
Etudes complémentaires par spectrométrie de masse

Nous avons procédé à une étude de la bande faible observée à ~ 60 kDa lors de l'identification différentielle par affinité (figure 4.6.). Nous avons des éléments d'identification par spectrométrie de masse pour plusieurs protéines : CBF3B, Hsp60p, Ku70p et Ku80p. Aucune présence de ces protéines n'a été retrouvée dans la bande de gel découpée dans la piste où la résine ne portait pas le ligand BTlev (piste servant de témoin lors de cette expérience). A la différence des IMPDH, nous ne retrouvons aucune de ces protéines lors de l'expérience réalisée avec le ligand BGTlev.

Ces identifications ont été réalisées à partir de peu de matériel peptidique par rapport à l'identification des protéines Yhr216p, Yml056p et Ylr432p. Dans le cas des protéines Ku70p, Ku80p et CBF3B, il ne s'agit pas d'identification formelle obtenue par le séquençage d'un peptide, mais d'une identification de peptides par spectrométrie de masse MALDI. Nous pensons à une implication éventuelle de ces protéines dans une association spécifique avec la séquence d'ADN télomérique de levure Tlev. Cela pourrait correspondre avec les bandes retardées d'intensités mineures devant la bande retardée due aux protéines IMPDH, observées lors de migrations électrophorétiques en conditions non dénaturantes. Dans le cas de la protéine Hsp60p, une expérience de spectrométrie de masse en tandem confirme l'identification.

1-1- Les protéines Ku70p et Ku80p

Nous avons identifié la présence probable des protéines yKu70p (ou Ku70p) et yKu80p (ou Ku80p). Dans le cas de la protéine Ku70p, les résultats obtenus par spectrométrie de masse MALDI montrent un recouvrement par les peptides identifiés de 21.0 % de la séquence de cette protéine (figure 5.1.).

	1	11	21	31	41	51	
1	mrsvtnafgn	sgelndqvde	tgyrkfdihe	gilfcielse	tmfkessdle	yksplleile	60
61	sldelmsqlv	itrpptaigc	yfyycnreda	kEGIYELFPL	RDINATFMKK	lndlledlss	120
121	grislydyfm	fqqtgsekqv	rlsvlftfml	dtfleiepqq	kqlsnkrvfl	ftdidkpqea	180
181	qdiderarlr	RLTIDLFDNK	vnfatffigy	adkpfdfefy	sdilqlgsh	nentgldsef	240
241	dgpstkpida	kyiksrlrk	kevkrimfqc	plildektnf	ivgvkgytmy	thekagvryk	300
301	LVYEHEDIRQ	EAYSKRkfln	pitgedvtgk	tvkvpyygd	dinlsdsdq	ivmeaytqkd	360
361	aflkiigfrS	SSKSIHYFNN	IDKssfivpd	eakeyegsirt	lasllkilk	KDKTAILWGK	420
421	LKsnshpsly	tlspssvkDY	NEGFYLYRVP	FLDEIRkfps	llsyddgseh	kldydnmkkv	480
481	tqsimgyfnl	rdgynpsdfk	npllqkhykv	lhdyllqiet	tfdenetpnt	kkdrMMREDD	540
541	SLRKLYYIrn	kileseksed	pqiqrlnkYV	KIWNMFYKKF	NDDNISIKEE	kkpfdkpkpf	600
601	ni						

Figure 5.1.: Répartition des peptides identifiés par spectrométrie de masse MALDI correspondant à la protéine Ku70p.

Dans le cas de la protéine Ku80p, nous avons obtenu pour cette protéine un recouvrement de 20 % de la séquence (figure 5.2.).

Indépendamment d'un taux de recouvrement important, trouver des éléments de séquence de ces deux protéines agissant habituellement de concert, accreditte l'hypothèse d'une association avec l'ADN Tlev. Jusqu'à présent, le complexe hétérogène Ku70p/Ku80p était connu pour s'associer au

double brin et au brin G de l'ADN télomérique de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ces conditions, il n'est pas surprenant de retrouver ces protéines dans une association apparemment avec le brin C.

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  mssesttfiv  dvspsmmknn  nvskSMAYLE  YTLNKSks  rktdwiscyl  ancpsvensq  60
61  eipnfvqiqs  flapvtttat  igfikrlkqy  cdqshdssn  eglqsmiqcl  lvvsldikqq  120
121  fqarkilkqi  vvftdnlddl  ditdeeidll  teelstriil  idcgkDTQEE  RKKsnwklkv  180
181  eaipnsriyn  mnellveits  patsvvpvr  VFSGELRlga  dilstqtsnp  sgsmqdencl  240
241  cikVEAFPAT  Kavsglnrkt  avevedsqkk  eryvkvksii  eyeihnegnk  knvseddqsg  300
301  ssyipvtisk  dsvtkayryg  adyvvlpsvl  vdtvyesfp  gldlrgflnr  EALPRyflts  360
361  essfitadtr  lgcqsdmaf  salvdvmlen  rKIAVARYVS  KKdsevmca  lcpvliehsn  420
421  insekkfvks  LTLCLpfae  dervtdfpl  ldrtttsgvp  lkktedghqi  delmeqfvds  480
481  mtdelpeip  lgnyyqpige  vttdttlplp  slnkdeenk  kDPLRIPTVJ  VYRqqqvll  540
541  wihqlminds  rEFEIPELDP  SLKNKISPYT  HKKFDSTKlv  evlgikkvdk  lkLDSELKTE  600
601  LEREKIPDLE  TLLKrGEQHS  Rgspnnsnn

```

Figure 5.2.: Répartition des peptides identifiés par spectrométrie de masse MALDI correspondant à la protéine Ku80p.

Pour permettre de nous assurer de cette association avec la séquence Tlev, nous pourrions dépléter les extraits de levure en protéines Ku70p et Ku80p, par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques. Cette immunoprécipitation devrait, dans l'hypothèse d'une association de Tlev avec les protéines Ku70p et Ku80p, entraîner la disparition de l'une des bandes retardées d'intensité mineure observées après une migration électrophorétique non dénaturante.

1-2- La protéine Hsp60p

Nous obtenons une identification MALDI de la protéine Hsp60p, correspondant à un recouvrement de 37.8 % de la séquence. Nous en avons eu confirmation par identification par spectrométrie de masse en tandem d'un peptide spécifique de cette séquence (figure 5.3. en bleu).

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  MLRSSVRSR  atlrpllrRA  YSSHkELKFG  VEGRasllkG  VETLAEAVAA  TLGPKgrNVL  60
61  IEQPFVPPKi  tkdgvttvaks  IVLKDKFENM  GAKllqevas  ktNEAAGDGT  TSATVLGRAI  120
121  FTESVKnvaa  gcnpmdlrRG  SQVAVEKvie  flsankkeit  tseeiaqvaf  isangdshvg  180
181  kLLASAMEKv  gkEGVITIRE  GRTLEDELEV  TEGMRfdrGF  ISPYFITDPK  sskVEFEKPL  240
241  LLLSEKkISS  IQDILPALEI  SNQSRrplli  iaedvdgeal  aaciInklrg  qkvvcavkAP  300
301  GFGDNRknti  gdiavltggt  vfteeldlcp  eqctienlgs  cdsitvtked  tvilngsgpk  360
361  eaiqerieqi  kgsiditttn  syekeklqer  laklsggvav  irvggaseve  vgekkdrydd  420
421  alnatrAAVE  EGILPGGGTA  LVKasrVLDE  VVVDNFDQKl  gvdiirkait  RPAKQIENA  480
481  GEEGSVIIGK  lideygdffa  kgydasksey  tdmlatgiid  pfkvvrsglv  dasgvaslla  540
541  ttevaidvap  eppaaagagg  mppggmpgmpg  mm

```

Figure 5.3. : Répartition des peptides identifiés par spectrométrie de masse MALDI (en rouge) et spectrométrie de masse en tandem (en bleu) correspondant à la protéine Hsp60p.

Cette protéine est localisée dans les mitochondries (Lithgow et *al.*, 1995) où elle joue un rôle au niveau du repliement des protéines (Koll et *al.*, 1992). Ses principales fonctions biochimiques connues sont celles de chaperone (Koll et *al.*, 1992) et de protéine de choc thermique (Reading et *al.*, 1989), mais à notre connaissance, aucune association de cette protéine avec de l'ADN n'a jusqu'à présent été mentionnée.

1-3- La protéine CBF3B

Nous obtenons une identification incomplète (11.3 % de séquence couverte) de la protéine CBF3B, sans confirmation par un autre moyen de séquençage. Cette protéine nucléaire fait partie du complexe protéique Cbf3 se liant à l'ADN centromérique (Lechner, 1994) et intervenant dans la mitose (Leopardi et *al.*, 1996) et le contrôle du cycle cellulaire (Sorger et *al.*, 1995).

	1	11	21	31	41	51			
1	MFNR	ttqlks	khpcsvctrr	KVKCDRMIPC	GNCRKR	ggqds	ecmkstklit	assskeylpd	60
61	lllfwqnyey	witniglykt	kqrdltrtpa	nldtdteecm	fwmnylqkdq	sfqlmnfame			120
121	nlgalyfgsi	gdiselylrV	EQYWDR	radk	NHSVDGKYwd	aliwsvftmc	iyympvekla		180
181	eifsvyplhe	ylgsnkrlnw	edgmqlvmcq	nfarcslfql	kqcdfmahpd	irlvqaylil			240
241	atftfpydep	llanslltqc	ihftknfhvd	dfrplnddp	vesiakvtlg	rIFYR	lrcgd		300
301	ylqsgprkpi	alhteVssll	qhaaylqdlp	nvdvyreens	teVlywkiis	ldrldqyln			360
361	kSSKPP	LkTl	dairreldif	qykVDSLEED	FRS	nsnsrfqk	fialfqistv	swklfkmyli	420
421	yydtadsilk	vihyskviis	livnnfhaks	effnrhpmvm	qtitrVvsfi	sfyqifvesa			480
481	avkqllvdlT	eltanlptif	gskldklvyl	terlsklkl1	wdkvqllDsg	dsfyhpfvki			540
541	lqndik	IIEEL	Kndemfslik	GLGSLVPLNK	lrqesll	eeedenn	tepsdf	rtiveefqse	600
601	ynisdils								

Figure 5.4. : Répartition des peptides identifiés correspondant à la protéine CBF3B

La répartition aléatoire des peptides recensés (figure 5.4.) et la masse native de cette protéine (71.349 Da) sont de bons indices de la présence de cette protéine dans les échantillons analysés. Nous n'avons pas pu déterminer la séquence d'un peptide par spectroscopie de masse en tandem et ces résultats sont insuffisants pour affirmer que cette protéine s'associe spécifiquement à la séquence Tlev. On sait cependant qu'elle se fixe à l'ADN centromérique du satellite CDEIII de *Saccharomyces cerevisiae* (Grady et *al.*, 1992), qui est homologue au satellite III du centromère humain. La séquence de ce dernier est constitué de répétitions de CC (Fitzgerald-Hayes et *al.*, 1982) et peut adopter une structure en motif i (Nonin-Lecomte & Leroy, 2001).

2- Purifications partielles et éléments d'identification

Dans le cadre de la recherche de protéines qui s'associeraient à la séquence télomérique de levure d[(CCCACA)₃CCC], nous avons entrepris de développer un protocole de purification menant à l'isolement en conditions natives des protéines impliquées. Les difficultés rencontrées au cours de ces travaux sont en partie dues à l'instabilité constatée du complexe protéique en fonction de l'avancement des étapes de purification.

2-1- Eléments de purification

Le travail présenté décrit les résultats obtenus lors de différentes phases de purifications partielles (pour chacune de ces étapes de purification, une étude préalable du comportement des protéines et de l'efficacité de la séparation a été conduite).

2-1-1- Chromatographie d'exclusion et chromatographie anionique

Une première étape de séparation consiste à récupérer la fraction de chromatographie d'exclusion à 250 kDa (chapitre III-2-3-). La stabilité du complexe protéique est comparable à ce qu'elle était dans les extraits de protéines de levure (rappel : concentration en protéines = 1 µg/µl). Le tampon d'élution est TBE 0.5x, pH 8 et NaCl 175 mM (utilisé pour neutraliser les interactions électrostatiques avec la résine. Le remplacement de NaCl par KCl a conduit à la perte de l'activité retardante.) .

Nous observons un effet de sel de même genre lors de nos essais de séparation par chromatographie anionique : l'élution doit être réalisée en KCl, pour un pH compris entre 7.2 et 7.6. A l'opposé de ce qui se passe lors de la chromatographie d'exclusion, nous perdons l'activité retardée si nous utilisons du chlorure de sodium dans le tampon d'élution.

Lors des expériences de chromatographie anionique, nous avons aussi déterminé que nous perdons l'activité retardée si la résine utilisée avait déjà préalablement servi. Après traitement dans des conditions d'élution dénaturantes (passage à pH 2 puis pH 10), nous observons le décrochage de

produits que les conditions de chromatographie « natives » (gradient jusqu'à 2M KCl) ne permettent pas d'éluer. Ceux-ci pourraient être responsable de la perte de matériel constaté.

Enfin, la chromatographie anionique consiste en une élution par pas de 50 et 100 mM de KCl plutôt que par gradient, afin d'obtenir une meilleure séparation entre les protéines présentes dans les extraits de levure. Dans ces conditions, on observe 90% du complexe protéique recherché dans la fraction correspondant au plateau à 300 mM KCl (figure 5.5.a.).

Les protéines provenant de la fraction à 250 kDa de la chromatographie d'exclusion sont amenées aux conditions d'élution de la chromatographie anionique durant une étape de dilution - reconcentration (utilisation de tubes reconcentrateurs, chapitre II-10-) dans le tampon approprié (TBE 0.5x, pH 7.4, 50 mM KCl), sans perte de l'activité retardée. A la sortie de la colonne anionique, les fractions sont reconcentrées (volume 1 ml, volume final 10 µl) et dessalées avant d'en observer le contenu par migration électrophorétique native (figure 5.5.a) et par gel dénaturant de protéines (figure 5.5.b).

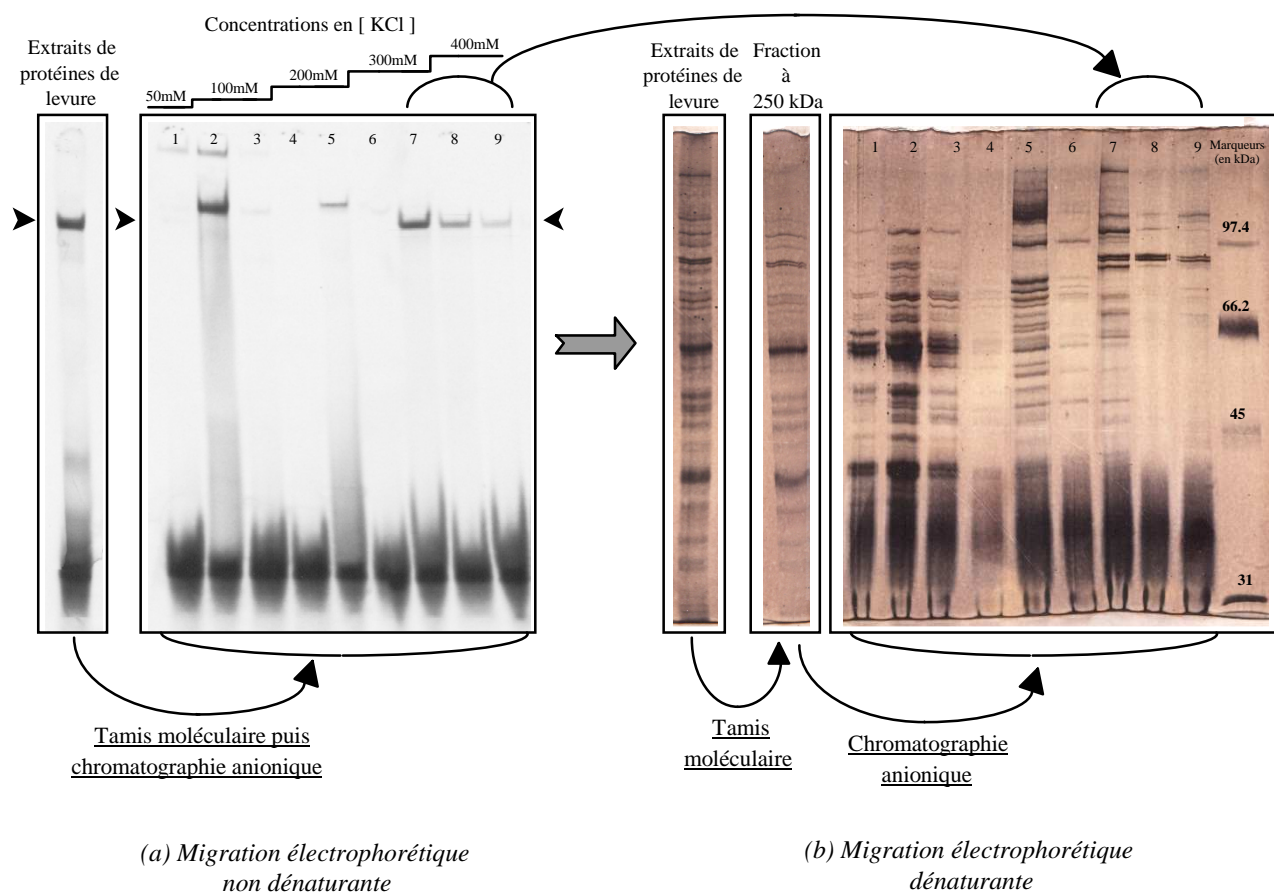
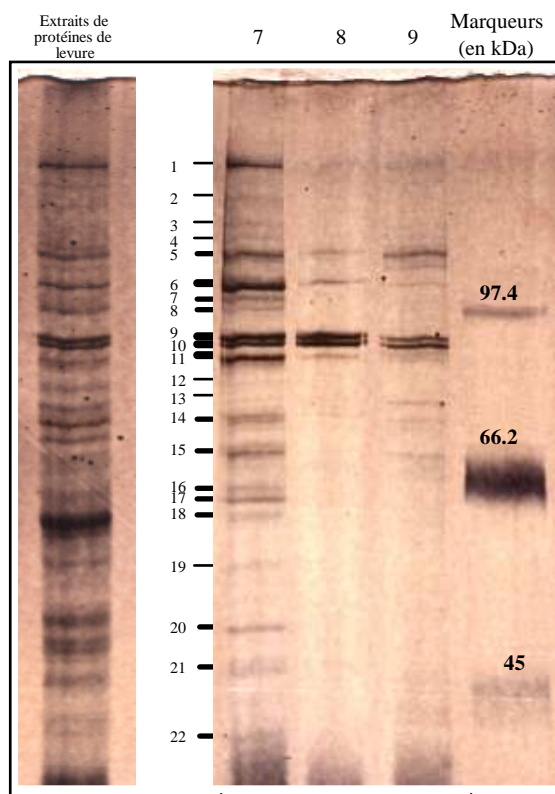


Figure 5.5. : Résultats obtenus après chromatographie d'exclusion puis chromatographie anionique. Les protéines du gel dénaturant (b) sont colorées au AgNO₃. Les pistes 1 à 9 correspondent aux fractions provenant de la chromatographie anionique.

Les résultats obtenus après ces deux étapes de purifications sont présentés dans la figure 5.5. . Pour la migration électrophorétique en conditions natives (figure 5.5.a.), les concentrations en protéines des différents échantillons sont établies de façon à pouvoir comparer directement l'intensité de la bande retardée obtenue avec les extraits de protéines (~ 0.5 pmol de sites de fixation spécifiques) et celle correspondant à la somme des intensités de l'ensemble des fractions du profil d'élution.

Lors de cette expérience, on perd 20% de l'intensité du signal retardé observé pour les extraits de protéines de levure, les 80% restant se trouvant dans les fractions 7, 8 et 9 (300mM KCl et passage à 400mM). On observe en piste 2 de l'autoradiographie une bande retardée d'intensité comparable à celle présente dans les extraits de protéines de levure ainsi qu'une bande de faible mobilité. En piste 5, on relève la présence d'une bande située au même niveau, que la bande principale observée en piste 2 mais d'intensité plus faible. Les interactions avec la résine anionique pourraient être la cause de modifications rendant possible l'association de protéines avec l'ADN Tlev*.

Figure 5.6. : Agrandissement du gel de protéines présenté en figure 5.5. (fractions 7, 8 et 9, contraste renforcé)



Tamis moléculaire puis chromatographie anionique

Les concentrations en protéines des pistes 'Extraits de protéines de levure' et 'Fraction à 250 kDa' correspondent au 1/5^{ème} des concentrations des pistes 1 à 9. On observe entre 31 et 45 kDa des effets de coloration résultants du tampon d'éluion de la chromatographie anionique (figure 5.5.b).

A partir de cette expérience (agrandissement du gel de protéines en figure 5.6), on dénombre pour la fraction 7, 22 bandes de protéines distinctes. On note la présence dans les pistes 7, 8 et 9 d'un doublet de protéines (9 - 10) persistant à environ 80-85 kDa, comptant parmi les protéines les plus contrastées observées dans les extraits de protéines non purifiées et dans la fraction à 250 kDa de la chromatographie d'exclusion.

Les bandes 13, 14 et 15 ne sont probablement pas impliquées dans la reconnaissance de la séquence Tlev* puisqu'elles sont absentes de la piste 8, ce qui va à l'encontre des intensités des bandes retardées observées pour les fractions 8 et 9 (figure 5.5.a.).

2-1-2- Développements ultérieurs

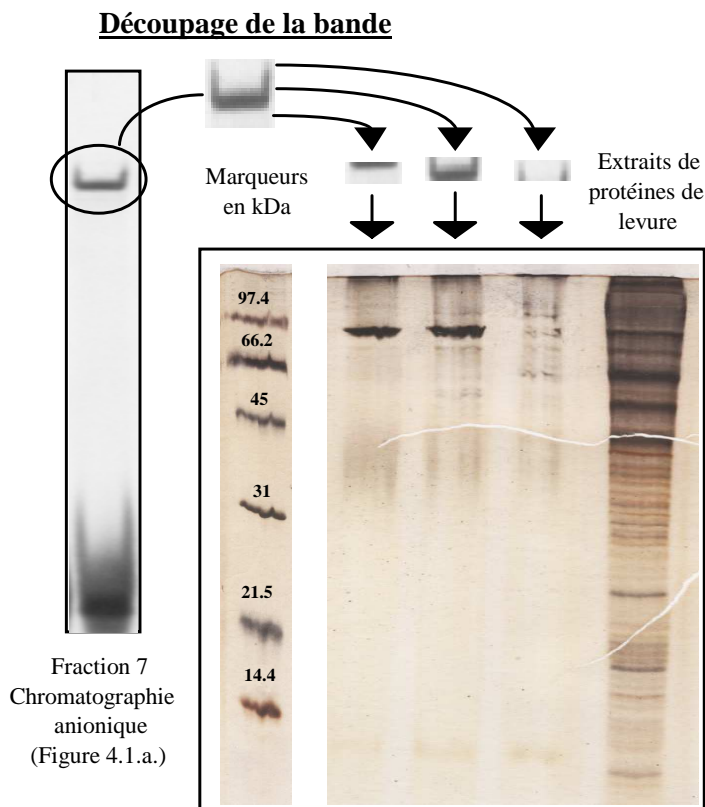
Devant l'instabilité du complexe protéique obtenu après ces deux étapes de purification (50% de perte du signal retardé après 2 h à 4°C et pas de bande retardée observée lors de migration électrophorétique native survenant soit après congélation à l'azote, soit après 1 nuit à 4°C), nous avons essayé d'identifier les protéines recherchées en profitant de la séparation complémentaire obtenue lors de la migration électrophorétique native.

Pour cela, après une migration non dénaturante (réalisée à partir des fractions de la chromatographie anionique) le gel est séché sur une feuille de cellophane. Les bandes correspondant à l'activité retardée peuvent être découpées selon l'autoradiographie du gel, avant d'être insérées dans les puits pratiqués en haut d'un gel de protéines (figure 5.7.).

Le découpage est tel que l'on retrouve 10% de l'activité retardée dans la piste de gauche du gel dénaturant, 85% dans la piste centrale et une fraction dans la piste de droite (estimations effectuées en mesurant la radioactivité au front de migration du gel de protéines). La bande de protéines de forte intensité (coloration saturée) observée dans la piste de gauche et la piste centrale correspond

au doublet 9-10 de la figure 5.6. D'autres bandes sont également observées dans la piste centrale présentant une intensité relative beaucoup plus faible.

Figure 5.7.: Visualisation des protéines restant après purification partielle par chromatographie d'exclusion puis chromatographie anionique et séparation en fonction de la mobilité électrophorétique. Coloration au AgNO_3 .



Lors d'expériences de contrôle, nous avons constaté que ce protocole de transfert de protéines d'un gel non dénaturant vers un gel dénaturant ne permettait pas de traiter l'ensemble des protéines (nous estimons transférer 75% des protéines). Nous pensons que la dénaturation des protéines, avant le début de la migration, reste imparfaite. Les agents dénaturants doivent pénétrer dans le gel natif avant d'être efficaces, ce qui signifie préalablement que celui-ci soit réhydraté. Une légère amélioration (n'entraînant pas de résultats marquants nouveaux) est apportée si le gel natif n'est pas séché. Cette amélioration peut s'expliquer d'une part par une meilleure dénaturation générale des protéines, d'autre part, par l'impossibilité de dégradation intervenant lors du séchage du gel sur cellophane. Cependant, les protéines ne pouvant être fixées dans le gel (puisque leur mobilité ne doit pas être entravée ultérieurement lors de la migration en conditions dénaturantes), l'autoradiographie doit être aussi rapide que possible, malgré la présence de molécules d'eau constitutives du gel non séché atténuant le signal radioactif.

2-2- Pontage ADN-protéines aux UV

Le pontage ADN-protéines permet d'associer le fragment d'ADN Tlev* marqué radioactivement avec les protéines spécifiques de cet oligodésoxynucléotide. Lors d'une migration électrophorétique dénaturante, la position de la radioactivité correspond au complexe ADN*-protéines.

L'expérience présentée (figure 5.8.) a été réalisée à partir d'extraits de protéines de levure non purifiés. Nous observons une bande intense (A) entre 85-92 kDa pouvant correspondre au doublet de protéines observé lors des étapes de purification partielle (figures 4.2. et 4.3.), et trois autres bandes d'intensités plus faibles (B, C et D), respectivement vers 47, 50 et 55 kDa. Ces masses moléculaires donnent une idée relative des masses réelles des protéines sur lesquelles l'ADN se sera fixé lors de cette expérience de pontage aux UV.

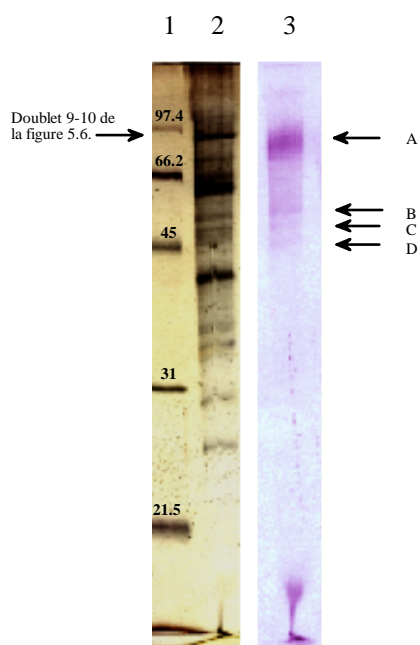


Figure 5.8. : Expérience de pontage ADN-protéines aux UV.

- 1 : Marqueurs de poids moléculaire ;
- 2 : migration dénaturante ;
- 3 : autoradiographie du gel.

On remarque que la mobilité du doublet de protéines 9-10 de la figure 5.6. semble légèrement différente (~ 85 kDa) de celle observée précédemment (~ 80-85 kDa).

2-3- Cohérence avec les résultats du chapitre IV

Le doublet intense de protéines repéré en figure 4.6., dont l'analyse par spectrométrie de masse conduit à l'identification des protéines Yhr216p, Ylr 432p et Yml056p, fait partie des bandes de protéines présentées dans les résultats obtenus lors de purifications partielles. Ainsi, on peut établir

une correspondance entre ce doublet (figure 4.6.) et la bande de protéines observées en figure 5.6. (bande n°19). On le retrouve en figure 5.7. parmi les protéines indicées et en figure 5.8. (bande B).

2-4- Protéines de choc thermique HSP90

Indépendamment des protéines IMPDH, nous retrouvons de façon récurrente dans ce chapitre un doublet de protéines à partir de purifications partielles et de pontage aux UV. Celles-ci ont été formellement identifiées par séquençage par dégradation d'Edman. Il s'agit des protéines Hsc82p et Hsp82p.

Ces deux protéines font partie d'une famille de protéines, les Heat Shock Protein 90. Il s'agit d'une famille de protéines chaperonnes rapidement induites dans les cellules lors de chocs thermiques ou d'un stress environnemental. Les protéines Hsp90p présentent d'importantes homologies d'une espèce eucaryote à l'autre. Elles sont connues pour former de nombreux complexes avec plusieurs autres protéines (Csermely et *al.*, 1998 pour revue).

Récemment, il a été montré que l'activité de la télomérase nécessitait la présence d'une association de protéines, p23 et Hsp90p (Holt et *al.*, 1999). Inhibiteur spécifique de la protéine Hsp90p, la geldanamycine semble par contre-coups ralentir l'activité de la télomérase (Masutomi et *al.*, 2000). C'est la première contribution observée d'un complexe protéique à l'activité de la télomérase.

Dénomination	Génotype
S150	<i>MATa, leu2-3, 112, his3Δ1 trp1-289, ura3-52, HSP82 HSC82</i>
PP501	<i>MATa, leu2-3, 112, his3Δ1 trp1-289, ura3-52, HSC82Δhsp82 : :KANMX4</i>
PP502	<i>MATa, leu2-3, 112, his3Δ1 trp1-289, ura3-52, HSP82Δhsc82 : :KANMX4</i>

Tableau 4.1. : Souches ne produisant pas de Hsc82p et Hsp82c. Les souches PP501 et PP502 sont construites à partir de la souche S150.

Nous avons obtenu de la protéine Hsp90p pure de rat (Pr. P. Csermely, Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Budapest) et de la protéine Hsp90p pure de poulet (A. Chadli, Laboratoire des communications hormonales, INSERM U. 33, Kremlin-Bicêtre). Avec ces

protéines, nous avons procédé à différents tests de migration électrophorétique non dénaturante. Nous n'avons obtenu aucun retard de la séquence Tlev* utilisée lors de ces essais. Cela montre que Hsp90p seule ne peut associer des séquences comportant des répétitions de désoxycytidines.

Nous avons également réalisé différents essais de migration non dénaturante, à partir d'extraits de protéines provenant de souches construites pour ne produire que l'une des deux protéines Hsp82c ou Hsp82p (tableau 5.1., Pr. P. Piper, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London).

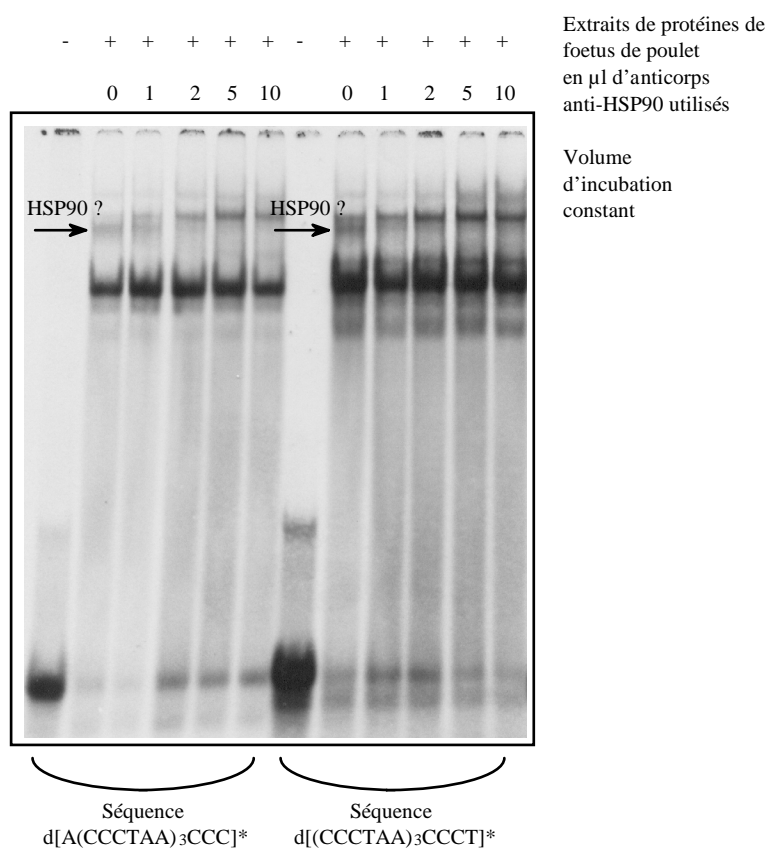


Figure 5.9. : Effets d'anticorps spécifiques de HSP90 de poulet en fonction de la concentration en anticorps.

Nous n'avons pas vu d'effet dû à l'absence de l'une des deux protéines de chocs thermiques. Cependant, ces deux protéines ont des séquences très proches l'une de l'autre (701 acides aminés communs sur 710), et une délétion simultanée des deux gènes étant impossible, on peut imaginer que chacune des protéines pourrait contribuer de la même façon dans un complexe s'associant au brin C de l'ADN télomérique de levure.

En travaillant sur des extraits de protéines de poulet et d'anticorps spécifiques des deux formes de la Hsp90p de poulet (fournis par A. Chadli), nous avons mis en évidence un effet des anticorps anti-

Hsp90p, sur une des bandes de protéines observées par migration électrophorétique après incubation des protéines de poulet et de la sonde télomérique (figure 5.9.). Nous n'observons pas d'effet similaire avec un anticorps anti-Hsp82p de levure.

Les protéines de choc thermique pourraient être impliquées dans un complexe protéique capable de reconnaître le brin C de l'ADN télomérique. Mais, dans toutes les expériences d'identification différentielles par affinité pour les séquences BTlev et BGTlev, nous avons pu observer ce doublet en concentration apparemment identique selon que la résine-streptavidine était porteuse ou non de ligand d'ADN.

CONCLUSION

et

PERSPECTIVES

1- Résultat principal

Nous avons montré que le fragment télomérique de levure d[(CCCACA)₃CCC] peut former *in vitro* un motif i par repliement intramoléculaire. L'identification des protéines de levure, Yhr216p, Ylr432p et Yml056p, s'associant spécifiquement à cette séquence d[(CCCACA)₃CCC], constitue le principal résultat de l'étude présentée. Cette association peut avoir lieu en milieu acide (pH 6), dans des conditions d'incubation compatibles avec l'observation *in vitro* du motif i. Jusqu'à présent,

seules quelques protéines avaient été identifiées comme s'associant à des séquences d'ADN riches en cytosines. Ainsi une protéine issue de cellules tumorales de souris, p70, qui reconnaît la répétition (CCT)_n (Muraïso et *al.*, 1992), et surtout les protéines hnRNP K et ASF/SF2, issues de cellules HeLa, qui fixent le fragment télomérique humain d[(CCCTAA)₃CCC] (Lacroix et *al.*, 2000), pourraient s'associer au motif i, sans que cela ne soit établi pour l'instant. Les résultats obtenus concernant la spécificité des protéines IMPDH pour toutes les séquences formant un motif i intramoléculaire nous oriente également dans l'idée d'une reconnaissance de cette structure par ces protéines.

Cependant malgré la présence d'une bande de protéines (provenant d'extraits nucléaires HeLa) ayant une mobilité électrophorétique comparable, des essais réalisés à partir de protéines IMPDH pures de types I et II montrent que celles-ci ne s'associent pas au fragment télomérique humain.

L'association avec le brin G complémentaire des télomères de levure est un résultat inattendu obtenu lors de ce travail. Très récemment, les propriétés associatives de hnRNP D pour chacun des deux brins télomériques vient d'être démontrées *in vitro* (Eversole & Maizels, 2000). A notre connaissance, il s'agit du seul exemple d'association spécifique d'une protéine pour chacun des deux brins télomériques. Le rôle joué par de telles protéines dans la régulation des télomères reste encore à démontrer.

Dans le cas des IMPDH de levure, la localisation des gènes identifiés, sur des chromosomes où l'on retrouve fréquemment la séquence d[(CCCACA)₃CCC] ou des séquences consensus très proches, et leur possible régulation par le phénomène de TPE, renforce l'idée que ces protéines pourraient jouer un rôle structural important dans le maintien de l'intégrité de ces chromosomes.

2- Autres contributions

Nous avons obtenu au cours de notre étude, différents autres résultats. Nous avons montré que les protéines Ku70p et Ku80p, dont on connaissait déjà l'association à l'ADN télomérique double brin et au brin G, peuvent aussi s'associer avec le brin riche en C. On montre aussi qu'une protéine du complexe Cbf3, dont on connaissait l'association au satellite CDEIII du centromère de

Saccharomyces cerevisiae, et que la protéine Hsp60p, peuvent s'associer à un fragment télomérique riche en cytosines.

Nous avons montré que la protéine Hsp90p de poulet peut s'associer avec des séquences riches en cytosines. Cette caractéristique a été obtenue en se basant sur de nombreux indices impliquant cette protéine chez *Saccharomyces cerevisiae*, mais l'existence de deux protéines homologues, Hsc82p et Hsp82p, distinctes, ne nous a pas permis jusqu'à présent de confirmer cette hypothèse chez la levure. On sait que Hsp90p est impliquée dans un rôle de régulation de l'activité de la télomérase des mammifères et des études montrent que l'on pourrait inhiber l'activité de la télomérase en inhibant Hsp90p. On ne sait pas pour l'instant de quelle façon elle agit. L'association au brin C de l'ADN télomérique pourrait permettre d'expliquer le mode de fonctionnement de cette régulation.

3- Perspectives

Un premier objectif sera de confirmer que l'association des protéines IMPDH avec la séquence Tlev, ne fait pas intervenir d'autres facteurs que nous n'aurions pas appréhendés par notre mode d'identification. Pour cela, nous avons déjà entrepris de produire l'une des protéines, Ylr432p. Nous pourrions alors entreprendre de définir le domaine d'interaction avec l'ADN, puis essayer de caractériser les mécanismes de cette association. Nous pouvons aussi envisager de vérifier qu'elles s'associent au motif i, en s'appuyant par exemple, sur des expériences de transfert d'énergie de fluorescence (Mergny, 1999).

La caractérisation approfondie de l'association avec le brin G complémentaire constitue une autre étape des développements envisageables. Notamment, il sera intéressant de regarder sous quelle forme le brin G s'associe avec ces protéines, et quelle est l'affinité des protéines pour ce brin.