Conformation, inetraction et organisation des particles coeur de nucleosome

Stephanie Mangenot

▶ **To cite this version:**

Stephanie Mangenot. Conformation, inetraction et organisation des particles coeur de nucleosome. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2001. Français. NNT : . tel-00002115

HAL Id: tel-00002115
https://theses.hal.science/tel-00002115

Submitted on 11 Dec 2002

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.

N° D'ORDRE 6768

UNIVERSITE PARIS XI

UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

Présentée pour obtenir

LE GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Par

Stéphanie MANGENOT

Sujet :

CONFORMATION, INTERACTIONS et ORGANISATION des PARTICULES CŒUR de NUCLEOSOME

Soutenue le 18 décembre 2001 devant la commission d'examen

Mr CHATENAY Didier (Rapporteur)
Mr RADLER Joachim (Rapporteur)
Mr CHARVOLIN Jean (Président)
Mme DURAND Dominique
Mme LIVOLANT Françoise (Directrice)
Mr PRUNELL Ariel
Mr BELLONI Luc (Invité)
Mr PROST Jacques (Invité)

Un grand merci à :

Françoise LIVOLANT sans qui rien de tout ce travail n'aurait pu exister. Merci de m'avoir accueillie dans votre groupe à l'occasion de mon stage de DEA et de m'avoir ainsi fait découvrir durant ces trois années de thèse les richesses de l'interface physique-biologie. Merci pour tous vos conseils et votre attention.

Dominique DURAND qui a grandement contribuée à la réussite de cette thèse et qui m'a initiée aux techniques de rayons X aussi bien de diffusion aux petits angles que de diffraction. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité tout au long de ce travail. J'espère très sincèrement que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble.

tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail, et en particulier à Didier CHATENAY et Joachim RADLER qui ont accepté la lourde tache de rapporteur.

Eric RASPAUD sans qui les études en solutions diluées ne seraient pas. Merci pour toute ton aide et tous tes conseils, et même si ce n'est pas toujours facile de discuter avec toi, j'ai beaucoup appris grâce à nos discussions.

Amélie LEFORESTIER qui a eu la lourde tache d'initier une physicienne aux préparations biochimiques. Nous garderons en mémoire toutes les deux l'agréable odeurs du sang de poulet lors des préparations.

Marta DE FRUTOS. J'ai beaucoup appréciée les quelques occasions que nous avons eu de travailler ensemble. Je te remercie pour toutes les discussions que nous avons pu avoir ainsi que pour ton soutien constant. Espérons que l'occasion de travailler ensemble se représentera…

Monique DA CONCEICAO qui m'a toujours aidée lors des préparations biochimiques et qui m'a toujours soutenue.

Patrice VACHETTE et Javier PEREZ qui nous ont toujours permis de travailler sur la ligne D24 dans les meilleurs conditions, même parfois sans temps de faisceau officiel... Les discussions que nous avons eu ensemble m'ont été très bénéfiques. Merci aussi à Patrice de m'avoir initiée à l'utilisation du programme de modélisation Turbo-Frodo.

Aux groupes de Mr DELOCHE et ALLOUL du laboratoire de physique des solides, qui nous ont permis à plusieurs reprises d'avoir accès à leurs appareils de RMN pour l'alignement crucial de nos échantillons.

Frank ARTZNER qui nous a généreusement donné à deux reprises une partie de son temps de faisceau sur la ligne ID2 de l'ESRF, permettant ainsi la compréhension de certains diagrammes de diffraction.

Laurent KREPLAK qui a permis les calculs théoriques de diffraction des phases denses. Merci de nous avoir aider dans les dernières lignes droites de ce travail !

toute les personnes du rez-de-chaussée de l'aile ouest du LPS (même toi Marc…) qui ont permis une ambiance de travail détendue et conviviale grâce à leur bonne humeur mais aussi à quelques pauses musicales.

toute ma famille et plus particulièrement à mes parents qui m'ont toujours soutenue et qui m'ont permis de poursuivre mes études.

Chapitre I INTRODUCTION 9

Chapitre II RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 15

II.A Chromatine des Eucaryotes 15
II.A.1 La chromatine dans le noyau de la cellule 15
II.A.2 Structure et organisation de la chromatine 17
II.A.2.1 La molécule d'ADN 17
II.A.2.2 Structure nucléosomique périodique 17
II.A.2.3 La particule cœur du nucléosome 19
II.A.3 Organisation et interactions en milieu dense 26
II.A.3.1 Au sein de la chaîne nucléosomique 26
II.A.3.2 Entre particules isolées 28

II.B Objets chargés en solution 40
II.B.1 Introduction 40
II.B.2 Interactions entre particules chargées 40
II.B.2.1 Interactions entre deux ions 40
II.B.2.2 Interaction ions-colloïdes 41
II.B.2.3 Interactions entre particules colloïdales : modèle DLVO 48
II.B.3 Propriétés thermodynamiques 50
II.B.3.1 Equilibre du solvant 50
II.B.3.2 Equilibre ionique 51
II.B.3.3 Théorie de la pression osmotique en solution diluée 53
II.B.4 Propriétés électrophorétiques 55
II.B.4.1 Principe de l'électrophorèse capillaire 55
II.B.4.2 Notion de potentiel zêta 55
II.B.4.3 Relation entre potentiel zêta et mobilité 55

Chapitre III PREPARATIONS BIOCHIMIQUES ET OUTILS PHYSIQUES 61

III.A Matériel 61
III.A.1 Préparation biochimique des particules cœur de nucléosome 61
III.A.2 Caractérisation des solutions de particules cœurs de nucléosomes 63
III.A.2.1 Stabilité des particules 64
III.A.2.2 Longueur de l'ADN associé aux NCP 64
III.A.2.3 Composition en histones 65
III.A.3 Différents lots de NCP utilisés 66

III.B Méthodes expérimentales 72
III.B.1 Osmométrie 72
III.B.1.1 Techniques et montages expérimentaux utilisés 72
III.B.1.2 Préparation des échantillons 76
III.B.2 Mobilité électrophorétique 76
III.B.2.1 Electrophorèse capillaire: principe de la mesure 76
III.B.2.2 Techniques et montages expérimentaux 77
III.B.2.3 Préparation des échantillons 78
III.B.3 Diffusion et diffraction des rayons X 78
III.B.3.1 Rappels théoriques 78
III.B.3.2 Montages expérimentaux et acquisitions de données: 87
III.B.3.3 Traitement des données 89

III.B.3.4 Préparation des échantillons 89

Chapitre IV ETUDE DES MILIEUX DENSES 95

IV.A Caractéristiques des expériences de rayons X 96
IV.A.1 Les différentes lignes de synchrotron utilisées 96
IV.A.2 Alignement sous champ magnétique 96
IV.A.3 Méthodes d'analyse des diagrammes de rayons X 97
IV.A.3.1 Cas du cristal à 3D 98
IV.A.3.2 Cas d'une organisation à 2D 99
IV.A.3.3 Cas des bicouches lamellaires 103
IV.A.4 Détermination des concentrations en NCP et des pressions de PEG 104

IV.B Observations à forte concentration saline 105
IV.B.1 Phase cristalline 105
IV.B.2 Influence des paramètres 107
IV.B.2.1 Effet de la pression osmotique 107
IV.B.2.2 Effet du temps d'équilibration 109
IV.B.3 Commentaire sur l'utilisation du champ magnétique 110
IV.B.4 Concentration saline de 100 mM 111

IV.C Observations à faible concentration saline 113
IV.C.1 Phase lamellaire de bicouches 113
IV.C.2 Influence des paramètres 117
IV.C.2.1 Effet de la pression osmotique 117
IV.C.2.2 Effet du temps d'équilibration 118

IV.D Observations pour les concentrations salines intermédiaires 119
IV.D.1 Concentration saline de 50 mM 119
IV.D.1.1 Concentration initiale en particules égale à 225 mg/ml 119
IV.D.1.2 Evolution au cours du temps 122
IV.D.1.3 Concentration initiale en particule égale à 260 mg/ml 122
IV.D.2 Concentration saline intermédiaire (37 mM) 124
IV.D.2.1 Pression osmotique de $4,7.10^5$ Pa et concentration initiale de 225 mg/ml 125
IV.D.2.2 Influence des paramètres 129

IV.E Transition vers les phases denses : existence d'une phase non ordonnée de colonnes ? 133

IV.F Discussion 136
IV.F.1 Phase hexagonale 139
IV.F.2 Phase lamellaire de bicouches 143
IV.F.3 Effet du PEG 145
IV.F.4 Intérêt et pertinence biologique 146

Chapitre V ETUDES DES SOLUTIONS DILUEES 151

V.A Etude de la conformation des NCP et de leurs interactions : approche par SAXS 151
V.A.1 Résultats expérimentaux 151
V.A.1.1 NCP_{165} 151
V.A.1.2 NCP_{145} 156
V.A.2 Discussion 161

V.A.2.1 Interactions entre particules *161*
V.A.2.2 Changements de conformation *164*
V.A.2.3 Corrélations entre dépliement des queues et interactions *170*

V.B Etude des interactions entre NCP par osmométrie **171**
V.B.1 Résultats obtenus avec l'osmomètre à membrane ***171***
V.B.2 Mesures de mobilité électrophorétique ***174***
V.B.3 Comparaison avec les modèles théoriques ***176***
V.B.3.1 Propriété dynamique : la mobilité *176*
V.B.3.2 Propriété statique : étude des interactions. *178*

V.C Origine de l'augmentation des répulsions avec la concentration saline **182**
V.C.1 Dissociation partielle des complexes ADN-histones ? ***182***
V.C.2 Forces d'hydratation ? ***183***
V.C.3 Interaction de pontage ? ***184***

Chapitre VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES **193**

Chapitre VII ANNEXE **201**

VII.A Code lettre des vingt acides aminés **201**

VII.B Résultats préliminaires de pression osmotique **202**

VII.C Méthodes de préparation biochimique des NCP **204**
VII.C.1 Préparation à partir de thymus de veau ***204***
VII.C.1.1 Préparation des noyaux *204*
VII.C.1.2 Préparation de la chromatine *204*
VII.C.1.3 Extraction des protéines H1 ..... *205*
VII.C.1.4 Préparation de la fraction nucléosomes *206*
VII.C.1.5 Purification par filtration sur gel de Sephacryl S 300 ..... *207*
VII.C.2 Préparation à partir de sang de poulet ***208***
VII.C.2.1 Collecte du sang *208*
VII.C.2.2 Préparation des noyaux *208*
VII.C.2.3 Préparation de la chromatine longue *209*
VII.C.2.4 Elimination des histones H1 ..... *209*
VII.C.2.5 Préparation de la fraction "Nucléosomes" *210*

VII.D Techniques d'électrophorèse **211**
VII.D.1 Electrophorèse retard ***211***
VII.D.2 Electrophorèse de l'ADN ***212***
VII.D.2.1 Extraction de l'ADN *212*
VII.D.2.2 Gel de polyacrylamide *212*
VII.D.3 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes ***213***

Chapitre VIII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **217**

LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

a	rayon des particules considérées comme des sphères
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
A_2	second coefficient du viriel (en $Å^3$/particule)
A_2^M	second coefficient du viriel (en ml.mol.g^{-2})
BET	bromure d'ethidium
β	énergie thermique
βME	β-mercapto éthanol
χ	compressibilité osmotique de la solution
C	concentration en particules
C_{NCP}	concentration des particules cœur de nucléosome
C_s	concentration en sel monovalent ajoutés
C_{tot}	concentration ionique totale
d	densité du solvant
D_{max}	extension maximale des particules
e	charge d'un électron
ε	constante diélectrique du milieu
ε_0	permittivité du vide
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétic acid
EGTA	Ethylène Gycol-bis (β-amino ethyl ether) Tétra-Acétic acid
φ(r)	potentiel électrostatique réduit
ϕ	fraction volumique de la solution
F(q)	facteur de forme des particules
g	constante de gravitation
g(r)	fonction de distribution de paire
I	force ionique
I(q)	intensité diffusée/diffractée
I(0)	intensité diffusée extrapolée à q=0
k	constante de Boltzmann
κ^{-1}	longueur d'écrantage de Debye-Hückel
L_B	longueur de Bjerrum
L_n	longueur moyenne d'ADN en nombre
L_w	longueur moyenne d'ADN en poids
M	masse des particules
M_{NCP}	masse molaire des particules cœur de nucléosome
N_A	nombre d'Avogadro
NCP	particule cœur de nucléosome
Π	pression osmotique
pb	paire de base
P	Pression

PEG	polyéthylène glycol
P(r)	fonction de distribution des distances
μ	mobilité électrophorétique apparente
$\mu_{e.o.}$	mobilité électro-osmotique
μ_{NCP}	mobilité électrophorétique des NCP
PM	poids moléculaire des particules
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluorure
q	vecteur de diffusion ($Å^{-1}$)
ρ	densité de particules
R_g	rayon de giration des particules
SDS	sodium dodécyl sulfate
S(q)	facteur de structure
T	température du système (en kelvin)
TE	tampon Tris 10 mM + 1 mM EDTA
V_c	volume de la maille élémentaire
V(r)	potentiel d'interaction entre particules
$\psi(r)$	potentiel électrostatique
ψ_s	potentiel électrostatique à la surface des colloïdes
ζ	potentiel zêta
Z_{eff}	charge effective des particules
Z_{str}	charge structurale des particules
Z_ζ	charge effective déduite des valeurs de ζ

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Chapitre I INTRODUCTION

Dans les cellules des organismes eucaryotes, l'ADN est associé à diverses protéines pour former la chromatine qui est condensée dans le volume du noyau cellulaire. Chaque molécule d'ADN, longue de 1 à 10 cm, est confinée au sein d'un territoire chromosomique dont les dimensions sont typiquement de l'ordre de 1 µm. Chaque molécule d'ADN est associée à des protéines basiques, les histones, pour former une structure périodique dont l'unité répétitive est le nucléosome. De nombreux auteurs suspectent que cette chaîne nucléosomique est condensée en une fibre plus dense, de 30 nm de diamètre, qui serait elle-même condensée en une structure d'ordre supérieur. Cependant, de nombreuses questions restent posées, tant sur l'organisation de la chromatine que sur les transitions structurales qui sont impliquées dans les mécanismes de régulation des propriétés fonctionnelles du matériel génétique. On ignore par exemple si cette fibre de 30 nm, que l'on observe en solution, existe dans le noyau cellulaire. On ignore également beaucoup de détails sur la manière dont se réalisent les transitions structurales requises pour permettre l'accessibilité de l'ADN aux enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques.

Si les approches de biologie cellulaire prennent en compte la cellule et le noyau cellulaire dans son ensemble, les études réalisées *in vitro* sur l'ADN et la chromatine sont le plus souvent réalisées en solution diluée, négligeant le fait que le milieu nucléaire est un milieu dense où les concentrations en ADN varient de 50 à 250 mg/ml environ. L'approche choisie par l'équipe dans laquelle j'ai fait ma thèse consiste au contraire à prendre en compte ce caractère de milieu dense, quitte à perdre certaines autres caractéristiques de la chromatine. C'est ainsi qu'a été entreprise dans l'équipe l'étude d'un système modèle de la chromatine, constitué par des solutions de nucléosomes isolés, préparés biochimiquement à partir de chromatine native. Ce système permet d'explorer des gammes de concentrations très larges, et de faire varier de manière contrôlée les conditions ioniques du milieu, qui comme nous le verrons plus loin, sont un paramètre essentiel à prendre en compte pour étudier l'organisation supramoléculaire de la chromatine. S'il est bien évident que l'organisation des particules cœur de nucléosome (noté NCP pour nucleosome core particle en anglais) dans ces systèmes modèles ne pourra en aucun cas être considérée comme celle qui existe au sein de la chromatine, on a tout lieu de penser que les interactions entre NCP isolés sont une bonne indication de la manière dont les nucléosomes sont susceptibles d'interagir au sein de la

chromatine. En effet, d'une part les conditions de concentration dans lesquelles se forment ces phases denses sont proches de celles du milieu cellulaire et d'autre part la manière dont se positionnent les NCP traduit l'existence d'interactions favorables du point de vue énergétique, conditions qui ont des chances d'être également favorisées au sein de la chromatine.

En présence de sels monovalents, deux phases ordonnées, cristallines liquides, avaient été observées dans des gammes de concentration correspondant à celles du milieu cellulaire : une phase lamellaire à faible sel et une phase colonnaire hexagonale à concentration saline élevée.

Le problème qui m'a été posé lorsque j'ai commencé ma thèse était d'explorer plus largement les possibilités d'organisation supramoléculaire des particules cœur de nucléosomes, et d'élucider les causes de ce polymorphisme.

Dans un premier temps, j'ai cherché à caractériser les phases précédemment observées en microscopie, puis exploré plus largement le diagramme de phase en faisant varier deux paramètres, la concentration en particules et la concentration en sels monovalents. Cette étude a été réalisée par diffraction des rayons X, afin de suivre l'évolution des paramètres structuraux dans chacune des phases. Les résultats obtenus font l'objet du Chapitre IV. Comme nous le discuterons à la fin de ce chapitre, cette exploration des multiples possibilités d'organisation supramoléculaire des particules cœur de nucléosomes constitue un travail de longue haleine, et de nombreuses questions restent encore en suspens.

Pour déterminer les causes du polymorphisme observé, nous avons envisagé deux hypothèses: (i) l'existence de changements conformationnels des particules et (ii) des changements dans leurs interactions. Les méthodes de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont permis d'explorer simultanément ces deux voies, en solution très diluée. Une autre approche, par osmométrie, a également été adoptée dans l'idée d'explorer de larges gammes de concentration en particules. Nous avons mis en évidence l'existence de très faibles changements dans la conformation des particules cœur de nucléosomes. Nous montrerons comment ces changements conformationnels sont couplés aux changements dans les interactions entre particules et nous proposerons en conclusion de ce chapitre un modèle rendant compte des observations expérimentales.

Dans la conclusion, je discuterai brièvement dans quelle mesure les phénomènes décrits en solution diluée pourraient jouer un rôle dans l'organisation supramoléculaire des phases denses, en soulignant les écueils qui doivent être évités quand on cherche à relier des

informations obtenues en milieu dense et en solution diluée. J'essaierai également de replacer mes résultats dans le contexte des questions qui se posent actuellement en biologie.

Mais je vais tout d'abord introduire ce travail par une présentation de la chromatine et des nucléosomes puis faire le point des connaissances actuelles sur le comportement des particules chargées en solution.

CHAPITRE II

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre II RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

II.A Chromatine des Eucaryotes

II.A.1 La chromatine dans le noyau de la cellule

Chez tous les eucaryotes, la chromatine est localisée dans le noyau qui occupe environ 10% du volume de la cellule et est limité par l'enveloppe nucléaire. Chaque chaîne d'ADN est localisée au sein d'un territoire chromosomique. On parle également de chromosome interphasique. Compte tenu de la longueur de la chaîne d'ADN, du volume dans lequel elle est confinée et de la présence d'autres espèces moléculaires, notamment des protéines qui lui sont associées, l'ADN se trouve dans des conditions de très fort encombrement macromoléculaire (Minton, 1981 ; Zimmerman et Minton, 1993). La concentration de chacune des espèces moléculaires présentes peut ainsi être localement très différente de leur concentration moyenne. Dans le cas de l'ADN, dont la concentration moyenne est de l'ordre de 50 mg/ml au sein du noyau à l'interphase, on sait maintenant que chaque chromosome interphasique est compartimenté en domaines présentant différents degrés de compaction (revue dans Cremer et Cremer, 2001). On estime que sa concentration locale est comprise entre 50 à 250 mg/ml (5 à 25%). C'est dans tous les cas, un milieu très dense et c'est dans ces conditions que l'ADN est dupliqué et transcrit à l'aide d'une machinerie enzymatique sophistiquée. Pour cela, l'accessibilité de la molécule d'ADN doit être assurée le moment venu. La chromatine subit donc des transitions conformationnelles, qui mettent en jeu toute une série de facteurs qui remodèlent la chromatine. Parmi ces facteurs, des protéines enzymatiques, comme les acétyltransférases et déacétylases semblent jouer un rôle prédominant, en modifiant les charges portées par certaines protéines associées à l'ADN. Nous reviendrons plus en détail sur le fonctionnement de la chromatine dans la discussion de ce mémoire.

Les conditions d'encombrement macromoléculaire jouent également sur les concentrations ioniques au sein du noyau mais on dispose malheureusement de très peu de données sur la distribution de ces ions, sur leurs concentrations locales et sur les variations de leurs concentrations. Les données disponibles sont en effet des moyennes et varient significativement selon les organismes, le tissu considéré, ou le milieu intra ou extracellulaire. Le Tableau II-1 résume les données disponibles sur ce sujet (Bloomfield, 1996).

IONS	Plasma sanguin humain	Muscle squelettique	Cellule animale de culture	Cytoplasme de E. coli
Cations				
Na^+	150	14		290-930
K^+	5	150		23
Mg^{2+}	0,9	8		
Ca^{2+}	2,5	1		
Putrescine (2+)			0,25-2,5	
Spermidine (3+)			1-2	21
Spermine (4+)			1-2	6
Anions				
Cl^-	105	16		Faible
HCO^{3-}	27	10		
Glutamate				30-260
Protéines	17	50		
Autres	6	146		

Tableau II-1 : Concentrations ioniques de différents tissus ou cellules (exprimés en mM).

Le problème majeur de ces données est que l'on ne sait pas si elles tiennent compte de tous les ions présents dans les tissus, ou seulement des ions libres. En l'absence de données bibliographique précises, la communauté des biologistes, parlant de conditions "physiologiques", entend généralement que les concentrations sont de l'ordre de 150 mM en sel monovalents, environ 10 mM en ions divalents, et quelques millimolaires en ions multivalents, essentiellement des ions 3+ et 4+ (polyamines). Selon les physiologistes, les concentrations en sels monovalents intracellulaires seraient de l'ordre de quelques millimolaires, et les concentrations extracellulaires d'environ 150 mM.

L'effet des ions divalents a été beaucoup étudié, notamment sur l'organisation et le fonctionnement de la chromatine. Nous ne l'aborderons pas ici. Nous avons pris le parti d'étudier l'effet des ions monovalents seuls et utilisé le chlorure de sodium (NaCl) comme modèle. En absence de données réellement fiables, les gammes de concentrations que nous avons explorées se situent dans la fourchette des valeurs que l'on trouve dans la bibliographie, entre 3,5 et 150 mM. Les gammes de concentration en ADN recouvrent celles du milieu cellulaire.

II.A.2 Structure et organisation de la chromatine

II.A.2.1 La molécule d'ADN

La molécule d'ADN est constituée de deux brins complémentaires antiparallèles qui s'enroulent pour former une double hélice droite. Le diamètre de la molécule est de 22 Å et son pas de 34Å. Cette hélice présente deux sillons de largeurs différentes appelés le grand et le petit sillon. La double hélice est stabilisée par les liaisons hydrogènes qui se forment entre bases complémentaires (AT) et (GC) (Figure II-1)

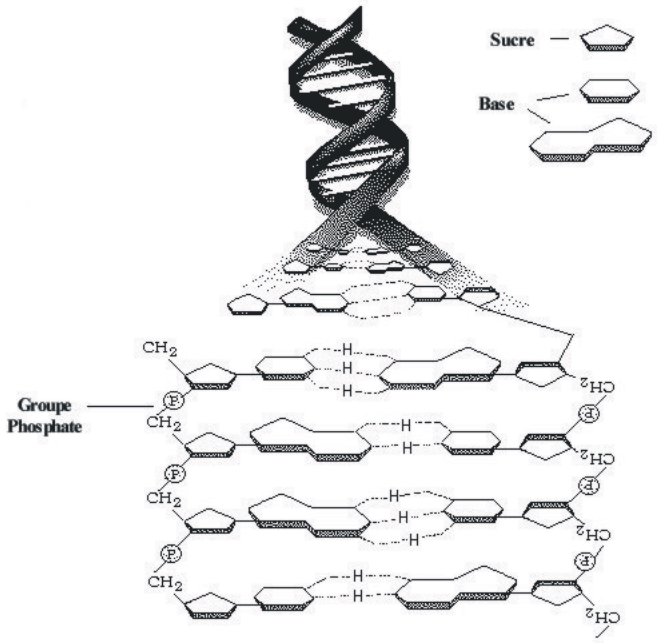


Figure II-1 : Appariement des paires de bases, et formation de la double hélice d'ADN

On peut considérer l'ADN comme un polymère semi-flexible. Chaque phosphate porte une charge négative. La chaîne d'ADN est donc un polyélectrolyte fortement chargé, avec 2 charges tous les 3,4Å. En solution, cette chaîne est entourée de contre-ions qui assurent son électroneutralité.

II.A.2.2 Structure nucléosomique périodique

Cette molécule d'ADN est associée à divers types protéiques et forme une structure périodique qui a été mise en évidence par des expériences de digestion avec la nucléase de microcoque dès les années 70 (Hewish et Burgoyne, 1973; Noll, 1974), la proposition d'une unité répétitive constituée par huit protéines histones (2 exemplaires de chacune des histones

H2A, H2B, H3 et H4) et une longueur d'environ 200 paires de bases d'ADN revenant à Kornberg (1974). Cette structure périodique de la chromatine a ensuite été visualisée par microscopie électronique (Olins et Olins, 1974).

Le nucléosome est l'élément répétitif de la chromatine. Il est constitué d'une longueur d'ADN de 200 paires de bases (pb) environ, enroulée en deux tours complets autour d'un cœur protéique. On associe généralement à cette unité répétitive une protéine de liaison, appelée histone H1 dans la plupart des espèces ou histone H5 chez les oiseaux, mais certains mutants sont dépourvus de cette cinquième histone. Cette histone de liaison n'existe pas non plus chez la levure.

La digestion de la chromatine, dépourvue de l'histone H1, par de la nucléase conduit à l'obtention d'un noyau transitoirement résistant à l'action de l'enzyme et appelé particule cœur de nucléosome. Cette particule de poids moléculaire (PM) 205000 $g.mol^{-1}$, est constituée d'un cœur protéique (PM = $1,09.10^5$ $g.mol^{-1}$) autour duquel est enroulée une longueur d'ADN de 146 pb (PM = $9,6.10^4$ $g.mol^{-1}$). Ces particules cœur de nucléosome sont reliées entre elles par des portions d'ADN nu, appelé ADN de liaison (ou ADN linker), pour former la structure en collier de perle de la chromatine, schématisée sur la Figure II-2. La longueur de l'ADN de liaison varie suivant les espèces, et vaut par exemple 45 pb dans le cas du thymus, 66 pb pour l'érythrocyte de poulet, et peut atteindre 80 pb dans le sperme d'oursin (revue dans Van Holde, 1988).

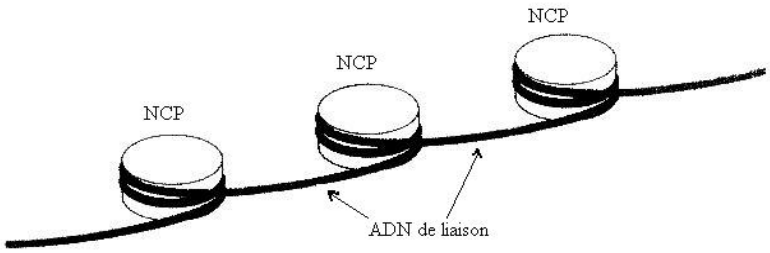


Figure II-2 : Structure en collier de perles de la chromatine. Les particules cœur de nucléosome sont reliées entre elles par des portions d'ADN nu, appelé ADN de liaison (D'après Kornberg et Lorch, 1999).

II.A.2.3 La particule cœur du nucléosome

a) Structure cristallographique

i) Premières structures

Les premières structures obtenues à basse résolution (Finch et al., 1977; Finch et Klug, 1978; Finch et al., 1980; Finch et al. 1981) ont montré que chaque particule cœur de nucléosome a la forme d'un cylindre aplati, légèrement coin de 110Å de diamètre et de 57Å de hauteur. Il est constitué d'un cœur protéique, autour duquel est enroulée en hélice gauche une longueur d'ADN de 146 pb sur un tour trois quart. Le tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ central est entouré de deux dimères H2A-H2B. Chacune des chaînes polypeptidiques présente un motif dit "histone fold" constitué d'un motif central en hélice alpha flanqué des deux côtés par des hélices courtes et des boucles qui interagissent avec l'ADN.

Dans toutes ces premières études, les particules présentent une certaine hétérogénéité qui empêche d'obtenir des cristaux de très bonne qualité. Outre un certain polymorphisme des histones (variants, divers degrés d'acétylation, protéolyse partielle des queues dans certains cas), les séquences d'ADN sont différentes d'un nucléosome à l'autre et leur longueur n'est pas définie à la paire de bases près. Il s'ensuit que la résolution obtenue avec ce matériel n'est pas excellente, et vaut 7Å (Richmond et al., 1984).

ii) Structure haute résolution

- *Construction des NCP*

Afin d'augmenter la résolution expérimentale, les études de cristallographie effectuées après 1988 ont été réalisées sur des cristaux de particules construites spécialement. Le principe consiste à reconstituer des particules à partir de fragments d'ADN de séquence bien définie (séquence palindromique α-satellite du chromosome X humain) et d'octamères d'histones préparées biochimiquement ou produites par génie génétique. Cette opération augmente la symétrie des particules et a donc pour conséquence de limiter tout désordre dans les cristaux. Peu d'études ont jusqu'à ce jour conduit à l'obtention de cristaux diffractant à des hautes résolutions. Nous nous focaliserons sur les trois structures principales dont les cristaux diffractent à des résolutions comprises entre 2,5 et 3,1Å (Lüger et al., 1997, Harp et al., 2000, White et al., 2001). Leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau II-2.

Cristaux	Résolution	Origine des histones	Nombre d'acides aminés résolus sur 982 aa totaux	Molécules H_2O localisées	Ions	Code pdb	Référence
Xla-NCP	2,8Å	H2A, H2B, H3, *Xenopus laevis* (amphibien*)* H4 Homme	**811**	13	6 Mn^{2+}	1aoi	Lüger et al., 1997
P-NCP	2,5Å	Erythrocyte de poulet	**865**	349	15 Mn^{2+} 7 K^{+} 2Cl^{-}	1eqz	Harp et al., 2000
Sce-NCP	3,1Å	*Saccharomyces Cerevisiae* (levure)	**757**	60	17 Mn^{2+}	1id3	White et al., 2001

Tableau II-2 : Caractéristiques principales des trois structures atomiques de NCP.

Suivant les auteurs, différentes histones ont été utilisées : histones d'amphibien et d'homme, d'érythrocytes de poulet et de levure. Ces séquences sont présentées sur la Figure II-3. Le code lettre est celui classiquement utilisé pour les acides aminés, rappelé en annexe dans le paragraphe VII.A. Nous utilisons aussi un code couleur qui différencie les acides aminés neutres (noir), chargés positivement (rouge) et chargés négativement (bleu).

Comme le présente la Figure II-3, les différences entre les trois types d'histones sont mineures. D'un point de vue évolutif, ces protéines sont en effet très conservées. Cependant, quelques différences, principalement localisées dans les parties N et C terminales, doivent être remarquées. Dans notre approche, et comme nous le verrons dans la suite, les différences à retenir sont celles pour lesquelles un acide aminé est remplacé par un autre acide aminé de charge différente. Les quatre histones présentent des parties structurées en hélice α, indiquées par des hélices, et des parties non structurées en hélice alpha, qui représentent environ 30% de la masse des histones, indiquées par des traits continus. Les parties indiquées en pointillés correspondent à des domaines dont les acides aminés n'ont pu être localisés dans les structures atomiques.

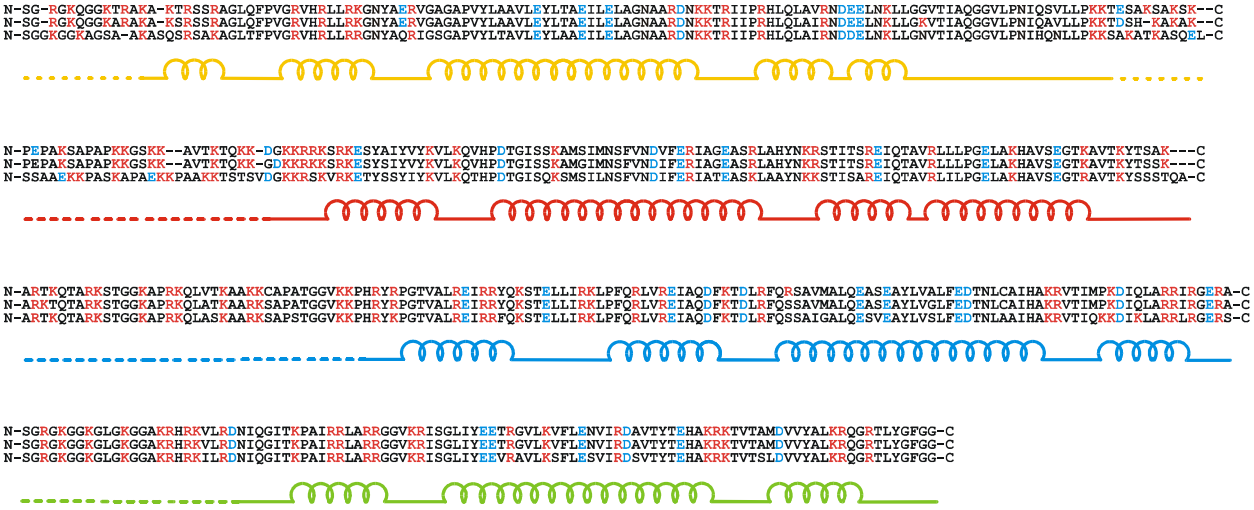


Figure II-3 : Comparaison des séquences d'acides aminés des quatre histones selon leur origine : *Xenopus laevis* (Amphibien) et homme pour H4, érythrocyte de poulet, *Saccharomyces cerevisiae* (levure) correspondant respectivement aux 1er , 2ème et 3ème lignes. Les acides aminés sont colorés en noir, rouge et bleu selon qu'ils sont neutres, chargés positivement ou chargés négativement.

- *Structure de la particule cœur de nucléosome*

Les trois structures présentent des différences mineures sur lesquelles nous reviendrons dans la suite, mais la structure de base des particules est identique. Pour exemple, la structure cristallographique de la particule cœur de nucléosome Xla-NCP à 2,8Å de résolution est présentée sur la Figure II-4 en vues apicale (a) et latérale (b).

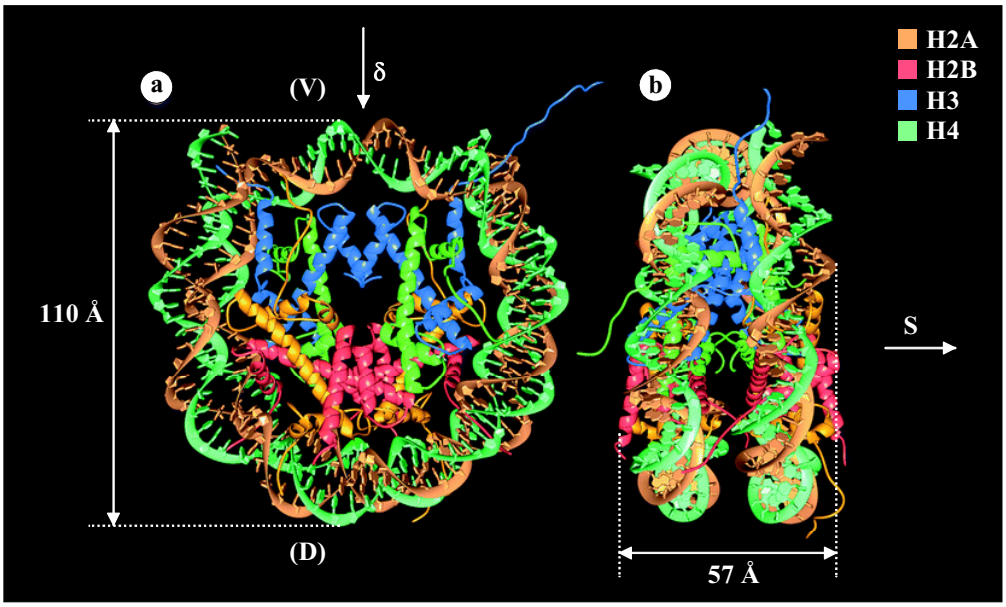


Figure II-4: Structure cristallographique de la particule cœur de nucléosome (Xla-NCP) à 2,8Å de résolution, en vue apicale, le long de l'axe de la superhélice d'ADN (a) et de côté (b) (d'après Lüger et al., 1997). Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont colorées respectivement en jaune, rouge, bleu et vert.

La particule cœur de nucléosome est un cylindre aplati, légèrement coin, de 57Å de hauteur et de 110Å de diamètre. L'ADN, présentant une longueur de 146 pb, est enroulé à la périphérie de la particule en une hélice gauche de pas égal à 28Å. On peut définir un axe S normal aux faces supérieure et inférieure du cylindre, correspondant à l'axe de la superhélice d'ADN. L' axe δ, perpendiculaire à l'axe S, passe exactement par une des paires de bases centrales. Ainsi, la particule n'est pas parfaitement symétrique et l'axe δ est un pseudo axe de symétrie binaire. Il y a d'un côté 72pb, de l'autre 73. L'orientation de l'axe de symétrie binaire définit le côté ventral (V) où se trouvent les extrémités de l'ADN et le côté dorsal (D), à l' opposé. Enfin, les faces supérieure (côté court de l'ADN) et inférieure (côté long de l'ADN) du NCP sont légèrement différentes.

Chacune des protéines de l'octamère est constituée de plusieurs domaines structurés en hélice alpha, séparés par des boucles. Leurs extrémités N et C terminales sont non structurées en hélice alpha. Ces extrémités peuvent sortir du cœur pour s'étendre à l'extérieur de la particule; ce sont les "queues" des histones dont la longueur est très variable. Le Tableau II-3 récapitule le nombre total d'acides aminés de chacune des extrémités non structurées et des queues correspondantes, pour les nucléosomes présentant la structure la mieux résolue (érythrocytes de poulet; Harp et al, 2000).

Extrémités des histones	Nombre d'acides aminés des régions non structurées en hélice α	Nombre d'acides aminés hors du cœur ("queues") (dont aa chargés positivement)
H2A, N	15	2 (1)
H2A, C	12	2 (1)
H2B, N	36	27 (9)
H2B, C	2	0
H3, N	43	28 (10)
H3, C	4	0
H4, N	23	14 (4)
H4, C	9	0

Tableau II-3 : Tableau indiquant le nombre d'acides aminés des extrémités non structurées de chacune des histones et ceux d'entre eux localisés dans les queues. (d'après les données de Harp et al., 2000, obtenues sur des NCP préparés à partir d'histones d'érythrocyte de poulet).

On voit que les queues N terminales sont beaucoup plus longues que les queues C terminales qui ne dépassent pratiquement pas hors de la particule. Les queues N-H2B sur la partie dorsale du NCP, et la queue N-H3 sur la partie ventrale sont particulièrement longues. Les queues N terminales de H4 sortent du NCP au niveau des faces supérieure et inférieure.

b) La particule cœur de nucléosome, un objet fortement chargé

La particule cœur du nucléosome est donc formée par l'association d'un fragment d'ADN fortement chargé négativement et d'un cœur protéique essentiellement basique. Nous allons voir plus en détail comment sont distribuées les charges positives et négatives au sein de la particule puis quelles en sont les conséquences sur la stabilité et les changements conformationnels possibles de la particule.

i) Distribution des charges positives et négatives

On peut dénombrer précisément les charges portées par la particule cœur de nucléosome. Dans le P-NCP pris ici comme exemple, l'octamère d'histones porte 220 acides aminés chargés positivement (lys et arg) (116 localisés au niveau du cœur et 104 sur les extrémités non structurées en hélices α) et 74 acides aminés chargés négativement (asp et glu) (66 dans le cœur et 8 sur les extrémités non structurées). Avec 2 charges négatives par paire de bases, le fragment de 146 pb d'ADN porte quant à lui 292 charges négatives. Le complexe une fois formé, le bilan des charges du NCP est donc fortement négatif (-146). La répartition de ces charges est très inhomogène : les charges négatives sont essentiellement localisées sur la couronne périphérique de la particule, au niveau de l'ADN. Les charges positives sont essentiellement localisées au niveau des extrémités N et C terminales des histones et plus précisément sur les queues puisque environ 1/3 des charges positives sont situées à leur niveau.

Ces queues peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui modifient leurs charges : acétylation (Vogelauer et al, 2000), méthylation (Strahl et al, 1999), phosphorylation (Hsu et al, 2000), ubiquitinisation (Robzyk et al, 2000). La phosphorylation ajoute, de manière covalente, un groupement phosphate aux résidus serine chargés positivement et situés au niveau des queues N et C terminales, inversant la charge de l'acide aminé, qui devient négatif. L'acétylation concerne les acides aminés lysine situés au niveau des queues N terminales des quatre histones, et neutralise leur charge positive par addition d'un groupe

acétate. Ce sont des enzymes, les acétyltranférases qui réalisent cette modification chimique. D'autres enzymes (déacétylases) font l'opération inverse. Cette modification diminue les interactions ADN-histones et provoque l'apparition de structures plus relâchées de la chromatine (Moore et Ausio, 1997) qui semble être corrélée avec l'activité transcriptionnelle de la chromatine (Travers, 1999).

ii) Stabilité de la particule

La stabilité de la particule, et en particulier l'association ADN-histones est assurée par de forts contacts électrostatiques entre le cœur protéique et l'ADN, et dépend de nombreux paramètres environnementaux : concentration saline, concentration en NCP, pH, température. Une synthèse de nombreuses données expérimentales a été réalisée par Yager et al (1989). Le diagramme de stabilité des NCP en fonction de la concentration en sel monovalent et de la concentration en particules, pour une température de 20°C, est présenté sur la Figure II-5.

La région 1 correspond au domaine de stabilité des particules, c'est-à-dire au domaine pour lequel les NCP sont sous leur forme native. Les deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 sont liées de façon stable et compacte à la molécule d'ADN. Pour les concentrations supérieures ou égales à 1mg/ml, cette zone de stabilité s'étend sur une large gamme de concentration saline, variant de quelques millimolaires à 750 mM. Pour les concentrations en NCP inférieures à 1 mg/ml, la concentration saline maximale pour laquelle les particules présentent un état natif, dépend de la concentration en particules.

L'augmentation de la concentration saline, quelle que soit la concentration en particules, provoque la rupture des contacts entre l'ADN et les histones. Dans la région 2, on observe une dissociation entre l'ADN et l'octamère d'histones de certains NCP. Dans la région 3, environ 50% des particules sont dissociées (séparation de l'ADN et de l'octamère d'histone), mais certains dimères H2A-H2B des particules sont également séparés du tétramère H3-H4. Dans la région 4, les particules cœurs de nucléosomes sont complètement dissociées, conduisant à une solution de fragments d'ADN et d'octamère d'histones. Cette dissociation est réversible, à condition de retirer le sel de la solution très lentement. Cette méthode est d'ailleurs très largement utilisée pour permettre la reconstitution de NCP avec des séquences d'ADN désirées (voir par exemple Tatchell et Van Holde 1977, 1979).

Pour les très faibles concentrations salines (région 1E), inférieures à 2 mM, les NCP présentent une forme différente de leur état natif. Les contacts électrostatiques plus faibles

entre le tétramère et les deux dimères conduisent à une nouvelle forme appelée forme "relâchée" ou "étendue" par opposition à la forme compacte de l'état natif. La transition entre l'état natif et la conformation "lâche" est complètement réversible.

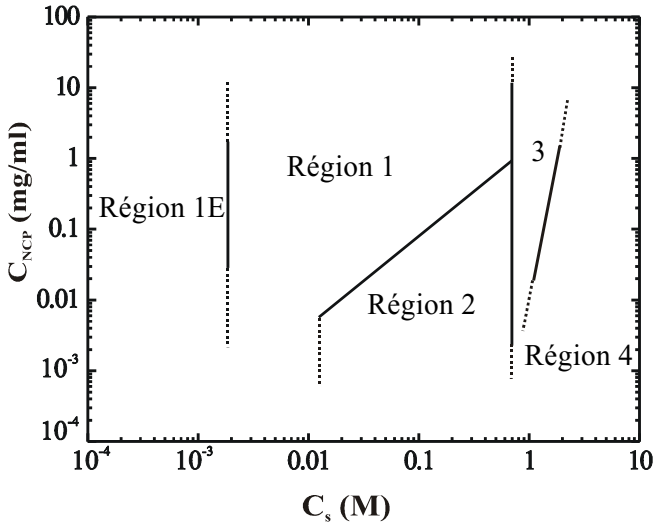


Figure II-5: Diagramme de stabilité des particules cœurs de nucléosomes en fonction de la concentration en sels monovalents C_s et en particules C_{NCP}. Les NCP sont stables dans la région 1. Pour les concentrations salines très faibles, les NCP présentent une forme "relâchée" (région 1E). A fort sel, on observe une dissociation de l'ADN et de l'octamère d'histone (régions 2, 3 et 4).

Les modulations des interactions entre l'ADN et les histones ont été prédites théoriquement en utilisant des considérations électrostatiques (Kunze et Netz, 2000).

Toutes les expériences réalisées dans ce travail ont été effectuées dans la région 1, correspondant à la zone de stabilité des particules.

iii) Changements conformationnels du NCP

Néanmoins, dans cette région de stabilité des particules, on note certaines modifications de la conformation des NCP en fonction de la concentration saline :

- une mobilité des extensions protéiques, prédite par Clark et Kimura (1990) du fait de la distribution des charges à la surface de la particule. Comme l'ont montré les expériences de RMN, les queues des histones sont collées sur l'ADN à 0,2M et libres de s'en écarter à 0,6M (Cary et al, 1978; Walker 1984; Hilliard et al, 1986; Smith et Rill, 1989). Plus récemment, on a montré que les queues N terminales des histones H3 et H4, sont structurées en hélices alpha

quand elles interagissent avec l'ADN et non structurées quand elles sont étendues (Baneres et al, 1997).

- des changements réversibles de la conformation du NCP, mis en évidence par des mesures de dichroïsme circulaire (Ausio et van Holde, 1986), de diffusion des rayons X aux petits angles (Greulich, 1985), par microscopie électronique (Czarnota et Ottensmeyer, 1996) ou par spectroscopie de fluorescence (Khrapunov et al, 1997). On a suspecté que l'extension des queues était responsable de ces changements conformationnels mais leur élimination partielle ou totale par digestion enzymatique ne montre pas de changements notables de la stabilité du cœur (Ausio, 1989)

- un relâchement des interactions entre l'ADN et le cœur protéique qui a été mis en évidence par des mesures de dichroïsme circulaire et par des tests de digestion à la DNAse (Ausio et Van Holde, 1986). Ceci a été confirmé plus récemment pour l'histone H2B par Ballestar et Franco (1997) qui ont suivi l'accessibilité de certains acides aminés en fonction de la concentration saline.

Malgré l'intérêt porté à ces questions, on ne dispose toujours pas d'une description précise des changements de conformation des NCP induits par variation de la concentration saline. La difficulté provient de l'hétérogénéité des échantillons utilisés (particules cœur isolées présentant différentes longueurs d'ADN associé) et des différences dans les conditions expérimentales de température et de concentration. Les méthodes expérimentales sont également très diverses. Enfin, les gammes de concentration saline ne sont pas toujours explorées en détail, ce qui fait que plusieurs effets peuvent quelquefois se superposer.

II.A.3 Organisation et interactions en milieu dense

II.A.3.1 Au sein de la chaîne nucléosomique

De part ses propriétés de polyélectrolyte, la chromatine est extrêmement sensible à son environnement aqueux et ionique. On dispose de données assez précises sur le comportement de la chromatine *in vitro* lorsque l'on fait varier la nature et la concentration des ions mono et multivalents. L'ensemble des observations microscopiques et cristallographiques réalisées après extraction de la chromatine dans différentes conditions ioniques sont résumées sous la forme d'un diagramme de phase. Nous les avons reprises et illustrées dans la Figure II-6 (Widom, 1986).

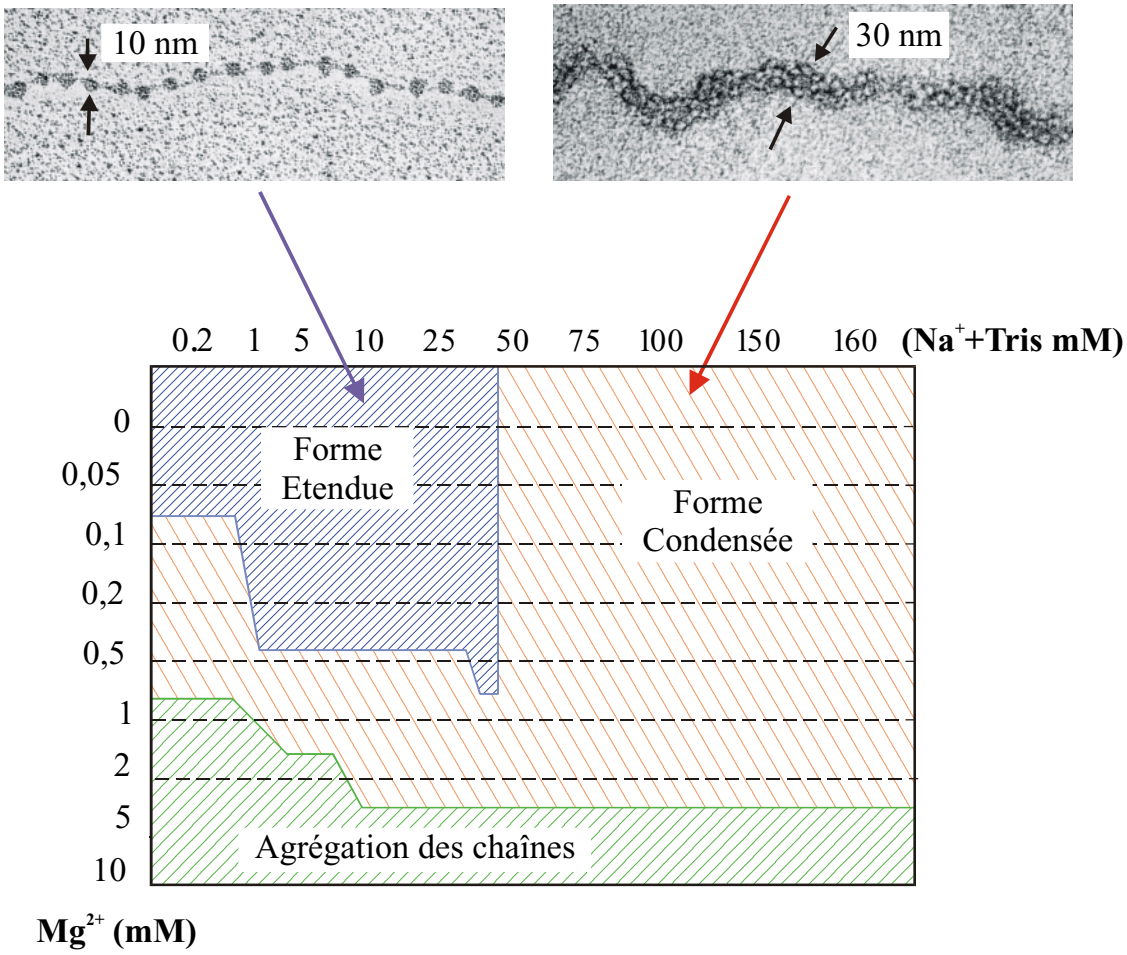


Figure II-6 : Comportement des chaînes nucléosomiques avec leurs histones H1 associées , lorsque les concentrations en sels monovalents et divalents varient respectivement de 0,2 à 160 mM et de 0 à 10 mM. On observe soit la forme étendue (fibre de 10 nm), soit la forme condensée (fibre de 30 nm), soit des formes agrégées (d'après Widom, 1986).

En présence uniquement d'ions monovalents, la chaîne nucléosomique, avec ses histones H1 associées, présente une transition réversible entre une forme étendue (fibre de 10 nm) et une forme condensée (fibre de 30 nm). La même transition est observée à faible concentration en sels monovalents lorsque l'on ajoute des ions divalents en faible concentration. Pour les concentrations plus élevées en ions divalents, les chaînes s'agrègent entre elles.

L'absence d'histones H1 n'empêche pas la condensation de la chaîne en présence d'ions monovalents (Moore et Ausio, 1997). Par contre, la présence des queues des histones est absolument indispensable pour observer cette transition. Si elles sont présentes mais hyperacétylées, la transition n'est pas non plus observée (Garcia-Ramirez et al, 1995). Toutes les queues ne jouent pas le même rôle dans la condensation de la fibre. La présence des queues du tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ est en effet absolument indispensable, contrairement aux queues des dimères H2A-H2B qui jouent un rôle mineur dans ce processus (Moore et Ausio,

1997; revue dans Widom 1998). En conclusion, le repliement de la fibre semble impliquer de nombreux paramètres, mais tous ont en commun de mettre en jeu des effets électrostatiques.

Nous ne rentrerons pas ici dans les différents modèles proposés pour l'organisation de la fibre de 30 nm. La plupart de ces modèles présentent une structure très régulière mais on s'oriente maintenant vers une structure plus dynamique de la fibre (Van Holde et Zlatanova, 1995). De plus, dans la plupart des types cellulaires, l'existence de cette fibre de 30 nm n'est pas établie.

Récemment des mesures de force réalisées sur des chaînes uniques de chromatine (avec H1) ont mesuré qu'une force de 5 à 6 pN permet d'étendre la fibre de 30 nm (Cui et Bustamante, 2000). Cette transition est interprétée comme la force requise pour rompre les interactions attractives entre nucléosomes. Cependant, dans ce modèle expérimental, on ne peut séparer les interactions entre NCP de l'effet de l'ADN de liaison et de l'effet des histones H1.

II.A.3.2 Entre particules isolées

Il n'existe aucun travail qui se soit vraiment focalisé sur l'étude des interactions entre particules cœur de nucléosome isolées. Cependant, on peut apprendre beaucoup sur les interactions entre ces particules quand on regarde comment les NCP se positionnent les uns par rapport aux autres quand on les contraint à se rapprocher au sein d'une solution concentrée ou d'un cristal.

a) organisation dans les cristaux

Nous avons précédemment expliqué que les cristaux de NCP ont permis de résoudre la structure atomique de la particule. Dans ce paragraphe, nous allons considérer ces mêmes études, mais en nous intéressant à l'organisation entre NCP au sein du cristal.

♦ Les NCP intacts préparés à partir de chromatine native forment des cristaux orthorhombiques de groupe d'espace $P2_12_12_1$ (Finch et al. 1980, 1981; Richmond et al. 1984; Struck et al. 1992). Dans le plan défini par les axes cristallographiques a et b, les particules présentent une organisation pseudo-hexagonale (Figure II-7). Les particules forment un réseau

rectangulaire de côtés a et b, avec b très peu différent de a√3. Le paramètre c correspond à la périodicité le long de l'axe c, perpendiculaire au plan défini par les axes a et b.

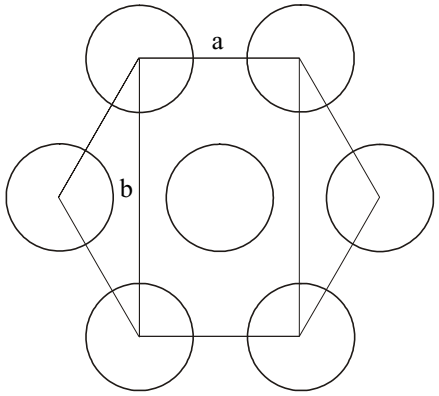


Figure II-7: Organisation orthorhombique quasi-hexagonale dans les plans définis par les axes cristallographiques (a,b).

Les paramètres a et c varient très peu. Par contre, le paramètre b est sensible aux conditions de préparation des cristaux, notamment aux effets de déshydratation provoqués par l'addition d'alcool (1,6 hexanediol) dans la solution. Le long de l'axe c, l'unité répétitive correspond à deux NCP. La maille orthorhombique contient ainsi 4 NCP. Nous ne retiendrons ici que le cas de cristaux hydratés.

Ces plans s'empilent les uns au-dessus des autres, les particules des plans successifs formant ainsi des "colonnes" le long de l'axe c. Le terme colonne est utilisé dans un sens très large puisque les NCP sont décalés d'une vingtaine d'angström de part et d'autre de l'axe de la colonne.

Les valeurs des paramètres a, b et c obtenus pour les différents cristaux sont résumés sur le Tableau II-4.

Etudes	Finch et al., 1980	Finch et al., 1981	Struck et al., 1992
Paramètres cristallographiques	a=111Å b=198Å c=111Å	a=111Å b= 203Å (193 Å*) c=111Å	a=111Å b= 198Å (184Å*) c=110,5 Å

(* cristaux deshydratés).

Tableau II-4: Paramètres cristallographiques caractérisant l'organisation orthorhombique des cristaux de NCP préparés à partir de chromatine native.

♦ Considérons maintenant les cristaux obtenus à partir de NCP reconstitués et diffractant à haute résolution (Lüger et al., 1997; Harp et al., 2000; White et al., 2001). On retrouve la même structure orthorhombique avec le groupe d'espace $P2_12_12_1$. Les paramètres de maille de ces trois structures sont donnés dans le Tableau II-5. Le paramètre a est ici légèrement plus faible, et varie de 104,9Å à 106,04Å. Les paramètres b et c que nous avons définis précédemment s'appellent maintenant c et b dans les cristaux de P-NCP et de Sce-NCP. Nous avons maintenu sur une même ligne du tableau les paramètres qui se correspondent. Le grand côté de la maille rectangle (b dans notre nomenclature) est nettement plus grand dans les cristaux de Sce-NCP (192Å au lieu de 181Å). Le paramètre c (109,71 à 110,4Å) varie très peu. Il correspond toujours à l'empilement de deux NCP. A l'aide de ces paramètres, nous avons calculé la concentration en NCP dans chacun des cristaux. Elle varie de 616 à 657 mg/ml.

Cristaux		Xla-NCP	P-NCP	Sce-Ncp
Paramètres de la maille orthorhombique	a	a=106,04 Å	a=105,28 Å	a=104,9 Å
	b	b=181,78 Å	c=181,12 Å*	c=192,6 Å*
	c	c=110,12 Å	b=109,71 Å*	b=110,4 Å*
Concentration en particules		648 mg/ml	657 mg/ml	616 mg/ml

* les paramètres b et c sont inversés dans ces deux cristaux

Tableau II-5: Paramètres de la maille orthorhombique caractérisant l'organisation des NCP dans les cristaux de particules reconstituées. Les concentrations en particules que nous avons calculées à partir des paramètres du réseau sont aussi indiquées.

Les NCP présentent deux types d'organisation, présentés sur la Figure II-8. Les cristaux préparés à partir de P-NCP, de Xla-NCP et de NCP natifs correspondent au premier type (Figure II-8 a,b) et les cristaux de Sce-NCP au second (Figure II-8 c,d).

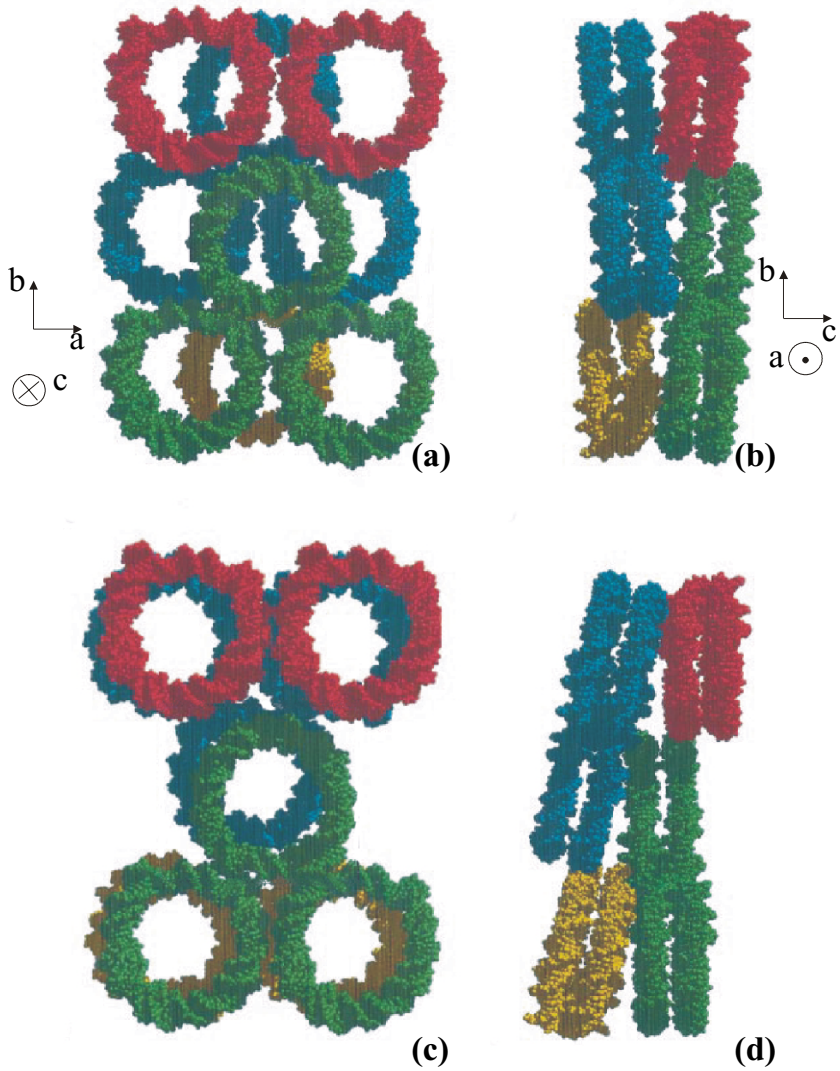


Figure II-8 : Organisation des NCP dans les cristaux de Xla-NCP (a,b) et de Sce-NCP (c,d). Selon notre nomenclature, l'organisation des NCP est présentée dans le plan (a,b) en a et c (le long de l'axe de la superhélice des NCP) et dans le plan (a,c) en b et d (D'après White et al. 2001).

Sur cette figure, l'organisation des NCP est présentée selon deux orientations : dans le plan perpendicualire à l'axe de la superhélice des NCP (Figure II-8 a,c) et après rotation de 90° autour de l'axe cristallographique b (toujours dans notre notation) (Figure II-8 b,d). De plus, les NCP sont colorés d'une même couleur quand ils sont situés exactement dans un même plan. Le long de l'axe de la superhélice des NCP, on observe la formation de "colonnes". Dans ces colonnes, les NCP sont décalés latéralement d'environ 20Å de part et d'autre de l'axe de la colonne dans les cristaux de Xla-NCP (voir Figure II-8a) alors qu'ils sont pratiquement superposés les uns sur les autres dans les cristaux de Sce-NCP (voir Figure II-8c). Dans les deux cas, les NCP sont plus ou moins inclinés dans les colonnes comme le

montre la Figure II-8(b) et (d). Quel que soit le type de cristal, les NCP d'une même colonne sont toujours orientés dans le même sens, de telle sorte que les contacts entre NCP successifs se font toujours entre une face supérieure et une face inférieure.

Il apparaît clairement que la formation de ces cristaux est pilotée par différents types d'interactions qui se manifestent entre NCP voisins. Elles sont essentiellement de deux types.

(i) Les interactions entre les extrémités des fragments d'ADN sont responsables de la formation des plans pseudo-hexagonaux. Les NCP voisins de même couleur sur la Figure II-8, qui se trouvent dans le même plan (a,b) se positionnent avec leurs faces ventrales en vis à vis, de telle sorte qu'un fragment court d'ADN (72pb) d'un NCP se positionne face au fragment long (73pb) du NCP qui lui fait face. Ainsi, via l'empilement des paires de bases, le parcours de l'ADN se fait continûment d'un NCP au suivant (voir Figure II-9). En conséquence, deux NCP successifs le long de ce parcours ont une orientation inverse de l'axe de la superhélice par rapport à l'axe c (face supérieure orientée vers le haut dans un cas, vers le bas dans l'autre). Ces interactions sont identiques dans les deux types de cristaux.

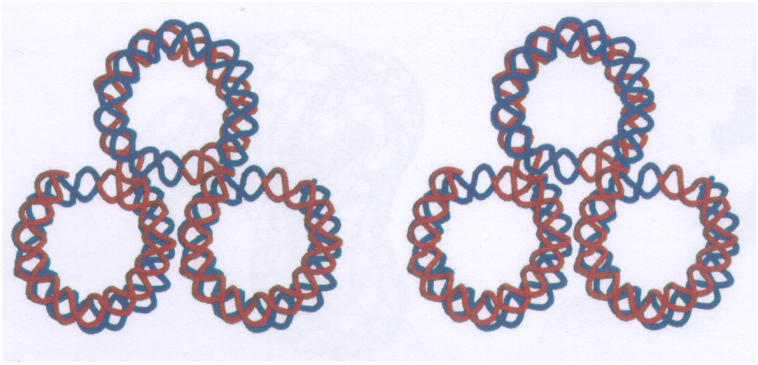


Figure II-9: Représentation schématique, en vues stéréo, de la continuité de l'ADN entre NCP voisins. Pour chaque NCP, les 72 pb ventrales sont colorées en rouge et les 73 pb dorsales en bleu (d'après Harp et al., 2000)

(ii) Les interactions entre faces supérieures et inférieures des NCP conduisent à l'empilement des plans de NCP les uns sur les autres. Ces interactions sont différentes dans les deux types de cristaux du fait des différences dans les séquences des acides aminés des histones. Dans les cristaux de Xla-NCP, les acides aminés chargés positivement de l'extrémité

N terminale de H4 entrent en contact avec une zone chargée négativement de la surface du dimère (H2A-H2B) du NCP voisin. L'extension N-terminale de H4 est indispensable pour que les cristaux se forment. Dans les cristaux de Sce-NCP, cette extrémité de H4 n'interagit plus avec cette région mais interagit avec l'ADN du NCP voisin sans que cette position soit précisément définie. Cette différence de positionnement de H4 provient des différences de séquences d'acides aminés dans la portion structurée en hélice alpha de l'extrémité C terminale de H2B (αC). Cette région αC a des contacts mineurs avec l'ADN du NCP voisin dans les cristaux de Xla-NCP. Elle joue par contre un rôle essentiel dans les contacts protéine-protéine entre NCP de deux plans successifs dans les cristaux de Sce-NCP. Notons également que les ions divalents jouent un rôle essentiel dans la formation de ces cristaux en se positionnant à des sites très spécifiques.

Le rôle joué par les extensions protéiques dans l'organisation des NCP au sein des cristaux apparaît également de manière évidente dans le cas où les queues des NCP natifs ont été protéolysées (Finch et al, 1977; 1978). Si le groupe d'espace est toujours $P2_12_12_1$, les paramètres de maille (a= 110Å, b= 192 Å et c = 340 Å) montrent que l'unité répétitive le long de l'axe c correspond maintenant à six NCP au lieu de deux. Les colonnes suivent des parcours sinusoïdaux qui ont été visualisés par microscopie électronique. Par contre les paramètres a et b sont très peu modifiés.

♦ D'autres types de cristaux ont également été obtenus avec des NCP natifs (Dubochet et Noll, 1978). Ils se présentent sous la forme de tubes creux dont les parois sont formées par des couches successives de colonnes de NCP. Les parcours des colonnes sont hélicoïdaux et l'obliquité des hélices par rapport à l'axe des tubes varie d'une couche à la suivante (Figure II-10). Les colonnes des différentes couches forment entre elles un réseau pseudo-hexagonal. La structure de ces cristaux traduit l'existence d'un positionnement bien défini des nucléosomes les uns au-dessus des autres au sein des colonnes, permettant la courbure régulière de l'hélice. La structure hélicoïdale de l'édifice reflète également la nature chirale des nucléosomes qui le constituent.

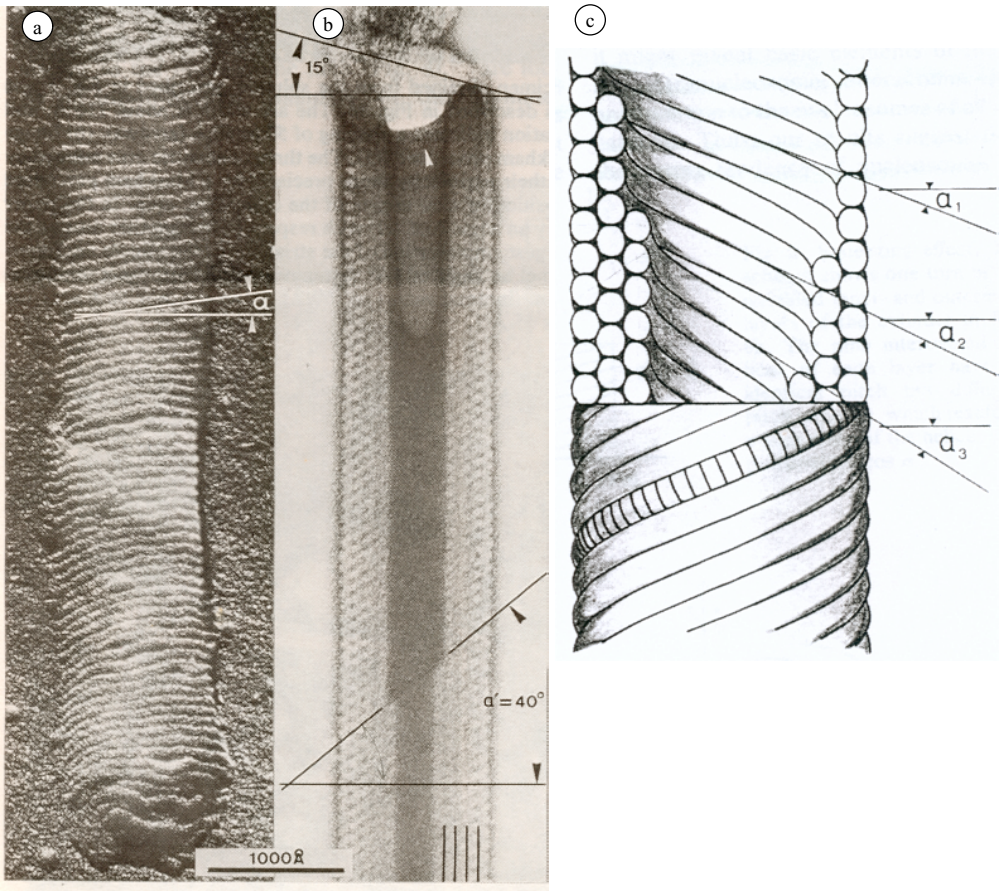


Figure II-10: Cristaux cylindriques de NCP préparés à partir de chromatine native. a : Cylindres observés en microscopie électronique après ombrage. On remarque les colonnes de nucléosomes superficielles, obliques par rapport à l'axe du cylindre. b : Après coloration négative, les cylindres apparaissent creux et leurs parois sont constituées par plusieurs couches concentriques de nucléosomes. c : Représentation schématique de l'empilement quasi-hexagonal des colonnes de NCP formant les parois du cylindre et de l'organisation hélicoïdale de colonnes des différentes couches. (d'après Dubochet et Noll, 1978).

b) Phases denses obtenues par concentration progressive de l'échantillon en présence de sels monovalents

Les phases cristallines que nous venons de décrire sont toujours formées en présence d'ions multivalents. Néanmoins, les NCP peuvent également former des phases ordonnées en présence d'ions monovalents seuls. Deux phases cristallines liquides ont été décrites : une phase colonnaire hexagonale (Leforestier et Livolant, 1997; Livolant et Leforestier, 2000), et une phase lamellaire (Leforestier et al., 2001). Rappelons que les cristaux liquides, ou mésophases, correspondent à un état particulier de la matière. Dans ces phases, les molécules présentent un ordre d'orientation, mais pas d'ordre de position. La fluidité de ces phases est quelquefois très réduite.

Les méthodes utilisées pour obtenir ces phases ordonnées consistent à concentrer progressivement les NCP tout en contrôlant précisément la concentration ionique de la solution. Cela est réalisé soit par ultrafiltration à travers une membrane hémi-perméable, soit par stress osmotique en immergeant la solution de NCP contenue dans un sac de dialyse dans une solution de polymère comme le polyéthylène glycol (PEG).

i) Phase lamellaire de bicouches

A des concentrations en NCP comprises entre 300 et 370 mg/ml et pour des concentrations en sels ajoutés C_s (NaCl) comprises entre 3,5 mM et 35 mM, les NCP forment une phase lamellaire (Leforestier et al., 2001). La croissance de cette phase a été suivie en microscopie optique. Des tubes grandissent au sein de la solution isotrope pour atteindre des longueurs typiques de 1 à 10 μm et un diamètre de 10 et 200 μm, (Figure II-11a). De nouveaux tubes bourgeonnent à leurs extrémités (Figure II-11b), ce qui conduit à la formation de sphérulites qui remplissent progressivement tout le volume (Figure II-11c). La structure lamellaire de cette phase est clairement visible en microscopie électronique sur des cryocoupes des échantillons vitrifiés (Figure II-11e). Les couches lamellaires alternent avec des couches de solvant, la périodicité de la structure variant de 270 à 420 Å dans les gammes de concentration explorées. L'épaisseur de la couche de solvant varie de 90 à 220 Å, selon la concentration de l'échantillon. Chaque lamelle est formée de colonnes de NCP alignées en parallèle pour former une bicouche. L'orientation des colonnes varie d'une bicouche à la suivante.

L'empilement des NCP dans les colonnes est bien visible lorsque le plan de coupe est parallèle à l'axe de la colonne (Figure II-11g). On reconnaît essentiellement l'ADN des nucléosomes, plus dense aux électrons que les protéines du cœur. Il dessine le plus souvent un V avec la pointe du V orientée côté solvant. Lorsque les coupes sont perpendiculaires à l'axe des colonnes, on a des vues apicales des NCP et l'ADN dessine leur contour circulaire (Figure II-11f). L'axe δ de chaque particule, indiqué par une tête de flèche, peut être positionné précisément en comparant les images des NCP et les structures cristallographiques correspondantes (encarts). Ainsi, les faces ventrales des NCP, portant les extrémités de l'ADN, sont toujours orientées vers le solvant. La structure de cette phase lamellaire est donnée sur la Figure II-12, en perspective (Figure II-12a') et dans un plan perpendiculaire au plan des lamelles (Figure II-12b'). Les NCP se positionnent dos à dos au sein de la bicouche. Les extensions N terminales des histones H2B (et éventuellement H2A) sont suspectées jouer

un rôle dans le maintien des colonnes au sein de la bicouche. D'autres interactions sont nécessaires pour maintenir les bicouches à égale distance les unes des autres (Leforestier et al, 2001).

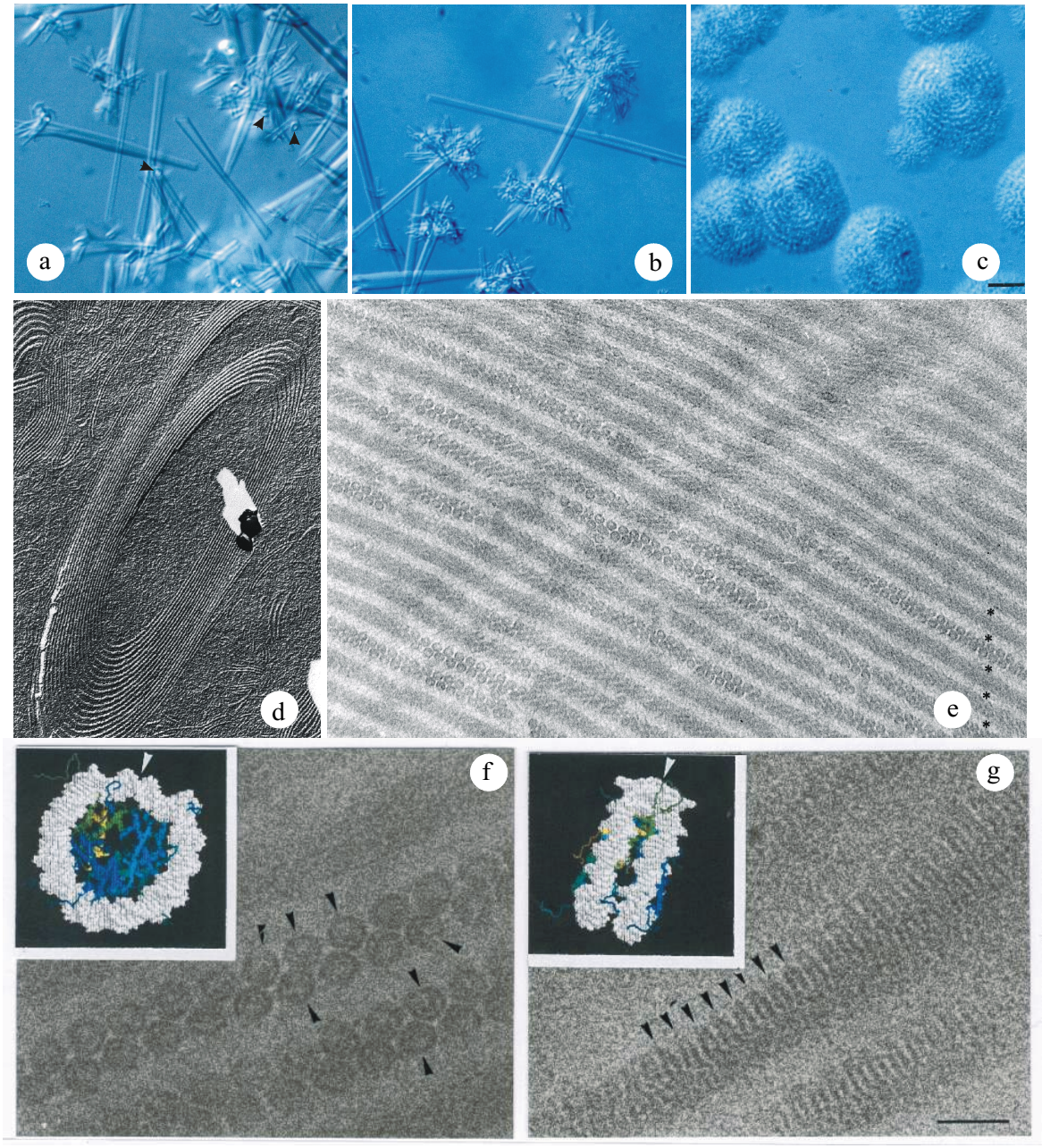


Figure II-11 : Phase lamellaire observée en microscopie optique (a-c) et en microscopie électronique (d-g). Les germes tubulaires creux en cours de croissance (a) peuvent bourgeonner d'autres tubes à leurs extrémités (b) et former des sphérulites denses (c). Chaque tube est constitué par l'enroulement d'une série de lamelles (Echelle 20 μm) (d, cryofracture). Comme le montrent les cryocoupes (e) la structure lamellaire est formée par des bicouches de colonnes séparées les unes des autres par le solvant. L'orientation des NCP dans les bicouches est analysée dans des plans perpendiculaire (f) ou parallèle aux colonnes (g) par comparaison avec les structures cristallographiques du NCP (encarts) (Echelle 20 nm).

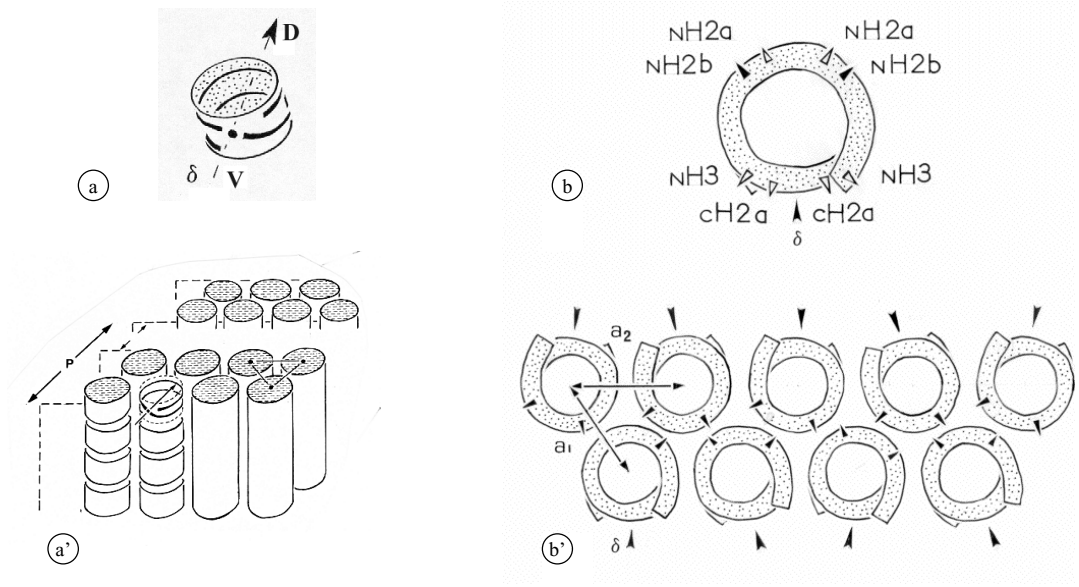


Figure II-12: Structure schématique des NCP et de leur organisation dans la phase lamellaire en perspective (a, a') et dans un plan perpendiculaire aux lamelles (b, b'). L'axe de symétrie binaire des NCP (δ) est perpendiculaire à la bicouche. Les NCP se positionnent toujours dos à dos à l'intérieur des bicouches. La position des extrémités N et C terminales des histones à leur sortie du NCP (b) laisse supposer que les queues protéiques jouent un rôle important dans la stabilisation des bicouches.

Le fait que ces bicouches aient tendance à s'enrouler pour former des tubes (Figure II-11a,b,d) montre que les plans lamellaires ont tendance à vriller. Ceci traduit le fait que les colonnes ont tendance à s'incliner les unes par rapport aux autres au sein des lamelles, du fait de la structure chirale des NCP qui les composent.

Des colonnes isolées formées par l'empilement de NCP, ont été observées en cryomicroscopie lorsque la concentration en NCP est légèrement inférieure à la concentration à laquelle apparaît la phase lamellaire (Leforestier et al, 2001).

ii) Phase hexagonale

Pour des concentrations en sels monovalents supérieures à 90 mM et des concentrations en particules comprises entre 310 et 485 mg/ml, les NCP s'organisent spontanément en une phase colonnaire hexagonale (Leforestier et Livolant, 1997). Dans ces germes, les NCP sont empilés les uns sur les autres pour former des colonnes qui elles-mêmes s'alignent parallèlement les unes aux autres pour former un réseau hexagonal (Figure II-13a). Les germes de cette phase hexagonale, en croissance au sein de la phase isotrope, sont le plus souvent de forme allongée mais ils présentent une symétrie d'ordre 6 lorsque la direction des colonnes est orientée perpendiculairement au plan de la préparation (Figure II-13b). La

croissance des germes se fait préférentiellement selon certaines directions, produisant un facettage, classique dans les phases discotiques, qui donne ces formes en "fleurs". Les colonnes de nucléosomes elles-mêmes ont été visualisées par microscopie électronique après cryofracture des échantillons car les plans de fracture suivent préférentiellement les plans réticulaires (Figure II-13c).

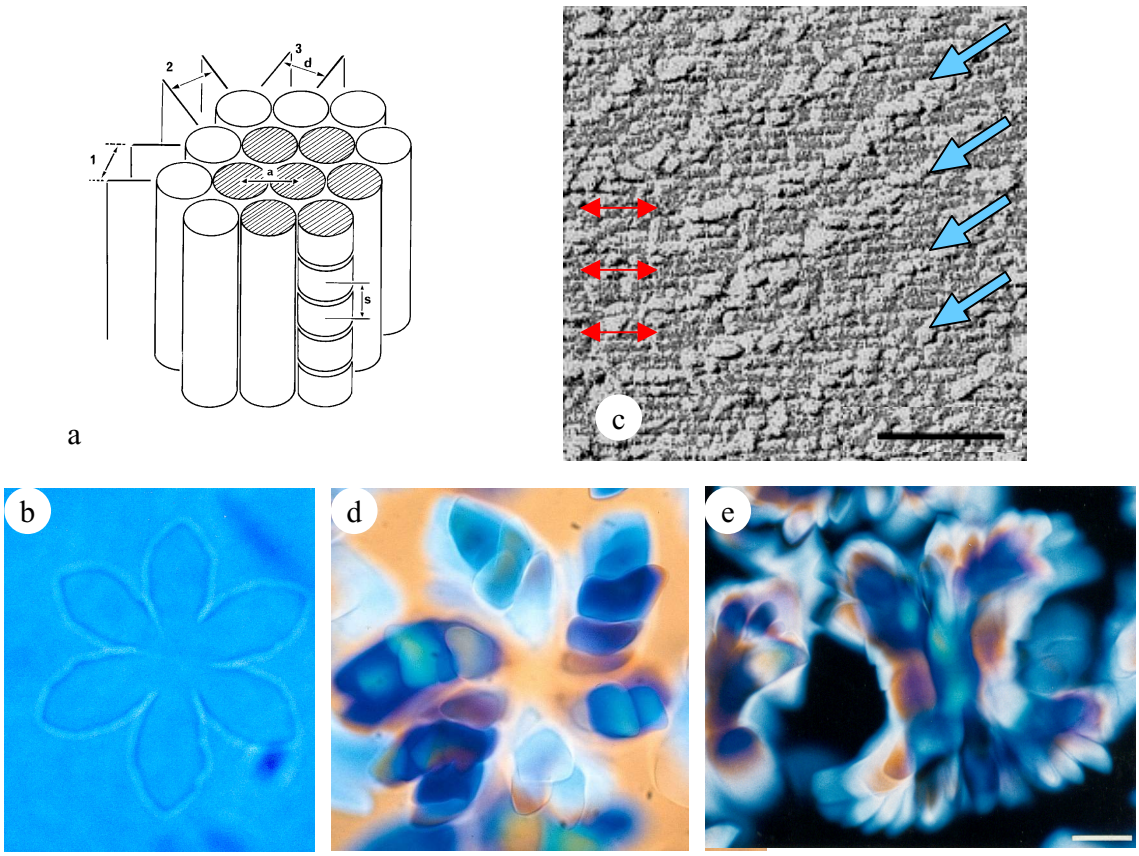


Figure II-13 : a: Organisation des NCP dans la phase colonnaire hexagonale soulignant les trois directions principales du réseau. b,d,e : germes hexagonaux observés au microscope polarisant en vue apicale (b,d) et en vue latérale (e). c: Visualisation des plans réticulaires de colonnes au sein de cette phase hexagonale. Les flèches bleues soulignent la direction des marches permettant de passer d'un plan de colonnes au suivant. Les doubles flèches rouges indiquent la direction des colonnes dans chacun des plans.

Les germes de grande taille ont une structure plus complexe (Figure II-13d,e). En effet, en grandissant le germe se divise en six branches. Tout en restant connectées entre elles dans la partie médiane du germe, ces six branches s'individualisent et s'enroulent en une hélice gauche macroscopique (Figure II-14). Ces formes originales des germes hexagonaux résultent d'une compétition entre un "packing" hexagonal des colonnes et une tendance à la torsion qui

se manifeste spontanément entre les colonnes dont la structure est hélicoïdale. Cette torsion se propage dans toutes les directions perpendiculaires à l'axe des colonnes. C'est ce qu'on appelle une organisation en "double twist" (double torsion). Néanmoins, en raison du facettage des germes, ce phénomène de "double twist" conduit dans le cas présent à la fragmentation du germe en 6 branches, qui elles-mêmes se divisent en six branches, et ceci de manière itérative. Les analyses à l'échelle microscopique ont mis en évidence la torsion entre colonnes et également des phénomènes de divergence par rapport à la direction moyenne qui rendent compte de la forme macroscopique des germes (Livolant et Leforestier, 2000).

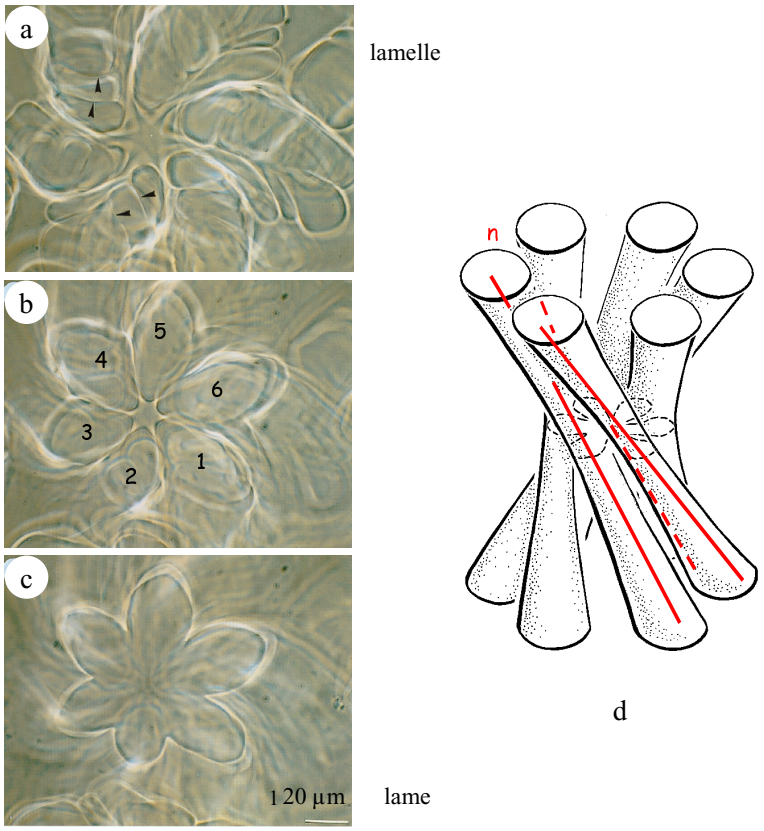


Figure II-14: a-c série focale d'un même germe hexagonal en vue apicale. Il a une forme hexagonale dans son plan médian (c). Les six branches s'individualisent et il apparaît entre elles un cœur creux quand on s'éloigne de la partie médiane (b,c). d: représentation schématique de la structure tridimensionnelle en hélice gauche du germe.

II.B Objets chargés en solution

II.B.1 Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les NCP sont des objets fortement chargés. Leur charge structurale Z_{str} est d'environ –150 (voir paragraphe II.A.2.3.b). Afin d'appliquer les lois de l'électrostatique, nous supposerons que ces charges sont réparties de façon homogène sur toute la surface des particules. De même, étant donné leur géométrie (voir paragraphe II.A.2.3), ces particules seront assimilées à des colloïdes ou plus exactement à des sphères chargées de rayon a égal à 50Å.

Pour assurer leur électroneutralité, ces colloïdes sont accompagnés d'ions dont la valence est de signe contraire à celle des NCP (c'est à dire positive). En plus de ces contre-ions, des sels sont ajoutés à la solution afin de stabiliser la particule en solution diluée. Une concentration saline de quelques millimolaires est absolument requise (voir paragraphe II.A.2.3). Ainsi, une solution de NCP doit être considérée comme un système à plusieurs composants : les particules colloïdales, les contre-ions, le sel ajouté et le solvant.

II.B.2 Interactions entre particules chargées

Dans ce paragraphe, nous allons étudier les interactions entre objets chargés, en commençant par les interactions entre deux ions, pour évoluer vers les interactions entre deux colloïdes chargés. Dans toutes les théories que nous allons développer, les ions seront considérés comme ponctuels. Le solvant, dans lequel les particules seront plongées, sera considéré comme continu et caractérisé par sa constante diélectrique ε.

II.B.2.1 Interactions entre deux ions

Dans le modèle le plus simple, le potentiel d'interaction entre deux ions i et j, séparés d'une distance r, et de valence Z_i et Z_j, est un potentiel coulombien de portée infinie, qui s'écrit :

$$V_{ij}(r) = \frac{Z_i Z_j e^2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r} \qquad \text{(II.1)}$$

La comparaison de ce potentiel avec l'énergie thermique kT=1/β donne alors :

$$\beta V_{ij}(r) = Z_i Z_j \frac{L_B}{r} \qquad \text{(II.2)}$$

avec L_B la longueur de Bjerrum définie par :

$$L_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon kT}$$

T est ici la température, k la constante de Boltzmann et e la charge de l'électron. En solution aqueuse, et à une température de 25°C, la longueur de Bjerrum vaut 7,2Å. Il découle de l'équation (II.2), que deux ions monovalents (de valence égale à 1) séparés par une distance égale à la longueur de Bjerrum, ressentent une attraction ou une répulsion, suivant le signe de leur charge, égale à l'énergie thermique.

II.B.2.2 Interaction ions-colloïdes

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser à la distribution des contre-ions au voisinage des colloïdes. Deux cas simples vont être considérés. En premier lieu, nous allons considérer les interactions pour une solution diluée de colloïdes, conduisant à l'approximation de Debye-Hückel, qui introduit la notion d'écrantage des interactions électrostatiques par les ions. Nous considérerons ensuite les interactions dans une solution concentrée, à travers le modèle Poisson-Boltzmann réseau.

Les particules colloïdales seront considérées comme des sphères de rayon a, uniformément chargée, et portant une charge structurale Z_{str}. Ces particules sont entourées de contre-ions, portant une charge opposée à celle du colloïde. La concentration en sel ajouté de la solution sera notée C_s.

a) Un seul colloïde

Considérons dans un premier temps une seule et unique particule colloïdale sphérique, plongée dans une solution en excès de sel. Dans ces conditions, le nombre de contre-ions entourant la particule est négligeable devant le nombre d'ions provenant de la dissociation du sel dans l'eau.

i) Equation Poisson-Boltzmann

D'après les lois de l'électrostatique, le potentiel électrostatique $\psi(r)$ créé par la particule, sur les ions de densité locale de charge $\rho(r)$ vérifie l'équation de Poisson :

$$\Delta\Psi = -\rho/\varepsilon_0\varepsilon = -\frac{e}{\varepsilon_0\varepsilon}\sum_{ions} Z_j C_j(r) \qquad (II.3)$$

C_j représente la concentration locale en ions j, de valence Z_j. On peut alors faire l'hypothèse que la densité locale de chaque espèce varie suivant la statistique de Boltzmann, c'est-à-dire que la concentration d'ions C_j à une distance r de la particule est de la forme :

$$C_j = C_j^0 \exp(-Z_j e\psi(r)/kT) \qquad (II.4)$$

avec C_j^0 la concentration en ions de l'espèce j en l'absence de toute énergie potentielle. Si l'on introduit le potentiel électrostatique normalisé $\varphi(r) = \frac{e\Psi(r)}{kT}$, la combinaison des équations (II.3) et (II.4) conduit à l'équation de Poisson-Boltzmann.

$$\Delta\varphi(r) = -4\pi L_B \sum_{ions} Z_j C_j^0 \exp(-Z_j\varphi(r)) \qquad (II.5)$$

Deux conditions aux limites doivent être imposées pour permettre la détermination du potentiel $\varphi(r)$. La première impose qu'à grande distance, le potentiel électrostatique tende vers 0, la deuxième condition étant imposée par le théorème de Gauss, soit :

$$\varphi(r \to \infty) = 0; \quad \frac{d\varphi(r=a)}{dr} = -\frac{Z_{str} L_B}{a^2}$$

L'équation différentielle non linéaire (II.5) ne peut être résolue analytiquement dans le cas d'une géométrie sphérique. Seul un calcul numérique permet la détermination du potentiel électrostatique.

ii) Approximation Debye-Hückel

Considérons pour simplifier que la solution contient un seul type de sel, qui crée en se dissociant deux types d'ions de valence Z_+ et Z_-, de concentrations respectives C_+ et C_- telles que $Z_+C_+ + Z_-C_- = 0$ (condition d'électroneutralité).

Pour des particules colloïdales faiblement chargées, et lorsque l'énergie électrostatique est très petite devant l'énergie thermique, soit $e\psi << kT$, ou $\varphi(r) << 1$, l'équation de Poisson-Boltzman peut être linéarisée. Cette linéarisation, associée à la condition d'électro-neutralité, conduit à l'approximation de Debye-Hückel :

$$\Delta\varphi(r) = \kappa^2\varphi(r) \tag{II.6}$$

La grandeur κ^{-1}, homogène à une longueur et appelée longueur de Debye, est définie par la relation :

$$\kappa^2 = 4\pi L_B \sum_{ions} C_j^0 Z_j^2 = 8\pi L_B I \tag{II.7}$$

Dans l'équation (II.7), I est appelée force ionique du système, définie par $I = \frac{1}{2}\sum_j C_j^0 Z_j^2$.

Dans notre cas, nous considèrerons un sel monovalent, comme le NaCl. Par conséquent, en excès de sel on peut écrire $C^0=C_+=C_-=C_s$. La force ionique correspond alors à la concentration en sel ajouté C_s de la solution.

L'équation de Debye-Hückel peut être résolue analytiquement quelle que soit la symétrie du système. Pour des particules sphériques, la solution de l'équation Poisson-Boltzmann linéarisée (approximation Debye-Hückel) s'écrit:

$$\varphi(r) = \frac{Z_{str} L_B}{1+\kappa a}\frac{e^{-\kappa(r-a)}}{r} \tag{II.8}$$

Cette expression montre clairement que la longueur de Debye κ^{-1} correspond à une longueur d'écrantage des interactions électrostatiques.

iii) Notions de charge effective

Nous avons vu précédemment que la solution de l'équation linéarisée de Poisson-Boltzmann est valable uniquement dans le cas de particules colloïdales de faible charge, et ne peut en aucun cas être utilisée pour des particules de forte charge structurale. Dans ce cas, du fait de leur forte charge, les particules sont entourées d'un nombre important de contre-ions. En pratique, ces derniers sont tellement condensés au voisinage du colloïde que l'on peut considérer le colloïde avec ses contre-ions comme une particule effective. D'un point de vue électrostatique, tout se passe alors comme si la particule présentait une charge effective moins

importante, réduite par la présence des contre-ions condensés. Un ion situé loin de la particule est donc plutôt soumis à un potentiel effectif et "voit" une charge effective Z_{eff} inférieure à la charge structurale. On utilise alors cette charge effective à la place de la charge structurale pour pouvoir appliquer la solution de l'équation linéarisée à des systèmes fortement chargés.

Il existe différentes définitions physiques de la charge effective, liées à la notion de condensation. Il est important de garder à l'esprit que ce paramètre ne peut être défini de façon univoque (Belloni, 1998). Par la suite, on définira la charge effective Z_{eff} par l'identification de la solution non linarisée du système réel fortement chargé, à la solution linéarisée d'un système effectif moins chargé :

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

Une représentation schématique du potentiel électrostatique φ(r) obtenu pour une particule sphérique, à partir des équations Poisson-Boltzmann linéarisée et non linéarisée est présentée sur la Figure II-15.

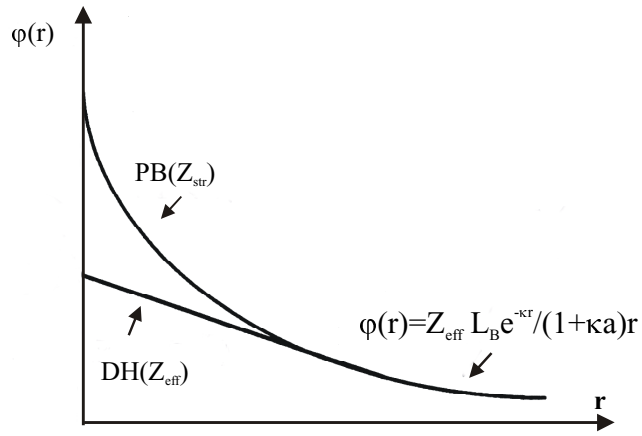


Figure II-15 : Variation du potentiel électrostatique φ(r) calculé pour une particule sphérique à partir des équations Poisson-Boltzmann linéarisé et non linéarisé. L'identification des deux courbes à grande distance permet une détermination de la charge effective.

La variation théorique de la charge effective, obtenue à partir de cette définition pour les fortes valeurs de charge structurale, en fonction de κa est présentée sur la Figure II-16. Pour les faibles valeurs de concentration saline (lorsque les valeurs de κa sont inférieures à 0,6), la valeur de la charge effective diminue progressivement avec la concentration ionique de la solution. Pour les valeurs de κa supérieures à 0,6, les valeurs de la charge effective augmentent rapidement avec la concentration saline pour atteindre la valeur de la charge structurale.

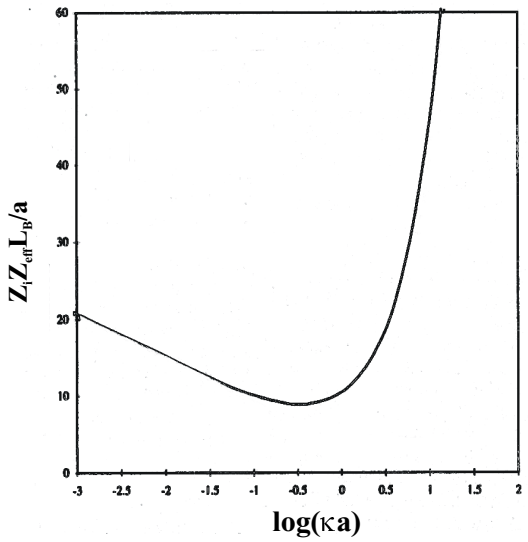


Figure II-16 : Variation de la charge effective normalisée d'une particule colloïdale sphérique en fonction de κa (d'après Belloni, 1998). Z_i correspond à la valence des ions condensés

Dans le cas de système très chargé, la charge effective est uniquement donnée par la variation du rapport $Z_iZ_{eff}L_B/a$ en fonction de κa. Cette charge ne dépend pas de la charge structurale Z_{str}.

b) Plusieurs colloïdes

Dans le cas de plusieurs colloïdes en solution, cas plus réaliste expérimentalement, le modèle le plus utilisé pour résoudre l'équation Poisson-Boltzmann (II.5) est le modèle Poisson-Boltzmann réseau, principalement introduit et étudié par Katchalsky (1966), pour la symétrie cylindrique. Dans notre cas, les particules cœur de nucléosome étant considérées comme des sphères, nous nous attacherons à décrire les résultats obtenus en symétrie sphérique.

Pour des particules sphériques, la solution étudiée est découpée en cellules sphériques élémentaires jointives de rayon R, au centre desquelles se trouve un et un seul colloïde. Chaque cellule est électriquement neutre. La fraction volumique ϕ des particules est égale à $\phi=(a/R)^3$ et détermine la taille R des cellules. Avec ces considérations, le potentiel électrostatique $\varphi(r)$ est identique d'une cellule à l'autre. On est alors ramené au cas précédent où l'on étudie un seul colloïde. La seule différence est l'effet de bord: $r \to \infty$ devient r = R. Les conditions aux limites s'écrivent donc:

$$\varphi(R) = 0;\ \frac{d\varphi}{dr}(R) = 0;\ \frac{d\varphi}{dr}(a) = -\frac{Z_{str} L_B}{a^2}$$

Ce système d'équations est résolu numériquement et de façon itérative (Belloni, 1982). Après résolution, la détermination des profils ioniques est obtenue en utilisant l'équation (II.4), soit :

$$C_+(r) = C_+^0 e^{-Z_+\varphi(r)}$$
$$C_-(r) = C_-^0 e^{-Z_-\varphi(r)}$$

Un exemple de profil ionique type obtenu par cette méthode est présenté sur la Figure II-17, ci-après. A grande distance, les ions ne ressentent pas l'influence de la particule. Lorsque l'on se rapproche de la particule, les ions dont la valence est de signe identique à celle du colloïde, ont tendance à être repoussés. A l'opposé, les ions de signe contraire ressentent une attraction de plus en plus importante, et leur nombre augmente de façon importante lorsque l'on se rapproche de la particule.

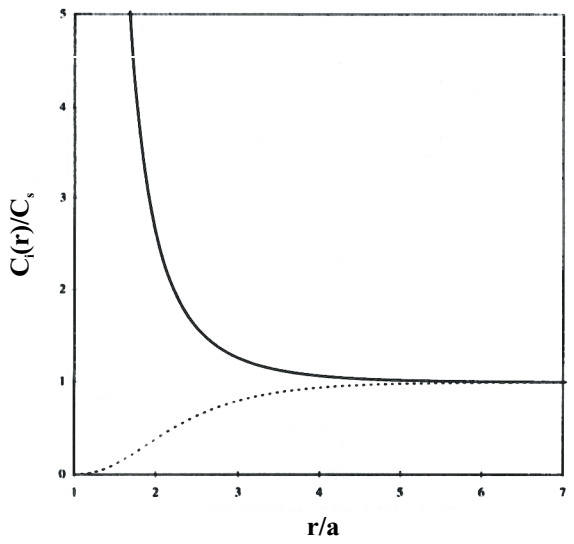


Figure II-17 : Exemple de profil ionique pour les ions de charge opposée (—) et identique (--) à celle du colloïde (D'après Belloni, 1998).

Dans le cas d'un excès de sel ajouté dans la solution, le nombre de contre-ions apportés par les particules, que nous noterons C_c, est négligeable. Pour les concentrations salines plus faibles, et/ou pour des solutions concentrées de particules, le rapport C_c/C_s n'est plus négligeable. Une partie des contre-ions de la particule va alors jouer un rôle d'écrantage, et la longueur de Debye κ^{-1} va être dépendante de la concentration en particules.

c) Application aux particules cœur de nucléosome

Dans le cas des particules cœur de nucléosome considérées comme des sphères de rayon a = 50Å, la détermination du potentiel électrostatique non-linéarisé est obtenue à l'aide d'un programme écrit par L. Belloni, et qui utilise le modèle Poisson-Boltzmann réseau. A partir d'une charge structurale et pour une concentration en sel ajouté déterminée, le programme identifie la solution linéarisée et non-linéarisée, permettant donc pour chaque concentration saline la détermination de la charge effective (Alexander et al, 1983). Ce programme permet aussi la détermination de la valeur du potentiel électrostatique à la surface de la particule, ψ_s. Les variations théoriques de la charge effective des NCP et du potentiel ψ_s avec la concentration en sel ajouté de la solution sont présentées sur le Tableau II-6. Les valeurs présentées ont été obtenues en considérant une charge structurale des NCP égale à –160 (Comme nous le verrons dans la suite, l'ADN utilisé dans la plupart de nos expériences avait 155 pb, ce qui conduit à une valeur de la large légèrement supérieure à celle évaluée à –146 dans le paragraphe II.A.2.3.b pour un NCP comportant 146 pb d'ADN).

C_s (mM)	κa	Z_{eff}	ψ_s (mV)
4,8	1,14	-64	-142
10	1,65	-71	-125
25	2,61	-84	-103
50	3,69	-96	-87
75	4,52	-102	-78
100	5,21	-104	-72
160	6,60	-119	-62
210	7,56	-124	-57

Tableau II-6 : Variation de la charge effective des particules (Z_{eff}) et du potentiel électrostatique de surface (ψ_s) en fonction de la concentration en sel ajoutée de la solution (C_s). Les valeurs de κa sont aussi indiquées. Les valeurs ont été calculées en considérant les NCP comme des sphères de 50Å de rayon et de charge structurale égale à –160.

Dans les conditions ioniques nécessaires à la stabilité des particules cœurs de nucléosome, correspondant à des concentrations salines de quelques millimolaires à environ 200 mM, soit des valeurs de κa de 1 à 7,6, les valeurs absolues de la charge effective augmentent continûment de 64 à 124 (voir Figure II-16). Ces valeurs sont à comparer à la charge structurale des particules cœurs de nucléosomes environ égale à -160.

II.B.2.3 Interactions entre particules colloïdales : modèle DLVO

Nous allons à présent étudier les interactions entre particules colloïdales sphériques, en utilisant le modèle le plus courant. Dans ce "modèle à un composant", les ions sont considérés comme ponctuels, et seuls les particules interagissent via un potentiel effectif introduit par Derjaguin, Landau, Vervey et Overbeek et connu sous le nom de DLVO (Verwey et Overbeek, 1948). Le point de départ de ce modèle consiste à plonger deux particules, et deux seulement, dans une solution saline, afin de calculer les forces ressenties par chacune des particules. Ce modèle serait quasi-idéal si l'on connaissait une expression analytique d'une solution contenant N particules, et si l'on pouvait résoudre l'équation Poisson-Boltzmann non linéarisée pour ces N particules.

Dans le modèle DLVO, les particules étudiées sont considérées comme impénétrables. Il y a donc apparition d'une composante répulsive entre les particules, appelée potentiel sphère dure. Pour des distances (centre à centre) entre deux particules inférieures au diamètre des particules, le potentiel d'interaction de paire est infini. A l'opposé, ce potentiel devient égal à 0 pour les distances supérieures au diamètre des particules.

Le deuxième potentiel introduit caractérise les interactions électrostatiques, liées au caractère chargé des particules. Pour des particules chargées uniformément, de charge Z, et séparées par une distance r, le potentiel électrostatique répulsif de paire s'écrit :

$$\beta V(r) = \frac{Z^2 L_B}{r} \frac{\exp\left(-\kappa(r-2a)\right)}{\left(1+\kappa a\right)^2} \qquad \text{(II.9)}$$

L'allure générale du potentiel en exp(-κr)/r caractérise les répulsions électrostatiques écrantées par les sels. De manière générale, les interactions électrostatiques entre deux particules sont négligeables dès que la distance qui les sépare est supérieure à la longueur de Debye κ^{-1}. Ce potentiel est dérivé de l'approximation de type Debye-Hückel (voir équation (II.8)) et ne s'applique qu'aux systèmes faiblement chargés. Dans le cas contraire, on renormalise comme précédemment (voir paragraphe II.B.2.2) la charge Z impliquée en utilisant la charge effective Z_{eff}.

Finalement, la dernière interaction considérée dans ce modèle est une attraction à courte distance entre les particules, de type van der Waals. Brièvement, le mouvement des électrons dans un atome crée un dipôle oscillant. Le couplage entre les dipôles, créés par deux atomes, induit l'apparition de la force attractive considérée.

Le potentiel d'interaction de paires DLVO résulte de la somme de ces trois interactions schématisées sur la Figure II-18. Ce potentiel, valable en toute rigueur pour des particules en solution diluée, est extrêmement utilisé pour étudier les interactions entre particules colloïdales, parfois même à des concentrations relativement élevées. De manière générale, ce potentiel permet d'expliquer un grand nombre de comportements expérimentaux observés. Il existe cependant quelques cas qu'il ne permet pas d'expliquer (entre autres voir Petsev et Velikov, 2000).

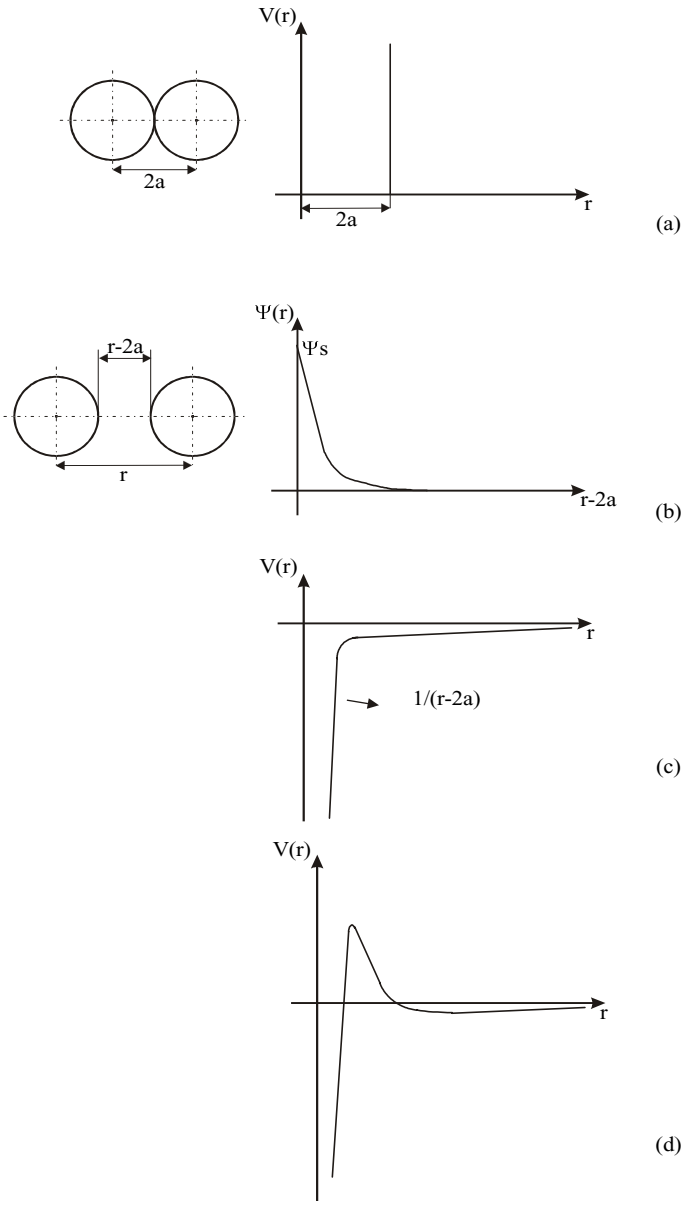


Figure II-18: Le potentiel DLVO (d) résulte de la somme de trois interactions.
(a) Les interactions répulsives de type sphère dure traduisent l'impénétrabilité des particules. Ce terme est particulièrement important pour les particules de grosse taille.
(b) les répulsions électrostatiques se traduisent par un potentiel répulsif. De manière générale, on considère que deux particules séparées par une distance supérieure à la longueur de Debye, κ^{-1}, n'interagissent pas entre elles.
(c) A courte distance, les particules sont soumises à une force attractive de type van der Waals.

II.B.3 Propriétés thermodynamiques

Mesurer la pression osmotique d'une solution, c'est-à-dire mesurer les forces d'interaction entre particules est un moyen d'obtenir des informations sur les propriétés thermodynamiques d'une solution de particules colloïdales. Cette mesure nécessite l'utilisation d'une membrane semi-perméable, c'est-à-dire perméable pour le solvant et les ions et imperméable pour les particules colloïdales. Dans ce chapitre, nous allons donc décrire l'effet de cette membrane sur les équilibres ioniques de part et d'autre de la membrane, avant de discuter de ces implications sur les mesures de pression osmotique.

II.B.3.1 Equilibre du solvant

Avant de considérer l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane, il convient de rappeler très brièvement la notion de dialyse. L'expérience classique consiste à placer de part et d'autre de la membrane un solvant pur et un solvant contenant un soluté dissous ne pouvant pas traverser la membrane. Du fait de la différence des potentiels chimiques du solvant dans les deux compartiments, on observe un flux de solvant à travers la membrane vers la solution contenant les particules. L'équilibre est ensuite atteint lorsque le potentiel chimique du solvant des deux compartiments est égal. Dans notre cas, les dialyses sont effectuées à l'aide de boudin immergé dans une solution réservoir (voir Figure II-19).

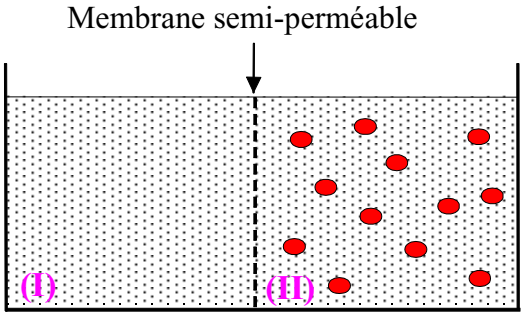


Figure II-19 : Equilibre ionique par dialyse. La solution de colloïdes est placée dans un boudin de dialyse, dont la membrane semi-perméable laisse passer librement les molécules de solvant et les ions, mais retient les colloïdes. Ce boudin est alors placé dans une solution réservoir, préalablement préparée à la concentration ionique désirée.

Dans le cas des expériences de pression osmotique, le même phénomène est observé. En Figure II-20 est représentée une expérience type. Le flux de solvant du compartiment I vers le

compartiment II crée une élévation H du niveau du liquide. L'équilibre est atteint lorsque le flux de solvant est arrêté par la surpression hydrostatique ainsi créée. Cette surpression, reliée à la différence de hauteur H entre les deux solutions, est appelée pression osmotique. Si d est la densité de la solution, la pression osmotique Π s'écrit: Π=dgH avec g l'accélération de la pesanteur. Cette grandeur est généralement exprimée en Pascal en unité S.I. ou en dyn/cm^2 en unité c.g.s.

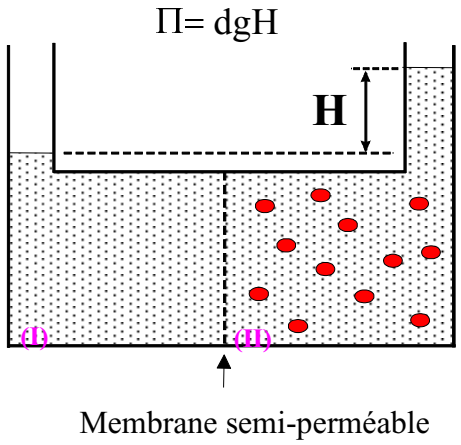


Figure II-20: Expérience type de pression osmotique.
A l'équilibre, la différence de hauteur H, de la solution étudiée par rapport à la solution de référence permet de calculer la pression osmotique de la solution de particules: Π = dgH (pour un solvant de densité d).

II.B.3.2 Equilibre ionique

a) Considérations théoriques

Tout comme le solvant (l'eau), les ions peuvent diffuser à travers la membrane et l'équilibre thermodynamique est atteint lorsque leurs potentiels chimiques de part et d'autre de la membrane sont égaux. Toutefois, comme les particules colloïdales sont chargées, une différence de potentiel électrostatique peut apparaître entre les deux compartiments. Cette différence va alors contrôler le flux d'ions à travers la membrane, entraînant ainsi leur redistribution ou encore le phénomène d'exclusion de sel, appelé effet Donnan.

Pour simplifier, nous supposerons que la solution dans le réservoir ne contient que des ions Cl^- et Na^+, ces derniers étant supposés être les seuls contre-ions des particules colloïdales de charge négative. Nous appellerons C_{s0} la concentration en sel dans le réservoir. L'électroneutralité de la solution impose que dans ce réservoir, les concentrations en ion Na^+ et Cl^- soient identiques et égales à la concentration saline, soit $C_{so}= C_{Na}{}^{+}= C_{Cl}{}^{-}$. Dans la solution contenant les particules, nous appellerons C_s la concentration saline. Dans ce

compartiment, la concentration en ions Cl^- est égale à la concentration saline de la solution, $Cl^-=C_s$. En ce qui concerne les ions Na^+, leur concentration est donné par la concentration saline C_s, mais aussi par la concentration C_c des contre-ions des particules colloïdales.

Pour le compartiment I, si l'on suppose une solution saline idéale, le potentiel chimique des ions s'écrit sous la forme $\mu_{s0} = \mu^0_{s0} + kT \ln \gamma C_{s0}$ avec μ^0_{s0} leur potentiel chimique standard et γ leur coefficient d'activité supposé égal à 1. Pour le compartiment II, nous avons vu précédemment l'effet du potentiel électrostatique sur la distribution des ions Na^+ et Cl^- (voir Figure II-17). Du fait que ces ions sont en équilibre thermodynamique et ceci quelle que soit leur distance r par rapport aux colloïdes, on peut considérer que tous les ions Na^+ ont le même potentiel chimique. De cette façon, leur potentiel chimique peut être calculé simplement puisque loin du colloïde, nous avons supposé que le potentiel électrostatique devient nul. Si ϕ dénote la fraction de contre-ions située loin du colloïde (au bord de la cellule pour le modèle Poisson-Boltzmann réseau), le potentiel chimique des ions Na^+ devient: $\mu_{II}(Na^+) = \mu^0(Na^+) + kT \ln(\phi C_c + C_s)$. Pour des raisons identiques, le potentiel chimique des ions Cl^- s'écrit : $\mu_{II}(Cl^-) = \mu^0(Cl^-) + kT \ln C_s$.

Ainsi, l'équilibre ionique qui se traduit par l'égalité de leurs potentiels chimiques de part et d'autre de la membrane ($\mu_I(Na^+) + \mu_I(Cl^-) = \mu_{II}(Na^+) + \mu_{II}(Cl^-)$) est obtenu lorsque:

$$C_{s0}^2 = (\phi C_c + C_s) C_s \qquad \text{(II.10)}$$

On constate donc facilement que les concentrations salines dans les deux compartiments ne sont pas forcément identiques, C_{s0} pouvant être différente de C_s. La salinité dans le réservoir peut être en effet supérieure à la salinité dans la solution. C'est ce phénomène que l'on appelle effet Donnan.

b) Considérations pratiques

Pratiquement, afin de pouvoir négliger l'effet Donnan dans nos solutions, toutes les dialyses ont été réalisées pour des concentrations ioniques supérieures à 3 mM, et en solution diluée de particules. Le nombre de contre-ions C_c apportés par les particules est alors négligeable, et l'on obtient $C_s \approx C_{s0}$. Pour les solutions concentrées soit à l'aide d'une membrane, soit par stress osmotique (voir paragraphe III.B.1), l'équation (II.10) montre que la concentration saline de ces solutions diffère de la concentration C_{s0}. La détermination de cette

concentration reste problématique du fait qu'elle dépend de la valeur de ϕ. Cette fraction appelée coefficient osmotique peut être déterminée expérimentalement (Raspaud et al., 2000) ou calculée numériquement à partir du modèle Poisson-Boltzmann réseau.

II.B.3.3 Théorie de la pression osmotique en solution diluée

Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe II.B.3.1 et Figure II-20), la pression osmotique est égale à la surpression hydrostatique Π permettant de contrebalancer le flux de solvant. Elle peut être calculée directement à partir des conditions d'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire de l'égalité des potentiels chimiques du solvant dans les deux compartiments. Une autre approche consiste à utiliser la relation entre la pression osmotique et la compressibilité de la solution étudiée. Si χ dénote la compressibilité osmotique normalisée, on a:

$$\chi = \frac{1}{\beta}\left(\frac{\partial \Pi}{\partial \rho}\right)^{-1} \tag{II.11}$$

avec $\beta=1/kT$ et T la température en Kelvin et k la constante de Boltzman. $\rho=CN_A/M$ est la densité de particules dans la solution avec N_A le nombre d'Avogadro, M et C étant respectivement la masse molaire et la concentration (masse/volume) des particules.

La compressibilité osmotique est directement reliée à la fonction de distribution de paire g(r), par la relation:

$$\chi = 1 + \rho \int [g(r) - 1] dV \tag{II.12}$$

La fonction de distribution de paire g(r) correspond à la probabilité d'avoir deux particules séparées par la distance r. L'allure de g(r) renseigne directement sur l'ordre à courte distance présent dans la solution étudiée. En l'absence d'interactions g(r) = 1 pour toutes les valeurs de r. En présence d'interactions, cette fonction présente des pics plus ou moins marqués suivant l'ordre entre particules. Cette fonction peut alors être développée en puissance de la densité de particules ρ. On obtient la relation suivante :

$$g(r) = e^{-\beta V(r)} + \rho g_1(r) + ... \tag{II.13}$$

où V(r) est le potentiel d'interaction entre deux particules et $g_1(r)$ le terme contenant les interactions à trois corps.

Pour une concentration très faible en particules, ou en l'absence d'interactions, la pression osmotique de la solution s'écrit comme celle d'un gaz parfait:

$$\beta\Pi = \rho$$

En présence d'interactions, la pression osmotique peut être écrite en puissance de la densité de particules, par un développement du viriel:

$$\frac{\Pi}{\rho kT} = 1 + A_2\rho + A_3\rho^2 + \ldots \qquad \text{(II.14)}$$

où A_2 et A_3 sont les deuxième et troisième coefficients du viriel exprimés dans ce cas en $Å^3$ par particule. En combinant les équations (II.11), (II.12) et (II.13), et par identification à l'équation (II.14), on obtient l'expression du second coefficient du viriel, en fonction du potentiel d'interaction de paire V(r):

$$A_2 = \frac{1}{2}\int_0^\infty \left[1 - \exp(-\beta V(r))\right] 4\pi r^2 dr \qquad \text{(II.15)}$$

L'équation (II.15) montre clairement que lorsque les interactions entre particules sont répulsives (V(r)>0), le deuxième coefficient du viriel est positif. Au contraire, dans le cas d'interactions attractives, ce coefficient devient négatif.

Expérimentalement, les expériences de pression osmotique sont réalisées non pas en fonction de la densité de particules, mais en fonction de leur concentration C (en mg/ml). Pour ces raisons, nous utiliserons la relation :

$$\frac{\Pi}{CRT} = \frac{1}{M} + A_2^M C + A_3^M C^2 + \ldots \qquad \text{(II.16)}$$

A_2^M et A_3^M sont ici aussi les deuxième et troisième coefficients du viriel mais exprimés en $ml.mol.g^{-2}$, R étant égale à $k \times N_A$. La relation entre les deux types de second coefficient du viriel est:

$$A_2 = A_2^M \times 10^{24} \times M^2 / N_A \qquad \text{(II.17)}$$

II.B.4 Propriétés électrophorétiques

II.B.4.1 Principe de l'électrophorèse capillaire

La mobilité électrophorétique consiste à étudier les mouvements d'une particule chargée soumise à un champ électrique extérieur. La migration des particules peut s'effectuer dans différents types de supports. Dans ce travail, nous utiliserons l'électrophorèse capillaire : la migration des particules s'effectue dans un capillaire de quelques dizaines de micromètres de diamètre, généralement en silice. Au contact d'une solution aqueuse, ces surfaces de silice ont la propriété de devenir chargées négativement. Afin d'assurer l'électro-neutralité, une couche d'ions, appelés contre-ions, de signe opposé à celui du capillaire vient s'accumuler sur la surface. En l'absence de champ électrique appliqué, ces contre-ions diffusent dans la solution aqueuse. Lorsque l'on applique un champ électrique, leur migration vers l'électrode de signe opposé à celui de leur charge entraîne un déplacement du liquide. Ce phénomène est appelé électro-osmose. Lorsque le capillaire contient en plus une solution de particules chargées, la migration de ces particules est accélérée ou ralentie par le déplacement du liquide, selon que leur charge est de même signe ou de signe opposé à celui des contre-ions. La vitesse apparente v des particules est alors la somme de la vitesse propre des particules v_{NCP} et de la vitesse électro-osmotique du capillaire $v_{e.o.}$.

II.B.4.2 Notion de potentiel zêta

Nous avons vu précédemment que tout objet chargé est entouré de contre-ions qui assurent l'électro-neutralité de la solution. Lorsque l'on induit le déplacement d'une particule chargée, seuls les contre-ions les plus proches de la particule se déplacent avec elle. Par définition, on appelle plan de cisaillement le plan situé à une distance a_μ au delà de laquelle les contre-ions commencent à être mobiles par rapport au déplacement de la particule. La valeur du potentiel électrostatique en ce point est appelée potentiel zêta $\zeta = \psi(a_\mu)$.

II.B.4.3 Relation entre potentiel zêta et mobilité

Les expériences de mobilité électrophorétique permettent la détermination du potentiel zêta des particules étudiées. En effet, l'application d'un champ électrique sur une particule provoque son accélération. Cependant, la particule est freinée par les forces de viscosité qui

augmentent linéairement avec la vitesse. La particule atteint donc instantanément un état d'équilibre, dans lequel les forces électrique et visqueuse sont égales. L'équation de Stockes permet la détermination de la vitesse:

$$\vec{v} = \frac{\vec{F}_{el}}{6\pi\eta a}$$

η représente la viscosité locale de la solution étudiée, et $\vec{F}_{el}$ la force électrique appliquée. Dans le cas d'une particule isolée de valence Z, cette force peut s'écrire simplement $Z\vec{E}$. Sachant que $\mu = \vec{v} / \vec{E}$, on obtient alors l'expression de la mobilité en fonction de la charge de la particule :

$$\mu = \frac{Z}{6\pi\eta a} \qquad \text{(II.18)}$$

Dans le cas d'une particule ponctuelle, ou dans le cas d'une sphère telle que $\kappa a << 1$, la relation d'Hückel permet de relier la mobilité et le potentiel zêta (Hückel 1924) :

$$\zeta = \frac{3}{2}\frac{\eta\mu}{\varepsilon_0\varepsilon} \qquad \text{(II.19)}$$

Considérons maintenant le cas de plans ou de sphères tels que $\kappa a >> 1$. En utilisant les propriétés hydrodynamiques de la solution, on peut montrer que le liquide, à la distance x de la particule, se déplace à la vitesse $v(x) = \frac{\varepsilon_0\varepsilon}{\eta} E\Psi(x)$. Sachant que $\vec{v}(a_\mu) = \mu\vec{E}$ et $\psi(a_\mu) = \zeta$, on obtient alors l'expression de Smoluchowski entre le potentiel zêta et la mobilité de la particule :

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_0\varepsilon}\mu \qquad \text{(II.20)}$$

Les deux expressions précédentes, que ce soit l'équation de Hückel (équation (II.19)) ou de Smoluchowski (équation (II.20)) sont valables respectivement lorsque $\kappa a_\mu << 1$ ou $\kappa a_\mu >> 1$. Ces deux relations reposent de plus sur la résolution de l'équation de Debye-Hückel, valable uniquement dans le cas de potentiels faibles. Lorsque les potentiels considérés ne sont pas faibles ou lorsque les valeurs de κa_μ ne sont pas dans les deux cas limites, les deux relations précédentes (équations (II.19) et (II.20)) ne sont plus utilisables. De plus, l'application de ces

deux équations suppose que le champ électrique n'affecte pas la distribution de contre-ions au voisinage de la molécule. Dans le cas contraire, les relations précédentes ne peuvent plus être utilisées, et il n'existe plus de relation analytique simple entre la mobilité électrophorétique et le potentiel zêta. Dans le cas de particules sphériques chargées, seule la résolution numérique de l'équation du bilan des forces de O'Brian et White permet de convertir la mobilité en potentiel zêta quelle que soit la valeur de κa (O'Brian et White, 1978).

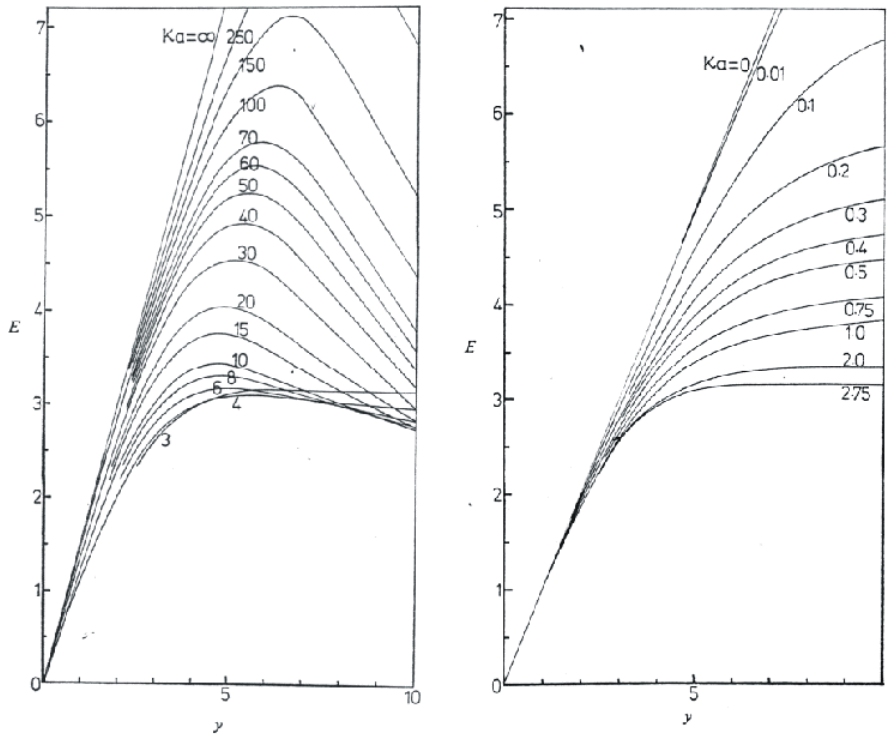


Figure II-21: Variation théorique de la mobilité réduite E, en fonction du potentiel zêta réduit y, pour différentes valeurs de κa (d'après O'Brian et White, 1978).

Pour une valeur de κa fixée, les valeurs de mobilité expérimentale exprimées en unités réduites $E=\frac{6\pi\eta e}{\varepsilon_0\varepsilon kT}\mu$, peuvent être traduites en potentiel zêta réduit: y=eζ/kT, en utilisant les courbes théoriques présentées sur la Figure II-21. Connaissant ainsi la valeur de κa, il est possible de convertir graphiquement la valeur de la mobilité en valeur de potentiel zêta.

CHAPITRE III

PREPARATIONS BIOCHIMIQUES ET OUTILS PHYSIQUES

Chapitre III PREPARATIONS BIOCHIMIQUES ET OUTILS PHYSIQUES

III.A Matériel

Les particules cœur de nucléosomes ont été préparées à partir de sang de poulet ou de thymus de veau. Les risques de dégradations des queues protéiques par les nucléases sont plus faibles quand on utilise le sang de poulet car sa teneur naturelle en protéase est faible, mais les rendements sont également très faibles.

Les premières préparations ont été réalisées à partir de thymus de veau acheté en boucherie. Par la suite, nous avons utilisé des thymus de veau directement prélevés aux abattoirs de Mantes-la-Jolie. Les thymus sont utilisés frais ou après conservation pendant quelques semaines à -20°C. Le sang de poulet a toujours été prélevé sur des poulets vivants (Ferme des Coteaux de l'Yvette ; Gometz-le-Chatel) et utilisé le jour même pour la préparation biochimique.

III.A.1 Préparation biochimique des particules cœur de nucléosome

Le principe de préparation des NCP est schématisé sur la Figure III-1, les détails des protocoles étant donnés en annexe. La première étape du protocole consiste à obtenir une population de noyaux cellulaires. Une première digestion grossière est réalisée à l'aide de nucléase de micrococque afin de fragmenter la chromatine avant rupture de l'enveloppe nucléaire, ce qui évite de manipuler des solutions trop visqueuses. La chromatine soluble est récupérée puis décondensée par extraction des protéines H1 en ajoutant une résine échangeuse d'ions (CM-Sephadex 50-120). A cette étape, il est important de vérifier la composition en histones de la solution, et en particulier l'absence des protéines H1 par électrophorèse, car l'ADN de liaison séparant les NCP doit être accessible aux nucléases.

Des tests sont menés lors de chaque préparation pour déterminer précisément le temps de digestion enzymatique et la concentration en enzymes optimaux pour l'obtention d'une solution de mononucléosomes. En effet, si le temps de digestion choisi est trop court (ou la quantité d'enzymes trop faible), la longueur d'ADN restant associée au NCP sera supérieure aux 146 pb. Si le temps est trop long (ou la quantité d'enzymes trop forte), l'ADN du NCP

commence à être digéré. La totalité de la chromatine est alors digérée dans les conditions déterminées lors des tests.

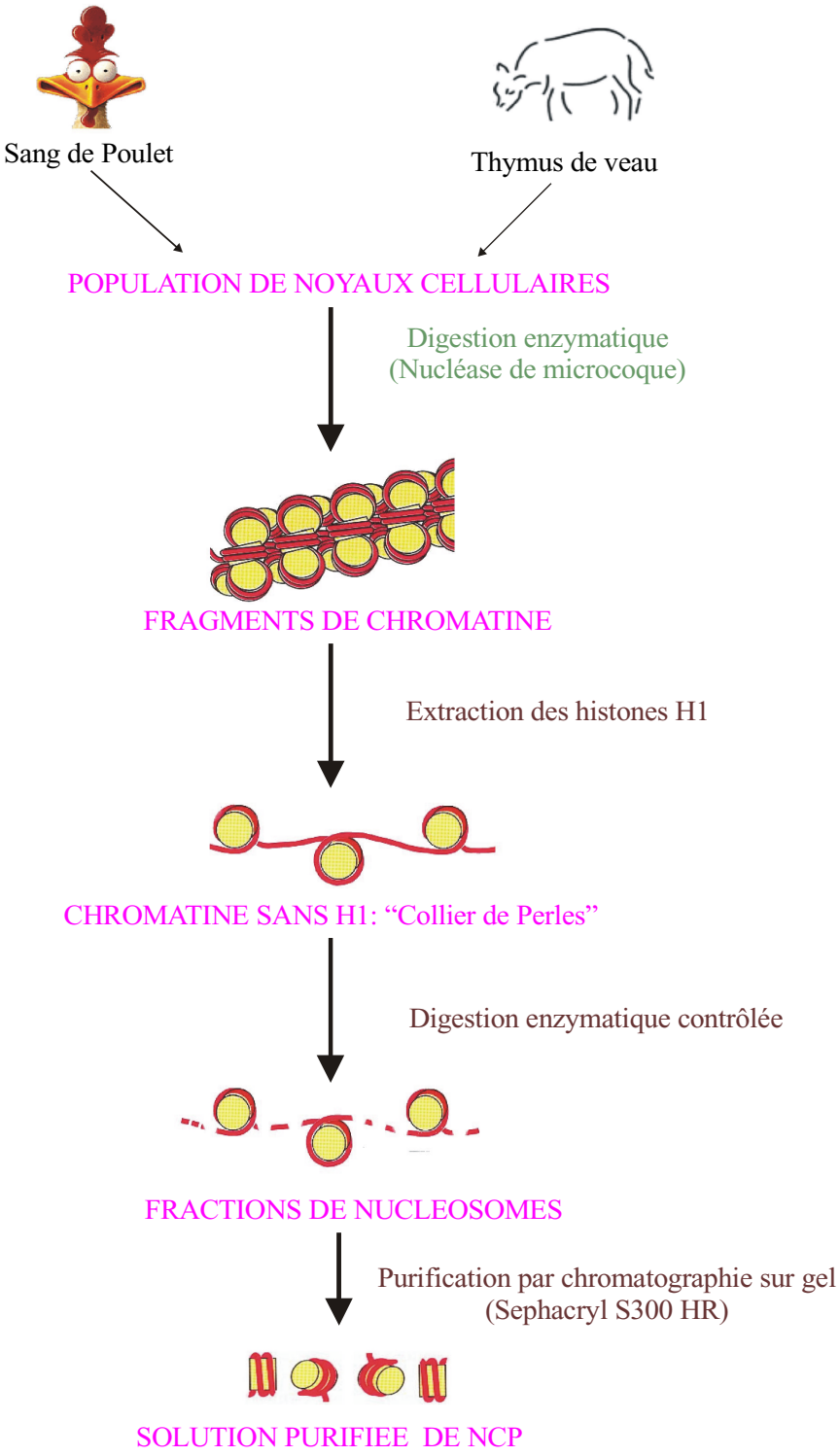


Figure III-1 : Principe de la méthode de préparation des NCP

La solution obtenue après digestion est purifiée par chromatographie sur gel (Sephacryl S300HR) afin d'éliminer les oligo-nucléosomes présents dans la solution. Un profil d'élution type, avec la composition moyenne de chaque fraction est présenté sur la Figure III-2. La composition de chacune des fractions collectées est vérifiée par électrophorèse retard sur gel de polyacrylamide 7,5%. Les fractions ne contenant que des mono-NCP sont regroupées et concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote pour obtenir une solution à 250 mg/ml. Cette solution stock est conservée à 0°C. Les concentrations en NCP sont déterminées après dilution d'une aliquote de la solution, par absorption U.V. à 260 nm en utilisant le coefficient d'absorption des NCP: A_{260} = 9,5 $cm^2.mg^{-1}$ (Ausio et al, 1984). Ce coefficient à été corrigé suivant les longueurs d'ADN associées aux cœurs d'histones. Pour des particules présentant une longueur d'ADN associée de 160 pb, ce coefficient devient A_{260} = 9,87 $cm^2.mg^{-1}$.

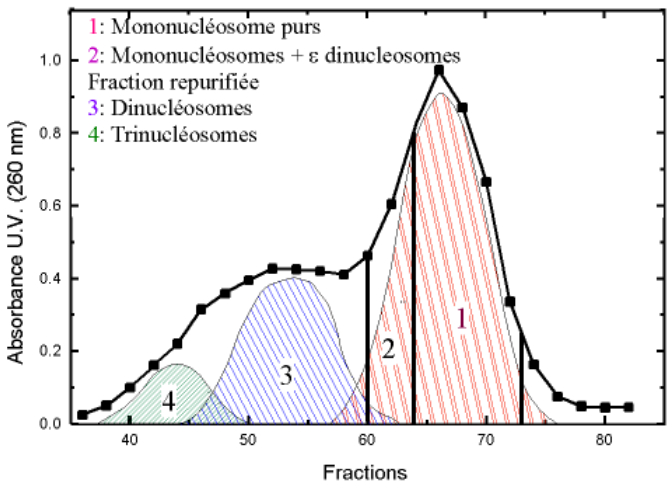


Figure III-2 : Profil d'élution type avec caractérisation de la composition des différentes fractions.

III.A.2 Caractérisation des solutions de particules cœurs de nucléosomes

Différents contrôles sont nécessaires afin de s'assurer de la qualité des échantillons. Ces contrôles sont effectués par différents types d'électrophorèse dont les protocoles détaillés sont présentés en annexe.

III.A.2.1 Stabilité des particules

L'intégrité des particules (absence de dissociation entre l'ADN et le cœur d'histones) est vérifiée par électrophorèse retard sur gel de polyacrylamide à 7,5%. L'électrophorèse est réalisée à 0°C sous une tension de 80V pendant 3 heures. Après migration, on utilise le Bromure d'ethidium (BET) qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN et devient fluorescent sous lumière UV, pour visualiser les différentes espèces moléculaires présentes dans le gel.

Une électrophorèse retard type est présentée sur la Figure III-3. La migration des complexes ADN-histones est comparée à celle des fragments d'ADN seuls. L'obtention d'une bande unique, retardée par rapport à la bande correspondant aux fragments d'ADN, montre qu'il n'y a ni contamination par des oligonucléosomes, ni présence d'ADN dissocié des particules cœur. Cette électrophorèse ne permet pas une détermination précise de la longueur d'ADN associée aux particules.

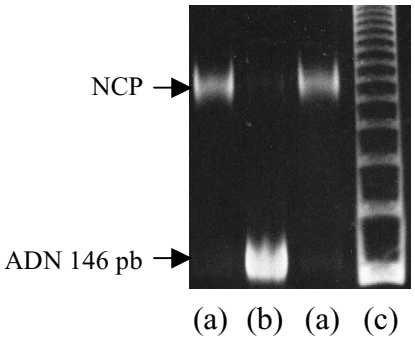


Figure III-3 : Gel d'électrophorèse "retard"
La solution de particules cœur de nucléosome (b) migre en une bande unique, retardée par rapport à l'ADN 146 pb extrait (a). L'ADN ladder 123 pb (c) est utilisé ici comme référence.

III.A.2.2 Longueur de l'ADN associé aux NCP

L'électrophorèse de l'ADN extrait des NCP est réalisée en routine sur gel de polyacylamide à 7% (Figure III-4). Dans certains cas, nous avons préféré utiliser des gels à 12% et un temps de migration beaucoup plus long pour obtenir une meilleure résolution des bandes. La longueur d'ADN est déterminée par comparaison avec un ADN de référence, ADN "ladder" de 123 pb et/ou 10 pb (Gibco BRL). Pour estimer la polydispersité de longueur des fragments d'ADN, nous avons utilisé le fait que la fluorescence du BET est proportionnelle à la masse de l'ADN contenue dans le gel (Maniatis et al, 1982). L'histogramme de l'intensité de

fluorescence le long de chaque piste est réalisé sur les gels photographiés puis numérisés. Il permet de quantifier cette polydispersité.

Aucune dégradation de l'ADN n'a été observée au cours de nos études, même quelques années après la préparation biochimique.

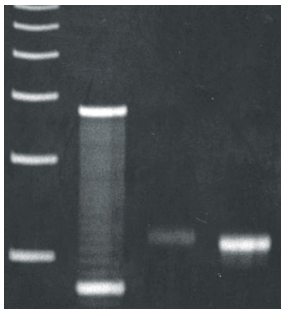


Figure III-4: Electrophorèse de l'ADN sur gel de polyacrylamide à 7%. La longueur des fragments d'ADN associés aux NCP (c) est déterminée par comparaison avec de l'ADN "ladder" de 123 et 10 pb (respectivement (a) et (b)).

III.A.2.3 Composition en histones

Le contrôle de la qualité des protéines du cœur s'effectue par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% en présence d'un agent dénaturant (SDS) (détail des protocoles en annexe). Cette électrophorèse sépare les protéines selon leur poids moléculaire. Après coloration au bleu de Coomassie, on obtient quatre bandes d'intensité égale correspondant aux quatre histones intactes : H2A, H2B, H3, H4, en quantité équimolaire dans la particule cœur du nucléosome (Figure III-5a). Cette électrophorèse permet également de vérifier l'absence d'autres contaminants, comme les histones H1(Figure III-5b).

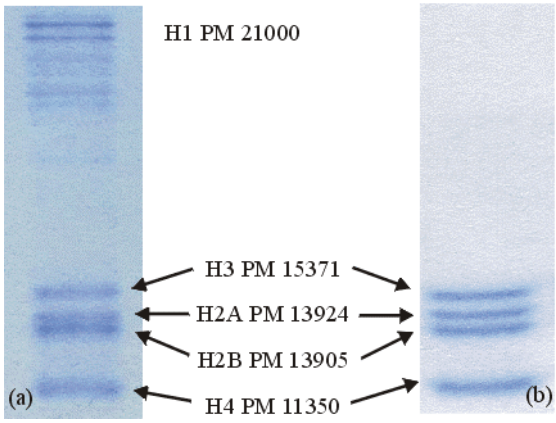


Figure III-5 Gel d'électrophorèse des protéines, après coloration au bleu de Coomassie.
a : Ensemble des 5 histones de référence.
b: Protéines des particules cœur de nucléosome.

Les "queues" des histones sont extrêmement sensibles aux attaques par les protéases. En cas de digestion protéique partielle d'une partie des NCP, l'intensité des bandes initiales diminue et de nouvelles bandes correspondant à des poids moléculaires plus faibles apparaissent. Au cours de ce travail, nous avons apporté une attention de plus en plus grande au contrôle de la qualité des protéines.

III.A.3 Différents lots de NCP utilisés

Sept préparations différentes de particules cœur de nucléosomes ont été effectuées durant ma thèse, dont les principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau III-1.

La plupart des préparations ont été réalisées à partir de thymus de veau, (lots 98I et 98III, 99I, 99II, 2000 et 2001). Les quantités de NCP purifiés varient d'environ 0,5g pour les premières préparations à plus de 2g pour les dernières. Ces rendements ne sont en aucun cas comparables à ceux obtenus à partir de sang de poulet (lot P99). Il fut en effet difficile d'obtenir 200 mg de NCP, à partir de 220 ml de sang (équivalent au sang de 3 poulets).

Les électrophorèses retard effectuées sur tous les lots ont montré que les complexes ADN-histones étaient intacts, avec une contamination de moins de 1% d'ADN libre dans les solutions. Quelques di-nucléosomes sont présents, mais dans des proportions inférieures à 1%.

Les électrophorèses ainsi que les profils d'intensité permettant la caractérisation précise des longueurs d'ADN associés aux particules sont présentés sur la Figure III-6.

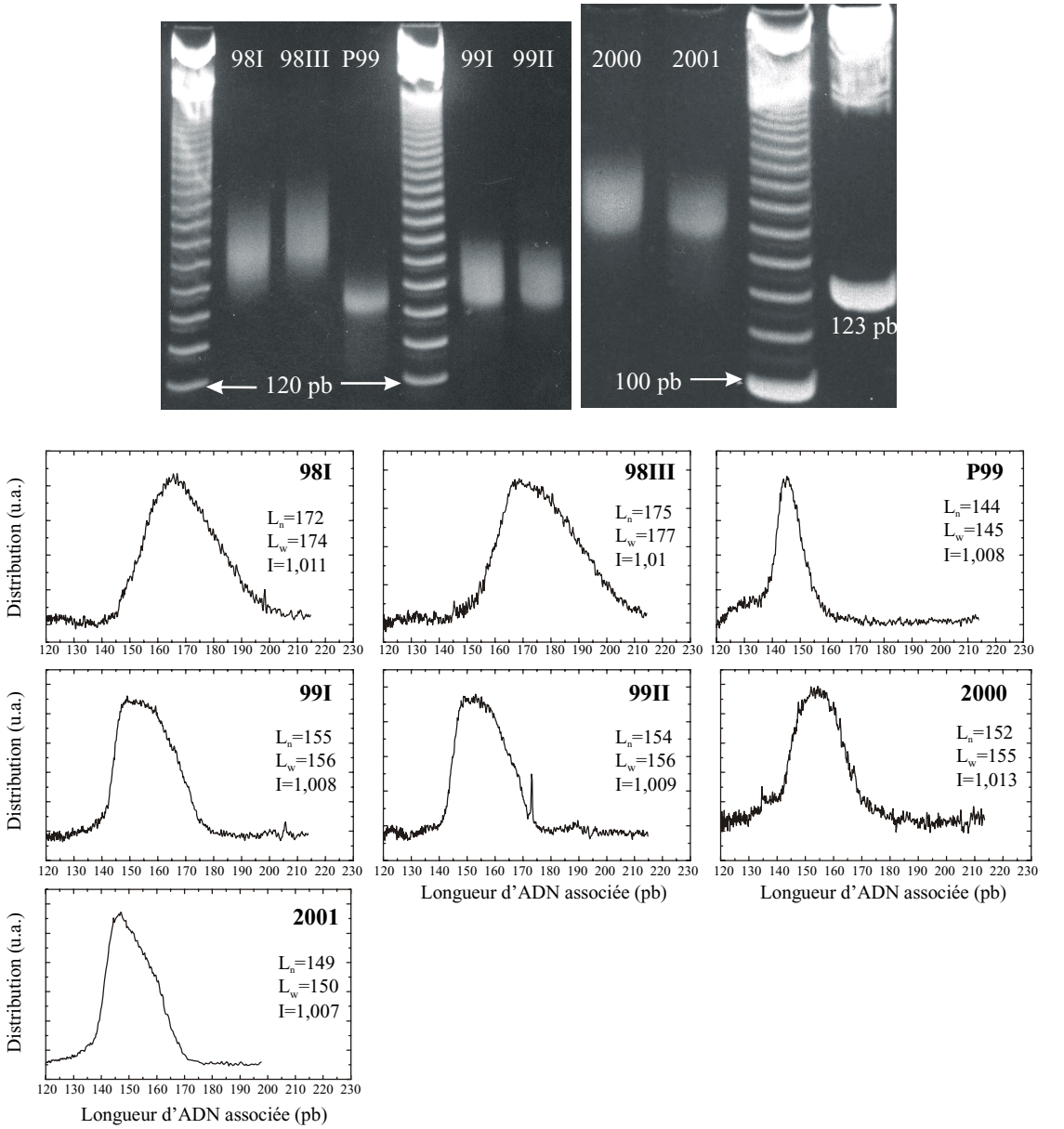


Figure III-6 : (a) Electrophorèse de l'ADN des différents lots de NCP sur gel de polyacrylamide 12 % et coloration au BET
(b) Profils de distribution des longueurs d'ADN pour les différents lots de NCP

Si l'on considère l'ADN comme un polymère, il est possible de définir une longueur d'ADN moyenne en poids (L_W) et en nombre de paires de bases (L_n). L'indice de polydispersité, I, est alors le rapport de ces deux nombres. Les résultats obtenus pour chaque lot sont présentés sur la Figure III-6b. Tous ces indices ont une valeur proche de 1, caractéristique d'une relativement faible polydispersité de l'ADN. Cette notation, très utilisée par la communauté des polymeristes, n'est pas très pratique dans notre cas. Nous préférons parler en longueur moyenne d'ADN et quantifier la polydispersité en paires de bases, même si les profils de distribution présentés sur la Figure III-6b ne sont pas symétriques. Nous

considérons que le lot P99, préparé à partir de sang de poulet, présente une longueur d'ADN de 145 ± 3 pb. Les lots 99I, 99II et 2000 sont pratiquement identiques avec une longueur d'ADN de 155 ± 7 pb. Le lot 2001, présente la même longueur moyenne, mais la polydispersité de ce lot est plus faible: 155 ± 4 pb. Les lots 98I et 98III présentent une plus grande longueur d'ADN, respectivement: 165 ± 10 et 170 ± 15 pb.

Chaque cœur d'histones protège un fragment d'ADN de 146 pb contre l'activité des enzymes mais cette protection n'est pas totale. Si on poursuit la digestion, l'ADN du cœur commence à être attaqué. Lors des premières préparations, nous avons craint de dépasser cette "barrière" des 146 paires de bases. Les fragments ont alors une longueur moyenne supérieure à 146 pb et leur polydispersité est importante. L'expérience acquise lors des préparations successives nous a permis d'ajuster plus finement les conditions de digestion pour obtenir les longueurs désirées. Il a quelquefois été nécessaire de préparer des échantillons identiques à ceux des lots précédents pour poursuivre une série d'expériences. Si nous n'avions à l'origine pas délibérément choisi de préparer des NCP avec des longueurs d'ADN associées différentes, nous verrons plus loin que ces différents lots nous ont permis de comparer l'effet des longueurs de l'ADN sur les propriétés des solutions.

Lorsque l'on travaille sur des particules cœurs de nucléosome, la principale difficulté est de réussir à garder les protéines, et plus exactement les queues des histones, intactes. Les électrophorèses des protéines correspondant aux différents lots sont présentées sur la Figure III-7.

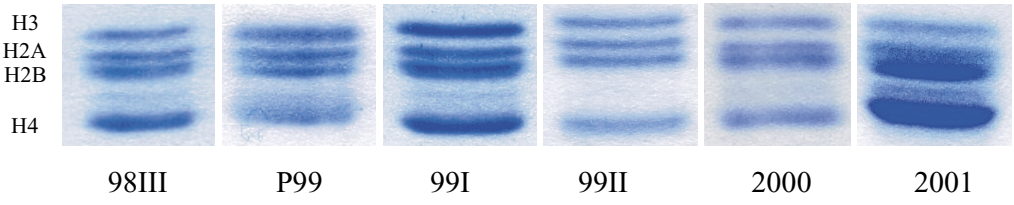


Figure III-7 : Gel d'électrophorèses des protéines des différents lots de NCP à l'issue de la préparation biochimique après coloration au bleu de Coomassie (remarque: ces études sont réalisées sur des gels différents avec des temps de migration variables).

A l'exception du lot 2001, 4 bandes majoritaires correspondant aux quatre histones H2A, H2B, H3, H4 sont visibles. Une bande additionnelle très minoritaire devient visible lorsque les quantités de protéines déposées dans chaque puits sont supérieures à 2 μg (très visible sur

le lot 99I). Cette bande révèle la présence de protéines contaminantes à l'état de traces (éventuellement dues à une dégradation partielle de certaines queues des histones pour une faible fraction de NCP dans la solution). Sa très faible intensité la rend négligeable. On peut remarquer que le lot préparé à partir de sang de poulet ne présente aucune différence notable par rapport aux lots préparés à partir de thymus de veau. Dans le lot 2001, on note une intensité relative des bandes qui s'écarte de l'équimolarité. Il apparaît clairement que certaines histones ont subi une dégradation. Les faibles décalages de mobilité électrophorétique, traduisant une faible variation des poids moléculaires, nous laissent supposer que ces dégradations sont limitées aux queues. Nous ne sommes pas capables pour l'instant d'expliquer les raisons de la mauvaise qualité des protéines de ce lot. Un nouveau type d'électrophorèse réalisé avec une coloration des protéines à l'argent semble montrer que seul la queue H3 est dégradée.

Nous ne disposons malheureusement pas de l'électrophorèse des protéines du lot 98I. Cependant, les autres lots, préparés dans la même période et dans les même conditions ne présentent aucune dégradation au moment de leur purification. Nous avons fait l'hypothèse que les histones de ce lot étaient de bonne qualité.

Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de dégradation au cours des expériences.

Toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions ioniques préservant la stabilité des NCP dans du tampon TE (Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA). L'EDTA, en complexant les ions divalents éventuellement présents dans la solution, inhibe l'activité d'enzymes qui pourraient digérer les échantillons.

Lots	Dates de préparation	Source	Quantité de NCP après purification	Longueur d'ADN associée aux NCP	Histones au moment de la préparation	Expériences
98 I	Janvier 1998	Thymus (boucherie)	≈ 0,5g	165 ± 10	Pas d'électrophorèse des protéines	➢ Diffusion X (solutions diluées) D24 Mars 98
98 III	Février 1998	Thymus (Boucherie)	≈ 0,5g	170 ± 15	Pas de dégradation	➢ Diffusion X (solutions diluées) D24 Juin 98 Pas d'exploitation des données (ADN trop polydisperse) ➢ Diffraction X (phases denses) D43 Mars 99
P 99	Juin 1999	Sang de poulet (Abattoirs)	200 mg	145 ± 3	Pas de dégradation	➢ Diffusion X (solutions diluées) D24 Juillet 99
99 I	Septembre 1999	Thymus (Abattoirs)	1,2g	155 ± 7	Pas de dégradation	➢ Osmométrie (osmomètre à membrane; solutions diluées) ➢ Mobilité électrophorétique ➢ Préparations pour microscopie optique
99 II	Décembre 1999	Thymus (Abattoirs)	1,9 g	155 ± 7	Pas de dégradation	➢ Diffraction X (phases denses) D24 Septembre 2000 ➢ Diffraction X (phases denses) D24 Mars 2000
2000	Mars 2000	Thymus (Abattoirs)	1,3 g	155 ± 7	Pas de dégradation	➢ Osmométrie
2001	Février 2000	Thymus (Abattoirs)	2,2 g	155 ± 4	H3 dégradée	➢ Osmométrie (Suite)

Tableau III-1: Récapitulatif des caractéristiques des différents lots de NCP, et expériences réalisées avec chacun d'eux.

III.B Méthodes expérimentales

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser des approches physiques pour étudier les propriétés des particules cœurs de nucléosomes en solution diluée, mais aussi en milieu dense. Deux techniques ont été principalement utilisées : la diffusion/diffraction des rayons X, et les techniques d'osmométrie.

Nous avons fait varier la concentration en sel ajouté de la solution sur une large gamme de concentration, de quelques millimolaires à 1M. Des expériences s'appuyant sur les principes d'osmométrie ont également été utilisées pour concentrer les échantillons en maintenant constant l'environnement ionique.

III.B.1 Osmométrie

Les mesures de pression osmotique permettent la mesure des forces d'interaction entre particules, qu'elles soient en solutions diluée ou concentrée. Comme nous l'avons vu précédemment, cette pression dépend fortement des concentrations en particules et en sel dans la solution.

III.B.1.1 Techniques et montages expérimentaux utilisés

Suivant la gamme de concentration en particules, deux procédés permettent de relier la pression osmotique et la concentration en NCP de la solution:

- Pour les faibles pressions, la concentration en particules de la solution à étudier est connue, et l'on mesure la pression exercée par cette solution sur une paroi (souvent à l'aide d'un capteur de pression).
- Pour les pressions supérieures, il est nécessaire de réaliser des expériences de stress osmotique. Dans ce cas, on impose une pression connue à la solution étudiée, et l'on détermine ensuite la concentration de la solution, lorsque l'équilibre est atteint. Ces mesures ont été réalisées à 4°C.

Nous avons donc utilisé différents montages expérimentaux dont les principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau III-3.

a) Osmomètre à membrane

Pour les faibles valeurs de pressions, de 10 à 2.10^3 Pa (soit 100 à 2.10^4 dynes/cm^2), nous utilisons un osmomètre à membrane KNAUER (ref A0330). Cet appareil est constitué de deux parties séparées par une membrane semi-perméable. La partie inférieure de la cellule est remplie de tampon de référence, tandis que la solution à étudier, de concentration connue, est insérée dans la partie supérieure à l'aide d'une seringue. Les volumes des deux compartiments sont fixés. La pression osmotique est mesurée dans la solution de référence par un capteur piézo-électrique qui la convertit en signal électrique. Techniquement, nous utilisons une membrane dont le seuil de coupure est de 20kD (Knauer A0547). Chaque mesure de pression nécessite l'injection d'au moins 70 µl de solution. Cette mesure est répétée plusieurs fois afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures.

b) "Stress osmotique"

Dans les expériences de "stress osmotique" classiques, la solution de solvant pur (contenu dans le compartiment (I), voir Figure II-20) est remplacée par une solution de polymère neutre, généralement du polyéthylène glycol (PEG) ou du dextran. La solution stressante exerce alors sur l'échantillon une pression qui dépend de la concentration en polymère. A l'équilibre, cette pression est équilibrée de part et d'autre de la membrane, et l'on mesure la concentration en particules dans l'échantillon. La méthode classique consiste à placer un boudin de dialyse rempli avec une solution de particules, dans une solution réservoir de polymère. Cette méthode nécessite des volumes d'échantillons supérieurs à 1 ml, pour que l'équilibre se fasse correctement. Par conséquent, les quantités de NCP requises pour mettre en œuvre cette méthode sont trop importantes. Nous avons donc mis au point d'autres méthodes, moins coûteuses en matériel, mais permettant néanmoins un contrôle précis de la pression.

Pour les pressions immédiatement supérieures à celles que l'on mesure avec l'osmomètre, nous utilisons une méthode basée sur l'hydrostatique et dont le principe est schématisé sur le Tableau III-3. Une cellule Amicon est montée à l'aide d'une membrane semi-perméable de 100kD laissant librement passer les ions. Cette cellule est équipée à sa sortie d'un tuyau de longueur variable. La différence de hauteur entre la solution de tampon dans le réservoir et la solution de NCP exerce sur cette dernière une dépression. A l'équilibre, cette dépression est égale à la pression osmotique de la solution. En théorie, cette technique ne présente pas de

valeurs limites minimale et maximale. Cependant, afin de limiter les erreurs de mesure, la hauteur minimum que nous considérons est de 10 cm. La hauteur de notre chambre froide étant de 2m50, la hauteur maximale généralement imposée est donc de 2 mètres. Néanmoins, des expériences réalisées avec une différence de hauteur de 4 mètres ont été réalisées sans aucun problème. Cette méthode permet donc d'imposer des pressions de 10^3 à 2.10^5 Pa (soit 10^4 à 2.10^5 dyn/cm^2), sans ajout de polymère stressant.

Techniquement, la solution de NCP est dialysée à une concentration de 1 mg/ml dans un boudin de dialyse contre la solution saline souhaitée. Cette solution est introduite dans la cellule Amicon (A8003) de volume maximum égal à 3 ml. La différence de hauteur est fixée. De manière générale, l'équilibre est atteint en une journée. La concentration en NCP est mesurée par absorption U.V. après dilution d'une aliquote de la solution à l'équilibre. Afin de minimiser les erreurs de mesure, la dilution est réalisée par pesée pour les échantillons ayant une concentration supérieure à 200 mg/ml .

Pour la gamme de pression supérieure, nous utilisons la même cellule Amicon, mais, la pression est exercée par un gaz d'azote. Pour les valeurs de pressions comprises entre 10^4 et $1{,}5.10^5$ Pa (soit 10^5 à $1{,}5.10^6$ dyn/cm^2), nous avons utilisé un manomètre double détente (Air liquide) permettant une grande précision. Les valeurs de pression supérieures ont été obtenues à l'aide d'un simple détenteur. Cette méthode a été utilisée pour une gamme de pressions de 10^4 à 4.10^5 Pa (soit 10^5 à 4.10^6 dyn/cm^2), la limite maximum étant imposée par la résistance de la membrane. Le temps d'équilibre de ces échantillons dépend de la viscosité de la solution finale. Il varie de 3 jours à un peu plus d'une semaine. A l'équilibre, la mesure de la concentration en NCP est réalisée comme précédemment par absorption U.V.

La méthode précédente n'est plus utilisable quand on veut appliquer une pression supérieure à 4.10^5 Pa (4.10^6 dyn/cm^2), c'est-à-dire en particulier quand on veut obtenir des phases très denses de NCP. Dans ce cas, la seule méthode ne requérant pas des quantités trop importantes en NCP consiste à ajouter directement la solution de PEG dans la solution de NCP sans utilisation de membrane de séparation. Polymère et NCP étant incompatibles, ils s'excluent mutuellement et se concentrent chacun dans une phase. Techniquement, environ 15 µl de la solution de NCP sont introduits dans le fond d'un capillaire en quartz utilisé pour les expériences de rayons X. On rajoute directement au-dessus de cette solution environ 200 µl

d'une solution de PEG. Pour éviter que la pression imposée ne dépende du lot de polymère utilisé et en particulier de sa polydispersité, il est important de se placer en régime semi-dilué ou concentré. Dans ces gammes de concentration en polymère, la pression imposée devient alors indépendante de la masse des polymères et donc du lot. Les valeurs de la pression osmotique en fonction de la concentration en polymère, disponibles sur la page internet http://dir.nichd.nih.gov/Lpsb/docs/osmdata/osmdata.html, sont présentées sur le Tableau III-2. Pour ces échantillons, la concentration à l'équilibre est obtenue par diffraction des rayons X, un à plusieurs mois après la préparation. Cette méthode présente des inconvénients qui seront discutés dans le Chapitre IV, mais toute autre technique était inenvisageable en raison des quantités de NCP requises, trop importantes.

Concentration (Poids)	12%	19%	23%	25,5%	28%	35%
Pression (Pa)	$1{,}6.10^5$	$4{,}7.10^5$	$7{,}6.10^5$	1.10^6	$1{,}3.10^6$	$2{,}3.10^6$

Tableau III-2 Pression exercée par une solution de PEG 20000 MW, en fonction de sa concentration.

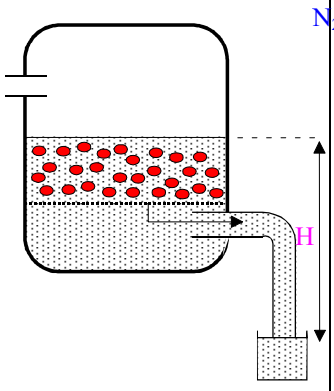
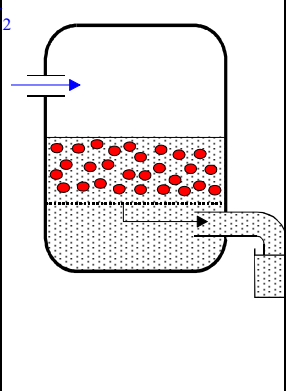
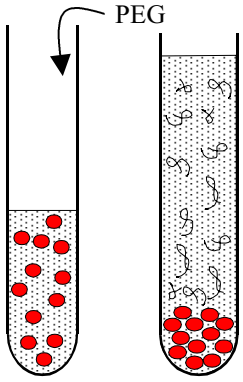
Méthodes	Osmomètre à membrane	Pression hydrostatique	Pression d'azote	Stress osmotique
				
Gamme de pression	10 à 2.10^3 Pa	1.10^3 à 4.10^4 Pa	1.10^4 à 4.10^5 Pa	4.10^5 à 4.10^6 Pa
Hauteur d'eau équivalente H	0,1 à 20 cm	10 cm à 4 m	1 à 40 m	40 à 400 m

Tableau III-3 : Différentes méthodes de mesure de la pression osmotique

III.B.1.2 Préparation des échantillons

Toutes les mesures d'osmométrie effectuées avec l'osmomètre à membrane ont été réalisées avec le même lot de nucléosomes : lot 99I. Ce lot présente une longueur d'ADN associée de 155 ± 7 pb. La solution stock a été dialysée contre une solution de faible salinité (TE 10 mM). Les différentes concentrations salines étudiées ont ensuite été obtenues par dialyse à faible concentration en particules contre le tampon souhaité ce qui permet de négliger l'effet Donnan et donc de connaître précisément la concentration en sel ajouté dans la solution. Pour chaque concentration saline, les échantillons sont ensuite concentrés par ultrafiltration sous pression d'azote dans une cellule Amicon de 3 ml de volume (cellule 8003, membrane YM100).

Les expériences de "stress osmotique" ont nécessité une grande quantité de matériel. Nous avons d'utilisé quatre lots de NCP : 99I, 99II, 2000, et 2001. Les trois premiers lots sont pratiquement identiques, avec une longueur d'ADN associée de 155 ± 7 pb; le lot 2001 est moins polydisperse : 155 ± 4 pb. Les solutions diluées de NCP (quelques mg/ml) sont dialysées contre une solution de concentration saline désirée, puis concentrées en utilisant les différentes méthodes précédemment décrites. Pour les pressions osmotiques les plus élevées, nous avons du réaliser des expériences de stress osmotique en capillaire. Leur préparation sera décrite dans le chapitre consacré à l'analyse des solutions concentrées.

III.B.2 Mobilité électrophorétique

Nous avons utilisé l'électrophorèse capillaire pour mesurer le potentiel zêta des particules cœurs de nucléosomes.

III.B.2.1 Electrophorèse capillaire: principe de la mesure

Sous champ électrique, les contres-ions se déplacent vers l'électrode de signe opposé à celui de leur charge ce qui entraîne un déplacement du liquide appelé électro-osmose. La vitesse apparente v des particules est alors la somme de la vitesse propre des particules v_{NCP} et de la vitesse électro-osmotique du capillaire $v_{e.o.}$. Expérimentalement, cette vitesse est obtenue en mesurant le temps de migration T, nécessaire à une particule pour se déplacer sur une

distance fixée ℓ ($v=\ell/T$). Comme la mobilité est par définition égale à $\mu= v/E$, où E représente le champ électrique extérieur appliqué, la mobilité apparente mesurée est égale à :

$$\mu=\mu_{e.o.}+\mu_{NCP}$$

Si l'on considère une différence de potentiel (ddp) ΔV appliquée sur toute la longueur L du capillaire, la définition de la mobilité électro-osmotique peut être réécrite :

$$\mu_{e.o.} = \frac{\ell L}{T_{e.o.}\Delta V} \qquad \text{(III.1)}$$

De la même manière, la mesure du temps de migration apparent des NCP permet la détermination de la mobilité des particules :

$$\mu_{NCP} + \mu_{e.o} = \frac{\ell L}{T_{NCP}\Delta V} \qquad \text{(III.2)}$$

III.B.2.2 Techniques et montages expérimentaux

Toutes les expériences ont été réalisées à l'ESPCI en collaboration avec C. Tribet en utilisant un système d'électrophorèse capillaire BECKMAN P/ACE-MDQ. Le temps de migration est déterminé par absorbance UV à 200 et/ou 260 nm et la distance ℓ est égale à 21 cm.

Pour les concentrations salines inférieures à 75 mM, les expériences ont été réalisées en utilisant un simple capillaire en silice de 75 μm de diamètre, d'une longueur totale L de 31 cm. Dans ces conditions, les contre-ions (positifs) du capillaire créent une électro-osmose relativement importante. Les NCP, bien que chargés négativement, sont alors entraînés par l'électro-osmose vers l'électrode négative, mais ralentis à cause de leur propre charge. Le temps de migration de l'électro-osmose est déterminé en utilisant comme référence une molécule neutre : l'oxyde de mésythyl.

Pour les concentrations salines supérieures à 75 mM, aucun signal n'est détecté en sortie de capillaire, laissant supposer l'adsorption des NCP sur les surfaces. Afin d'éviter cette adsorption, nous avons utilisé des capillaires en silice recouvert de PEG 400000 MW. La longueur du capillaire est inchangée, mais afin d'éviter une augmentation de chaleur excessive, le diamètre a été réduit à 25 μm. L'électro-osmose étant très faible dans ces

conditions, les NCP migrent vers l'électrode positive. Afin de permettre la mesure du temps de déplacement, la migration est effectuée sous champ électrique inversé. La cohérence de chaque mesure réalisée avec le capillaire contenant le PEG, est vérifiée en injectant deux solutions de référence (un mélange de 4-hydroxy benzoique et de 4-hydroxyphenyl (Beckman) et une solution d'azide de sodium (Sigma)) de mobilité électrophorétique préalablement connue.

III.B.2.3 Préparation des échantillons

Toutes les expériences ont été effectuées en utilisant le lot 99I de NCP. Les différentes concentrations salines souhaitées sont obtenues comme précédemment par dialyse d'une partie de la solution stock à 1 mg/ml, contre un réservoir de la solution de concentration saline désirée. Les concentrations salines étudiées varient de 3,5 mM à 500 mM. Pour chaque concentration ionique, la concentration en particules est obtenue en concentrant la solution de NCP par ultrafiltration sous pression d'azote. La valeur de la concentration utilisée lors des expériences dépend de la concentration saline étudiée, et varie de 1 mg/ml pour les plus faibles concentrations salines à 7-10 mg/ml pour les concentrations supérieures à 100 mM.

III.B.3 Diffusion et diffraction des rayons X

III.B.3.1 Rappels théoriques

Dans ce chapitre, nous allons rappeler brièvement les principes de bases de la diffusion et de la diffraction des rayons X. L'ouvrage de référence dans ce domaine est le livre de A. Guinier (1956).

a) Principes généraux

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de l'angström. Ils sont particulièrement bien adaptés à l'étude des structures, puisque les distances interatomiques sont elles aussi de l'ordre de grandeur de l'angström. Lorsqu'un faisceau de rayons X interagit avec la matière, il se produit de nombreux phénomènes : absorption du faisceau, diffusion élastique, effet compton et effet photoélectrique. Dans ce travail, nous considérons uniquement la diffusion élastique pour laquelle il n'y a pas de changement de longueur d'onde entre l'onde incidente et l'onde diffusée. C'est un phénomène primordial

puisque, dans ce cas, tous les atomes forment un ensemble de diffuseurs cohérents, les ondes qu'ils diffusent pouvant interférer.

i) Diffusion par un électron

- Electron libre

Un électron libre placé dans une onde électromagnétique se met à osciller, et émet alors dans toutes les directions de l'espace des radiations électromagnétiques de même longueur d'onde que l'onde incidente. Si le faisceau incident n'est pas polarisé, l'intensité diffusée à la distance r de l'électron, est donnée par la formule de Thomson (Guinier, 1956)

$$I = \frac{I_e}{r} = \frac{I_0}{r^2} r_e^2 \left(\frac{1+\cos^2 2\theta}{2}\right)$$

où I_0 est l'intensité du faisceau incident, 2θ l'angle de diffusion, c'est-à-dire l'angle entre faisceau incident et faisceau diffusé. Dans cette expression, la quantité $r_e = (\mu_0/4\pi)(e^2/m)$ (e et m étant respectivement la charge et la masse de l'électron) a les dimensions d'une longueur et est appelée rayon classique de l'électron ou longueur de diffusion de Thomson. Sa valeur numérique est $0{,}2818.10^{-12}$ cm. On voit sur ces expressions que l'intensité diffusée par un proton serait négligeable devant celle diffusée par un électron. Par conséquent, seuls les électrons interviennent dans la diffusion des rayons X par la matière.

En fait, le rayonnement diffusé n'est pas simple, car seule une partie de ce rayonnement a la même longueur d'onde que le rayonnement incident. Une autre partie a une longueur d'onde légèrement supérieure, c'est la diffusion Compton que nous ne considérerons pas. En effet, les ondes diffusées par effet Compton n'interfèrent jamais. Elles sont incohérentes.

- Electron lié

Pour un électron lié, il faut avoir recours à la mécanique ondulatoire pour exprimer l'intensité diffusée. En mécanique ondulatoire, l'électron ponctuel est remplacé par la densité électronique $\rho(\vec{r})$ de l'électron considéré. Les ondes élémentaires diffusées par les éléments de volume, de charge $\rho(\vec{r})dv$, interfèrent, conduisant à l'intensité diffusée cohérente :

$$I = f^2 I_e$$

I_e étant donnée par l'expression de Thomson, et

$$f = \int \rho(\vec{r}) \exp[-(\vec{q}_1 - \vec{q}_0).\vec{r}]dv \qquad \text{(III.3)}$$

$\vec{q}_0$ et $\vec{q}_1$ sont les vecteurs d'onde des ondes incidente et diffusée respectivement, de norme $2\pi/\lambda$, λ étant la longueur d'onde du faisceau incident (Figure III-8). f est appelé le facteur de diffusion de l'électron atomique. Si la fonction d'onde électronique a une symétrie sphérique, f ne dépend que de $\sin\theta/\lambda$.

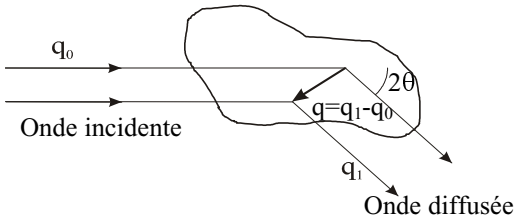


Figure III-8: Principe de l'interaction entre un faisceau de rayon X et la matière

ii) Diffusion par un atome à plusieurs électrons

Dans le cas de la diffusion par un atome, on admet que la densité électronique totale est la somme des densités électroniques des différents électrons. En ce qui concerne la diffusion cohérente, les amplitudes des ondes diffusées par les Z électrons s'ajoutent et l'intensité diffusée totale prend la forme :

$$I = f^2 I_e = \left(\sum_i^Z f_j^2 \right) I_e$$

où f_j est le facteur de diffusion de l'électron j. f est appelé facteur de diffusion de l'atome.

iii) Diffraction par une molécule

Lorsqu'une molécule est placée dans un faisceau de rayons X, chaque atome participe au processus de diffusion. L'interférence entre toutes les ondes diffusées provoque le phénomène de diffraction. Si les différents atomes A_1, A_2,…, A_j de la molécule sont repérés par les vecteurs $\vec{r}_1, \vec{r}_2, ..., \vec{r}_j$, par rapport à une origine arbitraire, l'amplitude totale diffusée par la molécule s'exprime suivant la relation: $F(\vec{q}) = \sum_j f_j \exp(-\vec{q}.\vec{r}_j)$, où les f_j sont les facteurs de diffusion atomique et $q = \vec{q}_1 - \vec{q}_0$ (voir Figure III-8) est le vecteur de diffusion. $F(\vec{q})$ est traditionnellement appelé le facteur de structure de la molécule, et peut être exprimé en fonction de la densité électronique $\rho(\vec{r})$ de la molécule, par une équation similaire à (III.3):

$$F(\vec{q}) = \int \rho(\vec{r}) \exp(-i\vec{q}.\vec{r}) dv \qquad \text{(III.4)}$$

L'intensité diffractée est alors: $I(\vec{q}) = I_e \left|F(\vec{q})\right|^2$. Elle dépend des distances entre atomes au sein de la molécule.

b) Diffraction par un cristal

Dans un cristal, les molécules (ou atomes) sont rangées de façon périodique. A tout point du cristal, on peut faire correspondre une infinité d'autres points, présentant autour d'eux des atomes identiques, positionnés aux mêmes distances et dans les mêmes directions. Ces points sont définis par les translations: $\vec{r} = x\vec{a} + y\vec{b} + z\vec{c}$, où x, y et z sont des entiers. Si l'on choisit une origine fixe, l'ensemble des extrémités de tous les vecteurs $\vec{r}$ constituent le réseau cristallin. Le cristal est la répétition dans les trois directions $\vec{a}, \vec{b}$ et $\vec{c}$ de l'espace, de la maille élémentaire construite suivant ces trois mêmes vecteurs. Un cristal se caractérise également par un ensemble d'opérations de symétrie, qui définissent le groupe d'espace.

Lorsque l'on envoie un faisceau de rayons X sur un cristal, la périodicité de celui-ci implique que les interférences entre les ondes diffusées par les différentes molécules du cristal sont destructives, sauf dans des directions privilégiées de l'espace vérifiant les trois conditions :

$$\vec{a}.\vec{q} = 2\pi h \qquad \vec{b}.\vec{q} = 2\pi k \qquad \vec{c}.\vec{q} = 2\pi l$$

Les trois équations précédentes sont les équations de Laue, dans lesquelles h,k et l sont des nombres entiers appelés indices de Miller. Chaque vecteur de diffusion $\vec{q}$ vérifiant les équations de Laue peut s'écrire sous la forme $\vec{q} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$, où $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$ sont les vecteurs de base d'un réseau fictif, le réseau réciproque. On passe facilement du réseau réel au réseau réciproque par les relations:

$$\vec{a}^* = 2\pi \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{V_c} \qquad \vec{b}^* = 2\pi \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{V_c} \qquad \vec{c}^* = 2\pi \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{V_c}$$

où V_c est le volume de la maille élémentaire du cristal.

L'intensité diffractée dans la direction repérée par le vecteur de diffusion $\vec{q} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$, s'exprime sous la forme : $I_{hkl} = I_e |F_{hkl}|^2$, le facteur de structure F_{hkl} étant donné par :

$$F_{hkl} = \sum_j f_j \exp\left[2i\pi(x_j h + y_j k + z_j l\right]$$

(x_j, y_j, z_j) représente la position de l'atome j dans la maille, et f_j son facteur de diffusion atomique.

c) Diffusion des rayons X aux petits angles

Nous venons de voir que lorsqu'un cristal est soumis à une onde monochromatique, cette onde est diffractée dans les directions définies par les vecteurs de diffusion $\vec{q}$ satisfaisant aux équations de Laue. Dans le cas de matériaux désordonnés, comme par exemple une solution, cette condition est vérifiée uniquement pour $\vec{q}$ =0, dans la direction du faisceau incident. En réalité, les matériaux ne sont jamais complètement désordonnés et tous présentent des fluctuations de densité électronique à plus ou moins longue distance. Ils diffusent alors dans une région de l'espace réciproque proche de q=0, c'est-à-dire dans la région des petits angles de diffusion. L'étude de l'intensité diffusée dans cette zone permet d'obtenir des informations sur l'ordre résiduel ou sur les fluctuations de densité électronique. Ainsi, la diffusion des rayons X aux petits angles est une technique de basse résolution permettant d'obtenir des informations structurales sur les particules étudiées par le biais des inhomogénéités de densités électroniques. C'est en particulier un outil de choix pour l'étude de solutions d'objets biologiques, conduisant à des informations sur leur forme, mais aussi leurs interactions. Un de ses atouts est que les particules étudiées peuvent être placées dans des conditions proches des conditions physiologiques (pH, température, concentrations ioniques…).

i) Principe de la diffusion des rayons X aux petits angles sur une solution de particules

Nous avons vu précédemment que l'intensité diffusée par une particule de densité électronique $\rho(\vec{r})$ s'écrit sous la forme:

$$i(\vec{q}) = |F(\vec{q})|^2 = \int_V \int_{V'} \rho(\vec{r})\rho(\vec{r}') \exp(i\vec{q}.(\vec{r} - \vec{r}'))dVdV'$$

où V est le volume de la particule. En toute rigueur, dans l'expression ci-dessus, l'intensité i(q) doit être multipliée par $I_e = I_0 r_e^2 \left(\frac{1+\cos^2 2\theta}{2} \right)$, où I_0 caractérise l'intensité du faisceau incident, r_e la longueur de diffusion de Thomson, et 2θ l'angle de diffusion. Dans la région des petits angles, le facteur $(1+\cos^2 2\theta)/2$ est quasiment égal à 1. Pour des raisons de simplification, nous omettons la quantité $I_0 r_e^2$ dans l'expression de l'intensité diffusée.

L'intensité diffusée par une seule particule étant très faible, on doit éclairer simultanément un grand nombre de particules pour obtenir un signal détectable. Expérimentalement, on utilise une solution de particules.

Les spécificités de la diffusion des rayons X aux petits angles pour une solution de particules, par rapport à la diffraction par un cristal, sont les suivantes:

(i) L'échantillon étudié est isotrope. Le mouvement Brownien permet aux molécules en solution de prendre toutes les orientations possibles par rapport au faisceau incident. Expérimentalement, on n'accède pas à $i(\vec{q})$, mais à sa moyenne sphérique sur tout l'échantillon. Nous appellerons dans la suite i(q) cette moyenne sphérique $\langle i(\vec{q}) \rangle_\Omega$.

(ii) La diffusion des rayons X aux petits angles est une approche basse résolution. Dans cette approche, le solvant est considéré comme homogène et caractérisé par une densité électronique constante ρ_s. La présence de particules en solution ne pourra donc être détectée que si la densité électronique $\rho(\vec{r})$ des particules est suffisamment différente de ρ_s. On introduit alors la notion de contraste de densité électronique entre la particule et le solvant : $\Delta\rho(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) - \rho_s$. L'intensité diffusée est directement reliée au contraste par l'expression:

$$i(q) = \left| \int_V \Delta\rho(\vec{r}) \exp(-i\vec{q}.\vec{r}))dV \right|^2$$

ii) Diffusion par une solution idéale

Dans une solution de N particules sans interactions entre elles, dite solution idéale, chaque particule diffuse de manière indépendante. L'intensité diffusée par la solution est alors la somme des contributions des N particules

$$I(q) = \sum_{k=1}^{N} i_k(q)$$

Si la solution est monodisperse (constituée de particules strictement identiques), toutes les particules diffusent de la même manière $i_i(q) = i_2(q) = \cdots = i_k(q) = i(q)$. L'intensité diffusée devient alors:

$$I(q) = Ni(q) = N\left|\int_V (\rho(\vec{r}) - \rho_s)\exp(-i\vec{q}.\vec{r})d^3r\right|^2 \qquad \text{(III.5)}$$

Pour les faibles valeurs de q, l'équation (III.5) peut être développée en puissance de q, conduisant à l'approximation de Guinier (Guinier et Fournet, 1955)

$$I(q) = I(0)\exp(-\frac{q^2R_g^2}{3}) \qquad \text{(III.6)}$$

L'expression de R_g, rayon de giration de la particule, est donnée par la relation:

$$R_g^2 = \frac{\int_V r^2(\rho(\vec{r})-\rho_s)d^3r}{\int_V (\rho(\vec{r})-\rho_s)d^3r} \qquad \text{(III.7)}$$

On l'obtient expérimentalement en portant lnI(q) en fonction de q^2. Dans l'expression (III.7), I(0) est la valeur de l'intensité diffusée à q=0 que l'on peut écrire:

$$I(0) = Ni(0) = N(m_p - m_0)^2$$

où m_p et m_0 sont respectivement le nombre d'électrons de la particule, et du volume de solvant déplacé par la molécule. Il peut être utile d'exprimer l'intensité à l'origine en fonction de la concentration C de la solution, exprimée en mg/ml. L'expression précédente peut être réécrite sous la forme:

$$I(0) = V_{sol}\frac{CM}{N_A}\left(\frac{m_pN_A}{M} - \rho_s\overline{V}_p\right)^2 \qquad \text{(III.8)}$$

où V_{sol} est le volume de la solution, M la masse molaire des particules, N_A le nombre d'Avogadro, et $\overline{V}_p$ le volume spécifique partiel d'une particule.

La limite de validité en q de l'équation (III.6) dépend de la forme de la particule étudiée. Dans le cas de particules quasi-sphériques, l'approximation de Guinier est valable pour $qR_g<1,3$. Ce domaine peut être légèrement plus grand dans le cas de particules légèrement

ellipsoïdales. Dans le cas de particules ayant une forme significativement différente d'une sphère compacte, par exemple des particules comportant des portions déstructurées de type chaîne polymérique, l'approximation de Guinier est valable dans une très petite gamme de q et devient dans la pratique difficilement utilisable. Dans ce cas et pour un domaine de q tel que $qR_g<1,4$, l'intensité diffusée est mieux décrite par l'approximation de Debye (Debye 1947; Perez et al 2001):

$$\frac{I(q)}{I(0)} = \frac{2}{x^2}(x - 1 + e^{-x}) \qquad \text{(III.9)}$$

avec $x=q^2R_g{}^2$.

Le rayon de giration permet d'obtenir des informations sur taille de la particule. Des informations complémentaires peuvent être obtenues en étudiant la fonction de distribution des distances, qui est la transformée de Fourier de l'intensité diffusée.

$$P(r)=\frac{r^2}{2\pi^2}\int_0^\infty I(q)\frac{\sin(qr)}{qr}q^2dq \qquad \text{(III.10)}$$

La fonction P(r) peut être considérée comme l'histogramme des distances intermoléculaires. Un exemple de fonction P(r) est présenté sur la Figure III-9. Cette fonction est égale à zéro pour les distances supérieures à l'extension maximale de la particule, D_{max}.

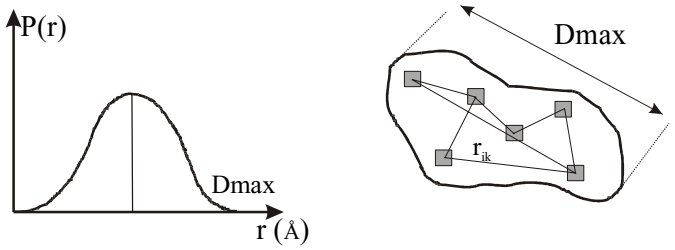


Figure III-9: Exemple de fonction P(r). La position du maximum correspond à la distance la plus probable à l'intérieur de la particule. Elle dépend des dimensions et de la forme de la particule. La fonction P(r) s'annule pour les distances supérieures ou égales à l'extension maximale de la particule, D_{max}.

Il n'est pas évident de calculer une fonction de distribution des distances à partir de l'intensité diffusée. Différentes méthodes dites de "transformée indirecte" existent pour résoudre ce problème. Dans ce travail nous utiliserons le programme GNOM développé par D. Svergun (Svergun et al 1988, Svergun 1992).

On peut effectuer une estimation du rayon de giration à partir du calcul de la fonction P(r) en combinant les équations (III.5) , (III.7) et (III.10).

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{Dmax} r^2 P(r) dr}{2 \int_0^{Dmax} P(r) dr} \qquad \text{(III.11)}$$

iii) Diffusion par une solution de particules en interaction

Considérons maintenant des particules en interaction. L'intensité diffusée est modifiée par les effets de corrélation dus aux interactions. Dans le cas de particules sphériques, l'intensité diffusée s'écrit :

$$I(q, C) = I(q)_{idéale} . S(q, C) \qquad \text{(III.12)}$$

où $I(q)_{idéale}$ est l'intensité diffusée en l'absence d'interactions, donnée précédemment (équation (III.5)), et que l'on appelle aussi facteur de forme F(q) de la particule. S(q,C) est le facteur de structure, caractéristique des interactions entre particules. Le facteur de structure est obtenu à partir de la fonction de distribution de paires g(r) suivant l'expression :

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

L'équation (III.12) reste valable dans le cas de particules présentant une forme peu éloignée de celle d'une sphère. Cependant, les concentrations en particules ainsi que les forces entre particules doivent être faibles.

En présence d'interactions, la valeur de l'intensité extrapolée à q=0 est aussi modifiée. La valeur de S(0,C) est directement reliée à la compressibilité osmotique de la solution χ, donc à la pression osmotique, par la relation:

$$\chi = S(0,C)$$

Or, d'après les équations (II.11) et (II.14), on obtient $\chi^{-1} = 1 + 2A_2\rho + 3A_3\rho^2 + ...$

Par conséquent, l'intensité extrapolée à q=0, peut être écrite en développement du viriel, et on obtient la relation:

$$I(0, C) = \frac{I(0)_{idéale}}{1 + 2A_2^M MC + 3A_3^M MC^2 + ...} \qquad \text{(III.13)}$$

où l'intensité $I(0)_{idéale}$, proportionnelle à la concentration en particules, est donnée par l'équation (III.8). Comme nous l'avons vu précédemment, A_2^M, A_3^M,... sont les deuxième, troisième,…, coefficients du viriel, qui caractérisent les interactions entre deux, trois,…, particules. Pour les faibles concentrations en particules, l'effet du troisième coefficient du viriel est négligeable. Les interactions entre particules résultent de la superposition de différentes interactions (électrostatique, Van der Waals, sphère dure…), qui seront discutées plus en détails dans la suite. A partir de l'équation (III.13), on s'aperçoit que des interactions attractives/répulsives entre particules augmentent/diminuent la valeur de I(0,C) par rapport à la valeur $I(0)_{idéale}$ d'une solution sans interactions.

L'intensité diffusée est aussi modifiée pour les faibles valeurs de q. Il s'ensuit que le rayon de giration obtenu en portant lnI(q,C) en fonction de q^2, est un rayon de giration apparent $R_g(c)$, qui est différent du rayon de giration mesuré en l'absence d'interactions, et qui dépend de la concentration en particules.

III.B.3.2 Montages expérimentaux et acquisitions de données:

Toutes les expériences présentées dans ce travail ont été réalisées en utilisant le rayonnement synchrotron. La plupart des expériences ont été faites sur l'anneau de stockage DCI à LURE (Orsay) sur les lignes D24 (diffusion aux petits angles) et D43 (diffusion/diffraction). Une expérience a été réalisée à l'ESRF sur la ligne de diffusion aux petits angles ID2. Le rayonnement synchrotron très intense, nous permet en effet d'étudier en un temps relativement court (1 ou 2 jours) un nombre important d'échantillons. De plus, il est indispensable pour réaliser des expériences de diffusion aux petits angles en solution très diluée.

a) LURE D43

La première série d'expériences de diffraction a été réalisée sur la ligne D43 de l'anneau DCI à LURE. Cette ligne délivre un faisceau monochromatique de haut flux permettant des expériences de diffraction aux moyens et grands angles. Un monochromateur courbe de Ge (111) permet de sélectionner une longueur d'onde λ donnée. Lors de nos expériences, λ a été choisie à 1,437 Å. La distance échantillon-détecteur a été fixée à 566 mm, permettant d'explorer une gamme de q allant de 0,0386 à 0,25 $Å^{-1}$ (correspondant à des distances de 170 à 25 Å).

Les capillaires en verre de 1,4 mm de diamètre contenant les phases denses à étudier sont placés sur un porte échantillon à l'air. Le détecteur utilisé est une plaque rectangulaire photosensible, une "Image Plate". La transmission de l'échantillon est mesurée à l'aide d'une photodiode qui mesure l'intensité du faisceau direct avec et sans échantillon.

b) LURE D24

Toutes les expériences de diffusion aux petits angles ainsi que la majorité des expériences de diffraction présentées dans ce travail ont été réalisées sur la ligne D24 de l'anneau de stockage DCI. Un monochromateur courbé de germanium, Ge (111), est utilisé pour sélectionner une longueur d'onde de 1,488 Å (correspondant à la raie d'absorption K du nickel). La distance échantillon-détecteur était fixée à environ 1800 mm pour les expériences de diffusion en solution diluée, et à 2500 mm environ pour les expériences de diffraction. Une telle distance est indispensable pour nos échantillons pour lesquels des pics de diffraction sont observés à très petits angles, correspondant à des distances d'environ 370 Å. L'utilisation de D24 permet aussi d'augmenter considérablement la résolution et ainsi de séparer des pics de diffraction très rapprochés les uns des autres.

Nous avons utilisé deux méthodes pour obtenir les spectres de diffusion/diffraction.

(i) Les spectres des solutions peu concentrées en particules ($C \leq 10$ mg/ml) ont été obtenus en plaçant la solution de NCP à étudier dans un capillaire en quartz de 1,5 mm de diamètre. Ce capillaire est placé dans une cellule sous vide conçue par P. Vachette. Le vide assuré depuis le monochromateur jusqu'au détecteur permet de limiter la diffusion parasite (Dubuisson et al., 1997). Le signal est détecté à l'aide d'un détecteur linéaire à gaz. Des acquisitions successives de 200 secondes chacune ont été enregistrées à température ambiante. 8 acquisitions de 200 secondes sont effectuées pour chaque tampon. Afin d'éviter toute dégradation, les solutions de NCP sont exposées durant seulement 4 acquisitions de 200s. Pour augmenter la statistique, cette opération est répétée 2, 3 ou 4 fois (suivant la concentration en NCP), après avoir introduit dans le capillaire une solution de NCP n'ayant pas été irradiée. Chaque spectre est alors inspecté avec soin afin de détecter d'éventuels dommages dus aux radiations. Aucune dégradation n'a été observée. Chaque spectre est corrigé par la réponse du détecteur. La transmission de chaque échantillon est obtenue par intégration du spectre d'une référence de noir de carbone, élément diffusant de manière intense et uniforme, placé juste après l'échantillon.

(ii) Les solutions plus concentrées en particules (C>10 mg/ml) ont été introduites dans des capillaires en quartz de 1,6 mm de diamètre, ce qui ne nécessite que 15 à 20 µl de solution, contrairement à la cellule sous vide utilisée précédemment. Pour cette série de mesure, les capillaires se trouvent dans l'air. Le détecteur est dans ce cas une "Image Plate". La transmission des échantillons est mesurée comme sur D43 à l'aide d'une photodiode qui mesure l'intensité du faisceau transmis avec et sans échantillon.

c) ID2

Comme nous le verrons plus loin, à la suite des expériences de diffraction réalisées sur la ligne D24, il est apparu nécessaire d'augmenter la résolution expérimentale afin de mieux séparer des pics de diffraction obtenus pour des valeurs de q très proches. Dans ce but, nous avons utilisé le rayonnement synchrotron de la ligne ID2 à l'ESRF (Grenoble). Ce rayonnement synchrotron parfaitement parallèle et non divergent, couplé à la possibilité d'augmenter la distance échantillon-détecteur jusqu'à 10 mètres, permet une augmentation considérable de la résolution. Le principe des expériences réalisées sur cette ligne est comparable à celui du LURE. La longueur d'onde est de 0,99 Å. La distance échantillon-détecteur a été choisie entre 2730 et 4730 mm, et la détection s'effectue comme précédemment à l'aide d'une "Image Plate".

III.B.3.3 Traitement des données

Le signal mesuré lors d'une expérience de diffusion sur une solution de particules correspond à la somme du signal des particules et du signal du solvant constitué de molécules d'eau et d'ions. Seul le signal diffusé par les particules est intéressant dans nos analyses. Pour l'obtenir, l'intensité diffusée par le solvant seul est mesurée pour chaque concentration en sel, puis soustraite de l'intensité diffusée

III.B.3.4 Préparation des échantillons

a) Solutions diluées (diffusion aux petits angles)

Deux lots de nucléosomes ont été utilisés pour réaliser les expériences de diffusion. Le premier est le lot 98I, obtenu à partir de thymus de veau, et dont la longueur d'ADN associée est de 165 ± 10 pb. Le second est le lot P99, obtenu à partir de sang de poulet, et présentant

une longueur d'ADN plus courte et moins polydisperse que le lot 98I : 145 ± 3 pb. Dans toute la suite, ces deux lots seront renommés respectivement NCP_{165} et NCP_{145} par référence à la longueur d'ADN associée.

Une série d'échantillons couvrant une large gamme de concentration en sel monovalent (C_s) a été préparée.

Pour NCP_{165}, nous disposons d'une solution stock à 150 mg/ml dans NaCl 5 mM+TE, pH 7,6. Les concentrations salines C_s = 50 et 160 mM ont été obtenues par ajout de NaCl à la solution stock. Les concentrations plus faibles ou plus élevées (TE 10 mM, NaCl 440 mM + TE, NaCl 1M + TE) ont été obtenues par dialyse de la solution à 1 mg/ml contre la concentration saline finale souhaitée. Chaque solution est alors concentrée par ultrafiltration afin d'obtenir une concentration en NCP de 150 mg/ml. Les concentrations finales en NCP (5, 10, 20, 50, 100, 150 mg/ml) sont obtenues par simple dilution dans le tampon correspondant.

Pour NCP_{145}, nous disposons d'une solution stock à 50 mg/ml dans TE 10 mM, pH 7,6. Pour chaque concentration en sel, nous préparons une solution stock à 8 mg/ml par dilution dans du TE 10 mM, en ajoutant éventuellement du NaCl afin d'obtenir les concentrations 10 ; 25 ; 37,5 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; et 200 mM. Les concentrations en NCP 0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/ml sont obtenues par simple dilution de la solution à 8 mg/ml dans le tampon correspondant. Afin de minimiser les erreurs sur les concentrations salines et en NCP, toutes les dilutions ont été réalisées en pesant les échantillons.

b) Phases denses (diffraction)

La plus grande partie des expériences de diffraction ont été réalisées sur des échantillons provenant du lot 99II. Ce lot préparé à partir de thymus de veau présente une longueur d'ADN relativement peu polydisperse (155 ± 7 pb). Quelques échantillons ont été préparés à partir du lot 98III qui présente la plus grande longueur d'ADN associée: 170 ± 15 pb. Ceci nous a permis de tester l'effet de la longueur d'ADN sur la structure des phases denses. Nous avons aussi réalisé quelques expériences avec le lot 2001, pour tester l'effet de protéolyse partielle des queues.

Dans les trois cas, la préparation des échantillons fut identique. L'équilibre ionique est obtenu par dialyse de la solution de NCP à 1 mg/ml contre la solution saline à la

concentration finale C_s désirée. Les solutions sont ensuite concentrées par ultrafiltration sous pression d'azote.

Les échantillons présentant une concentration en NCP inférieure à 250 mg/ml, déterminée par mesure d'absorbance U.V. à 260 nm, sont obtenus par simple concentration en cellule. Un volume de 20 µl de cette solution est alors introduit par centrifugation dans un capillaire en quartz. Pour les pressions supérieures, nous avons utilisé la méthode de stress osmotique en capillaire déjà mentionnée dans le chapitre III.B.1.1. Un volume de 15 à 20 µl d'une solution de NCP préalablement dialysée et concentrée à 250 mg/ml, est prélevé et introduit par centrifugation à 200 g dans un capillaire. La phase dense est obtenue par ajout de PEG 20000 MW, préalablement préparé à la concentration saline C_s. Pour chaque capillaire, environ 200 µl de solution de PEG sont introduits par centrifugations successives dans le capillaire. Les volumes respectifs de PEG et de NCP sont notés afin de permettre le calcul de la concentration finale en PEG à l'équilibre.

Pour ces échantillons, nous avons attendu au moins un mois entre la préparation et l'expérience de rayons X. A l'échelle macroscopique, lorsque les concentrations en PEG sont inférieures à 35%, on observe dans les capillaires deux phases bien séparées, phase dense de NCP au fond des capillaires, et PEG au-dessus. Pour les concentrations en PEG supérieures à 30%, la séparation est moins nette.

CHAPITRE IV

ETUDE DES MILIEUX DENSES

Chapitre IV ETUDE DES MILIEUX DENSES

Comme il a été rappelé dans le Chapitre II, consacré à l'état de l'art, deux types de phases denses de NCP avaient jusqu'ici été mises en évidence, et caractérisées par microscopie optique et électronique : une phase lamellaire à faible concentration saline, et une phase colonnaire hexagonale à fort sel.

Initialement, l'étude de diffraction des rayons X présentée dans ce chapitre, avait donc pour objectifs principaux de :

- disposer d'informations complémentaires sur les deux phases précédemment observées.
- explorer plus précisément le diagramme de phase des NCP en faisant varier en parallèle la pression osmotique de la solution et la concentration en sel ajouté C_s, permettant la mise en évidence de nouvelles phases.

Le début de ce chapitre est consacré aux rappels des caractéristiques des expériences de rayons X, ainsi qu'à la méthode utilisée pour analyser les diagrammes. Les deux paragraphes suivants ont pour but principal de décrire le comportement des NCP à forte concentration saline, et à bas sel, dans les régions du diagramme de phase où les phases hexagonale et lamellaire ont été respectivement observées par microscopie. Le quatrième paragraphe relate le comportement des NCP pour les concentrations salines intermédiaires. Dans chaque paragraphe, nous nous attachons à décrire l'influence sur la structure des phases denses, de la pression osmotique et du temps écoulé entre la préparation des échantillons et l'analyse par rayons X. Nous précisons également, pour chaque expérience, la valeur de la concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique, afin de parvenir à dégager l'influence de ce paramètre. Dans le paragraphe E, nous discutons de l'existence éventuelle de colonnes isolées avant la formation des phases denses. Précisons que les résultats présentés dans les paragraphes B à E ont été obtenus à partir du même lot de NCP (lot 99II), qui présente une longueur d'ADN moyenne associée aux particules égale à 155 pb, relativement peu polydisperse, et des histones intactes. Finalement, l'effet de la longueur d'ADN et de l'état des histones sont abordés dans le dernier paragraphe, consacré à la discussion. Pour rappel, lorsque la concentration en particules d'une solution est élevée, la fraction de contre-ions

condensés n'est plus négligeable. Dans ce chapitre, nous appellerons C_s, la concentration en sel ajouté de la solution.

IV.A Caractéristiques des expériences de rayons X

IV.A.1 Les différentes lignes de synchrotron utilisées

Au début de ce travail, l'organisation des NCP au sein de la phase lamellaire obtenue à bas sel, n'était pas connue. Etant donné les tailles caractéristiques des NCP, il était raisonnable de penser que les particules s'organiseraient en présentant des tailles caractéristiques d'une centaine d'Angstrom. Les premières expériences de cette étude ont donc été réalisées sur la ligne D43 à LURE qui permet des observations aux moyens et grands angles, c'est-à-dire jusqu'à des distances de 250 Å environ. Les spectres obtenus à faible sel présentaient des pics de diffraction à des distances que nous ne comprenions pas. A fort sel, la résolution expérimentale, égale dans nos conditions expérimentales à 6.10^{-3} $Å^{-1}$ (largeur à mi-hauteur des pics de diffraction), ne permettait pas de séparer tous les pics du diagramme de diffraction. Nous avons alors décidé de passer ces échantillons sur la ligne D24, en augmentant la distance échantillon-détecteur, et en augmentant par conséquent la résolution expérimentale. La structure lamellaire de la phase à faible sel est alors devenue évidente, et corroborée à la même époque par des images de microscopie électronique. Mais la résolution expérimentale, égale au cours de ces expériences à $1{,}45.10^{-3}$ $Å^{-1}$, était toujours insuffisante pour permettre l'indexation précise de la phase obtenue à plus forte concentration saline. Nous avons alors utilisé la ligne ID2 à l'ESRF. Le faisceau non divergeant, couplé à l'augmentation de la distance échantillon-détecteur, nous a permis d'augmenter de façon considérable la résolution expérimentale, alors égale à 8.10^{-4} $Å^{-1}$, permettant par-là même l'indexation de la phase obtenue à fort sel.

IV.A.2 Alignement sous champ magnétique

Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, l'analyse des diagrammes de diffraction est facilitée lorsque l'échantillon considéré (cristallin ou cristal liquide) comporte une orientation privilégiée pour au moins l'un de ses axes cristallographiques. Dans ce cas, si le faisceau de rayons X est perpendiculaire à cette orientation privilégiée, les diagrammes de diffraction présentent des taches de Bragg, dont la position est caractéristique de l'organisation des particules dans le système. Lorsque l'échantillon considéré est

complètement désorienté, l'intensité diffractée est moyennée sur toutes les orientations possibles, conduisant à un diagramme de poudre, c'est-à-dire un diagramme avec des anneaux de diffraction. L'organisation des particules cœurs de nucléosomes sous stress osmotique conduit à de tels diagrammes de poudre difficilement interprétables. Nous avons alors essayé d'aligner ces phases sous champ magnétique, en utilisant les propriétés de l'ADN qui, dans un champ magnétique, s'oriente perpendiculairement à celui-ci (Brandes et Kearns, 1988). Dans les NCP, l'ADN est enroulé autour de l'octamère d'histones, perpendiculairement à l'axe S du cylindre que constitue la particule cœur. On peut alors s'attendre à ce qu'une particule cœur placée dans un champ magnétique $\vec{B}$ s'oriente avec l'axe S du cylindre parallèle à $\vec{B}$.

Dans un premier temps, nous avons essayé d'aligner les colonnes de NCP dans les phases denses déjà formées. Mais la viscosité de ces phases est tellement importante, que même sous un champ de 7 ou 10 Teslas pendant plusieurs jours, aucun n'alignement, même partiel, n'a été obtenu. Nous avons alors pensé à créer les phases denses sous champ magnétique. Dès la fin de l'introduction du PEG dans les capillaires, ces derniers étaient placés pendant plusieurs semaines, sous un champ magnétique de 7 ou 10 Teslas, obtenu dans les bobines à fort champ des appareils de RMN. Nous avons alors réussi à aligner partiellement les phases obtenues à fort sel, mais aucune phase à faible sel ne s'est orientée.

Lorsqu'un échantillon est partiellement aligné, l'arrêt du champ magnétique ne détruit pas cet alignement et nous disposons alors de quelques mois pour étudier cet échantillon.

IV.A.3 Méthodes d'analyse des diagrammes de rayons X

L'analyse par rayons X d'une phase dense de particules (de type cristal, fibre, cristal liquide colonnaire, etc …) n'est simple que si l'échantillon possède une orientation privilégiée, dans toute la zone d'illumination par le faisceau de rayons X. En d'autres termes, une telle analyse n'est simple que s'il s'agit d'un monocristal, d'un ensemble de fibres parallèles, ou, dans le cas d'une phase cristalline liquide colonnaire, si les colonnes adoptent la même direction dans tout l'échantillon. Dans le cas contraire, une partie des informations structurales fournies par l'analyse par rayons X est perdue. Pour la plupart de nos échantillons, nous sommes dans le second cas.

Pour une meilleure compréhension des résultats présentés dans ce chapitre, il nous a paru nécessaire d'expliciter les caractéristiques des diagrammes de diffraction que l'on obtiendrait

théoriquement si l'échantillon possédait une orientation privilégiée, et de montrer comment ces diagrammes sont modifiés quand on introduit une désorientation.

IV.A.3.1 Cas du cristal à 3D

Considérons le cas d'un monocristal parfait formé par l'empilement régulier des NCP les uns sur les autres. Les NCP forment des colonnes infiniment longues qui s'organisent entre elles parfaitement. Une telle situation est schématisée sur la Figure IV-1(a). Si les colonnes sont verticales, des taches de Bragg apparaissent sur le méridien; elles correspondent à l'empilement des NCP. Des taches de Bragg caractérisant l'ordre entre colonnes vont apparaître sur l'équateur. Les taches qui ne sont situées ni sur le méridien ni sur l'équateur caractérisent les corrélations entre ordre longitudinal (le long des colonnes) et ordre transverse (dans le plan perpendiculaire aux colonnes), voir Figure IV-1(b). L'indexation de l'ensemble des réflexions de Bragg permet de déterminer la structure du cristal.

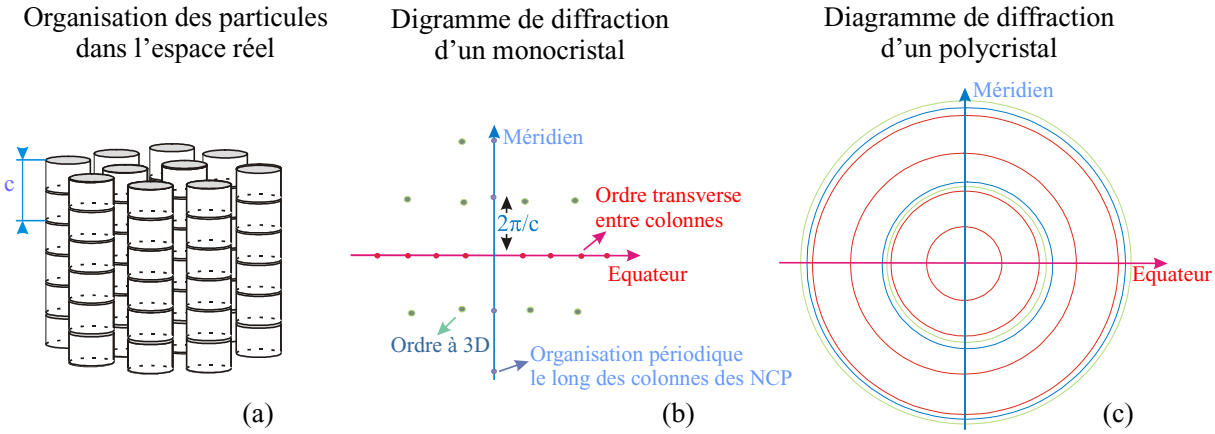


Figure IV-1 : Diagramme schématisant une organisation cristalline parfaite (a). Les particules s'empilent parfaitement les unes sur les autres avec une périodicité c pour former des colonnes qui s'organisent entre elles dans le plan perpendiculaire à leur axe.
(b) Le cliché de diffraction obtenu dans le cas d'un monocristal présente des taches de Bragg localisées sur le méridien (caractérisant l'empilement des particules en colonnes) et sur l'équateur (caractérisant les distances entre colonnes). Les pics qui ne sont localisés ni sur le méridien ni sur l'équateur sont caractéristiques de l'ordre cristallin à trois dimensions.
(c) Dans le cas de polycristaux présentant la même organisation, les taches de Bragg deviennent des anneaux de diffraction. On obtient un diagramme de poudre.

Lorsque l'échantillon diffractant est un polycristal, il n'existe plus d'orientation privilégiée. Les diagrammes sont alors moyennés sur toutes les orientations possibles, et les

taches de Bragg deviennent des anneaux infiniment fins (Figure IV-1(c)). Il existe des programmes permettant d'indexer ces anneaux et d'accéder, là encore, à la structure cristalline. Toutefois, l'indexation peut devenir délicate, par exemple dans les deux situations suivantes : i) certaines réflexions de Bragg sont de très faible intensité, et vont, à la suite de la désorientation, “disparaître” dans le bruit de fond expérimental. ii) il existe des réflexions de Bragg situées dans des régions différentes du réseau réciproque, mais dont les vecteurs de diffusion ont des modules voisins; elles vont conduire, par désorientation, à un seul anneau. Or cette situation peut se produire dans le cas des NCP, puisque le diamètre d'un NCP est approximativement le double de sa hauteur.

IV.A.3.2 Cas d'une organisation à 2D

Nous examinons dans ce paragraphe le cas d'une phase colonnaire hexagonale de NCP, pour laquelle les NCP s'empilent en colonnes parfaitement périodiques, ces colonnes étant toutes parallèles et organisées dans le plan perpendiculaire à leur axe suivant un ordre hexagonal à deux dimensions, avec possibilité de glissement le long de leur axe et rotation autour de celui-ci. Soient h la distance entre deux NCP successifs et c la périodicité le long d'une colonne. Considérons le cas le plus simple d'organisation le long des colonnes, qui est celui où les axes de symétrie binaire de deux NCP successifs pointent dans des directions opposées, c'est-à-dire où l'on passe d'un NCP au suivant par une rotation de 180° autour de l'axe de la colonne, sans décalage dans le plan perpendiculaire à celui-ci. La périodicité c est alors égale à 2h. Une telle organisation est schématisée sue la Figure IV-2a. Les observations qui suivent sont toutefois valables si l'angle de rotation entre deux NCP est différent de 180°.

Le diagramme de diffraction d'un tel système, obtenu en envoyant le faisceau de rayons X perpendiculairement aux colonnes, a les caractéristiques suivantes (schématisées sur la Figure IV-2b):

- Sur l'équateur (axe perpendiculaire aux colonnes) on observe des taches de diffraction, caractéristiques de l'organisation bidimensionnelle dans le plan perpendiculaire aux colonnes.
- Hors de l'équateur, la diffusion est concentrée sur des strates perpendiculaires au méridien. Les strates de diffusion les plus intenses sont celles qui correspondent à la distance h entre deux NCP successifs. Leur intensité est maximale sur le méridien, et leur distance à l'équateur est un multiple de $2\pi/h$. D'autres strates de

diffusion, moins intenses, apparaissent entre les strates intenses, et sont distantes de celles-ci d'un multiple de 2π/c. Leur intensité est maximale en dehors du méridien. Si l'ordre le long des colonnes s'étend à distance infinie, la largeur de ces strates de diffusion dans la direction du méridien est celle de la résolution instrumentale.

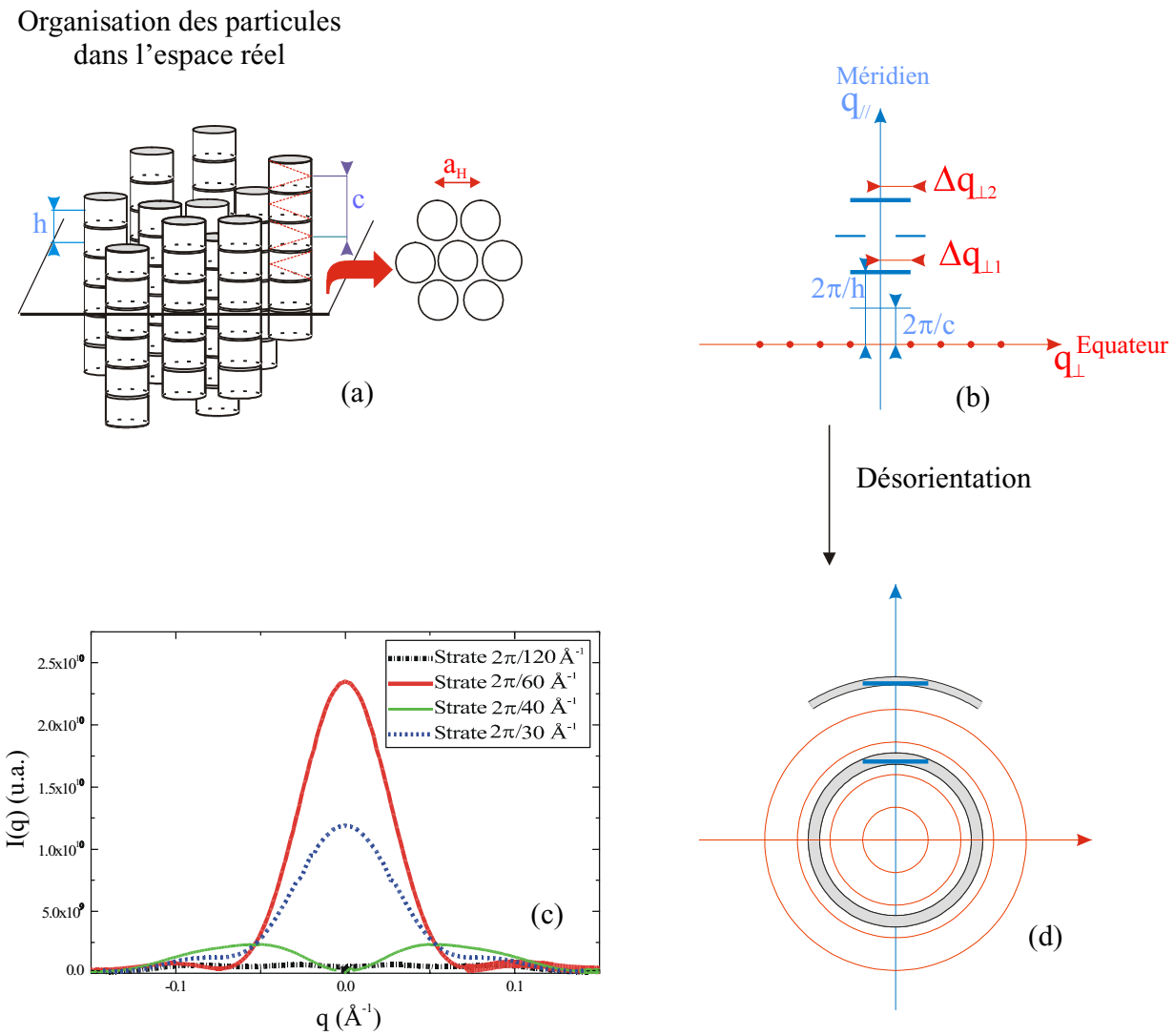


Figure IV-2 : (a) Considérons une organisation dans laquelle les particules s'empilent en colonnes, qui s'organisent entre elles en un réseau hexagonal avec une distance entre colonnes égale à a_H. (b) Sur l'équateur, le diagramme de diffraction présente des taches de Bragg caractérisant l'organisation entre colonnes. On distingue aussi des strates de diffusion perpendiculaires au méridien, qui caractérisent l'empilement des particules au sein des colonnes. Dans le cas d'une organisation répétitive le long des colonnes de période c=2h, ces strates sont situées à des distances $q_{//}$= π/h, 2π/h, 3π/h, 4π/h, de l'équateur (h=60 Å). (c) Le calcul de l'intensité diffusée le long de ces quatre strates, montre que les strates correspondant à la distance h entre deux NCP, et situées en 2π/h et 4π/h, sont les plus intenses. (d) Dans le cas d'un échantillon désorienté, ces strates intenses donnent des anneaux élargis par rapport à la résolution instrumentale, avec un élargissement qui décroît quand l'ordre de diffraction augmente. Par contre, les anneaux de diffraction caractérisant l'ordre entre colonnes ont la largeur de la résolution, si cet ordre s'étend sur une distance infinie.

Le calcul de l'intensité diffusée le long des quatre premières strates a été effectué dans le cas c=2h, avec h=60 Å. Le résultat est présenté sur la Figure IV-2c, qui donne l'évolution de l'intensité diffusée I(**q**) en fonction de $q_{\perp}$, pour les quatre valeurs de $q_{//}$: π/h, 2π/h, 3π/h, 4π/h, où $q_{\perp}$ et $q_{//}$ sont les composantes du vecteur de diffusion **q** sur l'équateur et sur le méridien respectivement. Pour l'obtenir, nous avons déterminé, en tout point **q** de l'espace réciproque, l'intensité I(**q**) (voir l'équation (III.4)) diffusée par deux NCP empilés et tournés de 180° l'un par rapport à l'autre, en utilisant un programme développé à LURE dans le groupe de J.Doucet. La libre rotation des colonnes a été prise en compte en faisant tourner les NCP autour de leur axe, et en moyennant les intensités obtenues. Les coordonnées cristallographiques utilisées pour le calcul sont celles déterminées par Lüger et al. (1997) (pdb : 1AOI). Avec ces considérations, le calcul de l'intensité diffusée le long des quatre strates (π/h, 2π/h, 3π/h et 4π/h) montre que les strates correspondant à des distances de 30 et 60Å sont les plus intenses.

Le point à retenir est que, dans le cas d'un échantillon orienté, pour lequel les colonnes de NCP sont toutes parallèles, l'analyse du diagramme de diffraction permettra d'accéder à la structure des colonnes, c'est-à-dire à la position des NCP à l'intérieur de celles-ci. En effet, la diffusion obtenue en dehors des strates intenses observées au voisinage du méridien (qui, elles, ne sont reliées qu'à la distance entre deux NCP successifs) est caractéristique de l'organisation périodique des NCP le long des colonnes.

Dans le cas où l'échantillon n'est pas orienté, cette information est en partie perdue. La désorientation transforme les strates de diffusion intense en anneaux, élargis par rapport à la résolution instrumentale, et les strates moins intenses en halos circulaires de diffusion, qui peuvent "disparaître" dans le bruit de fond et devenir indétectables (voir le schéma (d) de la Figure IV-2). Les taches de Bragg provenant de l'équateur donnent elles aussi des anneaux de diffraction, mais ceux-ci ne sont pas élargis par rapport à la résolution instrumentale si l'ordre dans le plan perpendiculaire aux colonnes s'étend sur une distance infinie. Il est possible d'estimer l'élargissement des anneaux provenant des strates de diffusion intense, par de simples considérations géométriques. Si $\Delta q_{\perp n}$ est la demi-largeur à mi-hauteur de la strate de diffusion intense située en $q_{//} = n2\pi/h$, alors l'élargissement par rapport à la résolution instrumentale de l'anneau de diffraction correspondant est approximativement égal à $\sqrt{(n2\pi/h)^2 + (\Delta q_{\perp n})^2} - n2\pi/h$. Ceci est explicité sur le schéma (b) de la Figure IV-2. Les courbes présentées sur la Figure IV-2c permettent de déterminer les demi-largeurs à mi-

hauteur $\Delta q_{\perp n}$: $\Delta q_{\perp 1} = 0.030$ Å^{-1} et $\Delta q_{\perp 2} = 0.032$ Å^{-1}. Ceci conduit à des élargissements des anneaux de diffraction repérés par $q=2\pi/h$ et $q=4\pi/h$ de l'ordre de 0.0042 Å^{-1} et 0.0024 Å^{-1}, respectivement.

Les calculs ci-dessus donnent l'élargissement minimal des anneaux de diffraction, dû à la désorientation des axes des colonnes. Si l'ordre le long des colonnes s'étend sur une distance finie, un élargissement supplémentaire vient s'ajouter à celui calculé précédemment; ce nouvel élargissement est le même pour tous les anneaux de diffraction $n2\pi/h$ et ne dépend que de la distance sur lequel l'ordre s'étend.

Mentionnons finalement le cas où les colonnes ne sont pas parfaitement périodiques, les NCP pouvant librement tourner autour de leur axe, et éventuellement subir une inclinaison (qui semble être le cas observé par microscopie électronique à haut sel). Dans ce cas, la périodicité de translation c le long des colonnes est perdue, et l'on peut seulement définir une distance moyenne h_{moy} entre deux NCP successifs. Dans le cas d'un échantillon orienté, on observe uniquement des strates de diffusion intenses au voisinage du méridien, distantes de $n2\pi/h_{moy}$ de l'équateur. L'élargissement de ces strates dans la direction du méridien décroît très rapidement quand n augmente, tandis que leur intensité diminue, les rendant indiscernables (Vainshtein, 1966). L'élargissement de la $n^{ième}$ strate est de l'ordre de $nd_h2\pi/h_{moy}$, où d_h est l'écart type de la distribution des distances inter-NCP, en unité réduite. Si l'on prend un écart-type de 5%, ce qui paraît être une valeur minimale dans le cas où les NCP sont complètement libres de tourner autour de leur axe, on obtient des élargissements de l'ordre de 0.005 Å^{-1} et 0.01 Å^{-1} pour les deux premières strates, respectivement. Dans le cas d'un échantillon désorienté, il s'y ajoute évidemment l'élargissement estimé précédemment et dû à la désorientation.

On comprend donc, à partir de toutes ces considérations, que l'analyse de la largeur des anneaux de diffractions repérés par les vecteurs de diffusion $n2\pi/h$ permet d'obtenir des informations sur la nature de l'ordre le long des colonnes de NCP.

IV.A.3.3 Cas des bicouches lamellaires

Les images de microscopie électronique montrent à bas sel une organisation des NCP en bicouches de colonnes. Nous supposons ici que ces colonnes sont infiniment longues, et nous considérons l'organisation dans le plan perpendiculaire aux colonnes (Figure IV-3(a)). Dans cette configuration, on observe une périodicité d/2 en projection sur le plan π_0, plan parallèle aux colonnes, passant par le milieu de la bicouche. Celle-ci donne lieu, dans l'espace réciproque, à une ligne de diffusion L_1, centrée sur le méridien, perpendiculaire à celui-ci, et située à la distance $4\pi/d$ de l'équateur. Par contre, la périodicité d se reproduisant de part et d'autre du plan π_0 engendre deux lignes de diffusion L_2 et L'_2 situées de part et d'autre du méridien à la distance $2\pi/d$ de l'équateur (voir Figure IV-3(b)). Cherchons maintenant le diagramme de diffraction d'un échantillon au sein duquel l'orientation des bicouches est variable. La ligne L_1 située sur le méridien va donner, comme dans le cas décrit au paragraphe précédent, un anneau de diffraction légèrement élargi passant par le point C, et donc repéré par le vecteur de diffusion $q=4\pi/d$. Les lignes L_2 et L'_2 donnent aussi un anneau de diffraction élargi. Mais dans ce cas, l'anneau ne passe plus par le point D : le vecteur de diffusion correspondant est donc légèrement supérieur à $2\pi/d$ (voir Figure IV-3(c)).

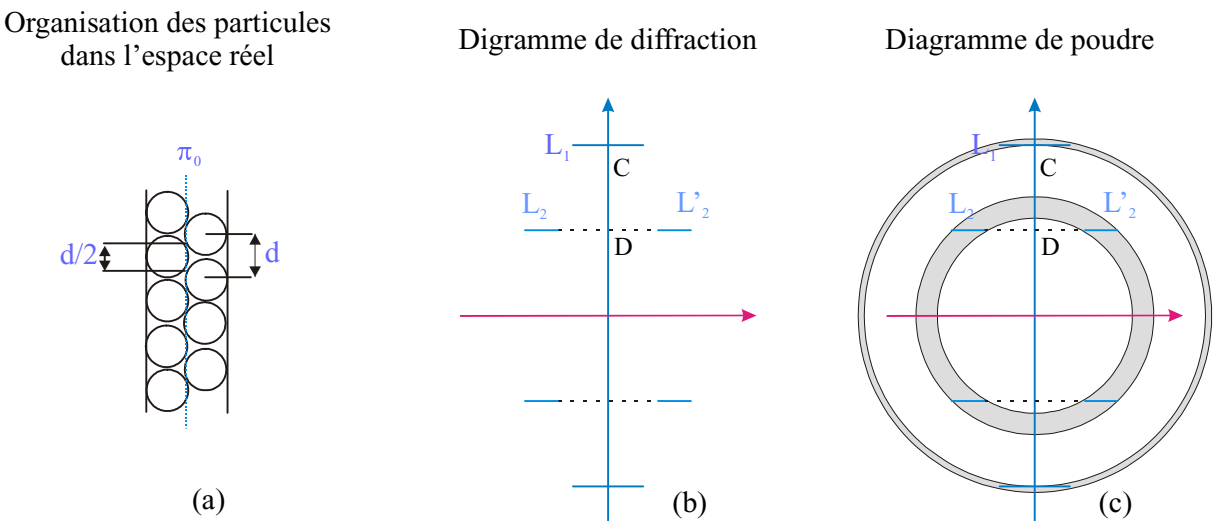


Figure IV-3 : (a) Considérons le cas d'une organisation colonnaire, dans laquelle les particules s'organisent en bicouches.
(b) La répétition de la distance d/2, en projection sur le plan π_0, crée une ligne de diffraction L_1 centrée sur le méridien, et située à la distance $4\pi/d$ de l'équateur. La répétition de la distance d, de part et d'autre du plan π_0, crée deux lignes de diffraction L_2 et L'_2 de part et d'autre du méridien, situées à la distance $2\pi/d$ de l'équateur.
(c) lors de la désorientation, la ligne L_1 va créer un anneau de diffraction de rayon $q=4\pi/d$. Les lignes L_2 et L'_2 créent un anneau de diffraction de rayon légèrement supérieur à $2\pi/d$.

IV.A.4 Détermination des concentrations en NCP et des pressions de PEG

Lorsque les échantillons sont organisés en phase dense, la concentration en NCP est estimée après indexation du diagramme de diffraction, en utilisant la relation :

$$C = \frac{M_{NCP}}{V_c \, N_a} \qquad \text{(IV.1)}$$

Où V_c est le volume de la maille élémentaire du système et M_{NCP} la masse molaire des NCP est prise égale à 205000 $g.mol^{-1}$.

Comme nous l'avons précédemment expliqué dans le chapitre III.B.1.1, consacré à la préparation des échantillons de diffraction des rayons X, les phases denses en capillaire ont été obtenues en ajoutant directement 200 µl d'une solution de PEG de concentration $C_{i(PEG)}$, sur une solution de NCP à la concentration initiale C_i, comprise entre 205 et 260 mg/ml, et de volume initial égal à 15µl. L'ajout de la solution de PEG provoque un stress et donc une augmentation de la concentration de NCP. Par conséquent, comme dans toute expérience de stress osmotique, on observe un flux de tampon vers la solution stressante. Dans notre expérience, le volume de PEG ne peut être considéré comme un réservoir infini, et il faut donc tenir compte de ce flux de tampon qui provoque une légère dilution de la solution stressante. A l'état final, la concentration de la solution stressante est donc légèrement inférieure à $C_{i(PEG)}$. Cette concentration effective peut être calculée à partir des valeurs de la concentration initiale C_i et de la concentration finale C (déterminée à posteriori) en NCP, et des volumes initiaux de PEG et de NCP. Toutefois, la diminution étant faible, nous ne mentionnerons dans ce qui suit que la concentration initiale $C_{i(PEG)}$. De même, les valeurs de la pression osmotique que nous donnerons sont celles correspondant à la concentration initiale $C_{i(PEG)}$.

IV.B Observations à forte concentration saline

Nous exposons dans les paragraphes IV.B.1 à IV.B.3 les résultats obtenus pour une concentration en sel ajouté C_s = 160 mM. Le chapitre IV.B.4 est consacré à la concentration saline de 100 mM. Pour toutes les expériences décrites dans ce chapitre, la concentration initiale C_i en NCP était de 260 mg/ml.

IV.B.1 Phase cristalline

Les échantillons obtenus avec une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%) et une concentration en sel ajouté de 160 mM ont donné des diagrammes de diffraction extrêmement complexes, présentant un grand nombre d'anneaux de diffraction, parfois très rapprochés. Seuls les diagrammes effectués sur la ligne ID2 de l'ESRF, avec une excellente résolution spatiale, nous ont permis de comprendre la structure de ces phases. Nous n'avons malheureusement pu disposer que de très peu de temps de faisceau sur cette ligne.

Un exemple de diagramme de diffraction enregistré sur la ligne ID2 est présenté sur la Figure IV-4. L'échantillon analysé a été préparé 4 mois avant son étude par rayons X. De plus, durant la formation de cette phase, cet échantillon a été partiellement aligné sous un champ magnétique de 10T pendant 15 jours. Ce champ est orienté verticalement sur le diagramme présenté.

Avant toute discussion sur l'indexation, il est important de remarquer que le diagramme de diffraction de la Figure IV-4 présente des arcs fins de diffraction localisés sur le méridien mais aussi sur l'équateur. Comme nous l'avons précédemment expliqué, ces deux types de raies correspondent respectivement à l'ordre longitudinal des NCP le long de leur axe et à l'ordre transverse entre NCP dans le plan perpendiculaire à leur axe. On distingue en plus une série d'arcs qui ne sont localisés ni sur le méridien ni sur l'équateur. Ces arcs supplémentaires sont la signature d'une corrélation entre les deux types d'ordre longitudinal et transverse. Nous sommes donc en présence d'un ordre à trois dimensions, comme dans un véritable cristal. Les arcs situés sur le méridien et l'équateur ont la largeur de la résolution, soit $\Delta q = 8.10^{-4}$ $Å^{-1}$ (largeur à mi-hauteur). Ceci signifie que l'ordre à longue distance le long de l'axe des NCP et dans le plan transverse s'étend sur plus de 3 μm. Les arcs n'étant localisés ni sur le méridien ni sur l'équateur sont légèrement élargis par rapport à la résolution instrumentale, leur largeur à

mi-hauteur étant d'environ 26.10^{-4} $Å^{-1}$. Il s'ensuit que la corrélation entre ordre longitudinal et ordre transverse s'étend sur plus de 7000Å.

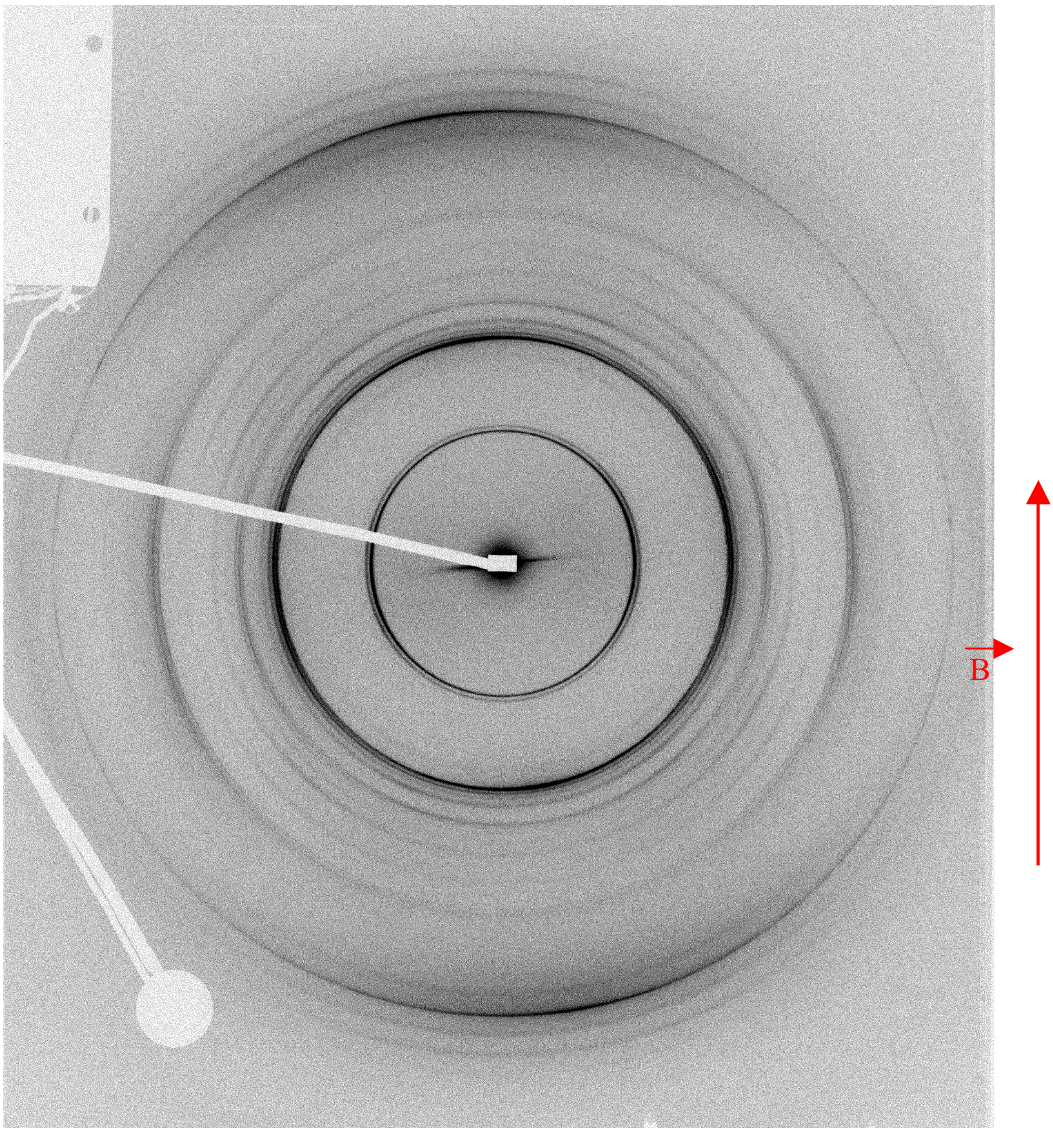


Figure IV-4 : Diagramme de diffraction enregistré sur la ligne ID2 de l'ESRF, pour une concentration en sel ajouté égale à 160 mM, et une pression osmotique de $4,7.10^5$ Pa (PEG 19%). L'échantillon étudié a été partiellement aligné sous champ magnétique de 10T pendant 15 jours. La concentration initiale en NCP, avant l'application du stress osmotique, était de 260 mg/ml. L'enregistrement est effectué 4 mois après la préparation du capillaire.

Abordons l'indexation des pics de diffraction. Le long du méridien, deux pics très intenses sont observés pour q_{1h}= 0,1080 et $q_{2h}=2q_{1h}$= 0,2060 $Å^{-1}$. Ils correspondent à l'empilement des nucléosomes le long de leur axe, qui se fait parallèlement au champ magnétique, avec une interdistance entre deux nucléosomes de 58,16 Å. En ce qui concerne

les raies équatoriales, elles se répartissent en groupes, dont les positions moyennes sont dans des rapports voisins de 1 ; √3 ; √4 et √7, ce qui suggère que dans le plan perpendiculaire à l'axe des NCP l'organisation est quasi-hexagonale.

Nous avons trouvé qu'un réseau de type orthorhombique à base centrée, avec l'axe cristallographique c approximativement parallèle à l'axe S des particules, permet d'indexer la plus grande partie des raies de diffraction observées. Nos données ne nous permettent évidemment pas de déterminer le groupe d'espace. On constate toutefois que le groupe d'espace $P2_12_12_1$ des cristaux de NCP (Lüger et al., 1997 ; Harp et al., 2000 ; White et al., 2001) est compatible avec les pics de Bragg du diagramme de la Figure IV-4. Dans ces conditions, la maille orthorhombique contient 4 NCP et ses paramètres sont a = 114,1±0,2Å, b = 201,1±0,2Å et c = 116,3±0,2Å (le choix que nous avons fait pour les axes a, b, c est celui de Lüger et al., 1997 : l'axe c est approximativement parallèle à l'axe S des NCP). A partir de ces paramètres et en utilisant la relation (IV.1), on obtient une concentration en particules de 516 ± 3 mg/ml. On note que la valeur du paramètre b est très proche de a√3; l'écart obtenu est en effet inférieur à 1,5%. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'organisation des NCP dans le plan transverse à leur axe est donc très proche d'un ordre hexagonal.

L'accord entre les positions théoriques et expérimentales des pics indexés avec le réseau orthorhombique précédent est excellent. Cependant quelques raies faibles sont difficilement indexables. Certaines semblent correspondre à une surstructure le long de l'axe c, qui pourrait être de l'ordre de 6 NCP. Il se pourrait aussi que ces raies difficilement indexables proviennent d'une légère distorsion de la maille orthorhombique. L'alignement du diagramme présenté sur la Figure IV-4 est insuffisant pour résoudre ce problème. Nous n'avons jamais réussi à obtenir d'alignement plus important de nos échantillons. Nous reviendrons sur ce point dans la partie discussion (paragraphe IV.F).

IV.B.2 Influence des paramètres

IV.B.2.1 Effet de la pression osmotique

Afin de connaître l'évolution des paramètres du réseau orthorhombique, pour cette même concentration saline, en fonction de la pression osmotique de la solution, nous avons réalisé une deuxième série d'expériences dans laquelle nous avons fait varier la concentration en PEG de 19 à 28%, correspondant à une gamme de pression de $4{,}7.10^5$ à $1{,}3.10^6$ Pa (soit 4,7 à 13

bars). Ces échantillons ont été préparés deux mois avant leur étude. Nous n'avons pas pu disposer du champ magnétique pour les orienter.

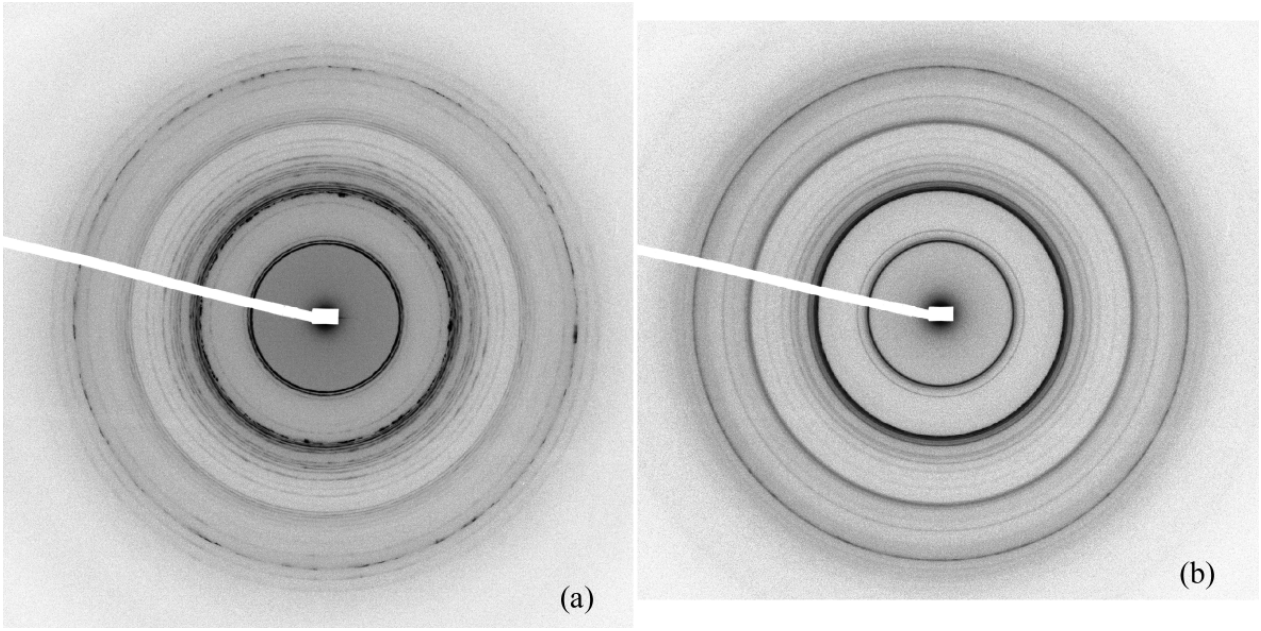


Figure IV-5 : Diagrammes de diffraction obtenu sur la ligne ID2 de l'ESRF, pour une concentration en sel ajouté de 160 mM et pour des pressions de PEG de (a) 19% et (b) 28%. L'enregistrement est effectué 2 mois après la préparation des capillaires.

Les clichés de diffraction enregistrés à l'ESRF sur la ligne ID2 pour les deux pressions extrêmes sont présentés sur la Figure IV-5. L'indexation dans le réseau orthorhombique utilisé précédemment convient pour décrire tous les diagrammes de diffraction obtenus à la concentration saline de 160 mM. Le principal effet de l'augmentation de la pression osmotique est de provoquer une diminution des dimensions de la maille orthorhombique (voir Tableau IV-1). On constate que cette diminution (entre PEG 19% et PEG 28%) est à peu près la même pour les paramètres a et b (4,8% et 4,9% respectivement), et à peine supérieure pour le paramètre c (5,6%). Il semblerait donc que sous l'effet de la pression, le volume de la cellule unité diminue, sans changement notoire de la structure. Nous avons toutefois remarqué que certains pics de diffraction correspondant à la surstructure le long de l'axe c voient leur position considérablement modifiée quand on passe d'une concentration en PEG de 19 à 28%. Il n'est donc pas impossible qu'une augmentation de pression affecte cette surstructure.

Pression osmotique	PEG 19% $4{,}7.10^5$ Pa	PEG 28% $1{,}3.10^6$ Pa
Paramètres	a=115,4 ± 0,2 Å b=203,6 ± 0,2 Å c=119,0 ± 0,2 Å	a=110,1 ± 0,4 Å b=194,0 ± 0,4 Å c=112,7 ± 0,2 Å
Concentration	493 mg/ml	572 mg/ml

Tableau IV-1 : Evolution des paramètres de la phase orthorhombique avec la pression osmotique de la solution pour une concentration en sel ajouté de 160 mM. Le temps écoulé entre la préparation des échantillons et l'étude par rayons X est de 2 mois.

Finalement, il est important de noter que l'augmentation de la pression osmotique provoque un léger élargissement des pics de diffraction par rapport à la résolution expérimentale. L'ordre à longue distance entre les particules semble donc s'étendre sur des distances plus courtes à PEG 28% qu'à PEG 19%. Nous ne sommes cependant pas capables de déterminer l'origine de ce comportement : s'agit-il du comportement intrinsèque des phases denses quand la concentration en NCP augmente, ou bien cela provient-il de la façon dont les échantillons sont préparés? Nous rappelons que dans les capillaires utilisés pour les expériences de rayons X, le PEG est en contact direct avec la solution de NCP. Les interactions entre particules au sein d'un tel système peuvent être très complexes quand la concentration en PEG augmente. Cet effet sera discuté plus en détail ultérieurement.

IV.B.2.2 Effet du temps d'équilibration

Afin de comprendre précisément l'organisation des particules cœurs de nucléosomes dans la phase à plus forte concentration saline, nous avons été obligés de réaliser différentes séries d'expériences à la fois sur la ligne D24 de LURE, mais aussi sur la ligne ID2 de l'ESRF. Le temps écoulé entre la préparation des capillaires et la réalisation des expériences n'était pas toujours le même, et nous avons découvert a posteriori que même après plusieurs mois d'attente en capillaire, les paramètres cristallins des échantillons évoluent encore en fonction du temps. Cette évolution est présentée dans le Tableau IV-2, ci-après, pour des échantillons préparés avec une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa, et une concentration saline de 160 mM. Par contre, la structure cristalline orthorhombique reste la même au cours du temps.

Temps d'équilibration	1 mois	2 mois	4 mois
Paramètres	a=116,3 ± 0,4 Å b=204,3 ± 0,4 Å c=119,4 ± 0,3 Å	a=115,4 ± 0,2 Å b=203,6 ± 0,2 Å c=119,0 ± 0,2 Å	a=114,1 ± 0,2 Å b=201,1 ± 0,2 Å c=116,3 ± 0,2 Å
Concentration	484 mg/ml	492 mg/ml	516 mg/ml

Tableau IV-2 : Paramètres orthorhombiques, obtenus pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa, pour différents temps écoulés entre préparation des échantillons et expériences de rayons X. Pour les temps de 1 et 4 mois, il s'agit du même échantillon. Pour le temps de 2 mois, il s'agit d'un autre échantillon.

On constate qu'entre 1 et 4 mois d'attente, la concentration en particules dans l'échantillon augmente d'environ 6%. Nous avons vérifié que cette évolution n'est pas due à l'évaporation. Ceci semblerait donc indiquer que même après plusieurs mois, l'échantillon n'a pas encore atteint son équilibre. Nous n'avons pas réalisé d'étude pour des temps plus importants. Par conséquent, il nous est impossible de connaître le temps nécessaire pour qu'un échantillon réalisé en capillaire se mette à l'équilibre. Idéalement, il aurait donc été préférable de réaliser un équilibre préalable des particules en boudin de dialyse. La surface d'échange, plus importante entre la solution stressante et les NCP aurait permis un équilibre plus rapide. Cependant, comme nous l'avons discuté dans le Chapitre III, cette méthode nécessite des volumes de solutions de NCP d'au moins 1 ml, ce qui correspond à 0,5 g de matériel par échantillon pour les pressions étudiées.

IV.B.3 Commentaire sur l'utilisation du champ magnétique

Comme il est expliqué dans le paragraphe IV.B.1, l'échantillon orienté sous champ magnétique, qui a donné des diagrammes de diffraction avec de nombreux arcs de Bragg fins et rapprochés, et qui nous a permis de comprendre la structure de la phase à 160 mM de sel, a été placé sous champ magnétique dès l'introduction du PEG dans le capillaire, avant formation de la phase dense. Les NCP se sont donc progressivement organisés en une phase ordonnée à trois dimensions, en présence du champ magnétique. La question qui se pose alors est de savoir si la structure de la phase dense obtenue dans ces conditions peut dépendre de l'application du champ magnétique. C'est pourquoi nous avons réalisé des diagrammes de rayons X sur deux échantillons préparés en même temps et dans les mêmes conditions (en particulier, même concentration initiale en NCP, C_i=260 mg/ml), un seul des deux étant placé sous champ magnétique de 10 teslas pendant 15 jours. Les échantillons ont été analysés sur D24 un mois après leur préparation. Les diagrammes de rayons X sont extrêmement

similaires: seules les raies de Bragg de très faible intensité sur le diagramme orienté (obtenu pour l'échantillon placé sous champ magnétique) ne sont plus détectables sur le diagramme non orienté. Ceci est un effet de la désorientation, qui produit une diminution d'intensité et implique que les raies de faible intensité ne peuvent plus être extraites du bruit de fond. Dans les deux cas l'analyse des diagrammes conduit à la structure de type orthorhombique déterminée précédemment. On note seulement que les trois paramètres cristallins pour l'échantillon placé sous champ sont inférieurs de 1% aux paramètres de l'autre échantillon. Mais ceci peut provenir d'une légère différence entre les concentrations effectives en PEG des deux échantillons.

IV.B.4 Concentration saline de 100 mM

Le diagramme de diffraction obtenu 1 mois après la préparation de l'échantillon, pour une concentration en sel ajouté égale à 100 mM, et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%) est présenté sur la Figure IV-6. La concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique était égale à 260 mg/ml.

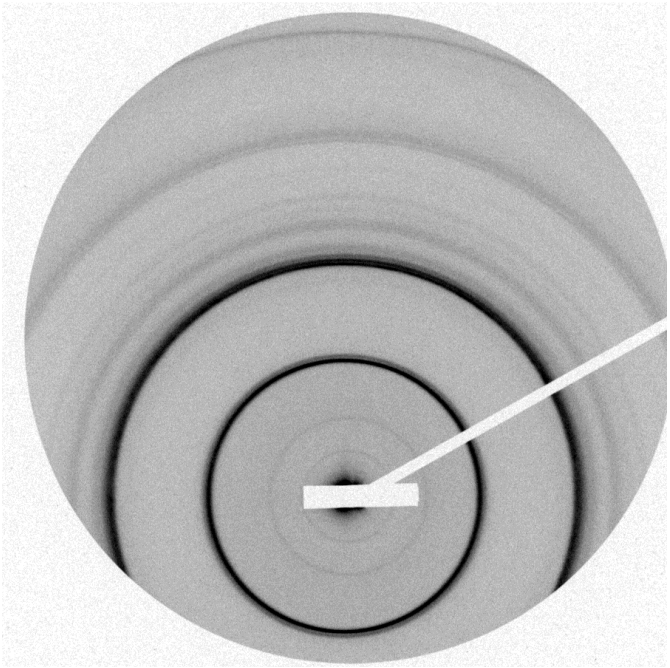


Figure IV-6 : Diagramme de diffraction enregistré sur la ligne D24 pour une concentration saline de 100 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa. La concentration initiale C_i en NCP avant l'application du stress osmotique était égale à 260 mg/ml. L'échantillon a été analysé 1 mois après sa préparation.

Ce cliché de diffraction est extrêmement similaire à celui obtenu pour l'échantillon préparé à une concentration saline de 160 mM dans les mêmes conditions (PEG 19%, et un mois d'attente). Les deux sont compatibles avec la même structure orthorhombique. La surstructure le long de l'axe c semble aussi être la même dans les deux échantillons. Les paramètres orthorhombiques de l'échantillon à 100 mM sont: a=115,9 ± 0,4 Å ; b=203,7 ± 0,4Å ; c=117,9 ± 0,3 Å. On peut alors calculer une concentration en particules au sein de l'échantillon égale à 494 mg/ml. Les paramètres a, b et c sont très légèrement inférieurs à ceux obtenus pour l'échantillon dont la concentration en sel ajouté est de 160 mM. Il est toutefois difficile d'en tirer une conclusion puisque la différence peut provenir d'une légère différence des concentrations effectives en PEG, comme nous l'avons déjà précédemment expliqué.

En conclusion, les phases denses de NCP obtenues pour des concentrations en sel monovalent de 100 et 160 mM et pour des pressions osmotiques supérieures à $4{,}7.10^5$ Pa sont des phases de type cristallin organisées à trois dimensions, présentant des caractéristiques structurales communes avec les cristaux de NCP obtenus en présence d'ions divalents (Lüger et al., 1997; Harp et al. 2000; White et al., 2001; Figure II-8). Les NCP s'empilent les uns sur les autres parallèlement à leur axe S, au sein d'une maille orthorhombique, quasi-hexagonale. Nos données ne sont évidemment pas suffisantes pour déterminer le type d'empilement des NCP le long de leur axe S, c'est à dire pour savoir si les NCP s'empilent parfaitement pour former des colonnes régulières (Figure II-8c), ou s'ils présentent un décalage systématique (Figure II-8a). Des différences avec les cristaux de Lüger et al. (1997) ou White et al. (2001) ont par ailleurs été mises en évidence : les paramètres cristallins sont supérieurs d'au moins 5%, et il existe une surstructure le long de l'axe c. La concentration en particules à l'intérieur de ces différentes phases est élevée et varie de 480 à 580 mg/ml quand la pression osmotique de la solution augmente de $4{,}7.10^5$ à $1{,}3.10^6$ Pa. De plus, nous avons pu noter que l'organisation de ces phases tend très lentement vers son état d'équilibre. Ainsi, 4 mois après la préparation des échantillons, les paramètres de la maille orthorhombique continuent d'évoluer.

L'utilisation du champ magnétique nous a permis d'accéder plus facilement à l'organisation des particules à l'intérieur de cette phase. Nous avons pu montrer que

l'utilisation d'un champ magnétique relativement intense (10 Teslas) ne modifie pas l'organisation orthorhombique.

IV.C Observations à faible concentration saline

Dans ce paragraphe, nous allons décrire l'organisation des particules cœurs de nucléosomes pour les concentrations en sel les plus basses, inférieures à 25 mM, et pour des pressions osmotiques supérieures ou égales à $4{,}7.10^5$ Pa. Nous rappelons que dans ces conditions, les observations de microscopie électronique ont mis en évidence une organisation lamellaire en bicouches de colonnes avec une distance moyenne entre bicouches variant de 270 à 420 Å.

IV.C.1 Phase lamellaire de bicouches

Le diagramme de diffraction obtenu 1 mois après la préparation de l'échantillon, pour une concentration en sel ajouté égale à 25 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%) est présenté sur la Figure IV-7(a). La concentration initiale en NCP était de 205 mg/ml. Le profil de l'intensité intégrée I(q) dans un cadran de 30° centré sur la verticale est aussi représenté sur cette figure. L'indexation de ce diagramme de poudre aurait été facilitée par l'obtention d'un échantillon aligné, même partiellement. Toutes les tentatives ont malheureusement échoué.

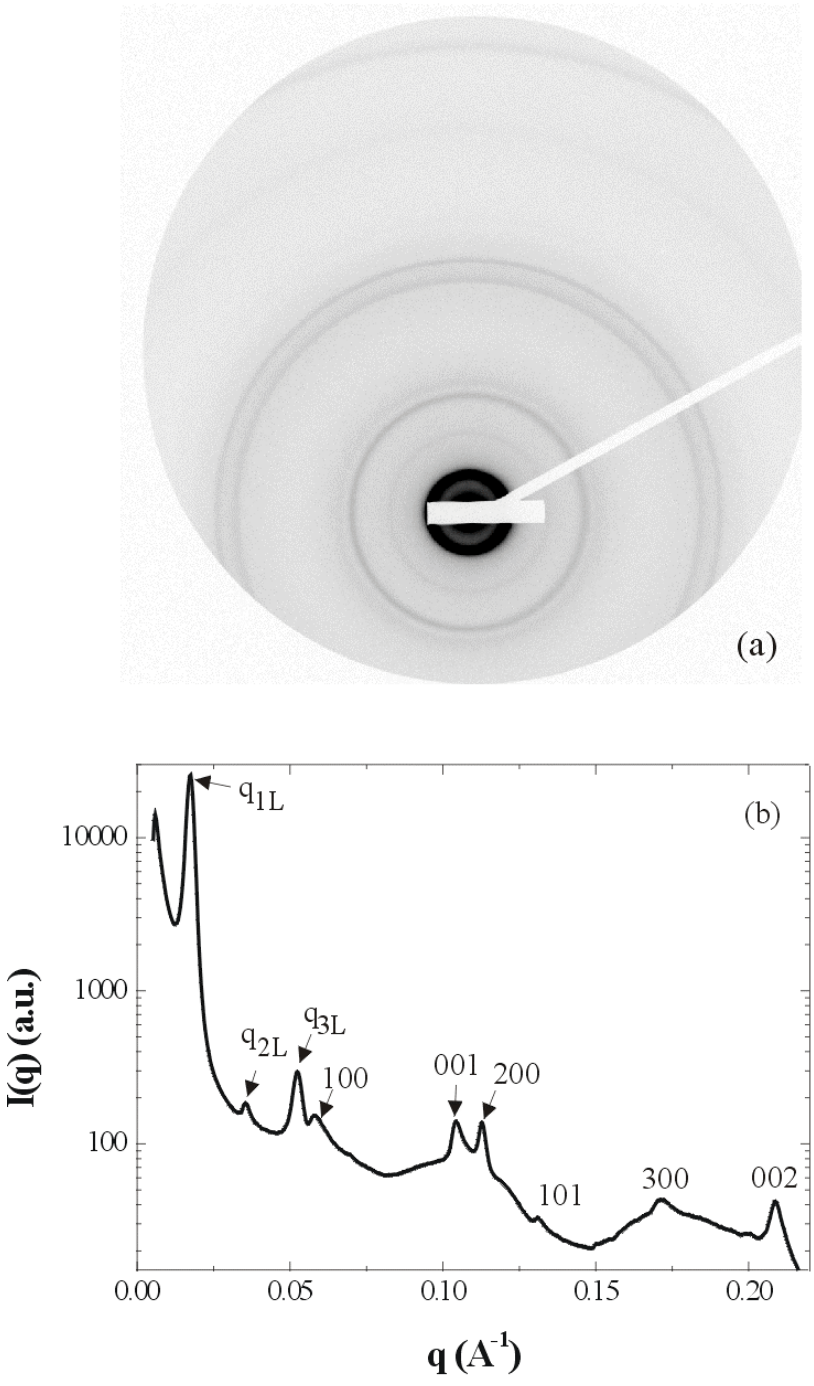


Figure IV-7 (a) Diagramme de diffraction obtenu sur la ligne D24 à LURE, pour une concentration en sel ajouté égale à 25 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%). La concentration initiale en NCP était de 205 mg/ml. L'enregistrement a été effectué 1 mois après la préparation du capillaire. (b) Profil d'intensité intégré dans un cadran supérieur de 30°.

Les principales caractéristiques de ce diagramme sont les suivantes :

a) Organisation en phase lamellaire

Dans la région des petites valeurs de q, on observe un pic de diffraction très intense situé en q_{1L}=0,0174Å^{-1} et deux pics de moindre intensité (moins de 1% de l'intensité du premier pic) situés à $q_{2L}=2q_{1L}$ et $q_{3L}=3q_{1L}$. Ces trois pics sont la signature d'une organisation lamellaire, avec une distance d_L entre les lamelles de 360Å. Différentes régions de l'échantillon ont été sondées par le faisceau de rayons X, et nous avons constaté que la périodicité d_L n'est pas parfaitement constante dans toute la phase lamellaire. Un gradient de d_L d'amplitude 14Å environ a été mesuré. Les trois pics de diffraction q_{1L}, q_{2L} et q_{3L} présentent des élargissements croissants par rapport à la résolution expérimentale : 0,0007Å^{-1}, 0,0014Å^{-1} et 0,002Å^{-1}, respectivement. Ces élargissements peuvent avoir deux origines : la première est le gradient de la périodicité d_L, qui va produire un élargisement des pics croissant avec l'ordre de diffraction ; la seconde est la distance finie sur laquelle s'étend l'ordre lamellaire, qui entraîne le même élargissement pour tous les pics de diffraction. Etant donné les valeurs données ci-dessus, ce second élargissement est nécessairement inférieur à 0,0007Å^{-1}. Il s'ensuit que dans l'échantillon considéré, la distance sur laquelle on a une organisation lamellaire avec une périodicité de 360Å ± 7Å, est d'au moins 1,5μm, ce qui correspond à 40 lamelles.

b) Organisation à l'intérieur d'une couche

Les autres pics du diagramme de diffraction, observés pour les valeurs de q supérieures à 0,055 Å^{-1}, traduisent l'organisation des NCP à l'intérieur de chacune des couches d'une bicouche. Ces pics peuvent s'indexer dans un réseau monoclinique à deux dimensions, de paramètres a=114,8 Å, c=62,2 Å et un angle β entre les deux directions du réseau de 104° environ. L'indexation est indiquée sur la Figure IV-7b. Les pics (001) et (002) indiquent que les NCP sont empilés régulièrement le long des colonnes avec une distance inter-NCP de 62,2Å. Il existe aussi une périodicité le long de la direction perpendiculaire aux colonnes, reflétée par les pics de diffraction (100), (200) et (300). La distance entre colonnes est égale à asinβ, soit 111,4Å. Enfin, l'existence du pic (101) est la signature d'une corrélation entre l'empilement des NCP le long des colonnes et l'organisation entre colonnes. Deux organisations des NCP à l'intérieur d'une couche sont envisageables et sont présentées sur la Figure IV-8. Dans le premier cas (Figure IV-8a), les NCP s'empilent les uns sur les autres avec leur axe S parallèle à l'axe de la colonne; la position des centres des NCP appartenant à

deux colonnes voisines présente un angle de 104°. On peut aussi imaginer que l'axe S des NCP est incliné d'un angle de 14° par rapport à l'axe de la colonne, les NCP s'organisant comme précédemment en un réseau monoclinique (Figure IV-8b). Les particules présentent alors un alignement d'une colonne à l'autre. Les rayons X ne permettent absolument pas de trancher entre ces deux hypothèses. Cependant ce deuxième cas de figure semble compatible avec les images de microscopie électronique qui font apparaître une inclinaison des NCP par rapport à l'axe des colonnes et un alignement des NCP quand on passe d'une colonne à sa voisine.

Aucun pic de diffraction supplémentaire n'est observé. L'organisation des particules à l'intérieur d'une bicouche apparaît donc complètement décorrélée d'une bicouche à une autre. Cette observation est compatible avec les observations de microscopie. Par contre, nos résultats ne nous permettent pas d'obtenir des informations sur les corrélations éventuelles entre les NCP appartenant aux deux couches d'une même bicouche. Là encore, pour obtenir de telles informations, il est indispensable d'orienter les bicouches au sein de l'échantillon.

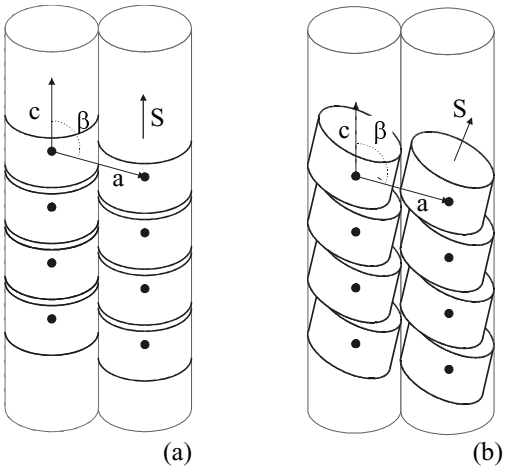


Figure IV-8 : Orientations possibles des NCP dans le plan des bicouches. Deux organisations compatibles avec un ordre monoclinique de paramètres a=114,8 Å , c=62,2 Å et β=104° sont envisageables. (a) les NCP s'empilent les uns sur les autres avec leur axe S, parallèle à l'axe de la colonne. (b) L'axe S des NCP ne correspond plus avec l'axe d'empilement des NCP. Les particules présentent alors un angle d'inclinaison de 14°.

c) Distorsion des bicouches ?

On observe sur la Figure IV-7(b) que les pics fins de diffraction décrits ci-dessus se superposent en fait à des maximas de diffusion beaucoup plus larges, et situés aux alentours de 0,06$Å^{-1}$, 0,11$Å^{-1}$ et 0,17$Å^{-1}$. Comme nous le verrons dans le paragraphe IV.D.2 pour la concentration saline de 37 mM, un tel profil traduit un désordre inter et intra-colonnes de

NCP. Il peut être le reflet de la courbure des bicouches, observée en microscopie, mais aussi de régions de l'échantillon qui ne seraient pas en phase lamellaire, mais dans une phase désordonnée.

IV.C.2 Influence des paramètres

IV.C.2.1 Effet de la pression osmotique

L'effet de la pression osmotique sur les paramètres de la phase lamellaire, a été étudié au cours d'une nouvelle série d'expériences en faisant varier systématiquement la pression de $4{,}7.10^5$ à $2{,}35.10^6$ Pa, correspondant à des concentrations de PEG de 19 à 35%. Au cours de ces expériences, la concentration en sel ajouté était de 15 mM, et la concentration initiale en NCP de 256 mg/ml. Les échantillons ont été analysés 1 mois après leur préparation.

La première remarque concerne l'échantillon obtenu avec une concentration de PEG de 19%. Cet échantillon a conduit à des diagrammes de diffraction très variables suivant la zone illuminée par les rayons X, et différents du diagramme décrit précédemment pour la même concentration de PEG (19%) mais des conditions de sel (C_s=25 mM) et de concentration initiale (C_i=205 mg/ml) différentes. Cet échantillon est très certainement multiphasique et les digrammes de rayons X qu'il produit n'ont pas pu être interprétés.

Par contre, à partir de la concentration en PEG de 23%, on retrouve des diagrammes de diffraction tout à fait analogues à celui décrit dans le paragraphe précédent, caractéristiques d'une phase lamellaire de bicouches, avec une organisation monoclinique à l'intérieur des couches. La variation des paramètres de la phase lamellaire en fonction de la pression osmotique de la solution est présentée dans le Tableau IV-3, ci dessous.

Pression osmotique	PEG 23% $7{,}6.10^5$ Pa	PEG 25.5% $1{,}00.10^6$ Pa	PEG 35% $2{,}35.10^6$ Pa
Paramètres	a=111,6 Å b=62,0 Å β=104° d_L=376,5 Å	a=110,9 Å b=61,4 Å β=104° d_L=374 Å	a=107,6 Å b=58,9 Å β=104° d_L=358 Å
Concentration	271 mg/ml	277 mg/ml	316 mg/ml

Tableau IV-3: Variation des paramètres de la phase lamellaire en fonction de la pression osmotique de la solution, pour une concentration en sel ajouté égale à 15 mM. Le temps d'équilibration des échantillons est de 1 mois. La concentration initiale en NCP est de 256 mg/ml.

On observe une diminution de 4 à 5% des trois paramètres caractéristiques a, c et d_L , (appelé P sur la Figure II-12a'). De plus, comme nous l'avons déjà observé pour la concentration saline de 160 mM, l'augmentation de la pression conduit à une augmentation de la largeur des pics de diffraction par rapport à la résolution expérimentale, ce qui traduit une détérioration de l'ordre à longue distance.

IV.C.2.2 Effet du temps d'équilibration

Comme pour la concentration saline de 160 mM, nous avons cherché à étudier l'effet sur l'organisation de la phase du temps écoulé entre préparation et analyse des échantillons. Nous avons donc étudié à deux reprises le même échantillon (pression osmotique de $7{,}6.10^5$ Pa (PEG 23%) et concentration en sel ajouté de 15 mM), avec des temps d'équilibration de 1 et 7 mois. On constate que l'augmentation du temps d'équilibration d'environ 6 mois ne provoque pas de changement important des paramètres cristallins a, c et d_L du système. On observe une augmentation à peine significative (environ 1%) de ces paramètres. L'équilibre de la phase lamellaire semble donc être atteint relativement rapidement, en un mois ou moins.

En conclusion, pour les concentrations salines les plus faibles, inférieures à 25 mM, et pour des pressions osmotiques supérieures à $4{,}7.10^5$ Pa, les particules cœur de nucléosomes présentent une organisation lamellaire de bicouches. Dans le plan d'une bicouche, les particules s'organisent en un réseau monoclinique à deux dimensions. Elles forment des colonnes à l'intérieur desquelles elles adoptent un angle d'inclinaison de 14° par rapport à l'axe de la colonne (voir Figure IV-8). L'augmentation de la pression osmotique de $4{,}7.10^5$ à $2{,}35.10^6$ Pa ne modifie pas l'organisation globale des particules, mais provoque une augmentation de la concentration en particules de 270 à 320 mg/ml. Contrairement au cas étudié précédemment (C_s=150 mM) l'état d'équilibre est ici atteint relativement rapidement, puisqu'un mois après la préparation des échantillons, les paramètres du réseau n'évoluent plus. Finalement, il faut noter qu'aucune orientation, même partielle, n'a été obtenue sur cette phase, après application d'un champ magnétique.

IV.D Observations pour les concentrations salines intermédiaires

IV.D.1 Concentration saline de 50 mM

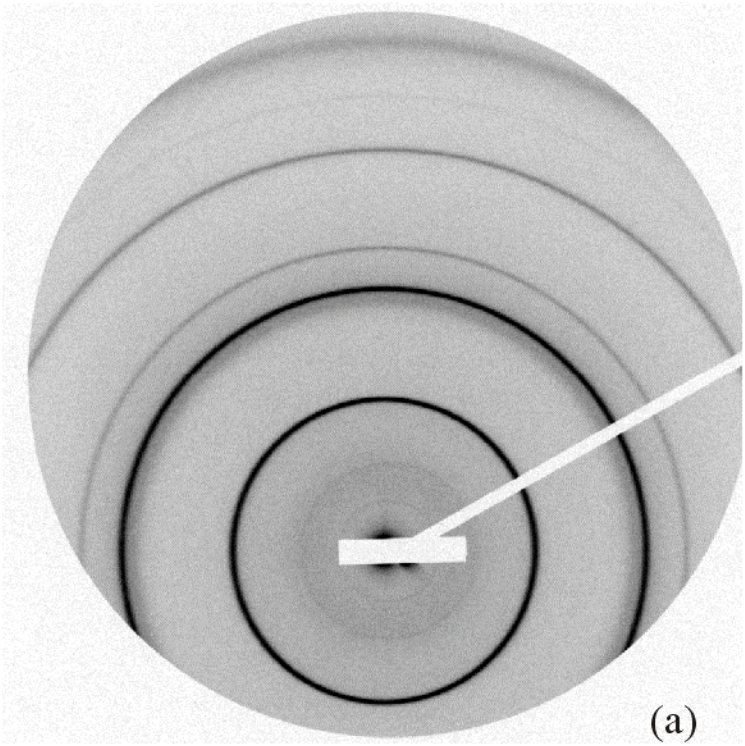
Pour cette concentration saline, deux expériences ont été effectuées, avec deux concentrations initiales en NCP différentes. Ces deux expériences ont conduit à des résultats différents, que nous allons successivement décrire.

IV.D.1.1 Concentration initiale en particules égale à 225 mg/ml.

Le diagramme obtenu pour une pression de PEG de $4{,}7.10^5$ Pa et pour une concentration en sel ajouté de 50 mM est présenté sur la Figure IV-9a. Il s'agit d'un diagramme non orienté, réalisé un mois après la préparation de l'échantillon. Les anneaux de diffraction que l'on observe sur ce diagramme peuvent être regroupés en deux catégories (voir Figure IV-9b):

- cinq pics de diffraction ont la largeur de la résolution expérimentale $\Delta q=0{,}0007 Å^{-1}$ (largeur à mi-hauteur). Les positions en q de ces cinq pics sont dans des rapports 1 ; $\sqrt{3}$; $\sqrt{4}$; $\sqrt{7}$; $\sqrt{9}$ ce qui est la signature d'un ordre hexagonal à deux dimensions. Le premier pic étant situé en $q_1=0{,}0625 Å^{-1}$, le paramètre de cette organisation hexagonale est égal à: $a_H = \frac{2}{\sqrt{3}} \frac{2\pi}{q_1} = 116{,}1 Å$.

- Deux pics de diffraction, situés en $q_{1h}=0{,}1047 Å^{-1}$ et en $q_{2h}=0{,}2094 Å^{-1}$ sont légèrement élargis par rapport à la résolution. On constate immédiatement que $2\pi/q_{1h}=60 Å$ est voisin de la hauteur du nucléosome le long de son axe S.



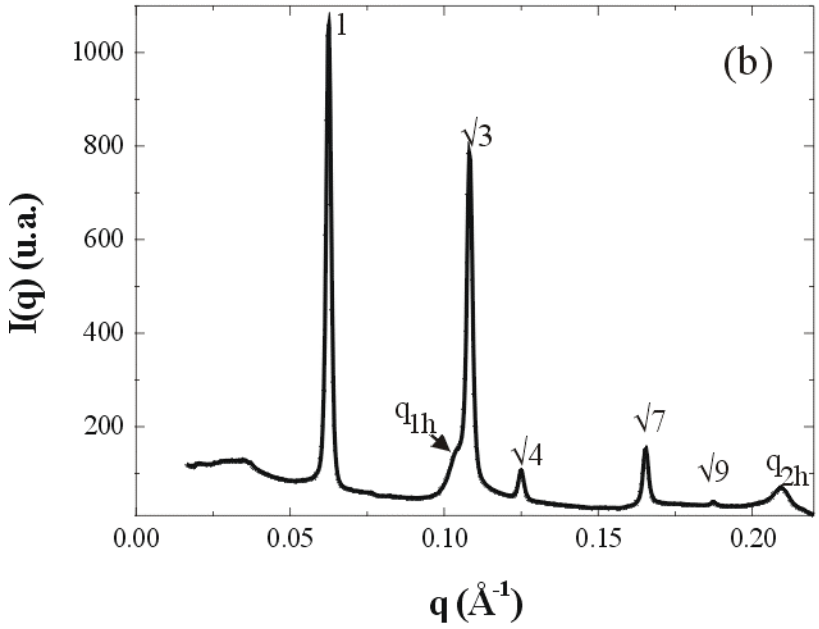


Figure IV-9 : (a) Diagramme de diffraction obtenu sur la ligne D24 à LURE, pour une concentration saline de 50 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%). L'enregistrement est effectué 1 mois après la préparation du capillaire. La concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique était égale à 225 mg/ml. (b) Intensité intégrée I(q) dans un cadran de 30° centré sur la verticale. Les pics repérés par 1, √3, √4, √7, √9 sont la signature d'un ordre hexagonal à deux dimensions. Les pics repérés par q_{1h} et q_{2h} correspondent à la distance entre deux NCP le long d'une colonne.

L'interprétation d'un tel diagramme est la suivante :

a) Organisation à deux dimensions

Dans cette phase, les NCP s'organisent en colonnes avec une distance d'empilement h de 60Å. Ces colonnes s'organisent entre elles en présentant un ordre hexagonal de paramètre a_H= 116,1Å. Aucun pic de diffraction supplémentaire n'est détecté sur le diagramme, laissant supposer un ordre hexagonal à deux dimensions, sans aucune corrélation entre l'organisation dans le plan perpendiculaire aux colonnes et l'empilement des NCP. Il est raisonnable alors d'en déduire que les colonnes sont libres de glisser les unes par rapport aux autres, et de tourner autour de leur axe.

b) Empilement dans les colonnes

Nous avons déjà mentionné au paragraphe IV.A.3 qu'il est difficile d'obtenir des informations sur la disposition des NCP à l'intérieur des colonnes quand on ne dispose pas d'un diagramme de diffraction orienté. On peut toutefois faire certaines suppositions. La première concerne l'éventuel décalage des NCP les uns par rapport aux autres le long des colonnes. Si les colonnes sont libres de glisser les unes par rapport aux autres, il est très peu probable qu'il puisse exister un décalage de plus de 10 Å entre deux NCP successifs, puisque le diamètre d'un NCP (de l'ordre de 105 Å) a une valeur très proche de celle du paramètre hexagonal a_H = 116.1 Å. On peut donc faire l'hypothèse que les colonnes sont "lisses". La deuxième supposition, concernant l'organisation périodique des NCP le long des colonnes, peut être déduite de l'analyse de la largeur des pics de diffraction situés en q_{1h} et q_{2h}, qui correspondent à l'empilement des NCP. Les élargissements de ces deux pics par rapport à la résolution expérimentale sont respectivement de 0.005 $Å^{-1}$ et 0.004 $Å^{-1}$ (à noter que pour le premier pic, situé en q_{1h}, il ne s'agit que d'une valeur approximative, car ce pic est très proche du pic situé en $q_1\sqrt{3}$ provenant de l'ordre hexagonal 2D, ce qui empêche une détermination précise de sa largeur). Nous avons vu au paragraphe IV.A.3.2 que ces élargissements sont dus en partie à la désorientation, celle-ci produisant un élargissement de 0.0042 $Å^{-1}$ pour le pic situé en q_{1h}, et un élargissement de 0.0024 $Å^{-1}$ pour le pic situé en q_{2h}. On voit donc que, si l'on tient compte de la désorientation, il ne subsiste qu'un élargissement extrêmement faible des deux pics de diffraction considérés, de l'ordre de 0.0008 $Å^{-1}$ et 0.0016 $Å^{-1}$ respectivement. Si l'on reprend les considérations présentées au paragraphe IV.A.3.2 sur l'effet d'un désordre

de position des NCP le long des colonnes, on arrive à la conclusion que les NCP sont régulièrement répartis le long des colonnes, avec une interdistance de 60 Å, l'écart type de la distribution des distances inter-NCP le long des colonnes étant nécessairement inférieure à 1%. Il paraît très peu probable, dans ces conditions, que les NCP soient libres de tourner autour de leur axe au sein de la colonne, mais nous rappellerons encore une fois que la réponse à cette question ne peut être définitivement obtenue que si l'on dispose d'échantillons très bien orientés.

IV.D.1.2 Evolution au cours du temps

Dans le but de savoir si l'organisation hexagonale à deux dimensions pouvait évoluer vers une phase hexagonale ou quasi-hexagonale à trois dimensions, nous avons à nouveau étudié ce même échantillon 7 et 17 mois après sa préparation. Les diagrammes obtenus sont dans les deux cas qualitativement similaires à celui présenté sur la Figure IV-9. Quel que soit le temps d'équilibration, cet échantillon présente une organisation colonnaire hexagonale, dont les paramètres sont résumés dans le Tableau IV-4.

Temps d'équilibration	1 mois	7 mois	1 an et 5 mois
Paramètres	a_h=116,1 Å h=60,0 Å	a_h=113,3 Å h=59,4 Å	a_h=110,0 Å h=57,67 Å
Concentrations	491 mg/ml	521 mg/ml	568 mg/ml

Tableau IV-4 Variation des paramètres de la phase colonnaire hexagonale obtenue pour une concentration en sel ajouté de 50 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa. Cet échantillon a été analysé 1, 7 et 17 mois après sa préparation.

On constate que même 7 mois après leur préparation, les paramètres des échantillons ne sont pas stabilisés. Leur évolution n'est pas négligeable, puisque l'on observe une augmentation de la concentration de plus de 40 mg/ml, soit environ 9%, lorsque le temps d'équilibration passe de 7 à 17 mois.

IV.D.1.3 Concentration initiale en particule égale à 260 mg/ml

La deuxième série d'expérience à C_s=50 mM, a été réalisée avec une concentration initiale en NCP identique à celle utilisée pour les fortes concentrations salines 160 et 100 mM.

Pour cette série, nous avons fait varier systématiquement la pression osmotique de l'échantillon de $4{,}7.10^5$ à $2{,}35.10^6$ Pa, correspondant à des concentrations en PEG de 19 à 35%. De plus, certains échantillons ont été orientés sous champ magnétique. Nous avons attendu deux mois entre la préparation des échantillons et leur analyse.

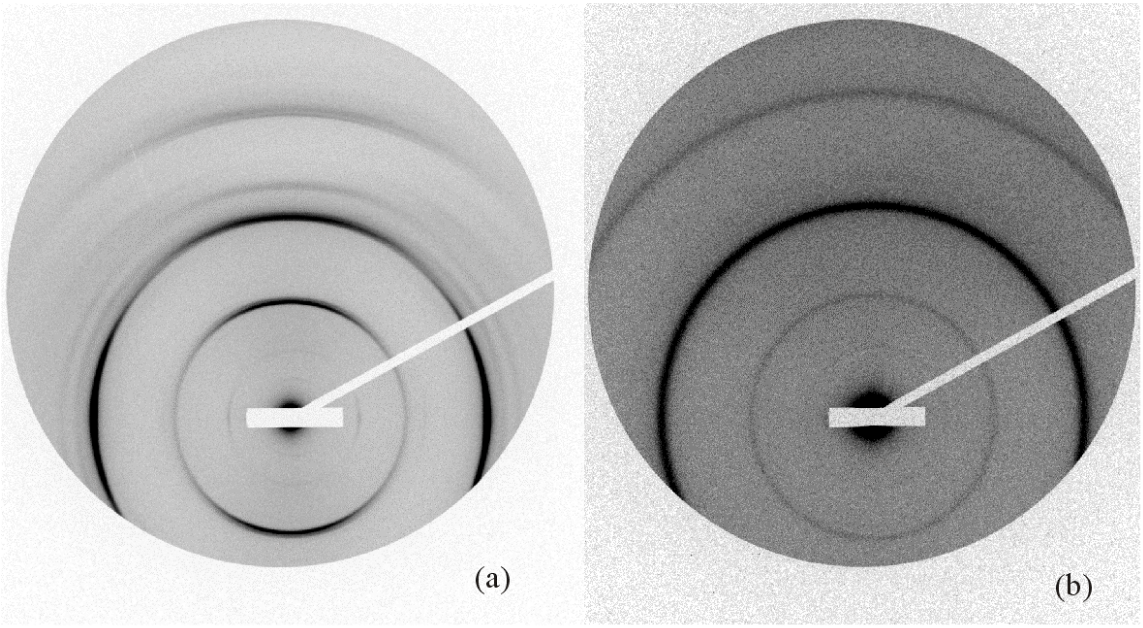


Figure IV-10 : Diagramme de diffraction obtenu sur la ligne D24, pour une concentration saline de 50 mM, et une concentration de PEG égale à (a) 23 et 35% (b). Les échantillons ont été analysés deux mois après leur préparation. La concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique était égale à 260 mg/ml. L'échantillon obtenu pour la concentration en PEG de 23% a été partiellement aligné sous un champ magnétique de 7 Tesla pendant un mois.

Le fait marquant est que nous n'avons pas réobtenu la phase colonnaire hexagonale précédemment décrite. Tous les clichés de diffraction des échantillons analysés présentent une organisation cristalline à trois dimensions, quasi-hexagonale, identique à celle obtenue pour les fortes concentrations salines. Un exemple en est montré sur la Figure IV-10a, pour un échantillon orienté sous champ, compressé avec une solution de PEG 23%. L'évolution des paramètres cristallins, quand la pression osmotique augmente, est quasiment identique à celle précédemment décrite pour la concentration en sel ajoutée égale à 160 mM. Par ailleurs, l'augmentation de la pression osmotique provoque, comme à 160 mM, une dégradation importante de l'ordre à l'intérieur de l'échantillon (voir Figure IV-10b). Les pics de diffraction deviennent de plus en plus élargis par rapport à la résolution expérimentale. Pour les pressions supérieures à $2{,}35.10^6$ Pa, correspondant à une concentration en PEG de 35%, l'organisation

tri-dimensionnelle s'est considérablement dégradée : tous les pics de diffraction correspondant à une corrélation entre l'ordre transverse et l'ordre le long des colonnes ont disparu (Figure IV-10b). Cet échantillon présente une concentration en particules relativement élevée, de l'ordre de 610 mg/ml, 2 mois après sa préparation. Finalement, le champ magnétique ne semble pas avoir d'influence notoire sur l'organisation des NCP à 50 mM, comme cela a été observé précédemment pour C_s=160 mM.

En conclusion, l'organisation des particules cœurs de nucléosomes pour une concentration saline égale à 50 mM dépend fortement de la concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique. Si l'on part d'une concentration initiale de 225 mg/ml, on obtient une organisation colonnaire hexagonale. Les particules s'empilent les unes sur les autres pour former des colonnes 'lisses'. Les colonnes ainsi formées sont libres de glisser les unes par rapport aux autres et s'organisent suivant un réseau hexagonal à deux dimensions. Par contre, pour une concentration initiale en NCP égale à 260 mg/ml, on observe une organisation cristalline parfaite, similaire à celle précédemment décrite pour les fortes concentrations salines ($C_s \geq 100$ mM). Les concentrations finales en particules dans ces deux phases sont quasiment identiques et de l'ordre de 500 mg/ml pour la pression osmotique la plus faible ($4{,}7.10^5$ Pa). L'utilisation d'un champ magnétique, qui favorise l'alignement des colonnes, ne semble pas modifier l'organisation de ces phases.

IV.D.2 Concentration saline intermédiaire (37 mM)

Pour les faibles concentrations salines, inférieures à 25 mM, les particules cœurs de nucléosomes présentent une organisation en bicouche lamellaire. Pour les concentrations salines supérieures ou égales à 50 mM, les particules présentent une organisation colonnaire hexagonale ou une organisation à trois dimensions quasi-hexagonale dont les caractéristiques sont complètement différentes de celles de la phase lamellaire. Nous avons donc cherché à déterminer l'organisation des particules pour une concentration saline intermédiaire, égale à 37 mM.

IV.D.2.1 Pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa et concentration initiale de 225 mg/ml

Les clichés de diffraction obtenus pour une concentration saline de 37 mM et une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa sont présentés sur la Figure IV-11. Ces deux diagrammes ont été obtenus (a) 1 mois et (b) 7 mois après la préparation de l'échantillon. La concentration initiale de l'échantillon était de 224 mg/ml. Les intensités I(q) obtenues par intégration de ces deux diagrammes dans un cadran de 30° centré sur la verticale sont aussi représentées en Figure IV-11(c). Les caractéristiques principales des deux diagrammes sont extrêmement différentes.

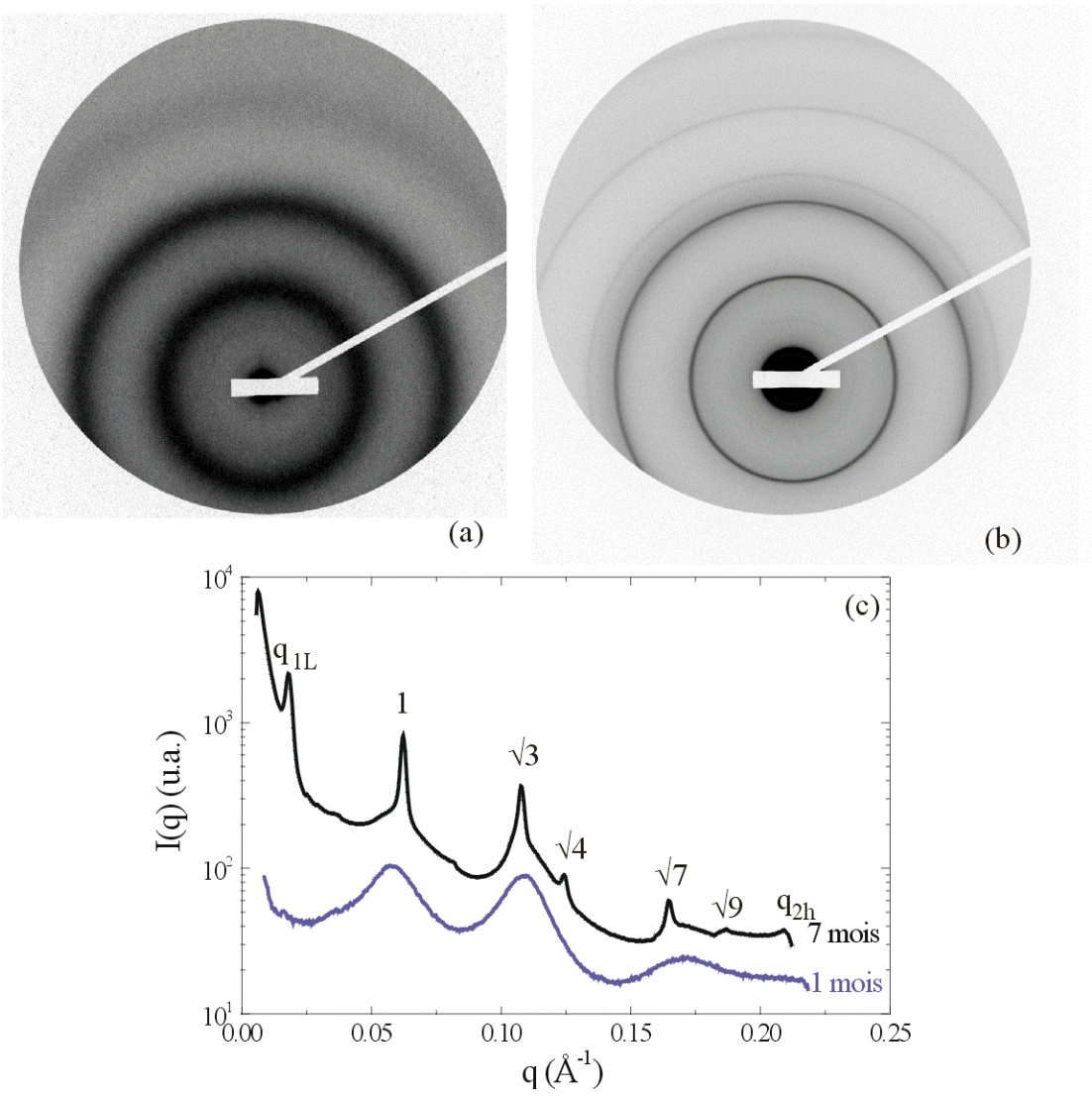


Figure IV-11: Diagramme de diffraction obtenu sur la ligne D24 à LURE pour un échantillon de concentration en sel ajouté égale à 37 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%). Les échantillons sont analysés (a) 1 mois et (b) 7 mois après leur préparation. (c) L'intensité diffractée I(q) est obtenue par intégration dans un cadran supérieur de 30°, centré sur la verticale.

Le diagramme obtenu 1 mois après la préparation de l'échantillon est complètement différent de tous les diagrammes présentés jusqu'à maintenant, puisqu'il présente des anneaux de diffraction très larges par rapport à la résolution instrumentale. Ces anneaux sont situés en q = 0.0594 $Å^{-1}$, 0.1102 $Å^{-1}$ et 0.1715 $Å^{-1}$, et leurs largeurs sont respectivement de 0.0100 $Å^{-1}$, 0.0096 $Å^{-1}$ et 0.0171 $Å^{-1}$ (à comparer à la largeur de la résolution instrumentale, qui est de 0.00145 $Å^{-1}$ dans cette expérience). Le premier pic est caractéristique des inter-distances entre objets diffusants, c'est le premier pic de la fonction d'interférence du système (ou facteur de structure S(q), comme défini dans le paragraphe III.B.3.1). Le premier point à élucider est la nature des objets diffusants : NCP isolés ou colonnes de NCP? Pour répondre à cette question, nous avons simulé l'intensité diffusée I(q) = F(q).S(q), le facteur de forme F(q) étant calculé pour une particule cœur isolée, à partir des coordonnées cristallographiques, en utilisant le programme CRYSOL développé par D. Svergun (le calcul est explicité dans le chapitre V consacré aux solutions diluées, paragraphe V.A.2.2). Le facteur de structure est celui calculé par Busson et Doucet pour des objets cylindriques présentant un ordre hexagonal local, à très courte distance (Busson et Doucet, 2000). Il n'a pas été possible, par ces simulations, de décrire le profil observé sur la Figure IV-11, et plus particulièrement de rendre compte du pic situé en 0.1102 $Å^{-1}$. Il est donc complètement improbable que les objets diffusants soient des NCP isolés, et l'on est conduit à admettre que les NCP, dans cette phase, s'empilent. Nous avons fait l'hypothèse qu'il s'agissait d'un empilement de type colonne. Nous avons alors calculé le facteur de forme $F(q_\perp)$ d'une colonne dans son plan équatorial, c'est-à-dire en fonction du vecteur de diffusion $q_\perp$, perpendiculaire à l'axe de la colonne (les notations ont été explicitées dans le paragraphe IV.A.3.2, et le programme utilisé est celui mentionné dans ce même paragraphe). Le calcul a été fait en permettant aux NCP une rotation de 360° autour de leur axe S, un angle d'inclinaison compris entre 0 et 25°, et un décalage latéral entre deux NCP successifs compris entre 0 et 35 Å. Le résultat est présenté sur la Figure IV-12, conjointement avec le facteur de forme d'une particule cœur isolée. On voit apparaître un maximum d'intensité au voisinage de 0.11 $Å^{-1}$. Le calcul de l'intensité diffusée I(q) = F(q).S(q), en utilisant le même facteur de structure S(q) que précédemment, montre que ce maximum est toutefois insuffisant pour expliquer la forte intensité observée expérimentalement pour le pic en q = 0.1102 $Å^{-1}$. Mais il faut garder en mémoire que l'empilement des NCP le long des colonnes, avec une inter-distance de 60 Å, produit des strates de diffusion au voisinage du méridien (voir Figure IV-2 (b) et (c)), la plus intense étant située au voisinage de $q_{//}$ =0.105$Å^{-1}$ (=2π/h avec h=60Å). Pour un échantillon désorienté, les

deux maxima, provenant de l'équateur et du méridien, se superposent. Il est très probable que ces deux maxima de diffusion soient à l'origine du pic large observé en q = 0.1102 $Å^{-1}$. Pour confirmer cette hypothèse, il aurait fallu simuler l'intensité diffusée par une colonne de NCP dans tout l'espace réciproque, et pas seulement sur le méridien et sur l'équateur, mais nos moyens informatiques n'ont pas rendu possible une telle simulation. Il est toutefois satisfaisant de constater que la structure en colonnes "imparfaites", proposée ci-dessus, permet également de rendre compte du troisième pic observé en 0.1715 $Å^{-1}$, qui serait la superposition du maximum de diffusion apparaissant au voisinage de 0.17 $Å^{-1}$ le long de l'équateur (voir la Figure IV-12), et de la strate de diffusion perpendiculaire au méridien et située en $q_{//}$ = 0.157 $Å^{-1}$ (=3π/h = 2π/40 si h=60Å) (qui, par désorientation, produit une diffusion intense aux alentours de 0.17 $Å^{-1}$, comme on peut le comprendre à partir des figures IV-2(b) et (c)).

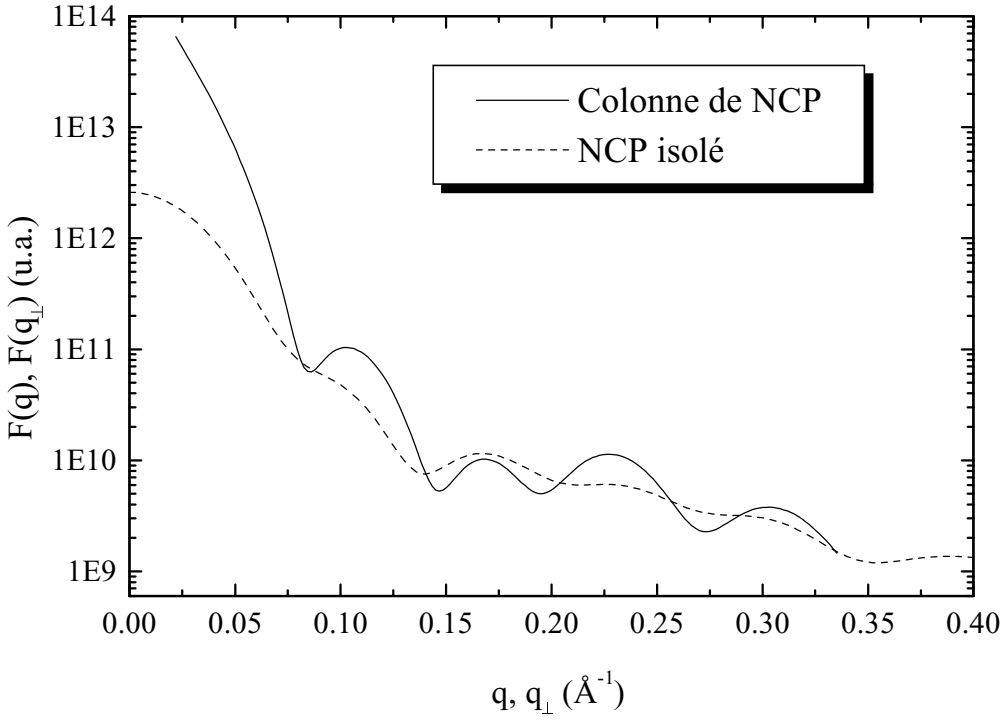


Figure IV-12: Calcul du facteur de forme F(q) d'un NCP isolé pouvant adopter toutes les orientations et du facteur de forme $F(q_\perp)$ d'une colonne de NCP dans son plan équatorial.

En résumé, le diagramme obtenu 1 mois après la préparation de l'échantillon est compatible avec une organisation en colonnes des NCP, les colonnes ne présentant pas entre elles d'ordre à longue distance (premier pic de diffusion large), et les NCP étant empilés peu

régulièrement le long des colonnes (deuxième pic de diffusion large). L'échantillon étudié n'ayant pu être orienté sous champ magnétique, nous ne sommes pas en mesure de dire si l'arrangement des colonnes entre elles est de type liquide, nématique, ou colonnaire hexagonal avec un ordre à courte distance. Nous ne pouvons également donner qu'un ordre de grandeur de l'inter-distance moyenne <a> entre colonnes, puisque la relation entre celle-ci et la position q_1 du premier pic de diffusion dépend du type d'arrangement : <a> = 1.23 *$2\pi/q_1$ = 130 Å dans le cas d'un liquide (Guinier, 1956), <a> = 1.117 *$2\pi/q_1$ = 118 Å dans le cas d'un nématique (de Vries, 1970), <a> = $(2/\sqrt{3})$*$2\pi/q_1$ = 122 Å dans le cas d'un ordre local colonnaire hexagonal.

L'analyse du même échantillon 7 mois après sa préparation révèle une organisation tout à fait différente. On observe en effet des pics de diffraction très peu élargis par rapport à la résolution expérimentale. Contrairement à l'observation précédente, on est en présence d'un échantillon présentant un ordre à longue portée. Le premier pic de ce diagramme est localisé en q_{1L}= 0,01816$Å^{-1}$, ce qui correspond à une distance de 346 Å. Pour les plus grandes valeurs de q, on observe des pics de diffraction dont les positions sont dans des rapports 1, √3, √4 et √7, √9 (caractéristique d'un ordre hexagonal à deux dimensions), le premier pic de cette série étant localisé en q=0,06222 $Å^{-1}$. Enfin, un pic légèrement élargi par rapport à la résolution instrumentale est observé en q_{2h}=0,2097$Å^{-1}$, qui est la position caractéristique du deuxième ordre de la périodicité h d'empilement des NCP le long des colonnes.

L'interprétation la plus simple de ce diagramme est qu'il s'agisse d'un échantillon biphasique. Le pic pointé à une distance de 346Å correspond à la distance entre bicouches au sein de la phase lamellaire. L'intensité de ce pic étant relativement faible, il n'est pas surprenant que les pics correspondant aux deuxième et troisième ordres, ainsi que les pics correspondant à l'ordre entre NCP au sein d'une bicouche ne soient pas détectés. Nous avons vu en effet, lors de l'étude de la phase lamellaire obtenue à bas sel (voir paragraphe IV.C) que tous ces pics ont une intensité inférieure à 0,6% de celle du pic correspondant au premier ordre de la périodicité lamellaire. Dans le cas étudié ici, l'intensité de ces pics devient alors très faible par rapport à celle du bruit de fond. Les autres pics du diagramme, présentés sur la Figure IV-11c, sont exactement identiques (mêmes positions, rapports d'intensité très similaires) à ceux obtenus dans la phase colonnaire hexagonale, avec un paramètre entre colonnes de 116,6 ± 0,2Å et une distance entre NCP le long des colonnes de 59,9 ± 0,3 Å.

L'échantillon étudié semble donc essentiellement biphasique, les deux phases en présence étant une phase lamellaire de bicouches et une phase colonnaire hexagonale. Toutefois, l'observation des profils de diffusion présentés sur la Figure IV-11c montre qu'il est possible qu'une région de l'échantillon soit encore en phase désordonnée, puisque les trois pics très larges (caractéristique de la phase désordonnée) semblent coexister (avec une intensité faible) avec les pics fins de diffraction.

En conclusion, un mois après sa préparation, l'échantillon obtenu pour une concentration saline de 37 mM, une concentration initiale en NCP de 224 mg/ml et une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa, présente une phase hors d'équilibre très désordonnée. Quelque mois plus tard, cet échantillon a subi une démixtion et présente deux phases bien ordonnées de concentrations différentes : une phase de type lamellaire et une phase de type colonnaire hexagonale. Il n'a pas été possible de réanalyser plus tard cet échantillon afin de continuer à suivre son évolution.

IV.D.2.2 Influence des paramètres

Afin d'étudier l'effet des différents paramètres (concentration initiale, pression osmotique, temps d'équilibration) sur l'organisation des NCP pour une concentration en sel ajoutée égale à 37 mM, nous avons réalisé une nouvelle série d'échantillons avec une concentration initiale de 260 mg/ml, et pour lesquels nous avons fait varier systématiquement la pression osmotique de la solution de $7{,}6.10^5$ à $2{,}35.10^6$ Pa, correspondant à des concentrations en PEG de 19 à 35%. Ces nouveaux échantillons ont été analysés 2 mois après leur préparation.

a) Effet de la concentration initiale en NCP et du temps d'équilibration

Le diagramme de diffraction ainsi que l'intensité intégrée I(q), obtenus pour la concentration de PEG égale à 19% sont présentés sur la Figure IV-13a. Comme dans le cas décrit précédemment pour la même concentration de PEG, mais après 7 mois d'équilibration et pour une concentration initiale de 225 mg/ml, cet échantillon présente nettement un caractère essentiellement biphasique, avec coexistence d'une phase lamellaire et d'une phase hexagonale (et probablement aussi d'une faible proportion de régions désordonnées). Cependant, on constate que la proportion de phase hexagonale est plus faible dans le

diagramme de la Figure IV-13 (obtenu 2 mois après préparation de l'échantillon) que dans le diagramme de la Figure IV-11b (obtenu au bout de 7 mois). La faible intensité de ces pics nous empêche de savoir s'il s'agit d'un ordre hexagonal à 2 dimensions ou d'un ordre quasi-hexagonal à 3 dimensions. Elle nous permet par contre de faire l'hypothèse que l'organisation hexagonale ou quasi-hexagonale (qui correspond à une concentration en NCP élevée, supérieure à 480mg/ml) met plus de temps à s'établir que l'organisation lamellaire (qui est moins dense, sa concentration étant de l'ordre de 300 mg/ml). Notons finalement que pour ce nouvel échantillon (C_i=260 mg/ml, temps d'équilibration de 2 mois), nous n'avons pas observé de diagramme de type désordonné, comme celui présenté sur la Figure IV-11a pour le premier échantillon (C_i=225 mg/ml, temps d'équilibration de 1 mois). Ceci peut provenir du temps plus long d'équilibration, mais plus probablement de la concentration initiale plus élevée, qui favoriserait la démixtion.

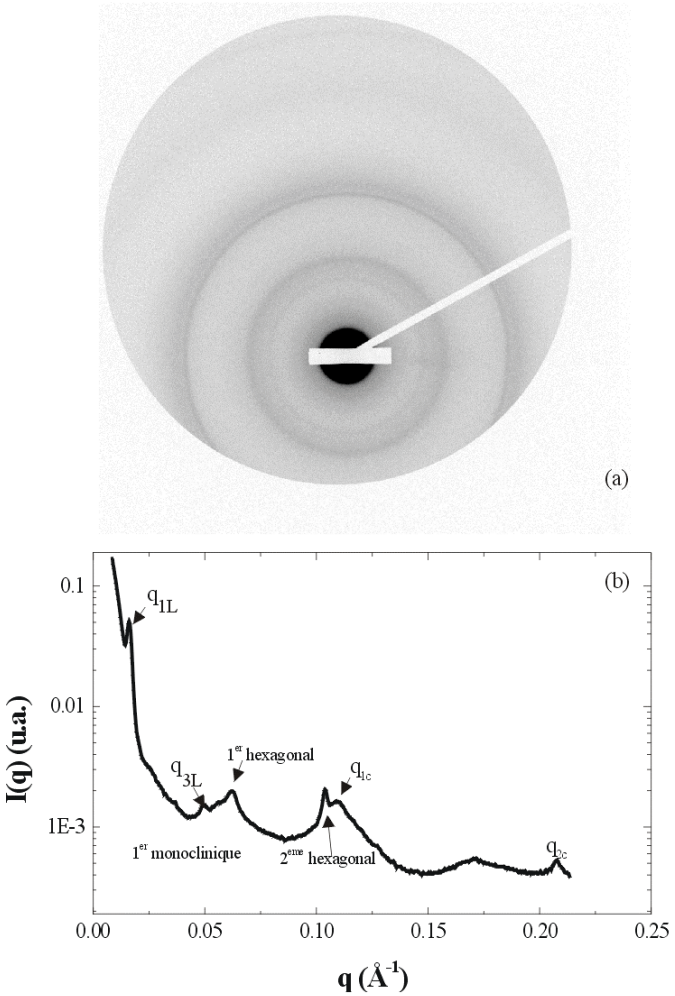


Figure IV-13: (a) Diagramme de diffraction obtenu sur la ligne D24, pour une concentration saline de 37 mM, et une pression osmotique égale à $4{,}7.10^5$ Pa (PEG 19%). La concentration initiale de la solution de NCP avant le stress osmotique était de 260 mg/ml. L'échantillon est analysé 2 mois après sa préparation. (b) Intensité I(q) correspondant au diagramme de diffraction, obtenue par intégration dans un cadran de 30° centrée sur la verticale.

b) Effet de la pression osmotique

L'effet de la pression osmotique est illustré sur la Figure IV-14, qui donne l'évolution de l'intensité diffusée obtenue par intégration des diagrammes de diffraction dans un cadran supérieur de 30°, pour des concentrations en PEG variant de 19 à 35%. Nous rappelons que la concentration initiale était de 260 mg/ml et le temps d'équilibration de 2 mois. On observe sur cette figure le passage d'une organisation essentiellement biphasique, lamellaire et hexagonale, pour 19% de PEG, à une organisation complètement désordonnée, pour 28 et 35 % de PEG, assez analogue à celle décrite dans le paragraphe IV.D.2.1 pour l'échantillon à PEG 19% de concentration initiale 224 mg/ml analysé au bout d'un mois (Figure IV-11). Le profil de diffusion obtenu à 23% est intermédiaire entre ces deux situations. Il semblerait donc qu'une augmentation de la concentration en PEG empêche les NCP de s'organiser en une (ou plusieurs) phase(s) ordonnée(s).

La seule différence notoire entre les profils de type "désordonné" obtenus à PEG 28 et 35% et présentés sur la Figure IV-14, et celui montré sur la Figure IV-11 pour PEG 19%, réside dans l'intensité du premier pic (situé au voisinage de 0.06 $Å^{-1}$), qui décroît quand la concentration en PEG augmente. L'explication en est simple : quand on compresse la solution, la distance moyenne entre colonnes diminue, ce qui entraîne un déplacement du premier pic du facteur de structure S(q) vers les plus grandes valeurs de q. Or, dans cette région de vecteur de diffusion, le facteur de forme F(q) des colonnes diminue violemment quand q augmente (voir la Figure IV-12). L'intensité diffusée I(q) étant le produit de ces deux quantités, il s'ensuit une diminution de la hauteur de son premier maximum quand on augmente la concentration de PEG.

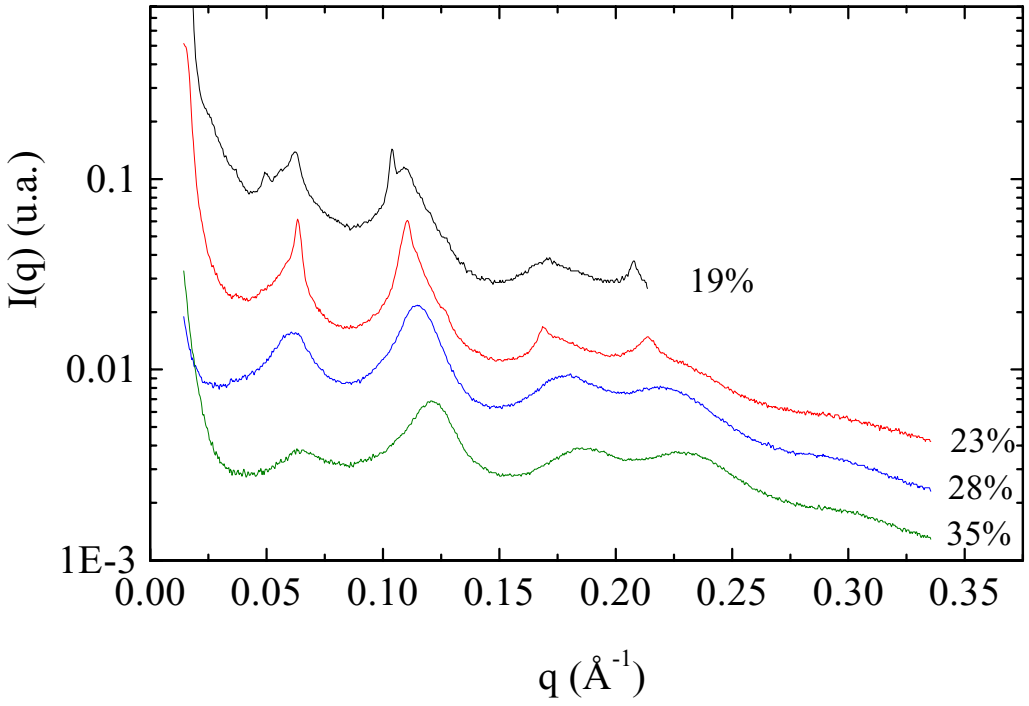


Figure IV-14 : Evolution de l'intensité diffusée pour une concentration saline de 37 mM en fonction de la pression osmotique de l'échantillon, qui varie de $4{,}7.10^5$ à $2{,}35.10^6$ Pa, ce qui correspond à des concentrations en PEG de 19 à 35%. La concentration initiale en NCP était de 260 mg/ml. Les échantillons sont analysés 2 mois après leur préparation. Pour les échantillons entre 23 et 35% de PEG, la distance échantillon-détecteur était de 1467 mm, plus petite que dans toutes les expériences montrées précédemment (D≈2480 mm), ce qui nous a permis d'explorer une région en q plus grande. On observe un quatrième pic de diffusion situé en q≈0,22-0,23 $Å^{-1}$, qui provient à la fois (comme pour les $2^{ème}$ et $3^{ème}$ pics) du maximum dans le facteur de forme $F(q_\perp)$ des colonnes, positionné vers 0,23$Å^{-1}$ (voir Figure IV-12) et de la strate de diffusion localisée sur le méridien (voir Figure IV-2 (b) et (c)) en $q_{//}$≈0,21$Å^{-1}$.

c) Effet du champ magnétique

Pour les concentrations en PEG de 19 et 23%, nous avons réalisé des échantillons sous champ magnétique, dans le but initial de mieux comprendre l'organisation des phases à 37mM, grâce à l'orientation des échantillons. Les diagrammes obtenus sont effectivement orientés, mais le résultat surprenant est qu'ils sont complètement différents des diagrammes obtenus dans les mêmes conditions (même concentration initiale en NCP, même pression osmotique et même temps d'équilibre), mais sans champ magnétique. Les échantillons ne semblent plus biphasiques, puisque les pics caractéristiques de la phase lamellaire ont disparu. Les pics observés sont caractéristiques d'une organisation quasi-hexagonale à trois dimensions, analogue à celle observée pour la concentration saline de 160 mM. Il semble donc que le champ magnétique favorise la formation d'une seule phase, quasi-hexagonale, au détriment de la phase lamellaire. Il faut toutefois remarquer que le fait que cette phase soit

ordonnée à trois dimensions, et non pas hexagonale à deux dimensions (comme c'est le cas pour l'échantillon biphasique de concentration initiale 225 mg/ml et analysé après 7 mois - (paragraphe IV.D.2.1), n'est peut-être pas dû à l'effet du champ magnétique, mais à la valeur de la concentration initiale, qui est de 260 mg/ml pour les échantillons placés sous champ. Nous avons en effet constaté, pour la concentration saline de 50 mM, que le type de phase, hexagonale 2D ou quasi-hexagonale 3D, semblait déterminé par la valeur de la concentration initiale en NCP.

En conclusion, la nature des phases denses observées, pour une concentration saline de 37 mM et pour une pression osmotique supérieure à $4{,}7.10^5$ Pa, dépend de plusieurs paramètres (temps d'équilibration, concentration initiale en NCP, champ magnétique). Nous avons pu montrer que pour des temps d'équilibration relativement longs, de l'ordre de quelques mois, les échantillons présentent une démixtion vers une phase lamellaire et une phase hexagonale. Cette démixtion se produit d'autant plus rapidement que la concentration en NCP initiale, avant l'application du stress osmotique, est élevée et que la concentration en PEG est faible. Avant la démixtion, les particules présentent une organisation colonnaire très désordonnée (désordre intra- et inter-colonnes). En l'absence d'orientation même partielle de cette phase, nous ne sommes pas capable de préciser si l'organisation des colonnes est de type liquide isotrope, nématique ou hexagonale à très courte distance. Nous avons aussi observé qu'en présence d'un champ magnétique, les NCP s'organisent immédiatement en une seule phase de type quasi-hexagonale à 3 dimensions. En d'autres termes, la présence d'un champ magnétique, tend à supprimer le désordre et favorise l'apparition d'une organisation hexagonale au détriment de la phase lamellaire.

IV.E Transition vers les phases denses : existence d'une phase non ordonnée de colonnes ?

Les différents travaux présentés dans les paragraphes précédents peuvent se résumer de la façon suivante : pour les faibles concentrations salines ($C_s \leq 25$ mM), les NCP s'empilent en colonnes "lisses", qui s'organisent elles-mêmes en bicouches régulièrement espacées, les distances inter-NCP à l'intérieur des colonnes, inter-colonnes à l'intérieur des bicouches et inter-bicouches étant telles que la concentration en NCP dans cette phase lamellaire est supérieure ou égale à 270 mg/ml. Pour les fortes concentrations salines ($C_s \geq 50$ mM), les

colonnes de NCP forment un réseau hexagonal à 2D ou quasi-hexagonal à 3D. Dans le cas de l'organisation à 2D, tout porte à croire que les colonnes soient "lisses", comme dans la phase lamellaire. Par contre, dans le cas de l'organisation à 3D, nos résultats ne permettent pas de savoir si les colonnes sont "lisses", ou s'il existe un décalage latéral entre NCP d'une même colonne, comme c'est le cas dans certains cristaux de NCP (Luger et al., 1997). En tous cas, la concentration en NCP dans ces phases hexagonale ou quasi-hexagonale est supérieure ou égale à 470 mg/ml. Quand la concentration saline a une valeur intermédiaire (C_s = 37 mM), la situation est plus complexe : on peut observer dans certaines conditions une phase désordonnée de colonnes de NCP (le désordre étant inter- et intra-colonnes), qui évolue au cours du temps vers un système biphasique (lamellaire et hexagonal).

La question que nous nous sommes alors posée est de savoir - dans les cas où les NCP, quand on les concentre, forment une seule phase dense ordonnée bien caractérisée ($C_s \leq 25$ mM et $C_s \geq 50$ mM) - comment l'on passe d'une phase isotrope de NCP isolés, à une phase dense de colonnes de NCP. En d'autres termes, quand on augmente la concentration en NCP, apparaît il entre ces deux phases une phase isotrope de colonnes? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé, pour C_s = 15 mM et C_s = 160 mM, des échantillons de concentration en NCP égale à 250 mg/ml, et pour C_s = 160 mM, un échantillon sous faible stress osmotique (concentration en PEG de 12 %). Par ailleurs, nous avions effectué sur un autre lot de NCP (lot 98I) des expériences sur des solutions de concentration en NCP croissant de 5 à 100 mg/ml (dont les résultats seront détaillés dans le chapitre suivant, consacré aux solutions diluées). Nous comparons ici les différentes courbes obtenues, afin d'avoir une image complète de l'évolution du système quand la concentration en NCP croît à partir de 5 mg/ml.

Les figures IV-15a et IV-15b montrent l'intensité diffusée par les solutions de concentration en NCP variant de 5 à 250 mg/ml, et pour un stress osmotique correspondant à PEG 12 %, respectivement, dans le cas C_s = 160 mM. On voit sur la Figure IV-15a que la courbe à 250 mg/ml est très peu différente des courbes obtenues à plus basse concentration en NCP, sauf dans la région des petites valeurs de q. L'évolution de I(q) quand la concentration en NCP augmente, observée pour $q < 0.05$ Å^{-1}, est due à l'évolution du facteur de structure. Par contre le facteur de forme des objets qui diffusent ne varie pas de manière significative, ce qui laisse à penser que, jusqu'à 250 mg/ml, les NCP restent isolés et ne s'associent pas (ou très peu) en colonnes. La courbe de la Figure IV-15b est complètement différente, puisqu'elle présente trois maxima larges situés aux alentours de 0.061 Å^{-1}, 0.105 Å^{-1} et 0.175 Å^{-1}. Comme

nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédent, le premier pic correspond simplement à l'inter-distance entre objets diffusants. Par contre, le deuxième ne peut s'expliquer que par une organisation en colonnes des NCP, avec un certain désordre à l'intérieur des colonnes. En l'absence de diagrammes orientés, nous ne pouvons évidemment pas savoir si ces colonnes forment une phase isotrope ou nématique, mais nous pouvons en tous cas affirmer qu'il existe, pour la concentration saline de 160 mM, une phase désordonnée de colonnes "imparfaites", entre la phase isotrope de NCP isolés, et la phase dense de colonnes organisée à trois dimensions.

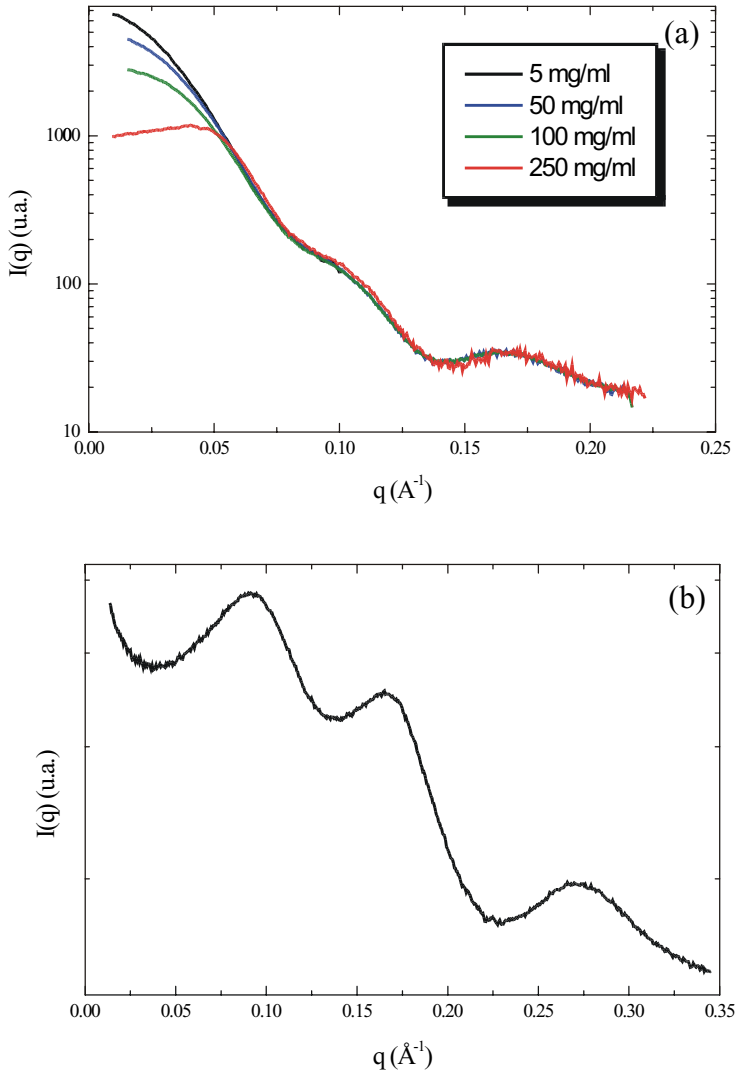


Figure IV-15 : (a) Intensité diffusée pour des solutions de NCP à une concentration saline de 160 mM, et pour des concentrations en NCP (a) variant de 5 à 250 mg/ml et (b) pour une solution de NCP équilibrée contre une pression osmotique de PEG 12%.

La situation pour la concentration saline C_s = 15 mM est représentée sur la Figure IV-16. On observe que la courbe obtenue pour une concentration en NCP de 250 mg/ml est

légèrement différente des courbes correspondant à C_{NCP} = 50 et 100 mg/ml, en particulier dans la région située autour de q = 0.11 $Å^{-1}$. Ceci pourrait laisser supposer qu'une certaine proportion de NCP s'est organisée en colonnes, ou tout au moins en oligomères de type colonne. Dans ces conditions, il n'est donc pas impossible qu'il existe une phase désordonnée de colonnes entre la phase isotrope de NCP et la phase lamellaire (comme cela a été observé en microscopie), mais le domaine en C_{NCP} sur lequel cette phase serait stable est nécessairement très restreint, puisque la phase lamellaire apparaît à partir de C_{NCP} = 270 mg/ml.

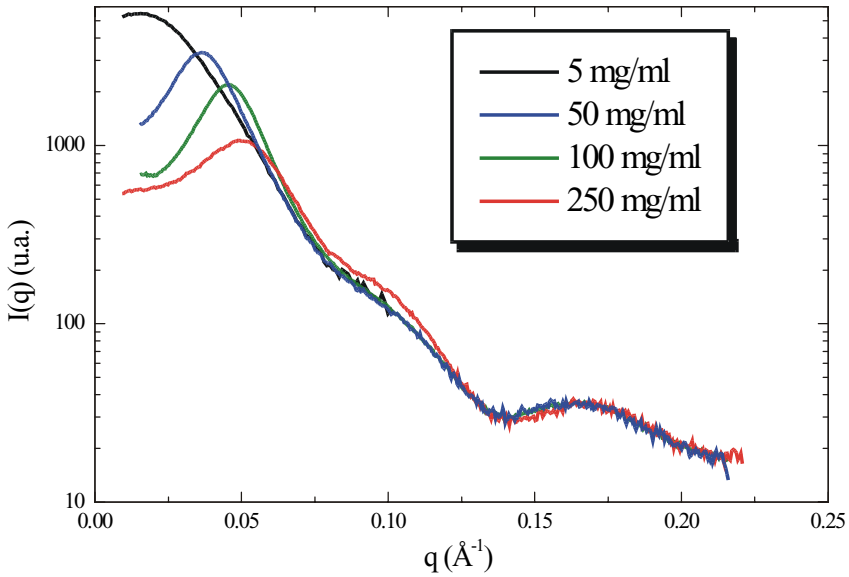


Figure IV-16 : Variation de l'intensité diffusée pour une concentration en NCP variant de 5 à 250 mg/ml et pour une concentration saline de 15 mM.

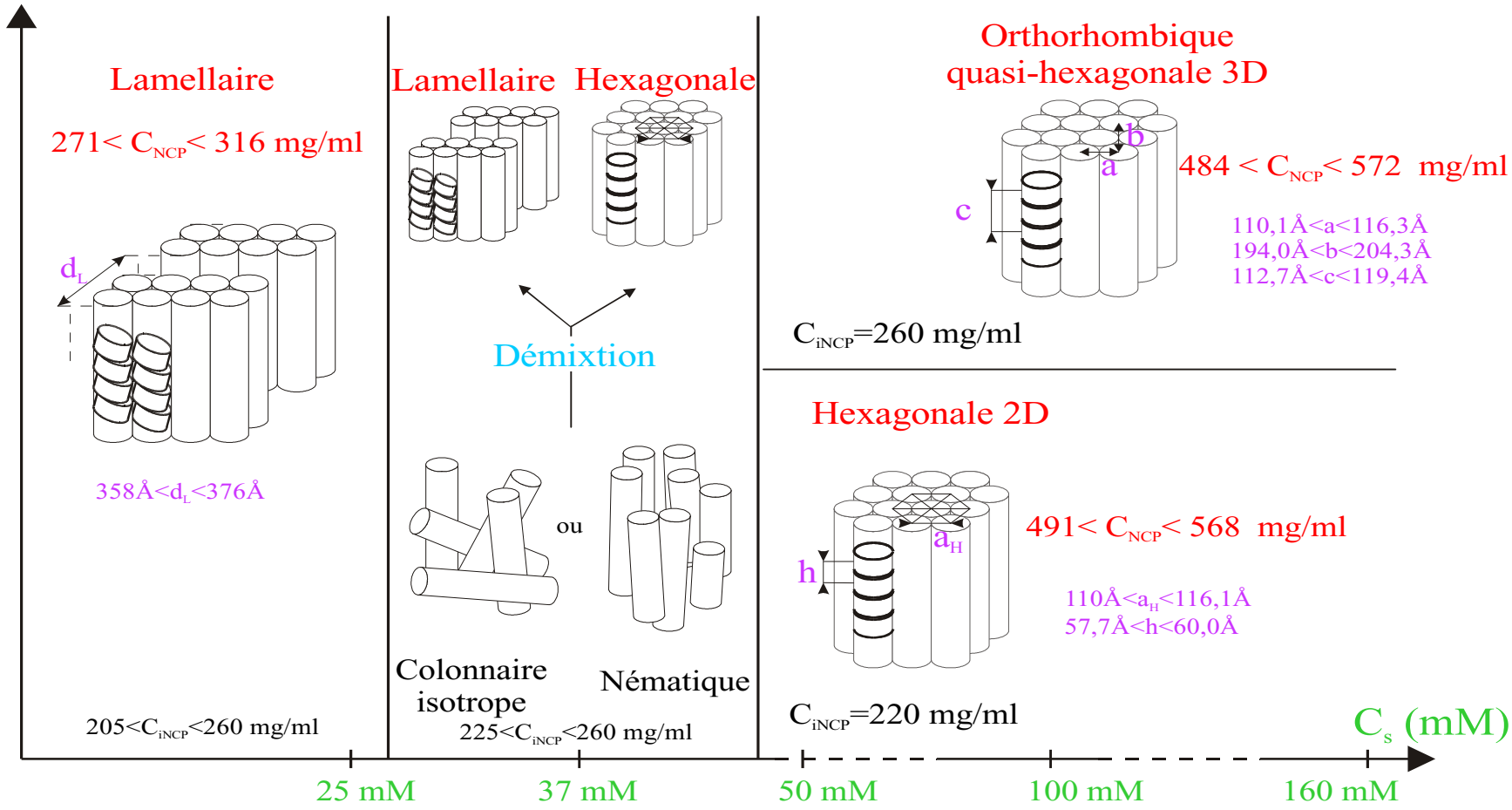
IV.F Discussion

Dans les paragraphes précédents, nous avons étudié précisément l'organisation des particules cœur de nucléosomes en faisant varier systématiquement la concentration en sel ajouté de la solution, et la pression osmotique des échantillons. Ces expériences nous ont permis de montrer que l'organisation des particules est fortement dépendante de la concentration saline de la solution, mais aussi de la concentration initiale des particules avant application du stress osmotique, et du temps d'équilibration des échantillons. La Figure IV-17 résume les organisations observées en fonction de ces paramètres.

Pour les faibles concentrations salines, inférieures ou égales à 25 mM, nous observons une phase lamellaire de bicouches. Au sein de chacune des deux couches d'une lamelle, les

NCP sont organisées régulièrement suivant un réseau monoclinique à deux dimensions. L'augmentation de la pression osmotique dans l'échantillon de $4{,}7.10^5$ à $2{,}35.10^6$ Pa provoque une diminution de la distance entre lamelles de 376 à 358Å. La distance entre colonnes et la distance entre NCP au sein d'une colonne diminuent dans les mêmes proportions de 111,4 à 104,4 Å et de 59,8 à 57,1 Å respectivement. Nous avons calculé que pour cette gamme de pression osmotique, la concentration en NCP dans cette phase varie de 271 à 316 mg/ml. L'équilibre de la phase lamellaire semble être obtenu relativement rapidement, en environ 1 mois. D'autre part, nous avons pu montrer que l'organisation de cette phase dense ne semble pas dépendre de la concentration initiale en NCP, et ne s'oriente pas sous champ magnétique.

Le comportement obtenu pour les fortes concentrations salines est complètement différent et présente une organisation hexagonale, organisée à deux ou trois dimensions suivant la concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique. Quelle que soit l'organisation considérée, ces phases tendent très lentement vers leur état d'équilibre. Nous avons pu montrer que même 7 mois après leur préparation, les distances caractéristiques entre particules continuent d'évoluer. Pour une concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique égale à 220 mg/ml, et pour une pression osmotique égale à $4{,}7.10^5$ Pa, les NCP présentent une organisation colonnaire hexagonale à deux dimensions. Les distances entre colonnes et entre NCP dans une colonne diminuent respectivement de 116 à 110Å et de 60 à 57,7Å, quand le temps d'équilibration augmente de 1 à 17 mois. La concentration en NCP dans cette phase varie donc au cours du temps de 491 à 568 mg/ml. Pour une concentration initiale en NCP de 260 mg/ml, et pour des pressions osmotiques variant de $4{,}7.10^5$ à $1{,}3.10^6$ Pa, les particules présentent une organisation à trois dimensions. En première approximation, la maille cristalline est orthorhombique, avec $b \approx a\sqrt{3}$ (ce qui indique qu'on est très proche d'un ordre hexagonal) et $c=2h$, h étant la distance entre deux NCP le long d'une colonne. L'augmentation de la pression osmotique provoque une diminution des trois paramètres a, b, c de 115,4 à 110,1 Å, de 203,6 à 194,0 Å et de 119,0 à 112,7 Å respectivement. Ces variations correspondent à une augmentation de la concentration finale en NCP de 484 à 572 mg/ml. Il est intéressant de noter que cette phase peut être partiellement alignée sous champ magnétique, ce qui facilite son étude. Sous les mêmes pressions les concentrations sont très comparables dans les phases colonnaire hexagonales 2D et 3D.



- Equilibre rapide
- Pas d'orientation sous champ
- Peu sensible à C_{iNCP}

- Equilibre très lent, d'autant plus lent que C_{iNCP} est faible et que la pression osmotique est élevée
- Sous champ, on observe directement une phase hexagonale sans passage par une phase désordonnée

- Equilibre très lent
- Orientation sous champ
- 2D ou 3D suivant C_{iNCP}

Figure IV-17 : Tableau synthétique résumant l'organisation des particules cœur de nucléosome en fonction de la concentration saline de la solution, et de la concentration initiale en NCP C_{iNCP} avant application du stress osmotique. L'effet du champ magnétique et du temps d'équilibration sont aussi indiqués. C_{NCP} représente la concentration finale en NCP

Pour une concentration saline intermédiaire, égale à 37 mM, la mise en ordre des NCP se fait très lentement, et dépend de la concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique. Pour une concentration initiale de 220 mg/ml, et un mois après leur préparation, les NCP présentent une phase désordonnée de colonnes (isotrope ou nématique), qui évolue vers une démixtion entre une phase lamellaire et une phase hexagonale. Pour une concentration initiale en NCP plus élevée, on observe également une démixtion mais qui se produit plus rapidement. L'utilisation d'un champ magnétique provoque directement l'apparition de la phase hexagonale, sans passage par une phase désordonnée.

En résumé, pour les faibles concentrations salines, on observe une phase lamellaire avec une concentration de l'ordre de 300 mg/ml, alors que l'on observe une phase hexagonale à forte concentration saline, avec une concentration en NCP de l'ordre de 500 mg/ml. Nous n'avons observé aucune autre phase supplémentaire à l'équilibre. Pour une pression osmotique fixée, l'augmentation de la concentration saline provoque donc une transition entre un état relativement peu dense à faible concentration saline, et un état plus dense à fort sel. Il est intéressant de noter qu'un comportement de même type est observé pour la fibre de chromatine pour laquelle l'augmentation de la concentration saline de la solution provoque la transition entre la fibre de 10 nm (forme relâchée) et la fibre de 30 nm (forme compacte) (Widom, 1986; voir Figure II-6).

IV.F.1 Phase hexagonale

Intéressons nous à présent, plus en détails, à la phase quasi-hexagonale à trois dimensions obtenue pour les plus fortes concentrations salines. Nous avons vu au paragraphe IV.B que cette phase cristalline présente des caractéristiques structurales communes avec les cristaux de NCP obtenus en présence d'ions divalents. En particulier, nous observons une organisation orthorhombique, quasi-hexagonale compatible avec un groupe d'espace $P2_12_12_1$. Comme nous l'avons précédemment expliqué, deux empilements colonnaires des NCP sont alors envisageables, et nos données de rayons X ne permettent pas d'écarter une de ces deux hypothèses. Cependant, l'analyse des images de microscopie électronique obtenues par cryofracture (Leforestier et Livolant, 2001) montre nettement l'organisation colonnaire des particules, sans observation d'un décalage latéral systématique entre NCP (voir Figure II-13). Il paraît donc raisonnable de penser que les colonnes formées sont "lisses".

D'autre part, nous avons noté, lors de l'indexation des pics de diffraction des diagrammes obtenus dans cette phase, (voir paragraphe IV.B.1) que certaines raies de diffraction difficilement indexables dans un réseau orthorhombique, pouvaient être dues à une légère distorsion de la maille orthorhombique. Les observations de microscopie optique ont montré que ces phases forment des germes à l'intérieur desquels la chiralité entre NCP donne lieu à une torsion mutuelle entre colonnes (twist) (voir paragraphe II.A.3.2.b). Dans ces conditions, il n'est donc pas impossible que cette torsion entre colonnes provoque une légère distorsion de la maille orthorhombique.

L'étude par diffraction des rayons X d'un échantillon monocristallin pourrait permettre d'indexer tous les pics de diffraction sans aucune ambiguïté, et ainsi de préciser l'organisation des NCP dans les colonnes, et de détecter une éventuelle torsion entre celles-ci. Tous les échantillons obtenus durant ce travail étaient polycristallins, mais comme l'atteste le diagramme présenté sur la Figure IV-5, ils étaient constitués de monocristaux de taille supérieure à quelques microns. Même si faute de temps, nous n'avons pu réaliser l'analyse par diffraction des rayons X d'un de ces monocristaux, une telle étude est tout à fait réalisable.

Etant donné nos conditions de préparation des échantillons (présence de sels monovalents uniquement, et ADN associé aux histones de longueur relativement polydisperse), il est assez remarquable d'avoir réussi à obtenir des cristaux avec un ordre parfait sur plusieurs microns. En effet, tous les cristaux décrits dans la littérature ont été obtenus en présence d'ions divalents, et en ce qui concerne les études les plus récentes (Lüger et al., 1997; Harp et al., 2000; White et al., 2001) avec de l'ADN comportant exactement 146 pb. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre II, les auteurs de ces dernières études (voir par exemple White et al., 2001), suspectent que l'organisation dans les cristaux soit gouvernée par trois types d'interactions :

(i) Les interactions entre extrémités des fragments d'ADN de deux NCP voisins situés dans le même plan (a,b) sont responsables de l'organisation quasi-hexagonale entre les particules.

(ii) Les interactions entre les faces supérieures et inférieures des octamères d'histones stabilisent l'empilement colonnaire des NCP.

(iii) Les interactions entre deux NCP successifs le long d'une colonne, par l'intermédiaire des ions divalents, et en particulier les ions Mn^{2+}, stabilisent également l'empilement colonnaire.

Dans nos études, nous avons porté une attention constante à garder intactes les queues des histones des NCP, permettant ainsi la stabilisation des empilements colonnaires des particules. Les deux points les plus étonnants sont donc les suivants :

- Nos cristaux ont toujours été obtenus uniquement en présence d'ions monovalents. Toutes nos solutions contiennent 1 mM d'EDTA qui chélate les éventuels ions divalents présents dans la solution. En l'absence totale d'ions divalents, les interactions mentionnées ci-dessus en iii) ne sont alors plus possibles.

- Dans notre cas, l'ADN ne présente pas une longueur parfaitement définie de 146 pb. Toutes nos études ont été réalisées sur des particules présentant une longueur d'ADN associée de 155pb, avec une polydispersité de ± 7pb. On imagine alors difficilement comment les extrémités de fragments d'ADN qui se font face vont interagir pour stabiliser l'organisation hexagonale. De plus, les valeurs des paramètres orthorhombiques sont comparables à celles obtenues dans les cristaux en présence d'ions divalents. Même si l'on néglige la polydispersité de nos échantillons, les 10 pb supplémentaires de l'ADN devraient provoquer une augmentation de la distance entre NCP d'environ 30Å (10x3,4Å), et ainsi une augmentation des paramètres a et b. Or, nous observons dans nos cristaux des paramètres a=110,1Å, b=194,0Å, c=112,7Å (NaCl 160 mM, PEG 28%), très peu supérieurs aux valeurs observées dans les cristaux en présence d'ions divalents (a=104,9Å, b=192,6Å et c=110,4Å pour Lüger et al, 1997).

Nous ne sommes pas en mesure de comprendre actuellement l'origine des forces qui stabilisent l'organisation parfaite que nous avons observée. Cependant, deux séries d'expériences supplémentaires nous ont permis de constater que l'on n'observe plus d'ordre à longue distance quand les queues des histones sont dégradées, ou quand l'ADN associé aux particules est trop long ou trop polydisperse.

Le diagramme de diffraction obtenu pour une concentration saline de 160 mM et une pression de PEG de 19%, avec une solution de NCP présentant une longueur d'ADN de 155 pb, mais ayant une partie des queues des histones H3 protéolysées, est présenté sur la Figure IV-18. La concentration initiale en NCP avant l'application du stress osmotique était égale à

250 mg/ml. Le temps d'équilibration de cet échantillon est de 1 mois. Ce diagramme présente des pics très élargis par rapport à la résolution instrumentale. Comme nous l'avons précédemment décrit pour la concentration saline égale à 37 mM, un tel diagramme caractérise une organisation colonnaire des NCP avec un désordre intra et inter colonne très important. Nous rappelons que pour des particules intactes, dans des conditions de préparation strictement identiques (même concentration initiale en NCP, même pression de PEG, même temps d'équilibration et même longueur d'ADN associée), le diagramme de diffraction obtenu est caractéristique d'une organisation cristalline orthorhombique, quasi-hexagonale, à trois dimensions.

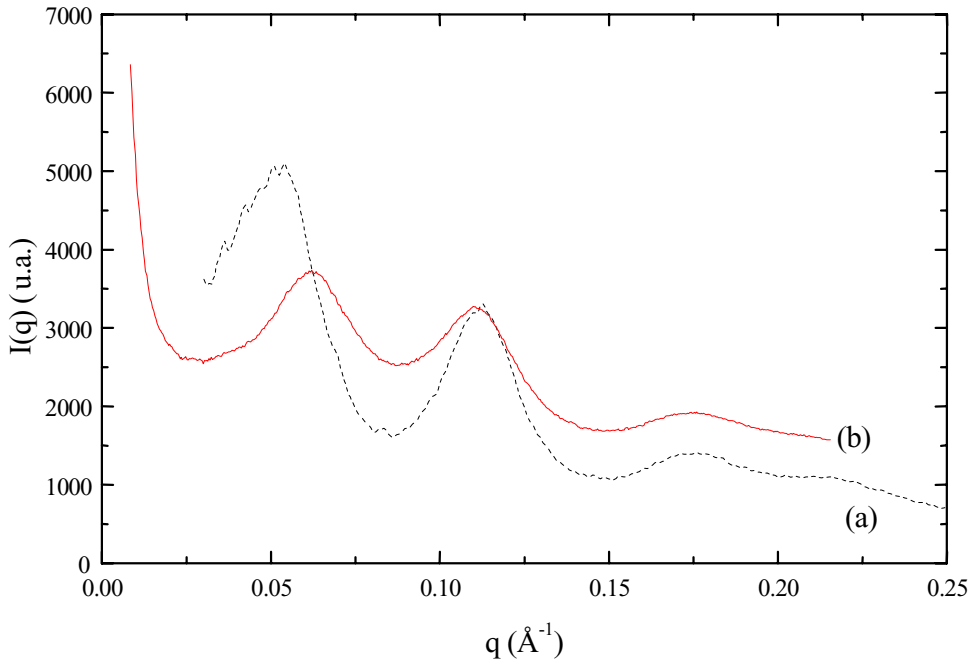


Figure IV-18 : Variation de l'intensité diffractée pour une concentration saline de 160 mM et pour une pression osmotique de $4{,}7.10^5$ Pa pour des NCP : (a) présentant des histones intactes et une longueur d'ADN de 170 pb et (b) présentant une longueur d'ADN de 155 pb mais pour lesquelles une partie des queues des histones H3 sont protéolysées.

La Figure IV-18 montre également le diagramme de diffraction obtenu à partir d'une solution de NCP présentant une longueur d'ADN égale à 170 ± 15pb, pour une concentration saline de 160 mM et PEG 19%. La concentration initiale de cet échantillon avant l'application du stress osmotique était égale à 230 mg/ml. Le temps d'équilibration est de 1 mois. Comme précédemment, ce diagramme présente des pics larges, caractérisant une organisation colonnaire très désordonnée. On remarque que le premier pic du diagramme de diffraction,

qui correspond à la distance moyenne entre colonnes, est situé à des valeurs de q plus petites. La position de ce pic correspond à des interdistances entre colonnes comprises entre 130 et 143Å environ (suivant le type d'organisation des colonnes entre elles, nématique, colonnaire hexagonale localement ou isotrope). Pour l'échantillon avec les histones partiellement protéolysées, l'interdistance moyenne est comprise entre 113 et 125Å. Nous rappelons que pour l'échantillon obtenu dans les mêmes conditions (1 mois d'équilibration, PEG 19%) avec une longueur d'ADN de 155pb et des histones intactes (voir paragraphe IV.B.1), nous avons trouvé, dans le réseau orthorhombique des paramètres a et b égaux à 116,3 et 204,3Å, ce qui correspond à une interdistance moyenne entre colonnes de 117,1Å.

En conclusion, l'ordre à trois dimensions entre NCP est détruit si les queues des histones sont protéolyées, ou si l'ADN est trop long et polydisperse. Il subsiste toutefois une organisation en colonnes, mais avec un désordre intra et inter colonnes. Dans le second cas, les interdistances entre colonnes sont considérablement augmentées, ce qui n'est pas surprenant.

IV.F.2 Phase lamellaire de bicouches

Considérons à présent l'organisation obtenue pour les concentrations salines inférieures à 25 mM. Les particules cœur de nucléosomes présentent une organisation lamellaire. Dans le plan d'une couche les NCP s'organisent en un réseau monoclinique à deux dimensions. Les particules s'empilent alors pour former des colonnes à l'intérieur desquelles elles sont inclinées de 14° par rapport à l'axe de la colonne.

Qualitativement, nos observations sont en accord avec les données de la microscopie électronique qui ont montré une organisation lamellaire en bicouches. Cependant, nous observons une périodicité lamellaire parfaite sur plus de 40 lamelles en moyenne alors que l'ordre lamellaire semble moins régulier et s'étend à moins grande distance sur les images de microscopie électronique. Rappelons toutefois que le mode de préparation des échantillons n’est pas le même dans les deux types d’expériences. Pour la microscopie électronique, les nucléosomes ont été concentrés dans un boudin de dialyse séparant les particules du PEG puis prélevés pour être analysés, alors que les NCP étaient en contact avec le PEG dans les capillaires préparés pour les analyses cristallographiques.

D'un point de vue macroscopique, les observations de microscopie optique montrent un enroulement des plans de bicouches pour former des tubes de quelques microns, de nouveaux tubes bourgeonnent à leurs extrémités conduisant ainsi à la formation de sphérulites denses. Ce comportement est dû à la structure chirale des NCP qui fait que les colonnes ont tendance à s'incliner les unes par rapport aux autres au sein des lamelles (torsion entre colonnes). Comme pour la phase hexagonale, la diffraction des rayons X sur des échantillons désordonnés ne permet pas d'obtenir des renseignements sur ce point. Cependant, nous avons noté lors de la description des diagrammes de diffraction que tous les clichés présentaient des maximas larges, superposés aux pics fins de diffraction, que nous interprétons comme un désordre intra et inter-colonnes dans certaines régions de l'échantillon, pouvant refléter ce comportement macroscopique. Nous avons essayé à plusieurs reprises d'obtenir des échantillons alignés pour permettre une description plus précise de cette organisation, mais aucun alignement n'a été observé. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ce phénomène. La première est reliée au comportement cristallin liquide de cette phase. On peut en effet imaginer que l'arrêt du champ magnétique provoque immédiatement, ou presque, la relaxation de l'orientation préférentielle des particules. La deuxième est liée à la nature même de cette phase, avec la formation de tubes qui peut paraître incompatible avec un alignement sous champ magnétique des particules. Rappelons en effet qu'il n'y a aucune corrélation d'orientation des colonnes d'une bicouche à la suivante.

Enfin, on peut se demander comment cette organisation lamellaire est modifiée lorsqu'une partie des queues des histones sont protéolysées ou lorsque l'on augmente la longueur d'ADN associée aux particules. Nous n'avons pu réaliser d'étude systématique pour tester l'effet de la protéolyse partielle des histones sur l'organisation des NCP. Par contre, quelques clichés de diffraction ont été réalisés sur des échantillons où l'ADN a 170 ± 15 pb. Ils semblent montrer que l'augmentation de la longueur d'ADN ne modifie ni l'organisation lamellaire en bicouches, ni les distances entre NCP à l'intérieur de celles-ci. On observe cependant une augmentation importante de la distance entre les lamelles. Ceci peut se comprendre à partir des observations de microscopie électronique (voir paragraphe II.A.3.2) qui montrent une orientation des particules telle que les extrémités libres de l'ADN sont à l'extérieur de la bicouche. Il s'ensuit que les paires de bases supplémentaires vont se situer à l'extérieur des lamelles, ne provoquant donc pas de changements importants des distances entre NCP au sein de celles-ci. Cependant, ces paires de bases supplémentaires augmentent les répulsions, et donc la distance entre bicouches.

IV.F.3 Effet du PEG

Dans la méthode de stress osmotique développée par Parsegian et al. (1986), une membrane semi-perméable sépare la solution que l'on concentre de la solution de PEG qui applique la pression désirée. Nous avons dans un premier temps essayé d'utiliser cette méthode pour préparer les phases denses, en utilisant des minicellules de dialyse que nous avions fabriquées à cet effet mais cette méthode s'est révélée infructueuse. La diminution de la taille de la cellule nous empêche d'atteindre les concentrations d'équilibre. Les phases denses ont donc été préparées en ajoutant le PEG directement dans la solution de NCP. Le problème est de savoir si l'on peut considérer le PEG comme inerte. Les informations récentes sont en effet contradictoires : certains travaux suggèrent que le PEG exerce des interactions attractives (ou répulsives) sur certaines molécules (Timasheff, 1998), alors que d'autres considèrent que le PEG ne met en jeu que les forces de déplétion classiques (de nature entropique) (Odijk, 2000). Dans nos expériences, on observe une interface nette entre la solution de PEG (20000 MW) et la solution de NCP lorsque la concentration de PEG est comprise entre 19% et 35% alors que cette séparation n'est plus aussi nette aux concentrations de PEG plus élevées. Nous observons également que l'ordre au sein de la phase dense de nucléosomes est moins bien établi aux très fortes concentrations de PEG. Ces observations suggèrent que d'autres interactions sont peut-être mises en jeu, et qu'elles sont éventuellement complexes du fait de l'hétérogénéité chimique des nucléosomes. Par ailleurs, deux autres effets interviennent lorsque les échantillons et le PEG sont mis en contact : (i) les effets de sel et (ii) les effets de concentration du PEG et des particules.

(i) En solution diluée, le PEG est classiquement utilisé pour induire la condensation de l'ADN en présence de sels (Lerman, 1971). La concentration critique de PEG dépend de la concentration en sels monovalents de la solution. Du point de vue théorique, cette condensation a été décrite en terme de transition pelote-globule. Dans ce cadre, il apparaît à faible concentration en sels monovalents et forte concentration en PEG un phénomène de décondensation de l'ADN (DeVries, 2001) ; appelé phénomène de réentrance, c'est à dire que celui-ci peut dans ces conditions se "décondenser". Il semblerait que ce phénomène soit également observé expérimentalement (Vasilevskaya et al, 1995). Cette dépendance en sel de l'effet du PEG pourrait intervenir dans nos expériences.

(ii) Quand on travaille avec des solutions concentrées, comme dans notre cas, l' addition de PEG provoque la démixtion entre une phase riche en particules et une phase riche en PEG,

Les phases denses de virus ont été beaucoup étudiées par ces méthodes (Adams et al, 1998; Adams et Fraden, 1998; Dogic et al, 2000) et les auteurs ont observé des phénomènes de micro-séparation de phases dont le polymorphisme est très riche. La nature des phases mixtes observées dépend de la concentration en PEG et en virus dans la solution. Le fait que l'interface ne soit pas nette dans certains de nos échantillons laisse supposer que nous puissions avoir ce même phénomène, même si nous avons cherché à le limiter en déposant le PEG au dessus de la solution de NCP, sans mélange des deux solutions. Dans des capillaires préparés pour la microscopie optique afin de contrôler les textures des solutions que nous analysions par diffraction des rayons X, nous avons observé ce phénomène de microséparation de phases aux concentrations salines intermédiaires (37mM NaCl). Dans ce cas, la solution de nucléosomes et la solution de PEG étaient introduites successivement par capillarité à l'intérieur d'un capillaire plat, provoquant un mélange plus important des deux solutions. L'analyse de ces microphases reste à faire.

IV.F.4 Intérêt et pertinence biologique

Ayant décrit les différentes phases denses formées par les particules cœurs de nucléosomes en fonction de la concentration en sels monovalents, la question que l'on se pose est de savoir s'il existe des organisations de ce type dans la chromatine *in vivo*.

Nous sommes bien conscients que les organisations observées dans ce travail ne reflètent probablement pas exactement la manière dont les particules sont organisées dans la chromatine. En effet, dans nos études, les particules cœurs de nucléosomes sont isolées alors que dans la chromatine, elles sont connectées par l'ADN de liaison. Cependant, il est raisonnable de penser que ces arrangements miment ce qui peut se passer in vivo. En effet, l'organisation des particules dans les phases denses est gouvernée par la recherche des minima énergétiques dans les contacts entre particules et les mêmes contraintes doivent s'appliquer au sein de la chromatine.

Les expériences ont en effet été réalisées dans des gammes de concentration comparables à celles du milieu nucléaire. Les concentrations en ADN varient de 50 à 250 mg/ml environ dans un noyau eucaryote, ce qui correspond à des concentrations en NCP comprises entre 100 et 500mg/ml environ. Les différents modèles d'organisation de la fibre nucléosomique qui ont été proposés au cours des années ne permettent pas d'atteindre ces concentrations au sein du noyau cellulaire (Daban, 2000). D'autres modèles doivent donc être envisagés. Les seules

données dont on dispose sur l'organisation de la chromatine in situ ont été obtenues par cryomicroscopie sur coupes des noyaux entiers (MacDowall et al, 1986). Des filaments de 11 nm de diamètre seraient organisés en une structure fluide compacte. Il pourrait s'agir de colonnes, comme celles que nous observons dans la phase lamellaire et dans les phases hexagonales. Une organisation de ce type a été proposée par Fajkus et Trifonov (2001) pour l'organisation de la chromatine télomérique. D'autres modèles d'organisation de la fibre de chromatine sont très peu différents d'une organisation colonnaire hexagonale et permettent d'atteindre des concentrations biologiquement pertinentes (Daban et Bermudez, 1998).

Les concentrations salines que nous avons explorées semblent raisonnables, en l'absence de données plus précises. Nous avons, il est vrai, négligé les effets des ions di et multivalents, qui jouent un rôle important dans la condensation de la chromatine. Nous savons qu'ils provoquent l'agrégation des nucléosomes isolés (qu'il s'agisse des ions Ca++, Mg++, ou spermine (4+) (de Frutos, 2001) et que cette agrégation est réversible par addition de sels monovalents dans la solution. On peut noter que ces ions induisent également la formation de colonnes de nucléosomes et leur organisation en phase isotrope, nématique ou colonnaire hexagonale selon les conditions ioniques de la solution (Leforestier et al, 1999).

Du point de vue biologique, ce sont peut être davantage les transitions entre ces différents types d'organisations que les phases elles-mêmes qui présentent le plus d'intérêt. Nous avons observé que sous une pression donnée, qui mime les effets d'encombrement macromoléculaire qui existent dans la cellule, de simples variations de la concentration en sels monovalents permettent de passer d'une organisation à une autre. Dans la cellule des variations locales des concentrations ioniques peuvent induire localement ce genre de transitions. Expérimentalement, il serait intéressant de faire varier continûment la concentration saline pour suivre cette transition.

CHAPITRE V

ETUDES DES SOLUTIONS DILUEES

Chapitre V ETUDES DES SOLUTIONS DILUEES

Dans ce chapitre, nous souhaitons étudier les effets de la concentration saline sur les interactions entre NCP en solution diluée ainsi que d'éventuels changements de conformation des particules. A cet effet, deux approches ont été utilisées : (i) une approche par diffusion des rayons X aux petits angles qui, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, permet d'étudier à la fois la forme des particules mais aussi leurs interactions, et (ii) une approche par osmométrie qui nous donnera des informations nous permettant d'aller plus loin dans l'analyse des interactions entre NCP.

V.A Etude de la conformation des NCP et de leurs interactions : approche par SAXS

Deux séries d'expériences ont été réalisées: une première avec le lot NCP_{165}, exploratrice, qui nous a permis de définir les modalités précises de la deuxième série, réalisée avec le lot NCP_{145}.

V.A.1 Résultats expérimentaux

V.A.1.1 NCP_{165}

Une première série d'expériences a été réalisée avec le lot NCP_{165} en couvrant une large gamme de concentrations salines (10 mM à 1M) et différentes concentrations en NCP (5, 10, 50, 100 mg/ml). Des exemples de spectres de diffusion sont présentés sur les Figure V-1 et Figure V-2.

La Figure V-1 présente les effets de la concentration saline pour une concentration en particules de 5 mg/ml. La courbe de diffusion obtenue à 10 mM présente très nettement un pic caractéristique de répulsion entre particules (Ducruix et al, 1996; Tardieu et al 1999). Ce pic disparaît lorsque l'on augmente la concentration saline de la solution, traduisant l'écrantage des interactions entre particules.

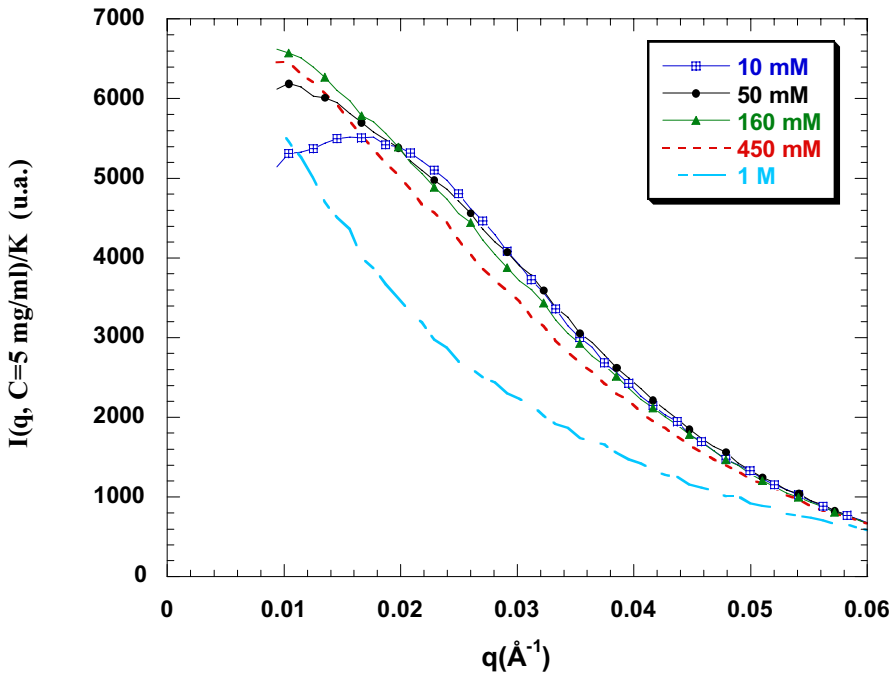


Figure V-1: Courbes de diffusion aux petits angles enregistrées pour différentes concentrations salines et une concentration en NCP_{165} de 5 mg/ml. Ces courbes sont normalisées par le contraste de densité électronique $K = \left(\frac{m_p N_A}{M} - \rho_s \overline{V}_p \right)^2$ (cf équation (III.8))

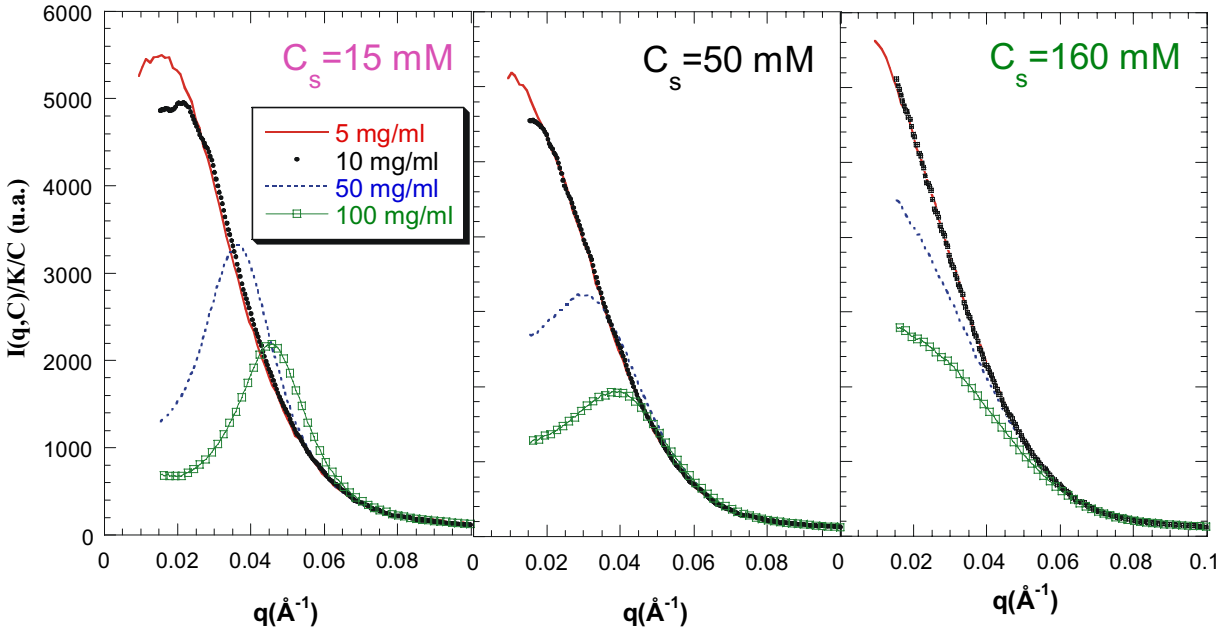


Figure V-2 : Courbes de diffusion aux petits angles enregistrées pour trois concentrations salines (15, 50 et 160 mM) et différentes concentrations en NCP_{165}. Les courbes I(q,C) ont été normalisées par la concentration en NCP et le contraste K.

Pour chaque concentration saline C_s étudiée, les spectres de diffusion ont été enregistrés pour les quatre concentrations en NCP mentionnées ci-dessus. La Figure V-2 montre les résultats obtenus pour C_s = 15, 50 et 160 mM. Pour C_s = 15 mM, on observe un pic de répulsion pour toutes les concentrations en NCP, de plus en plus marqué quand cette concentration augmente. Par contre, pour C_s = 160 mM (et pour toutes les concentrations salines supérieures), le pic de répulsion n'existe plus, quelle que soit la concentration en NCP. Le cas C_s = 50 mM est intermédiaire.

La première information que l'on peut extraire de ces spectres concerne les interactions, et plus exactement le second coefficient du viriel. En l'absence de pic d'interaction, les valeurs de I(0,C) peuvent être calculées en utilisant l'approximation de Guinier dans le domaine des très faibles valeurs de q. Pour C_s = 1M, nous préférons utiliser la loi de Debye car, pour cette concentration saline, la particule présente une conformation partiellement dépliée comme nous l'expliquerons dans la suite. Avec ces considérations, les valeurs de I(0,C) nécessaires au calcul du second coefficient du viriel (cf équation (III.13)) ont été déterminées uniquement pour deux concentrations en NCP (5 et 10 mg/ml) pour C_s = 50 mM, et pour trois concentrations en NCP (5, 10 et 50 mg/ml) pour les concentrations salines supérieures. Il s'ensuit que seul un ordre de grandeur des seconds coefficients du viriel peut être déduit de ces expériences. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau V-1.

NCP_{165}	C_s = 50 mM	C_s = 160 mM	C_s = 450 mM	C_s = 1M
A_2 (ml.mol.g^{-2})	$6.10^{-5} \pm 2.10^{-5}$	$2{,}2.10^{-5} \pm 1.10^{-5}$	$1{,}7.10^{-5} \pm 1.10^{-5}$	$3{,}6.10^{-5} \pm 1.10^{-5}$
R_g (Guinier ou Debye)	44,5 ± 0,3 Å	46,2 ± 0,2 Å	51,1 ± 0,5 Å	83,6 ± 3 Å
R_g (P(r))	44,8 ± 0,2 Å	47,1 ± 0,3 Å	51,4 ± 0,3 Å	86,0 ± 1,2 Å
D_{max}	138 ± 5 Å	171 ± 5 Å	185 ± 5 Å	335± 10

Tableau V-1 : Tableau récapitulatif des valeurs du second coefficient du Viriel déterminées pour NCP_{165}. Ce tableau donne aussi la valeur du rayon de giration, obtenue d'une part à partir de l'approximation de Guinier ou la loi de Debye, et d'autre part à partir de la fonction P(r) ainsi que l'extension maximale de la particule.

Les valeurs du second coefficient du viriel diminuent lorsque la concentration saline de la solution augmente. Ces valeurs restent positives même pour les plus fortes concentrations ioniques. Les interactions entre particules sont donc toujours répulsives.

Nous avons ensuite utilisé les données collectées à 5 mg/ml pour étudier la forme des particules via la fonction de distribution de distances P(r). Dans ce but, il est nécessaire de

s'assurer que les courbes P(r) ainsi obtenues ne sont pas affectées par des effets d'interactions entre particules. Pour les concentrations salines C_s>50 mM, ces effets peuvent être raisonnablement négligés quand la concentration en particules est de 5 mg/ml. En effet, dans ces conditions, la décroissance relative $2A_2MC$ de l'intensité à l'origine I(0,C), due à la présence d'interactions, est inférieure à 4%. De plus, les courbes obtenues pour C_{NCP} = 5 et 10 mg/ml sont quasiment superposables. On peut donc considérer que la courbe I(q, C=5mg/ml) constitue une bonne approximation du spectre I(q,C=0) de la solution sans interactions.

Par contre, on ne peut pas totalement exclure que la courbe enregistrée à C_s=50 mM soit légèrement affectée par des effets de répulsion entre particules pour q<0,022 $Å^{-1}$. Par conséquent, pour cette concentration saline, seules les données I(q, C=5 mg/ml) enregistrées dans une gamme de q supérieure à 0,022 $Å^{-1}$ ont été utilisées pour calculer la fonction P(r) ainsi que le rayon de giration. Pour les concentrations salines inférieures à 50 mM, les courbes I(q, C=5 mg/ml) sont trop affectées par les effets d'interaction pour permettre la détermination de la fonction P(r).

La Figure V-3 présente les fonctions P(r) calculées en utilisant le programme GNOM pour les différentes concentrations salines étudiées. Au regard des courbes présentées, l'extension maximale de la particule augmente continûment avec la concentration saline. Les rayons de giration calculés à partir de la fonction P(r), comme indiqué par l'équation (III.11), ou obtenus à partir de l'approximation de Guinier ou Debye, sont présentés dans le Tableau V-1. Les valeurs des rayons de giration obtenues par les deux méthodes (Guinier-Debye ou P(r)) donnent des résultats voisins. Pour C_s = 50 et 160 mM, nos valeurs de rayon de giration sont en accord avec les résultats précédemment publiés (Greulich et al, 1985, Inoko et al, 1992). Pour $C_s \geq$ 450 mM, les valeurs de R_g augmentent de façon significative, ce qui laisse supposer que la particule commence à se déplier.

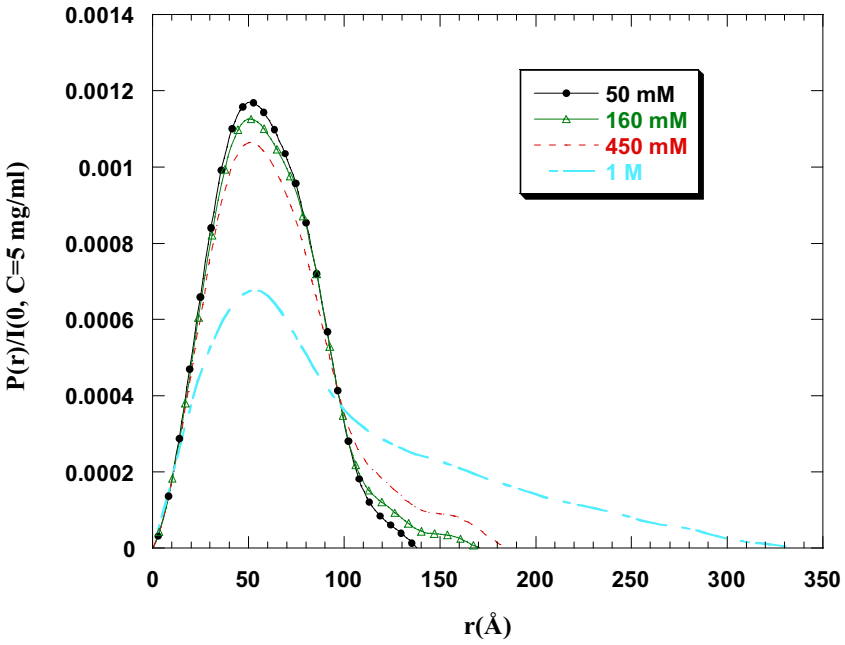


Figure V-3: Fonctions de distribution des distances P(r) calculées pour différentes concentrations salines, et pour une concentration en NCP_{165} de 5 mg/ml. Ces courbes sont normalisées par l'intensité diffusée à l'origine I(0,C=5 mg/ml).

On peut alors examiner le facteur de forme sur toute la gamme de q étudiée pour obtenir des renseignements complémentaires sur la forme des particules. Les résultats sont présentés sur la Figure V-4. La courbe enregistrée à C_s= 450 mM est différente des courbes enregistrées à $C_s \leq 160$ mM, pour q>0,08 $Å^{-1}$. En particulier, le minimum observé au voisinage de $q \approx 0,14$ $Å^{-1}$ est beaucoup moins marqué, suggérant un changement de forme des particules pour cette concentration saline. Sur la courbe enregistrée à C_s = 1M, ce minimum a complètement disparu. A cette concentration saline, les modifications observées dans le facteur de forme, corrélées à l'augmentation du rayon de giration, peuvent être attribuées à une dissociation partielle des NCP pour les fortes concentrations salines. Comme nous l'avons précédemment expliqué dans le chapitre II.A.2.3 de cette thèse, le complexe formé par l'ADN et le cœur d'histone est stable pour des concentrations en sel monovalent comprises entre 3 et 700 mM environ. Pour les concentrations supérieures, on observe une dissociation de l'octamère d'histones et de l'ADN (Yager et al 1989 ; Ausio et al 1984 et 1989 ; Krapunov et al 1997 ; Ballestar et Franco 1997). L'augmentation de la concentration saline provoque de forts changements de forme des nucléosomes (ouverture du cœur de protéines) qui conduisent finalement à la dissociation de l'ADN du cœur d'histone.

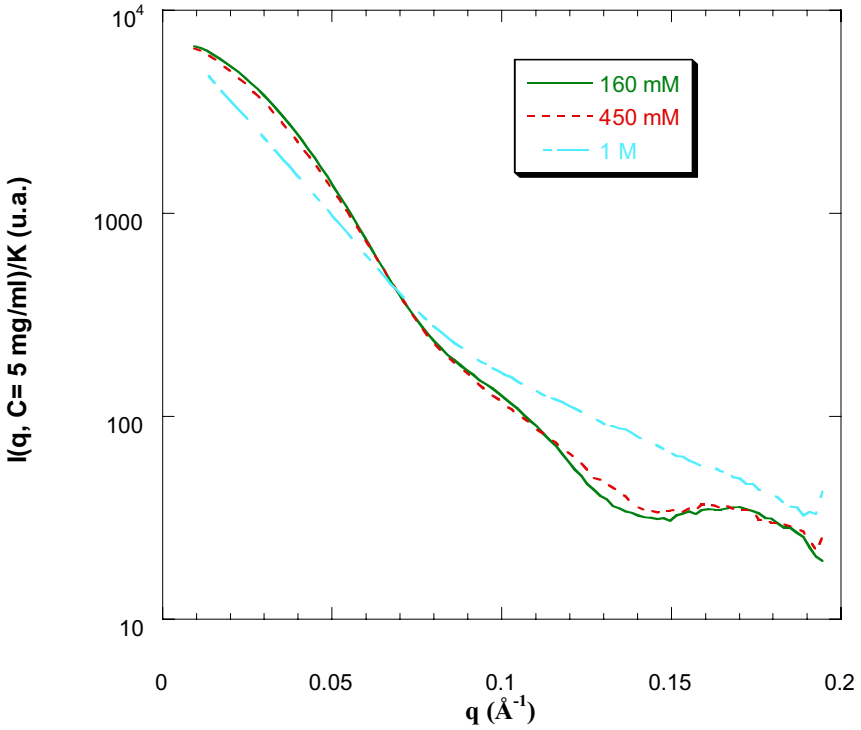


Figure V-4 : Variation de l'intensité diffusée I(q, C= 5 mg/ml) normalisée par le contraste K pour C_s = 160, 450 mM et 1M. Les courbes obtenues pour C_s < 160 mM ne sont pas présentées car elles sont identiques à la courbe obtenue pour C_s= 160 mM pour q> 0,05 $Å^{-1}$. Le changement de forme des particules est très clairement visible à C_s = 450 mM, pour q>0,085 $Å^{-1}$. Dans un souci de clarté, ces courbes ont été lissées. La procédure de lisage consiste, pour chaque valeur de q, à faire une moyenne de I(q) sur les 5 points expérimentaux de part et d'autre du point considéré.

Nous ne nous intéresserons pas plus en détail au changement de forme observé à forte concentration saline. Nous préférons, dans la suite de ce travail, nous attacher à la gamme de concentration ionique qui est biologiquement pertinente et où les particules sont stables (C_s< 200 mM). Le principal résultat obtenu à partir des expériences présentées ci-dessus est l'augmentation de l'extension maximum de la particule (D_{max}) entre C_s = 50 mM et 160 mM. Nous avons donc décidé de réaliser une nouvelle série d'expériences, dont le but est de nous affranchir sans aucun doute de l'effet des interactions entre particules, mais aussi de réaliser plus de points dans la gamme des concentrations inférieures à 160 mM.

V.A.1.2 NCP_{145}

A partir d'une solution de NCP ayant une longueur d'ADN associée de 145 pb (NCP_{145}), avec une polydispersité plus faible (± 3 pb), nous avons exploré la zone de concentration saline compatible avec la stabilité des particules (C_s < 200 mM). La Figure V-5 présente les

courbes de diffusion obtenues pour les faibles valeurs de q, pour différentes concentrations salines et pour une concentration en particules de 4 mg/ml. Comme pour NCP_{165}, on observe un écrantage des interactions lorsque la concentration saline de la solution augmente. La courbe enregistrée pour C_s = 10 mM est pratiquement plate pour les plus faibles valeurs de q. Ce comportement caractéristique d'interactions répulsives entre particules disparaît pour les concentrations salines supérieures. Au-dessus de 75 mM, l'intensité diffusée aux faibles valeurs de q présente un changement de courbure laissant suggérer la présence d'interactions attractives entre particules.

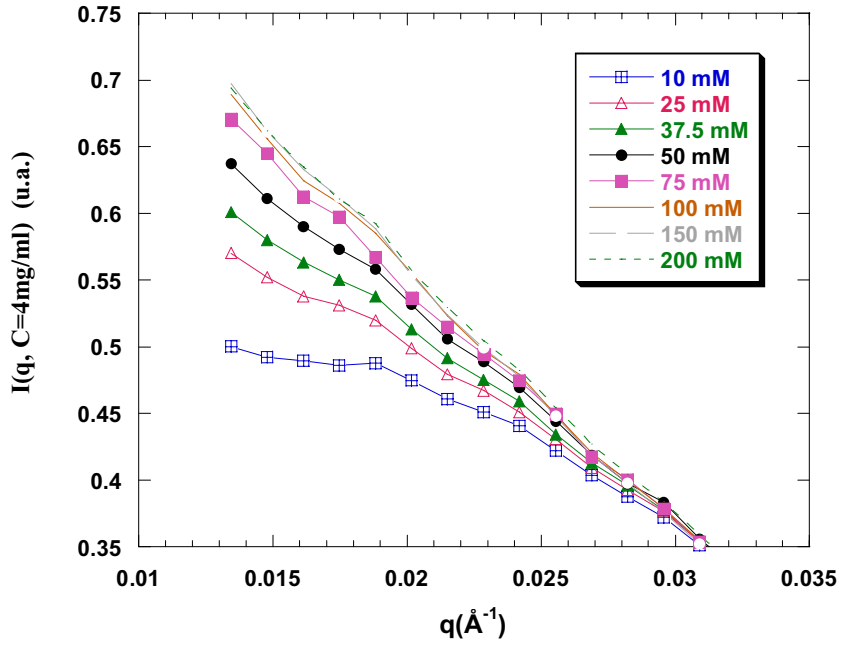


Figure V-5 : Courbes de diffusion aux petits angles enregistrées pour une concentration en NCP_{145} de 4 mg/ml I(q, C = 4 mg/ml) et différentes concentrations ioniques entre 10 et 200 mM. La variation de contraste dans cette gamme de sel étant faible (moins de 3%) les courbes ne sont pas normalisées par le contraste K.

Pour chaque concentration saline, nous avons fait varier la concentration en NCP de 0,5 mg/ml à 4 ou 8 mg/ml, afin de déterminer avec précision l'effet des interactions. Pour les concentrations salines inférieures à 75 mM, les courbes Ln I(q,C) en fonction de q^2 sont linéaires dans la zone de Guinier ($qR_g \leq 1,3$), exception faite de la courbe à 10 mM et C_{NCP}=4 mg/ml, qui présente un plateau pour les petites valeurs de q. Dans ces conditions, I(q, C_{NCP}) peut être extrapolée à q = 0, permettant le calcul du deuxième coefficient du viriel en utilisant l'équation (III.13). Les valeurs obtenues sont résumées dans le Tableau V-2.

NCP_{145}	C_s = 10 mM	C_s = 25 mM	C_s = 37,5 mM	C_s = 50 mM	C_s = 75 mM
A_2 (ml.mol.g^{-2})	$15.10^{-5} \pm 2.10^{-5}$	$4{,}5.10^{-5} \pm 1{,}5.10^{-5}$	$3.10^{-6} \pm 3.10^{-6}$	$-5.10^{-6} \pm 5.10^{-6}$	$-2.10^{-5} \pm 1.10^{-5}$

Tableau V-2 : Valeurs du deuxième coefficient du viriel pour différentes concentrations salines. Les mesures ont été faites sur NCP_{145}.

La valeur de A_2 diminue progressivement et devient négative pour une concentration saline comprise entre 37,5 et 50 mM. Ceci indique que les interactions entre particules, répulsives pour les faibles concentrations salines, deviennent attractives pour les concentrations salines supérieures. Au-dessus de 75 mM, les courbes ln I(q, C_{NCP}) en fonction de q^2 ne sont plus linéaires, et présentent une augmentation de courbure pour les très faibles valeurs de q. Ce comportement peut être attribué à des interactions attractives dans une solution monodisperse, ou à la formation d'oligomères, conséquence de cette attraction. A cause de cette augmentation de courbure, l'extrapolation de I(q, C_{NCP}) à q=0 ne peut pas être correctement effectuée pour des concentrations supérieures à 100 mM et pour $C_{NCP} \geq$ 2 mg/ml. Dans ces conditions, la détermination du second coefficient du viriel n'a pu être effectuée pour les concentrations salines supérieures à 75 mM.

Nous avons ensuite cherché à obtenir le facteur de forme des NCP, non affecté par les effets des interactions. D'après ce qui précède, la procédure utilisée doit dépendre de la concentration saline de la solution. A C_s=10 mM, les interactions répulsives entre particules sont suffisamment importantes pour que les courbes enregistrées à 0,5 et 1 mg/ml présentent des différences significatives pour q < 0,03 Å^{-1}. Les données enregistrées à 0,5, 1 et 2 mg/ml sont extrapolées à dilution infinie en utilisant un "Zimm-plot" (Zimm, 1948). Dans le cas où les interactions entre particules sont modérées, qu'elles soient répulsives (25 et 37 mM) ou attractives (50 et 75 mM), les courbes enregistrées à 0,5 et 1 mg/ml ne présentent pas de différences significatives, supérieures aux barres d'erreurs. La courbe obtenue pour une concentration en particule de 0,5 mg/ml peut alors être considérée comme non affectée par les interactions. Pour les concentrations salines supérieures (100, 150 et 200 mM), les interactions attractives entre particules sont plus fortes. Cependant, les courbes de diffusion enregistrées pour une concentration en particule de 0,5 mg/ml présentent peu de différence par rapport aux courbes enregistrées pour les concentrations salines inférieures (50 et 75 mM). De plus, la valeur de l'intensité extrapolée à q=0, I(0, C_{NCP}) pour l'échantillon le plus dilué, C_{NCP} = 0,5 mg/ml, est constante pour toutes ces concentrations salines. Les courbes

enregistrées pour la concentration la plus faible (0,5 mg/ml) sont donc là encore considérées comme non affectées par les interactions.

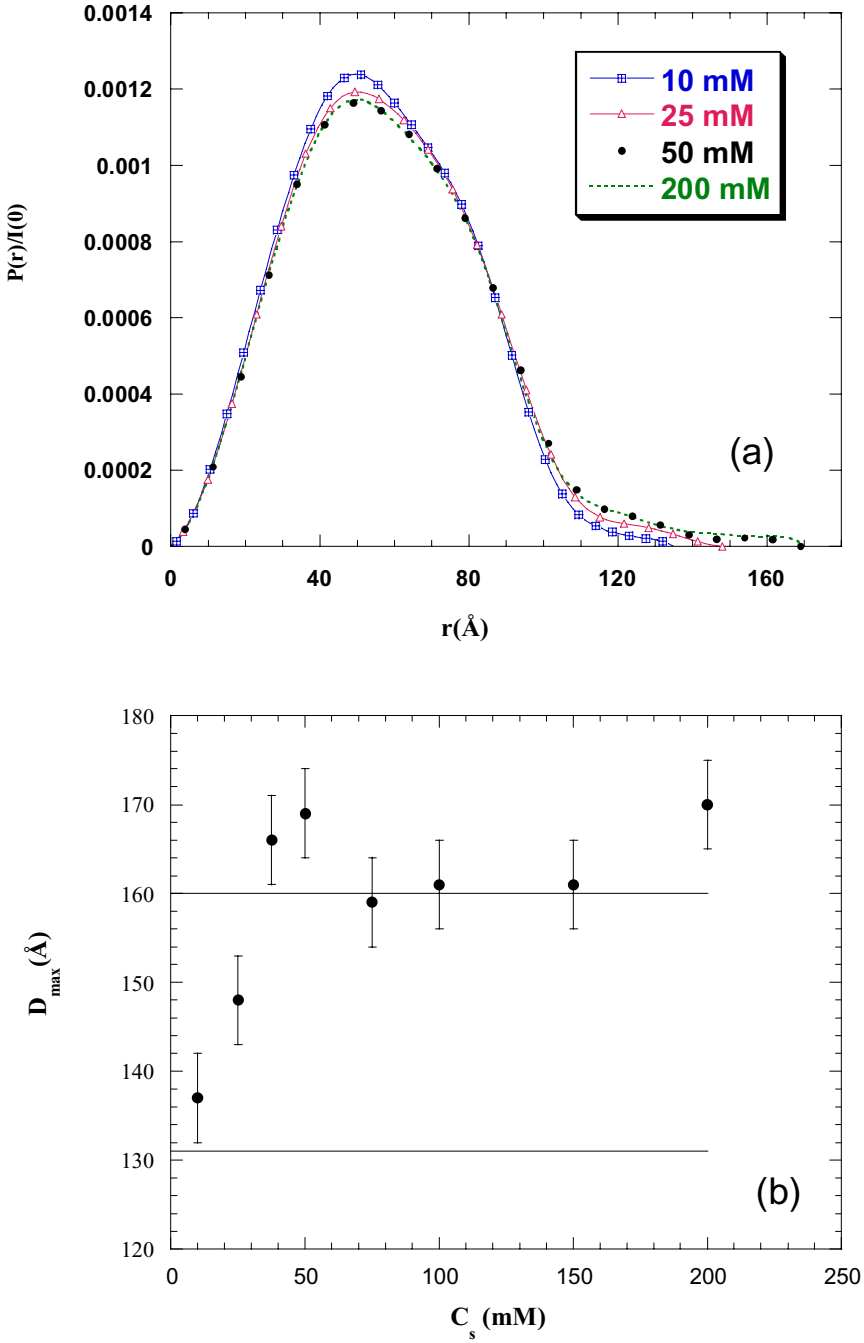


Figure V-6 : Caractérisation de la forme des NCP_{145} en fonction de la concentration saline.
(a) Fonction de distribution des distances P(r) calculée pour quatre concentrations salines à partir des courbes I(q) construites de la façon suivante: pour $q < 0,05$ Å^{-1}, $I(q)=I(q, C = 0,5$ mg/ml); pour $q > 0,05$ Å^{-1}, $I(q)=I(q, C = 4$ ou 8 mg/ml). Les courbes P(r) sont normalisées par l'intensité I(0).
(b) Variation de l'extension maximale D_{max} des particules en fonction de la concentration saline. Les deux lignes correspondant à D_{max} = 131 et 160 Å sont obtenues à partir des courbes P(r) calculées pour la particule cœur de nucléosome avec les queues condensées ou étendues respectivement (voir paragraphe V.A.2.2.a)

En résumé, dans la région des petites valeurs de q (région où l'effet des interactions peut se faire sentir), le facteur de forme des NCP est assimilé à la courbe I(q, C_{NCP}= 0,5 mg/ml) pour toutes les concentrations salines C_s, à l'exception de C_s=10 mM. Pour cette valeur de C_s, le facteur de forme est assimilé à la courbe I(q, C_{NCP}=0) extrapolée à dilution infinie. Par contre, dans la région des grandes valeurs de q, où l'effet des interactions n'intervient plus, il est préférable d'utiliser la courbe I(q, C_{NCP}) mesurée pour la concentration C_{NCP} la plus élevée (4 ou 8 mg/ml), dans le but d'améliorer la statistique. Les facteurs de forme ainsi construits sont alors utilisés pour calculer les fonctions de distribution des distances P(r) présentées sur la Figure V-6 (a). On en déduit l'évolution de l'extension maximale D_{max} du NCP en fonction de la concentration saline C_s (Figure V-6 (b)).

Entre 10 mM et 50 mM, l'extension maximale des particules D_{max} augmente de 137 à 165 ± 5 Å, et reste constante pour les concentrations salines supérieures, jusqu'à C_s =200 mM (Figure V-6 b). De la même manière, les valeurs des rayons de giration, obtenues à partir de l'approximation de Guinier ou calculées à partir de la fonction P(r), présentent une augmentation entre 10 et 50 mM puis restent constantes pour les concentrations supérieures. La Figure V-7 présente les variations des rayons de giration en fonction de la concentration saline. La petite différence observée entre les deux séries de valeurs est probablement due au fait que la région angulaire ($0,0147 \leq q \leq 0,0309$ $Å^{-1}$), utilisée pour le calcul des valeurs du rayon de giration dans l'approximation de Guinier, n'atteint pas des valeurs de q assez petites. Les valeurs du rayon de giration seraient donc sous-estimées dans ce cas.

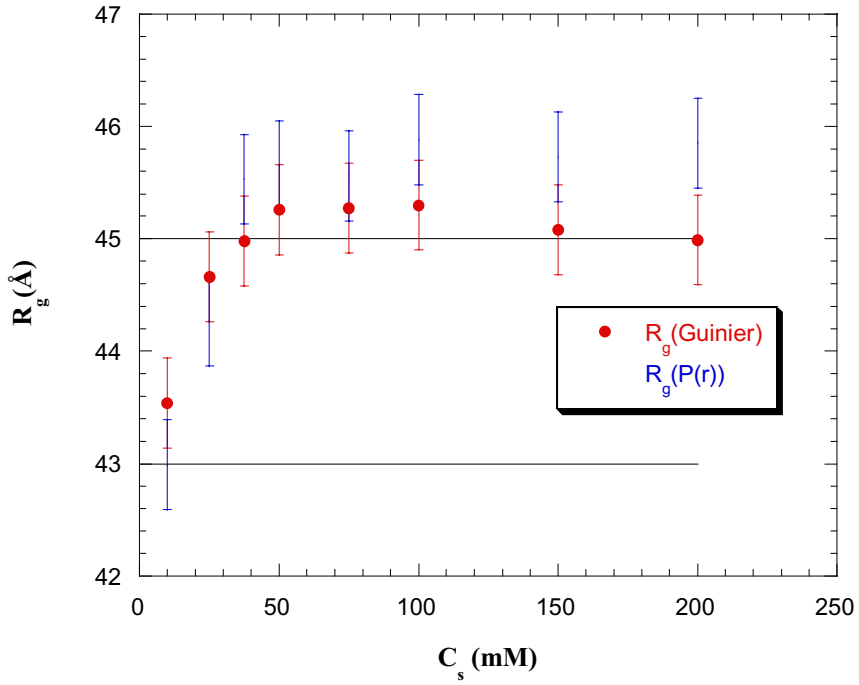


Figure V-7 : Variation du rayon de giration des NCP_{145} en fonction de la concentration saline. Les valeurs de R_g(Guinier) ont été calculées à partir de l'approximation de Guinier et R_g(P(r)) à partir de la fonction P(r). Les valeurs de R_g= 43Å et R_g= 45Å, indiquées par les deux lignes horizontales, sont obtenues à partir des courbes I(q) calculées pour la particule cœur de nucléosome avec les queues respectivement repliées et étendues (voir paragraphe V.A.2.2.a)

V.A.2 Discussion

V.A.2.1 Interactions entre particules

Les interactions entre particules cœur de nucléosomes ont été étudiées pour les deux lots NCP_{165} et NCP_{145}. Ces interactions ont été analysées en détail pour NCP_{145} dans la zone de concentration saline pour laquelle la particule est stable et sans changement conformationnel du cœur pour les concentrations salines inférieures à 200 mM. Les valeurs du second coefficient du viriel, positives à faible sel, deviennent négatives pour les concentrations salines supérieures à 50 mM, traduisant le passage d'interactions répulsives à interactions attractives pour ce lot de NCP. Pour les deux lots de particules, les interactions électrostatiques sont écrantées lorsque l'on augmente la concentration saline de la solution. Mais cet écrantage est déplacé vers les concentrations salines plus élevées pour NCP_{165}. De plus, le passage répulsif-attractif n'est pas observé pour le lot NCP_{165}, pour lequel les interactions entre particules restent répulsives jusqu'à C_s = 1M.

Pour une concentration saline fixée, C_s = 150 mM, les interactions sont globalement répulsives pour NCP_{165} alors qu'elles sont globalement attractives pour NCP_{145}. Cependant, nos valeurs de A_2 doivent être comparées à la valeur calculée en ne considérant qu'une simple

répulsion stérique entre particules, c'est-à-dire un potentiel de sphères dures. Dans le cas de particules de volume V, et de masse molaire M, le second coefficient du viriel pour un potentiel de sphères dures s'écrit : $A_2^{S.D} = 4VN_a/M^2$. Pour les particules cœur de nucléosomes, avec un rayon de giration variant de 43 à 45 Å, $A_2^{S.D}$ est compris entre 4.10^{-5} et $4{,}6.10^{-5}$ ml.mol.g^{-2}. Dans nos deux séries d'expériences, pour C_s = 150 mM, les valeurs de A_2 sont inférieures à $A_2^{S.D}$ (cf Figure V-8). La somme des interactions, à l'exception des interactions de type sphère dure, est donc globalement attractive, et cela pour les deux lots de NCP.

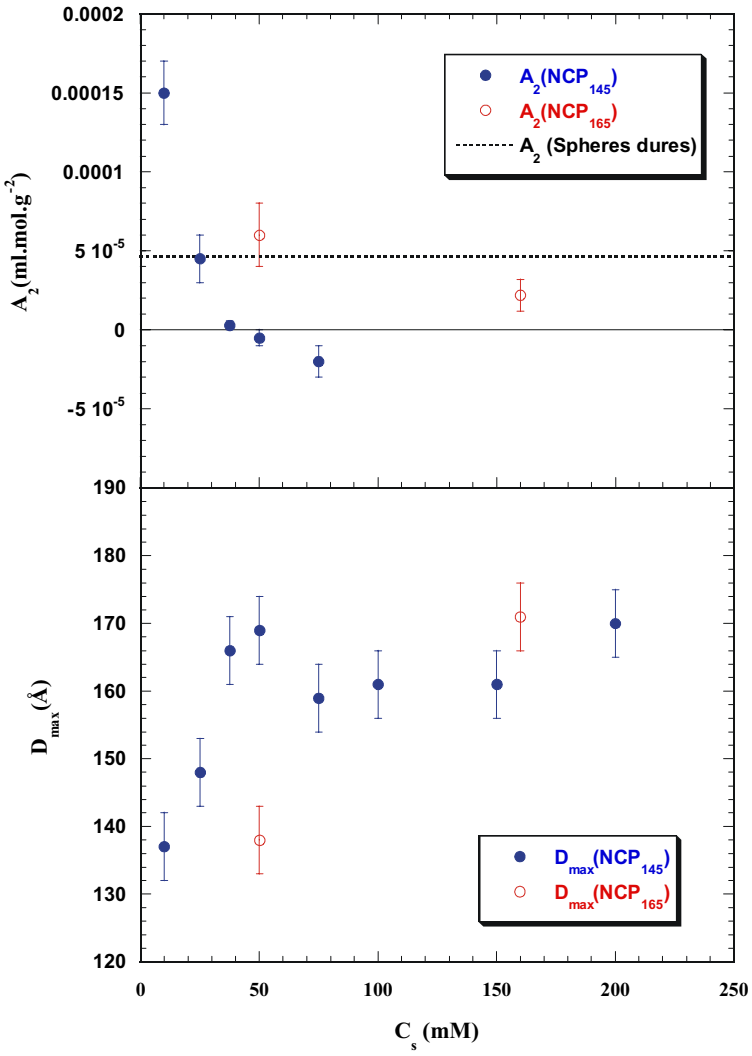


Figure V-8 :Variation du deuxième coefficient du viriel A_2, et de l'extension maximale des particules D_{max}, en fonction de la concentration en sel monovalent C_s, pour NCP_{165} et NCP_{145}.

Le phénomène d'écrantage des interactions électrostatiques coulombiennes par augmentation de la concentration saline de la solution, permettant aux interactions attractives

à courtes portées de se révéler, a déjà été décrit dans des solutions de protéines de faible poids moléculaire, comme par exemple le lysozyme et les γ-cristallines (Tardieu et al 1992, Muschol et Rosenberger 1995, Ducruix et al 1996). Par contre, il n'a jamais été observé avec des protéines de fort poids moléculaire. Par exemple, dans le cas de l'aspartate transcarbamylase (un hétéro-dodécamère de 306kDa), les interactions répulsives sont écrantées, mais restent répulsives lorsque l'on augmente la concentration saline de la solution jusqu'à 1M NaCl (Budayova et al, 1999). Le même comportement est observé avec l'urate oxydase, un homotetramère de 128 kDa (Bonneté et al, 2001). Dans le cas de l'apoferritine, le second coefficient du viriel diminue lorsque l'on augmente la concentration saline et devient inférieur à la valeur du potentiel de sphère dure $A_2^{S.D}$, mais en restant toujours positif; il réaugmente pour les concentrations salines supérieures à 0,2M (Petsev et al, 2000). Les auteurs attribuent ce comportement aux forces d'hydratation. Par comparaison avec ces protéines de haut poids moléculaire, on peut noter que les particules cœur de nucléosomes présentent des interactions attractives plus importantes. Pour comprendre l'origine de cette attraction, il est nécessaire de prendre en compte les spécificités structurales et d'éventuels changements de conformations des NCP qui sont détaillés dans le paragraphe V.A.2.2.

La différence de concentration saline nécessaire à l'écrantage des interactions, peut être attribué à la différence de charge des particules dans ces deux lots. En effet, les longueurs d'ADN associées à l'octamère d'histones sont significativement différentes (165 et 145 pb). Les 20 pb supplémentaires conduisent à 40 charges négatives additionnelles pour le lot NCP_{165}. La charge structurale d'une particule est ainsi de 156 e^- pour NCP_{145} et 196 e^- pour NCP_{165}. On peut néanmoins se demander si la différence de comportement du deuxième coefficient du viriel ne pourrait pas être attribuée à une différence de charges portées par les histones. On pouvait suspecter une différence d'origine des échantillons, le lot NCP_{165} ayant été préparé à partir de sang de poulet, alors que le lot NCP_{145} provient de thymus de veau. S'il existe certaines différences dans la composition en acides aminés des queues, mais elles sont négligeables si l'on considère les charges des acides aminés chargés (van Holde, 1988), ce qui permet d'éliminer cette éventualité. Les modifications post-transcriptionnelles, en particulier l'acétylation et la phosphorylation des queues N et C terminales des histones, pouvaient également être une source de modification possible de la charge portée par les NCP dans les deux lots. Cependant, ces effets peuvent raisonnablement être négligés puisque nos méthodes de préparation éliminent les particules acétylées et phosphorylées.

V.A.2.2 Changements de conformation

a) Deux conformations possibles

Le facteur de forme des NCP_{145} a été déterminé en s'assurant de l'absence totale d'interactions entre particules, nous permettant ainsi d'étudier précisément les changements de conformation des particules cœurs de nucléosomes avec la concentration saline. Pour les valeurs de q supérieures à 0,08 $Å^{-1}$, le facteur de forme ne dépend pas de la concentration saline de la solution, ce qui n'est pas le cas pour les valeurs de q les plus faibles. On note en particulier une faible augmentation du rayon de giration qui se traduit par une augmentation de l'extension maximale des particules de 137 à 165 ± 5 Å lorsque la concentration saline de la solution augmentede 10 à 50 mM. L'allure de la fonction P(r), observée pour les distances supérieures à 130 Å (Figure V-3), nous laisse supposer que le nombre de grandes distances à l'intérieur de la particule est petit. La variation du rayon de giration étant faible, nous supposons que l'augmentation significative du D_{max} est due à une extension des queues protéiques, sans changement de forme notable du reste de la particule.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons construit une particule cœur de nucléosome avec les queues protéiques étendues ou condensées (Figure V-9 a,b) à partir des coordonnées cristallographiques récemment publiées par Harp et al (2000) (fichier PDB 1eqz). Les particules cœurs de nucléosomes utilisées dans le travail de Harp et al. sont préparées à partir d'histones de poulet, et d'ADN palindromique. Les queues N terminales de toutes les histones, ainsi que la queue C terminale de l'histone H2A n'ont pas pu être localisées dans leur cristal (voir Tableau II-3). Nous avons donc décidé de rajouter les 102 résidus manquants des queues protéiques en utilisant l'outil de modélisation du programme Turbo-FRODO (Roussel et Cambillau, 1989). Deux particules ont été construites : la première correspondant à la conformation étendue, dans laquelle les queues sont libres de s'étendre hors de la particule, la seconde correspond à la conformation compacte, dans laquelle les queues sont localisées près de la surface de l'ADN. Seules les positions des acides aminés localisés dans les queues des histones ont été modifiées. Ces deux particules ont été construites pour rendre compte des dimensions de la particule, mais sans avoir la prétention de décrire précisément la conformation des queues, ni leur localisation précise. En d'autres termes, les deux conformations présentées sur la Figure V-9 a,b doivent être considérées comme deux conformations possibles parmi d'autres. Les chaînes polypeptidiques correspondant aux queues étant mobiles, elles sont libres d'explorer un large volume autour des particules. C'est pourquoi nous les avons placées dans des positions quelconques, bien exposées au solvant,

sans orientation ou position privilégiée. Leur contribution à l'intensité diffusée peut être considérée comme provenant d'une conformation moyenne. Il faut noter finalement que nous n'avons pas cherché à introduire dans les queues les portions structurées en hélice α, détectées par certains auteurs (Banéres et al., 1997) lorsque les queues sont condensées sur l'ADN. En effet, la diffusion aux petits angles étant une technique à basse résolution, il est très peu probable que de tels éléments de structure résiduelle aient une influence sur les spectres.

La courbe expérimentale I(q) obtenue à C_s = 10 mM pour les NCP_{145} a été simulée par une solution idéale de NCP dans la conformation compacte construite comme indiqué ci-dessus, en utilisant le programme CRYSOL (Svergun et al, 1995). Ce programme utilise uniquement deux paramètres: le volume moyen de solvant déplacé par atome, et le contraste de la couche d'hydratation. Les résultats obtenus pour une densité de la couche d'hydratation de 1,15 ± 0,03 sont présentés sur la Figure V-10a. L'accord entre les courbes expérimentale et théorique est très bon. La forte valeur obtenue pour la densité de la couche d'hydratation nous indique que l'eau est fortement structurée dans la première couche d'hydratation. Ce résultat est tout à fait cohérent avec des molécules d'eau bien ordonnées autour de la molécule d'ADN. A partir de la courbe théorique, nous pouvons calculer une valeur de rayon de giration de 43Å, en accord avec la valeur obtenue à partir de la courbe expérimentale. La Figure V-10c présente la fonction P(r) obtenue à partir de la courbe théorique. La valeur de D_{max} obtenue est de 131Å.

Les mêmes simulations ont été effectuées sur les courbes expérimentales obtenues à 50 et 200 mM ont utilisant le modèle dans la forme étendue. Comme précédemment, l'accord entre les courbes expérimentales et théoriques est excellent (Figure V-10b,d) en utilisant une valeur de densité de la couche d'hydratation de 1,16 ± 0,04. Les valeurs de R_g et de D_{max} obtenues à partir de la courbe calculée sont respectivement de 45 et 160Å.

A cette étape, il est important de remarquer que la valeur du D_{max} obtenue dans la forme compacte des NCP correspond au diamètre maximal de la particule, comme nous pouvons le mesurer en vue stéréo. Cependant, pour les particules dans la forme étendue, la valeur de D_{max} obtenue est significativement plus petite que la valeur réelle du diamètre de la particule. Cette différence est due au fait que la fraction de masse des queues est beaucoup plus petite que celle du cœur. Lorsqu'elles sont étendues, les queues contribuent donc de façon marginale à l'intensité diffusée. Les plus grandes distances à l'intérieur de la particule (séparant les extrémités des queues étendues) contribuent donc à trop peu de vecteurs pour être détectées

dans le calcul de l'intensité diffusée. Cependant, le résultat important est que les valeurs expérimentales et théoriques obtenues sont identiques.

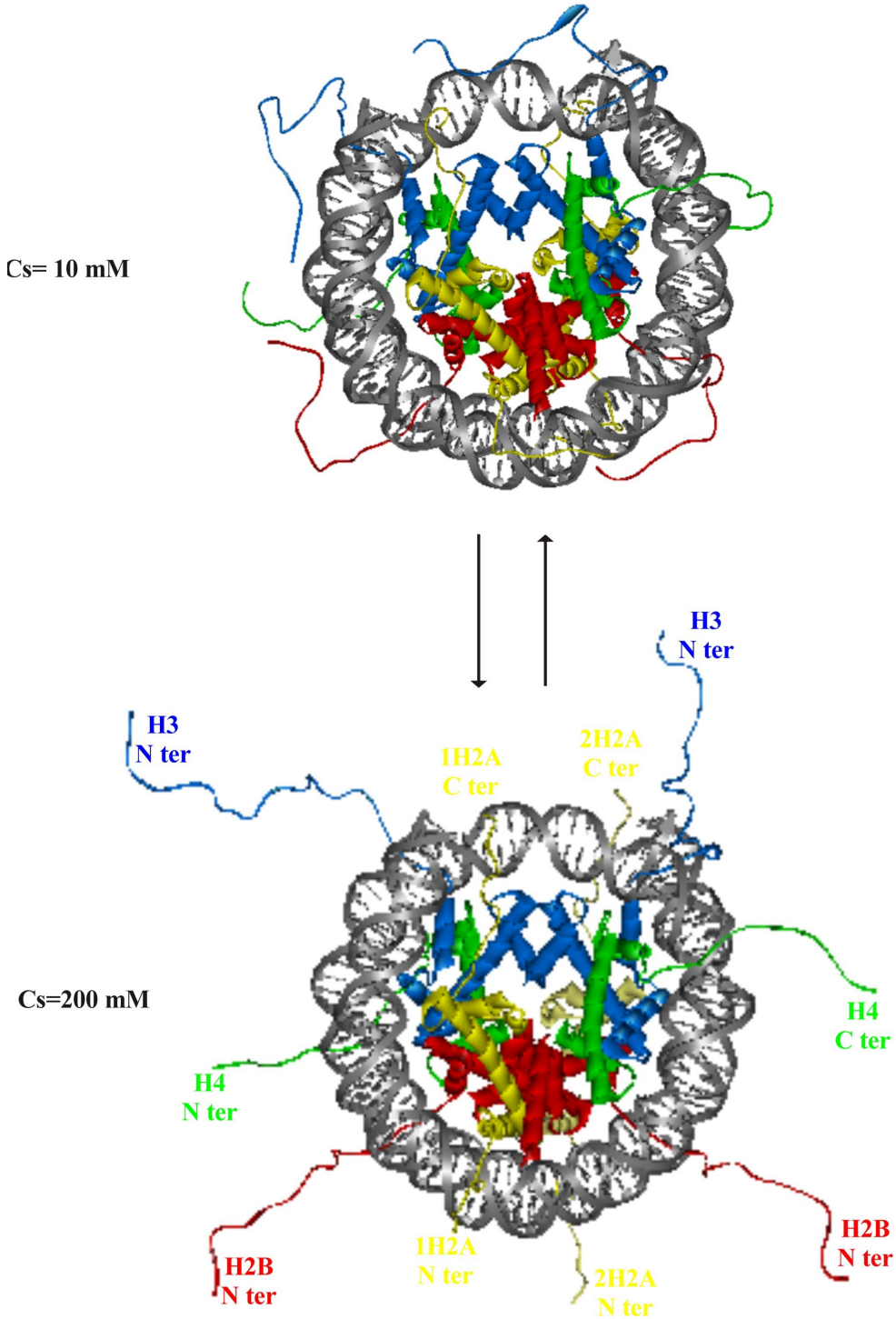


Figure V-9 : Modèle de NCP dans sa forme compacte et dans sa forme étendue construit, à partir des données cristallographiques de Harp et al, 2001.

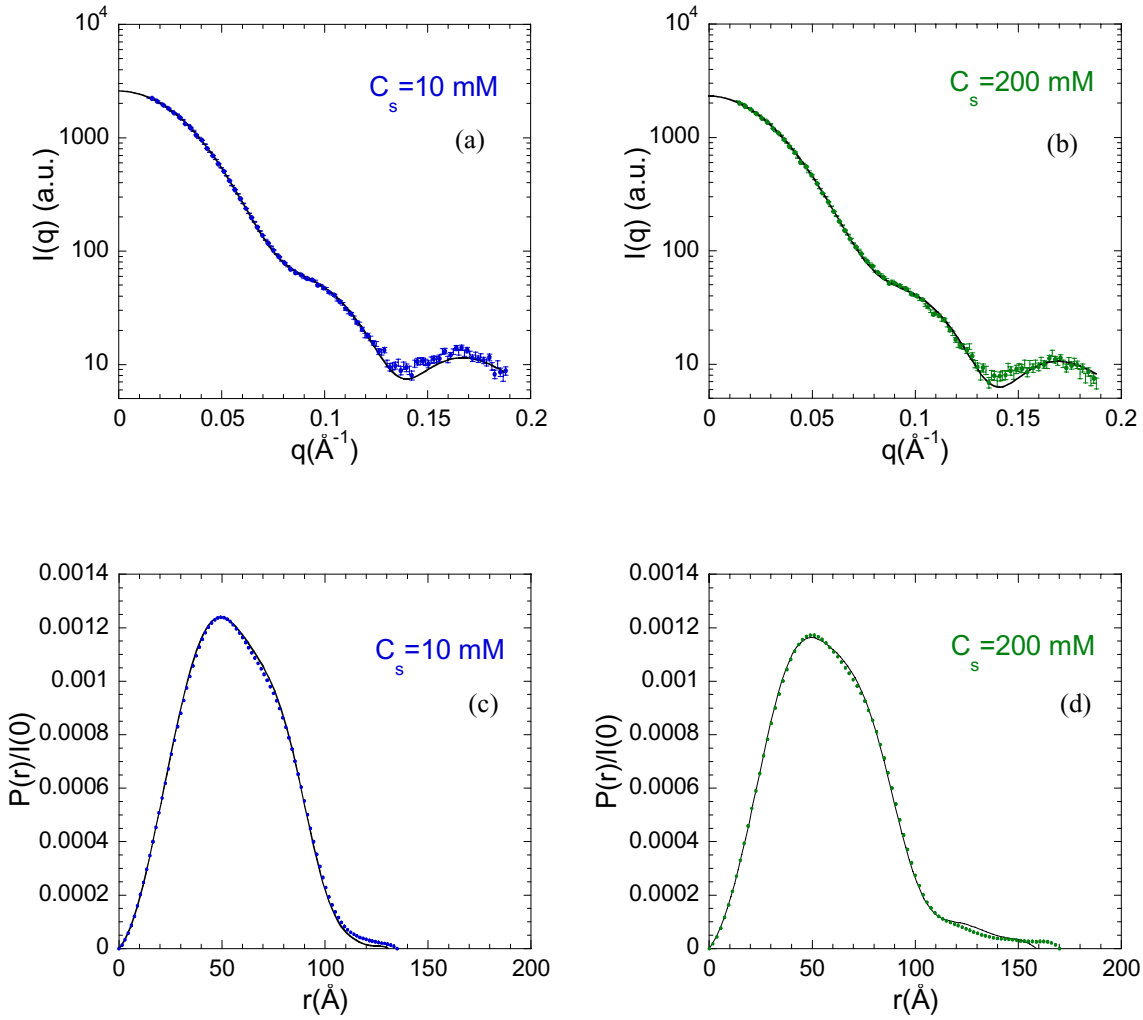


Figure V-10: Comparaison de l'intensité diffusée obtenue expérimentalement et calculée théoriquement à partir des particules reconstruites présentées sur la Figure V-9 pour une concentration saline de (a) 10 mM et (b) 200 mM. La même comparaison est effectuée pour la fonction de distribution des distances P(r) pour une concentration saline de (c) 10 mM et (d) 200 mM.

b) Origine de l'extension

On peut alors se demander ce qui provoque l'extension des queues des histones. Les extrémités N et C terminales de la particule cœur de nucléosome sont constituées de nombreux acides aminés lysine et arginine. Ces acides aminés chargés positivement interagissent avec les groupements phosphates de l'ADN, chargés négativement, lorsque les interactions électrostatiques ne sont pas écrantées. Lorsque l'on augmente la concentration saline de la solution, les interactions électrostatiques sont écrantées, et les queues protéiques sont alors libres de s'étendre hors du cœur d'histones.

Ce comportement est en accord avec les prédictions théoriques de Clark et Kimura (Clark et Kimura, 1990). En utilisant la théorie de condensation des contre-ions de Manning, ces

auteurs prévoient en effet que toutes (ou presque toutes), les queues doivent être liées à l'ADN pour les faibles concentrations salines. D'autre part, les interactions entre des fragments d'ADN de 30pb, et la queue polypeptidique de H4 (1-23), ont été étudiées en fonction de la concentration saline de la solution (Huong et al 1993). Les peptides stabilisent la double hélice d'ADN à faible force ionique, mais la fixation ne se fait plus pour les concentrations salines supérieures à 125-150 mM. Nous sommes tout à fait conscients que les interactions entre l'ADN et les queues protéiques à l'intérieur d'un NCP ne sont pas parfaitement représentées par le modèle expérimental de Huong. Cependant, il est intéressant de noter que l'écrantage des interactions dans ce cas à lieu dans la même gamme de concentration saline que lors de nos expériences.

L'extension des queues que nous observons est aussi en accord avec des expériences de RMN réalisées sur des chaînes d'oligonucléosomes (Cary et al 1978, Hilliard et al 1986, Smith et Rill 1989) ou des fragments de chromatine (Walker 1984). Toutes ces expériences ont montré que les queues des histones sont liées à l'ADN à faible concentration saline, alors qu'elles sont libres de s'en écarter pour les concentrations salines supérieures à 0,2-0,4 M. Cependant, aux concentrations salines supérieures à 0,2M, le phénomène d'extension des queues n'est pas vraiment découplé des autres changements conformationnels induits par variation de la force ionique, que les queues soient présentes ou non (quand elles ont été clivées par digestion enzymatique par exemple) (Ausio et al, 1989).

Nos résultats expérimentaux montrent que l'extension des queues se produit à des concentrations bien inférieures à 0,2M NaCl, sur une faible gamme de variation de la concentration saline, bien avant tout autre changement conformationnel, qu'il s'agisse (i) des changements réversibles observés dans la gamme 0,2-0,8 M NaCl ou (ii) de la dissociation de l'ADN et des histones du cœur au-delà de 0,8M NaCl.

(i) Les changements de conformation réversibles détectés par dichroïsme circulaire et mesure du coefficient de sédimentation (Ausio et Van Holde 1986) correspondent à une structure secondaire relaxée, avec un début d'ouverture du cœur (Dong et al 1990). De tels changements se traduiraient par une augmentation significative du rayon de giration et un changement du facteur de forme. C'est ce que nous avons observé lors de la première série de mesures, pour les concentrations salines supérieures à 0,45M, bien au-delà de la concentration en sel requise pour l'extension des queues.

(ii) Dans nos expériences (<0,2M NaCl), la fraction de nucléosomes dissociée est négligeable car non détectable, alors que la diffusion des rayons X est une méthode très

sensible à de tels changements conformationnels. Ces résultats sont en accord avec les observations d'Ausio et al (Ausio et al 1984) et le diagramme expérimental de stabilité des NCP (Yagger et al., 1989).

Nous pouvons donc affirmer que l'extension des queues est décorrélée de tout autre changement de conformation des NCP.

c) Extension des queues progressive ou par palier?

Des mesures d'accessibilité des résidus glutamine, réalisées par Ballestar et Franco (1997), présentent des changements de conformation des queues protéiques, pour des concentrations salines inférieures à 50 mM. De plus, les auteurs interprètent leurs résultats comme un phénomène se produisant en deux étapes. A partir de nos résultats, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer qu'il y a des stades intermédiaires lors de l'extension des queues. Nous ne pouvons pas non plus prédire l'ordre dans lequel les queues vont s'étendre. Pour répondre à ces questions, il faudrait réaliser un grand nombre d'expériences, dans la gamme des concentrations salines correspondant au dépliement des queues. Les données collectées devraient alors être traitées de façon adéquate, en utilisant par exemple un programme de "Singular Value Decomposition" (Fetler et al., 1995).

d) Effet de l'acétylation

Il est intéressant de noter que l'addition de sel à des concentrations supérieures à 50 mM, en induisant l'extension des queues, sans changement de conformation de la particule, mime les effets produits par l'acétylation des acides aminés lysine portés par les queues des histones. La structure des NCP reste inchangée (Ausio et Van Holde 1986, Imaï et al 1986, Libertini et al 1988) alors que les interactions entre l'ADN et les queues protéiques deviennent de plus en plus faibles à cause de la diminution du nombre de charges positives dans les extrémités N terminales (Ausio et al 1989, Oliva et al 1990). Les cœurs hyperacétylés présentent un coefficient de sédimentation plus faible que les particules intactes. Un très faible degré d'acétylation est nécessaire pour produire un tel effet (Ausio et Van Holde 1986). Cependant, seules les queues H3 et H4, qui présentent un degré d'acétylation supérieur aux queues H2A et H2B, sont censées s'étendre alors que l'extension induite par les sels et un phénomène non spécifique.

V.A.2.3 Corrélations entre dépliement des queues et interactions

Nous avons également observé l'extension des queues avec les NCP_{165}. Repliées sur l'ADN pour une concentration saline de 50 mM, elles sont étendues à 150 mM. Par comparaison avec les NCP_{145} pour lesquels l'extension est déjà réalisée à 50 mM NaCl, le phénomène se produit donc à une concentration saline plus élevée. Nous supposons que ce décalage est du à la plus grande longueur d'ADN associée au NCP qui, en apportant des charges négatives supplémentaires, nécessite une concentration ionique plus élevée pour écranter les interactions ADN-extensions protéiques. Ceci expliquerait pourquoi Mutskov et al (1998) observent, par des expériences de pontages entre les queues NH_2 et l'ADN, une extension des queues à une concentration saline encore plus élevée, entre 0,2 et 0,5 M NaCl. Dans leurs expériences, la longueur d'ADN associée à la particule est de 180 pb.

Dans nos deux séries d'expériences, l'extension des queues se produit à la concentration saline pour laquelle les valeurs de A_2 sont inférieures à la valeur sphère dure du second coefficient du viriel (Figure V-8). Ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle les variations des interactions entre particules, et les changements de conformation ont la même origine: l'écrantage des interactions électrostatiques lorsque la concentration saline de la solution augmente. Pour les faibles concentrations ioniques, les interactions entre particules cœurs de nucléosomes sont fortement répulsives, alors que l'ADN, négativement chargé, et les queues des histones, positivement chargées, interagissent via des interactions attractives. L'ajout de sel dans la solution provoque simultanément l'écrantage des interactions répulsives entre NCP et l'écrantage des interactions attractives entre l'ADN et les queues des histones. Les phénomènes intra et inter particules apparaissent donc couplés.

Pour comprendre l'origine de ces interactions attractives, nous avons entrepris une analyse par osmométrie qui est présentée dans le chapitre suivant.

V.B Etude des interactions entre NCP par osmométrie

V.B.1 Résultats obtenus avec l'osmomètre à membrane

Une série d'expériences a été réalisée à l'aide d'un osmomètre à membrane, sur des solutions de NCP_{155}, présentant une longueur d'ADN associée de 155 pb, à des concentrations ioniques variant de 3,5 mM à 510 mM, et pour différentes concentrations en particules. La pression maximale mesurable par l'osmomètre étant de 2.10^3 Pa, les concentrations de NCP que l'on peut explorer dépendent de la concentration saline de la solution. Pour les concentrations salines les plus faibles, la concentration maximale en NCP_{155} est environ de 40 mg/ml, alors que l'on peut effectuer des mesures à des concentrations supérieures à 200 mg/ml pour les concentrations salines les plus élevées.

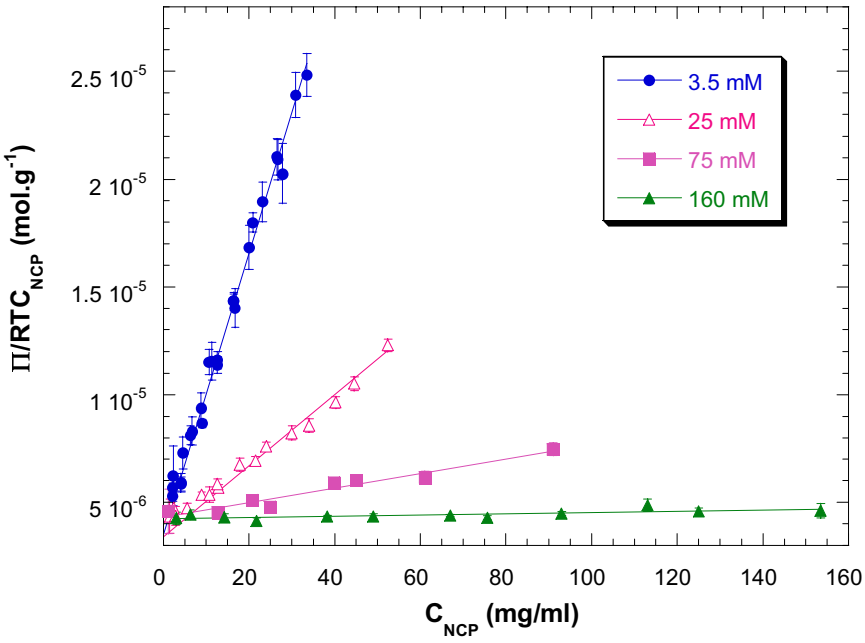


Figure V-11: Variation de la pression osmotique divisée par l'énergie thermique RT et par la concentration en NCP en fonction de la concentration en NCP, pour différentes concentrations salines. Les pentes des courbes obtenues par ajustement linéaire sont directement reliées au second coefficient du viriel, l'ordonnée à l'origine étant inversement proportionnelle à la masse des NCP.

La Figure V-11 présente la variation de la pression osmotique divisée par la concentration en NCP en fonction de la concentration en NCP_{155} pour différentes concentrations salines (3,5; 25; 75 et 160 mM). D'après l'équation (II.16), l'ordonnée à l'origine de toutes ces courbes est l'inverse de la masse des NCP, M_{NCP}. Les courbes Π / RTC_{NCP} présentent toutes un

comportement linéaire sur toute la gamme de concentration en NCP, nous permettant de négliger le troisième coefficient du viriel. La pente des courbes obtenues est alors simplement le deuxième coefficient du viriel, A_2^M. Les valeurs de M_{NCP} et A_2^M obtenues en effectuant un simple ajustement linéaire des courbes expérimentales par la méthode des moindres carrés sont présentées dans le Tableau V-3.

C_s (mM)	$M_{NCP} \times 10^{-5}$ ($g.mol^{-1}$)	$A_2^M \times 10^5$ ($ml.mol.g^{-2}$)	μ ($cm^2/V.s$) $\times 10^5$	ζ (mV)	ψ_s (mV)	Z_{eff}
3,5	2,01 ± 0,21	69 ± 11				
4,8			-39,3 ± 0,2	-117	-142	-64
7,5	1,83 ± 0,21	36 ± 4				
10			-34,5 ± 0,5	-92,2	-125	-71
15	2,07 ± 0,2	21± 3,7				
25	2,41 ± 0,24	14,0 ± 1,5	-30,1 ± 0,2	-74,2	-103	-84
50	2,46 ± 0,24	9,2 ± 0,8	-27,3 ± 0,6	-55	-87	-96
75	2,28 ± 0,18	3,7 ± 1,1	-25,1 ± 0,5	-51,5	-78	-102
100	1,97 ± 0,05	0,69± 0,25	-20,6 ± 0,5	-36,3	-72	-104
160	2,40 ± 0,05	0,37 ± 0,15	-18,0 ± 0,6	-31,4	-62	-119
210	2,27 ± 0,04	0,75 ± 0,1	-16,2 ± 0,6	-28,4	-57	-124
310	2,55 ± 0,11	2,40± 0,18	-14,1 ± 0,5	-23,9	-49,5	-132
410	2,12 ± 0,06	2,43± 0,33	-12,1 ± 0,5	-20,4	-45	-137
510	1,80 ± 0,05	2,54 ± 0,27				
660			-10,0 ± 0,5	-18,6	-37	-147

Tableau V-3: Valeurs de la masse des particules M_{NCP} et du second coefficient du viriel A_2^M obtenues pour différentes concentrations salines, C_s, à partir des mesures d'osmométrie. Ce tableau présente aussi les valeurs de la mobilité μ, ainsi que le potentiel zêta ζ associé. ψ_s correspond aux valeurs théoriques du potentiel électrostatique à la surface des particules et Z_{eff}. à la charge effective théorique des NCP (voir paragraphe II.B.2.2)

Au vu des valeurs de M_{NCP} obtenues pour les différentes concentrations ioniques, on calcule une masse moyenne égale à $(2,18 \pm 0,23) \times 10^5$ $g.mol^{-1}$. Cette valeur est en accord avec la masse que l'on peut calculer pour des particules présentant une longueur d'ADN de 155 ± 7 pb: $(2,10 \pm 0,05) \times 10^5$ $g.mol^{-1}$. Ceci implique qu'aucune agrégation notable n'est observée dans notre système.

Les variations du second coefficient du viriel, exprimé en $Å^3$/particule, en fonction de la concentration saline sont présentées sur la Figure V-12. La conversion entre A_2 (en $Å^3$/particule) et A_2^M (en $ml.mol.g^{-2}$) est donnée par la relation (II.17). Dans la gamme de

concentration considérée, entre 3,5 mM et 510 mM, les valeurs de A_2 varient sur plus de deux décades. Ces variations dépendent de la gamme de concentration saline considérée. Trois régions distinctes sont observables. Entre 3,5 mM et 50 mM, les valeurs de A_2 décroissent continûment avec C_s, en une fonction de type loi de puissance $C_s^{0,76}$. Cette décroissance est essentiellement due à l'écrantage des interactions électrostatiques, comme nous le verrons par la suite. Pour les concentrations salines supérieures, jusqu'à 160 mM, la décroissance des valeurs de A_2 est plus rapide, mais ces valeurs restent positives. Pour les concentrations ioniques supérieures, les valeurs de A_2 augmentent lentement avec C_s et atteignent un plateau. La Figure V-12 présente également les variations du second coefficient du viriel obtenues pour des fragments d'ADN nu de 146 ± 10 pb (Nicolai et Mandel, 1989). Dans ce cas, les valeurs de A_2 décroissent continûment avec la concentration saline, et aucun changement de pente n'est observé. Les valeurs obtenues pour les fragments d'ADN nu sont en plus toujours supérieures aux valeurs obtenues pour les NCP. Par conséquent, les interactions répulsives entre NCP sont plus faibles que celles observées entre des fragments d'ADN. Cette différence est due à la présence du cœur d'histones.

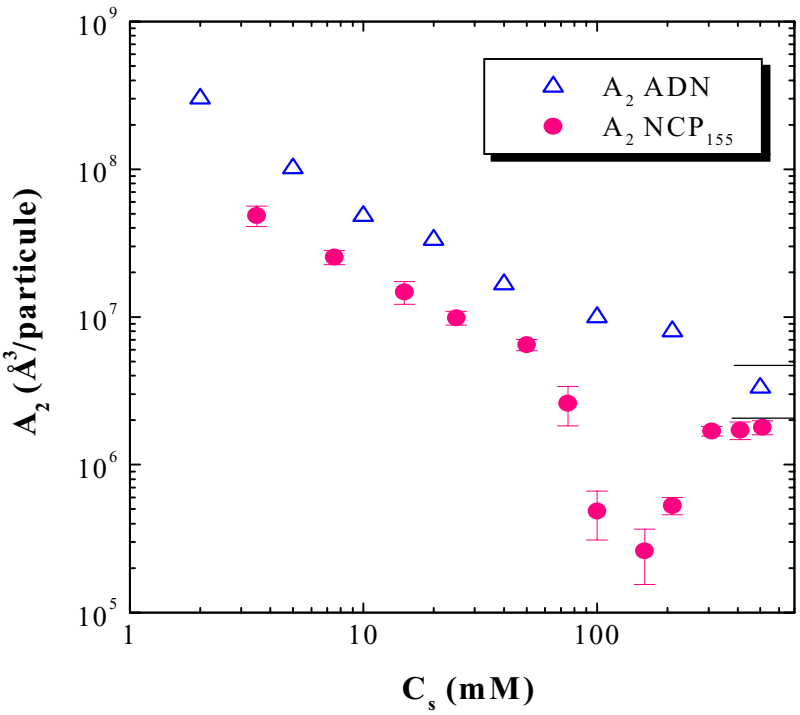


Figure V-12 : Variation du second coefficient du viriel obtenu pour les NCP en fonction de la concentration saline de la solution C_s pour les NCP_{155}. La figure présente aussi les résultats obtenus pour des molécules d'ADN de 146 pb.

V.B.2 Mesures de mobilité électrophorétique

Une série de mesures de mobilité électrophorétique a été réalisée sur le même lot de NCP, et pour des concentrations salines variant de 4,8 mM à 660 mM. Comme nous l'avons précédemment mentionné dans la partie Matériel et Méthodes, nous n'avons pas pu réaliser toutes ces mesures sur les mêmes capillaires en silice. En effet, pour les concentrations salines supérieures à 75 mM, on observe une forte adsorption des NCP sur la surface du capillaire. Les expériences ont alors été réalisées à l'aide d'un capillaire de silice recouvert d'une couche de polymères. Cette adsorption permet une réduction importante de la charge du capillaire, réduisant par-là même l'adsorption des NCP à la surface, mais aussi la vitesse d'électro-osmose associée au capillaire. La Figure V-13a présente un électrophorégramme type, obtenu sous une différence de potentiel de 5 kV et pour C_s = 25 mM. Les positions des premier et deuxième pics, pointés par une étoile et une flèche, correspondent respectivement au temps d'électro-osmose $T_{e.o.}$ du marqueur neutre (oxyde de mesythyl) et au temps de migration des NCP_{155}, T_{NCP}. Les valeurs de la mobilité des nucléosomes μ_{NCP} sont alors obtenues à partir des équations (III.1) et (III.2). De la même manière, la Figure V-13b présente un électrophorégramme type obtenu pour un capillaire modifié sous une ddp de 7 kV et pour C_s = 160 mM. Les trois étoiles indiquent la localisation des pics de référence, le pic des NCP étant lui pointé par la flèche. Contrairement au cas précédent, ce pic est clairement dissymétrique, traduisant une adsorption des NCP sur le capillaire. Nous avons vérifié que la valeur de la mobilité, déduite de la localisation de ce pic, ne dépend pas de l'adsorption par comparaison des électrophorégrammes obtenus pour une même concentration saline mais sous différents voltages. De plus, pour $C_s \geq 160$ mM, les spectres des solutions de NCP présentent un pic supplémentaire, localisé par (♦).

Pour comparaison, la Figure V-13c présente l'électrophorégramme obtenu pour des fragments d'ADN, de 146 pb, à C_s = 160 mM (ddp = 7 kV). Dans ce cas, le pic correspondant aux fragments d'ADN, pointé par une flèche, est beaucoup moins dissymétrique que pour les NCP dans les mêmes conditions (Figure V-13b). Contrairement aux NCP, aucune adsorption n'est observée pour les fragments d'ADN. De plus, la comparaison entre les spectres d'ADN et de NCP enregistrés dans les mêmes conditions (Figure V-13 b et c) permet d'attribuer le pic supplémentaire, observé dans les solutions de NCP pour $C_s \geq 160$ mM, à de l'ADN dissocié présent dans les solutions de NCP de concentration saline supérieures à 160 mM. L'intégration des deux pics correspondant à l'ADN et aux NCP permet de calculer

précisément le pourcentage d'ADN dissocié dans nos solutions. Ce pourcentage varie de 0,6 à 2% lorsque C_s varie de 160 à 660 mM. Ces valeurs de dissociation obtenues pour les concentrations en NCP supérieures à 10 mg/ml sont en accord avec celles généralement publiées (Ausio, 2000).

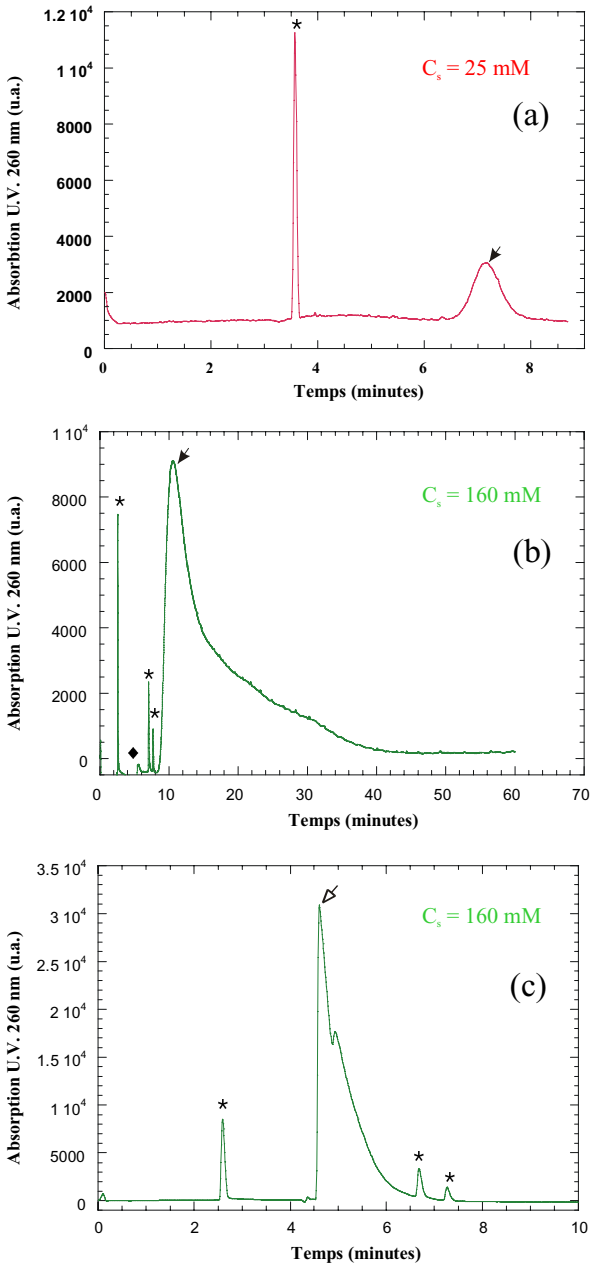


Figure V-13 : Trois électrophorégrammes type obtenus sous différentes tensions, pour des solutions de NCP à différentes concentrations salines ((a) C_s=25 mM, 5 kV et (b) C_s=160 mM, 7 kV) et pour une solution d'ADN ((c) C_s=160 mM, 7 kV). Pour les concentrations salines supérieures à 75 mM, les expériences sont réalisées à l'aide d'un capillaire dont la surface est recouverte par une couche de polymère. Les (*) localisent les pics de référence tandis que les échantillons sont pointés par les flèches.

L'évolution de la mobilité obtenue dans ces conditions pour les NCP ainsi que pour les fragments d'ADN est présentée sur la Figure V-14. Dans les deux cas, la mobilité μ reste négative, et son amplitude diminue lentement lorsque C_s augmente. Les valeurs obtenues pour les fragments d'ADN sont toujours largement supérieures à celles obtenues pour les NCP_{155}. Pour ces derniers, contrairement aux valeurs de second coefficient du viriel, les variations de μ avec C_s ne présentent pas de changement abrupt pour les concentrations salines supérieures à 50 mM. Pour l'ADN, les variations obtenues sont en accord avec les prédictions théoriques attendues dans le cas de bâtonnets rigides chargés (Desruisseaux et al., 2001).

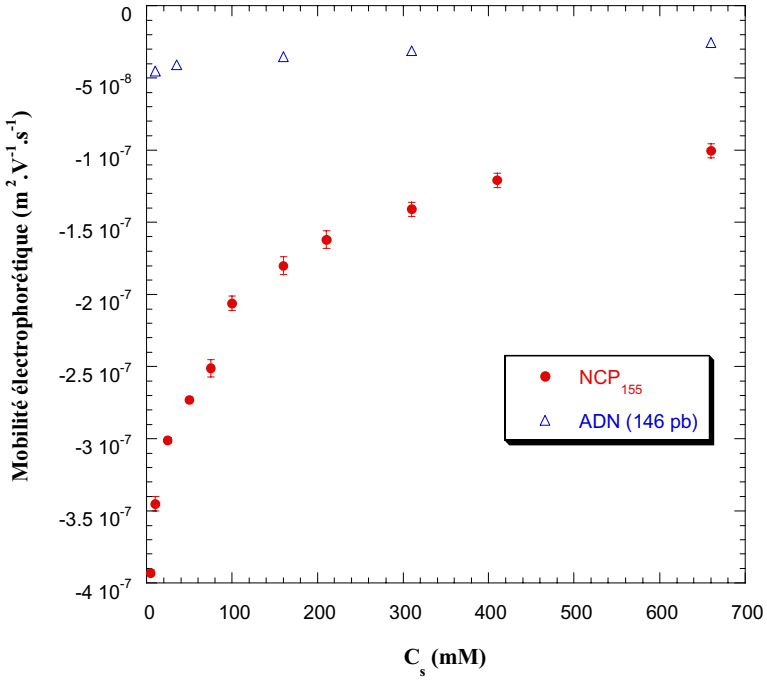


Figure V-14 : Variation de la mobilité électrophorétique des NCP en fonction de la concentration saline. La figure présente également la mobilité obtenue pour des fragments d'ADN de 146 pb.

V.B.3 Comparaison avec les modèles théoriques

V.B.3.1 Propriété dynamique : la mobilité

Les valeurs de la mobilité des NCP ont été analysées afin de déterminer le potentiel zêta ζ des particules. Comme nous l'avons précédemment expliqué, suivant la géométrie des

particules ou les valeurs de κa (κ^{-1} étant la longueur d'écrantage de Debye), il existe deux relations simples entre ζ et μ. Dans le cas de particules ponctuelles ou pour des sphères telles que $\kappa a << 1$, la relation entre ζ et μ est donnée par la relation d'Hückel (Equation (II.19)). Dans le cas de particules planaires ou pour des sphères telles que $\kappa a >> 1$, il convient d'utiliser la relation de Smoluchowski (Equation (II.20)). Dans nos conditions ioniques, conditions requises pour la stabilité des complexes ADN-histones, les valeurs de la longueur de Debye κ^{-1} sont de l'ordre de grandeur ou plus petites que la taille des NCP $a \cong 50$ Å ($0,98 < \kappa a < 13,3$). Une telle situation est courante dans les systèmes biologiques, mais ne permet d'appliquer aucune des deux relations précédentes. De plus, dans le cas des NCP, l'importance du rapport $\eta\mu/\varepsilon_0\varepsilon$, qui traduit le caractère très chargé des NCP, ne permet pas de négliger l'effet du champ électrique sur les contre-ions de la particule. Dans ces conditions, il est impossible d'utiliser les deux relations analytiques précédentes, et l'on doit utiliser les résultats d'analyse numérique de O'Brien et White (1978) obtenus pour des particules sphériques chargées. Pour une valeur de κa fixée, les valeurs de la mobilité sont converties graphiquement en potentiel zêta à l'aide des figures 3 et 4 de leur article, reproduites sur la Figure II-21.

Dans ce but, les NCP seront considérés comme des particules sphériques de rayons $a \cong 50$ Å. Le rayon hydrodynamique des particules a_μ, caractérisant le plan de cisaillement et nécessaire au calcul de ζ, sera considéré constant sur toute la gamme de concentration saline étudiée et égal au rayon a des particules $a_\mu = a \cong 50$ Å. Cette hypothèse est critiquable pour les faibles concentrations salines, lorsque la longueur de Debye est de l'ordre de grandeur du rayon de la particule et lorsque le facteur de conversion numérique entre ζ et μ est très sensible aux valeurs de κa. Par exemple, pour $C_s = 4,8$ mM, une augmentation de a_μ de 50 à 60 Å augmente de 8% la valeur de ζ. Notre hypothèse a donc pour conséquence de minimiser les valeurs de ζ. Ce problème n'est pas spécifique à la présente étude et c'est pour cette raison que le potentiel zêta est généralement considéré comme un paramètre phénoménologique plutôt que comme une valeur quantitative absolue. Les valeurs de ζ obtenues pour les différentes concentrations salines sont résumées dans le Tableau V-3. Ces valeurs décroissent continûment de 117 à 18,6 mV lorsque la concentration saline augmente de 4,8 à 660 mM. Dans ces conditions, le rapport entre l'énergie électrostatique $e\zeta$ (e étant l'unité de charge) et l'énergie thermique kT des ions localisés sur le plan de cisaillement décroît de 4,6 à 0,8.

Les valeurs du potentiel zêta obtenues expérimentalement peuvent être comparées aux valeurs théoriques du potentiel électrostatique à la surface des particules ψ_s. Ce dernier a été calculé numériquement à l'aide d'un programme mis au point par L. Belloni, et qui utilise un modèle Poisson-Boltzmann réseau (voir paragraphe II.B.2.2) pour les différentes valeurs de κa. Les valeurs théoriques du potentiel de surface ψ_s, résumées dans Tableau V-3., diminuent lorsque la concentration saline de la solution augmente. De plus, quelle que soit la concentration saline, les valeurs du potentiel zêta ζ sont toujours inférieures aux valeurs de potentiel de surface ψ_s. Cette différence était attendue puisque le potentiel ζ correspond au potentiel électrostatique $\psi(a_\mu)$ sur le plan de cisaillement. La détermination numérique du profil des potentiels, nous a permis de montrer que la distance $(a_\mu - a)$ entre le plan de cisaillement et la surface de la particule était de l'ordre de 2 à 5 Å, quelle que soit la concentration saline de la solution.

V.B.3.2 Propriété statique : étude des interactions.

Afin d'analyser les résultats de pression osmotique, nous utilisons une approche classique développée pour les colloïdes. Nous avons précédemment montré (Equation (II.15)) que dans le cas d'une géométrie sphérique, et pour des interactions entre particules suffisamment faibles, le second coefficient du viriel peut s'écrire :

$$A_2 = \frac{1}{2}\int_0^\infty \left[1 - \exp(-\beta V(r))\right] 4\pi r^2 dr$$

Par conséquent, la caractérisation de V(r), potentiel d'interaction de paires entre particules, permet de calculer les valeurs de second coefficient du viriel en fonction de C_s. Dans l'approche la plus simple, V(r) est considéré comme la somme de composants attractifs et répulsifs : $V(r) = V^{VdW}(r) + V^{elect.}(r) + V^{S.D.}(r)$. Dans un premier temps, les interactions attractives à courte portée seront étudiées en utilisant un potentiel de Van der Waals : $V^{VdW}(r)$, tandis que les interactions répulsives seront traitées en utilisant la théorie de Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO) (Verwey et Overbeek, 1948), en incorporant la contribution sphère dure : $V^{elect.}(r) + V^{S.D.}(r)$.

a) Attraction entre NCP

L'attraction à courte portée entre NCP va être traitée en utilisant un potentiel de Van der Waals. Il existe plusieurs façon d'exprimer ce potentiel. Dans ce travail, nous utiliserons l'expression utilisant la constante d'Hamaker A_H (Israelachvili, 1992) :

$$V^{VdW}(x) = \frac{-A_H}{12}\left[\frac{1}{(1+x^2)} + \frac{1}{x^2+2x} + 2\ln\left(\frac{x^2+2x}{(x+1)^2}\right)\right] \qquad (V.1)$$

où x=r/2a-1. La valeur de la constante d'Hamaker, généralement exprimée en unité kT, caractérise l'amplitude des interactions attractives entre particules.

Lorsque l'on intègre V^{VdW} (x) pour calculer les valeurs du second coefficient du viriel en utilisant l'équation (II.15), il apparaît une singularité en x=0. Afin de contourner cette difficulté, nous avons choisi une borne limite inférieure lors de l'intégration : $x_{min.}$ Cette distance minimum n'est pas choisie au hasard, mais correspond à une protection stérique autour des NCP, due à la taille non nulle des ions. Dans le cas des NCP considérés comme des sphères de rayons a = 50 Å, et pour des ions de diamètre 1,8 Å, cette protection stérique correspond à une distance minimale d'approche de 101,8Å soit x_{min} = 0,018.

b) Répulsion entre NCP

Deux potentiels conduisant à des interactions répulsives entre particules sont considérés.

i) Potentiel sphère dure

Le potentiel d'interaction sphère dure entre NCP empêche le recouvrement ou l'interpénétration des particules considérées comme indéformables. Ce potentiel est infini pour r<2a et nul dans le cas contraire. Puisque ce potentiel est nul pour r>2a, région où les autres potentiels sont non nuls, sa contribution est généralement séparée de celle des autres potentiels et la valeur de A_2 qui lui est associée est alors simplement proportionnelle au volume V_{NCP} des NCP : $A_2^{S.D.} = 4\ V_{NCP}$. Si l'on considère les NCP comme des sphères de rayon 50 Å, on obtient : $A_2^{S.D.} = 2{,}09.10^6$ Å^3/particule.

ii) Potentiel électrostatique DLVO

Le dernier potentiel considéré est le potentiel électrostatique DLVO. Dans l'approche classique, l'expression du potentiel DLVO provient de la linéarisation de l'équation de Poisson-Boltzmann. Il faut donc que l'énergie électrostatique soit petite devant l'énergie thermique pour utiliser ce potentiel. De plus, contrairement au modèle primitif, ce potentiel est un potentiel effectif dans lequel les particules interagissent via un potentiel moyenné sur les ions (modèle à un composant). Ce modèle n'a donc de sens que lorsque les ions et les particules présentent une grande dissymétrie de masse, de charge et de taille. Lorsque ces conditions sont respectées, on obtient :

$$V^{elect.}(r) = Z_{str}^2 L_B \frac{\exp[-\kappa(r-2a)]}{r(1+\kappa a)^2} \qquad (V.2)$$

où l_B est la longueur de Bjerrum ($L_B = e^2/(4\pi\varepsilon_0\varepsilon kT)$). L'expression précédente (Equation (V.2)) est valable uniquement dans le cas de particules présentant une faible densité de charge, c'est-à-dire une faible charge structurale Z_{str}. Dans le cas de particules fortement chargées, on utilise l'expression précédente en remplaçant la charge structurale par une charge effective Z_{eff}, qui prend en compte la condensation des contre-ions autour de la particule. La difficulté principale réside donc dans le choix de Z_{eff} et a_{eff}. Comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe II.B.2.2, une des possibilités est de considérer qu' à longue distance, les valeurs du potentiel linéarisé et non linéarisé sont identiques. Les valeurs de la charge effective, Z_{eff}, obtenues théoriquement sont résumées sur le Tableau V-3. La valeur absolue de cette charge augmente avec la concentration saline de la solution de 62 à 150.

c) Calcul du second coefficient du viriel

En utilisant les valeurs de la charge effective présentées dans le Tableau V-3, il est possible de calculer les valeurs du second coefficient du viriel en utilisant les équations (II.15), (V.1) et (V.2). Le seul paramètre ajustable dans ces équations est la constante d'Hamaker A_H. La Figure V-15 présente les variations du second coefficient du viriel, calculé dans l'approximation gaz dilué sans contribution attractive (trait continu) et avec une attraction de van der Waals (pointillés). La valeur de la constante d'Hamaker A_H permettant le meilleur ajustement entre les courbes expérimentale et théorique vaut 5,6 kT. Par comparaison avec d'autres systèmes cette valeur est tout à fait raisonnable. Dans le cas de protéines globulaires, cette valeur est généralement plus faible (Malfois et al, 1996), alors que

l'on trouve des valeurs plus élevées si l'on considère des micelles de surfactants (Ortega et al, 1990).

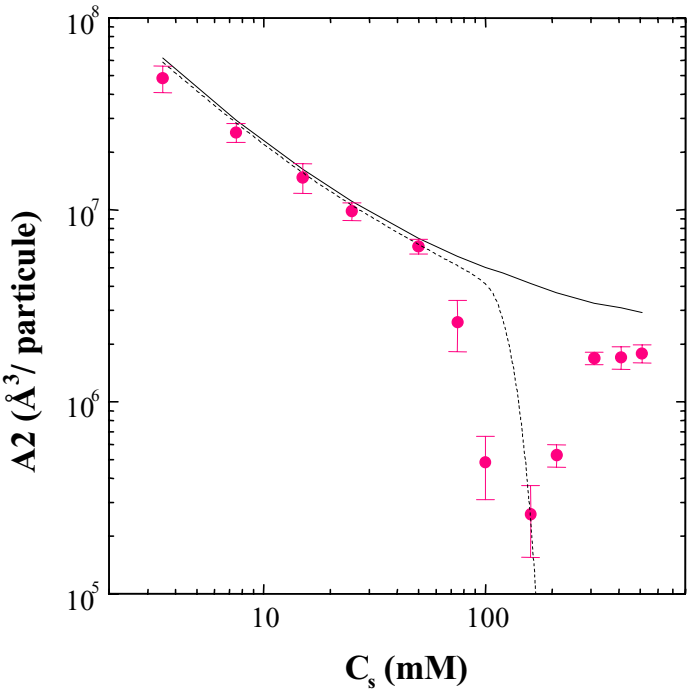


Figure V-15 : Comparaison entre les A_2 expérimentaux et théoriques calculés avec et sans attraction (respectivement trait pointillé et continu).

Dans la première partie de la courbe, entre 3,5 mM et 75 mM, les deux courbes théoriques sont quasiment superposables. La contribution attractive peut donc être considérée comme négligeable dans ces conditions. De plus, le bon accord entre les deux courbes théoriques et la courbe expérimentale nous laisse supposer que les valeurs de Z_{eff} choisies sont correctes. La décroissance des valeurs du second coefficient du viriel s'explique alors par un écrantage progressif des interactions électrostatiques avec C_s. La même conclusion s'applique dans le cas des fragments d'ADN (Nicolai et Mandel, 1989).

Pour C_s>75 mM, les deux courbes théoriques présentent des comportements très différents. La courbe obtenue en l'absence d'interactions attractives décroît progressivement avec C_s et atteint la valeur sphère dure des NCP pour les concentrations salines les plus fortes. Si l'on considère les attractions entre particules, la courbe théorique décroît de façon drastique avec C_s et devient négative. Pour les fortes concentrations salines, cette courbe atteint une valeur plateau négative (non illustré sur la figure). Ces deux comportements sont différents de celui observé expérimentalement. En effet, les valeurs expérimentales décroissent fortement

avec C_s pour les concentrations supérieures à 75 mM, mais restent toujours très faiblement positives. De plus, pour C_s>160 mM, les valeurs expérimentales augmentent doucement avec C_s. Avec ces considérations, il paraît évident que le terme attractif à courte portée de Van der Waals ne peut pas reproduire les variations expérimentales observées des valeurs de second coefficient du viriel. Nous allons donc essayer d'introduire un autre potentiel attractif dont l'origine sera discutée dans la suite.

V.C Origine de l'augmentation des répulsions avec la concentration saline

Pour les fortes concentrations salines, lorsque les interactions électrostatiques sont complètement écrantées, les valeurs expérimentales du second coefficient du viriel obtenues pour les fragments d'ADN et pour les NCP atteignent une valeur équivalente à celle d'un système neutre. Cette valeur est simplement le terme de sphère dure. Pour les NCP considérés comme des sphères de rayon a = 50 Å, nous avons déjà vu que cette valeur vaut $A_2^{S.D.} = 4V_{NCP} = 2{,}09.10^6$ Å^3/particule. Pour les fragments d'ADN, considérés comme des segments de longueur L et de diamètre d, cette valeur vaut $A_2^{S.D.} = 5.10^6$ Å^3/particule. Le potentiel sphère dure peut être considéré comme le volume exclu des particules. Avec ces considérations, le gain de volume exclu lorsque l'ADN est enroulé autour du cœur d'histones pour former le nucléosome, premier niveau de compaction de la chromatine, est égal au rapport $A_2^{S.D.}$ (ADN_{146})/ $A_2^{S.D.}$ (NCP). La valeur de ce gain pour les fortes concentrations salines est égale à 2,5. Pour les faibles concentrations salines (autour de 10 mM), les interactions électrostatiques sont très importantes et A_2 peut être considéré comme un volume exclu effectif. Dans ce cas encore, le gain de volume exclu effectif, égal à 4, n'est pas très important. La gamme de concentration saline pour laquelle ce gain est le plus important se situe autour de 160 mM. En effet, on trouve pour cette concentration un gain de volume effectif égal à 10, qui est largement supérieur aux valeurs précédentes. Le cœur d'histones semble donc jouer un rôle important dans cette gamme de concentration saline. C'est ce phénomène qui nous intéressera plus particulièrement dans la suite de cette discussion. Nous tenterons aussi d'expliquer la remontée observée avec C_s pour les valeurs expérimentales de A_2.

V.C.1 Dissociation partielle des complexes ADN-histones ?

Comme nous l'avons précédemment expliqué, le calcul des valeurs du second coefficient en utilisant un potentiel DLVO et une attraction de Van der Waals ne reproduit pas les

résultats expérimentaux observés. Cette attraction est couramment utilisée pour décrire les interactions entre colloïdes ou protéines globulaires qui ne sont pas stables à forte concentration ionique, quand les interactions électrostatiques sont écrantées. En effet, dans ces conditions, ces particules s'agrègent et forment même dans certains cas des cristaux (Ducruix et al, 1996). Un tel comportement n'est pas observé pour les NCP. Pour les fortes concentrations salines, supérieures à 2M, le cœur d'histone est stable et dissocié de l'ADN, mais aucune agrégation n'est observée. On peut alors se demander si l'augmentation du A_2 observée pour les fortes concentrations salines n'est pas due à une dissociation partielle des complexes ADN-histones. En effet, cette dissociation augmente avec C_s. Dans cette hypothèse, on assisterait donc à une augmentation continue des valeurs de A_2 jusqu'à la disociation complète des NCP. Ce comportement n'est pas observé expérimentalement puisque les valeurs obtenues à fort sel pour les NCP atteignent une valeur plateau. De plus, les électrophorégrammes obtenus à partir des mesures de mobilité électrophorétique ont montré que seule une faible proportion des NCP est dissociée dans nos conditions ioniques : 0,6% à 160 mM et 2% à 660 mM (mesures effectuées à 10 mg/ml).

V.C.2 Forces d'hydratation ?

Un article publié récemment sur l'apoferritine, une molécule quasi sphérique creuse de 13 nm de diamètre, a déjà montré une telle remontée des valeurs de coefficients du viriel avec la concentration saline de la solution (Petsev et Vekilov, 2000). Les auteurs attribuent cette remontée aux forces d'hydratation. Il n'existe malheureusement pas de relation précise entre la concentration saline de la solution et les forces d'hydratation entre particules. De plus, les concentrations salines pour lesquelles ces forces sont observées dépendent fortement de la nature des ions considérés, mais aussi des propriétés physique et chimique de la surface des particules (Israelachvili, 1992). De façon qualitative, ces forces répulsives apparaissent pour des concentrations salines intermédiaires, lorsque les contre-ions des particules sont remplacés par les ions de la solution saline. Ces forces augmentent avec C_s jusqu'à une concentration critique pour laquelle tous les contre-ions sont remplacés. Au-dessus de cette concentration critique, les répulsions dues aux forces d'hydratation sont constantes avec C_s (Israelachvili, 1982). Par ajustement à des données expérimentales, Petsev D. et Velikov P. (2000) ont montré que l'énergie d'hydratation pouvait s'écrire :

$$U_{hyd}(r) = \pi a L f_0 \exp\left[-(r-2a)/L\right]$$

où f_0 et L sont des paramètres empiriques représentant l'énergie de surface et une longueur caractéristique de décroissance du système. Dans notre cas, ces deux paramètres sont inconnus. Cependant, en choisissant de façon adéquate ces deux valeurs, nous pouvons expliquer nos résultats. Il faut pour cela considérer que pour C_s<160 mM, seules les forces DLVO et Van der Waals agissent dans notre système, alors que pour C_s>160 mM, nous devons aussi considérer les forces d'hydratation. Mais ces mêmes potentiels ne permettent en aucun cas d'expliquer le passage attractif observé par diffusion des rayons X à faible concentration saline pour les NCP avec une longueur d'ADN associée de 145 pb (NCP_{145})

V.C.3 Interaction de pontage ?

Dans la gamme de concentration ionique inférieure à 200 mM, le seul changement conformationnel observé correspond à l'extension des queues des histones mis en évidence par diffusion des rayons X aux petits angles. Pour rappel, nous avons observé dans la partie précédente (chapitre V.A) que les queues N et C terminales repliées sur l'ADN pour les faibles concentrations salines se déplient lorsque les interactions électrostatiques de la solution sont écrantées. La Figure V-16a (échelle de droite) rappelle les résultats obtenus pour l'extension maximale des particules, D_{max}, pour les deux lots de NCP considérés, avec des longueurs d'ADN différentes (145 et 165 pb). Dans les deux cas, on observe une augmentation du D_{max} de plus de 20 Å, attribuée à l'extension des queues protéiques. De plus, la concentration saline C_s^* pour laquelle les queues commencent à se déplier est très différente. Une telle situation a déjà été précédemment étudiée pour des chaînes de polymères greffées sur une surface plane (Zhulina et al. 2001). Ces auteurs ont montré que pour des polymères chargés positivement, greffés sur une surface de charge totale σ négative, la conformation des polymères est déterminée par la balance entre les interactions électrostatiques attractives entre les polymères et la surface, et la perte d'entropie due au confinement des chaînes. Si l'on considère α_+ la fraction de monomères chargés positivement, l'extension des queues se produit pour une concentration saline $C_s^* \propto \sigma\alpha_+^{1/2}$. Pour les concentrations salines supérieures à C_s^*, la distance D bout à bout de la chaîne augmente avec C_s comme : $D \propto C_s/(\sigma\alpha_+)$ pour atteindre la distance Gaussienne: $D \sim R_0 \approx N^{1/2}b$, où N est le nombre de monomères de longueur b pour la chaîne greffée.

Dans notre cas, les extrémités terminales flexibles les plus longues pouvant s'étendre hors du cœur sont constituées en moyenne de 25 acides aminés. Bien que la distribution des acides

aminés ne soit pas uniforme, la fraction moyenne α_+ est de l'ordre de 1/3. Si l'on suppose que chacune des queues, fixée à une extrémité, se comporte comme une chaîne Gaussienne à longueur de persistance, l'extension R de chacune d'elles peut se mettre sous la forme :

$$R = \sqrt{2l_pL}$$

où l_p est la longueur de persistance de la chaîne, égale à environ 10Å, et L sa longueur de contour, c'est-à-dire sa longueur quand elle est complètement étendue. L est donnée par l'expression L=Naf, N étant le nombre de résidus de la chaîne, a la distance entre deux carbone alpha adjacents (a=3,8Å), et f un facteur géométrique dépendant des angles de liaison le long de la chaîne et prenant en compte le fait qu'une chaîne polypeptidique complètement étendue n'est pas une ligne droite mais forme un zig-zag. Pour une chaîne polypeptidique, f est de l'ordre de 0,95 (voir Cantor et Schimmel, 1980). Ainsi, une chaîne protéique de 25 acides aminés peut s'étendre sur une distance de 40Å. Dans le cas de chaînes très chargées, la longueur de persistance est légèrement supérieure à 10Å, permettant aux chaînes de s'étendre sur des distances plus grandes.

D'autre part, si l'on considère que l'augmentation de la longueur d'ADN associée de 20 pb entre les deux lots provoque une augmentation de la charge de surface σ, on attend théoriquement C_s^* (145 pb) < C_s^* (165 pb). Ce comportement est effectivement vérifié expérimentalement puisque les queues des NCP_{145} se déplient à des concentrations salines plus faibles que pour NCP_{165}. Les calculs prédisent par ailleurs que le rapport C_s^* (165 pb) / C_s^* (145 pb) doit être égal à 1,2. D'après les expériences de diffusion des rayons X, cette valeur semble au moins égale à 2.

Nos résultats suggèrent donc que l'extension des queues avec C_s permet l'apparition de forces attractives entre les parties positives des queues et les charges négatives d'un NCP voisin. Des interactions spécifiques entre les queues protéiques et des NCP voisins ont d'ailleurs été précédemment observées dans les cristaux. Dans les cristaux de Xla-NCP, la queue N terminale de H4, interagit avec le domaine protéique acide du NCP voisin (Lüger et al., 1997). De même, la queue N terminale de H2A peut interagir avec l'ADN d'un NCP voisin (Harp et al., 2000). Dans des solutions d'oligonucléosomes, il est aussi bien connu que les queues protéiques permettent le repliement de la chaîne. Lorsqu'une partie des charges des queues est neutralisée par acétylation, ou lorsque les queues sont simplement coupées par trypsinisation, le repliement de la chaîne ne se fait plus (Garcia-Ramirez et al., 1992; Moore et Ausio, 1997; Fletcher et Hansen, 1995). Ces deux observations montrent donc que les

queues peuvent jouer un rôle dans les interactions attractives entre NCP. Afin de modéliser ces interactions, nous supposerons que les queues étendues sont capables d'interagir avec les NCP voisins. Dans ce but, nous introduisons un potentiel attractif de type Yukawa, dans lequel l'extension des queues D sera considérée comme la portée du potentiel, de profondeur Ω :

$$\frac{V(r)}{kT} = -\Omega \frac{2a}{r} \exp\left[-(r-2a)/D\right] \qquad (V.3)$$

Dans l'expression (V.3), les deux paramètres D et Ω, sont inconnus. Dans toute la suite, le paramètre D sera déduit des mesures de diffusions des rayons X, tandis que Ω sera obtenu par ajustement des valeurs expérimentales du second coefficient du viriel. Les variations considérées de D avec C_s sont présentées sur la Figure V-16a (échelle de gauche). Pour NCP_{145}, les variations de D sont simplement ajustées aux variations expérimentales de D_{max}. Ces valeurs augmentent linéairement avec C_s. Pour NCP_{155}, nous ne disposons pas de donnée expérimentale de D_{max}. Par comparaison avec les mesures de D_{max} effectuées sur les lots NCP_{145} et NCP_{165}, nous considèrerons que les valeurs de D sont égales à 0 pour les concentrations salines inférieures à 50 mM et égales à 40Å au-dessus de 160 mM.

Les interactions répulsives entre particules sont prises en compte comme précédemment à l'aide des potentiels sphère dure et électrostatique (Equation (V.2)). La charge effective nécessaire au calcul des valeurs de A_2 est considérée comme constante pour les deux lots de NCP. En effet dans le cas de particules sphériques, la charge effective post-condensation est censée être indépendante de la charge structurale des particules, et ne doit dépendre que de la taille des particules (Belloni 1998, Alexander 1984). Pour chaque concentration saline, les valeurs du second coefficient du viriel ont été calculées pour différentes valeurs de Ω, jusqu'à ce que l'accord entre les valeurs expérimentales et théoriques soit atteint.

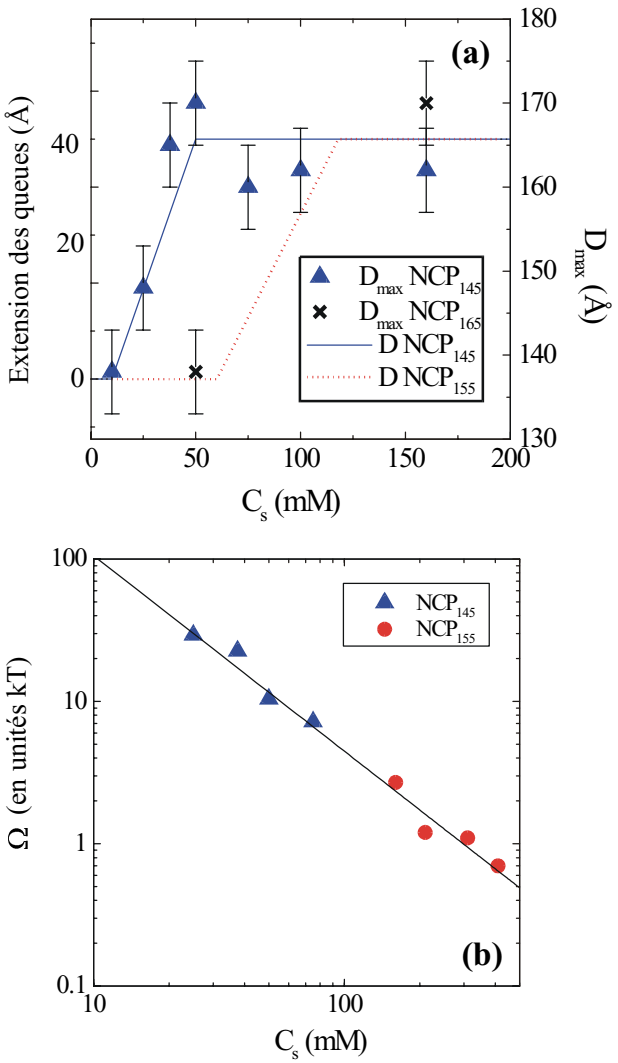


Figure V-16 : (a) Variation de l'extension maximale D_{max} des NCP présentant des longueurs d'ADN différentes (145 et 165 pb) en fonction de la concentration saline C_s (voir chapitre V.A.2). L'extension des queues correspondante (D) est indiquée en vis à vis. Elle correspond à la portée du potentiel attractif.
(b) Variation de la profondeur du potentiel attractif Ω en fonction de la concentration saline. La forte variation de Ω avec C_s suggère que l'attraction due aux queues est modulée par la concentration saline de la solution.

Les valeurs de Ω en unités kT obtenues par cette procédure pour les différentes concentrations salines en mM sont présentées sur la Figure V-16b. Ces valeurs varient de 30 à 0,7 kT et s'alignent toutes sur une même courbe en loi de puissance $\Omega=2493.C_s^{-1,37\ \pm0,03}$, indépendamment de la longueur d'ADN associée aux NCP. La dépendance en sel des valeurs de Ω est beaucoup plus importante que celle observée pour l'amplitude du potentiel répulsif. C'est cette forte dépendance qui permet d'observer ou non le passage d'interactions répulsives à attractives. En effet, pour les NCP avec la longueur d'ADN associée la plus courte (145 pb),

le dépliement des queues s'effectue pour les faibles valeurs de concentration saline, lorsque les valeurs de Ω, profondeur du potentiel attractif, sont très importantes. Les interactions attractives sont donc supérieures aux interactions répulsives et le second coefficient du viriel passe par des valeurs négatives. Lorsque la longueur d'ADN associée aux NCP augmente, la concentration pour laquelle les queues se déplient est déplacée à plus forte concentration saline. Les valeurs de Ω sont alors plus faibles que précédemment, et ne sont pas suffisantes pour permettre l'observation de A_2 négatifs. Enfin, aux plus fortes concentrations en sel, Ω devient négligeable, et seul le terme sphère dure prédomine. A cette étape, on peut remarquer que la majeure partie des valeurs de Ω est obtenue lorsque les queues protéiques sont complètement dépliées. Seuls les points obtenus à 75 mM et 110 mM (pour les NCP avec une longueur de 155 pb) dépendent du choix de D. Sans tenir compte de ces deux points, l'alignement obtenu nous permet de valider notre hypothèse de départ selon laquelle l'extension des queues protéiques des NCP et le pontage entre deux NCP voisins permet l'apparition d'un potentiel attractif.

La forte dépendance de Ω avec la concentration saline indique que la nature de ce potentiel pourrait être électrostatique. On peut raisonnablement penser que les phénomènes qui provoquent l'adsorption puis l'extension des queues avec C_s (énergie électrostatique attractive et énergie due à la conformation des queues, entropique (Zhulina et al., 2001)) sont aussi impliqués dans le pontage entre NCP. L'origine de ce pontage provient probablement de l'hétérogénéité de charge des NCP au niveau de la particule cœur, mais aussi des queues des histones. En effet, pour les concentrations salines supérieures à C_s^*, les queues protéiques s'étendent et peuvent alors être attirées par une région plus négativement chargée de la particule voisine. Dans cette hypothèse, les queues étendues peuvent interagir avec une surface chargée négativement, et peuvent alors aussi être responsables de l'adsorption des NCP observée sur les capillaires en silice pour les concentrations salines supérieures à 75 mM.

Pour résumer, l'analyse des valeurs du second coefficient du viriel nous a permis de montrer que les queues interviennent dans la régulation des interactions entre NCP. Selon la longueur d'ADN associée à la particule, ces queues se déplient pour des concentrations salines plus ou moins importantes, permettant l'apparition ou non de forces attractives entre NCP. Ces forces attractives provenant de pontage entre deux NCP sont probablement dues à

l'hétérogénéité de charge des NCP. A ce niveau, nous ne sommes pas capables de préciser si toutes les queues ou seulement une partie, sont nécessaires pour observer cette attraction. Il faudrait pour cela effectuer des digestions sélectives de certaines des queues, et réaliser les mêmes expériences. De plus, dans nos expériences, les attractions sont maximales pour une concentration saline de 150 mM. Ce phénomène est intéressant, puisque cette concentration saline se situe dans les gammes de concentration en sel monovalent considérées comme physiologiques (voir paragraphe II.A.1). De plus, l'acétylation partielle de certains acides aminés des queues des histones permettrait ainsi de réguler les attractions entre NCP dans cette gamme de concentration, et par-là même, la régulation de l'activité transcriptionnelle.

CHAPITRE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Chapitre VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons étudié *in vitro* le comportement des particules cœur de nucléosome dans des conditions de concentration en sel monovalent et en particules proches de celles du milieu cellulaire. Les particules forment alors différentes phases denses dont l'organisation dépend fortement de la concentration saline de la solution. Le but premier de cette thèse était de caractériser précisément l'organisation des particules dans ces conditions de milieu dense. Nous avons montré, par diffraction des rayons X, qu'à faible concentration saline les particules s'organisent en une phase lamellaire de bicouches et qu'à fort sel, elles forment une phase hexagonale ou quasi-hexagonale organisée à deux ou trois dimensions. Nous avons pu montrer que ces différentes organisations dépendent également d'autres paramètres, des paramètres biologiques (longueur d'ADN associée aux particules et qualité des histones) et des paramètres expérimentaux (concentration initiale en particules avant application du stress osmotique, utilisation d'un champ magnétique).

Afin de comprendre l'origine du polymorphisme observé en phase dense, nous avons réalisé des études de diffusion des rayons X et des expériences d'osmométrie en solution diluée. Nous avons mis en évidence de très faibles changements de la conformation des NCP, et plus précisément une extension des queues des histones, lorsque la concentration saline de la solution augmente de 10 à 200 mM. Cette augmentation de la concentration ionique modifie également les interactions entre particules. Nous avons montré que ces deux derniers phénomènes (extension des queues et changement des interactions) sont couplés.

La question qui se pose alors naturellement est de savoir si l'on peut extrapoler les résultats obtenus en solution diluée au cas des milieux denses. En d'autres termes, le polymorphisme d'organisation en milieu dense est-il une conséquence des conformations et des interactions différentes en solution diluée ? La réponse à cette question n'est pas si simple et nécessite de prendre en compte de nombreux paramètres, notamment l'évolution des concentrations ioniques, les effets d'encombrement stérique et les particularités géométriques des NCP.

La première difficulté consiste à comparer les concentrations ioniques en solution diluée et en solution concentrée. Deux phénomènes doivent être pris en compte : (i) l'effet Donnan, également appelé phénomène d'exclusion du sel, qui tend à réduire la concentration en sel au voisinage des particules et (ii) l'effet de concentration des NCP qui tend au contraire à augmenter considérablement la concentration ionique. Pour tenter d'estimer ces concentrations, on peut utiliser le modèle Poisson-Boltzman réseau. Pour rappel, dans ce modèle, chaque particule se trouve au centre d'une cellule de rayon R. En solution diluée, l'environnement ionique des particules est défini par la concentration en sels ajoutés Cs dans le réservoir, qui correspond à la concentration au bord de cette cellule C(R). En solution concentrée, la taille de cette cellule est maintenant considérablement réduite et la concentration ionique au bord de la cellule C(R) a varié. A la transition isotrope/anisotrope (de l'ordre de 250 mg/ml) on peut estimer que la concentration C(R) est respectivement de 150 mM et de 220 mM quand on part d'une solution dialysée contre 15 mM ou 160 mM de sel. La différence vient du fait que les sels ajoutés ne sont pas complètement exclus par effet Donnan dans le dernier cas. Ainsi, au voisinage de la transition, la phase anisotrope se forme dans un environnement ionique final différent suivant que l'on part de solutions dialysées à 15 ou à 160 mM. Par contre, si la transition isotrope/anisotrope se produisait à concentration plus élevée, de l'ordre de 400 mg/ml, l'exclusion des sels ajoutés serait complète. Seuls les contre-ions apportés par les particules seraient présents et leur concentration augmenterait progressivement.

Voyons maintenant quelles en sont les conséquences sur les interactions entre particules lorsqu'elles arrivent au proche voisinage les unes des autres. Il n'est plus possible à cette étape de négliger la géométrie de la particule comme nous l'avons fait en solution diluée. Quelles que soient les conditions ioniques de la solution, les NCP interagissent via leurs faces supérieures et inférieures pour former des colonnes comme toute molécule discotique. Ce type d'interaction n'étant pas spécifique des conditions ioniques explorées, nous ne le prendrons donc pas en considération dans cette discussion. Nous nous attacherons par contre à comprendre les interactions entre les faces latérales des NCP qui conduisent à la formation d'une phase lamellaire à faible sel et à la formation d'une phase hexagonale à fort sel.

Dans la phase lamellaire, rappelons que les colonnes de NCP forment des bicouches qui requièrent l'existence d'interactions attractives entre colonnes. Les bicouches sont quant à elles maintenues à égale distance les unes des autres par des interactions répulsives entre colonnes. Le positionnement des NCP les uns par rapport aux autres au sein de la bicouche est tel (NCP positionnés dos à dos) qu'un pontage par les queues NH2b avait été proposé au vu des images de microscopie électronique (Leforestier et al., 2001). Ce pontage suppose que les queues jusqu'alors condensées sur l'ADN de leur propre NCP en solution diluée se détachent pour se condenser sur l'ADN du NCP voisin. On peut comprendre cette transition conformationnelle si l'on suppose que les queues gagnent en entropie. On peut s'interroger sur les raisons qui déterminent cette polarité des NCP au sein de la bicouche, conduisant à ce positionnement dos à dos des particules. Il faut pour cela considérer le nombre et la localisation des charges positives sur les différentes queues et le nombre de charges négatives de l'ADN. Les faces ventrales des NCP présentent un déficit de charges négatives puisque l'ADN ne fait qu'un tour 3/4 à la périphérie du NCP. Si l'on néglige les queues des histones H4 qui ne pointent pas sur la couronne périphérique, quatre queues sont à la fois très longues et très chargées : les queues NH2B qui pointent sur la face dorsale et les queues de H3 qui pointent sur la face ventrale. Le fait que les queues NH2B soient moins chargées (environ 7 charges au lieu de 10) laisse supposer qu'elles sont susceptibles de se décrocher plus facilement, ou les premières. On pourrait donc comprendre qu'au proche voisinage d'un autre NCP, les queues de NH2B viennent se condenser sur les charges négatives de la face dorsale du NCP voisin. Ce comportement pourrait expliquer la formation des bicouches de colonnes.

Au sein de cette bicouche la concentration en NCP est très élevée, de l'ordre de 450 mg/ml. A cette concentration, les sels ajoutés ont été complètement exclus par effet Donnan. Seuls les contre-ions positifs des particules sont alors présents. Leur concentration peut être estimée à environ 0,4M. Ils neutralisent complètement les charges des NCP. Par contre, la distance entre bicouches est relativement importante et un calcul utilisant l'approximation Poisson-Boltzman réseau en géométrie sphérique comme précédemment (qu'en toute rigueur on ne peut faire qu'en solution homogène) montre qu'à l'extérieur des bicouches la concentration en sels à la distance R serait de l'ordre de 15 mM. Les conditions ioniques sont donc telles que sur les faces ventrales des NCP exposées au solvant, les queues se trouvent dans des conditions ioniques comparables aux conditions initiales; elles devraient rester condensées sur l'ADN. Il serait utile de faire des calculs plus précis en considérant les

surfaces des plans de colonnes exposés soit à l'autre partie de la bicouche soit au solvant, qui correspondraient davantage aux conditions expérimentales. Toutefois, le fait que l'extérieur des bicouches soit dans un environnement de faible concentration ionique permet de comprendre l'interaction répulsive entre les bicouches.

Dans le cas des phases formées à concentration saline plus élevée (> 160 mM), l'organisation des particules est extrêmement dense avec une distance entre NCP de l'ordre de quelques angströms. La phase est hexagonale et non plus lamellaire. On peut donc supposer que l'effet des hétérogénéités de charges responsable de la formation des lamelles soit écranté par la concentration ionique plus importante ici que dans le cas des bicouches. Or, comme nous l'avons mentionné précédemment, au voisinage de la transition isotrope-anisotrope, la différence des concentrations ioniques C(R) reste faible. On peut donc s'interroger pour savoir si cet écart de concentration saline, qui s'atténue avec la concentration en NCP, est suffisant pour induire les différences observées et/ou si un autre phénomène est impliqué. On peut considérer par exemple le fait que les phases sont formées à partir de NCP dont les queues sont soit condensées (15mM) soit dépliées (160 mM). Jusqu'à présent, nous avions supposé que la densité moyenne de charges portée par les queues était insuffisante pour provoquer une condensation d'anions au voisinage de celles-ci. Or, la répartition des acides aminés chargés n'est pas aléatoire et certains sont regroupés deux par deux. Si ce regroupement est suffisant pour induire une condensation d'anions, les contre-ions des NCP seraient non seulement des cations, mais aussi des anions. De ce fait, quand on concentre chacune des solutions par application d'une pression osmotique, on concentre les particules et l'ensemble des ions qui leur sont associés : uniquement des ions positifs dans le cas des particules dialysées à bas sel, des ions positifs et négatifs dans le cas des particules dialysées à haut sel. La présence ou non d'ions négatifs pourrait ainsi jouer un rôle crucial.

Cette discussion montre bien que l'étude complète des interactions entre particules cœur de nucléosome est très complexe. Mettre en relation les données obtenues en solution diluée et en milieu dense n'est pas chose évidente. Nous avons donc essayé de suivre ces interactions sur toute la gamme des concentrations explorées, en combinant différentes méthodes de mesure de la pression osmotique (voir paragraphe III.B.1.1). Ces résultats (présentés en annexe VII.B) sont trop préliminaires pour avoir pu faire l'objet d'un chapitre à part entière. Nous souhaitons simplement les mentionner pour montrer quelles sont les approches qui

peuvent être envisagées pour aborder ces questions. Les courbes que nous avons obtenues confirment la complexité des effets qui se combinent dans les mécanismes qui sous-tendent l'organisation supramoléculaire : effet de la concentration en particules, des contre-ions, transitions isotrope-anisotrope et effet des forces d'hydratation. Néanmoins cette approche expérimentale ne prend toujours pas en compte les détails structuraux des particules. Les observations de microscopie mettent pourtant clairement en évidence leur importance et souligne en particulier que la chiralité des particules s'exprime fortement au sein de la phase lamellaire comme au sein des phases hexagonales. Il sera important de réussir à prendre en compte ce caractère dans le futur.

Du point de vue biologique, on sait que le rôle premier de la particule cœur de nucléosome est de permettre la compaction de l'ADN et de réprimer la transcription *in vitro* (Kornberg et Lorch, 1999) et *in vivo* (Grunstein, 1990). A l'échelle supérieure, la condensation de la chromatine permet également de réprimer l'activité de la chromatine. Divers mécanismes doivent donc être mis en jeu pour rendre accessibles les portions du génome qui doivent être répliquées ou transcrites à un moment donné du cycle cellulaire. Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que les queues des histones jouent un rôle crucial dans ces mécanismes de régulation de la transcription. Des enzymes ATP-dépendantes, les acetyltransférases (HAT), en acétylant les lysines des queues des histones, modifient leur charge. L'accessibilité de l'ADN d'une partie du nucléosome est ainsi facilitée et la chromatine condensée est déstabilisée. De plus, les histones acétylées sont capables de recruter les facteurs de transcription, déclenchant ainsi l'initiation de la transcription : la RNA polymérase se fixe au niveau du promoteur et la synthèse d'ARN peut commencer. Pour que le processus se poursuive (étape d'élongation), il est nécessaire que la décondensation se propage à l'ensemble du gène. Certains auteurs proposent que la polymérase une fois fixée sur le promoteur recrute un "élongateur" qui a une activité HAT. Celui-ci, se déplaçant en même temps que la polymérase acétylerait toutes les histones au fur et à mesure que l'élongation se poursuit, permettant ainsi la décondensation de l'ensemble du gène au fur et à mesure qu'il est transcrit (Orphanides et Reinberg, 2000). Ce type de mécanisme, essentiel pour réguler l'activité de la chromatine, repose sur des mécanismes électrostatiques, qui jusqu'à présent ont été très peu explorés, probablement en raison de leur complexité. Nous avons commencé à explorer cette voie en jouant simplement sur l'effet des sels monovalents et en utilisant un système expérimental très simplifié. Nous avons montré quels en sont les conséquences sur la

conformation des nucléosomes et leurs interactions. *In vivo*, on peut imaginer que des variations locales de la concentration saline puissent provoquer également de fortes variations de l'organisation des particules. Néanmoins, nous avons bien conscience que pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes qui se produisent dans la cellule, des systèmes plus fins devront être considérés. A concentration ionique constante, il faudrait pouvoir faire varier le degré d'acétylation des queues des histones. Le passage à des fragments de chromatine devra également être considéré, ainsi que la présence des autres protéines associées à la chromatine.

CHAPITRE VII

ANNEXE

Chapitre VII ANNEXE

VII.A Code lettre des vingt acides aminés

Code lettre	Symbole	Nom de l'acide aminé
A	Ala	Alanine
C	Cys	Cysteine
D	Asp	Acide aspartique
E	glu	Acide glutamique
F	Phe	Phenylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Methionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Serine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosine

VII.B Résultats préliminaires de pression osmotique

Comme nous l'avons précédemment expliqué, les mesures de pression osmotique permettent de mesurer les forces d'interactions sur toute la gamme de concentration en NCP que l'on souhaite étudier. Nous présentons ici les résultats obtenus en combinant différentes méthodes de mesure (détaillées dans le chapitre III.B). Les courbes de pression obtenues pour une concentration en nucléosomes variant de 1 à environ 600 mg/ml et pour trois concentrations salines sont présentées sur la Figure VII-1.

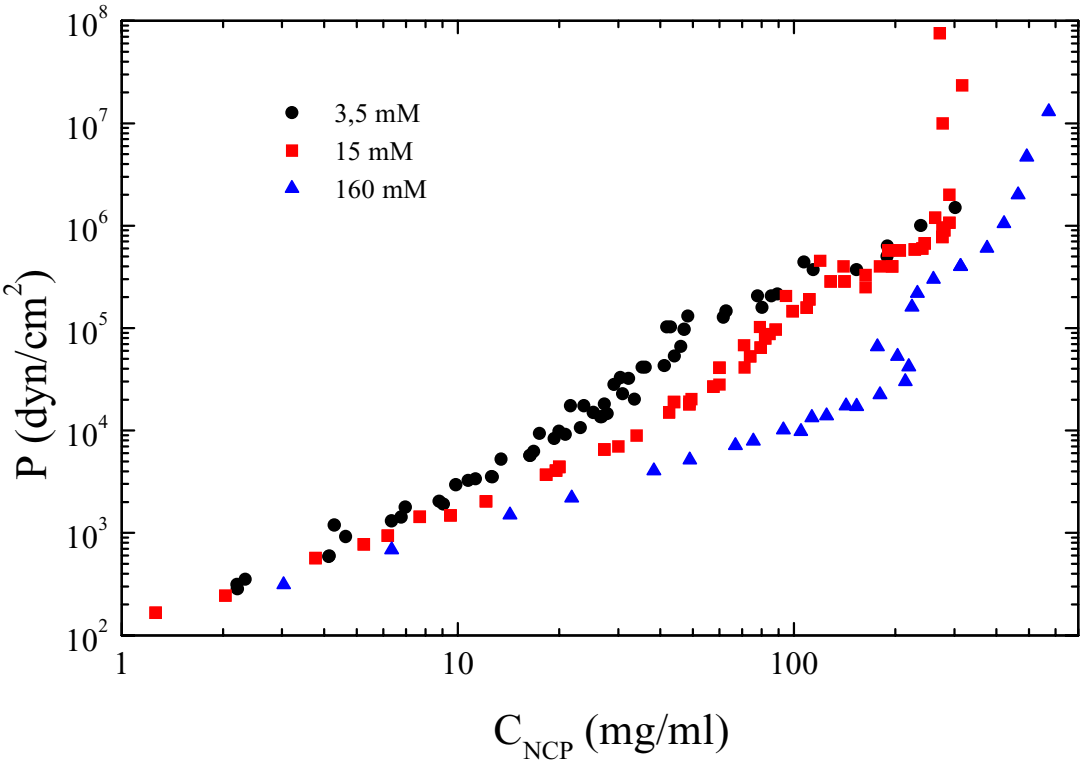


Figure VII-1 : Variation de la pression osmotique de la solution de NCP en fonction de la concentration en NCP, pour trois concentrations salines (3,5 mM ; 15 mM et 160 mM).

Différents comportements sont observés suivant les gammes des concentrations en sel et en particules. Pour les faibles concentrations en NCP, quelle que soit la concentration saline de la solution, la pression osmotique est gouvernée par les interactions entre particules. Ce comportement est celui que nous avons précédemment décrit dans l'étude des interactions à l'aide de l'osmomètre. Pour les faibles concentrations salines, et les concentrations en particules supérieures (comprises entre 100 et 200 mg/ml), les courbes se superposent,

montrant que la pression est indépendante de la concentration saline. On peut alors montrer que la pression est gouvernée par les contre-ions présents dans la solution.

Pour les fortes concentrations salines (160 mM) et pour une concentration en particules environ égale à 250 mg/ml, on note que l'augmentation de la pression osmotique de la solution provoque une diminution de la concentration en particules. Ce comportement peut être attribué à la formation de colonnes dans l'échantillon.

Pour les très fortes concentrations en particules, la pression osmotique de la solution est gouvernée par les forces d'hydratation dues au proche voisinage des particules.

VII.C Méthodes de préparation biochimique des NCP

VII.C.1 Préparation à partir de thymus de veau

VII.C.1.1 Préparation des noyaux

- A réaliser en chambre froide à 4°C ou sur de la glace
- Thymus de veau (100 à 200g) congelé par petits morceaux à -80°C. On peut également utiliser un thymus frais non congelé commandé le jour même à l'abattoir.
- Couper le thymus de veau en morceaux en éliminant la membrane qui recouvre les lobes et le gras.
- Mélanger les morceaux avec 500 ml de milieu d'homogénéisation (MOPS 50 mM, e-aminocaproic acide, KCl 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH 6,5) préalablement refroidi à 0°C.

- Ajouter 1 ml d'octanol et 1 ml de PMSF 0,1 M dans de l'isopropanol.
- Homogénéiser 5 mn à vitesse moyenne (mixeur 15000) ; puis augmenter la vitesse (17000 tours/min).
- Filtrer l'homogénat à travers deux couches de gaze prélavées avec de l'eau distillée puis le milieu d'homogénéisation + PMSF 0,5 mM. Changer la gaze quand nécessaire.
- Centrifuger la solution dans de grands flacons (250 ml) 15 min, 1500 g .
- Nettoyer les noyaux en les resuspendant deux fois dans 500 ml de Triton 0,5 % dans le milieu d'homogénéisation + 0,5 mM PMSF (5 ml dans 1 litre de milieu d'homogénéisation). Remettre le culot en suspension en agitant (pas trop vigoureusement).
- Répéter cette opération deux fois avec du milieu d'homogénéisation contenant 2 mM $CaCl_2$ + 0,5 mM PMSF (1,2 ml de $CaCl_2$ 2 M pour 1,2 litres de milieu d'homogénéisation).
- Resuspendre le culot final dans 100 ml de la solution précédente (sans le PMSF), ajustée à pH=8 avec du tampon Tris.

VII.C.1.2 Préparation de la chromatine

- Prééquilibrer la suspension de noyaux 10 min à 37°C.
- Ajouter 5000 unités de nucléase de micrococque et incuber 30 minutes à 37°C avec agitation.
- Pour arrêter la digestion, placer le flacon dans de la glace et ajouter 1 ml d'EGTA 0,5 M (pH 8) + 0,5 mM PMSF.
- Mélanger puis centrifuger 15 minutes à 1500 g.

- Resuspendre le culot dans 200 ml de "Saline EDTA" (NaCl 75 mM, EDTA 24 mM, pH 6,5) en agitant doucement.
- Centrifuger 15 minutes à 1500 g.

** Resuspendre le culot dans 200 ml d'EDTA 2 mM ajusté à pH = 6,5. Agiter avec un agitateur magnétique afin d'obtenir une solution homogène (minimum 15 minutes à 4°C).*

- Centrifuger 15 minutes à 16000 g.

*- Collecter le surnageant qui contient la chromatine.**

- Répéter de * à * plusieurs fois en gardant les surnageants à chaque fois.
- Stocker au fur et à mesure les différents surnageant à 0°C en ajoutant du PMSF 0,5 mM.
- À chaque fois, vérifier la concentration en ADN du surnageant (diluer 100 fois le surnageant dans du SDS 1 %). S'arrêter quand la concentration en ADN devient < 5 mg/ml).
- Estimer la quantité d'ADN récupérée.

VII.C.1.3 Extraction des protéines H1

- Diluer la chromatine dans EDTA 2 mM (pH 6,5) + PMSF 0,5 mM pour atteindre une concentration en ADN ≈ 3 mg/ml.
- Mesurer le volume final de la solution et ajouter petit à petit un volume adéquat de NaCl 2 M pour atteindre une concentration finale en NaCl de 50 mM.
- Ajouter 12,3 à 13 mg de CM-Sephadex 50-120 (Sigma) sec par mg d'ADN.
- Mélanger doucement et laisser au moins 1 heure à 4°C.
- Filtrer sous vide (trompe à eau, vide faible) :

Filtre: une épaisseur de toile à butée sur Büchner.

Conditions de rinçage et filtration: ajouter au mélange chromatine-Sephadex à filtrer 100 ml de solution de rinçage du Sephadex. Filtrer une première fois. Puis ajouter 100 à 150 ml de NaCl 0,6 M et filtrer une seconde fois.

Re-filtrer sur papier filtre Whatman GF/A Glass Microfibre pour éliminer les traces de Séphadex dans le filtrat.

- Mesurer la quantité d'ADN récupérée (DO_{260}). Si cette quantité est trop faible, recommencer l'opération.
- Ajouter PMSF pour obtenir une concentration de 0,5 mM.
- Vérifier la composition en histones de la chromatine par électrophorèse des protéines sur gel SDS (jamais de problèmes d'élimination des H1).

VII.C.1.4 Préparation de la fraction nucléosomes

- Ajouter 1/20ème de volume de Tris 200 mM, CaCl2 100 mM, pH = 8.

- Test de digestion enzymatique:

Déterminer le temps de digestion et la concentration en nucléase de microcoque (Pharmacia) pour obtenir une fraction de mononucléosomes.

Pour le test de digestion, utiliser 200 µg d'ADN par point temps à (5), 8, 11, 14, 17, 20, 25... minutes.

ATTENTION : Le PMSF présent dans la solution inhibe légèrement l'action de l'enzyme. Il faut donc parfois utiliser 3 u.e pour 100 µg d'ADN, pour obtenir une digestion optimale.

- Diluer la quantité d'enzyme nécessaire à la digestion de toute la chromatine (1, 2, 3, 4 u.e. pour 100 µg d'ADN) dans de l'eau distillée, à la concentration de 4000 ue/ml.

- Déterminer quel volume **V** de la solution contient 200 µg d'ADN.

- Stocker 10 tubes numérotés dans de la glace, chaque tube contenant un volume **V** de TBE (x1), EGTA 10 mM (pour atteindre ensuite une concentration finale en EGTA de 5 mM).

- Mettre au bain marie à 37°C 10 **V** de solution de chromatine (1000 µg).

- Ajouter la quantité d'enzyme nécessaire (20 ue = 10 µl) au temps t = 0, et vortexer.

- Prélever **1 V** à chaque temps test (10, 15, 20, ...) et le déposer dans un tube numéroté. Vortexer. Laisser dans la glace. Inutile de continuer le test au-delà 50 min.

- Extraire l'ADN dans chacun des 10 tubes (+ un tube témoin de chromatine non digérée):

- Électrophorèse de l'ADN des différents points test sur gel de polyacrylamide 7,5 %.

- Déterminer le temps de digestion optimal pour obtenir la population de NCP désiré.

- Digérer ensuite la totalité de la chromatine dans les mêmes conditions. Équilibrer au préalable la solution 10 minutes à 37°C. Arrêter la réaction en ajoutant EGTA 0,5 M pour atteindre une concentration finale en EGTA 5 mM, et plonger le récipient dans de la glace. Ajouter PMSF pour obtenir une concentration de 0,5 mM

- Dialyser la solution 1 nuit à 4°C contre 10 litres de NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,1 + 0,5 mM PMSF.
- Centrifuger la solution à 11000 g, 15 minutes. Récupérer le surnageant. La fraction précipitée (culot) peut être éliminée.
- Concentrer la solution par ultrafiltration à travers une membrane poreuse (Amicon YM 100) et sous pression d'azote (2 bars) dans une cellule à agitation (Amicon 8050 et 8400), jusqu'à obtenir une concentration en nucléosomes de l'ordre de 30 mg/ml (15 mg/ml d'ADN).
- Prélever la quantité de solution à déposer sur colonne. Mettre le reste de la solution à concentrer pour la journée dans une cellule Amicon, et rediluer le soir dans NaCl 150 mM, TE 10 mM + PMSF 0,5 mM. Prélever la solution de nucléosomes à déposer le lendemain sur la colonne. De cette façon, on laisse la concentration en isopropanol (contenu dans le PMSF) constante. Répéter cette opération chaque jour.

VII.C.1.5 Purification par filtration sur gel de Sephacryl S 300

- colonne de Sephacryl S 300 (Pharmacia) de 1 m de hauteur et 2,5 cm de diamètre, préalablement équilibrée dans NaCl 150 mM, TE 10 mM.
- Tampon d'élution : NaCl 150 mM, TE 10 mM, pH 7,6.
- Dégazer la solution avant dépôt sur colonne.
- Déposer 7-8 ml de la solution à la surface de la colonne, à une vitesse de 30 ml/h.
- Eluer à 20-25 ml/h. Volume des fractions 2 à 2,5 ml.
- Déterminer le profil d'élution par mesure de l'absorbance ($D0_{260}$, dilution 50).
- Vérifier la pureté de chaque fraction du pic principal par electrophorèse-retard sur gel de polyacrylamide 7,5 % (Détails, voir paragraphe VII.D.1).
- Regrouper les fractions correspondant aux mono-nucléosomes purs.
- Récupérer les fractions contenant des mono-nucléosomes + quelques di-nucléosomes et les réinjecter dans la solution à purifier.
- Filtrer la solution à travers un filtre millipore 0,22 μm, et ajouter 0.1 mM PMSF.
- Concentrer à 250 mg/ml par ultrafiltration sous pression d'azote.
- Stocker à 0°C.

Cette méthode permet d'obtenir 2 grammes de mono-nucléosomes purs.

VII.C.2 Préparation à partir de sang de poulet

VII.C.2.1 Collecte du sang

- A réaliser en chambre froide à 4°C, ou sur de la glace
- Saigner les poulets (en coupant la langue)
- Collecter un volume de sang de 100 ml (correspond à environ deux poulets de taille moyenne) dans 100 ml de tampon de lavage (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, Trisodium citrate 15 mM) + 30 unités d'héparine + 0,25 mM PMSF.
- Filtrer le sang sur 4 épaisseurs de gaze.
- Centrifuger à 1500 g pendant 3 minutes sans frein, et resuspendre le culot dans le tampon de lavage du sang. Répéter cette opération 3 fois.
- A cette étape, le culot de globule rouge peut être congelé à l'azote liquide, et conservé à –20°C.

VII.C.2.2 Préparation des noyaux

- Décongeler un volume V de culot de globules rouges, au bain-marie à 37°C.
- Ajouter très progressivement 10 V de tampon de lyse des noyaux (Tris 10 mM, NaCl 10 mM, NP40 0,5%, $MgCl_2$ 5mM, βmE 1 mM, PMSF 0,25 mM), en homogénéisant à la pipette pasteur de manière à obtenir une resuspension complète.
- Centrifuger à 1500 g pendant 3 minutes sans frein.
- Eliminer le surnageant avec précaution (pipette pasteur).
- Resuspendre le culot à la pipette pasteur dans du tampon de lavage des noyaux (Tris 10 mM, $MgCl_2$ 5mM, NaCl 75 mM, EDTA 0,2 mM, βmE 1 mM, PMSF 0,25 mM).
- Centrifuger à 1500 g pendant 3 minutes sans frein.
- Répéter cette opération deux ou trois fois pour obtenir un culot de noyaux de couleur rosé.
- Resuspendre le culot dans du tampon sucrose (Tris 15 mM, KCL 60 mM, NaCl 15 mM, βmE 15 mM, spermidine 0,5 mM, sucrose 0,345 M, EDTA 0,1 mM).
- Centrifuger à 1500 g pendant 3 minutes sans frein.
- Le culot de noyaux est blanc et peut être congelé et conservé à –20°C.

VII.C.2.3 Préparation de la chromatine longue

- Resuspendre le culot de noyaux (volume V) dans 4 V de tampon sucrose.

- Digestion à la nucléase de microcoque :

- Ajouter CaCl2 1 M pour une concentration finale de 1 mM.

- Ajouter Acétate d'Ammonium 2 M (1/100 V) pour une concentration finale de 20 mM

- Incuber 10 minutes à 37°C avec agitateur magnétique pour homogénéiser la température

- Ajouter 600 ue (nucléase Pharmacia, solution stock dans eau distillée à 2000 ue/ml)

- Incuber 15 minutes à 37°C. Arrêter la réaction en ajoutant EDTA pH 7,5 à 5 mM final et en refroidissant à 0°C (glace).

- Centrifuger à 4000 g, 10 minutes.

- Eliminer le surnageant S_0 (correspond à la chromatine acétylée) après estimation de la concentration en ADN

** Resuspendre le culot dans 1 à 2 V EDTA 1 mM, pH 7,5 (lyse des noyaux par choc osmotique). Homogénéiser à la pipette pasteur et au vortex. Centriguger à 4000 g, 10 minutes*

*Récupérer le surnageant S_1 qui contient la chromatine. Estimer la concentration en ADN (DO_{260}).**

Le rapport S_0/S_1 doit être compris entre 0,03 et 0,1.

- Répéter de * à * plusieurs fois.

- Récupérer les surnageants S_2, S_3, S_4 …. jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de chromatine ressolubilisée.

- Stocker au fur et à mesure les surnageants à 0°C, et ajouter dans chaque PMSF 0,1 mM.

- Regrouper les surnageants S_1 et suivants (jeter S_0). Estimer la quantité totale de chromatine.

VII.C.2.4 Elimination des histones H1

- Colonne de Sépharose CL 6B, Pharmacia de 50 cm de hauteur, 2,5 cm de diamètre préalablement équilibré dans NaCl 0,65 M; TE 10 mM pH 7,5.

- Tampon d'élution : NaCl 0,65 M; TE 10 mM pH 7,5; PMSF 0,1 mM; 0,5 mM βME.

- Concentrer la solution (cellule Amicon 8400 ou 8050), sous pression d'azote pour obtenir une concentration d'ADN de 12 mg/ml.
- Ajouter NaCl 4 M pour obtenir une concentration finale de 0,65 M (avec agitation magnétique forte).
- Dégazer la solution.
- Déposer 12 ml de solution de chromatine.
- Vitesse d'élution : 38 à 45 ml/h, volume des fractions 2 ml.
- Collecter immédiatement les fractions
- Déterminer le profil d'élution par mesure d'absorbance $D0_{260}$. La chromatine est éluée avec le volume mort.
- Regrouper les fractions contenant la chromatine longue sans H1.
- Vérifier l'élimination des H1 par électrophorèse sur gel (voir paragraphe VII.D.3).
- Dialyser contre Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 0,1 mM; PMSF 0,1 mM; β-mercapto 1 mM à 0-4 °C.

VII.C.2.5 Préparation de la fraction "Nucléosomes"

- Ajouter Acétate Ammonium 2 M, pour une concentration finale de 20 mM
- Ajouter CaCl2 1 M, concentration finale 3 mM
- Réaliser le test de digestion, la digestion et la purification sur gel Sephacryl dans les mêmes conditions que pour le thymus de veau.

VII.D Techniques d'électrophorèse

Toutes les électrophorèses que nous réalisons sont effectuées en utilisant des mini-gels (Bio-rad, mini protean II).

VII.D.1 Electrophorèse retard

Une fois le gel coulé et polymérisé, 2 pré-run de 30-45 minutes à 80 volts (10 volts/cm) sont effectués à 0°C dans le tampon de migration TBE (1X). (Il est possible de couler le gel la veille. Dans ce cas, il faut effectuer un premier pré-run le jour même et le second le lendemain). Après avoir mélangé la solution de NCP au tampon d'échantillon (1V NCP + 4V tampon), on dépose 0,1 à 0,4 µg de NCP par puits. La migration s'effectue à 0°C durant 3 heures à 80V (10 Volts/cm) dans du tampon de migration TBE (1X).

Lorsque la migration est terminée, les gels sont colorés au BET (immersion 1 à 3 minutes dans une solution de BET à 5 mg/ml). On enlève l'excès de BET en rinçant à l'eau. Le gel est alors révélé sous UV et photographié à l'aide d'un Polaroid avec un temps de pose de 3 à 4 secondes.

Composition gel polyacrylamide 7,5%

H_2O	4,14 ml
TBE (5X)	2 ml
Acryl/ bis acryl (19,74/0,26)	3,75 ml
Persulfate d'ammonium 10%	100 µl
Temed	10 µl

Tampon de migration TBE (5X)

Tris base	54 g
Acide boric	27,5 g
EDTA 0,5 M (pH8)	20 ml
H_2O	Qsp 1 litre

Tampon d'échantillon

Bleu bromophénol	0,01%
Xylène cyanol	0,01%
Glycérol 50% dans tampon désiré	

VII.D.2 Electrophorèse de l'ADN

VII.D.2.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des NCP se fait par ajout de 2 volumes de phénol à un volume de la solution de NCP et centrifugation à 11000g durant 2 minutes. L'ADN soluble dans le surnageant est prélevé. L'opération est réitérée avec un mélange phénol : chloroforme-alcool isoamyl (1 : 1) puis chloroforme-alcool isoamyl. L'ADN est ensuite précipité par ajout de $MgCl_2$ 10 mM et d'éthanol. Après 15 minutes à –20°C, l'ADN précipité est récupéré par centrifugation 5 minutes à 11000g. L'alcool est éliminé et les culots séchés sous vide. L'ADN est resolubilisé dans du TE à une concentration de 1 mg/ml.

VII.D.2.2 Gel de polyacrylamide

Une fois le gel coulé, il polymérise en moins d'une heure. La préparation des échantillons s'effectue en mélangeant 2 µl de la solution d'ADN (à 1 mg/ml), dans 5 µl de la solution de bleu et 23 µl de TBE (1X). 0,05 à 0,2 µg d'ADN est déposé dans chaque puits du gel. La migration s'effectue durant 15h à 65Volts. Après migration, le gel est coloré au BET 2 à 3 minutes, puis rincé à l'eau distillée. Le gel est révélé sous UV, et photographié à l'aide d'un polaroid 3 à 4 secondes (Diaphragme 5,6-8).

Composition du gel de polyacrylamide 12%

H_2O	2 ml
TBE (5X)	2 ml
Acryl/ bis acryl (19/1)	6 ml
Persulfate d'ammonium 10%	63,2 µl
Temed	10 µl

Composition du Bleu

EDTA 0,5M (pH8)	10 ml
Ficoll	10 g
Bleu de bromo	0,1 g
Xylène cyanol	0,1g
H_2O qsp	50 ml

VII.D.3 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

L'électrophorèse des protéines est faites en conditions dénaturantes. A cet effet, les échantillons sont incubés au bain-marie à 95°C durant 5 minutes et dilués à 1 mg/ml dans le tampon d'échantillon contenant du SDS à 10%.

Ce gel doit être coulé en deux parties. Il faut d'abord couler le gel de séparation (à 15%) en s'arrêtant 2 cm avant le haut de la plaque. On recouvre immédiatement le gel d'eau distillée pour que la surface reste plane lors de la polymérisation. Après polymérisation, l'eau distillée est éliminée, et on peut couler le gel de concentration (à 3%).

Après dépôt de 1 à 2,5 µg d'échantillon dans chaque puits, la migration s'effectue à 200V pendant 45 minutes. La coloration du gel s'effectue dans une solution de bleu de Coomassie 0,25% dans méthanol/acide acétique/eau (5V/1V/4V) durant 30à 45 minutes. La décoloration est réalisée durant 12 heures dans un mélange méthanol 30%/ acide acétique 10% (V/V). Les gels sont ensuite séchés.

Lower Tris (x4)

Tris	18,17 g
SDS 10%	4 ml
H_2O	qsp 100ml

Ajuster à pH 8,8 avec HCl concentré

Tampon d'échantillon

Glycérol	10 ml
βmE	5 ml
SDS 10%	30 ml
Upper Tris (x4)	12.5 ml
Bleu de bromo	0.5 ml
H_2O	qsp 100 ml

Tampon de migration (x10)

Tris	60 g
Glycine	112,6 g
SDS	10 g
H_2O	qsp 1litre

Gel de concentration polyacrylamide 3%

Upper Tris (x4)	0.83 ml
Acryl-bis acryl (37.5/1)	0.264 ml
Persulfate d'ammonium 10%	12.5 µl
Temed	4.16 µl
H_2O	2.22 ml

Gel de séparation polyacrylamide 15%

Lower Tris (x4)	2,5 ml
Acryl-bis acryl (37,5/1)	4 ml
Persulfate d'ammonium 10%	30 µl
Temed	2,5 µl
H_2O	3,46 ml

CHAPITRE VIII

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre VIII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams M., Dogic Z., Keller S.L. et Fraden S. (1998), Entropically driven microphase transitions in mixture of colloidal rods and sphere, *Nature* **393**, 349-352.

Adams M. et Fraden S. (1998), Phase behavior of mixture of rods (Tobacco Mosaic Virus) and sphere (Polyethylene oxide, Bovine serum albumin), *Biophys J.* 74, 669-677.

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

Arents G., Burlingame R.W., Wang B., Love W.E. et Moudrianakis E.N. (1991), The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148-10152.

Ausio J., Seger D. et Eisenberg H. (1984), Nucleosome core stability and confomational change. Effect of temperature, particle and NaCl concentrations, and crosslinking of histone H3 sulfhydryl groups, *J. Mol. Biol*. **176**, 77-104.

Ausio J. et Van Holde K.E. (1986), Histone hyperacetylation : its effects on nucleosome conformation and stability, *Biochemistry* **25**, 1421-1428.

Ausio J., Dong F. et Van Holde K.E. (1989), Use of selectively trypsinized nucleosome core particle to analyse the role of the histone “tails” in the stabilization of the nucleosome. *J. Mol. Biol.* **206**, 451-463.

Ausio J. (2000), Analytical ultracentrifugation and characterization of chromatin Structure, *Biophys. Chem.* **86**, 141-153.

Ballestar E. et Franco L. (1997), Use of transglutaminase reaction to study the dissociation of histone N-terminal tails from DNA in nucleosome core particles, *Biochemistry* **36**, 5963-5969.

Ballestar E., Boix-Chornet M., et Franco L., (2001), Conformational changes in the nucleosome followed by the selective accessibility of histone glutamines in the transglutaminase reaction : effetcts of ionic strength, *Biochemistry* **40**, 1922-1929.

Baneres, J.L., Martin, A., et Parello J. (1997), The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J. Mol. Biol.* **273**, 503-508.

Belloni L. (1982), Thèse de l'université P.M. Curie Paris VI, Interactions électrostatiques dans les solutions aqueuses de polyelectrolytes.

Belloni L. (1998), Ionic condensation and charge renormalization in colloidal suspension, *Colloids and surfaces A* **140**, 227-243.

Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I. (1996), Nucleic acid : structures, properties and functions, University science Books.

Bonneté F., Vivarès D., Robert C. et Colloc'h C. (2001), Interactions in solution of a large oligomeric protein, *J. Crystal. Growth* **196**, 210-219.

Braddock G.W., Baldwin J.P.et Bradbury E.M. (1981), Neutron-Scattering of the Structure of the Chromatin Core Particles in Solutions, *Biopolymers* **20**, 327-343.

Brandes R. et Kearns D.R. (1988), ^{2}H NMR of DNA liquid Crystals: Structural and dynamical aspects, *J. Phys. Chem*. **92**, 6836-6841.

Budayova M., Bonneté F., Tardieu A.et Vachette P. (1999), Interactions in solution of a large oligomeric protein. *J. Crystal. Growth* **196**, 210-219.

Burgoyne L.A. et Skinner J.D. (1982), Avian erythrocyte chromatin degradation : The progressive exposure of the dinucleosomal repeat by bovine-pancreatic Dnase-I armed probed and free DNAse-I, *Nucleic Acids Res.* **10**, 665-673.

Burlingame R.W., Love W.E., Moudrianakis E.N. (1983), Crystals of the Octameric Histone Core of the Nucleosome, *Science* **223**, 413-416.

Busson B. et Doucet J. (2000), Distribution and interference function for two-dimensional hexagonal paracrystals, *Acta Cryst.* **A56**, 68-72.

Cantor C.R. et Schimmel P.R. (1980), Biophysical chemistry, Part III The behavior of biological macromolecules, p 1010-1013, editeur W.H. Freeman and compagny (New-York)

Cary P.D., Moss T., Bradbury E.M. (1978) High resolution proton-magnetic resonance studies of chromatin core particles *Eur. J. Biochem*. **89**, 475-482.

Clark D.J. et Kimura T. (1990), Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J. Mol. Biol.* **211**: 883-896.

Cremer T. et Cremer C. (2001), Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells, *Nature reviews Genetics* **2**, 292-300.

Cui Y. et Bustamante C. (2000), Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure, *Proc. Nat. Am. Soc*. **97**, 127-132.

Czarnota G.J. et Ottensmeyer F.P. (1996), Structural states of the nucleosome, *J. Biol. Chem*. **271**, 3677-3683.

Daban et Bermudez, (1998), Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers, *Biochemistry* **37**, 4299-4304

Daban (2000), Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochemistry* **39**, 3861-3866.

Debye P. (1947), *J. Phys. Colloid. Chem:* **51**, 18-32.

de Frutos M., Raspaud E., Leforestier A., Livolant F. (2001), Aggregation of nucleosomes by divalent cations, *Biophys. J.* **81**, 1127-1132.

Desruisseaux C., Long D., Drouin G. et Slater G.W. (2001), Electrophoresis of composite molecular objects, relation between friction, charge and ionic strength in free solution, *Macromolecules* **34**, 44-52.

De Vries A. (1970), X-ray Photographic studies of liquid crystal, I. A cybotactic nematic phase, *Mol. Cryst. And Liq. Cryst.* **10**, 219-236.

De Vries R. (2001), Flexible polymer-induced condensation and bundle formation of DNA and F-actin filaments, *Biophys. J.* **80**, 1186-1194.

Dogic Z., Frenkel D., Fraden S. (2000), Enhanced stability of layered phases in parallel hard spherocylinders due to addition of hard spheres, *Phys. Rev. E.* **62**, 3925-3933.

Dong F., Nelson C. et Ausio J. (1990), Analysis of the change in the structure and hydratation of the nucleosome core particle at moderate ionic strengths, *Biochemistry* **29**, 10710-10716.

Dubochet J. et Noll M. (1978), Nucleosome arc et helices, Science 202, 280-286.

Dubuisson J.M., Decamps T. et Vachette P. (1997), Improved signal to background ratio in small angle X-ray scattering experiments with synchrotron radiation using an evacuated cell for solution, *J. Appl. Cryst*. **30**, 49-54.

Ducruix A., Guilloteau J.P., Riès-Kautt M. et Tardieu A. (1996), Protein interaction as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. *J. Cryst Growth* **168**, 28-39.

Kajkus J. et Trifonov E.N. (2001), Columnar packing of telomeric nucleosome, *Biochem Biophys Res Commun*. **280**, 961-963.

Fetler L., Tauc P., Hervé G., Moody M.F. et Vachette P. (1995) X-ray scattering titration of the structure transition of aspartate transcarbamylase with a bisubstrate analogue. Influence of nucleotide effectors, *J. Mol. Biol*. **251**, 243-255.

Fletcher T.M. et Hansen J. (1995), Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanism, *J. Biol. Chem.* **270**, 25359-25362.

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

Finch J.T. et Klug A. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-1901.

Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Lewitt M. et Klug A. (1977), Structure of nucleosome core particles of chromatin, *Nature* **269**, 29-36.

Finch J.T. et Klug A. (1978), X-ray and electron microscope analyses of crystal of nucleosome cores, *Cold Spring harb. Sym. Quant. Biol.* **42**, 1-9.

Finch J.T., Lewit-Bentley A., Bentley G.A., Roth M. et Timmins P.A. (1980), Neutron Diffraction from Crystals of Nucleosome core particle, *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. *B* **290**, 635-638.

Finch J.T., Brown R.S., Rhodes D., Richmond T., Rushton B., Lutter L.C. et Klug A. (1981), X-ray diffraction study of a new crystal form of the nucleosome core showing higher resolution, *J. Mol. Biol*. **145**, 757-769.

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

Guinier A. (1956), Théorie et technique de la radiocristallographie, Dunod, Paris.

Guinier, A. et Fournet G. (1955), Small Angle Scattering of X-Rays, Wiley, New York.

Greulich K.O., Ausio J., Eisenberg H., (1985), Nucleosome core particle structure and structural changes in solution, *J. Mol. Biol.* **186**, 167-173.

Grunstein M. (1990), Nucleosomes: regulators of transcription, *Trends Genet*. **10**, 5721-5727.

Harp J.M., Hanson B.L., Timm D.E. et Bunick G.J. (2000), Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5Å resolution, *Acta Cryst*. D**56**, 1513-1534.

Hewish D.R. et Burgyone L.A. (1973), Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at the regulatory spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 504-510.

Hilliard P.R., Smith R.M., Rill R.L. (1986) Natural abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of histone and DNA dynamics in nucleosome cores, *J. Biol. Chem* **261**, 5992-5998.

Hjelm R.P., Kneale G.G., Suau P., Baldwin J.P. et Bradbury E.M. (1977), Small Angle Neutron Scattering Studies of Chromatin Subunits in Solution, *Cell* **10**, 139-151.

Hückel E.(1924), *Phys Z.***25**, p 204.

Huong L., Schroth G.P., Matthews H.R., Yau P. et Bradbury E.M. (1993), Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus, *J. Biol. Chem*. **261**, 305-314.

Hsu J.Y. et al (2000), Mitotic phosphorilation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphate in budding yeast and nematodes, *Cell* **102**, 279-291.

Imaï B.S., Yau P., Baldwin J.P., Ibel K., May R.P. et Bradbury E.M. (1986), Hyperacetylation of core histones does not cause unfolding of nucleosome, *J. Biol. Chem* **261**, 8784-8792.

Inoko Y., Yamamoto M., Fujiwara S., et Ueki T. (1992), X-ray scattering study of the shape of the DNA region in nucleosome core particle with synchrotron radiation. *J. Biochem*. **111**: 310-316.

Israelachvili J.M., (1982), Advances in colloid and interface science **16**, 31-47.

Israelechvili, (1992), Intermolecular and surface force, Academic Press, San Diego.

Katchalsky A., Alexandrowicz O. et Koden O. (1966), Chemical physics of ionic solution, ed Conway B.E. and Barradas R.G. (Wiley), 295.

Khrapunov S.N., Dragan A.I., Sivolob A.V. et Zagariya A.M. (1997), Mechanisms of stabilizing nucleosome structure. Study of dissociation of histone octamer from DNA, *Biochimica et Biophysica Acta* **1351**, 213-222.

Kirste R.G. et Oberthür R.C. (1982), Synthetic Polymers in Solution. In *Small Angle X-ray Scattering* (Glatter 0. Et Kratky O. eds), p 387-431. Academic Press, London, New-York.

Klug A., Rhodes D., Smith J., Fincj J.T., Thomas J.O. (1980), A Low Resolution Structure for the Histone Core of the Nucleosome, *Nature* **287**, 509-516.

Kornberg R.D. (1974), Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histone and DNA, *Science* **184**, 868-871.

Kornberg R.D. (1977), Structure of chromatin, *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 931-954.

Kornberg R.D. et Lorch Y. (1999), Twenty-five year of the nucleosome fundamental particule of the eukaryote chromosome, *Cell* **98**, 285-294.

Kunze K.K. et Netz R.R. (2000), Salt induced DNA-histones Complexation, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 4389-4392.

Leforestier A. et Livolant F. (1997), Liquid crystalline ordering of nucleosome core particle under macromolecular crowding conditions: evidence for a discotic columnar hexagonal phase, *Biophys. J.* **73**, 1771-1776.

Leforestier A., Fudaley S., Livolant F. (1999), Spermidine-induced aggregation of nuclzosome core particles : evidence for multiple liquid crystalline phases, *J. Mol. Biol*. **290**, 481-494.

Leforestier A., Dubochet J., Livolant F. (2001), Bilayers of Ncucleosome core particle, *Biophys J*. **81**, 2414-2421.

Lerman L.S. (1971), A transition to a compact form of DNA in polymer solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1886-1890.

Libertini L.J., Van Holde K.E. et Small E.W. (1988), Histone hyperacetylation. Its effects on nucleosome core particle transition, *Biophys. J.* **53**, 477-487.

Livolant F. et Leforestier A. (2000), Chiral Discotic Columnar Germs of Nucleosome Core Particle, *Biophys. J.* **78**, 2176-2729.

Lüger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997), Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution, *Nature* **389**, 251-260.

MacDowall A.W., Smith J.M., Dubochet J. (1986), Cryoelectron microscopy of vitrified chromosomes in situ, *EMBO J.* **5**, 1395-1402.

Malfois M., Bonneté F., Tardieu A. et Belloni L. (1996), A model of attractive interactions to account for liquid-liquid phase separation of protein solution, *J. Chem. Phys*. **105**, 3290-3300.

ManiatisT., Fritsch E.F. et Smabrook J. (1982), Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory.

Manning G.S. (1969), Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solution, *J. Chem. Phys.* **51**, 924-934.

Minton A.P. (1981), Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity, *Biopolymers* **20**, 2093-2110.

Moore S.C. et Ausion J. (1997), Major role of the histone H3-H4 in the folding of the chromatin fiber, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **230**, 136-139.

Muschol M. et Rosenberger F. (1995), Interactions in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions : static and dynamic light scattering results. *J. Chem. Phys*. **103**, 10424-10432.

Mutskov V., gerber D., Angelov D., Ausio J., Workman J., et Dimitrov S. (1998), Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding, *Mol. Cell*. **18**, 6293-6304.

Noll M. (1974), Subunit structure of chromatin, *Nature* **251**, 249-251.

Nicolai Y. et Mandel M. (1989), Ionic Strength of the Second Virial Coefficient of Low Molar Mass DNA Fragments in Aqueous Solution, *Macromolécules* **22**, 438-444.

O'Brien R.W. et White L.R. (1978), Electrophoretic Mobility of a Spherical Colloidal Particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans*. **II 74**, 1607-1626.

Odijk T. (2000), Depletion theory of protein transport in semi-dilute polymer solution, *Biophys. J.* **79**, 2314-2321.

Olins A.L. et Olins D.E. (1974), Spheroid chromatin units (v bodies), *Science* **183**, 330-332.

Oliva R., bazett-Jones D.P., Locklear L. et Dixon G.H. (1990), Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle, *Nucleic Acids Res*. **18**, 2739-2747.

Oosawa F. (1971), Polyelectrolytes, ed. M.Dekker, New-York.

Orphanides G. et Reinberg D. (2000), RNA polymerase II elongation through chromatin, *Nature* **407**, 471-475.

Ortega F., Bacaloglu R., McKenzie D.C., Bunton C.A., et Nicoli D.F. (1990), Static and dynamic light scattering study of strongly interacting micelles: hypernetted chain vs dilute gas approximation, *J. Phys. Chem*. **94**, 501-504.

Paulson J.R. (1988), Chromosomes and chromatin, C.R.C. press, Boca Raton, F.L., Vol III, 3-36.

Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N.L., Rau D.C. (1986), Osmotic stress for the direct measurement of intermolecular forces, *Methods Enzymol*. **127**; 400-416.

Pérez J., Vachette P., Russo D., Desmadril M. et Durand D. (2001), Heat induced Unfolding of Neocarzinostatin, a small all-beta protein investigated by small-angle x-ray scattering. *J. Mol. Biol.,* **308**, 721-743.

Petsev D.N. et Vekilov P.G. (2000), Evidence for non-DLVO hydratation interactions in solutions of the protein apoferritin. *Phys. Rev. Lett*. **84**, 1339-1342.

Ramanathan G.V. (1988), Counterion condensation in micellar and colloidal solution, J. Chem. Phys. 88, 6- .

Raspaud E., da Conceiçao M., Livolant F. (2000), Do free DNA conterions control the osmotic pressure, *Phys. Rev. Lett*. **84**, 2533-2536.

Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D. et Klug A. (1984), Structure of nucleosome core particle at 7Å resolution, *Nature* **311**, 532-537.

Richmond T.J., Searles M.A. et Simpson R.T. (1998), Crystal of a nucleosome core particle containing defined sequence DNA, *J. Mol. Biol*. **199**, 161-170.

Robzyk K., Recht J. et Osley M.A. (2000), Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast, *Science* **287**, 501-504.

Rodriguez-Carjaval J. et Roisnel T. FullProf 98 and winPLOTR: New windows 95/NT for diffraction, *Newsletter* **20**.

Roisnel T. et Rodriguez-Carjaval J. (1998), a Windows tool for powder diffraction patterns analysis, *Materials Science Forum, Proceedings of the European Powder Diffraction Conference* (*EPDIC* **7**), in press.

Roussel A; et Cambillau C. (1989). Dans *Silicon Graphics Geometry Partners Directory* 86 (Silicon Graphics, Mountain View, CA.).

Shkel I.A., Tsodikov O.V. et Record M.T. (2000), Complete asymptotic solution of cylindrical and spherical Poisson-Boltzmann equation at experimental salt concentrations, *J. Phys. Chem.* **104**, 5161-5170.

Smith R.M. et Rill R.L. (1989) Mobile histone tails in nucleosome, *J. Biol. Chem*. **264**, 10574-10581.

Stigter D. et Hill T.L. (1959), Theory of the Donnan membrane equilibrium. Calculation of the osmotic pressure and of the salt distribution in a Donnan system with higly charged colloid particles, *J. Chem. Phys*. **63**, 551-556.

Strahl B.D., Ohba R., Cook R.G. et Allis C.D. (1999), Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14967-14972.

Struck M.M., Klug A., Richmond T.J. (1992), Comparaison of X-ray structures of the nucleosome core particle in two different hydration states

Svergun D.I., Semenyuk A.V. et Feigin L.A. (1988), Small-Angle-Scattering-Data Treatment by the Regularization Method, *Acta Cryst* A**44**, 244-250.

Svergun D.I. (1992), Determination of the regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J. Appl. Cryst*. **25**, 495-503.

Svergun D.I., Barberato C., et Koch M.H.J. (1995), CRYSOL -a program to evalute X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst* **28**, 768-773.

Tatchell K. et Van Holde K.E. (1977), Reconstitution of chromatin core particles, *Biochemistry* **16**, 5295-5303.

Tatchell K. et Van Holde K.E. (1979), Nucleosome reconstitution : effect of DNA length on nuclesome structure. *Biochemistry*.**18**, 2871-80.

Tardieu A., Vérétout F., Krop B. et Slingsby C. (1992), Protein interactions in the calf eye lens : interactions between β-crystallins are repulsive whereas in γ-crystallins they are attractive. *Eur. Biophys. J.* **21**, 1-12.

Tardieu A., LeVerge A., Malfois M., Bonneté F., Finet S., Riès-Kautt M. et Belloni L. (1999), Proteins in solution : from X-ray scattering intensities to interaction potentials. *J. Cryst Growth* **196**, 193-203.

Thoma F., Koller T. et Klug A. (1979), Involvement oh histone h1 in the organisation of the nucleosome and of salt dependent superstructure of chromatin, *J. Cell. Biol.* **83**, 403-427.

Timasheff S.N. (1998), In disperse solution, "osmotic stress" is a restricted case of preferential interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7363-7367.

Todd R.D. et Garrard W.T. (1977), Two-dimensional electrophoretic analysis of polynucleosomes, *J Biol Chem*. **252**, 4729-4738.

Travers A. (1999), Chromatin modification by DNA tracking*, Proc. Nat. Acad. Soc.* **96**, 13634-13637.

Vainshtein (1966), Diffraction of X-ray by chain molecules, Elsevier publishing compagny, Amsterdam.

Van Holde K.E. (1988), Chromatin. Springer Series in Molecular Biology, editor A. Rich Springer Verlag, New York.

Van Holde K., Zlatanova J. (1995) Chromatin higher order structure : chasing a mirage? *J. Biol. Chem*. **270**, 8373-8376.

Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R., Matsuzawa Y. et Yoshikawa K. (1995), Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions, *J. Chem. Phys.* **102**, 6595-6602.

Verwey E.J.W. et Overbeek J.Th.G. (1948), theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier, Amsterdam.

Vogelauer M., Wu J., Suka N. Et Gstein M. (2000), Global histone acetylation and deacetylation in yeast, *Nature* **408**, 495-498.

Walker I.O. (1984), Differential dissociation of histone tails from core chromatin, *Biochemistry* **23**, 5622-5628.

Watson J.D. et Crick F.H.C. (1953), Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribonucleic acid, *Nature* **171**, 964-967.

White C.L., Suto R.K. et Luger K. (2001), Structure of the yeast nuclesome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions, *EMBO J.* **20**, 5207-5218.

Widom J. (1986), Physicochemical studies of the folding of the 100Å nucleosome filament into the 300Å filament, *J. Mol. Biol.* **190**, 411-424.

Widom J. (1998), Structure, dynamics anf function of chromatin in vitro, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **27**, 285-327.

Williams S.P., Athey B.D., Muglia L.J., Schappe R.S., Gough A.H. et Langmore J.P. (1986), Chromatin fibers are left-handed double helice with diameter and mass per unit length that depend on linker length, *Biophys. J.* **49**, 233-248.

Woodcock C.L.F., Frado L.-L.Y. et Rattner J.B. (1984), The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical arrangement, *J. Cell. Biol.* **99**, 42-52.

Wolfe A. (1995), Chromatin: Structure and Function, Academic Press, London.

Yager T.D., McMurray C.T. et van Holde K.E. (1989), Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles. *Biochemistry* **28**, 2271-2281.

Zhulina E.B., Borisov O.V., van Male J. et Leermakers F.A.M. (2001), Adsorption of tethered polyelectrolytes onto oppositely charged solid-liquid interfaces, *Langmuir* **17**, 1277-1293.

Zimm, B.H. (1948), The Scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.* **16**: 1093-1116.

Zimmerman S.B. et Minton A.P. (1993), Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. **22**, 27-65.