed with several $MgCl_2$ concentrations (2, 5, 10, and 20 mM) and with $ns = 1$ M. For $d < 1$ nm, the surface counterion concentration is weakly dependent on the bulk concentration of the counterion, whereas for $d > 4$ nm it is similar to the bulk value

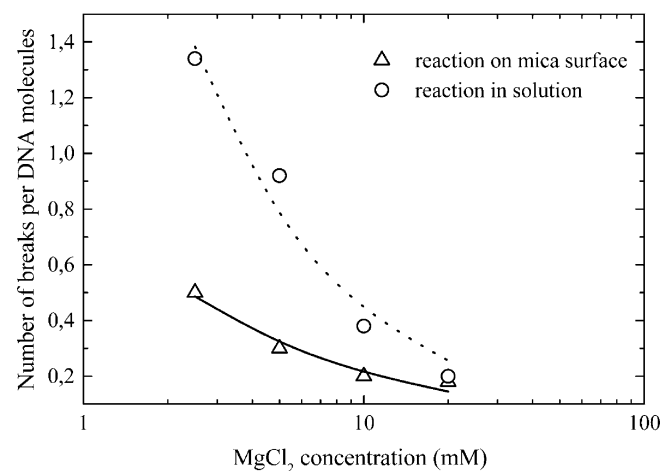


Fig. 4 Number of DNA breaks per molecule versus $MgCl_2$ concentration in bulk and on a mica surface, with $[\text{Fe-(III)BLM}] = 30$ nM and $[\text{Asc}] = 100$ μM . The experimental results are fitted by a polynomial function of the $MgCl_2$ concentration. This comes from Eq. (5) $\frac{z_{\text{eff}}}{2} = 0.55$. Inhibition of DNA cleavage by magnesium ions is less marked for adsorbed DNA molecules. This indicates that the DNA cleavage takes place in the electrical layer near the surface, as predicted by the model

surface. In bulk (reaction in solution), the magnesium is known to inhibit the cleavage of DNA by bleomycin (Chien et al. 1977; Takeshita et al. 1976). The plot of DNA breaks per molecule versus MgCl_2 concentration ($[\text{MgCl}_2]$) can be fitted by a polynomial function, which indicates that the number of DNA breaks per molecule is proportional to $[\text{MgCl}_2]^{-0.92}$. On the surface (when bleomycin interacts with adsorbed DNA molecules), the dependency of the cleavage of DNA by Fe(III)-bleomycin on the magnesium concentration is weaker than in the bulk ($[\text{MgCl}_2]^{-0.55}$). This result agrees with the electrostatic model, which predicts that DNA molecules adsorbed on a mica surface are located in the condensed counterion layer. As the concentration of magnesium condensed at the surface is weakly dependent on the bulk magnesium concentration, the DNA cleavage is weakly dependent on the bulk magnesium concentration. Using Eq. (3) and assuming that the number of DNA breaks is directly proportional to the bleomycin concentration at the surface $n_{s_{\text{blm}}}$, we obtain the bleomycin effective charge $z_{\text{eff}} \approx 1.1$. This value is pretty accurate, since the bleomycin C-terminal cationic group carries only a single positive charge. More detailed calculations performed for the adsorption of DNA into netrospin and Hoechst 33258 show that the calculated values for these ligands are a little larger than their valencies due to the sizes and flexibilities of the ligands (Rouzina and Bloomfield 1996b). Equation (5) can provide a qualitative estimation of the Fe(III)-bleomycin concentration on the surface. When $[\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ and $[\text{Fe(III)-bleomycin}] = 30 \text{ nM}$, it turns out that the surface concentration of the Fe(III)-bleomycin complex is about $0.5 \text{ }\mu\text{M}$, which is more than one order of magnitude larger than the bulk concentration. Moreover, bleomycin molecules adsorbed onto the mica surface prior to DNA deposition are able to damage DNA (data not shown), which agrees with the electrostatic adsorption hypothesis. We can therefore assume that part of the DNA damage results from bleomycin molecules adsorbed onto the surface.

For a more precise study of the effect of the surface, we have measured the number of DNA breaks per molecule versus the bleomycin concentration for bulk (Fig. 5) and adsorbed (Fig. 6) molecules, either with or without $100 \text{ }\mu\text{M}$ ascorbate. Firstly, note that the number of DNA breaks in bulk is linearly dependent on the bleomycin concentration, and it is considerably enhanced by ascorbate addition, as expected for low bleomycin concentrations (Chien et al. 1977; Li et al. 2001). For DNA molecules adsorbed on the mica surface, the number of DNA breaks is not linearly dependent on the bleomycin concentration. These results indicate that the DNA/bleomycin interaction strongly depends on the mica surface.

In the absence of ascorbate, for a wide range of bleomycin concentrations, DNA molecules are damaged more on the mica surface than in bulk. This is in agreement with the electrostatic attraction of the bleomycin molecules towards the surface (Li et al. 2001). We

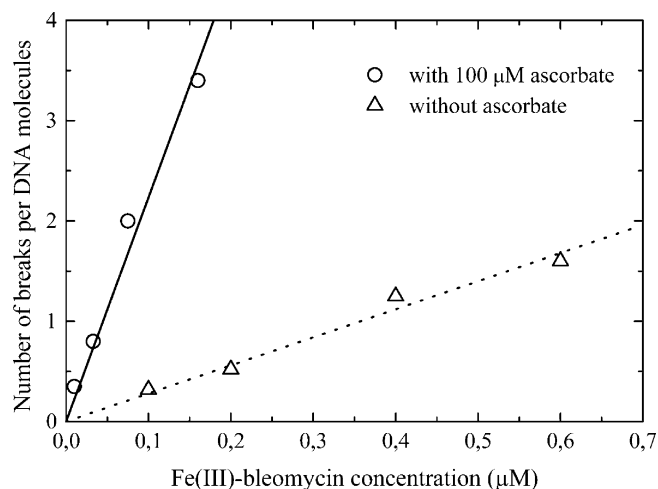


Fig. 5 Plot of the number of DNA breaks per molecule versus Fe(III)-bleomycin concentration for reactions in bulk. The measured values are obtained by analyzing AFM images of DNA molecules treated by Fe(III)-bleomycin at various concentrations with and without $100 \text{ }\mu\text{M}$ ascorbate. The number of DNA breaks is linearly dependent on the bleomycin concentration. The presence of ascorbate leads to a significant amplification of the cleavage efficiency

may assume that the high concentration of bleomycin on the surface could favor electron reduction via a dioxygen-bridged dimer of Fe(III)-bleomycin (Petering et al. 1990).

In the presence of ascorbate, the enhancement of the cleavage of DNA is not as efficient as in bulk (see Fig. 5). Generally, the addition of excess ascorbate increases the potential of a bleomycin molecule to cleave

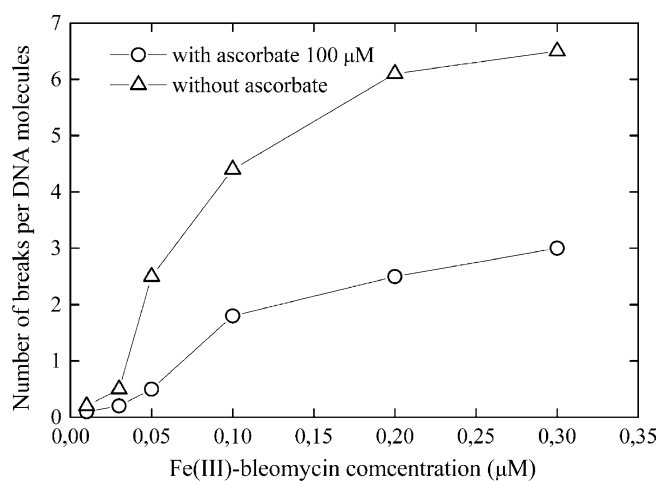


Fig. 6 Plot of the number of DNA breaks per molecule versus the Fe(III)-bleomycin concentration for molecules adsorbed onto mica prior to interacting with bleomycin, with and without $100 \text{ }\mu\text{M}$ ascorbate. The number of DNA breaks does not depend linearly on the bleomycin bulk concentration (which is observed in bulk), which indicates that the surface influences the cleavage of DNA. In the absence of ascorbate, the adsorbed molecules are damaged more than in the bulk. The amplification of the DNA cleavage by ascorbate is also less efficient than in the bulk

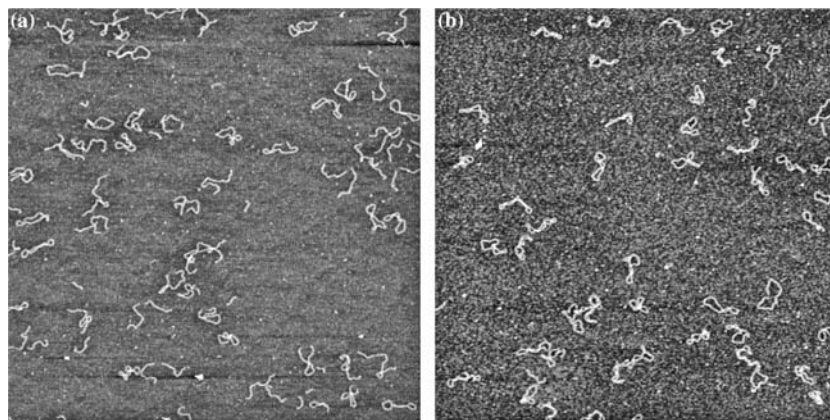


Fig. 7 Images of DNA molecules after adsorption and interaction with Fe(III)-bleomycin. The DNA molecules were previously adsorbed by adding NiCl_2 to the deposition buffer. 200 nM Fe(III)-bleomycin was then allowed to interact with DNA for 3 min. **a** 1 μl of 1 mM NiCl_2 was added to 4 μl of DNA deposition buffer. **b** 1 μl of 30 mM NiCl_2 was added to 4 μl of DNA deposition buffer. It is apparent that DNA cleavage is strongly inhibited by the addition of NiCl_2 , which neutralizes the DNA surface (this inhibition is also important when the mica is pre-treated with NiCl_2 and dried before DNA deposition). Also, the final concentration of NiCl_2 during incubation with bleomycin is relatively low (diluted 25-fold) since 20 μl of the buffer containing bleomycin is added to the DNA deposition buffer on the mica surface. Ni^{2+} ions cannot effectively compete with bleomycin for DNA binding (control experiment not shown). Scan area: $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

DNA by a factor of eight, as it has been observed in bulk (Buettner and Moseley 1992; Sugiyama et al. 1986). On the surface of the mica, the number of DNA breaks is weakly enhanced by a factor of about three. The negative charge of the ascorbate molecule may be repelled by the negatively-charged surface so that the enhancement is weaker than expected. Nevertheless, the main reason could be that the amount of DNA substrate is small compared to the high surface concentration of adsorbed bleomycin. This suggests that the catalytic function of Fe(III)-bleomycin may be less enhanced by ascorbate (Ajmera et al. 1986).

The cleavage of DNA by bleomycin is saturated at lower bleomycin concentrations on the surface than in the bulk (with or without ascorbate). The Mg^{2+} concentration in the condensed layer is very high (see Fig. 3), which may inhibit the bleomycin binding. In addition, high ionic strength is known to sharply increase the size of the bleomycin-binding site on DNA (Chien et al. 1977; Huang et al. 1980) Therefore the counterion layer could prevent the binding of bleomycin to DNA adsorbed on a mica surface.

Figure 7 shows two AFM images of DNA molecules for two NiCl_2 concentrations (200 μM and 6 mM). Figure 8 shows the number of DNA breaks per molecule versus the concentration of the 1 μl of NiCl_2 solution added to the DNA deposition buffer. Ni^{2+} ions are exchanged with the potassium ions on the surface, which leads to charge neutralization and a charge reversal at high concentrations of Ni^{2+} ions.

We can see that DNA is weakly damaged for NiCl_2 concentrations larger than 10 mM. This indicates that the surface charge inversion strongly inhibits DNA cleavage by bleomycin on the surface (this inhibition is also obtained for mica surfaces pre-treated with NiCl_2 solution, rinsed and dried before DNA deposition). When 1 μl of 1 mM NiCl_2 solution is added to the deposition buffer, the $2 \times 10^{18} \text{ m}^{-2}$ mica surface sites are partly neutralized by the Ni^{2+} ions since a surface area of mica of about 2 cm^2 is used for deposition (so there are 4×10^{14} negatively-charged mica sites and 6×10^{14} Ni^{2+} ions). The Ni^{2+} concentration at which DNA cleavage is inhibited is roughly the concentration at which the mica surface starts to be neutralized (see Fig. 6). At lower concentrations of NiCl_2 (<1 mM), the mica surface charge does not change significantly, and the presence of Ni^{2+} does not influence the bleomycin activity either. In this respect, the bleomycin can be considered to be a probe of the charge density on the surface onto which the DNA is adsorbed.

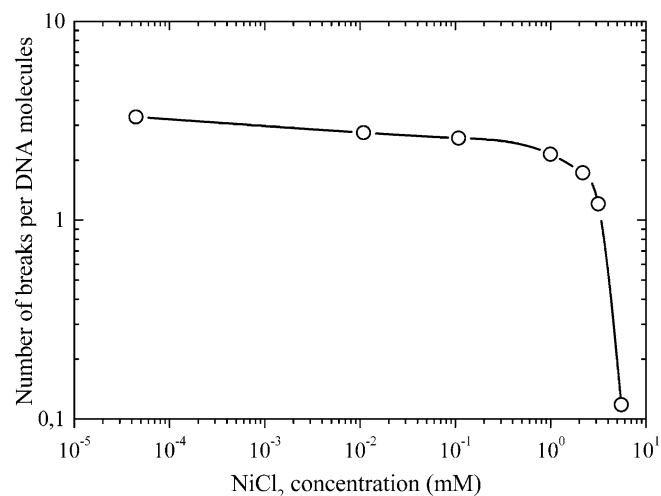


Fig. 8 Plot of the number of DNA breaks per adsorbed molecule for interactions with 200 nM Fe(III)-bleomycin versus the NiCl_2 concentration added to the deposition buffer (see caption of Fig. 7). It appears that the Ni^{2+} ions strongly adsorbed onto the mica surface inhibit the DNA cleavage, possibly due to the change in the surface charge induced by the adsorption of Ni^{2+}

The measurement of the cleavage efficiency of Fe(III)-bleomycin on the mica surface reveals that the DNA surface adsorption does not inhibit the DNA cleavage by bleomycin when the surface is negatively-charged (untreated). The electrostatic adsorption of DNA on mica mediated by Mg^{2+} divalent counterions is weak, which allows the bleomycin cleavage mechanism to take place. However the experimental results show that the interaction between bleomycin and adsorbed DNA is rather different to that in bulk. In particular, the reaction takes place in the condensed counterion layer on the negatively-charged mica surface. The bleomycin molecules can therefore be considered as counterions that participate in the surface neutralization. This suggests that the surface concentration of bleomycin should be larger on the mica surface than in bulk. The number of DNA breaks per molecule as measured by AFM is larger on the surface than in the bulk, but it is not as high as we might expect if we consider the high surface concentration of Fe(III)-bleomycin. This indicates that the cleavage of DNA by bleomycin is less effective for adsorbed DNA molecules, which is partly due to the high concentration of divalent counterions, but may also be because the DNA molecules adsorbed on the mica are not as accessible.

The surface charge is crucial to bleomycin cleavage, which is strongly inhibited when the surface charge is reversed by adding $NiCl_2$ to the deposition buffer. The results obtained from these experiments allow us to put forward some hypotheses to explain the effects of the surface charge. There is an electrostatic repulsion or attraction between bleomycin and the positively- or negatively-charged mica surface, respectively. However, we cannot exclude the role played by the orientations of the bleomycin molecules adsorbed on the surface, which can influence the DNA breakage. It is possible that the molecular orientation depends on the surface charge. In addition, the binding of DNA to the positively-charged surface is enhanced. Molecular rearrangements are hindered and the molecules adopt a more compact conformation (Pastré et al. 2003), which can make the cleavage of the DNA molecule more difficult. The experiments conducted in this study clearly demonstrate that the nature of the surface charge can perturb the cleavage of DNA by bleomycin. Similar AFM studies need to be carried out while studying DNA/ligand interactions. We have also provided evidence for the inhibition of anti-tumoral activity when DNA is bound to a positively-charged surface, which may be of particular interest when studying the action of bleomycin in chromatin (Cuiffo et al. 1985; Lönn et al. 1990; Smith et al. 1994).

References

- Abraham AT, Zhou X, Hecht SM (1999) DNA Cleavage by Fe(II)-Bleomycin conjugated to a solid support. *J Am Chem Soc* 121:1982–1983
- Ajmera S, Wu JC, Worth L, Jr, Rabow LE, Stubbe J, Kozarich JW (1986) DNA degradation by bleomycin: evidence for 2'R-proton abstraction and for C-O bond cleavage accompanying base propenal formation. *Biochemistry* 25:6586–6592
- Allison DP, Kerper PS, Doktycz MJ, Spain JA, Modrich P, Larimer FW, Thundat T, Warmack RJ (1996) Direct atomic force microscope imaging of EcoRI endonuclease site specifically bound to plasmid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8826–8829
- Berge T, Jenkins NS, Hopkirk RB, Waring MJ, Edwardson JM, Henderson RM (2002) Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 30:2980–2986
- Biggins JB, Prudent JR, Marshall DJ, Ruppen M, Thorson JS (2000) A continuous assay for DNA cleavage: the application of “break lights” to enediynes, iron-dependent agents, and nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13537–13542
- Buettner GR, Moseley PL (1992) Ascorbate both activates and inactivates bleomycin by free radical generation. *Biochemistry* 31:9784–9788
- Burger RM (1998) Cleavage of nucleic acids by bleomycin. *Chem Rev* 98:1153–1170
- Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ (1997) DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4267–4272
- Chien M, Grollman AP, Horwitz SB (1977) Bleomycin-DNA interactions: fluorescence and proton magnetic resonance studies. *Biochemistry* 16:2641–2647
- Claussen CA, Long EC (1999) Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev* 99:2797–2816
- Cuiffo BP, Fox HB, Babior BM (1985) Chromatin structure during bleomycin-induced DNA damage and repair. *Free Radical Biol Med* 1:139–144
- D'Andrea AD, Haseltine WA (1978) Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3608–3612
- Gier S, Johns WD (2000) Heavy metal-adsorption on micas and clay minerals studied by X-ray photoelectron spectroscopy. *Appl Clay Sci* 16:289–299
- Guthold M, Bezanilla M, Erie DA, Jenkins B, Hansma HG, Bustamante C (1994) Following the assembly of RNA polymerase-DNA complexes in aqueous solutions with the scanning force microscope. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12927–12931
- Huang CH, Galvan L, Croke ST (1980) Interactions of bleomycin analogues with deoxyribonucleic acid and metal ions studied by fluorescence quenching. *Biochemistry* 19:1761–1767
- Koppelman MH, Dillard JD (1977) A study of the adsorption of Ni(II) and Cu(II) by clay minerals. *Clay Clay Miner* 73:457–462
- Li W, Xia C, Antholine WE, Petering DH (2001) Interactions of iron bleomycin, phosphate or cyanide, and DNA: sequence-dependent conformations and reactions. *J Biol Inorg Chem* 6:618–627
- Li W, Antholine WE, Petering DH (2002) Kinetics of reaction of DNA-bound Fe(III)bleomycin with ascorbate: interplay of specific and non-specific binding. *J Inorg Biochem* 90:8–17
- Lloyd RS, Haidle CW, Robberson DL (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry* 17:1890–1896
- Lloyd RS, Haidle CW, Robberson DL (1979) Noncovalent intermolecular crosslinks are produced by bleomycin reaction with duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2674–2678
- Lönn U, Lönn S, Nylen U, Windblad G (1990) Bleomycin-induced DNA lesions are dependent on nucleosome repeat length. *Biochem Pharmacol* 39:101–107
- Lyubchenko YL, Jacobs BL, Lindsay SM, Stasiak A (1995) Atomic force microscopy of nucleoprotein complexes. *Scanning Microscopy* 9:705–724
- Nagami F, Zuccheri G, Samori B, Kuroda R (2002) Time-lapse imaging of conformational changes in supercoiled DNA by scanning force microscopy. *Anal Biochem* 300:170–176
- van Noort SJ, van der Werf KO, Eker AP, Wyman C, de Grooth BG, van Hulst NF, Greve J (1998) Direct visualization of dynamic

- protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope. *Biophys J* 74:2840–2849
- Pashley RM, Israelachvili JN (1984) DLVO and hybridization forces between mica surfaces in Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} chloride solutions. *J Colloid Interf Sci* 97:446–455
- Pastré D, Piétrement O, Fusil S, Landousy F, Jeusset J, David MO, Hamon L, Le Cam E, Zozime A (2003) Adsorption of DNA to mica mediated by divalent counterions: a theoretical and experimental study. *Biophys J* 85:2507–2518
- Petering DH, Byrnes RW, Antholine WE (1990) The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem Biol Interact* 73:133–182
- Piétrement O, Pastré D, Fusil S, Jeusset J, David M-O, Landousy F, Hamon L, Zozime A, Le Cam E (2003) Reversible binding of DNA on $NiCl_2$ treated mica by varying the ionic strength. *Langmuir* 19:2536–2539
- Pope LH, Davies MC, Laughton CA, Roberts CJ, Tendler SJ, Williams PM (2000) Atomic force microscopy studies of intercalation-induced changes in plasmid DNA tertiary structure. *J Microsc* 199:68–78
- Povirk LF, Goldberg IH (1983) Stoichiometric uptake of molecular oxygen and consumption of sulfhydryl groups by neocarzinostatin chromophore bound to DNA. *J Biol Chem* 258:11763–11767
- Povirk LF, Houlgrave CW (1988) Effect of apurinic/apyrimidinic endonucleases and polyamines on DNA treated with bleomycin and neocarzinostatin: specific formation and cleavage of closely opposed lesions in complementary strands. *Biochemistry* 27:3850–3857
- Revet B, Fourcade A (1998) Short unligated sticky ends enable the observation of circularised DNA by atomic force and electron microscopies. *Nucleic Acids Res* 26:2092–2097
- Rouzina I, Bloomfield VA (1996a) Competitive electrostatic binding of charged ligands to polyelectrolytes: planar and cylindrical geometries. *J Phys Chem* 100:4292–4304
- Rouzina I, Bloomfield VA (1996b) Influence of ligand spatial organization on competitive electrostatic binding to DNA. *J Phys Chem* 100:4305–4313
- Sakai TT, Riordan JM, Glickson JD (1983) Bleomycin interactions with DNA. Studies on the role of the C-terminal cationic group of bleomycin A2 in association with and degradation of DNA. *Biochim Biophys Acta* 758:176–180
- Smith BL, Bauer GB, Povirk LF (1994) DNA damage induced by bleomycin, neocarzinostatin, and melphalan in a precisely positioned nucleosome. Asymmetry in protection at the periphery of nucleosome-bound DNA. *J Biol Chem* 269:30587–30594
- Steighner RJ, Povirk LF (1990) Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8350–8354
- Sugiyama H, Morii T, Saito I, Matsuura T, Hecht SM (1986) Structure and chemistry of alkali-labile product formed during Fe(II)-bleomycin-mediated DNA strand scission. *Nucleic Acids Symp Ser* 17:165–166
- Takeshita M, Grollman AP, Horwitz SB (1976) Effect of ATP and other nucleotides on the bleomycin-induced degradation of vaccinia virus DNA. *Virology* 69:453–463
- Takeshita M, Grollman AP, Ohtsubo E, Ohtsubo H (1978) Interaction of bleomycin with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5983–5987
- Utsuno K, Tsuboi M, Katsumata S, Iwamoto T (2001) Viewing of complex molecules of ethidium bromide and plasmid DNA in solution by atomic force microscopy. *Chem Pharm Bull* 49:413–417
- Utsuno K, Tsuboi M, Katsumata S, Iwamoto T (2002) Visualization of complexes of Hoechst 33258 and DNA duplexes in solution by atomic force microscopy. *Chem Pharm Bull* 50:216–219

Chapitre 5

Etude des interactions entre l'ADN
et la protéine Ku.

PLAN DU CHAPITRE 5

Introduction	154
I – Présentation générale de la protéine Ku.	154
Introduction	154
A. Localisation cellulaire.	154
B. Données structurales sur l'hétérodimère Ku70/80.	154
C. Implication de Ku dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.	156
D. Interaction de Ku avec les protéines impliquées dans le NHEJ.	158
1. <i>L'association Ku-DNA-PKcs.</i>	158
1.1. <i>La DNA-PKcs.</i>	158
1.2. <i>Interactions Ku/DNA-PKcs.</i>	158
1.3. <i>Activité DNA-PK.</i>	159
a. <i>Activation.</i>	159
b. <i>Inhibition, ciblage pharmacologique.</i>	159
c. <i>Substrats impliqués dans le NHEJ.</i>	159
d. <i>Régulation de l'entrée de Ku sur l'ADN.</i>	159
e. <i>Autres substrats.</i>	160
2. <i>Interaction de Ku avec d'autres partenaires impliqués dans le NHEJ.</i>	160
2.1. <i>WRN.</i>	160
2.2. <i>Artemis.</i>	160
2.3. <i>Polymérase λ et μ.</i>	161
2.4. <i>PNK.</i>	161
2.5. <i>Le complexe XRCC4-ligase IV.</i>	161
3. <i>Cas de la recombinaison V(D)J.</i>	161
E. Implication de Ku dans d'autres mécanismes.	162
Conclusion.	162
II – Etude des propriétés des interactions ADN-Ku en AFM et MET.	163
A. Introduction.	163
B. Matériels et méthodes.	163
1. <i>Protéine Ku.</i>	163
2. <i>ADN.</i>	163
2.1. <i>ADN double brin linéaire.</i>	163
2.2. <i>ADN double brin circulaire.</i>	164
2.3. <i>ADN simple brin.</i>	164
2.4. <i>ADN hybride simple brin/double brin.</i>	164
3. <i>Complexes streptavidine - ADN biotinylé aux extrémités.</i>	165
3.1. <i>Obturation des extrémités.</i>	165
3.2. <i>Circularisation.</i>	165
3.3. <i>Préparation de trimères.</i>	166
4. <i>ADN avec cassures simple brin.</i>	166
4.1. <i>ADN circulaire avec cassures simple brin.</i>	166
4.2. <i>ADN linéaire avec cassures simple brin.</i>	166
5. <i>Microscopie électronique à transmission.</i>	167
6. <i>Microscopie à force atomique.</i>	168
C. Résultats et discussion.	168
1. <i>Etude par AFM.</i>	168
1.1. <i>Observation des complexes ADN-Ku par AFM à l'air.</i>	168

1.2. Observation par AFM en milieu liquide.	172
2. Etude en MET.	177
2.1. Oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin.	178
2.2. Liaison de Ku aux extrémités.	178
2.3. Etude de la formation des complexes en fonction de la concentration et de la température.	180
a. ADN linéaire de 1440 pb.	180
b. ADN linéaire de 439 pb.	180
c. Comparaison entre l'ADN de 1440 pb et l'ADN de 439 pb.	180
2.4. Dépendance de la présence d'extrémités libres.	185
a. Interaction de Ku avec l'ADN circulaire relâché.	185
b. Interaction de Ku avec l'ADN circulaire superenroulé négativement.	185
c. Interaction de Ku avec l'ADN circularisé par la streptavidine.	186
d. Entrée et sortie de Ku sur des ADN linéaires.	187
2.5. Interaction de Ku avec l'ADN simple brin.	188
a. Fixation de Ku sur l'ADN simple brin circulaire.	188
b. Fixation de Ku sur des gaps.	190
b. Fixation de Ku sur une construction linéaire hybride simple brin/double brin.	190
2.6. Reconnaissance des cassures simple brin.	192
3. Discussion.	194
Conclusion et perspectives.	198
Bibliographie du chapitre 5.	199

CHAPITRE 5

Etude des interactions entre l'ADN et la protéine Ku.

Introduction

L'ADN est constamment soumis à des agents génotoxiques d'origine endogène ou exogènes qui y génèrent des modifications chimiques et structurales, et mettent en danger l'intégrité du matériel génétique. Les lésions de l'ADN doivent impérativement être reconnues et réparées sinon elles peuvent être à l'origine de transformations cellulaires et donc de cancers. Les lésions sont prises en charge par des protéines de réparation. Nous nous intéressons dans ce chapitre à une de ces protéines : Ku, décrite comme étant acteur du mécanisme *NHEJ* (Non Homologous End Joining) de réparation des cassures double brin de l'ADN, mais également impliquée dans bien d'autres fonctions.

I – Présentation générale de la protéine Ku.

Introduction

Ku chez les eucaryotes est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : Ku70 (Yku70 ou Hdf1 chez *S. cerevisiae*) et Ku80 (Yku80 ou Hdf2 chez *S. cerevisiae*, Ku86 chez les eucaryotes supérieurs) respectivement de 70 et 80 kDa approximativement. Les monomères humains comprennent respectivement 609 et 732 acides aminés. Ku a été initialement identifiée en 1981, dans le sérum de patients atteints du syndrome de *polymyositis scleroderma overlap* (1) ; le nom Ku correspond aux deux premières lettres du nom du premier patient. Ku est aussi connue sous les noms de NFIV (2,3), EBP-80 (4), TREF (5) et PSE1 (6). Les gènes de Ku86 et Ku70 sont désignés respectivement par *XRCC5* et *XRCC6* (7). Ku est présente en grande quantité dans les cellules (au moins 400000 exemplaires par cellule (8,9)). Les homologues chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, Hdf1 et Hdf2 ont été identifiés initialement en 1993 (10). Chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, les deux sous-unités et la DNA-PKcs ont été identifiées expérimentalement en 2005 (11,12). Des homologues de Ku ont aussi été identifiés chez les archaebactéries et chez les bactéries, en 2001 (13,14).

A. Localisation cellulaire.

Chez les eucaryotes Ku est essentiellement localisée dans le noyau des cellules, où elle joue un rôle central dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. Ku70 et Ku80 sont aussi présentes en moindre quantité dans le cytoplasme, et à la surface de différents types de cellules (pour une revue voir (15)). La présence de Ku dans les radeaux lipidiques membranaires a été démontrée (16). Une implication de Ku dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (17) a été établie ; Ku pourrait aussi être impliquée dans la migration cellulaire et l'invasion cellulaire (18).

B. Données structurales sur l'hétérodimère Ku70/80.

Ku70 et Ku80 présentent des homologies de séquence qui indiquent qu'elles dérivent d'un ancêtre commun (19). Plusieurs travaux sur l'identification de domaines fonctionnels de

Ku (domaines impliqués dans l'hétérodimérisation, domaines impliqués dans la liaison aux extrémités de l'ADN) (19-23) ont précédé l'élucidation de la structure cristallographique de l'hétérodimère seul ou complexé à l'ADN (24,25) (**figures I-1A et 1B**) ainsi que les structures en solution de la région C terminale de Ku86 (26,27) – absente de la structure cristallographique - et de Ku70 (28). Les repliements globaux de Ku70 et Ku80 sont très similaires (**figure I-2**) et les deux protéines réunies dans l'hétérodimère forment une structure en anneau quasi-symétrique, qui est observée en absence comme en présence de l'ADN.

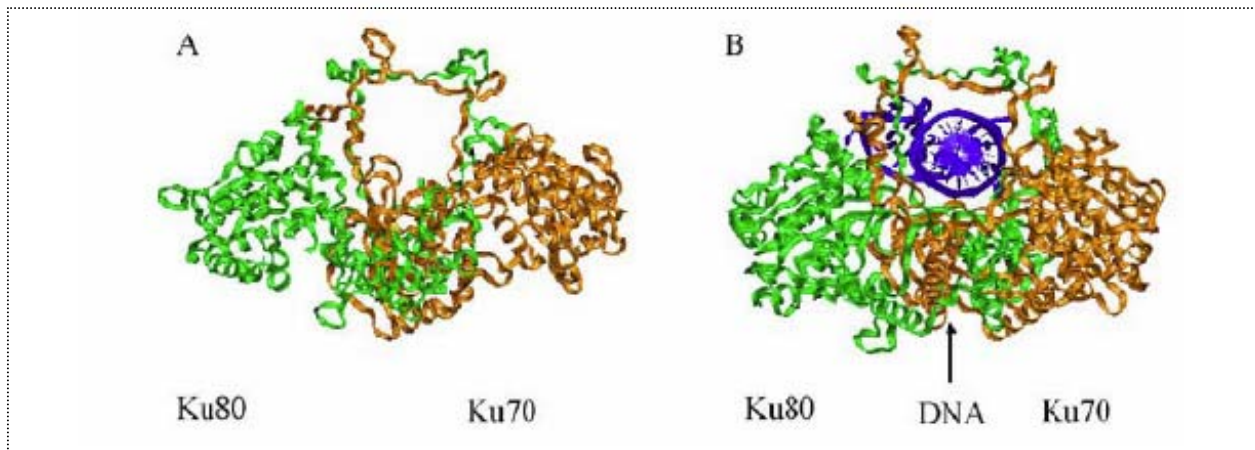


Figure I-1 : *Structure cristallographique de l'hétérodimère Ku seul (A) ou complexé à l'ADN (B). Figures d'après (29).*

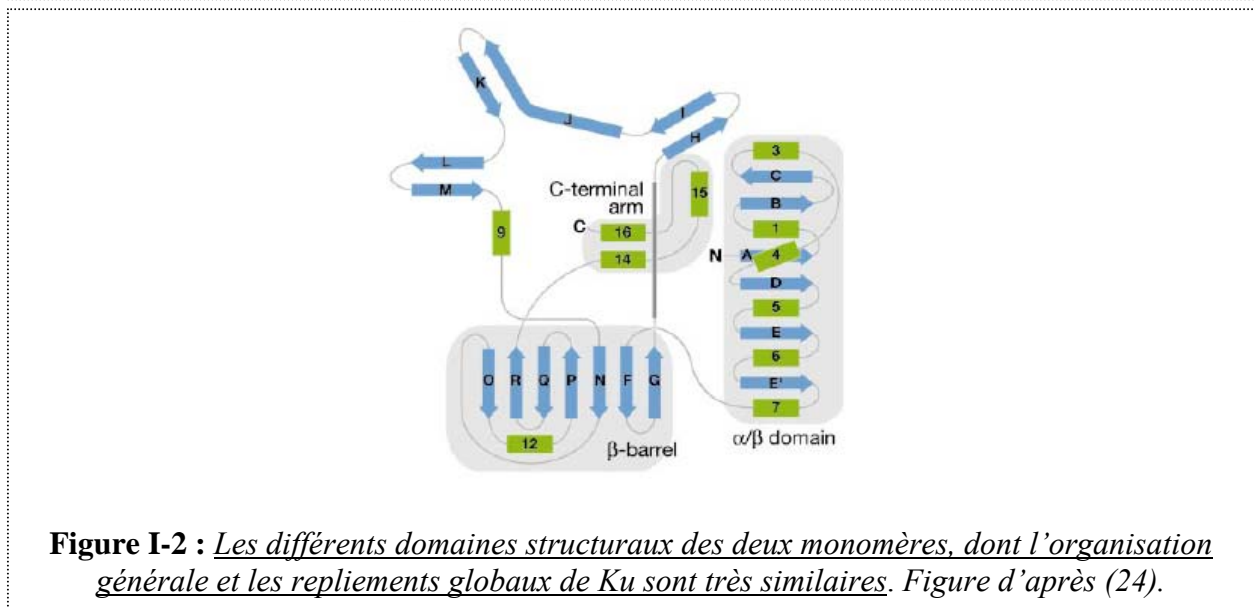


Figure I-2 : *Les différents domaines structuraux des deux monomères, dont l'organisation générale et les repliements globaux de Ku sont très similaires. Figure d'après (24).*

L'organisation commune de Ku70 et Ku80 comprend plus précisément trois domaines : un domaine amino-terminal α/β , un domaine en tonneau β , et un bras carboxy-terminal avec une structure en hélice. Le domaine amino-terminal comprend un feuillet β à six segments. Il est situé à l'extérieur du complexe et pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec d'autres protéines. Le domaine central en tonneau β à sept segments antiparallèles forme avec un pont β un canal capable d'entourer étroitement l'ADN. Ce canal comporte une série de résidus chargés positivement à sa surface interne (**figure I-3**), pouvant donc neutraliser les charges négatives du squelette sucre-phosphate de l'ADN. Le domaine carboxy-terminal de

chaque sous-unité est essentiellement hélical, et pourrait jouer un rôle important dans l'hétérodimérisation (24,25).

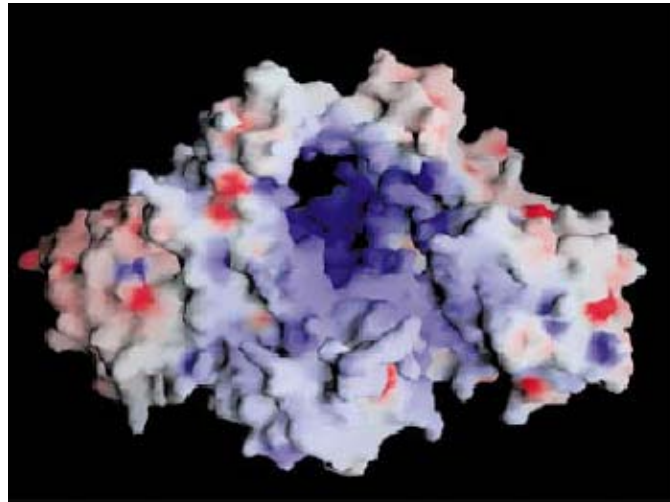


Figure I-3 : *Surface moléculaire de Ku colorée en fonction du potentiel électrostatique (négatif en rouge et positif en bleu). Figure d'après (24).*

Dans la structure cristallographique, l'anneau de Ku n'a pas de contacts avec les bases de l'ADN, et assez peu avec le squelette sucre-phosphate (24). Notons que l'anneau n'est pas le seul domaine de liaison à l'ADN identifié : Ku70 comporte dans sa partie C-terminale un autre domaine de liaison à l'ADN.

Sur un ADN avec une extrémité libre et une extrémité bouchée par une streptavidine, c'est Ku80 qui « rentre d'abord » et donc Ku70 qui est du côté de l'extrémité libre (30).

C. Implication de Ku dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.

Les cassures double brin interviennent très souvent dans la cellule ; elles peuvent être d'origine exogène (radiations ionisantes naturelles ou artificielles, médicaments anticancéreux comme la bléomycine,...) ou endogène (radicaux libres générés par le métabolisme oxydatif, recombinaison,...) (7). Deux voies principales de réparation des cassures double brin de l'ADN ont été identifiées dans les cellules eucaryotes : la recombinaison homologue (*Homologous Recombination* ou *HR*) et la jonction non homologue d'extrémités (*Non Homologous End Joining* ou *NHEJ*). La *HR* dépend de l'utilisation d'un ADN homologue - tel que l'ADN de la chromatide sœur - tandis que le *NHEJ* accole et joint les deux extrémités de la cassure au sein d'un complexe ADN-protéine sans que l'utilisation d'une homologie soit nécessaire. La *HR* intervient préférentiellement pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire, tandis que le *NHEJ* joue un rôle dominant dans la réparation des cassures double brin pendant la phase G1-S (31). Les principales étapes de la voie *NHEJ* de réparation des cassures double brin sont schématisées dans la **figure I-4**.

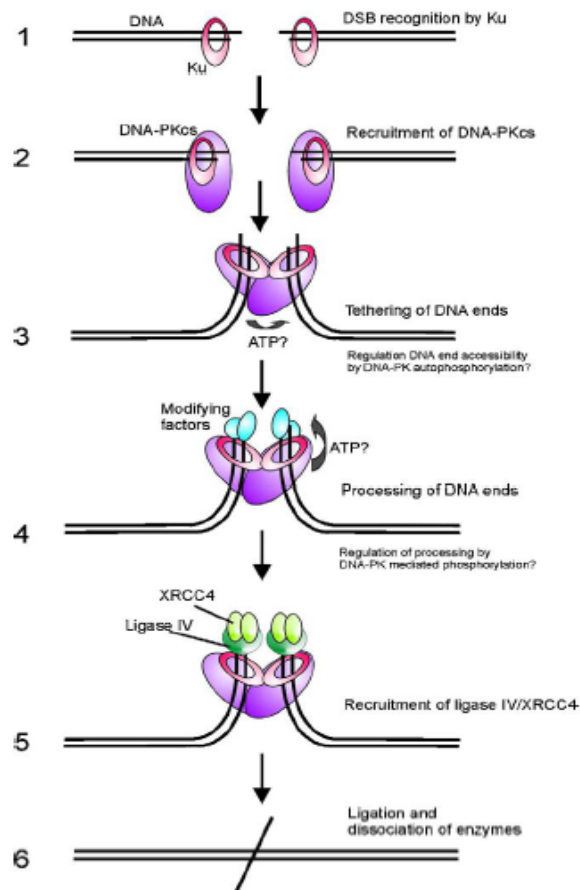


Figure I-4 : *Schéma du mécanisme de réparation des cassures double brin par jonction d'extrémités non homologues.* Figure d'après (32).

- 1) Il est considéré que c'est l'hétérodimère Ku70/80 qui reconnaît la cassure double brin, en raison de son affinité pour les extrémités de l'ADN double brin,
- 2) puis y recrute la DNA-PKcs.
- 3) Les extrémités de l'ADN sont ensuite associées par ces protéines.
- 4) Les cassures sont maturées pour permettre leur rabouillage, ce qui implique des activités hélicases (ouverture de la double hélice d'ADN), exonucléases (digestion de nucléotides à partir de l'extrémité) et polymérases (ajout et liaison de nucléotides supplémentaires à l'ADN).
- 5) et 6) Le complexe ligase IV – XRCC4 est recruté à son tour et son action permet la ligation de la cassure.

La machinerie *NHEJ* intervient aussi dans la recombinaison V(D)J, un mécanisme de réarrangement génomique qui génère la diversité dans les gènes codant pour les immunoglobulines et les récepteurs des lymphocytes T des vertébrés. V, D et J désignent respectivement les segments Variable, Diversité et Jonction des gènes considérés. Les segments dits codants, qui codent pour la partie de l'immunoglobuline ou du récepteur de lymphocyte T capable de reconnaître un antigène, peuvent être associés dans des combinaisons multiples par recombinaison. Celle-ci survient après génération de cassures double brin au niveau de séquences dites Séquences Signal de Recombinaison (*Recombination Signal Sequences* ou *RSS*), qui flanquent les segments de gènes V(D)J. C'est essentiellement la machinerie *NHEJ* qui est utilisée pour traiter et rabouter les extrémités d'ADN générées au cours de ce processus (33).

Notons qu'il a récemment aussi été décrit une voie alternative de jonction d'extrémités non homologues ; les acteurs actuellement identifiés dans cette voie sont la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1), le complexe XRCC1/ligase III, et la polynucléotide kinase (PNK) (34,35).

D. Interaction de Ku avec les protéines impliquées dans le *NHEJ*.

1. L'association Ku-DNA-PKcs.

Le complexe Ku+DNA-PKcs forme l'enzyme DNA-PK, l'un des acteurs principaux du mécanisme *NHEJ* de réparation des cassures double brin de l'ADN (pour des revues sur la DNA-PK voir (36-40)). La DNA-PK (Ku + DNA-PKcs) s'assemble en présence d'ADN (41).

1.1. La DNA-PKcs.

La DNA-PKcs (ou p460) est une protéine d'environ 460 kDa. Le gène de la DNA-PKcs est désigné par *XRCC7* (7). La partie C-terminale de la protéine la rattache à la famille des phosphatidyl inositol 3 – kinases (PI3-kinases), mais son activité est de type protéine-kinase (37). La phosphorylation intervient sur un motif S/T-Q (sérine ou thréonine suivie d'une glutamine). La structure de la DNA-PKcs (42,43) et les changements conformationnels induits par l'ADN (44) ont été étudiés par microscopie électronique (revue dans (29)). La DNA-PKcs libre peut être décrite par une organisation en trois domaines : tête, paume, et bras connectant la tête et la paume. La DNA-PKcs liée à l'ADN présente des changements conformationnels substantiels. En particulier, la paume est repliée vers la tête, laissant libre entre les deux un petit canal suffisamment large pour accueillir de l'ADN double brin (**figure I-5**).

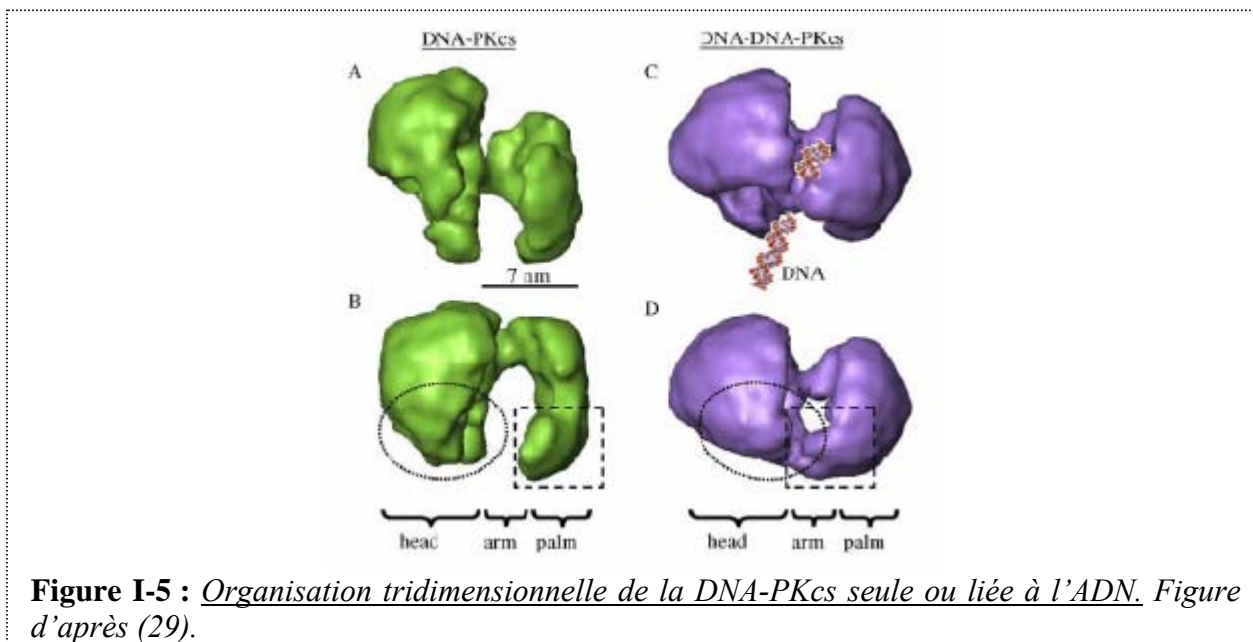


Figure I-5 : *Organisation tridimensionnelle de la DNA-PKcs seule ou liée à l'ADN. Figure d'après (29).*

1.2. Interactions Ku/DNA-PKcs.

La région C-terminale de Ku80, en particulier ses 12 derniers acides aminés, a une interaction fortement spécifique avec la DNA-PKcs (19), que Ku recrute aux extrémités de l'ADN dans le *NHEJ* (l'association de la DNA-PKcs aux extrémités de l'ADN peut cependant

se faire même en l'absence de Ku (45)). Le recrutement de la DNA-PKcs induit une translocation de Ku de l'extrémité vers l'intérieur de la molécule d'ADN (46). Une structure tridimensionnelle de la DNA-PKcs associée à Ku sur l'ADN vient très récemment d'être établie, avec une résolution d'environ 2,5 nm (47).

1.3. Activité DNA-PK.

a. Activation.

La DNA-PKcs seule a une activité kinase considérée comme faible. Elle peut se lier à l'ADN linéaire et son activité kinase en être stimulée même en l'absence de Ku (48) mais l'activité est grandement stimulée par l'association avec Ku aux extrémités de l'ADN. Ku et la DNA-PKcs ne peuvent pas se lier simultanément à un fragment d'ADN s'il est trop court (18 paires de bases ne permettent la fixation que d'une des deux protéines, exclusivement de l'autre) ; le fragment d'ADN doit être suffisamment long pour une liaison simultanée pour que Ku stimule l'activité kinase de la DNA-PKcs (48). La DNA-PKcs est aussi activée par les extrémités simple brin (49,50). Nous ne détaillerons pas ici les protéines autres que Ku pour lesquels un effet activateur a été montré, plusieurs sont récapitulées dans la revue (37).

b. Inhibition, ciblage pharmacologique.

L'activité DNA-PK peut être inhibée notamment par la wortmannine et par le composé LY294002 (51) ou par le composé Nu7026, dérivé du précédent et beaucoup plus spécifique (52). La DNA-PK est une cible pharmacologique dans le traitement du cancer par chimiothérapie et radiothérapie ; son inhibition a un effet de radio- et chimiosensibilisation (53).

c. Substrats impliqués dans le NHEJ.

La DNA-PK phosphoryle Ku, XRCC4 et Artemis. La DNA-PKcs est également capable de s'autophosphoryler, ce qui est nécessaire pour qu'elle se dissocie de Ku. Cela conduit à la libération de la DNA-PKcs des extrémités de l'ADN, nécessaire pour la progression ultérieure du *NHEJ* avec les étapes de maturation des extrémités à rabouter puis leur ligation. XRCC1, impliquée dans la voie de jonction des extrémités alternative au *NHEJ* évoquée en **I-C.**, est aussi phosphorylée par la DNA-PK (54).

d. Régulation de l'entrée de Ku sur l'ADN.

L'activité DNA-PK régule l'entrée de Ku sur l'ADN (53). En situation de kinase active, Ku rentre et s'accumule le long de l'ADN, qu'elle rend inaccessible ; des mécanismes tels que la réparation par la voie de *Nucleotide Excision Repair* ou *NER* (55,56) ou la transcription (56) sont alors inhibés. En situation de kinase inhibée, Ku reste à l'extrémité, avec la DNA-PKcs ; l'activité enzymatique aux extrémités (dégradation, synthèse ou ligation) est en grande partie empêchée (57) mais le reste de la molécule d'ADN est accessible et le *NER* ou la transcription ne sont pas bloqués (56) (**figure I-6**).

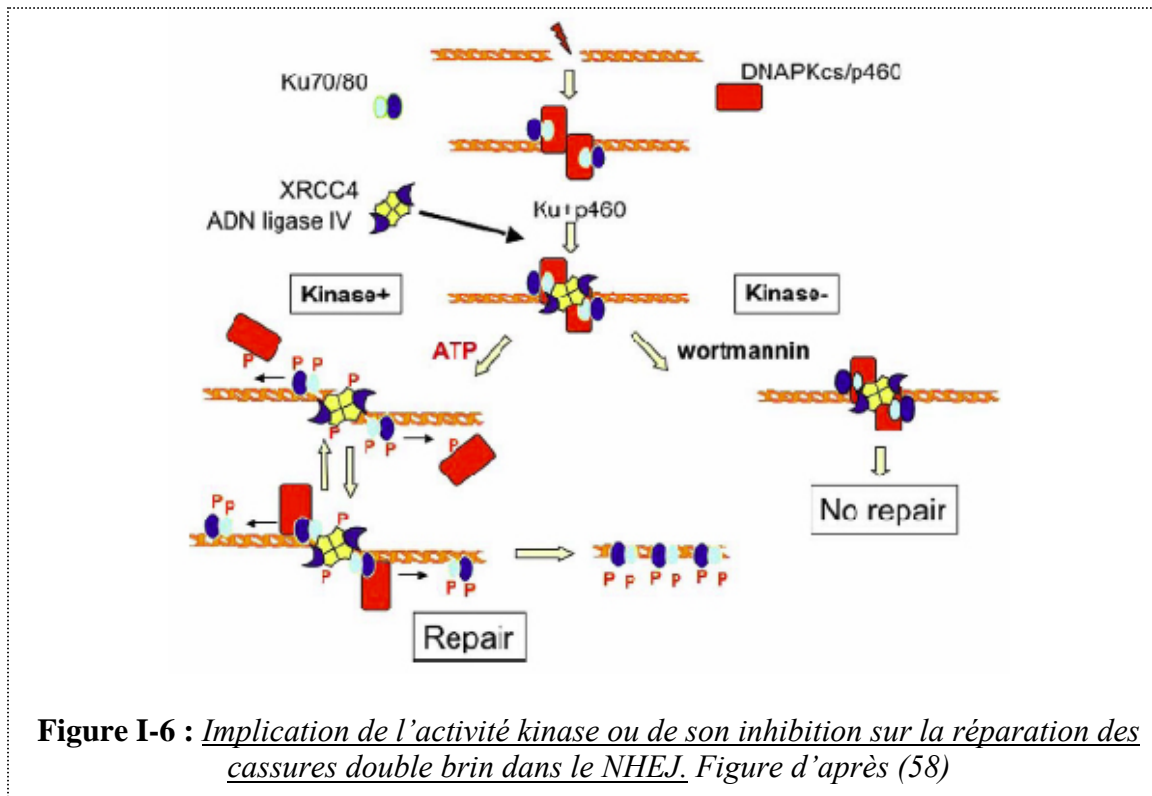


Figure I-6 : *Implication de l'activité kinase ou de son inhibition sur la réparation des cassures double brin dans le NHEJ. Figure d'après (58)*

e. Autres substrats.

Comme les protéines ATM et ATR, la DNA-PK joue un rôle essentiel dans la signalisation des dommages de l'ADN et l'initiation de la réponse de la cellule à ce stress génotoxique (59). LA DNA-PK phosphoryle de nombreux substrats, récapitulés dans la revue (38), après la détection des dommages.

2. Interaction de Ku avec d'autres partenaires impliqués dans le NHEJ.

Ku interagit directement (par contact physique) ou indirectement (par la régulation de l'activité kinase de la DNA-PKcs) avec les autres partenaires du *NHEJ*, qui interviennent dans les étapes postérieures au recrutement de la DNA-PKcs au niveau extrémités à rabouter. Nous présentons ici succinctement ces partenaires et leurs interactions connues avec Ku.

2.1. WRN.

La protéine du syndrome de Werner (WRN) est une protéine de 160 kDa (1432 acides aminés), qui possède une activité hélicase et exonucléase avec une directionnalité 3'→5' (pour une revue voir (60)). Ku70/80 et WRN interagissent directement, en l'absence d'ADN ; les deux protéines copurifient et coimmunoprécipitent (61). Ku n'a pas d'effet sur l'activité hélicase ou ATPase de WRN mais stimule fortement son activité exonucléase (61). WRN est capable de déplacer la DNA-PKcs des extrémités de l'ADN (62) et intervient dans la maturation des extrémités à rabouter (62,63).

2.2. Artemis.

La protéine Artemis (pour une revue voir (64)) purifiée possède une activité exonucléase orientée 5'→3' sur les extrémités simple brin sortantes. Elle est capable de

former un complexe avec la DNA-PKcs en l'absence d'ADN (65) mais n'a pas à notre connaissance d'interaction directe avec Ku. Artemis est l'une des cibles de phosphorylation de la DNA-PK (66). La phosphorylation d'Artemis lui confère une activité endonucléase sur les extrémités simple brin 5' ou 3' et les *hairpins* (65). Artemis intervient à la fois dans la maturation des extrémités à rabouter dans le *NHEJ*, et dans l'ouverture des *hairpins* dans la recombinaison V(D)J.

2.3. Polymérase λ et μ .

Ces polymérase interviennent pour la synthèse d'ADN à l'étape de maturation des extrémités dans la voie *NHEJ* (67,68). Dans des extraits cellulaires, Pol μ s'associe avec Ku. In vitro, Pol μ a besoin de Ku et du complexe XRCC4-ligase IV pour former un complexe stable sur l'ADN. Réciproquement Pol μ facilite le recrutement de XRCC4-ligase IV sur l'ADN lié à Ku et la jonction des extrémités par la ligase IV (67). Pol λ pourrait être la principale responsable du remplissage des brèches au niveau de la jonction (69).

2.4. PNK.

La PNK est une 5'kinase/3'phosphatase qui génère les extrémités 5' phosphate/3'hydroxyle prérequisées pour l'étape de ligation du *NHEJ* (70). La structure de cette enzyme a été déterminée par cristallographie (71). Il a été montré une interaction directe de la PNK avec XRCC4 (72) mais à notre connaissance pas avec Ku ni avec la DNA-PKcs. La PNK interagit aussi avec XRCC1 (73), impliquée dans l'initiation de la réparation par la voie de *Base Excision Repair* ou *BER* à partir de cassures simple brin et dans la voie de jonction des extrémité alternative au *NHEJ* évoquée en **I-C.** .

2.5. Le complexe XRCC4-ligase IV.

XRCC4 et la ligase IV forment un complexe dans la cellule, avec une interaction particulièrement forte. La cristallographie indique que ce complexe est un dimère de XRCC4 associé à un monomère de ligase IV (74). La ligase IV catalyse l'étape finale de ligation dans le *NHEJ*. Il existe une interaction protéine-protéine spécifique et directe (ne nécessitant pas l'ADN comme cofacteur) entre Ku et la ligase IV (75). XRCC4 et la ligase IV font également partie des cibles de phosphorylation de la DNA-PK. Le recrutement du complexe XRCC4-ligase IV sur les cassures double brin est dépendant à la fois de Ku et de la DNA-PKcs. Lors de sa liaison à une extrémité d'ADN, il pourrait induire une translocation de Ku vers l'intérieur de la molécule (76).

3. Cas de la recombinaison V(D)J.

Comme évoqué en **I-C.**, les partenaires de Ku dans le *NHEJ* interviennent aussi dans la recombinaison V(D)J. Il a de plus été en mis en évidence une interaction entre Ku et l'enzyme TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*), qui suggère que Ku pourrait recruter TdT au niveau des extrémités d'ADN pendant la recombinaison V(D)J (77). Cette enzyme ajoute des nucléotides aux extrémités 3' libres, contribuant ainsi de manière majeure à la génération de diversité de séquence au niveau des extrémités produites pendant la recombinaison V(D)J.

E. Implication de Ku dans d'autres mécanismes.

Il existe de nombreuses indications que Ku ne soit pas seulement impliquée dans le *NHEJ*, mais soit une protéine pléiotropique, capable d'intervenir dans de nombreux mécanismes (78).

Il s'agit d'abord de mécanismes faisant intervenir des extrémités d'ADN à rabouter comme la recombinaison V(D)J déjà évoquée (voir **I-C.**), la transposition ou l'intégration d'ADN d'origine exogène ou endogène (79-81). Ku interagit fortement aussi avec les extrémités des chromosomes, appelées télomères, chez de nombreuses espèces eucaryotes, et a un rôle dans leur maintenance (82-84).

Il s'agit également de mécanismes se déroulant en l'absence d'extrémités libres d'ADN, comme la réplication, la transcription, ou la réparation des cassures simple brin de l'ADN.

Ku interagit physiquement avec différentes protéines impliquées dans la réplication, notamment les ADN polymérase α , δ et ϵ , PCNA, RFC,...(85). *In vivo*, chez les mammifères, Ku s'associe avec les origines de réplication, avec une action à l'étape d'initiation du mécanisme (86).

In vitro, Ku entre efficacement en compétition avec des facteurs de transcription comme OTF-1, Sp-1 ou AP-1 sur ADN linéaire; l'effet disparaît sur ADN circulaire (87). Ku est capable de réprimer la transcription du MMTV (*Mouse Mammary Tumour Virus*) (88). L'interaction de Ku avec des protéines de la machinerie de transcription pourrait être impliquée dans ces effets transcriptionnels (78), et l'activité kinase de la DNA-PK, qui régule l'entrée de Ku sur l'ADN, est également déterminante (voir **I-C.1.3.** ci-dessus). Notons que Ku peut se lier de manière spécifique sur le brin supérieur de la séquence NRE1 du LTR (*Long Terminal Repeat*) du MMTV mais ne se lie pas sur le brin inférieur (88,89) et pourrait adopter une conformation différente sur le NRE1 simple brin et sur le NRE1 double brin, avec une influence sur le recrutement et l'activité de la DNA-PKcs (88).

Il a été montré une interaction directe entre Ku et la protéine PARP-1 (90), le principal acteur de la réparation des cassures simple brin de l'ADN, qui a aussi été décrite dans la voie de jonction d'extrémités non homologues alternative au *NHEJ* évoquée en **I-C.** .

Certains travaux ont également suggéré une activité ATPase et hélicase pour la protéine Ku (91,92), appelée alors HDH II (*Human DNA Helicase II*). Cette activité résiderait uniquement dans la sous-unité Ku70 (93). La présence d'extrémités simple brin est nécessaire à cette activité, qui n'a par contre pas lieu sur l'ADN double brin avec extrémités à bouts francs.

D'autres rôles de Ku dans la cellule (que nous ne détaillerons pas ici dans la mesure où ils n'impliquent pas directement une interaction ADN-Ku) commencent également à être décrits : implication dans l'apoptose au niveau du noyau et du cytosol (94-96), implication dans l'interaction avec le milieu extracellulaire au niveau de la membrane cellulaire (18,97).

Conclusion.

Ku a un rôle majeur dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par la voie *NHEJ*. Ce rôle repose à la fois sur une interaction avec les extrémités de l'ADN et une interaction directe ou indirecte avec les autres acteurs de la voie *NHEJ*, en particulier avec la DNA-PKcs, dont elle régule l'activité kinase. Cependant de toute évidence Ku n'est pas une protéine impliquée seulement dans la réparation de l'ADN. Dans le noyau, où elle est présente en grande quantité, elle intervient dans d'autres processus de la vie de l'ADN mettant en jeu des extrémités à rabouter (transposition d'ADN) ou à ne pas rabouter (maintenance des télomères) mais également dans des processus qui se déroulent loin des extrémités de l'ADN,

comme la transcription ou la réplication. Des rôles de Ku hors du noyau commencent à être identifiés et analysés, avec une implication dans l'apoptose et dans diverses interactions de la cellule avec le milieu extracellulaire. La variété des mécanismes de la vie de l'ADN impliquant Ku nous interpelle sur la nature des interactions ADN-Ku. La diversité des substrats d'ADN avec lesquels une interaction a été mise en évidence (revues dans (98,99)) nous a décidé à étudier les mécanismes de reconnaissance de l'ADN par Ku. L'AFM et la MET, qui permettent de caractériser les complexes à l'échelle de la molécule individuelles, sont des outils de choix pour analyser le comportement de Ku sur l'ADN, en fonction des propriétés du substrat ADN et des conditions de réaction.

II – Etude des propriétés des interactions ADN-Ku en AFM et MET.

A. Introduction.

L'essentiel des résultats relatifs à Ku porte sur le modèle du *NHEJ* qui implique une reconnaissance des extrémités double brin et l'association de ces extrémités par le complexe DNA-PK (Ku+DNA-PKcs). Certains résultats suggèrent cependant que si Ku rentre sur une cassure double brin elle est capable d'envahir de longs segments d'ADN, et cet événement n'est pas actuellement relié à une fonction précise. Par ailleurs la présence de Ku dans les régions télomériques n'est pas comprise. Nous avons exploré les modes de fixation de Ku à l'ADN dans le but de les rapprocher des différentes implications de Ku énoncées ci-dessus. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Patrick Calsou et Bernard Salles. Nous avons dans un premier temps réalisé cette étude par AFM. Au regard de la problématique de la méthode et des résultats préliminaires obtenus nous avons approfondi l'étude en MET.

B. Matériels et méthodes.

1. Protéine Ku.

L'hétérodimère Ku (70/80 kDa) nous a été fourni par l'équipe de Patrick Calsou et Bernard Salles. Il s'agit de la forme humaine de la protéine exprimée sous forme recombinante chez le baculovirus puis purifiée (55).

2. ADN.

Différents substrats d'ADN correspondant à différents états ont été utilisés (double brin, simple brin, linéaire, circulaire).

2.1. ADN double brin linéaire.

La préparation d'ADN double brin linéaire de 1440 paires de bases est décrite au **chapitre II** pages 76 (ADN non biotinylé aux extrémités) et 83 (ADN biotinylé à une ou deux extrémités).

Nous avons également travaillé avec un ADN double brin linéaire de 439 paires de bases. Il provient de la séquence centrale du VIH contenant le PPT (*PolyPurine Track*) central et le site CTS de terminaison de la reverse-transcription. L'amplification est faite par PCR. Le fragment est purifié directement par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (MiniQ), avec élution par un gradient entre Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM et Tris 10 mM

pH 7,5 NaCl 1 M. L'une et/ou l'autre des extrémités de cet ADN peuvent être biotinylées en utilisant des amorces portant une biotine.

2.2. ADN double brin circulaire.

Deux ADN ont été utilisés : le plasmide pBR322 (4361 paires de bases) superenroulé (New England Biolabs) et le plasmide pTZ (2861 paires de bases) superenroulé. Ces formes relâchées ont été préparées par réaction 1 heure à 37°C avec la topoisomérase I (Fermentas) suivie d'une purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6) en tampon NaCl 50 mM Tris 10 mM pH 7,5. Les préparations ont été contrôlées en MET.

2.3. ADN simple brin.

Nous avons utilisé l'ADN simple brin circulaire Φ x174 virion (New England Biolabs), de longueur 5386 nucléotides.

2.4. ADN hybride simple brin/double brin.

Un ADN linéaire hybride comportant une partie double brin 600 paires de bases et une partie simple brin de 840 nucléotides (**figure II-1**) semblable à celui utilisé au **chapitre 3** partie **III** page 100 a été préparé comme décrit dans (100).

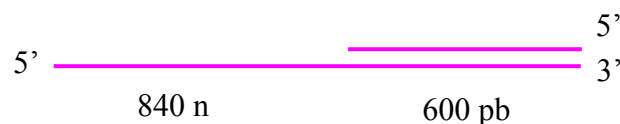


Figure II-1 : *Schéma de la construction d'ADN linéaires hybride simple brin/double brin. La construction a une extension simple brin 5' sortante.*

Un ADN circulaire hybride comportant une partie double brin et une partie simple brin (**figure II-2**) a été préparé par élongation d'amorce sur l'ADN simple brin circulaire Φ x174 virion (5386 bases) par la Taq polymérase. L'amorce de départ d'élongation a pour séquence 5' AAC AGC CAT ATA ACT GGT AGC TTT AAG 3' et se positionne des bases 5000 à 4974 du Φ x174. L'extension d'amorce et l'élongation sont faites à 72°C pendant 30 minutes, après une étape de dénaturation (2 minutes à 95°C, pour défaire les structures secondaires du Φ x174) et une étape d'hybridation de l'amorce à sa température T_m de 60,4°C. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur colonne échangeuse d'anions MiniQ par élution par un gradient de NaCl entre Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM et Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 1 M. Après précipitation éthanol et resuspension dans une solution de Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 10 mM, la préparation est contrôlée en MET. La longueur de la partie double brin obtenue est en moyenne de 2000 paires de bases +/- 265 paires de bases (estimation sur 100 molécules).

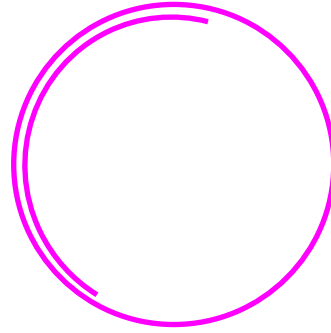


Figure II-2 : *Schéma de la construction d'ADN circulaire hybride simple brin/double brin. La partie double brin obtenue est d'environ 2000 pb en moyenne et la partie simple brin est d'environ 3500 n en moyenne.*

3. Complexes streptavidine - ADN biotinylé aux extrémités.

Toutes les réactions avec la streptavidine décrites ci-dessous sont faites à température ambiante, avec un temps de réaction de 15 minutes, et les purifications sont faites par chromatographie sur tamis moléculaire (colonne superose 6) avec une élution en tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM. Plusieurs types de complexes ont été préparés, décrits ci-dessous.

3.1. Obturation des extrémités.

Les complexes de l'ADN de 1440 paires de base ou de l'ADN de 439 paires de bases avec la streptavidine à chaque extrémité (**figure II-3**) sont préparés par réaction entre l'ADN biotinylé et un excès de streptavidine d'au moins 10 fois (en nombre de molécules). Le mélange réactionnel est ensuite purifié.



Figure II-3 : *ADN double brin linéaire avec une streptavidine complexée à chaque extrémité 5'.*

3.2. Circularisation.

L'ADN de 1440 paires de bases biotinylé aux deux extrémités réagit avec une quantité en streptavidine légèrement supérieure en nombre de molécules (facteur ~2). Le mélange réactionnel est ensuite purifié. L'estimation par comptage d'environ 150 molécules en MET indique que plus de 80% des complexes obtenus sont des molécules d'ADN circularisées par la streptavidine (**figure II-4**).

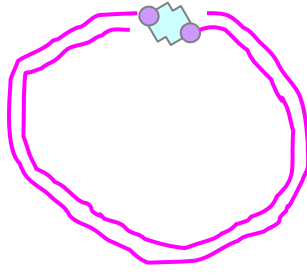


Figure II-4 : *ADN circularisé par la streptavidine. Les deux extrémités 5' biotinylées d'un fragment d'ADN sont reliées par la streptavidine.*

3.3. Préparation de trimères.



Figure II-5 : *Schéma d'un complexe à trois molécules avec l'ADN de 439 paires de bases.*

Le complexe est schématisé en **figure II-5**. L'ADN central peut (a) ou pas (b) avoir réagi avec Ku préalablement à la réaction avec la streptavidine et au couplage avec les ADN latéraux.

a) D'une part l'ADN biotinylé aux deux extrémités (destiné à être central dans le trimère) réagit avec une concentration de Ku suffisante pour qu'une majorité des molécules soit totalement recouverte ; le mélange est ensuite purifié pour donner une solution S1. D'autre part le même ADN mais biotinylé à une seule extrémité réagit avec un excès de streptavidine ; après purification la solution S2 obtenue est ajoutée à la solution S1 pour former un trimère dont la partie centrale est recouverte par Ku.

b) L'ADN central, biotinylé aux deux extrémités, réagit avec un excès de streptavidine pendant 15 minutes à température ambiante. Après purification par chromatographie sur tamis moléculaire il est mis à réagir avec le même ADN mais biotinylé d'un seul côté, pour former le trimère.

4. ADN avec cassures simple brin.

4.1. ADN circulaire avec cassures simple brin.

Les cassures simple brin ont été générées sur le plasmide pBR322 (New England Biolabs) par l'enzyme N.BstNB I (New England Biolabs). La réaction est effectuée à 55°C. L'ADN est ensuite purifié sur tamis moléculaire (colonne superose 6) dans un tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM. La MET permet de vérifier que les plasmides sont relâchés et ont donc subi au moins une coupure simple brin. Le clivage aux quatre sites spécifiques reconnus par N.BstNB I est contrôlé par migration sur gel d'agarose 1% en présence de NaOH 200 mM, qui dénature l'ADN double brin (**figure II-6**).

4.2. ADN linéaire avec cassures simple brin.

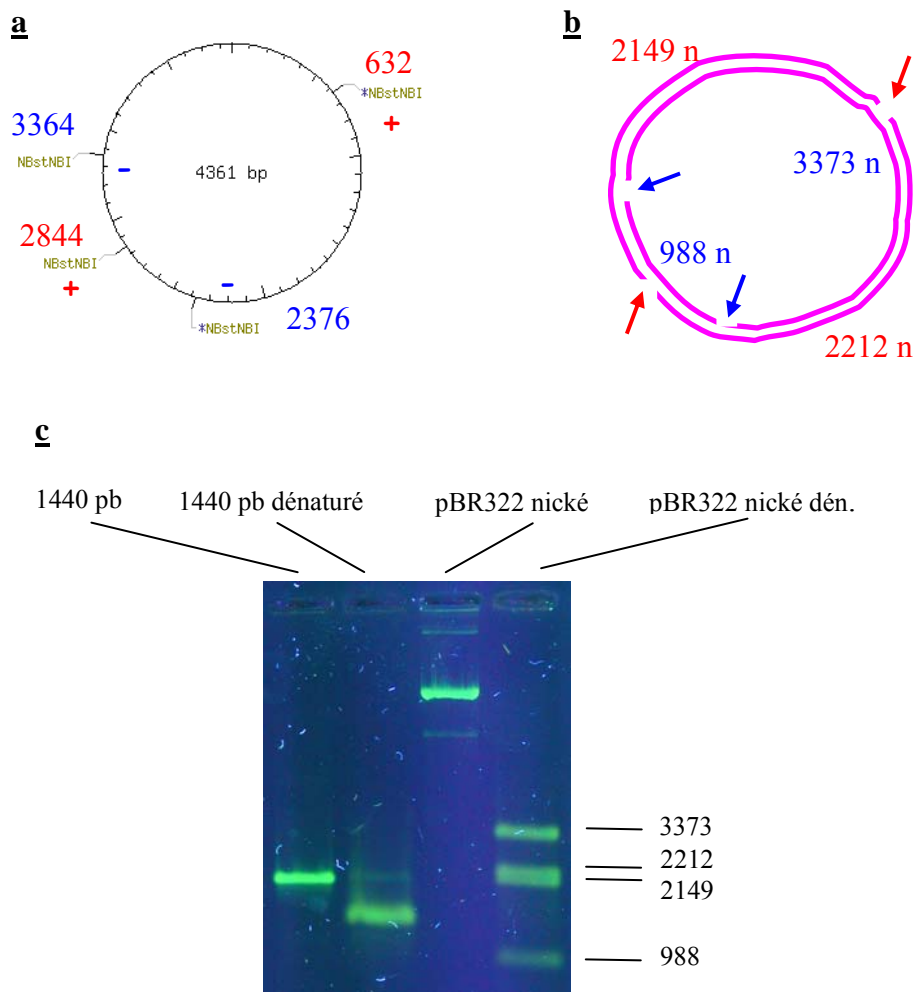
Deux types de fragments d'ADN avec un nombre contrôlé de cassures simple brin ont été préparés : un ADN de 1440 pb et un ADN de 4361 pb.

L'ADN de 1440 paires de bases correspond à une partie de la séquence du plasmide pBR322 incluant deux des sites de reconnaissance de la N.BstNB I. La réaction avec

l'enzyme et la suite de la préparation sont analogues à celles décrites ci-dessus en 4.1. L'ADN ainsi préparé comporte donc deux cassures simple brin (**figure II-7**).

L'ADN de 4361 pb correspond au plasmide pBR322 nické préparé comme décrit en 4.1. puis linéarisé par l'enzyme de restriction DrdI au niveau de la position 2575. L'ADN ainsi préparé comporte donc 4 cassures simple brin.

Figure II-6 : *Génération de cassures simple brin sur le plasmide pBR322 à l'aide de l'enzyme N.BstNB I. a, positions des quatre sites d'incision simple brin de N.BstNB I sur pBR322 ; b, distances entre les sites de cassure simple brin sur le brin + (rouge) et sur le brin - (bleu) de pBR322 ; c, contrôle de l'efficacité de coupure par migration sur gel d'agarose 1%.*



5. Microscopie électronique à transmission.

Le protocole de préparation des grilles pour l'observation en MET est le même que celui décrit au **chapitre 3** pages 76-77. L'observation est faite sur un MET Leo Zeiss 902 ou Leo Zeiss 912 ; l'appareil utilisé pour les différentes photographies est précisé dans la légende de chacune des images de la partie **II-C**.

6. Microscopie à force atomique.

Les images ont été obtenues en mode Tapping sur un AFM Multimode de Veeco Instruments associé au contrôleur Nanoscope IIIa. En AFM à l'air nous avons utilisé les microleviers OTESPA commercialisés par Veeco ou les microleviers AC160TS commercialisés par Olympus. En AFM en milieu liquide nous avons utilisé les microleviers contact DNP commercialisés par Veeco Instruments. Une correction de planéité (*flatten*) est effectuée sur toutes les images brutes d'AFM à l'air ou en milieu liquide avec le logiciel du Nanoscope.

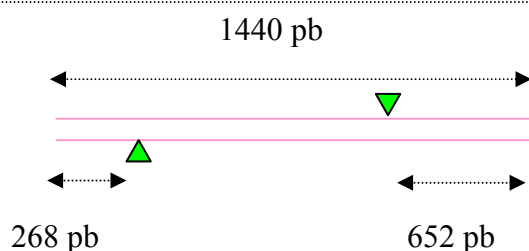


Figure II-7 : *Génération de deux cassures simple brin par N.BstNB I sur un ADN linéaire de 1440 paires de bases. Les distances en paires de bases entre les sites d'incision simple brin et les extrémités sont indiquées.*

C. Résultats et discussion.

1. Etude par AFM.

1.1. Observation des complexes ADN-Ku par AFM à l'air.

Les résultats préliminaires sur les interactions ADN-Ku ont ciblé la reconnaissance des cassures double brin. Les expériences ont été faites avec des fragments linéaires de 1440 paires de bases préparés comme décrit en II-B. L'ADN est utilisé à une concentration finale de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ soit environ 0,5 nM en fragments. Les stoechiométries testées sont respectivement 20, 40, 80 et 160 (rapports molaires $r = [\text{Ku}]/[\text{ADN}]$), à température ambiante, à différents temps de réaction (2, 5, 10 et 15 minutes).

Différents degrés de couverture de l'ADN par Ku sont observés en fonction de la stoechiométrie et du temps de réaction (figures II-8 et II-9). La liaison de Ku à l'ADN est nécessaire pour la juxtaposition des protéines, puisque nous n'observons pas d'oligomérisation de la protéine Ku seule. A $r = 20$ les molécules d'ADN ne sont pas complètement recouvertes par Ku tandis qu'à $r = 40$ et $r = 80$ certaines molécules d'ADN sont totalement recouvertes. A $r = 160$ toutes les molécules d'ADN sont complètement recouvertes par Ku. Dans la gamme de temps de réaction testée, il n'est pas mis en évidence de liaison préférentielle de Ku aux extrémités des molécules d'ADN ni de jonction intra- ou intermoléculaire des extrémités. Le phénomène de couverture de l'ADN est rapide à température ambiante puisqu'à concentration en protéine suffisamment élevée, comme $[\text{Ku}]/[\text{ADN}] = 160$, toutes les molécules de l'ADN de 1440 pb utilisé sont complètement recouvertes dès deux minutes de réaction (figure II-10).

Aux rapports molaires intermédiaires $r = 40$ et 80 il y a coexistence de molécules d'ADN entièrement recouvertes par Ku et de molécules sans Ku (figure II-11). Cela indique que la présence d'une protéine déjà liée à l'ADN stabilise la liaison de la protéine suivante sur la même molécule d'ADN (il y aurait sinon une répartition beaucoup plus homogène de Ku

entre l'ensemble des molécules d'ADN). Ainsi le phénomène de couverture de l'ADN par Ku observé apparaît comme coopératif.

Nous avons voulu vérifier si les extrémités des fragments d'ADN double brin jouent un rôle dans ce processus. Pour cela nous avons examiné l'interaction de Ku avec un ADN double brin circulaire relâché. Aucune oligomérisation n'est observée sur cet ADN circulaire, alors que dans la même expérience Ku recouvre l'ADN linéaire double brin présent dans le mélange (**figure II-12**). Le processus de couverture de l'ADN double brin est donc dépendant de la présence d'extrémités libres.

Pour mieux caractériser la reconnaissance des extrémités et le phénomène de couverture de l'ADN double brin par Ku, nous avons voulu observer et étudier les complexes ADN-Ku en milieu liquide.

Figure II-8 : *Différents degrés de couverture de l'ADN double brin linéaire par Ku en fonction du rapport molaire $[Ku]/[ADN]$.*

$[ADN] = 0,5 \text{ nM}$

Tampon de réaction et de dépôt : Hepes 20 mM pH 7,5 $MgCl_2$ 10 mM KCl 50 mM

Temps de réaction : $t = 5 \text{ minutes}$.

Mica non prétraité ; AFM à l'air ; scans : $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$; échelle en Z : 5 nm.

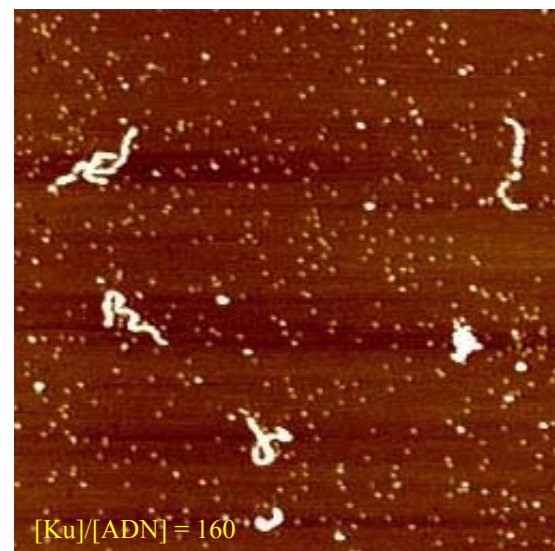
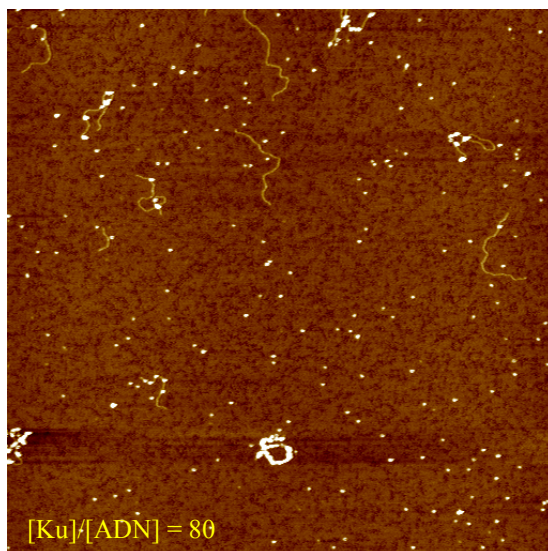
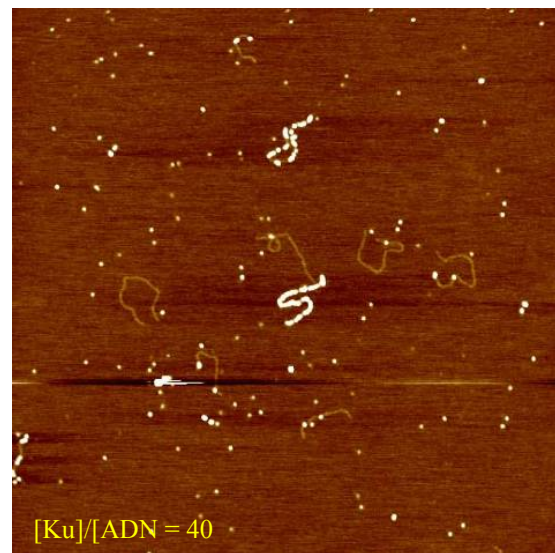
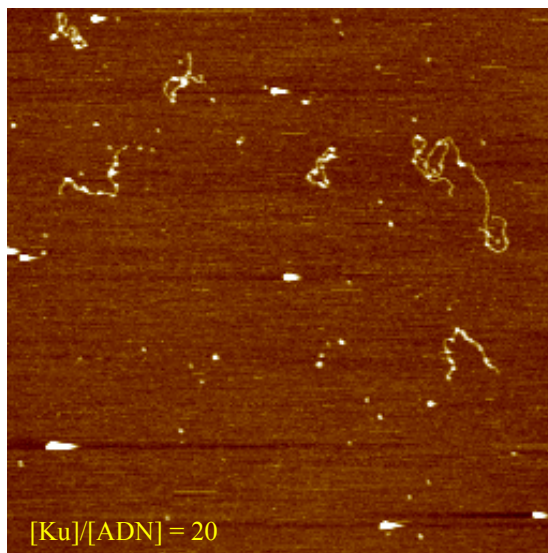


Figure II-9 : *Couverture de l'ADN double brin linéaire par Ku à différents temps de réaction en fonction du rapport molaire [Ku]/[ADN].*

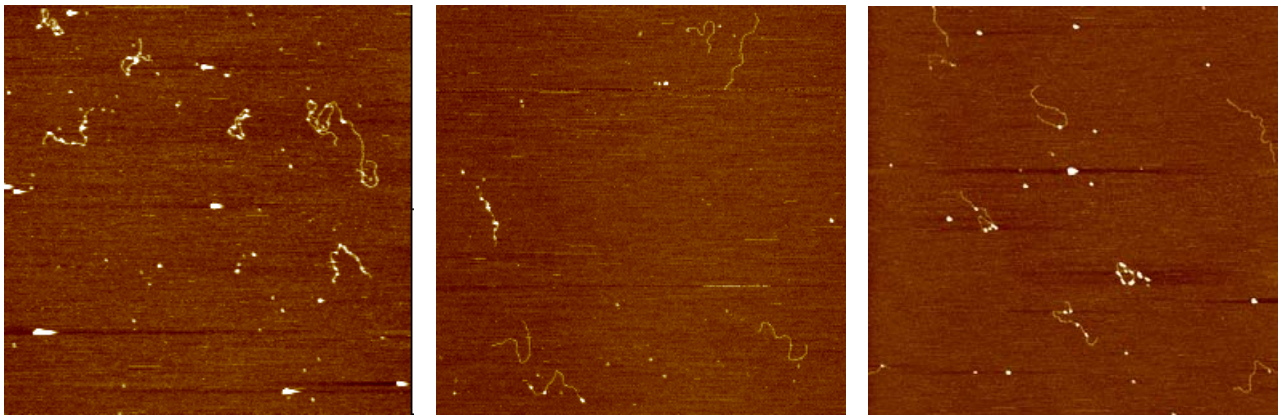
$[ADN] = 0,5 \text{ nM}$

Tampon de réaction et de dépôt : Hepes 20 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM KCl 50 mM

Temps de réaction : $t = 5$ minutes (gauche), 10 minutes (milieu), 15 minutes (droite)

Mica non prétraité ; AFM à l'air ; scans : $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$; échelle verticale : 5 nm.

[Ku]/[ADN] = 20



[Ku]/[ADN] = 80



[Ku]/[ADN] = 160



Figure II-10 : *L'oligomérisation de Ku le long de l'ADN est un phénomène rapide. La totalité des molécules d'ADN de 1440 paires de bases peut être recouverte par Ku dès 1 à 2 minutes de réaction.*

$[ADN] = 0,5 \text{ nM}$

Gauche : $[Ku]/[ADN] = 20$; droite : $[Ku]/[ADN] = 160$

Temps de réaction : $t = 2 \text{ minutes}$

Tampon de réaction et de dépôt : Hepes 20 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM KCl 50 mM

Mica non prétraité ; AFM à l'air ; scans : $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$; échelle verticale : 5 nm.

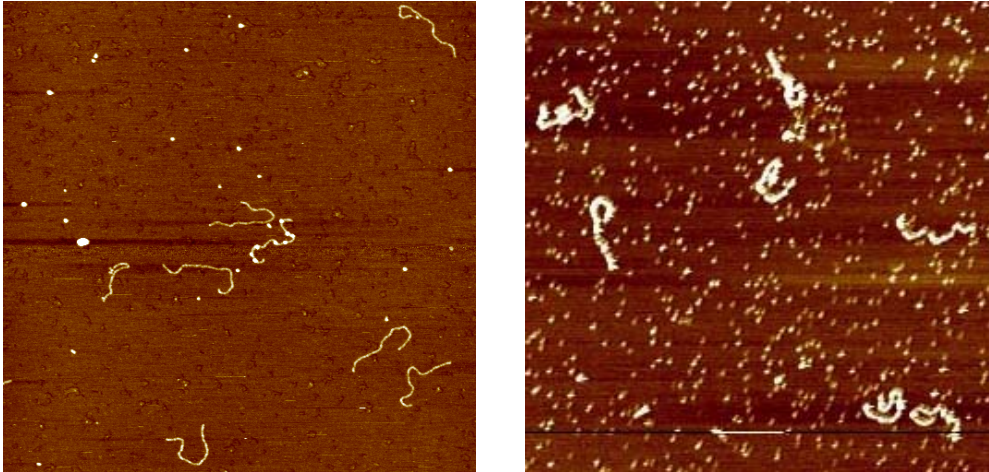


Figure II-11 : *L'oligomérisation de Ku le long de l'ADN est coopérative. Des molécules d'ADN complètement recouvertes de Ku et des molécules sans Ku coexistent. Les protéines déjà liées à l'ADN facilitent la liaison des protéines suivantes. L'interaction Ku-Ku le long de l'ADN à l'origine de cette coopérativité reste à identifier. En absence de coopérativité, Ku se répartirait beaucoup plus équitablement entre toutes les molécules présentes.*

$[ADN] = 0,5 \text{ nM}$

Gauche : $[Ku]/[ADN] = 40$; $[Ku]/[ADN] = 80$

Hepes 20 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM KCl 50 mM

Mica non prétraité ; AFM à l'air ; scans : $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$; échelle en Z : 5 nm.

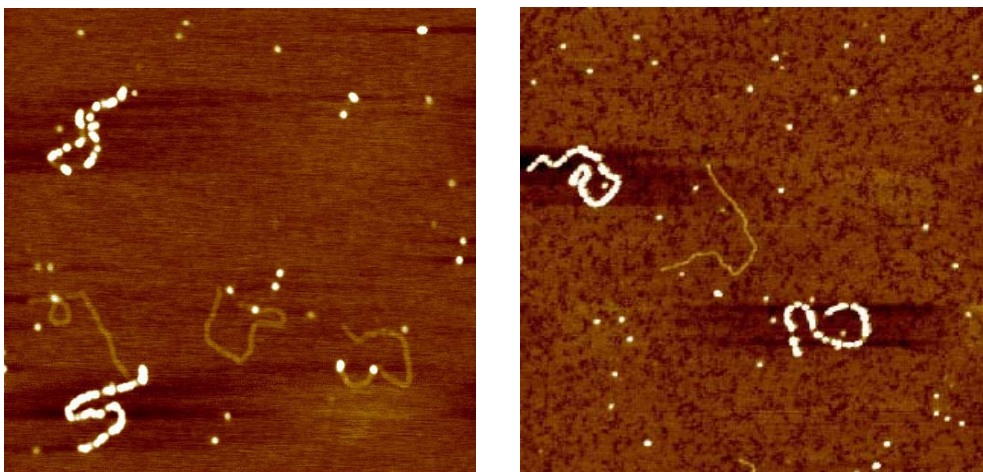
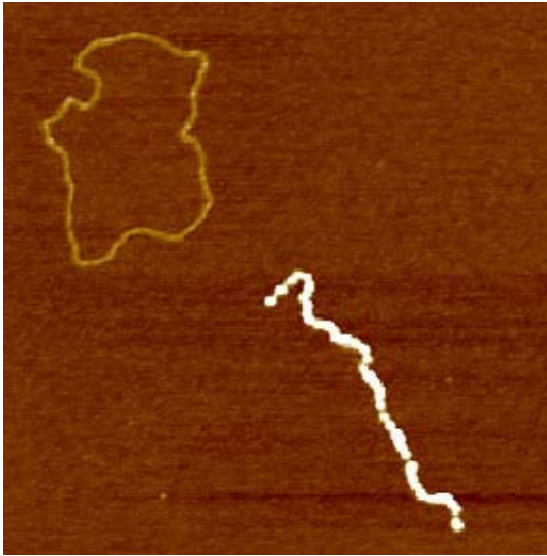


Figure II-12 : Aucune oligomérisation n'a lieu sur l'ADN double brin circulaire relâché, alors que dans les mêmes conditions elle a lieu sur l'ADN double brin linéaire.

L'ADN double brin circulaire est du pBR322 relâché. Les molécules linéaires d'ADN double brin comme celle présente sur l'image sont des fragments de pBR322. Le dépôt sur le mica a été effectué après purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6) pour éliminer la quantité de Ku qui ne s'est pas fixée à l'ADN ; ainsi il n'y a pas de protéines isolées sur la surface du mica.



$[ADN] \sim 0,5 \text{ nM}$ en molécules

$[Ku]/[ADN] = 5$

Tampon de réaction : Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM.

Réaction 15 minutes à température ambiante suivie d'une purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6).

Mica non prétraité

Tampon de dépôt : Tris 10 mM pH 7,5 $MgCl_2$ 10mM NaCl 50 mM

AFM à l'air

Scan : $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$

Echelle en Z : 5 nm

1.2. Observation par AFM en milieu liquide.

Nous avons commencé par travailler sur mica prétraité par des ions nickel pour nous placer dans le référentiel de modulation réversible de la force d'adsorption établi au **chapitre 3**.

La première idée est d'injecter successivement l'ADN puis Ku dans la cellule liquide AFM. Les molécules d'ADN et les protéines viennent s'adsorber sur la surface au cours du temps (**figure II-13a**), mais aux concentrations utilisées, l'adsorption de Ku se fait le plus souvent sans rencontre avec les molécules d'ADN déjà adsorbées et la formation de complexes n'est pas observée en direct sur la surface. Les complexes observés sur la surface se sont vraisemblablement formés dans le volume de la cellule liquide avant de s'adsorber (**figure II-13b**).

Nous avons aussi testé la préincubation de Ku avec l'ADN, pour injecter dans la cellule liquide AFM des complexes déjà formés (**figure II-14**). Une fois adsorbées les protéines Ku restent immobiles sur la surface, tandis que les molécules d'ADN non liées à Ku restent mobiles. Aucune évolution particulière des complexes ADN-Ku sur la surface n'est mise en évidence : ni poursuite de l'oligomérisation, ni, inversement, désassemblage. Occasionnellement, des molécules d'ADN semblent ancrées à la surface par leur extrémité (**figure II-15**), probablement par la protéine Ku puisqu'un tel ancrage de l'ADN à la surface n'est pas observé en l'absence de Ku.

Ces observations par AFM en milieu liquide nous ont conduit à l'hypothèse d'une forte interaction entre la surface de mica prétraité nickel et la protéine Ku. Nous avons voulu vérifier sur mica prétraité nickel mais aussi sur mica non prétraité si l'adsorption de Ku sur la surface est forte même à force ionique élevée en sel monovalent. Sur mica non prétraité, Ku même injectée à une faible concentration sur la surface et à concentration élevée en sel

monovalent (Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM) s'y adsorbe bien (**figure II-16a**). Sur mica prétraité nickel, l'adsorption de Ku résiste à une augmentation de la concentration en sel monovalent : en passant d'un tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM à un tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM Ku reste fortement adsorbée sur la surface (**figure II-16b**). Ku est une protéine fortement chargée, exposant sa charge globalement négative (~-25 à pH 7,5 cf. **figure II-17**) essentiellement sur sa surface moléculaire externe (**voir figure I-3**), ce qui pourrait expliquer cette forte interaction avec la surface de mica, en présence des cations de la solution.

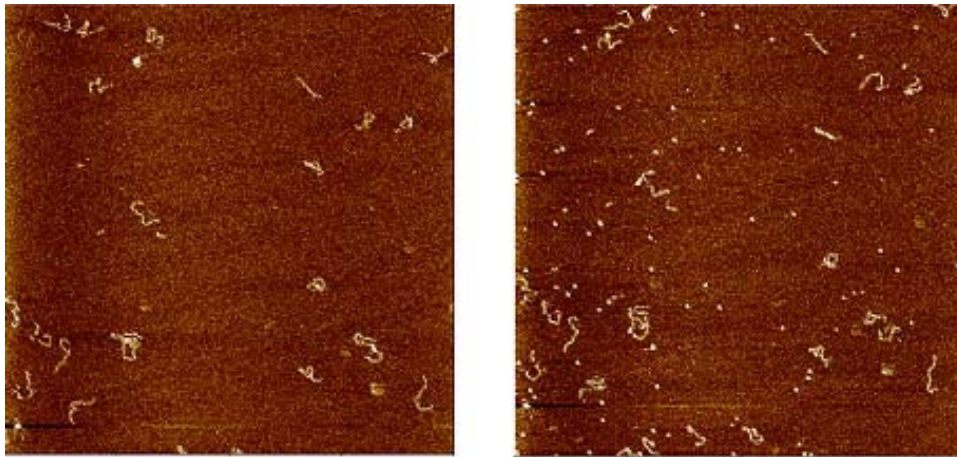
Figure II-13 : *Essai d'observation de la formation de complexes ADN-Ku en injectant successivement l'ADN et Ku dans la cellule liquide AFM.*

AFM en liquide ; scan : 4 μm x 4 μm ; échelle en Z : 3 nm.

Mica prétraité nickel ; tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM.

Injection [1440] ~ 0,5 nM puis injection [Ku] ~ 20 nM.

a) Injections successives de l'ADN et de Ku dans la cellule liquide et adsorption sur la surface.



b) Observation de complexes ADN-Ku qui se sont vraisemblablement formés dans le volume de la cellule liquide avant de s'adsorber.

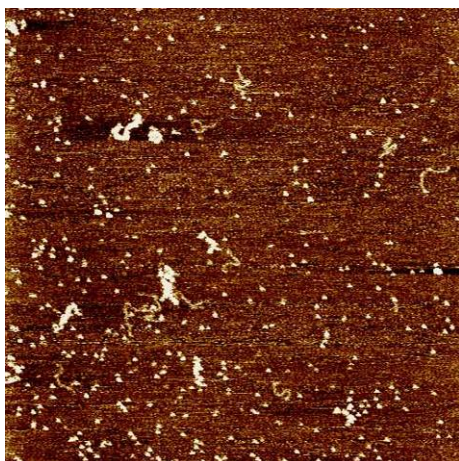


Figure II-14 : *Essai d'observation de complexes ADN-Ku préincubés avant l'injection dans la cellule liquide.*

*AFM en liquide ; scan : 4 μm x 4 μm (gauche), 3 μm x 3 μm (droite) ; échelle en Z : 3 nm.
Mica prétraité nickel ; tampon Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM.
Injection mélange ADN-Ku préincubé 10 minutes avec $[\text{Ku}]/[\text{ADN}] = 40$ et $[\text{Ku}] = 4 \text{ nM}$.*

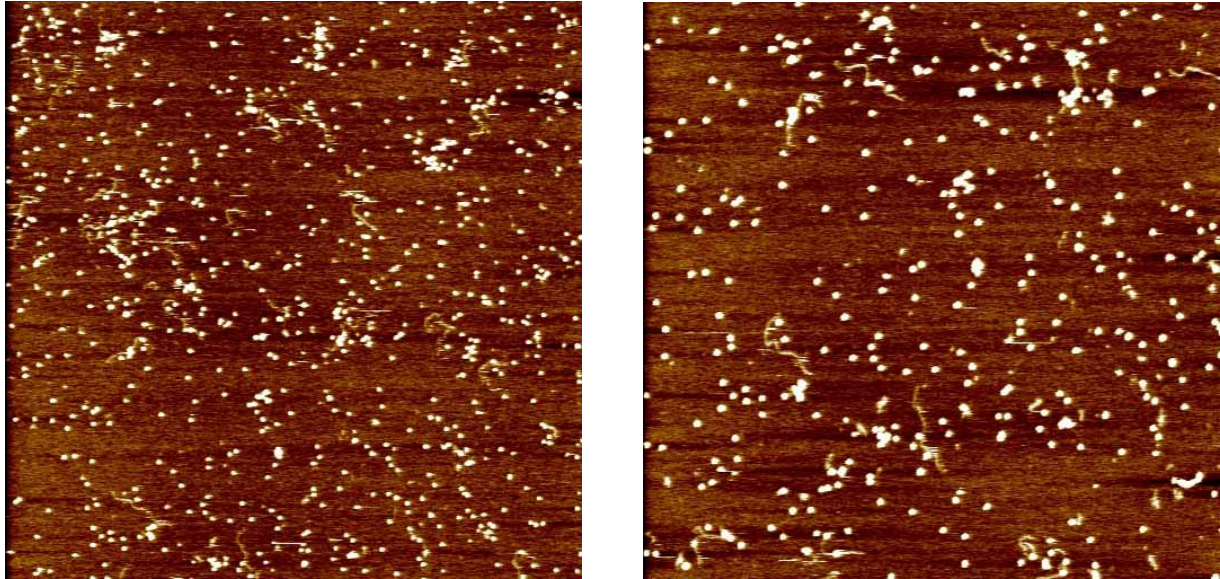


Figure II-15 : *Ku* est capable d'ancrer des molécules d'ADN à la surface de mica par leur extrémité.

ADN double brin de 1440 paires de bases ; mica prétraité nickel ; tampon Tris 10 mM pH 7,5
MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM.

AFM en milieu liquide ; fréquence de balayage 20,35 Hz ; 128 pixels/ligne ; ~ une image
toutes les 6,3 secondes ; scan : 1 μm x 1 μm ; échelle en Z : 5 nm

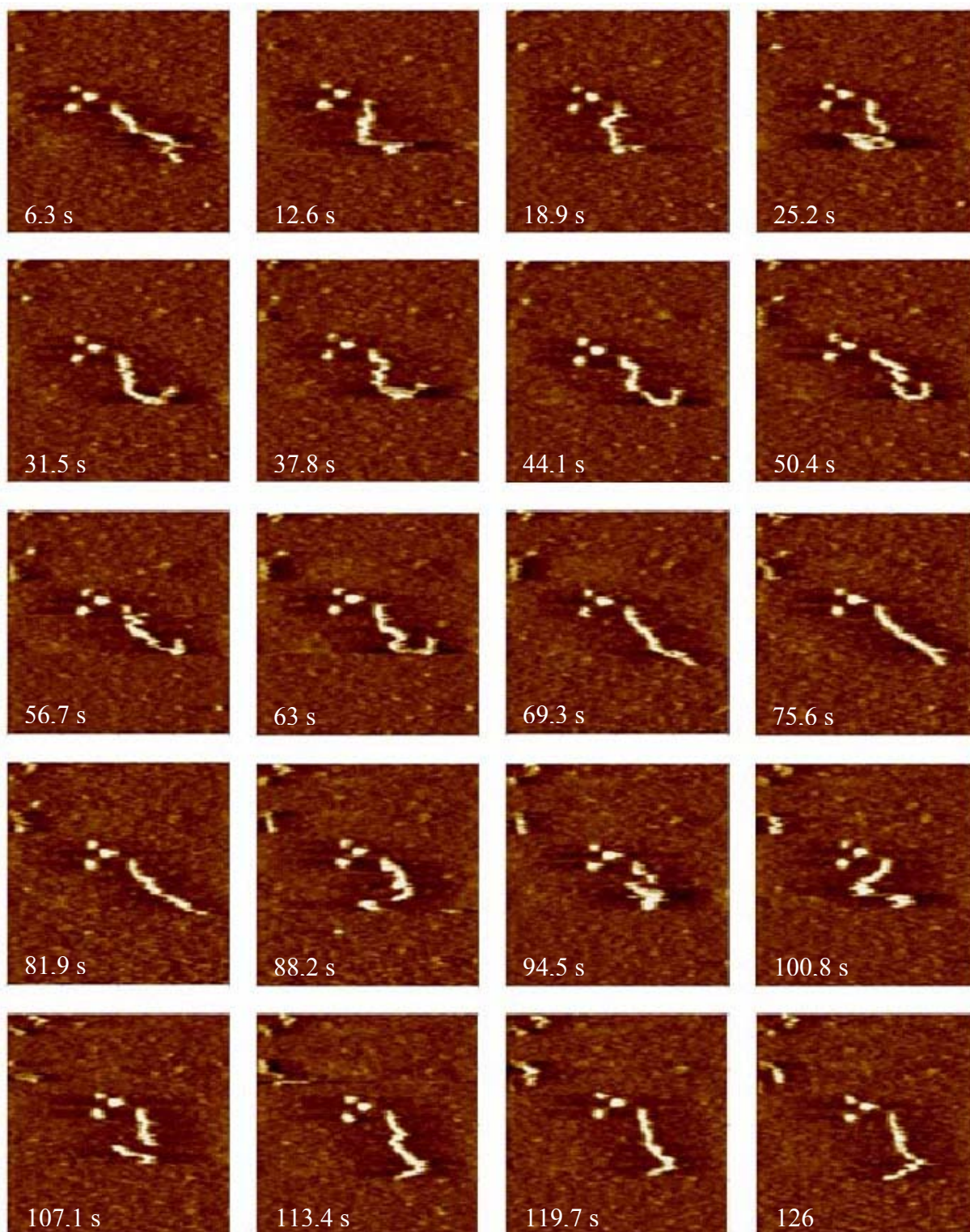


Figure II-16 : Test de l'adsorption de Ku sur mica non prétraité et sur mica prétraité nickel à concentration élevée en sel monovalent.

a) Sur mica non prétraité, Ku s'adsorbe efficacement même à concentration élevée en sel monovalent (NaCl 200 mM Tris 10 mM pH 7,5).

AFM en milieu liquide

40 μ L de protéine avec [Ku] = 4 nM ont été injectés dans la cellule liquide.

Scan : 4 μ m x 4 μ m

Echelle en Z : 3 nm



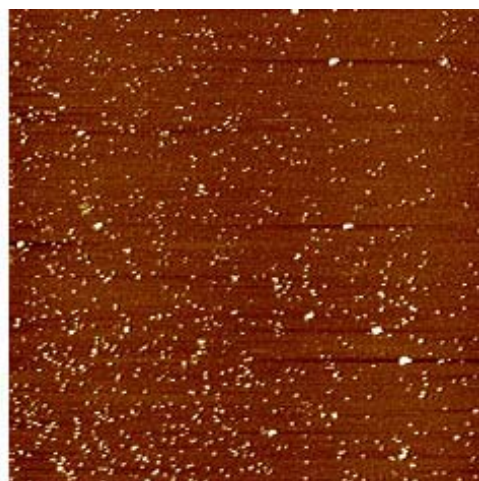
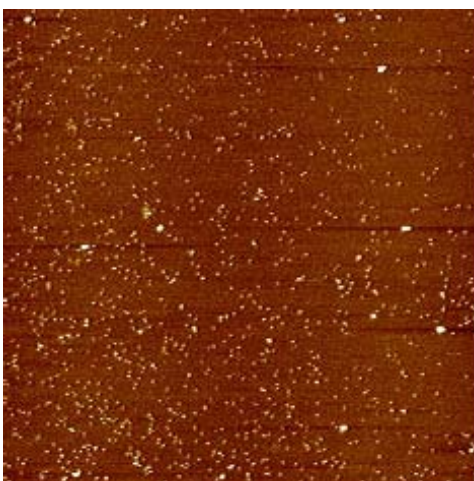
b) Sur mica prétraité nickel, Ku reste bien adsorbée sur la surface lors du passage Tris 10 mM pH 7,5 MgCl₂ 10 mM NaCl 10 mM (image de gauche) → Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 200 mM (image de droite).

AFM en milieu liquide

10 μ L de protéine avec [Ku] = 10 nM ont été injectés dans la cellule liquide.

Scan : 4 μ m x 4 μ m

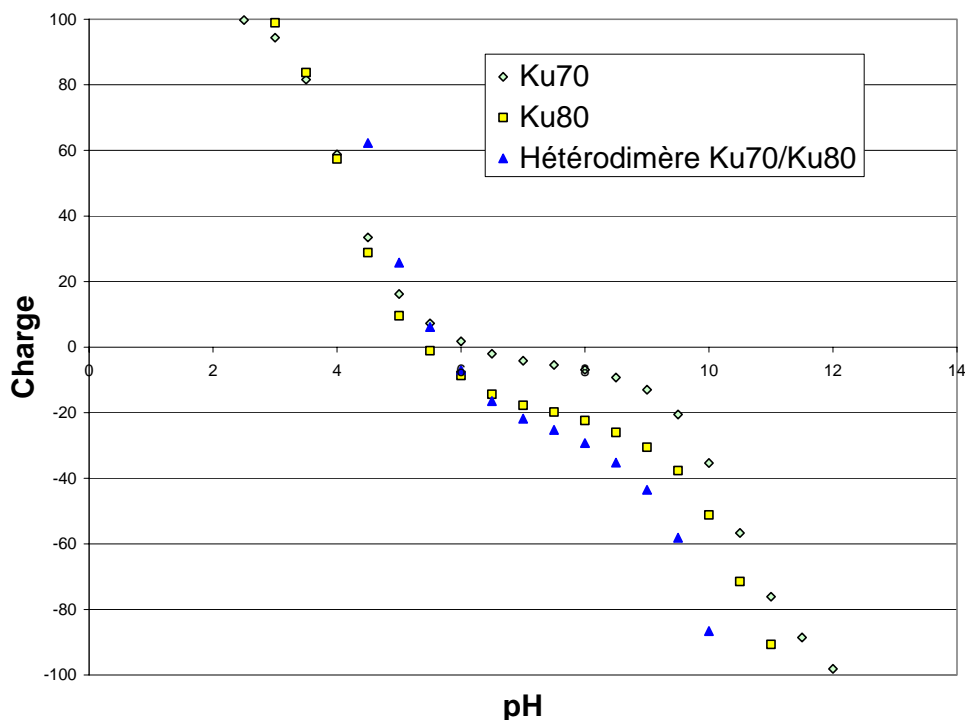
Echelle en Z : 5 nm



~ 98% des protéines Ku sont restées sur la surface, il n'y a pas eu de désorption significative.

La forte adsorption de Ku sur le mica indépendamment des conditions ioniques et sa non-désorption même à concentration élevée en sel monovalent rend difficile toute étude de la dynamique des interactions ADN-Ku sur cette surface. Ce problème pourra peut-être à l'avenir être contourné en utilisant d'autres surfaces, comme par exemple les bicouches lipidiques supportées, dont il est possible d'ajuster la composition et la charge en fonction des lipides employés. Mais ces surfaces sont encore très peu étudiées en tant que substrat d'adsorption de l'ADN, et il existe aussi des interactions des protéines avec la bicouche lipidique. Nous nous sommes donc plutôt tournés vers la MET pour poursuivre le travail et nous avons engagé une étude systématique des interactions ADN-Ku, en fonction de la nature du substrat ADN, dans la continuité du travail initié en AFM.

Figure II-17 : *Charge globale de Ku70, Ku80 et de l'hétérodimère Ku70/80 en fonction du pH. La charge globale est calculée à partir de la séquence en acides aminés de chaque protéine, en utilisant le « Gateway to isoelectric point service » de l'EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>).*



2. Etude en MET.

La MET est une méthodologie de référence au laboratoire pour étudier l'ADN et les complexes nucléoprotéiques en termes de structure, de conformation, et de propriétés d'interactions. Les techniques utilisées permettent de décrire précisément les propriétés de courbure et de flexibilité de l'ADN. Elles sont aussi validées pour caractériser les mécanismes de reconnaissance des protéines sur des sites cibles d'ADN ainsi que les mécanismes d'ancrage ; en d'autres termes elles permettent de caractériser les interactions spécifiques mais aussi les interactions non spécifiques. Les nombreux modèles étudiés au laboratoire ont montré la complémentarité de la microscopie avec les techniques plus usuelles de la biochimie utilisées pour la caractérisation des complexes ADN-protéines (101-103).

Les interactions entre l'ADN et la surface carbonée sont mieux contrôlées sur un film de carbone utilisé en MET que sur un mica utilisé en AFM. Les étalements sont plus

homogènes, ce qui permet de travailler sur des champs importants et de réaliser une étude statistique à partir d'un grand nombre de molécules.

2.1. Oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin.

Nous avons d'abord étudié l'interaction de Ku sur des fragments d'ADN double brin linéaire de 1440 pb à différentes stoechiométries. Comme cela est indiqué dans le Matériels et Méthodes l'ADN est incubé en présence de Ku dans le tampon d'incubation (Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM). Le complexe est étalé sur une grille de microscopie au bout de 15 minutes, sans fixation de type glutaraldéhyde.

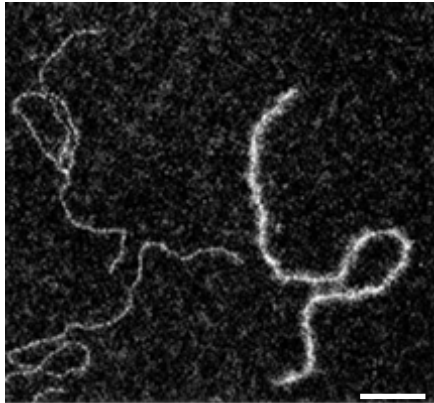


Figure II-18 : Coopérativité de l'oligomérisation de Ku le long de l'ADN.

Comme en AFM, la coexistence de molécules entièrement couvertes de Ku et de molécules d'ADN entièrement libres est mise en évidence.

ADN de 1440 paires de bases ; $[Ku]/[ADN] = 50$

*Photographie obtenue sur le MET LEO Zeiss 902.
Barre d'échelle : 50 nm.*

Nos observations en MET comme en AFM ont rapidement mis en évidence et de manière spectaculaire l'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin. Ainsi pour un rapport stoechiométrique 1 nM en fragments d'ADN de 1440 pb / 50 nM en protéines, on retrouve des fragments partiellement ou totalement recouverts, à côté de fragments libres. Cette oligomérisation le long de l'ADN apparaît être une polymérisation de nature coopérative (**figure II-18**). Aucune circularisation de ces fragments linéaires n'est observée.

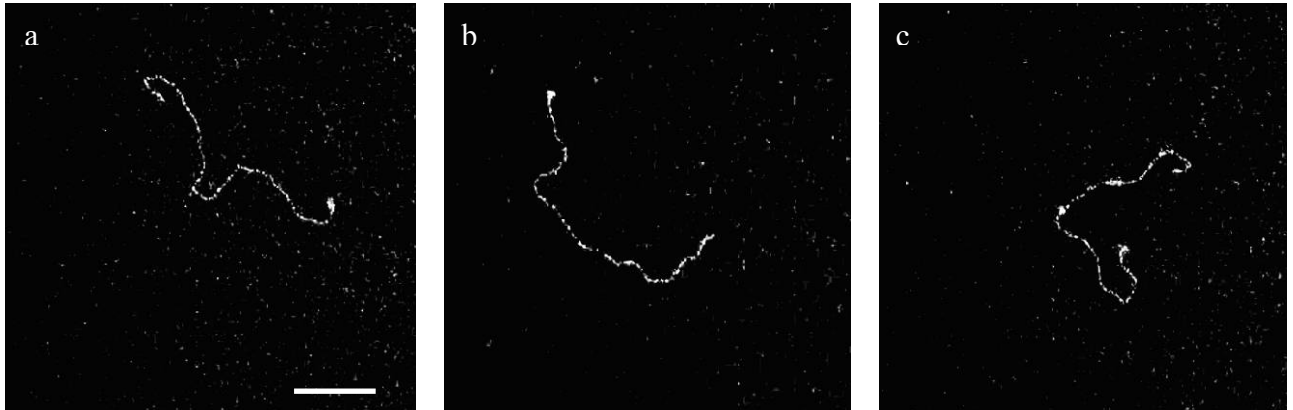
2.2. Liaison de Ku aux extrémités.

Pour caractériser les étapes d'initiation et de polymérisation nous avons réalisé des incubations à des temps courts de manière à caractériser les complexes au niveau des extrémités. Nous avons observé les complexes à un rapport molaire $[Ku]/[ADN] = 20$ à des temps inférieurs à la minute. Ku est souvent localisée aux extrémités à ces temps très courts (**figure II-19**) mais de nombreuses protéines sont déjà engagées sur l'ADN. Ces conditions permettent difficilement de caractériser le mécanisme d'oligomérisation de Ku.

Pour mieux piéger les états intermédiaires, nous avons travaillé à 4°C afin de ralentir la cinétique, et utilisé la glutaraldéhyde comme agent pontant. Nous observons à nouveau des complexes aux extrémités mais comme dans le cas précédent certaines protéines sont déjà engagées au milieu de l'ADN (**figure II-20**). La polymérisation s'engage bien sur les extrémités mais il apparaît clairement que dans ces conditions les protéines Ku sont capables de se dissocier de l'oligomère pour progresser le long de l'ADN.

Figure II-19 : *Observation des complexes ADN-Ku à des temps très courts (<1 minute).* Ku est souvent localisée aux extrémités (a,b) mais de nombreuses protéines sont aussi déjà engagées sur l'ADN (c).

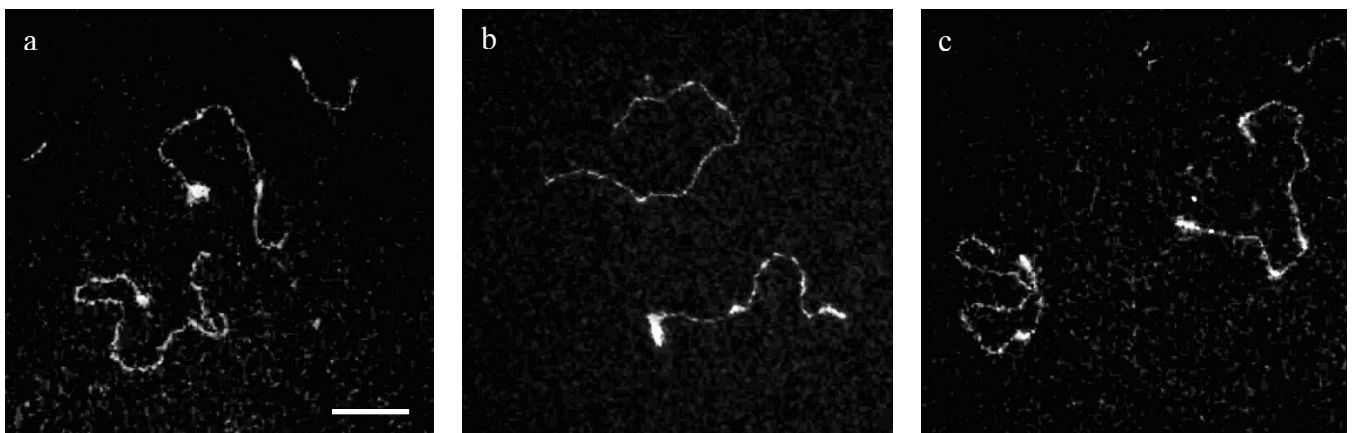
ADN double brin linéaire de 1440 paires de bases
[Ku]/[ADN] = 20
Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM
Réaction à température ambiante ; t~30 secondes



Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 902.
Barre d'échelle : 100 nm.

Figure II-20 : *Essai de piégeage des étapes précoces de l'oligomérisation.* La réaction est faite à 4°C pour ralentir l'oligomérisation ; la glutaraldéhyde, agent de fixation non spécifique, est utilisée pour piéger les complexes ADN-Ku. Comme en figure II-20, Ku est souvent localisée aux extrémités (a), mais de nombreuses protéines sont déjà engagées sur l'ADN (b,c).

ADN double brin linéaire de 1440 paires de bases
[Ku]/[ADN] = 20
Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM
Glutaraldéhyde 0,2%
Réaction à 4°C ; les images présentées correspondent au temps t = 3 minutes.
Purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6).



Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 902.
Barre d'échelle : 100 nm.

2.3. Etude de la formation des complexes en fonction de la concentration et de la température.

Afin de mieux paramétrer le mécanisme d'initiation de l'oligomérisation à partir des extrémités double brin et de polymérisation nous avons fait varier les conditions de température et de stoechiométrie. Sont considérées dans ce test trois températures (4°C, 20°C et 37°C), trois concentrations en protéines ($[Ku] = 25, 50$ et 100 nM) et deux tailles de fragments (1440 pb et 439 pb) (**figure II-21**).

Les histogrammes ont été construits en mesurant la longueur d'ADN couverte par Ku dans les différentes conditions. Pour chaque molécule, les longueurs d'ADN couvertes par Ku sont mesurées, additionnées, et exprimées en pourcentage de la longueur totale de la molécule d'ADN.

a. ADN linéaire de 1440 pb.

L'histogramme de la **figure II-21a** montre que le facteur concentration est un facteur prépondérant, ce qui confirme les observations préalables sur ce fragment de 1440 paires de bases. A 25 nM les fragments sont peu ou pas recouverts, tandis qu'à 100 nM de nombreuses molécules complexées à Ku présentent une couverture plus continue ou sont même totalement recouvertes.

Si on considère l'effet température, à 25 nM il y a décroissance du taux de couverture de l'ADN de 1440 paires de bases quand la température augmente, alors qu'on considère que la cinétique de formation du complexe est favorisée à 37°C ou à 20°C par rapport à 4°C. A 50 nM on observe une augmentation du taux de couverture à 20°C et c'est aussi à cette température que la continuité de la couverture des molécules d'ADN est la plus importante. A 100 nM les taux de couverture moyens des fragments et la continuité de la couverture sont comparables aux différentes températures.

b. ADN linéaire de 439 pb.

A 100 nM on ne voit pas d'effet net de la température sur l'histogramme de la **figure II-21b** ; l'effet de la concentration élevée semble prépondérant. A 50 nM on arrive à voir un effet de la température ; les molécules d'ADN sont bien plus couvertes à 4°C qu'à 20°C ou 37°C. A 25 nM il y a décroissance de la couverture de l'ADN quand la température augmente.

c. Comparaison entre l'ADN de 1440 pb et l'ADN de 439 pb.

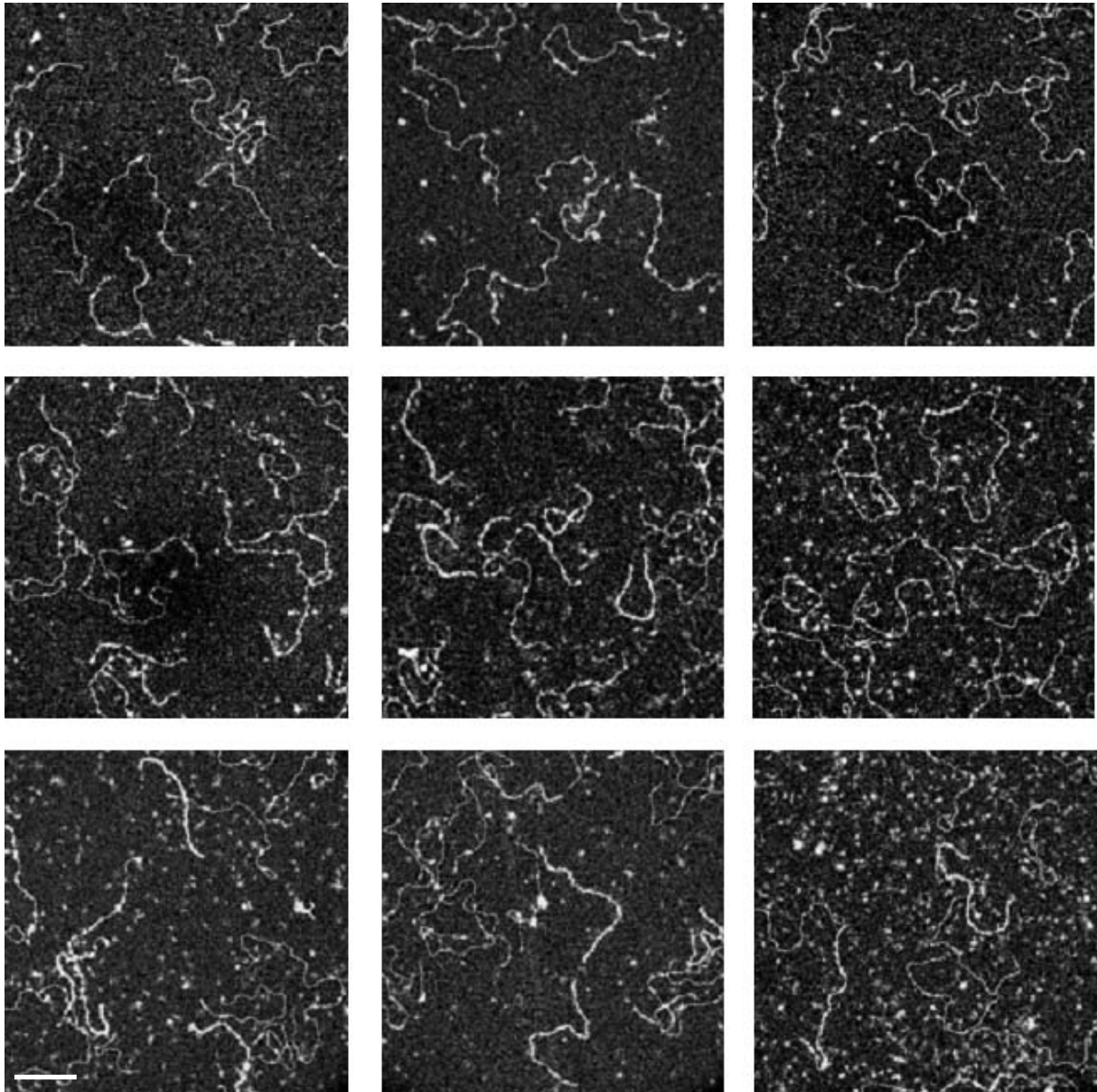
A la concentration 100 nM, la coopérativité est mieux discernable sur l'ADN de 1440 paires de bases. Dans les conditions de stoechiométrie utilisées (~ 1 $\mu\text{g/mL}$ en nucléotides de 1440 et de 439 paires de bases pour 25, 50 et 100 nM en protéines) il y a environ trois fois plus de molécules d'ADN dans le mélange contenant le 439 pb, donc environ trois fois plus d'extrémités d'ADN disponibles pour interagir avec Ku. C'est à 50 nM que l'étude en fonction des autres conditions (température, force ionique...) semble la plus favorable. A 25 nM la couverture de l'ADN est trop faible et à 100 nM l'effet de la concentration élevée est prépondérant.

Figure II-21 : *Etude de l'évolution du taux de couverture de l'ADN double brin linéaire en fonction de la concentration en Ku et de la température pour deux ADNs (1440 pb et 439 pb).*

a) ADN de 1440 pb

Le tableau ci-dessous donne les conditions de concentration en Ku et de température correspondant à chacune des photographies présentées ensuite. Le tampon de réaction est le Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM EDTA 1 mM et le temps de réaction est de 5 minutes.

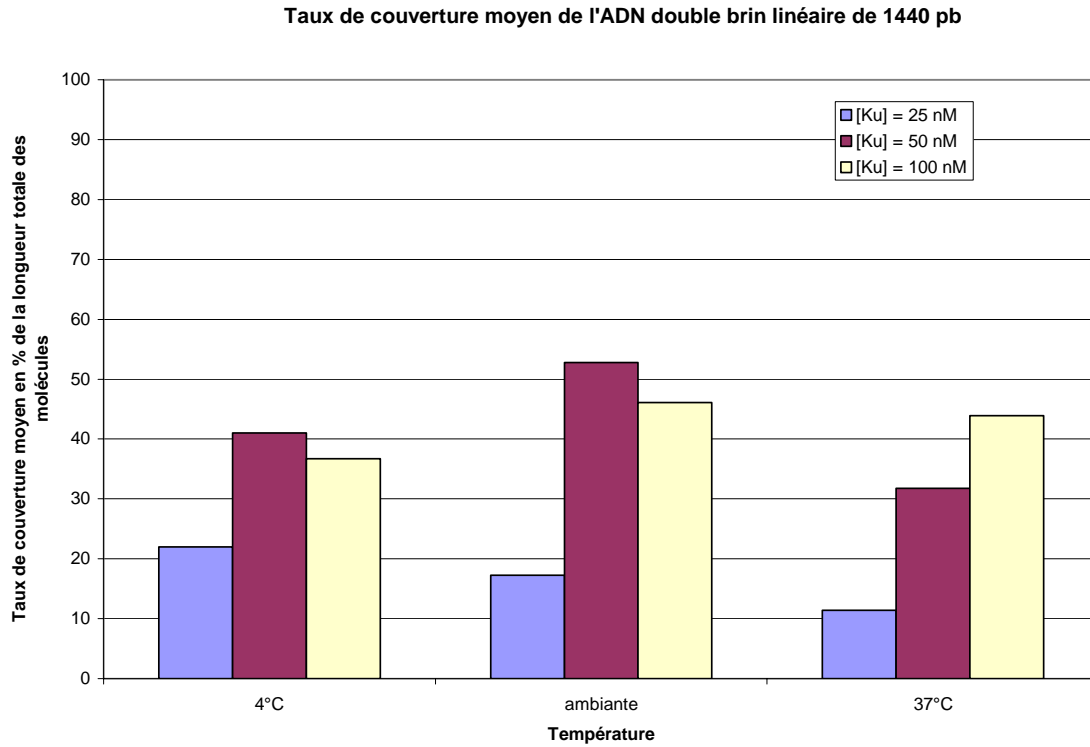
<i>[Ku] = 25 nM T = 4 °C</i>	<i>[Ku] = 25 nM T = 20 °C</i>	<i>[Ku] = 25 nM T = 37 °C</i>
<i>[Ku] = 50 nM T = 4 °C</i>	<i>[Ku] = 50 nM T = 20 °C</i>	<i>[Ku] = 50 nM T = 37 °C</i>
<i>[Ku] = 100 nM T = 4 °C</i>	<i>[Ku] = 100 nM T = 20 °C</i>	<i>[Ku] = 100 nM T = 37 °C</i>



Barre d'échelle : 200 nm. Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 912.

Histogrammes des taux de couverture moyens de l'ADN double brin linéaire de 1440 pb dans les différentes conditions des tableaux ci-dessus.

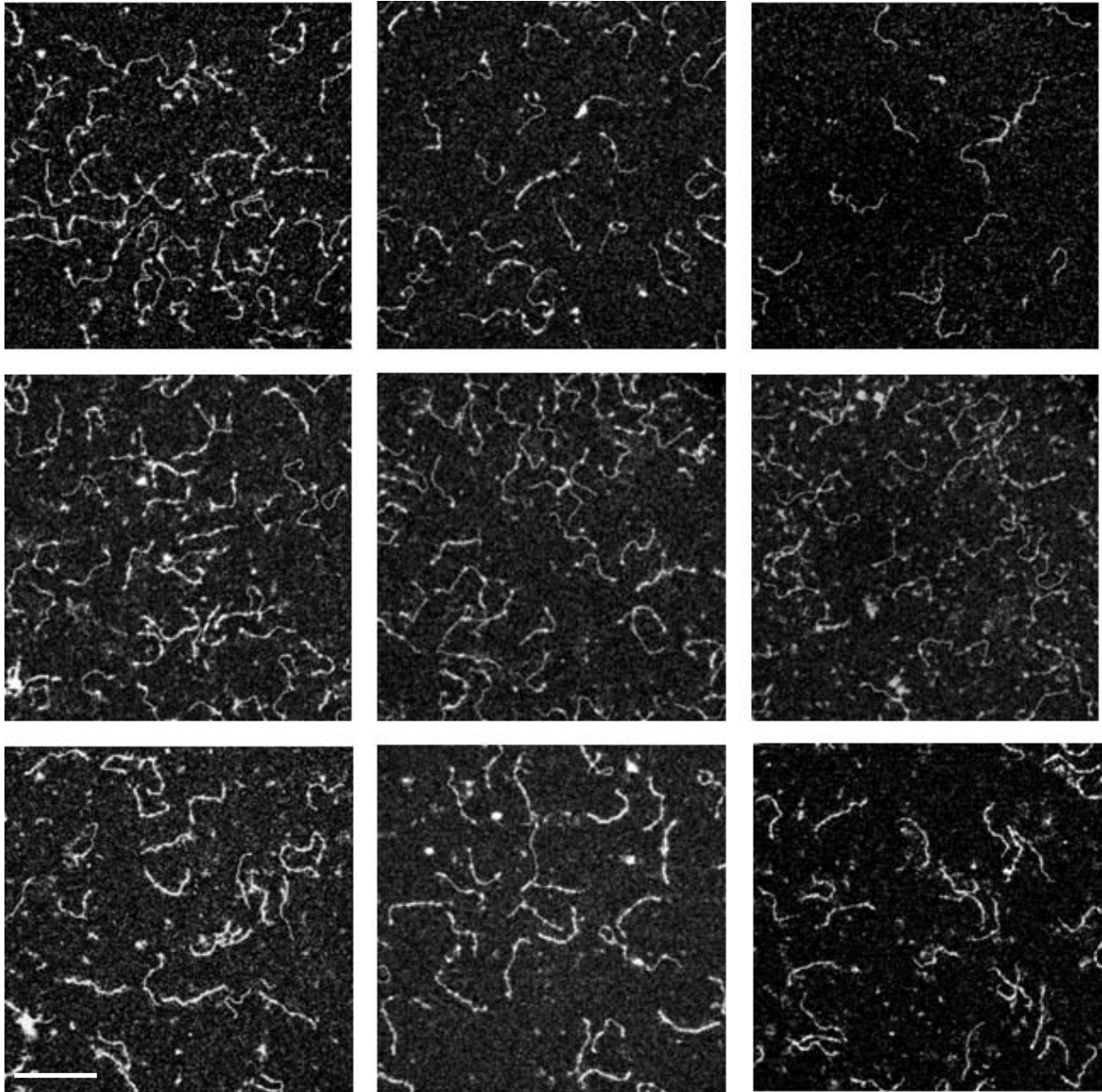
Pour chaque cas les mesures ont été faites sur environ 80 molécules.



b) ADN de 439 pb

Le tableau ci-dessous donne les conditions de concentration en Ku et de température correspondant à chacune des photographies présentées ensuite. Le tampon de réaction est le Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM EDTA 1 mM et le temps de réaction est de 5 minutes.

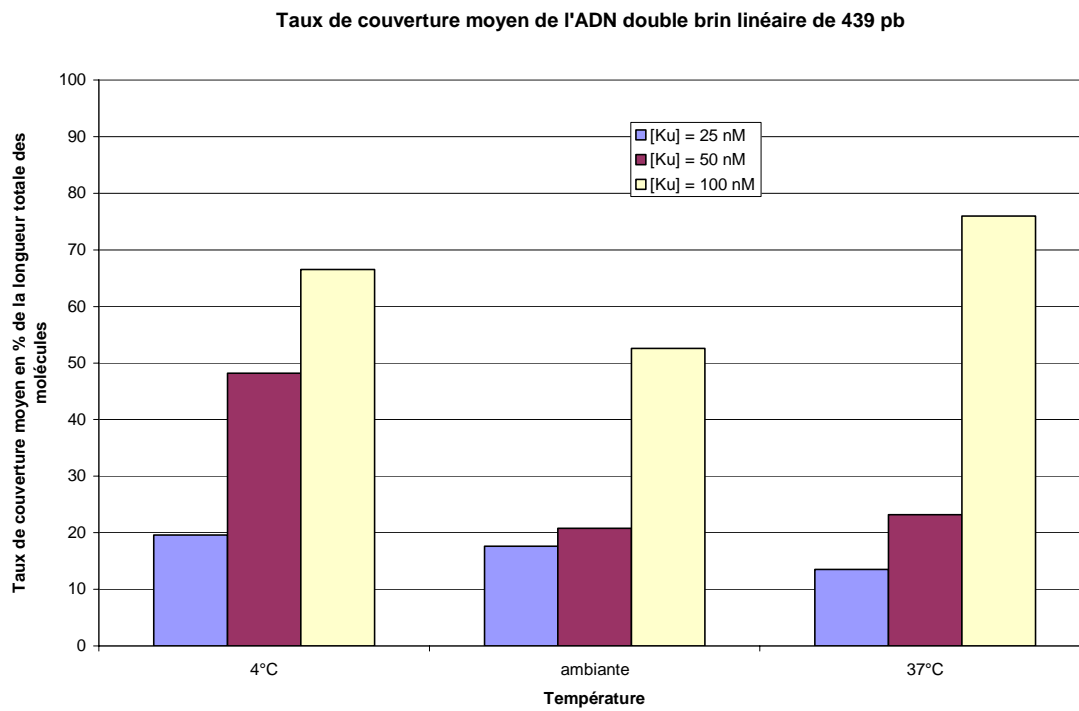
<i>[Ku] = 25 nM T = 4 °C</i>	<i>[Ku] = 25 nM T = 20 °C</i>	<i>[Ku] = 25 nM T = 37 °C</i>
<i>[Ku] = 50 nM T = 4 °C</i>	<i>[Ku] = 50 nM T = 20 °C</i>	<i>[Ku] = 50 nM T = 37 °C</i>
<i>[Ku] = 100 nM T = 4 °C</i>	<i>[Ku] = 100 nM T = 20 °C</i>	<i>[Ku] = 100 nM T = 37 °C</i>



Barre d'échelle : 200 nm. Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 912.

Histogrammes des taux de couverture moyens de l'ADN double brin linéaire de 439 pb dans les différentes conditions des tableaux ci-dessus.

Pour chaque cas les mesures ont été faites sur environ 80 molécules.



2.4. Dépendance de la présence d'extrémités libres.

a. Interaction de Ku avec l'ADN circulaire relâché.

Un mélange d'ADN circulaire pTZ relâché et d'ADN linéaire de 439 pb est réalisé en présence de Ku à 50 nM. Dans ces conditions l'ADN linéaire de 439 paires de bases est fortement recouvert alors qu'il n'y a pas de fixation ni d'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin circulaire pTZ relâché (**figure II-22**) ce qui confirme les résultats obtenus en AFM et déjà caractérisés sur Ku.



Figure II-22 : *L'oligomérisation le long de l'ADN double brin est dépendante de la présence d'extrémités libres. Elle n'a pas lieu sur ADN double brin circulaire relâché (plasmide pTZ relâché, 2861 pb) tandis que dans les mêmes conditions elle est observée sur ADN double brin linéaire (439 pb).*

[ADN pTZ] = 1 $\mu\text{g/mL}$; [ADN 439] = 0,25 $\mu\text{g/mL}$; [Ku] = 50 nM

Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM EDTA 1 mM ; réaction 15 minutes à température ambiante.

*Photographie obtenue sur le MET LEO Zeiss 902.
Barre d'échelle : 100 nm.*

Cependant lorsque le pTZ relâché est tout seul et à partir de concentrations de 100 nM en protéines, des complexes ADN-Ku commencent à se former, sans oligomérisation de la protéine le long de l'ADN comme on l'observe sur des fragments linéaires.

b. Interaction de Ku avec l'ADN circulaire superenroulé négativement.

Nous avons comparé la fixation de Ku à différents plasmides superenroulés négativement par rapport à leurs homologues relâchés fermés, à une concentration de Ku = 50 nM. L'analyse montrée ici dans le cas de pBR322 superenroulé négativement montre que Ku interagit avec cet état de l'ADN alors qu'il n'y a bien sûr aucune extrémité libre. Cette fixation observée ne semble pas associée à de la polymérisation (**figure II-23**). Ce résultat inattendu nous suggère que Ku est capable d'interagir avec des zones d'ADN localement dénaturées, puisque c'est la particularité des ADN superenroulés négativement.

Figure II-23 : Interaction de Ku avec l'ADN double brin circulaire superenroulé.

ADN : plasmide pBR322 (4361 pb) superenroulé négativement

Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM

A : contrôle

B1, B2 : ADN +Ku 50 nM, réaction 15 minutes à température ambiante

Photographies obtenue sur le MET LEO Zeiss 912.

Les molécules d'ADN superenroulées sont partiellement recouvertes de Ku, avec un accollement local des boucles de surenroulement.

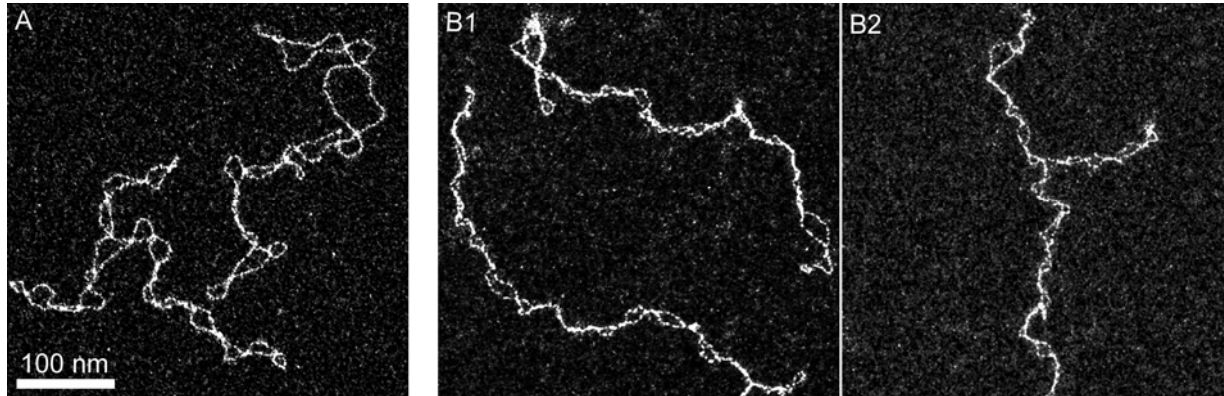
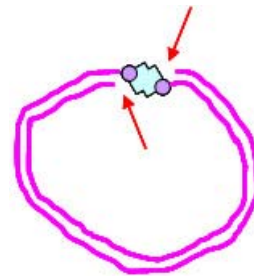
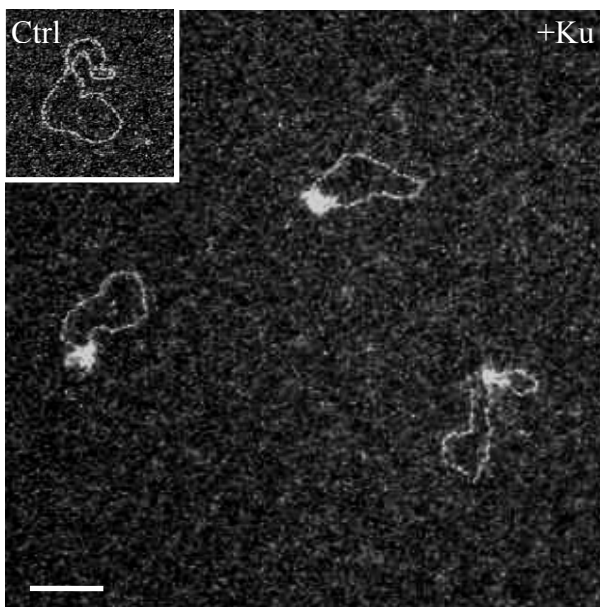


Figure II-24 : L'oligomérisation n'a pas lieu sur ADN de 1440 paires de bases refermé par la streptavidine. Ku est cependant capable de se fixer au niveau de la jonction entre les deux extrémités d'ADN.



$[Ku] = 2,5 \text{ nM}$; $[ADN] = 0,25 \text{ nM}$
soit $[Ku]/[ADN] = 10$.

Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM.

Réaction 15 minutes à température ambiante.

Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 902.

Barre d'échelle : 100 nm.

c. Interaction de Ku avec l'ADN circularisé par la streptavidine.

Nous avons ensuite étudié la fixation de Ku sur d'autres formes d'ADN circularisées. Nous avons sélectionné des fragments d'ADN de 1440 paires de bases biotinylés à leurs deux extrémités et refermés par une streptavidine. Cette circularisation est préalablement réalisée dans le tube ; Ku est ajoutée après avoir contrôlé la circularisation par microscopie. Aucune

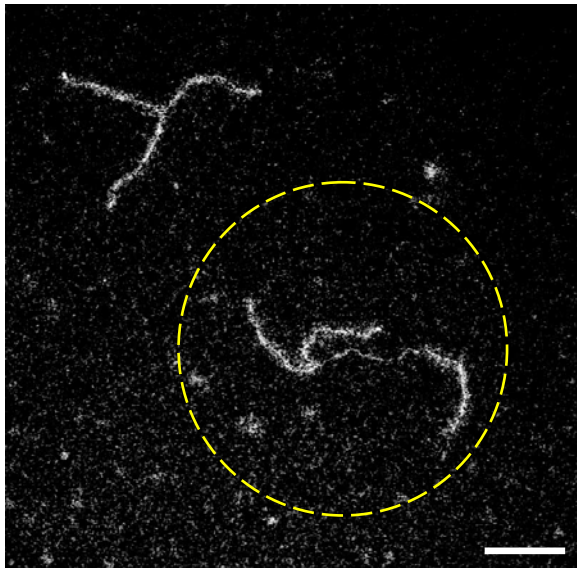
oligomérisation de Ku le long de l'ADN n'est observée même en montant à des rapports molaires $[Ku]/[ADN] = 100$. Mais quel que soit le rapport molaire dans la gamme 10 à 100 on observe une fixation de Ku au niveau de la streptavidine (**figure II-24**, exemple à $[Ku]/[ADN] = 10$).

d. Entrée et sortie de Ku sur des ADN linéaires.

Nous avons voulu tester par ailleurs les mécanismes d'entrée et de sortie de Ku sur des ADN linéaires bloqués ou non par la streptavidine à leurs extrémités grâce au complexe biotine-streptavidine. Sur un ADN biotinylé de chaque côté et en augmentant le rapport $[streptavidine]/[ADN \text{ biotinylé}]$ il est possible d'obtenir une majorité (~80%) d'ADN 1440 linéaire avec une streptavidine à chaque extrémité, non refermé. Dans ces conditions il n'y a pas de couverture de Ku le long de l'ADN, même si la protéine est capable de se fixer au niveau des streptavidines à chacune des extrémités. Nous avons alors testé différentes constructions de trimères permettant de mieux caractériser à la fois l'entrée et la sortie de Ku sur l'ADN.

Sur des trimères d'ADN de 439 paires de base biotinylés dont le fragment central se trouve déjà lié à une streptavidine à chaque extrémité, l'oligomérisation a lieu sur les deux fragments latéraux, mais ne se propage pas au fragment central, dans les conditions 50/100 nM en Ku (**figure II-25**), à température ambiante.

Figure II-25 : *Le bouchage des extrémités par la streptavidine sur l'ADN linéaire empêche la propagation de l'oligomérisation.*



Une extrémité des molécules d'ADN latérales reste libre et permet le démarrage de l'oligomérisation de Ku. La couverture de l'ADN double brin par Ku n'a lieu que sur les molécules d'ADN latérales, elle s'arrête au niveau de la jonction avec la molécule centrale (cf. complexe entouré).

*Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM
[Ku] = 50 nM*

Réaction à température ambiante.

Photographie obtenue sur le MET LEO Zeiss 902 ; barre d'échelle : 100 nm

Nous avons montré que Ku rentre par une extrémité double brin. Il est donc évident de chercher à définir comment Ku peut en sortir. Nous avons testé la dissociation de Ku d'un ADN complexé aux extrémités par la streptavidine après la formation du complexe ADN-Ku (**figure II-26**). Le complexe ADN-Ku est réalisé à 50 nM sur un ADN double brin biotinylé aux deux extrémités. Le complexe formé est ensuite incubé en présence d'un excès de streptavidine pendant 15 minutes. La réaction est ensuite purifiée sur tamis moléculaire (colonne superose 6B) afin d'éliminer Ku et la streptavidine libres en excès. Les complexes sont observés à différents temps (15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 3 heures et même 10 heures). Dans toutes ces conditions l'ADN central reste couvert par Ku, démontrant ainsi la nécessité d'extrémités libres pour assurer la dissociation de Ku de l'ADN double brin linéaire.

Figure II-26 : Stabilité de la couverture de l'ADN par Ku après bouchage des extrémités par la streptavidine.

Des complexes ADN-Ku ont été préparés sur ADN double brin linéaire (439 pb) biotinylé aux deux extrémités, dans des conditions de couverture totale de l'ADN. L'ajout de streptavidine permet ensuite de boucher les extrémités. L'ajout d'ADN linéaire biotinylé à une seule extrémité (439 pb) en excès permet alors de former des trimères (cf. molécules entourées).

Il n'est pas observé de départ de Ku de la partie centrale, qui reste complètement couverte par Ku à des temps longs (30 minutes, 1 heure, 3 heures) après la réaction.

Cette grande stabilité quand les extrémités sont bouchées implique réciproquement que dans un complexe Ku-ADN double brin linéaire avec les extrémités libres, le désassemblage du complexe ADN-Ku ne pourrait se faire que par la dissociation et le départ des protéines Ku au niveau des extrémités.

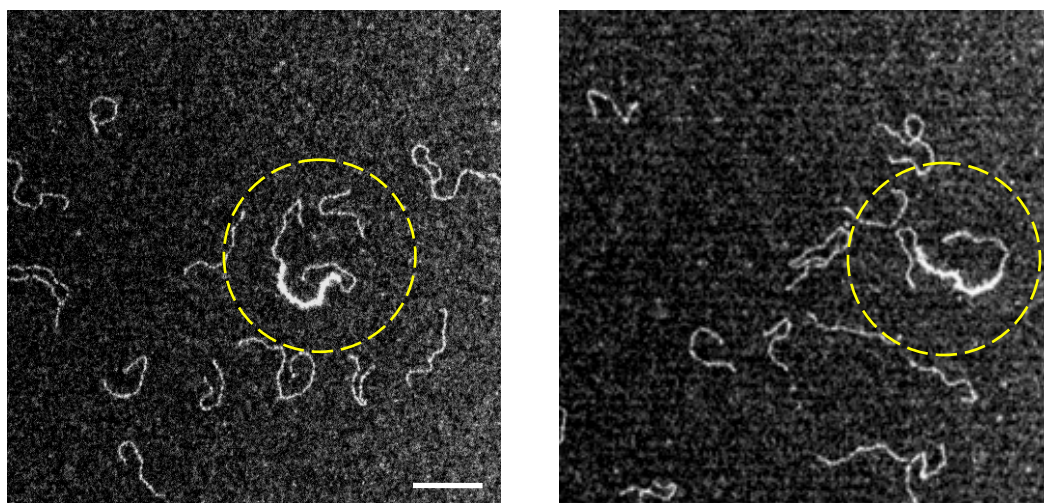
Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM.

Réaction à température ambiante.

Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 912.

Barre d'échelle : 100 nm.

Gauche : $t = 15$ minutes ; droite : $t = 1$ h.



2.5. Interaction de Ku avec l'ADN simple brin.

a. Fixation de Ku sur l'ADN simple brin circulaire.

L'observation sur l'ADN circulaire superenroulé négativement montrant des interactions Ku-ADN, comme l'observation sur l'ADN de 1440 paires de bases montrant des interactions au niveau des extrémités près de la streptavidine, suggèrent une capacité de Ku à se fixer à l'ADN simple brin. Nous avons donc étudié le comportement de Ku sur l'ADN simple brin.

Nous avons dans un premier temps étudié l'interaction de Ku avec un ADN Φ_{x174} dans des conditions comparables à des protéines de type SSB (*Single-Stranded DNA Binding protein* ou protéine de liaison à l'ADN simple brin) comme la gp32 ou la SSB de la bactérie *E. coli*. Ainsi les stoechiométries choisies sont dans des rapports d'une protéine pour 20, 40

ou 60 nucléotides. Nous mettons en évidence une affinité importante de Ku pour l'ADN simple brin circulaire. La fixation montre que le mode d'interaction est comparable à celui des SSB puisqu'on observe un déploiement des molécules (**figure II-27**). Ces réactions sont réalisées à différentes températures (4 à 37°C) sans avoir préalablement chauffé l'ADN simple brin, c'est-à-dire sans avoir préalablement défait les structures secondaires de l'ADN simple brin. Pour la gp32 la longueur de contour moyenne mesurée pour l'ADN simple brin circulaire est de 1771 nm +/- 186 nm alors que pour Ku elle est de 799 +/- 75 nm, soit environ 2,2 fois plus faible. Différents modes de fixation à l'ADN ont été proposés pour ces SSB, avec ou sans enroulement, avec ou sans formation de boucles. Ku présente clairement une propriété commune aux SSB d'*helix destabilizing* (déstabilisation d'hélice). La longueur plus courte avec Ku qu'avec la gp32 pourrait être due à des interactions protéine-protéine non décrites dans le cas des SSB.

Figure II-27 : Interaction de Ku avec l'ADN simple brin circulaire Φ x174 (5386 nucléotides) et comparaison avec une SSB (Single-Stranded DNA Binding protein), la gp32.

[ADN] = 1,5 μ M en nucléotides

Réaction à température ambiante, t = 15 minutes

Tampon Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM

Photographies obtenue sur le MET LEO Zeiss 912.

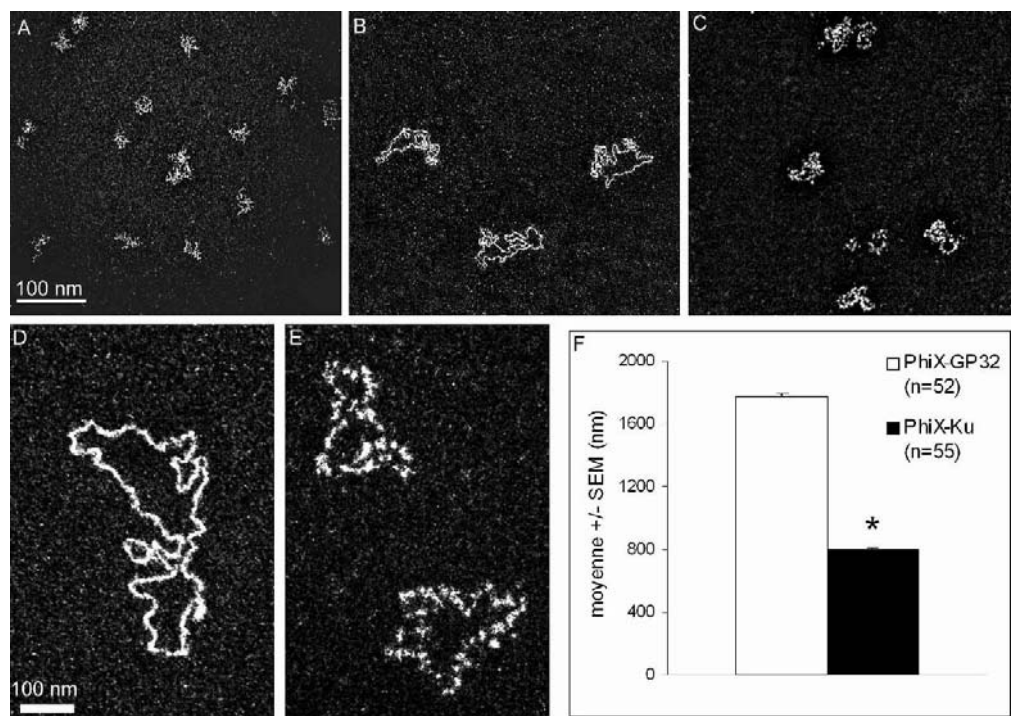
A : contrôle

B, D : ϕ x174 + gp32 15 μ M

C, E : ϕ x174 + Ku 50 nM

F : comparaison des longueurs de contour du ϕ x174 mesurées en présence de gp 32 ou en présence de Ku

L'ADN simple brin circulaire est plus étalé en présence de Ku (C) que l'ADN contrôle (A) mais beaucoup moins étalé qu'en présence de gp 32 (B).



b. Fixation de Ku sur des gaps.

Nous nous sommes demandés si cette fixation à l'ADN simple brin permet ou non une oligomérisation consécutive sur l'ADN double brin. L'étude de l'interaction de Ku avec un ADN circulaire présentant une grande partie double brin (~2000 pb en moyenne) et une grande partie simple brin ou *gap* (~3500 nucléotides en moyenne) montre que Ku se fixe à la partie ADN simple brin, sans propagation de la couverture à la partie ADN double brin (**figure II-28**).

Figure II-28 : Interaction de Ku avec un ADN circulaire hybride simple brin/double brin.

[ADN] ~ 1 µg/mL

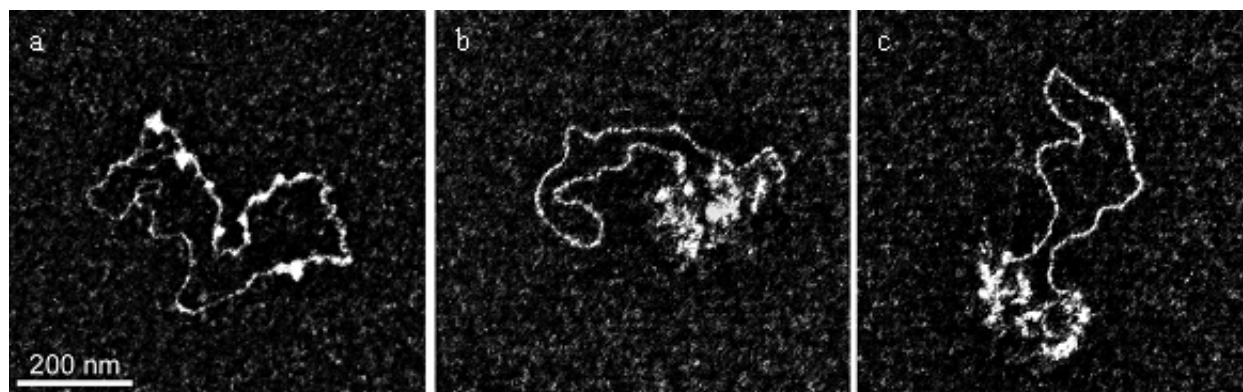
Réaction à température ambiante, t = 15 minutes

Tampon Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM

Photographies obtenue sur le MET LEO Zeiss 912

a : contrôle ADN + gp 32 15 µM

b, c : ADN + Ku 50 nM



b. Fixation de Ku sur une construction linéaire hybride simple brin/double brin.

Comme dans les cas précédents, Ku est incubée à différentes concentrations avec des fragments hybrides partiellement simple brin 5' sortant et double brin respectivement de 840 nucléotides et de 600 paires de bases (**figure II-29a**). L'affinité différentielle entre l'ADN simple brin 5' sortante et le double brin est étudiée ; la répartition de la présence du Ku sur le l'ADN double brin est étudiée et la répartition de la présence de Ku est présentée sur l'histogramme de la **figure II-29b**. L'étude en fonction de la concentration en Ku confirme que Ku présente une affinité préférentielle pour l'ADN simple brin puisque qu'à 15 nM de Ku, la fixation est exclusivement sur l'ADN simple brin. A [Ku] = 25 nM, Ku se fixe aussi à l'extrémité double brin de l'autre côté. En augmentant encore la quantité de Ku, une couverture partielle (à [Ku] = 50 nM) ou totale (à [Ku] = 100 nM) de la partie double brin finit par être obtenue.

Ces résultats montrent qu'il y a une hiérarchie dans la formation des complexes, en premier l'ADN simple brin puis l'ADN double brin. Cette fixation à l'ADN double brin ne peut se faire que sur l'extrémité double brin et pas à la jonction entre ADN simple brin et double brin, ce qui permet d'avoir une orientation de la polymérisation de Ku. L'analyse de l'histogramme confirme que la fixation du Ku sur l'ADN double brin ne se fait ici que par

l'extrémité double brin libre mais la polymérisation reste difficile à caractériser en termes de cinétique. Entre 50 et 100 nM de Ku, on obtient des fragments partiellement à totalement recouverts. Lorsque l'ADN est partiellement recouvert, il y a souvent discontinuité dans le recouvrement ce qui confirme qu'il y a dissociation entre les hétérodimères de Ku au cours du glissement dans l'ADN. Cependant, il faut remarquer qu'à 100 nM tout l'ADN double brin est recouvert contrairement à des fragments de 1440 pb ou de 439 pb ayant les deux extrémités libres. On se retrouve ainsi dans la situation où Ku rentre par une extrémité double brin et qu'elle ne peut plus ressortir de l'autre côté. Sa seule sortie possible est celle de l'entrée.

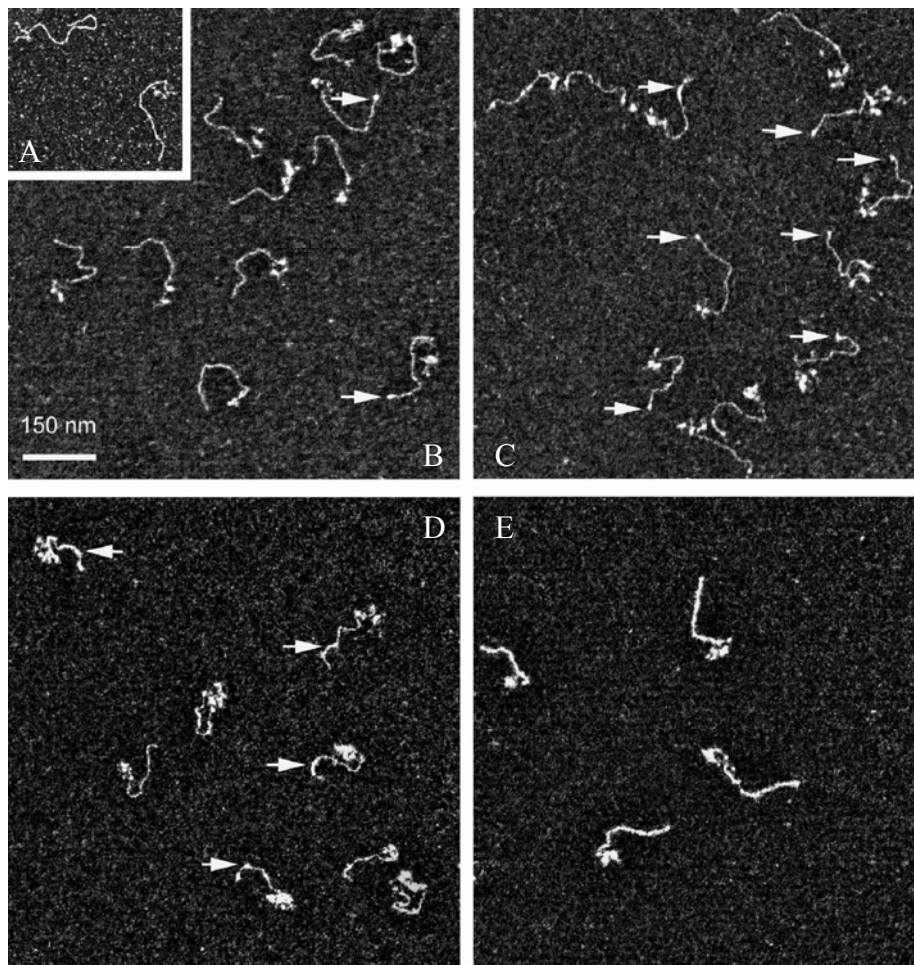
Figure II-29 : *Interaction de Ku avec une construction d'ADN linéaire hybride simple brin / double brin.*

a) Fixation différentielle de Ku sur les parties simple et double brin.

A, contrôle sans Ku ; B, construction + Ku 15 nM ; C, construction + Ku 25 nM ; D, construction + Ku 50 nM ; E, construction + Ku 100 nM

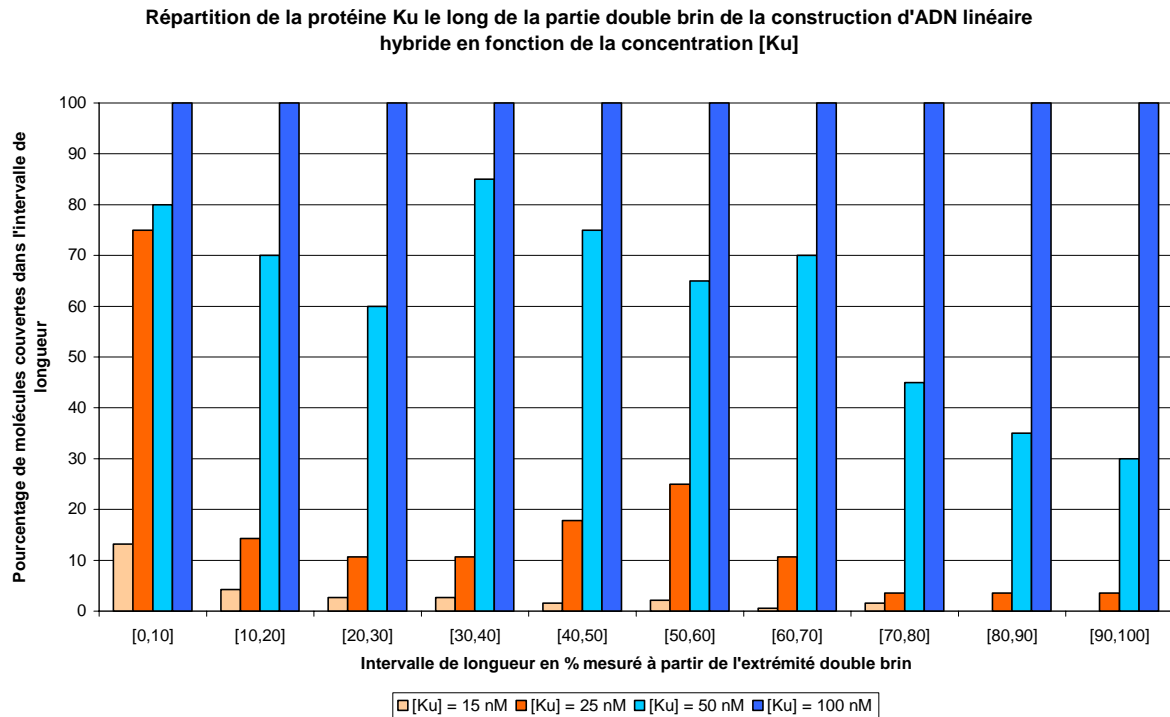
*Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM
Réaction 15 minutes à température ambiante.*

Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 912.



b) Couverture de la partie double brin de la construction en fonction de la concentration en Ku.

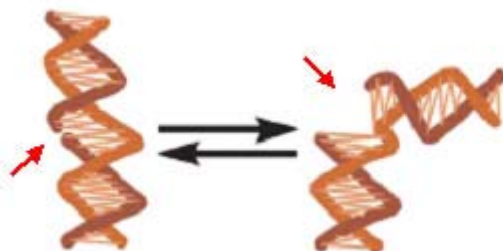
La fixation de Ku se fait préférentiellement sur la partie simple brin. En augmentant la concentration en protéine, il y a également fixation à l'extrémité libre de la partie double brin puis couverture de la partie double brin par Ku.



2.6. Reconnaissance des cassures simple brin.

Quel pourrait être le rôle biologique de l'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin ? Compte tenu de toutes les fonctions dans lesquelles Ku est susceptible d'être impliquée sur l'ADN (voir partie II de ce chapitre), nous avons avancé l'hypothèse que l'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin pourrait être un mécanisme de « scanning » conduisant à la détection d'autres lésions de l'ADN que les cassures double brin, comme par exemple les cassures simple brin. Nous avons étudié l'interaction de Ku avec des ADN présentant des cassures simple brin sans altération des bases adjacentes (*nicks*). Ces structures sont à l'origine de conformations locales particulières de l'ADN : au niveau des *nicks*, l'ADN est en permanence en équilibre entre une conformation empilée et une conformation désempilée des paires de bases adjacentes (104) (figure II-30).

Figure II-30 : Equilibre entre conformation empilée et désempilée au niveau d'une cassure simple brin de l'ADN. Figure d'après (104).



Nous avons d'abord examiné l'interaction de Ku avec un ADN circulaire dans lequel on a introduit 4 coupures simple brin ou *nicks* à des positions contrôlées comme décrit en **II-B**. La coupure est vérifiée par gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Ku est incubée avec cet ADN et les complexes sont étalés sur mica et grille et observées par AFM et TEM. Nous observons une fixation de Ku au niveau de ces structures (**figure II-31**). Cette fixation n'est pas suivie d'une oligomérisation le long de l'ADN double brin.

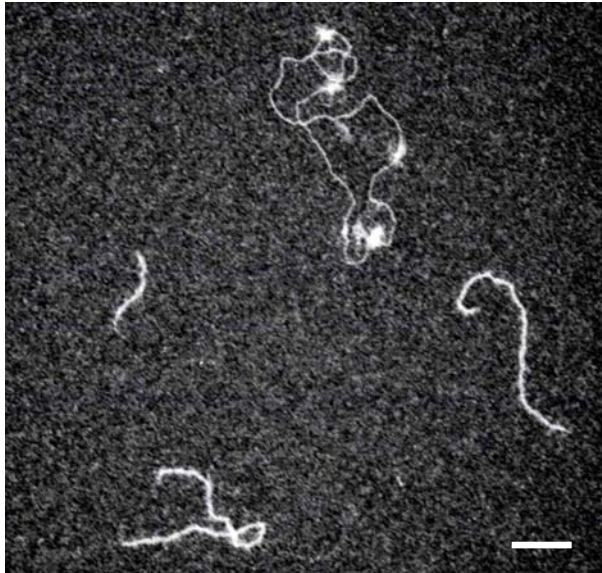


Figure II-31 : *Interaction de Ku avec un ADN circulaire comportant des nicks.*

a) En MET

[ADN] ~0,5 nM en molécules

[Ku] = 100 nM

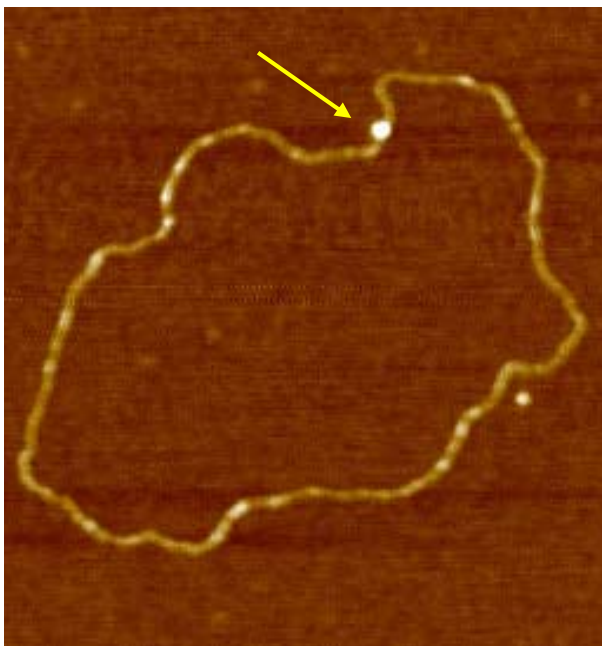
Tampon Tris 10 mM pH 7,5 NaCl 50 mM

EDTA 1 mM

Réaction 15 minutes à température ambiante suivie d'une purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6)

Photographie obtenue sur le MET LEO Zeiss 902.

Barre d'échelle : 100 nm.



b) En AFM

[ADN]~0,5 nM en molécules

[Ku]/[ADN] = 5

Tampon de réaction : Tris 10 mM pH 7,5
NaCl 50 mM.

Réaction 15 minutes à température ambiante suivie d'une purification sur tamis moléculaire (colonne superose 6).

Mica non prétraité

Tampon de dépôt : Tris 10 mM pH 7,5
MgCl₂ 10mM NaCl 50 mM

AFM à l'air

Scan : 500 nm x 500 nm.

Echelle en Z : 5 nm.

La même étude est réalisée avec l'ADN de 1440 pb linéaire pour étudier si la polymérisation de Ku le long de l'ADN est bloquée par les nicks. Cette étude a été réalisée à différentes concentrations de Ku (25, 50, et 100 nM). Nous n'avons pas clairement observé d'arrêt de l'oligomérisation de Ku le long de l'ADN, ni de stabilisation de conformations désempilées au niveau des *nicks* comme l'aurait montré la présence d'angles forts au niveau

de l'ADN (*kinks*). Cependant il apparaît que Ku recouvre plus l'ADN quand il y a présence des cassures simple brin.

Le même expérience est refaite à partir d'un plasmide pBR322 préparé de manière à obtenir les 4 nicks. Les complexes sont formés et vérifiés à des concentrations de 50 et 100 nM de Ku. Le plasmide est alors linéarisé par l'enzyme *DrdI*. Dans ces conditions où Ku est déjà fixée sur les nicks, la polymérisation sur l'ADN de Ku libre n'est pas bloquée par Ku ancrée sur les coupures simple brin. L'analyse détaillée de l'occupation de Ku sur l'ADN confirme que la couverture de Ku sur l'ADN est plus importante en présence des cassures simple brin (**figure II-32**).

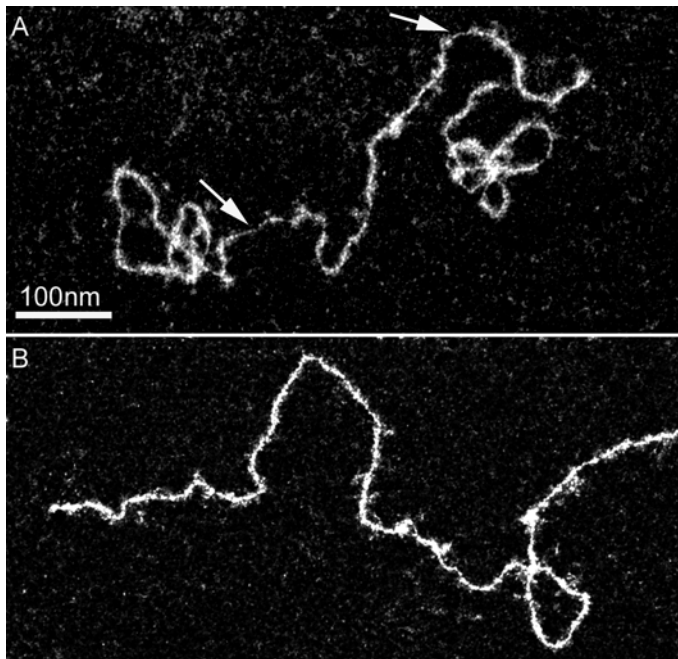


Figure II-32 : Interaction de Ku avec l'ADN linéaire nické.

*A : contrôle (plasmide pBR322 coupé par l'enzyme de restriction *DrdI*)
B : plasmide pBR322 nické préparé comme décrit dans la partie II-B, puis coupé par l'enzyme de restriction *DrdI*.*

*[Ku] = 100 nM
Tampon Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 1 mM
Réaction 15 minutes à température ambiante.
Photographies obtenues sur le MET LEO Zeiss 912.*

La couverture par Ku de l'ADN linéaire nické (B) est supérieure à celle de l'ADN linéaire intact (A) ; les flèches indiquent des portions d'ADN non recouvertes par Ku sur l'ADN linéaire intact.

3. Discussion.

Notre étude initiale était ciblée sur la reconnaissance des cassures double brin par la protéine Ku. Nos observations en AFM montrent un mécanisme d'oligomérisation de Ku le long de l'ADN initiée au niveau des extrémités d'ADN double brin mais pas de jonction d'extrémités. Ces résultats diffèrent d'autres études AFM, qui indiquaient une affinité et une stabilisation de Ku sur les extrémités d'ADN double brin (105-107) et une capacité à les rabouter (105) ou à former des boucles (108) sur la surface du mica. Ces différences pourraient être liées aux protocoles de préparation des échantillons et de dépôts sur les micas utilisés. Les faibles interactions entre l'ADN et la surface favorisent la diffusion de l'ADN en 2 dimensions. Cette diffusion 2D et la forte affinité de Ku pour la surface pourraient être à l'origine de ces observations qui ont été depuis remises en cause (105). Par ailleurs, l'utilisation de glutaraldéhyde favoriserait le piégeage de boucles (108).

La forte interaction de la protéine Ku avec la surface du mica ne nous a pas permis d'aller plus loin dans la caractérisation du processus d'oligomérisation en utilisant l'AFM en milieu liquide. L'adsorption de Ku résiste aux changements de conditions ioniques de la solution, ce qui pourrait en faire un bon candidat comme plot d'ancrage dans l'étude que j'ai réalisée sur la fixation de l'ADN dans le **chapitre 3** partie **III**. Mais ses propriétés de se lier

aussi fortement à l'ADN rendent son utilisation inappropriée. Durant la période pendant laquelle ce travail a été réalisé, les méthodologies utilisées en AFM ne permettaient pas d'étaler de manière satisfaisante l'ADN dans son état simple brin, c'est la raison pour laquelle nous avons approfondi l'étude des interactions ADN-Ku en utilisant la Microscopie Electronique en Transmission (MET), méthode de référence au laboratoire pour étudier les interactions entre les protéines et l'ADN dans ses différents états.

Oligomérisation, liaison aux extrémités, étude en fonction de la concentration et de la température

Nous avons étudié en MET l'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin linéaire et mis en évidence une coopérativité impliquant probablement l'existence d'interactions protéine-protéine. L'affinité de Ku pour les extrémités de l'ADN a pu être mise en évidence en regardant les complexes à des temps courts ou en ralentissant la cinétique de réaction à basse température, en accord avec certaines études par gel retard indiquant une affinité de Ku pour les extrémités de l'ADN (4,109-111).

La quantification du taux de couverture de l'ADN par Ku en fonction de la concentration et de la température pour deux longueurs de fragments différentes confirme que nous observons, comme en AFM, des phénomènes essentiellement dépendants de concentration en Ku. Il ne se dégage pas de tendance claire en fonction de la température. La reconnaissance des extrémités double brin et l'oligomérisation apparaissent comme des événements très rapides, dans des échelles de temps bien inférieures au temps d'adsorption sur la grille MET. La seule diminution de la température ne permet donc pas d'analyser directement les mécanismes d'association de la protéine sur l'ADN. Ainsi nos observations, tout comme les données issues des autres approches de caractérisation des interactions ADN-Ku résultent des équilibres association / dissociation et ces équilibres sont bien dépendants des concentrations en Ku.

Dépendance aux extrémités libres

Nous avons montré et confirmé la dépendance de la liaison de Ku à l'ADN double brin et de son oligomérisation le long de l'ADN à la présence d'extrémités libres. L'entrée de Ku sur un ADN double brin linéaire est bloquée par la streptavidine. Nous avons aussi montré que l'oligomérisation de Ku est bloquée par la streptavidine dans les différents modèles étudiés. La streptavidine peut empêcher l'entrée de Ku sur l'ADN mais aussi sa sortie lorsqu'elle est placée à une des extrémités ou aux deux extrémités après formation du complexe. Ku n'est donc pas capable, même après oligomérisation, de déplacer la liaison extrêmement forte biotine-streptavidine comme le font certaines hélicases dans leur activité translocase. Ces résultats sont en accord avec les données qui montrent que l'augmentation de la concentration en sel n'entraîne pas de dissociation des complexes ADN-Ku sur ADN circularisé après la liaison de Ku, tandis que dans les mêmes conditions les complexes formés sur ADN linéaire se dissocient (111). Ces résultats interrogent sur le sens physiologique de la polymérisation de Ku sur l'ADN puisque si celle-ci a un sens, il se pose la question de savoir comment Ku est capable de ressortir de l'ADN. On ne peut pas exclure l'implication de protéases, ou l'intervention de protéines chaperonnes qui pourraient remodeler la structure de l'hétérodimère et l'ouvrir pour le libérer de l'ADN. Des problèmes similaires se posent pour certaines hélicases hexamériques qui se chargent sur des jonctions simple / double brin et qui transloquent sur l'ADN simple brin, mais qui sont aussi capables de transloquer sur des ADN double brin (112). Certaines de ces hélicases présentent des formes ouvertes, multimériques qui leur permettent de rentrer sur des ADN circulaires fermés ; la liaison induit un

changement de conformation, ATP dépendant, qui referme l'hélicase comme un *clamp* sous sa forme hexamérique et qui lui permet d'initier son activité.

Coopérativité et modèles de description de l'oligomérisation.

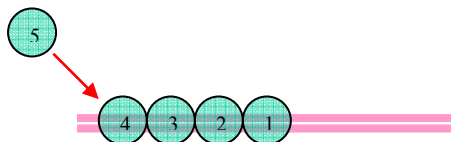
Nous avons mis en évidence une coopérativité dans le processus d'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin linéaire. Celle-ci faisait jusqu'ici débat (113-115) et n'avait jusqu'alors pas du tout été observée en microscopie. Selon certains auteurs il y aurait pas ou très peu de coopérativité dans la liaison successive des protéines Ku le long de l'ADN (113,114). Selon d'autres auteurs qui décrivent une coopérativité dans la liaison de Ku au niveau des extrémités, la protéine déjà fixée faciliterait la liaison à l'ADN d'une nouvelle protéine, mais la coopérativité ne serait pas conservée dans la couverture du reste de la molécule (115). La coopérativité observé ne peut être initiée qu'au niveau de l'extrémité à partir d'un point de nucléation constitué par la fixation du premier hétérodimère de Ku sur l'extrémité double brin. Cette coopérativité met en jeu des interactions protéine-protéine qui ne sont pas encore documentées dans la littérature. Ces interactions, si elles existent, sont probablement faibles comme le montre l'instabilité de l'oligomère de Ku sur l'ADN.

Pour rendre compte de ces observations, nous avons envisagé deux modèles différents. D'après sa structure cristallographique, Ku forme un anneau capable de reconnaître les extrémités et de glisser le long de l'ADN, ce qui suggère d'abord un mécanisme d'entrées successives de protéines par l'extrémité, associée à une translocation ou un glissement le long de l'ADN ; la première protéine fixée à l'extrémité favoriserait l'entrée des suivantes (modèle **a**). Un autre modèle ferait intervenir une fixation plus stable de Ku à l'extrémité, ce qui favoriserait la fixation d'un autre hétérodimère sans passage direct par l'extrémité, ce qui permettrait ainsi une propagation de proche en proche médiée par des interactions protéines-protéines (modèle **b**) (**figure II-33**). Le modèle **a** est en accord avec nos résultats sur l'ADN bouché aux extrémités par la streptavidine et avec les données structurales et biochimiques publiées. En revanche il rend difficilement compte de la coopérativité que nous observons. Le modèle **b** est difficilement compatible avec nos données et la structure en anneau de Ku, même s'il rendrait mieux compte des phénomènes de coopérativité.

Figure II-33 : Modèles proposés pour décrire l'oligomérisation extrémités-dépendante de Ku le long de l'ADN double brin.

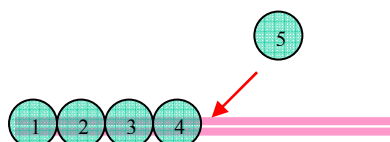
a) Entrées successives des protéines par l'extrémité.

La protéine déjà fixée à l'extrémité favorise la liaison de la protéine suivante ; la couverture de l'ADN se fait par translocation des protéines le long de la molécule.



b) Nucléation à partir de l'extrémité.

L'affinité particulière de Ku pour les extrémités de l'ADN permet la fixation d'une première protéine. La couverture de l'ADN se fait par nucléation à partir de la protéine fixée à l'extrémité.



Interactions avec l'ADN simple brin

La fixation de Ku et son oligomérisation sur l'ADN double brin nécessitent la présence de cassures double brin. Dans les conditions étudiées, Ku n'interagit pas avec l'ADN circulaire fermé et relâché mais nos résultats révèlent pour la première fois que Ku interagit avec l'ADN circulaire superenroulé négativement sans qu'il y ait une oligomérisation comparable à celle observée avec un ADN linéaire. Les propriétés de fixation à l'ADN simple brin que nous discuterons dans le paragraphe suivant pourraient expliquer cette interaction avec des zones partiellement dénaturées, spécifiques de l'ADN superenroulées négativement. La nucléation de Ku sur ces régions pourrait être suivie d'un phénomène de propagation envahissant progressivement l'ADN. Certaines données bibliographiques vont dans le sens de cette conclusion : Ku est capable de se lier aux séquences de type BUR (2) (régions avec désappariement de bases ou *Base Unpairing Regions*) et aux bulles de dénaturation de l'ADN (4). La fixation de Ku sur l'ADN circularisé par la streptavidine, au niveau de l'interruption de brin, confirme cette interaction avec l'ADN simple brin, sans propagation par oligomérisation de Ku le long de l'ADN.

Nous montrons sur des modèles d'ADN simple brin ou partiellement double et simple brin que l'affinité de Ku pour l'ADN simple brin est bien supérieure à son affinité pour l'ADN double brin et que la fixation à l'ADN simple brin se fait en l'absence d'extrémités libres. L'interaction de Ku avec les brèches simple brin avait déjà été montrée en biochimie (4), mais sans information sur la possibilité d'initier ou non une couverture de l'ADN double brin. Au vu de nos données il est clair également que la fixation de Ku à l'ADN simple brin ne permet pas d'initier l'oligomérisation de Ku sur l'ADN double brin voisin, dans le contexte d'un ADN circulaire comme d'un ADN linéaire. Nous pouvons donc finalement émettre l'hypothèse que les modes d'interaction de Ku avec le double brin et le simple brin sont différents ; ils pourraient peut-être être associés à des conformations différentes de la protéine. Ces résultats vont dans le même sens qu'un certain nombre de données déjà publiées. Au niveau des extrémités, la liaison de Ku à une extrémité « A+T » est environ 5 fois plus forte qu'à une extrémité « G+C », où le désappariement des deux brins d'ADN est plus difficile (4). Avec un ADN double brin saturé en Ku, l'ADN simple brin circulaire M13 fait une compétition efficace (2). Ku peut se lier sur un brin de la séquence d'ADN NRE1 du LTR (*Long Terminal Repeat*) du MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) (88,89).

Reconnaissance des cassures simple brin

Ku est déjà connue pour avoir une affinité assez forte pour ce type de discontinuité structurale de l'ADN (109). Nos résultats vont aussi dans ce sens, avec l'accumulation de protéines Ku au niveau des cassures simple brin dans le contexte d'un ADN circulaire. Nous émettons l'hypothèse que cette affinité et un temps de résidence plus important de Ku sur les *nicks* que sur le reste de la molécule d'ADN pourraient favoriser le recrutement de machineries de réparation de cette lésion. Nous avons mis en évidence que cette fixation de Ku au niveau des *nicks* ne permet pas d'initier d'oligomérisation le long de l'ADN double brin. La présence de *nicks* le long d'un ADN linéaire n'empêche pas en revanche la propagation de l'oligomérisation. Les particularités de l'interaction ADN-Ku sur cette structure semblent donc masquées par la dynamique d'empilement-déempilement de l'ADN au niveau des cassures simple brin ; le passage transitoire par des conformations empilées serait suffisant pour que l'oligomérisation se propage. L'hypothèse que dans le contexte d'un ADN linéaire, l'oligomérisation de Ku le long de la molécule mènerait la protéine Ku à une reconnaissance des cassures simple brin reste ne peut pas être exclue.

Conclusion et perspectives.

Les protéines interagissant avec l'ADN double brin sont en général considérées et caractérisées dans leur spécificité pour un site défini, une séquence, une altération comme les sites abasiques ou les dimères de thymine, ou une cassure simple ou double brin... La dynamique des protéines sur l'ADN mettant en jeu à la fois des interactions spécifiques et non spécifiques est plus difficile à caractériser. Pourtant, de plus en plus de modèles intègrent les mécanismes de recherches des protéines sur l'ADN. Ceux-ci impliquent des interactions faibles ADN-protéines et/ou protéine-protéine, mettant en avant la dynamique des complexes nucléoprotéiques, en présence ou non de moteurs moléculaires comme les hélicases, les polymérases, ou les topoisomérases. Nous avons montré l'intérêt des approches d'imagerie à haute résolution comme la MET et l'AFM pour appréhender l'étude de ce type de complexe. Comme le montre mon travail de thèse, l'AFM est un outil pour lequel il faut davantage développer des approches pour l'étude de la dynamique de ces complexes.

Il reste à mieux comprendre le sens physiologique des deux modes d'interactions de Ku avec l'ADN double brin et simple brin. Ku a été évoquée dans la régulation de nombreux mécanismes, comme ceux de la réparation et pas exclusivement des cassures double brin, ou comme ceux de la maintenance des télomères. Ku a même été montré au sein des complexes de pré-intégration du VIH au moment de l'étape précoce de l'infection. Dans le *NHEJ*, l'implication de Ku nécessite la protéine DNA-PKcs comme partenaire. Nos approches permettront de caractériser les interactions de la DNA-PKcs seule avec l'ADN, en absence et en présence d'ATP puis en présence de Ku pour étudier les mécanismes permettant la jonction des extrémités et facilitant la ligation. Le rôle et les partenaires putatifs de Ku au sein d'autres mécanismes de régulation restent à caractériser. Nous savons en particulier que Ku interagit avec les nucléosomes dans la fibre chromatinienne. Il apparaît très intéressant d'étudier le comportement de Ku au sein des nucléosomes pour comprendre quels sont les modes de fixation qui sont mis en jeu et évaluer l'impact de Ku sur la dynamique chromatinienne.

Bibliographie du chapitre 5

1. Mimori, T., M. Akizuki, H. Yamagata, S. Inada, S. Yoshida, and M. Homma. 1981. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 68:611-620.
2. de Vries, E., W. van Driel, W. G. Bergsma, A. C. Arnberg, and P. C. van der Vliet. 1989. HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol* 208:65-78.
3. Stuiver, M. H., F. E. Coenjaerts, and P. C. van der Vliet. 1990. The autoantigen Ku is indistinguishable from NF IV, a protein forming multimeric protein-DNA complexes. *J Exp Med* 172:1049-1054.
4. Falzon, M., J. W. Fewell, and E. L. Kuff. 1993. EBP-80, a transcription factor closely resembling the human autoantigen Ku, recognizes single- to double-strand transitions in DNA. *J Biol Chem* 268:10546-10552.
5. Roberts, M. R., W. K. Miskimins, and F. H. Ruddle. 1989. Nuclear proteins TREF1 and TREF2 bind to the transcriptional control element of the transferrin receptor gene and appear to be associated as a heterodimer. *Cell Regul* 1:151-164.
6. Knuth, M. W., S. I. Gunderson, N. E. Thompson, L. A. Strasheim, and R. R. Burgess. 1990. Purification and characterization of proximal sequence element-binding protein 1, a transcription activating protein related to Ku and TREF that binds the proximal sequence element of the human U1 promoter. *J Biol Chem* 265:17911-17920.
7. Chu, G. 1997. Double strand break repair. *J Biol Chem* 272:24097-24100.
8. Mimori, T., J. A. Hardin, and J. A. Steitz. 1986. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem* 261:2274-2278.
9. Mimori, T. and J. A. Hardin. 1986. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 261:10375-10379.
10. Feldmann, H. and E. L. Winnacker. 1993. A putative homologue of the human autoantigen Ku from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268:12895-12900.
11. Hsu, D. W., P. Gaudet, J. J. Hudson, C. J. Pears, and N. D. Lakin. 2006. DNA Damage Signaling and Repair in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Cycle* 5:702-708.
12. Hudson, J. J., D. W. Hsu, K. Guo, N. Zhukovskaya, P. H. Liu, J. G. Williams, C. J. Pears, and N. D. Lakin. 2005. DNA-PKcs-dependent signaling of DNA damage in *Dictyostelium discoideum*. *Curr Biol* 15:1880-1885.
13. Aravind, L. and E. V. Koonin. 2001. Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res* 11:1365-1374.

14. Weller, G. R., B. Kysela, R. Roy, L. M. Tonkin, E. Scanlan, M. Della, S. K. Devine, J. P. Day, A. Wilkinson, F. d'Adda di Fagagna, K. M. Devine, R. P. Bowater, P. A. Jeggo, S. P. Jackson, and A. J. Doherty. 2002. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* 297:1686-1689.
15. Muller, C., J. Paupert, S. Monferran, and B. Salles. 2005. The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. *Cell Cycle* 4:438-441.
16. Lucero, H., D. Gae, and G. E. Taccioli. 2003. Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: a putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response. *J Biol Chem* 278:22136-22143.
17. Monferran, S., C. Muller, L. Mourey, P. Frit, and B. Salles. 2004. The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin. *J Mol Biol* 337:503-511.
18. Monferran, S., J. Paupert, S. Dauvillier, B. Salles, and C. Muller. 2004. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J* 23:3758-3768.
19. Gell, D. and S. P. Jackson. 1999. Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res* 27:3494-3502.
20. Wu, X. and M. R. Lieber. 1996. Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Mol Cell Biol* 16:5186-5193.
21. Osipovich, O., R. J. Duhe, P. Hasty, S. K. Durum, and K. Muegge. 1999. Defining functional domains of Ku80: DNA end binding and survival after radiation. *Biochem Biophys Res Commun* 261:802-807.
22. Osipovich, O., S. K. Durum, and K. Muegge. 1997. Defining the minimal domain of Ku80 for interaction with Ku70. *J Biol Chem* 272:27259-27265.
23. Cary, R. B., F. Chen, Z. Shen, and D. J. Chen. 1998. A central region of Ku80 mediates interaction with Ku70 in vivo. *Nucleic Acids Res* 26:974-979.
24. Walker, J. R., R. A. Corpina, and J. Goldberg. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614.
25. Doherty, A. J. and S. P. Jackson. 2001. DNA repair: how Ku makes ends meet. *Curr Biol* 11:R920-924.
26. Harris, R., D. Esposito, A. Sankar, J. D. Maman, J. A. Hinks, L. H. Pearl, and P. C. Driscoll. 2004. The 3D solution structure of the C-terminal region of Ku86 (Ku86CTR). *J Mol Biol* 335:573-582.

27. Zhang, Z., W. Hu, L. Cano, T. D. Lee, D. J. Chen, and Y. Chen. 2004. Solution structure of the C-terminal domain of Ku80 suggests important sites for protein-protein interactions. *Structure (Camb)* 12:495-502.
28. Zhang, Z., L. Zhu, D. Lin, F. Chen, D. J. Chen, and Y. Chen. 2001. The three-dimensional structure of the C-terminal DNA-binding domain of human Ku70. *J Biol Chem* 276:38231-38236.
29. Llorca, O. and L. H. Pearl. 2004. Electron microscopy studies on DNA recognition by DNA-PK. *Micron* 35:625-633.
30. Yoo, S., A. Kimzey, and W. S. Dynan. 1999. Photocross-linking of an oriented DNA repair complex. Ku bound at a single DNA end. *J Biol Chem* 274:20034-20039.
31. Hennequin, C., N. Giocanti, D. Averbeck, and V. Favaudon. 1999. [DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), a key enzyme in the re-ligation of double-stranded DNA breaks]. *Cancer Radiother* 3:289-295.
32. Weterings, E. and D. C. van Gent. 2004. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)* 3:1425-1435.
33. Lieber, M. R., Y. Ma, U. Pannicke, and K. Schwarz. 2004. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 3:817-826.
34. Audebert, M., B. Salles, and P. Calsou. 2004. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 279:55117-55126.
35. Audebert, M., B. Salles, M. Weinfeld, and P. Calsou. 2006. Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol* 356:257-265.
36. Muller, C., G. Rodrigo, P. Calsou, and B. Salles. 1999. [DNA-dependent protein kinase: a major protein involved in the cellular response to ionizing radiation]. *Bull Cancer* 86:977-983.
37. Smith, G. C. and S. P. Jackson. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13:916-934.
38. Lee, S. H. and C. H. Kim. 2002. DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint. *Mol Cells* 13:159-166.
39. Meek, K., S. Gupta, D. A. Ramsden, and S. P. Lees-Miller. 2004. The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol Rev* 200:132-141.
40. Collis, S. J., T. L. DeWeese, P. A. Jeggo, and A. R. Parker. 2005. The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 24:949-961.

41. Suwa, A., M. Hirakata, Y. Takeda, S. A. Jesch, T. Mimori, and J. A. Hardin. 1994. DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p350 complex) assembles on double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6904-6908.
42. Leuther, K. K., O. Hammarsten, R. D. Kornberg, and G. Chu. 1999. Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA. *EMBO J* 18:1114-1123.
43. Chiu, C. Y., R. B. Cary, D. J. Chen, S. R. Peterson, and P. L. Stewart. 1998. Cryo-EM imaging of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J Mol Biol* 284:1075-1081.
44. Boskovic, J., A. Rivera-Calzada, J. D. Maman, P. Chacon, K. R. Willison, L. H. Pearl, and O. Llorca. 2003. Visualization of DNA-induced conformational changes in the DNA repair kinase DNA-PKcs. *EMBO J* 22:5875-5882.
45. Hammarsten, O. and G. Chu. 1998. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:525-530.
46. Yoo, S. and W. S. Dynan. 1999. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27:4679-4686.
47. Spagnolo, L., A. Rivera-Calzada, L. H. Pearl, and O. Llorca. 2006. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell* 22:511-519.
48. Yaneva, M., T. Kowalewski, and M. R. Lieber. 1997. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 16:5098-5112.
49. Martensson, S. and O. Hammarsten. 2002. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. Structural requirements for kinase activation by DNA ends. *J Biol Chem* 277:3020-3029.
50. Hammarsten, O., L. G. DeFazio, and G. Chu. 2000. Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* 275:1541-1550.
51. Rosenzweig, K. E., M. B. Youmell, S. T. Palayoor, and B. D. Price. 1997. Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clin Cancer Res* 3:1149-1156.
52. Veuger, S. J., N. J. Curtin, C. J. Richardson, G. C. Smith, and B. W. Durkacz. 2003. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res* 63:6008-6015.

53. Salles, B., P. Calsou, P. Frit, and C. Muller. 2006. The DNA repair complex DNA-PK, a pharmacological target in cancer chemotherapy and radiotherapy. *Pathol Biol (Paris)* 54:185-193.
54. Levy, N., A. Martz, A. Bresson, C. Spenlehauer, G. de Murcia, and J. Menissier-de Murcia. 2006. XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 34:32-41.
55. Frit, P., P. Calsou, D. J. Chen, and B. Salles. 1998. Ku70/Ku80 protein complex inhibits the binding of nucleotide excision repair proteins on linear DNA in vitro. *J Mol Biol* 284:963-973.
56. Frit, P., R. Y. Li, D. Arzel, B. Salles, and P. Calsou. 2000. Ku entry into DNA inhibits inward DNA transactions in vitro. *J Biol Chem* 275:35684-35691.
57. Calsou, P., P. Frit, O. Humbert, C. Muller, D. J. Chen, and B. Salles. 1999. The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem* 274:7848-7856.
58. Salles, B., P. Calsou, P. Frit, and C. Muller. 2006. The DNA repair complex DNA-PK, a pharmacological target in cancer chemotherapy and radiotherapy. *Pathol Biol (Paris)*.
59. Yang, J., Y. Yu, H. E. Hamrick, and P. J. Duerksen-Hughes. 2003. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24:1571-1580.
60. Comai, L. and B. Li. 2004. The Werner syndrome protein at the crossroads of DNA repair and apoptosis. *Mech Ageing Dev* 125:521-528.
61. Cooper, M. P., A. Machwe, D. K. Orren, R. M. Brosh, D. Ramsden, and V. A. Bohr. 2000. Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* 14:907-912.
62. Li, B. and L. Comai. 2002. Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 30:3653-3661.
63. Li, B. and L. Comai. 2001. Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein-Ku70/80 complex. *J Biol Chem* 276:9896-9902.
64. Dudasova, Z. and M. Chovanec. 2003. Artemis, a novel guardian of the genome. *Neoplasma* 50:311-318.
65. Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz, and M. R. Lieber. 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-794.
66. Ma, Y., U. Pannicke, H. Lu, D. Niewolik, K. Schwarz, and M. R. Lieber. 2005. The DNA-PKcs phosphorylation sites in human artemis. *J Biol Chem*.

67. Mahajan, K. N., S. A. Nick McElhinny, B. S. Mitchell, and D. A. Ramsden. 2002. Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22:5194-5202.
68. Fan, W. and X. Wu. 2004. DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1328-1333.
69. Lee, J. W., L. Blanco, T. Zhou, M. Garcia-Diaz, K. Bebenek, T. A. Kunkel, Z. Wang, and L. F. Povirk. 2004. Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem* 279:805-811.
70. Chappell, C., L. A. Hanakahi, F. Karimi-Busheri, M. Weinfeld, and S. C. West. 2002. Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J* 21:2827-2832.
71. Bernstein, N. K., R. S. Williams, M. L. Rakovszky, D. Cui, R. Green, F. Karimi-Busheri, R. S. Mani, S. Galicia, C. A. Koch, C. E. Cass, D. Durocher, M. Weinfeld, and J. N. Glover. 2005. The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Mol Cell* 17:657-670.
72. Koch, C. A., R. Agyei, S. Galicia, P. Metalnikov, P. O'Donnell, A. Starostine, M. Weinfeld, and D. Durocher. 2004. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J* 23:3874-3885.
73. Williams, R. S., N. Bernstein, M. S. Lee, M. L. Rakovszky, D. Cui, R. Green, M. Weinfeld, and J. N. Glover. 2005. Structural basis for phosphorylation-dependent signaling in the DNA-damage response. *Biochem Cell Biol* 83:721-727.
74. Sibanda, B. L., S. E. Critchlow, J. Begun, X. Y. Pei, S. P. Jackson, T. L. Blundell, and L. Pellegrini. 2001. Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nature Struct Biol* 8:1015-1019.
75. Hsu, H. L., S. M. Yannone, and D. J. Chen. 2002. Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 1:225-235.
76. Kysela, B., A. J. Doherty, M. Chovanec, T. Stiff, S. M. Ameer-Beg, B. Vojnovic, P. M. Girard, and P. A. Jeggo. 2003. Ku stimulation of DNA ligase IV-dependent ligation requires inward movement along the DNA molecule. *J Biol Chem* 278:22466-22474.
77. Mahajan, K. N., L. Gangi-Peterson, D. H. Sorscher, J. Wang, K. N. Gathy, N. P. Mahajan, W. H. Reeves, and B. S. Mitchell. 1999. Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13926-13931.
78. Downs, J. A. and S. P. Jackson. 2004. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:367-378.

79. Daniel, R., R. A. Katz, and A. M. Skalka. 1999. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* 284:644-647.
80. Li, L., J. M. Olvera, K. E. Yoder, R. S. Mitchell, S. L. Butler, M. Lieber, S. L. Martin, and F. D. Bushman. 2001. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J* 20:3272-3281.
81. Downs, J. A. and S. P. Jackson. 1999. Involvement of DNA end-binding protein Ku in Ty element retrotransposition. *Mol Cell Biol* 19:6260-6268.
82. Ting, N. S., Y. Yu, B. Pohorelic, S. P. Lees-Miller, and T. L. Beattie. 2005. Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 33:2090-2098.
83. Stellwagen, A. E., Z. W. Haimberger, J. R. Veatch, and D. E. Gottschling. 2003. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* 17:2384-2395.
84. Bianchi, A. and T. de Lange. 1999. Ku binds telomeric DNA in vitro. *J Biol Chem* 274:21223-21227.
85. Matheos, D., M. T. Ruiz, G. B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos. 2002. Ku antigen, an origin-specific binding protein that associates with replication proteins, is required for mammalian DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 1578:59-72.
86. Novac, O., D. Matheos, F. D. Araujo, G. B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos. 2001. In vivo association of Ku with mammalian origins of DNA replication. *Mol Biol Cell* 12:3386-3401.
87. Ono, M., P. W. Tucker, and J. D. Capra. 1996. Ku is a general inhibitor of DNA-protein complex formation and transcription. *Mol Immunol* 33:787-796.
88. Giffin, W., W. Gong, C. Schild-Poulter, and R. J. Hache. 1999. Ku antigen-DNA conformation determines the activation of DNA-dependent protein kinase and DNA sequence-directed repression of mouse mammary tumor virus transcription. *Mol Cell Biol* 19:4065-4078.
89. Torrance, H., W. Giffin, D. J. Rodda, L. Pope, and R. J. Hache. 1998. Sequence-specific binding of Ku autoantigen to single-stranded DNA. *J Biol Chem* 273:20810-20819.
90. Galande, S. and T. Kohwi-Shigematsu. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences. *J Biol Chem* 274:20521-20528.
91. Tuteja, N., R. Tuteja, A. Ochem, P. Taneja, N. W. Huang, A. Simoncsits, S. Susic, K. Rahman, L. Marusic, J. Chen, and et al. 1994. Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* 13:4991-5001.

92. Tuteja, N., T. N. Phan, R. Tuteja, A. Ochem, and A. Falaschi. 1997. Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 236:636-640.
93. Ochem, A. E., D. Skopac, M. Costa, T. Rabilloud, L. Vuillard, A. Simoncsits, M. Giacca, and A. Falaschi. 1997. Functional properties of the separate subunits of human DNA helicase II/Ku autoantigen. *J Biol Chem* 272:29919-29926.
94. Zhu, P., D. Zhang, D. Chowdhury, D. Martinvalet, D. Keefe, L. Shi, and J. Lieberman. 2006. Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein Ku70. *EMBO Rep* 7:431-437.
95. Kato, M., T. Nonaka, and S. Imajoh-Ohmi. 2005. Cleavage at the carboxyl-terminus of Ku80 during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem (Tokyo)* 137:685-692.
96. Beckman, M. 2004. Going Ku Ku on Bax. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004(11):nf31.
97. Martinez, J. J., S. Seveau, E. Veiga, S. Matsuyama, and P. Cossart. 2005. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell* 123:1013-1023.
98. Dynan, W. S. and S. Yoo. 1998. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 26:1551-1559.
99. Tuteja, R. and N. Tuteja. 2000. Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:1-33.
100. Vahsen, N., C. Cande, P. Dupaigne, F. Giordanetto, R. T. Kroemer, E. Herker, S. Scholz, N. Modjtahedi, F. Madeo, E. Le Cam, and G. Kroemer. 2006. Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene* 25:1763-1774.
101. Le Cam, E., E. Delain, F. Culard, and J. A. Cognet. 2000. DNA -protein interactions - A practical approach. Chapter 24 : DNA-protein complexes analysed by electron microscopy and cryo-microscopy. Edited by Andrew Travers and Malcolm Buckle. Oxford University Press.:337-350.
102. Delain, E. and E. Le Cam. 1995. The spreading of nucleic acids. In *Visualization of nucleic acids*. G. Morel, editor. CRC Press. Boca Raton, FL. 35-56.
103. Le Cam, E., B. Theveny, B. Mignotte, B. Revet, and E. Delain. 1991. Quantitative electron microscopic analysis of DNA-protein interactions. *J Electron Microscop Tech* 18:375-386.
104. Protozanova, E., P. Yakovchuk, and M. D. Frank-Kamenetskii. 2004. Stacked-unstacked equilibrium at the nick site of DNA. *J Mol Biol* 342:775-785.
105. Pang, D., S. Yoo, W. S. Dynan, M. Jung, and A. Dritschilo. 1997. Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res* 57:1412-1415.

106. Pang, D., B. Vidic, J. Rodgers, B. L. Berman, and A. Dritschilo. 1997. Atomic force microscope imaging of DNA and DNA repair proteins: applications in radiobiological research. *Radiat Oncol Investig* 5:163-169.
107. Ristic, D., M. Modesti, R. Kanaar, and C. Wyman. 2003. Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 31:5229-5237.
108. Cary, R. B., S. R. Peterson, J. Wang, D. G. Bear, E. M. Bradbury, and D. J. Chen. 1997. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4267-4272.
109. Blier, P. R., A. J. Griffith, J. Craft, and J. A. Hardin. 1993. Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* 268:7594-7601.
110. Chiu, C. F., T. Y. Lin, and W. G. Chou. 2001. Direct transfer of Ku between DNA molecules with nonhomologous ends. *Mutat Res* 486:185-194.
111. Paillard, S. and F. Strauss. 1991. Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res* 19:5619-5624.
112. Mackintosh, S. G. and K. D. Raney. 2006. DNA unwinding and protein displacement by superfamily 1 and superfamily 2 helicases. *Nucleic Acids Res* 34:4154-4159.
113. Arosio, D., S. Cui, C. Ortega, M. Chovanec, S. Di Marco, G. Baldini, A. Falaschi, and A. Vindigni. 2002. Studies on the mode of Ku interaction with DNA. *J Biol Chem* 277:9741-9748.
114. Arosio, D., S. Costantini, Y. Kong, and A. Vindigni. 2004. Fluorescence anisotropy studies on the Ku-DNA interaction: anion and cation effects. *J Biol Chem* 279:42826-42835.
115. Ma, Y. and M. R. Lieber. 2001. DNA length-dependent cooperative interactions in the binding of Ku to DNA. *Biochemistry* 40:9638-9646.

Conclusion générale.

CONCLUSION GENERALE DE LA THESE

La caractérisation des différentes étapes de la régulation du métabolisme de l'ADN (transcription, réplication réparation, recombinaison) constitue un des grands enjeux de la biologie actuelle. Toutes les disciplines de la biologie (génétique, biologie cellulaire, biochimie, biologie structurale, biophysique) ont contribué et contribuent encore à la connaissance de ces mécanismes. Un des nouveaux enjeux se situe dans le domaine des nanotechnologies et consiste à être en capacité de visualiser les différents événements d'assemblage des protéines sur l'ADN à l'échelle de la molécule unique aux résolutions spatiales et temporelles compatibles avec les échelles de la cellule et plus particulièrement du noyau.

Cela nécessite de développer de nouvelles approches d'imagerie combinant résolution temporelle et résolution spatiale. Si la microscopie électronique à transmission (MET) permet d'obtenir des résolutions nanométriques depuis de nombreuses années, elle ne donne pas accès aux résolutions temporelles que nécessitent les études sur les machineries nucléoprotéiques combinant des protéines de structure et des moteurs moléculaires de types hélicases, topoisomérases ou polymérases. La microscopie à force atomique (AFM) offre potentiellement cette possibilité de combiner les résolutions spatiales et temporelles à l'échelle de la molécule unique. C'est un outil polyvalent de mesure de force et d'imagerie actuellement en plein essor ; il permet de travailler sous vide ou à l'air mais également en milieu liquide, ce qui est particulièrement adapté à l'étude d'objets biologiques comme l'ADN et les protéines.

L'étude de l'ADN et des complexes ADN-protéines par AFM ouvre des perspectives intéressantes pour la compréhension de la structuration de l'ADN et de la régulation de son métabolisme par les protéines. L'analyse structurale à une résolution nanométrique combinée à l'analyse dynamique en milieu liquide, à des échelles de temps courts, sur des molécules individuelles, doit permettre une caractérisation particulièrement fine. Le projet de ma thèse s'intégrait dans le projet du Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire de l'Institut Gustave Roussy de mettre en place une méthodologie permettant ce type d'analyses. L'étude des propriétés conformationnelles de l'ADN et la caractérisation de complexe ADN protéine nécessite :

- de contrôler l'adsorption des molécules sur une surface afin de rendre possible l'imagerie en AFM mais aussi de rendre l'ADN accessible à la protéine
- d'être capable d'étudier ces complexes en milieu liquide sous flux sans trop perturber l'imagerie et sans modifier les équilibres d'interactions ADN-protéine
- de balayer suffisamment rapidement pour se rapprocher des constantes d'équilibre des complexes ADN-protéine.

Ainsi ce travail nécessitait de développer des méthodologies contrôlant l'adsorption des molécules d'ADN par l'utilisation de plots et par ailleurs de développer des projets relatifs à l'instrumentation. Mon travail de thèse a pris en compte ces différents aspects en initiant une collaboration avec la société Veeco Instruments aux Etats-Unis pour l'instrumentation et en développant les approches méthodologiques au laboratoire. La première partie n'a pas pu se réaliser en raison de changements d'orientation internes à l'entreprise, j'ai donc consacré l'ensemble de mon travail à la partie méthodologique qui de toute façon restait un prérequis pour ces études. L'obtention et la validation d'informations biologiques nouvelles à partir des données AFM passe en effet préalablement par une analyse et une optimisation rigoureuses des conditions de préparation et d'observation des échantillons.

Pour l'étude des complexes nucléoprotéiques, la première exigence est la compréhension des interactions entre les molécules et la surface utilisée pour les déposer.

Ainsi nous avons d'abord repris la problématique de l'adsorption et de l'étalement de l'ADN sur les surfaces de mica. La méthode dite des cations divalents a été retenue pour adsorber l'ADN sur le mica car elle est plus favorable que les fonctionnalisations chimiques de surface pour obtenir un bon étalement des molécules, et pour travailler dans des conditions d'interactions ADN-surface variées. A l'aide de modèles simples des interactions ADN-mica médiées par les cations nous avons proposé une explication de l'adsorption de l'ADN sur le mica. A courte distance, la force d'attraction due aux corrélations entre les cations divalents est capable de vaincre la force de répulsion due aux doubles couches électriques. La force d'adsorption varie alors en fonction de la densité relative en cations divalents sur la surface, qui dépend du rapport [divalents]/[monovalents]². Dans ce modèle le prétraitement du mica par des cations divalents capables de s'y fixer comme les ions Ni²⁺ améliore l'adsorption en diminuant la composante répulsive à très courte distance et en apportant une contribution attractive à courte distance. Les données expérimentales d'AFM obtenues à l'air ou en milieu liquide sont cohérentes avec le modèle proposé. Le référentiel de conditions ainsi établi est essentiel pour étudier les complexes nucléoprotéiques dans des conditions d'adsorption variées et pour satisfaire un compromis entre accroche de l'ADN sur la surface et disponibilité pour interagir avec des ligands comme par exemple les protéines.

Il est nécessaire de maintenir l'ADN accroché et étendu sur la surface indépendamment des conditions ioniques pour pouvoir étudier le comportement des protéines le long de l'ADN en milieu liquide. Nous avons donc travaillé à la mise au point d'un système d'ancrage de l'ADN par ses extrémités entre des plots suffisamment distants pour obtenir des molécules tendues.

Six systèmes de plots différents ont été testés par rapport à l'adsorption et la désorption des plots seuls ou complexés à l'ADN, sur mica non prétraité ou prétraité par des ions nickel. Parmi les systèmes nécessitant une seule étape de couplage entre les extrémités et les plots d'ADN qui ont été testés (streptavidine, streptavidine-peroxydase, anticorps IgG anti-digoxigénine) aucun ne reste accroché à la surface après passage à haute concentration en sel monovalent, dans la gamme de conditions d'adsorption testées. L'utilisation de plots d'ADN simple brin de plusieurs centaines de nucléotides restreint considérablement la mobilité des extrémités de l'ADN double brin sur la surface mais n'empêche pas non plus ce décrochage. Avec l'utilisation d'étiquettes histidine s'est posé le problème d'interactions non spécifiques fortes entre la surface de mica prétraité nickel puis histidine et l'ADN et de la reproductibilité des propriétés de ces surfaces. Le système retenu comme le plus favorable est la BSA biotinylée. Nous avons montré que son accroche sur le mica est assez robuste par rapport aux changements de conditions ioniques et nous avons établi une méthode pour former les complexes avec les extrémités d'ADN avec un assez bon rendement. L'observation en milieu liquide pose cependant encore des problèmes, et il faudra aussi trouver des moyens de contrôler la distance entre les deux plots de BSA sur la surface. Il sera important de développer l'utilisation de BSA monobiotinylée pour simplifier la mise en œuvre de cette stratégie.

En parallèle de la maîtrise de l'adsorption et de l'ancrage de l'ADN, l'accessibilité de l'ADN vis-à-vis des ligands sur la surface doit être caractérisée.

L'étude des interactions ADN-bléomycine a été un bon moyen d'aborder la problématique de l'influence de la surface sur les interactions ADN-ligand. Nous avons mis au point et validé une méthode pour quantifier le nombre moyen de coupures des molécules d'ADN par la bléomycine. Cette méthode a ensuite permis de montrer que l'efficacité de coupure de l'ADN varie différemment avec les paramètres expérimentaux selon que les molécules d'ADN sont en solution ou sont adsorbées sur le mica. Une explication des résultats à l'aide d'un modèle électrostatique des interactions cations-surface a été proposée. Cette étude souligne l'importance de prendre en compte l'influence de la surface dans l'étude

des interactions ADN-ligands et de caractériser quantitativement les effets, pour cerner des conditions expérimentales affectant le moins possible les équilibres de liaison ADN-ligands.

J'ai pu confronter les problématiques d'adsorption à l'étude d'un système biologique : l'étude de la reconnaissance des cassures double brin par la protéine Ku. C'est essentiellement la MET, méthode de référence au laboratoire, qui a été utilisée pour étudier la reconnaissance de l'ADN par Ku en fonction de la nature et de l'état du substrat ADN (double brin, linéaire, circulaire, relâché, surenroulé, simple brin, *gaps*, *nicks*...). En effet l'utilisation de l'AFM en milieu liquide pour caractériser ce système est compliquée par la forte interaction de Ku avec la surface de mica quelles que soient les conditions d'adsorption de l'ADN. Notre étude préliminaire en AFM à l'air et approfondie en MET a permis de définir les conditions d'oligomérisation de Ku le long de l'ADN double brin. Nos données indiquent que Ku entre et sort de l'ADN par les extrémités double brin libres ; la coopérativité de la couverture de l'ADN indique en outre l'existence d'interactions Ku-Ku qui restent actuellement à identifier. Ce travail a aussi démontré l'existence d'une forte interaction de Ku avec l'ADN simple brin, indépendante de la présence d'extrémités libres contrairement à l'interaction avec l'ADN double brin. Ces différents modes d'interaction en fonction de l'état de l'ADN fournissent une base moléculaire pour commencer à comprendre comment cette protéine multifonctionnelle peut s'orienter vers différents mécanismes de la vie de l'ADN.

Les avancées notables sur les propriétés d'adsorption de l'ADN sur le mica et les méthodologies mises en place dans cette thèse ouvrent des perspectives pour l'étude d'autres systèmes biologiques. Plusieurs modèles biologiques sont actuellement cadrés et disponibles au laboratoire, sur la réparation de l'ADN ou sur la réplication, et pourront être testés en AFM, dans un contexte d'ADN nu et/ou de chromatine. Du point de vue de l'instrumentation, les principaux points qui restent à améliorer concernent la cellule liquide et le contrôle de l'excitation de la pointe.

Résumé en français.

La microscopie à force atomique (AFM) ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des interactions ADN-protéines. Mon travail a consisté à développer de nouvelles méthodologies pour contrôler l'adsorption de l'ADN sur les surfaces et permettre l'étude en liquide de la dynamique des complexes.

Nous avons caractérisé les interactions entre l'ADN et la surface de mica. Nous proposons un modèle simple pour décrire les interactions électrostatiques en solution entre l'ADN et le mica, en considérant le rôle des cations monovalents et divalents. La bonne corrélation avec les données expérimentales permet de valider un référentiel de conditions et une méthode d'adsorption réversible de l'ADN sur mica prétraité nickel. Nous avons parallèlement développé un système de plots pour ancrer l'ADN par ses extrémités.

Le contrôle de ces méthodologies permet de caractériser l'accessibilité en fonction des états d'adsorption. Nous abordons cette problématique en caractérisant l'activité de la bléomycine sur l'ADN. Cette approche sur un système modèle permet de caractériser l'influence de la surface en termes d'accessibilité et d'activité.

La dernière partie de ce travail considère la caractérisation des interactions de la protéine Ku avec l'ADN dans le cadre de l'étude de la réparation des cassures double brin. Notre approche qui combine les apports de la microscopie électronique à transmission et de l'AFM met en évidence une polymérisation coopérative de Ku sur l'ADN double brin et un mode de fixation très différent sur l'ADN simple brin. Ce travail montre l'intérêt de l'imagerie moléculaire pour caractériser les mécanismes de recherche des sites cibles par les protéines.

Mots clés : AFM, ADN, adsorption, mica, bléomycine, réparation, Ku, interactions ADN-protéines, microscopie électronique

Résumé en anglais.

Atomic Force Microscopy (AFM) opens new perspectives in the study of DNA-protein interactions. My work consisted of developing new methodologies for controlling DNA adsorption on surfaces and enabling the study of the dynamics of the complexes in liquid.

We have characterized the interactions between DNA and the mica surface. We propose a simple model to describe the electrostatic interactions in solution between DNA and mica, considering the role of monovalent and divalent cations. The good correlation with experimental data allows validating referential adsorption conditions and a reversible adsorption method for DNA on nickel-pretreated mica. In parallel we have developed a system of tethers to anchor DNA by its extremities.

The control of these methodologies allows characterizing accessibility in function of the adsorption states. We broach this issue by characterizing bleomycin activity on DNA. This approach on a model system allows characterizing the surface influence in terms of accessibility and activity.

The last part of this work considers the characterization of the interactions of the Ku protein with DNA, in the frame of the study of DNA double-strand break repair. Our approach which combines the contributions of transmission electron microscopy and of AFM shows a cooperative polymerization of Ku along DNA and a very different binding mode on single-stranded DNA. This work shows the interest of molecular imaging for the characterization of target site research mechanisms by proteins.

Keywords : AFM, DNA, adsorption, mica, bleomycin, repair, Ku, DNA-protein interactions, electron microscopy