

Peigner de l'ADN pour étudier les interactions polysaccharide-protéine

Régis Daniel, Bérandère Tissot, Christophe Place et Zoher Gueroui

Résumé

De nouvelles méthodologies d'observation et de manipulation de molécules uniques sont apparues ces dernières années, principalement appliquées jusqu'à présent aux protéines et aux acides nucléiques et à la compréhension de leurs interactions. Ces méthodes ouvrent également de nouvelles perspectives pour l'étude des polysaccharides et de leurs propriétés d'interaction. Les techniques de peignage moléculaire de l'ADN, qui permettent d'aligner et d'observer des molécules individuelles d'ADN fluorescent, ont été utilisées pour caractériser la liaison de la protéine C1q à l'ADN. C1q est une protéine du système du complément dont la liaison à certaines molécules, immunes ou non immunes comme l'ADN, déclenche l'activation de ce système de défense immunitaire innée. C1q est également la protéine cible de l'activité anticomplémentaire du fucoïdane, un polysaccharide sulfaté extrait principalement d'algues brunes. Ce polysaccharide est capable de bloquer très efficacement certaines cascades biologiques de mammifères comme celles de la coagulation et du système du complément, ce qui peut être exploité dans la perspective d'applications thérapeutiques. La visualisation de l'interaction protéine/ADN et des expériences de compétition avec le polysaccharide ont permis de mieux comprendre l'interaction du polysaccharide avec C1q, et ainsi de progresser dans la connaissance du mécanisme anticomplémentaire du fucoïdane.

Mots-clés

Système du complément, peignage moléculaire, molécule unique, polysaccharide, ADN, microscopie de fluorescence.

Abstract

Studying carbohydrate-protein interaction using DNA combing

During the past few years, new methodologies to observe and manipulate single molecule have emerged. The first experiments mainly dealt with the manipulation of nucleic acids and proteins and the delineation of their interactions. However, the idea of single molecule handling has spread over the glycan-related field of interest. Indeed circumventing the complexity to study mixtures of isomeric polysaccharides by precisely looking at a single polysaccharide chain was considered as a potent breakthrough in the structural characterization of those molecules and of their interactions. The possibility to comb single strands of fluorescent DNA, i.e. to stretch them on a surface, and to observe fluorescent proteins interacting with them has been used to understand how the complement system C1q protein interacts with DNA. In physiological conditions, this C1q-DNA interaction triggers the complement classical pathway. Besides, C1q also interacts with fucoidan, a sulphated polysaccharide extracted from brown seaweeds. This interaction results in the inhibition of C1q functionality. The observation of C1q-DNA interaction in combination with competition assays with fucoidan allowed to delineate the mechanisms by which fucoidan exerts its anti-complementary activity.

Keywords

Complement system, molecular combing, single molecule, polysaccharide, DNA, fluorescence microscopy.

Les glucides – oligosaccharides des glycoprotéines, glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire, polysaccharides extraits de sources animales et végétales – sont maintenant reconnus pour leurs activités biologiques dépassant la simple fonction de molécules structurales ou de réserve. Les glycoconjugués sont ainsi parties prenantes de nombreux processus biologiques – communication, différenciation et développement cellulaire, infection bactérienne et virale, cancérogenèse – impliquant des phénomènes de reconnaissance moléculaire entre un glucide et une protéine cible ou un récepteur. Une meilleure connaissance des complexes glucide/protéine est nécessaire pour comprendre les règles gouvernant cette reconnaissance et les mécanismes d'assemblage de ces complexes non covalents.

De nouvelles méthodologies d'observation et de manipulation de molécules uniques sont apparues ces dernières années, développées par des équipes à l'interface de la physique et de la biologie. Appliquées essentiellement aux

protéines et aux acides nucléiques et à la compréhension de leurs interactions, ces méthodes ouvrent également de nouvelles possibilités pour l'étude des polysaccharides, de leurs organisations supramoléculaires et de leurs propriétés d'interaction [1]. Parmi ces méthodes, citons l'utilisation de pinces optiques ou magnétiques, de microaiguilles ou de pointes de microscope à force atomique pour micromanipuler des macromolécules greffées sur des billes micrométriques et des surfaces [2]. Ces molécules sont ensuite observées par microscopie optique ou de fluorescence ou par microscopie à force atomique (AFM). Ces observations sont basées sur la visualisation d'objet micrométrique (par exemple des billes de polystyrène) ou de fluorophores nanométriques (nanocristaux semi-conducteurs, fluorophores organiques) couplés de façon covalente aux biomacromolécules [3]. Ces méthodes permettent d'extraire un comportement individuel d'une population de macromolécules en interaction. Ainsi le comportement d'une

macromolécule, plutôt que défini statistiquement, est défini comme une probabilité de comportement. Nous avons exploité l'une de ces méthodes consistant en un peignage moléculaire de brins individuels d'ADN sur une surface pour sonder les propriétés d'interaction d'un polysaccharide bioactif, le fucoidane, avec la protéine C1q du système du complément (voir encadré).

Le système du complément

Le complément est une cascade biologique comprenant plus d'une trentaine de protéines solubles et membranaires assurant notre défense immunitaire innée. Cette immunité dite naturelle est déclenchée de façon immédiate et locale lors d'agression microbienne, en présence d'allergène, lors de traumatismes tissulaires causés par des agents chimiques ou physiques, et de processus auto-immunitaires. Le système du complément permet ainsi l'élimination des complexes antigène/anticorps, la neutralisation des virus et la destruction des microorganismes. Il intervient aussi dans la réaction inflammatoire et la régulation de la réponse immunitaire.

Ce système peut être activé selon trois voies qui conduisent à la liaison covalente de protéines du complément à la surface microbienne : la voie alternative est déclenchée directement par des composants des surfaces bactériennes, la voie des lectines est activée par la liaison de la protéine MBP aux protéoglycannes des enveloppes des bactéries qui contiennent du mannose, et la voie classique est déclenchée par la reconnaissance par la protéine C1q d'anticorps liés à des antigènes de surface microbienne. Ces voies aboutissent à la formation du complexe d'attaque membranaire qui est un pore perçant la membrane et conduisant à la lyse cellulaire.

Ce système doit être régulé efficacement car il est très performant et donc potentiellement dangereux. Un dysfonctionnement de la régulation du complément entraîne des situations pathologiques (lupus, glomérulonéphrite).

Nous décrivons dans un premier temps le peignage moléculaire de l'ADN et l'observation des molécules individuelles ainsi immobilisées. Étudiant le mécanisme d'inhibition du système du complément par le polysaccharide sulfaté fucoidane et l'interaction du fucoidane avec la protéine C1q de ce système biologique, nous avons montré que la protéine C1 est aussi capable d'interagir et de se lier à l'ADN. Puis nous décrivons comment nous avons exploité cette propriété de liaison de C1q à l'ADN pour immobiliser la protéine le long des brins d'acide nucléique alignés – peignés – individuellement sur une surface. Enfin, nous exposerons comment la visualisation de l'interaction protéine/ADN permet alors de rendre compte, par des méthodes de compétition avec le fucoidane, de l'interaction du polysaccharide et de C1q.

Observation de molécules uniques d'ADN peigné

Une molécule d'ADN double brin de plusieurs milliers de paires de bases adoptent une conformation de pelote fluctuante en solution (la longueur de persistance, que l'on peut voir en première approximation comme un segment rigide de la molécule, est de l'ordre de 50 nm (150 bp)). Une telle pelote, marquée par des intercalants fluorescents, apparaît comme un amas lumineux en observation par microscopie de fluorescence (figure 1). Il est alors impossible de distinguer la position d'une protéine le long de cet ADN. Cette observation est toutefois possible sur une molécule d'ADN étiré. Différentes méthodes d'étirement de l'ADN ont été décrites, basées sur la micromanipulation *via* des pinces

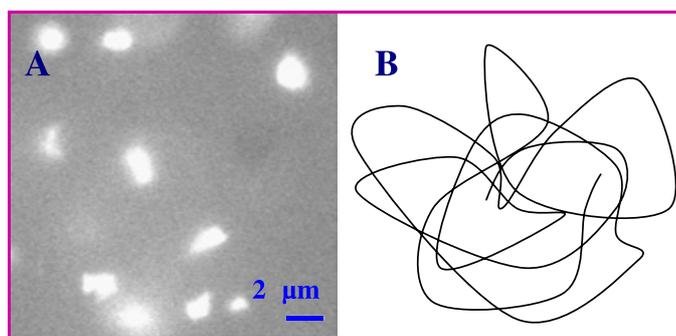


Figure 1 - ADN en solution.

A : image par microscopie de fluorescence de pelotes d'ADN du bactériophage T2 marquées par l'intercalant fluorescent YOYO-1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 491/509$ nm) en diffusion libre en solution aqueuse (microscope inversé Leica DMIRBE, lampe au mercure 100 W, objectif X63 à immersion, cube de filtre Leica I3, longPass 515 nm, caméra Hamamatsu C4880, temps d'acquisition 250 ms). La structure interne de l'ADN fluctuant en solution (B) ne peut être résolue spatialement par microscopie optique.

mécaniques, optiques ou magnétiques [2], sur l'élongation dans un fluide en circulation [4] ou par effet diélectrique [5], ou sur le peignage moléculaire [6]. Le peignage moléculaire de l'ADN est une technique attrayante car elle permet l'observation directe et simultanée d'un grand nombre de molécules d'ADN étiré et aligné. L'ADN peigné sur des surfaces solides est alors un substrat idéal car l'ADN est aligné le long de la surface, ce qui permet d'envisager d'observer une seule molécule d'enzyme sur un « rail » d'ADN sans être gêné par les fluctuations browniennes. Le système permet alors l'observation en parallèle d'un grand nombre d'objets individualisés (de l'ordre de 10^2 dans le champ d'observation du microscope) en vue d'établir un comportement statistique des molécules étudiées.

Le principe du peignage moléculaire de l'ADN est le suivant : un brin d'ADN est fixé par l'une de ses extrémités en solution sur une surface hydrophobe dans des conditions définies de pH (typiquement pH 5,5 pour des surfaces de verres traités par des trichlorosilanes aliphatiques). Puis la surface de verre est retirée de la solution de sorte qu'au passage du ménisque air-eau, le brin d'ADN se trouve étiré le long de la surface. L'origine de la force exercée durant le peignage n'est pas de nature hydrodynamique, mais résulte des forces capillaires dues à la tension de surface de l'eau. Nous avons pu montrer qu'en diminuant la tension de surface (par addition de l'alcool aliphatique 1-dodécanol), la force exercée est moins importante et permet un peignage sans sur-extension de l'ADN [7]. L'ADN peigné présente le long de sa structure des points d'ancrage avec la surface qui le stabilisent et permettent sa réhydratation pour étudier son interaction avec des protéines en solution (figure 2).

Depuis sa découverte, le peignage moléculaire de l'ADN a été appliqué avec succès pour l'identification de régions d'ADN génomique spécifique par une stratégie d'hybridation *in situ* de sonde fluorescente (FISH), pour la cartographie physique du génome ou pour la localisation des origines de réplifications chez les organismes eucaryotes [8]. Nous avons montré également que le fonctionnement d'une enzyme peut être observé sur de l'ADN peigné dans certaines conditions de peignage [7] (contrôle du sur-étirement et du nombre de points de fixation à la surface). Nous avons ainsi observé, par microscopie de fluorescence, l'activité de transcription de l'ARN polymérase du phage T7 sur de l'ADN fixé linéairement par peignage moléculaire le long d'une surface.

Les pelotes d'ARN produites (marquage de l'ARN en cours de synthèse par incorporation de nucléotides fluorescents) sont alors clairement identifiables le long de l'ADN étiré (figure 3).

Interaction entre C1q et les molécules uniques d'ADN peigné

Les propriétés de liaisons de C1q à l'ADN permettent d'envisager de visualiser directement le complexe

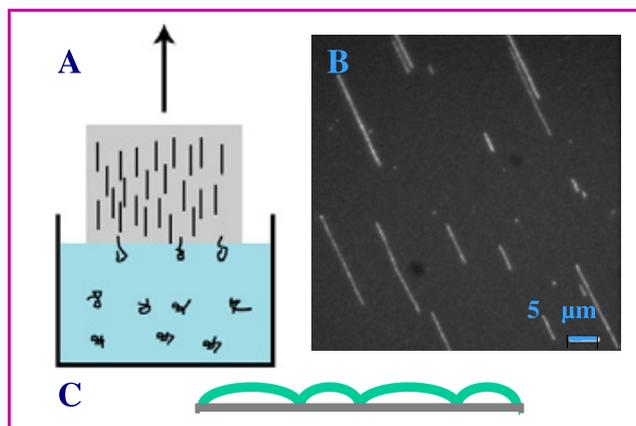


Figure 2 - Peignage moléculaire de l'ADN sur une lamelle de verre traitée par dépôt de PMMA (polyméthylmétacrylate).

A : l'ADN fixé par une extrémité en solution est ensuite aligné le long de la surface au passage du ménisque air-eau ; B : image en microscopie de fluorescence des ADN du phage λ (49 000 bps) peignés. L'ADN est rendu fluorescent par intercalation des fluorophores YOYO-1 (objectif X100 à immersion, temps d'acquisition 500 ms) ; C : l'ADN n'est pas en contact de la surface sur toute sa longueur mais forme des arches entre des points d'ancrage.

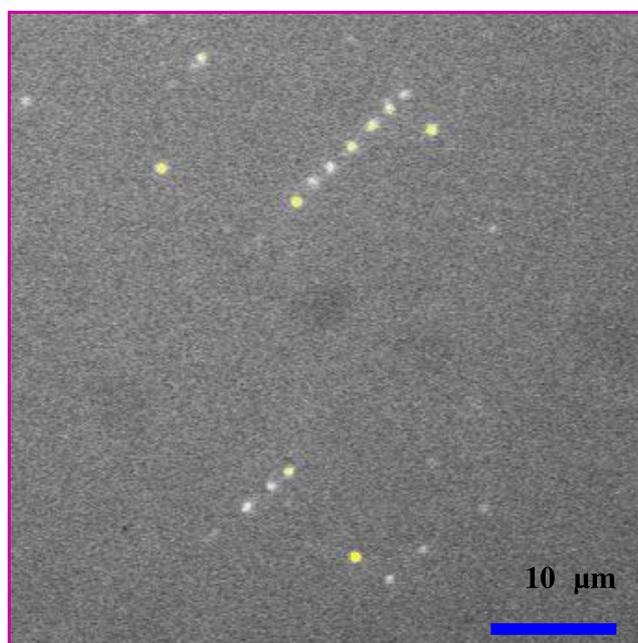


Figure 3 - Transcription par l'ARN polymérase du bactériophage T7 le long d'ADN peigné.

Les points lumineux alignés le long des brins d'ADN sont les pelotes d'ARN marquées par des nucléotides fluorescents (chromatide Alexa fluor 488 -5-UTP $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 496/517 nm (Molecular Probes)). Les observations sont réalisées par microscopie de fluorescence (objectif X100, temps d'acquisition 500 ms).

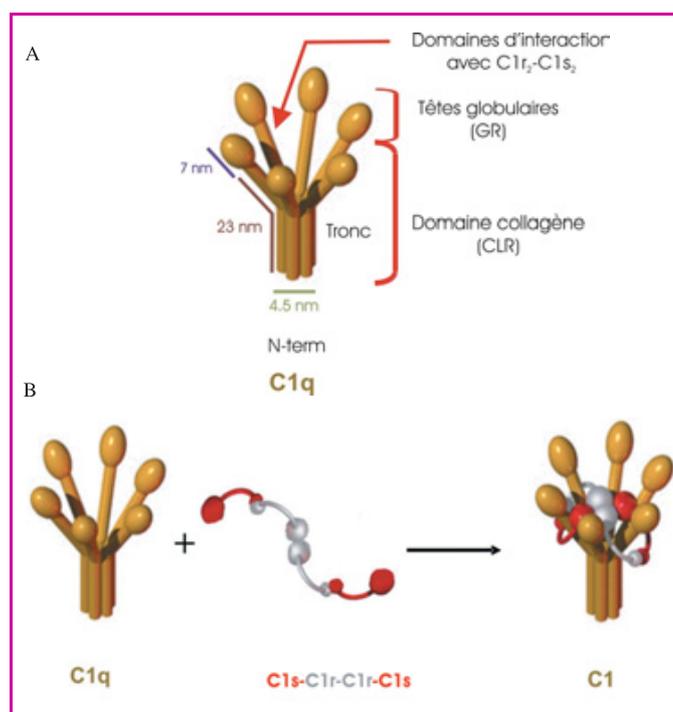


Figure 4 - A : représentation schématique de C1q avec ses différents domaines ; B : représentation de l'association de C1q avec le tétramère protéolytique composé des protéases C1r et C1s.

nucléoprotéique formé. La protéine C1q est un complexe multimérique de masse élevée (460 000 g/mol) constitué de six sous unités hétérotrimères (A, B et C), soit au total 18 chaînes polypeptidiques (6A, 6B et 6C) organisées en une structure singulière valant à C1q d'être décrit comme un bouquet de six tulipes (figure 4). La « tige » du bouquet résultant de l'association étroite au niveau N-terminal des hétérotrimères organisés en triple hélice, puis les six « branches » correspondant aux six sous unités désassociées, définissent un domaine de type collagène (« collagenlike region », CLR). Dans le prolongement de ce domaine, les six sous unités adoptent au niveau C-terminal une structure globulaire formant les six fleurs du bouquet et constituant le domaine globulaire (« globular region », GR) [9].

C1q a été couplé de manière covalente à des microbilles fluorescentes (Alexa 488) afin d'être visualisé par microscopie de fluorescence [10]. L'encombrement approximatif de C1q est estimé à 35 nm et le diamètre des billes est d'environ 27 nm, ce qui n'autorise la fixation que d'un nombre limité de molécules de C1q par bille. Des brins d'ADN T4 (160 000 paires de bases), également rendus fluorescents par un intercalant, sont peignés sur des lamelles de verre recouvertes de polyméthylmétacrylate (PMMA). Les alignements fluorescents observés sur la surface correspondent à des brins de longueur équivalente à celle de molécules d'ADN T4 étirées (figure 5A). Si préalablement à son peignage l'ADN est incubé avec C1q marqué (C1q*), les alignements de brins d'ADN apparaissent alors tous décorés de billes fluorescentes, réparties plus ou moins régulièrement sur toute la longueur de la chaîne d'ADN (figure 5B). Cette colocalisation n'a pas lieu si le peignage de l'ADN se fait en présence de billes qui ne sont pas couplées à C1q. L'alignement des billes le long des brins d'ADN est donc dû à C1q, démontrant l'existence d'interactions et de la liaison de C1q à l'ADN.

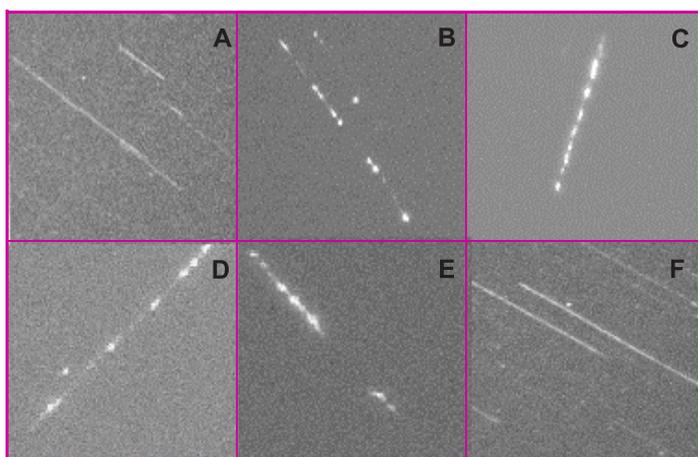


Figure 5 - Peignage moléculaire de l'ADN T4 sur sur une lamelle de verre traitée par dépôt de PMMA (polymeéthylmétacrylate) après incubation avec les protéines du système du complément et le fucoïdane.

A : brins individuels d'ADN T4 fluorescent (160 kpb) ; B-D : peignage de l'ADN après incubation avec les protéines fluorescentes (« yellow green-conjugated beads » $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 505/515$ nm (molecular probes)) respectivement C1q, le domaine CLR et C1 ; E : peignage de l'ADN après incubation avec C1q et la protéase fluorescente C1r ; F : peignage de l'ADN après incubation avec C1q et le fucoïdane (objectif X100, temps d'acquisition 1 s).

Les deux domaines GR et CLR de C1q peuvent être séparés et obtenus isolément par digestion enzymatique de C1q par la pepsine et par la collagénase, pour obtenir respectivement les CLR et les GR. Les têtes globulaires sont obtenues individuellement, alors que les CLR gardent leur organisation structurale avec les six triples hélices associées. L'expérimentation avec chacun de ces domaines isolés a été utile afin d'identifier la région de C1q impliquée dans la liaison à l'ADN. Des expériences de compétition entre C1q* et chacun de ces domaines ont montré qu'une faible quantité de CLR suffit à empêcher la liaison de C1q* à l'ADN, alors que le même résultat n'est obtenu que pour un large excès de GR. D'autre part, le domaine CLR marqué par les billes fluorescentes (CLR*) a été ajouté à une solution d'ADN T4 fluorescent, avant dépôt et peignage sur une surface de PMMA. L'analyse des images montre une co-localisation des billes porteuses des CLR et des brins

fluorescents d'ADN, comme observé pour C1q (figure 5C). Le domaine CLR isolé est donc capable de se lier à l'ADN, ce qui indique que C1q peut se lier à l'ADN par ce domaine collagène.

Le complexe C1 comprend outre C1q une sous-unité enzymatique assurant son activité protéolytique et constituée d'un tétramère de deux protéases à sérine C1r et C1s. Ce tétramère C1r2-C1s2 s'insère entre les bras du domaine collagène (figure 4). Le peignage de l'ADN préalablement incubé avec C1 couplé aux billes fluorescentes conduit à l'alignement de C1 le long des brins d'ADN (figure 5D). La présence du tétramère au niveau du domaine CLR n'interfère donc pas avec la liaison de l'ADN par ce même domaine.

Interaction entre le fucoïdane et C1q en présence d'ADN peigné

Le fucoïdane est un polysaccharide d'origine marine, principalement extrait d'algues brunes, et constitué d'unités L-fucose liées par des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et/ou $\alpha(1\rightarrow4)$ selon l'algue d'origine (fucale, laminariale). Le fucoïdane est en outre sulfaté avec une répartition des groupements sulfate dépendant également de l'algue. Nous étudions un fucoïdane extrait de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* très commune sur la côte atlantique ; sa structure présente des liaisons alternées $\alpha(1\rightarrow3)/\alpha(1\rightarrow4)$ et des groupements sulfate majoritairement en position 2 (figure 6) [11]. Ce polysaccharide est capable de bloquer certaines cascades biologiques de mammifères comme celles de la coagulation [12] et du système du complément [13], ce qui suscite de nombreuses études en vue d'applications thérapeutiques. Cette action biologique du polysaccharide résulte de sa capacité à interagir avec des cibles protéiques. Le système du complément est un élément de notre système immunitaire dont il assure la composante innée (voir encadré p. 16). Il constitue d'une part un système de défense précoce au cours de la réaction immunitaire en produisant des facteurs intervenant dans la mort cellulaire, et d'autre part une composante importante de la réaction inflammatoire, notamment par la formation d'anaphylatoxines. Son dérèglement ou sa sur-activation sont à l'origine de pathologies auto-immunes et neurodégénératives, ainsi que de situations de chocs anaphylactiques et de rejet de greffes. Nous avons montré qu'en bloquant cette activation, le fucoïdane possède une action

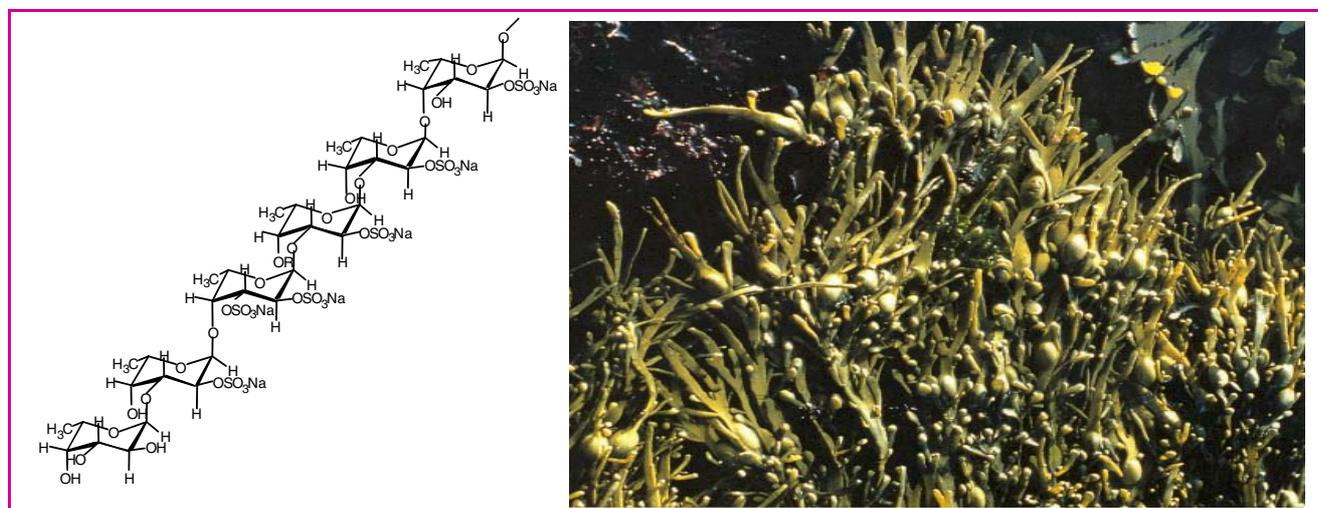


Figure 6 - Structure du fucoïdane extrait de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (photo).

anti-complémentaire forte. Cette activité inhibitrice du fucoidane s'exerce sur les deux voies d'activation classique et alterne du complément. Nous avons identifié certaines des protéines de ces voies comme étant des cibles du fucoidane [14], notamment la protéine C1q qui est une sous-unité du complexe C1 et est impliquée dans l'activation de la voie classique [15]. Cette activation résulte de la reconnaissance par C1q de complexes immuns antigène/anticorps au niveau de la région Fc de l'anticorps. C1q est capable de se lier non seulement aux anticorps (IgG, IgM), mais aussi à des composés non immuns, comme l'ADN, la protéine C réactive, l'amyloïde P sérique, la β -amyloïde agrégée et la décorine, provoquant selon le ligand l'activation ou l'inhibition du complément. Ainsi, l'ADN active la voie classique du complément bien que moins efficacement que les IgG.

Lorsque le fucoidane est mis en présence de C1q couplé aux billes fluorescentes et d'ADN T4, plus aucune molécule de C1q n'apparaît alignée et liée à l'ADN peigné (figure 5F). Il apparaît donc que le fucoidane empêche la liaison entre l'ADN et C1q, vraisemblablement en interagissant avec la protéine. De plus, la compétition entre le fucoidane et l'ADN pour la liaison de C1q suggère que l'interaction établie par le polysaccharide se situe comme pour l'ADN au niveau du domaine collagène de C1q. Cette hypothèse se trouve vérifiée par des expériences de compétition avec le domaine CLR* isolé, montrant que la liaison de ce domaine à l'ADN est totalement bloquée par le fucoidane. En revanche, l'effet du polysaccharide sur la liaison de C1 est moins marqué puisque quelques molécules de ce complexe sont observées le long des brins d'ADN peignés malgré la présence du fucoidane. Ce moindre effet est à relier à la présence du tétramère inséré entre les bras du domaine collagène et qui pourrait interférer dans l'interaction de C1 avec le fucoidane. Ces données conduisent à penser que le polysaccharide interagit avec C1 au niveau du site de liaison du tétramère catalytique. Le fort pouvoir inhibiteur du fucoidane vis-à-vis de l'activité hémolytique de C1q est en accord avec cette hypothèse. Afin de visualiser et confirmer cet effet, la protéase C1r a été couplée aux billes fluorescentes (C1r*) et ajoutée au complexe C1q/ADN formé au préalable. La liaison de C1q à l'ADN n'empêche pas l'incorporation de C1r*, ce qui se traduit par un alignement de spots fluorescents le long des brins d'ADN peigné (figure 5E). En revanche, lorsque C1r est ajouté en présence de fucoidane, aucune incorporation de C1r à C1q n'est observée.

L'ensemble de ces résultats montre que les deux polyanions ADN et fucoidane interagissent avec le même domaine protéique de C1q mais en des sites distincts, et conduisent à des effets opposés, d'activation pour l'un, d'inhibition pour l'autre. La propriété d'interaction du fucoidane avec le domaine collagène doit empêcher l'incorporation du tétramère catalytique à C1q et donc la formation du complexe C1 fonctionnel, ce qui expliquerait le pouvoir anticomplémentaire du fucoidane.

Ces expériences de visualisation de molécules uniques permettent de mettre en évidence de manière univoque la formation de complexe, et dans cet exemple de progresser dans la connaissance des propriétés d'interaction d'un polysaccharide sulfaté. Notre prochaine étape est l'observation du polysaccharide lui-même à l'échelle de la molécule unique, éventuellement aligné comme l'ADN sur une surface. Cette approche expérimentale vient compléter le dispositif nécessairement pluridisciplinaire de caractérisation des complexes glucide/protéine.

Références

- [1] Brant D.A., Novel approaches to the analysis of polysaccharide structures, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, p. 556.
- [2] a) Essevaz-Roulet B., Bockelmann U., Heslot F., Mechanical separation of the complementary strands of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, p. 11935; b) Houchmandzadeh B., Marko J.F., Chatenay D., Libchaber A., Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration, *J. Cell Biol.*, **1997**, *139*, p. 1; c) Block S., Goldstein S.B., Schnapp B.J., Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers, *Nature*, **1990**, *348*, p. 348; d) Harada Y., Funatsu T., Murakami K., Nonoyama Y., Ishihama A., Yanagida T., Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time, *Biophys. J.*, **1999**, *76*, p. 709; e) Strick T.R., Allemand J.-F., Bensimon D., Croquette V., Behavior of supercoiled DNA, *Biophys. J.*, **1998**, *74*, p. 2016.
- [3] a) Weiss S., Fluorescent spectroscopy of single biomolecules, *Science*, **1999**, *283*, p. 1676; b) Mehta A.D., Rief M., Spudich J.A., Smith D.A., Simmons R.M., Single molecule biomechanics with optical methods, *Science*, **1999**, *283*, p. 1689; c) Sako Y., Yanagida T., Single-molecule visualization in cell biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, *Suppl:SS1*, p. 5.
- [4] a) Ladoux B., Quivy J.P., Doyle P., du Roure O., Almouzni G., Viovy J.L., Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, p. 14251; b) Davenport R.J., Wuite G.J.L., Landick R., Bustamante C., Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. Coli RNA polymerase, *Science*, **2000**, *287*, p. 2497.
- [5] Oana H., Ueda M., Washizu M., Visualization of a specific sequence on a single large DNA molecule using fluorescence microscopy based on a new DNA-stretching method, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, *265*, p. 140.
- [6] a) Bensimon A., Simon A., Chiffaudel A., Croquette V., Heslot F., Bensimon D., Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface, *Science*, **1994**, *265*, p. 2096; b) Bensimon D., Simon A.J., Croquette V., Bensimon A., Stretching DNA with a receding meniscus: experiments and models, *Phys. Rev. Lett.*, **1995**, *74*, p. 4754.
- [7] Gueroui Z., Place C., Freyssingas E., Berge B., Observation by fluorescent microscopy of transcription on single combed DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, p. 6005.
- [8] a) Michalet X., Ekong R., Fougereuse F., Rousseaux S., Schurra C., Hornigold N., van Slegtenhorst M., Wolfe J., Povey S., Beckmann J.S., Bensimon A., Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies, *Science*, **1997**, *277*, p. 1518; b) Herrick J., Michalet X., Conti C., Schurra C., Bensimon A., Quantifying single gene copy number by measuring fluorescent probe lengths on combed genomic DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, p. 222; c) Meng X., Benson K., Chada K., Huff E.J., Schwartz D.C., Optical mapping of lambda bacteriophage clones using restriction endonucleases, *Nat. Genet.*, **1995**, *9*, p. 432; d) Yokot H., Johnson F., Lu H., Robinson R.M., Belu A.M., Garrison M.D., Ratner B.D., Trask B.J., Miller D.L., A new method for straightening DNA molecules for optical restriction mapping, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, p. 1064; e) Herrick J., Bensimon A., Single molecule analysis of DNA replication, *Biochimie*, **1999**, *81*, p. 859; f) Herrick J., Stanislawski P., Hyrien O., Bensimon A., Replication fork density increases during DNA synthesis in *X. laevis* egg extracts, *J. Mol. Biol.*, **2000**, *300*, p. 1133; g) Pasero P., Bensimon A., Schwob E., Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus, *Genes Dev.*, **2002**, *16*, p. 2479.
- [9] Gaboriaud C., Juanhuix J., Guez A., Lacroix M., Darnault C., Pignol D., Verger Fontecilla-Camps J.C., Arlaud G.J., The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, p. 46974.
- [10] Tissot B., Daniel R., Place C., Interaction of the C1 complex of Complement with sulfated polysaccharide and DNA probed by single molecule fluorescence microscopy, *Eur. J. Biochem.*, **2003**, *270*, p. 4714.
- [11] a) Daniel R., Berteau O., Jozefonvicz J., Goasdoue N., Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten Maximus*, *Carbohydr. Res.*, **1999**, *322*, p. 291; b) Chevolut L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A., Collic-Jouault S., A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae, *Carbohydr. Res.*, **2001**, *330*, p. 529.
- [12] Varenne A., Gareil P., Collic-Jouault S., Daniel R., Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins: study of the binding properties of fucoidan to antithrombin, *Anal. Biochem.*, **2003**, *315*, p. 152.
- [13] Tissot B., Daniel R., Biological properties of sulfated fucans: the potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human Complement system, *Glycobiology*, **2003**, *13*, p. 29.
- [14] Tissot B., Montdargent B., Chevolut L., Varenne A., Descroix S., Gareil P., Daniel R., Interaction of fucoidan with the complement proteins of the classical pathway, *Biochem. Biophys. Acta*, **2003**, *1651*, p. 5.
- [15] Tissot B., Gonnet F., Iborra A., Berthou C., Thielens N., Arlaud G.J., Daniel R., Mass spectrometry analysis of the oligomeric C1q protein reveals the B chain as the target of trypsin cleavage and interaction with fucoidan, *Biochemistry*, **2005**, *44*, p. 2602.

Régis Daniel

est chargé de recherche au CNRS, au Laboratoire Analyse et environnement d'Évry¹.

Bérangère Tissot

est post-doctorante à l'Imperial College².

Christophe Place

est chargé de recherche au CNRS, à l'École Normale Supérieure de Lyon³.

Zoher Gueroui

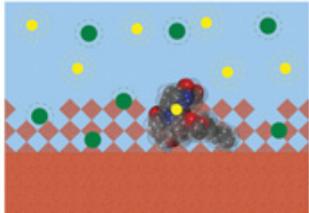
est chargé de recherche au CNRS dans le Groupe Matière condensée et matériaux à l'Université de Rennes 1⁴.

- ¹ Laboratoire Analyse et environnement, UMR 8587 CNRS-CEA-Université d'Évry Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, 91025 Évry Cedex.
Tél. : 01 69 47 76 41. Fax : 01 69 47 76 55.
Courriel : regis.daniel@chimie.univ-evry.fr
- ² Imperial College, Dept of Biological Sciences – Biochemistry Building, South Kensington Campus, Londres, SW7 2AZ (Grande-Bretagne).
Tél. : 0207 594 5210. Fax : 0207 225 0458.
Courriel : b.tissot@imperial.ac.uk
- ³ Laboratoire Joliot-Curie, Département de physique, UMR 5672 CNRS, École Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07.
Tél. : 04 72 72 88 78. Fax : 04 72 72 80 80.
Courriel : christophe.place@ens-lyon.fr
- ⁴ Groupe Matière condensée et matériaux, UMR 6626 CNRS, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu-CS 74205, 35042 Rennes Cedex.
Courriel : Zoher.gueroui@univ-rennes1.fr



CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Institut de Chimie Séparative de Marcoule



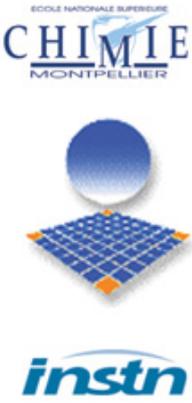
Modélisation d'un tensioactif adsorbé sur une interface chargée (S. Prévost)

8 postes de chercheurs (débutants ou confirmés) de haut niveau sont à pourvoir.

Le CEA, le CNRS, l'Université de Montpellier II et l'Ecole de Chimie de Montpellier ont décidé la création de l'Institut de Chimie Séparative de Marcoule (ICSM). Son objectif est notamment de conduire des recherches fondamentales en support à la conception des systèmes nucléaires du futur. Les recherches menées concerneront aussi l'ensemble des nouvelles technologies pour l'énergie ainsi que les technologies pour l'information et la santé. L'effectif visé de l'ICSM est de l'ordre de 80 à 100 chercheurs à l'horizon 2009. Les thématiques de recherche couvrent plusieurs champs de la chimie, qui vont de la chimie physique statistique des solutions ioniques à la chimie moderne des nanomatériaux hybrides. Elles sont orientées selon 3 axes :

- la combinaison des aspects nanostructuraux et thermodynamiques dans la chimie physique des fluides complexes utilisés pour l'extraction,
- la caractérisation et la modélisation, à l'échelle de la chimie nanométrique supramoléculaire, de l'interface solide-liquide ou liquide-liquide lorsqu'une réaction chimique se produit,
- la chimie « moderne » de l'état solide des nanomatériaux à structure hiérarchique.





La définition des postes est accessible sur le site : icsm.cea.fr

Les candidatures (CV détaillé comprenant la liste de publications, une lettre de motivation et un projet de recherche en deux pages maximum) seront reçues jusqu'au 21 juin 2006 à : icsm@cea.fr

Interviews les 6 et 7 juillet 2006.