



---

## Identification des protéines du complexe

### 1- Protéines identifiées par affinité (streptavidine immobilisée)

#### 1-1- Choix de la séquence biotine-ADN

Nous avons développé un protocole d'identification par affinité en utilisant de la streptavidine immobilisée. A cette fin, nous avons synthétisé la séquence BTlev (cf. tableau 4.1.) sur la base de la séquence Tlev, en prenant soin d'éloigner par une suite de thymines, la biotine de la partie Tlev. Si les protéines s'associent à la séquence Tlev sous une forme structurale en motif i ou sous une autre, l'ajout d'une biotine à l'extrémité 5' de la séquence ne devrait pas perturber la structure adoptée par l'ADN.

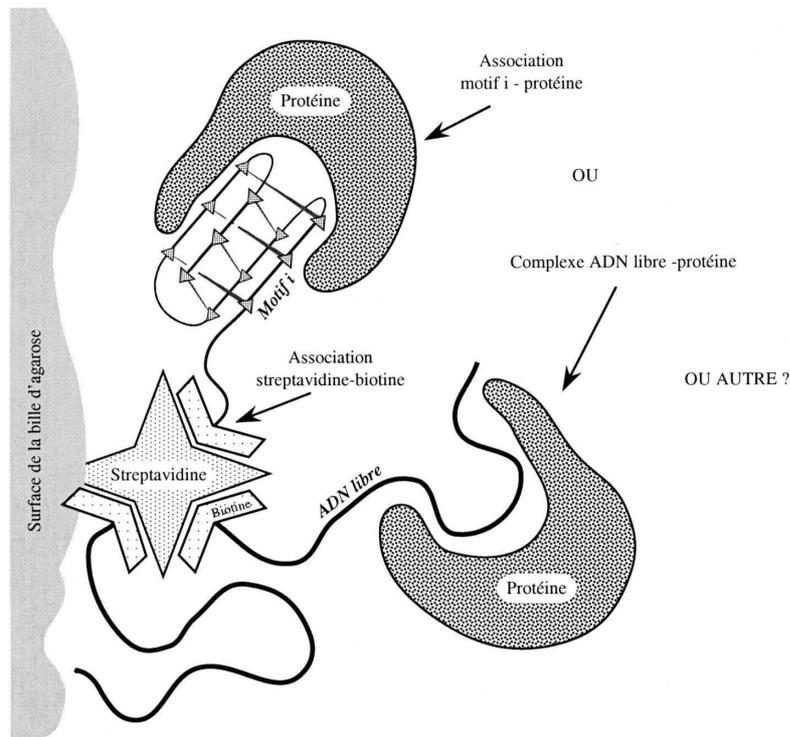


Figure 4.1.: Séparation par affinité. Quelle que soit la structure adoptée par la séquence Tlev et reconnue par les protéines, la formation du complexe ADN-protéines doit rester possible malgré la présence d'une biotine à l'extrémité 5' et la proximité immédiate de la streptavidine et de son support.

Pour nous assurer que la séquence modifiée n'entraînera pas l'association artificielle d'autres protéines, et vérifier la longueur du segment de thymine nécessaire et suffisant pour ne pas perturber la structure adoptée par l'ADN, nous avons réalisé plusieurs essais de migrations électrophorétiques en conditions natives, à partir de protéines non purifiées et de séquences présentant des variations de la longueur du bras de thymine (tableau 4.1.).

Noms	Séquences (5'→3')
<b>Tlev</b>	<b>d (CCCACACCCACACCCACACCC)</b>
TBT <sub>2</sub> Tlev	dT-B-d (TTCCCACACCCACACCCACACCC)
T <sub>4</sub> Tlev	d (TTTTCCCACACCCACACCCACACCC)
<b>BTlev</b>	<b>B-d (TTTTCCCACACCCACACCCACACCC)</b>
TBTlev	dT-B-d (TTTTCCCACACCCACACCCACACCC)
TBT <sub>7</sub> Tlev	dT-B-d (TTTTTTTCCCACACCCACACCCACACCC)

Tableau 4.1. : Séquences testées en prévision de la séparation par affinité.

On constate que l'insertion d'une biotine (séquences BTlev\* et TBTlev\*, figure 4.2.), de même que l'allongement de la séquence Tlev par une suite de 4 thymine (séquence T<sub>4</sub>Tlev\*), ne permet pas

de visualiser de nouvelle bande de protéines intense. Il en va de même lors de tests réalisés pour des suites de 2 ou 7 thymines (résultats non montrés).

On remarque également que le rendement de kination est moins bon pour ces séquences qu'avec la séquence Tlev\* (notamment pour la séquence BTlev\* où la biotine est située à l'extrémité 5' du fragment d'ADN).

+	+	-	-	-	Tlev*
-	-	+	-	-	TBTlev*
-	-	-	+	-	BTlev*
-	-	-	-	+	T4Tlev*
-	+	+	+	+	Extraits de protéines

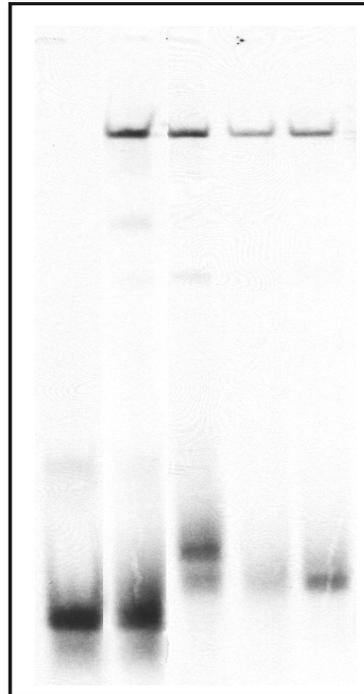


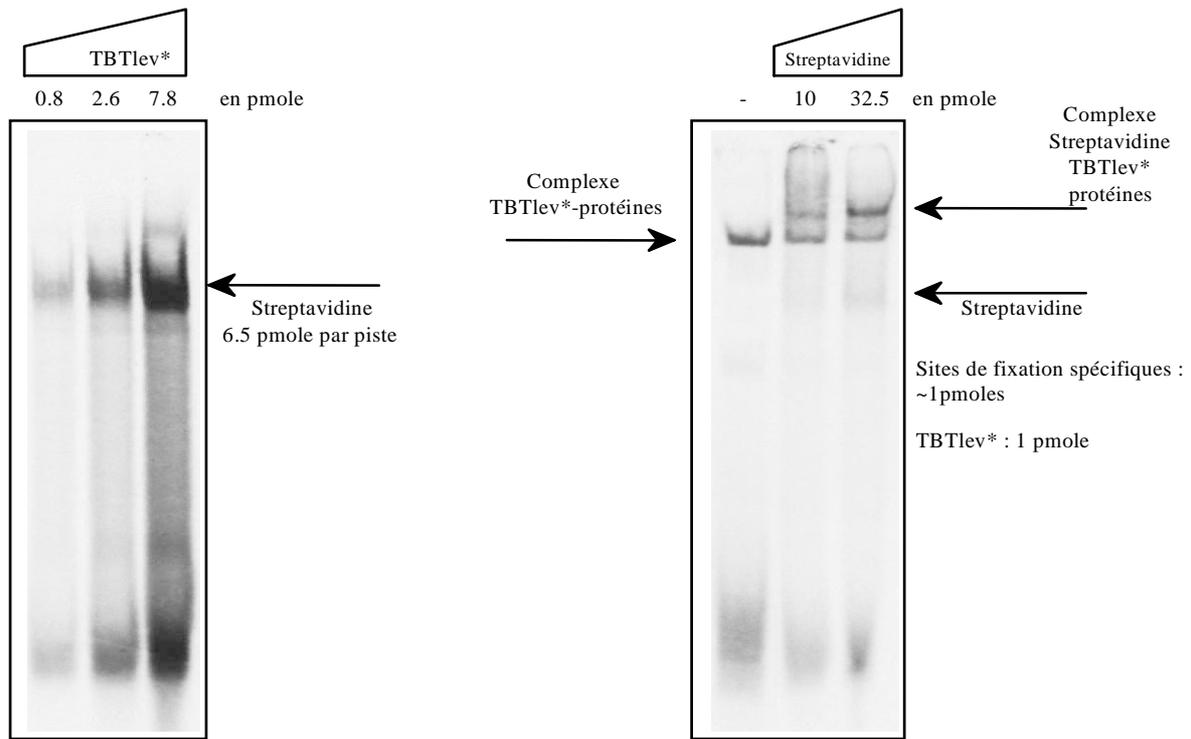
Figure 4.2. : Comparaison entre les migrations électrophorétiques observées pour la séquence Tlev\* et pour les séquences T<sub>4</sub>Tlev\*, BTlev\* et TBTlev\*. Les concentrations en ADN\* sont identiques (~ 65 nM). Sites de fixation spécifiques ~ 0.5pmol

En fonction de ces expériences, le choix du ligand utilisé pour les expériences de séparation par affinité s'est porté sur la séquence BTlev, dont les rendements de synthèse étaient supérieurs à ceux de séquences plus longues.

## 1-2- Le complexe streptavidine-biotine-ADN-protéines

Nous avons vérifié la formation d'un complexe streptavidine-biotine-ADN-protéines unique par migration électrophorétique en conditions natives. Pour cela, nous avons utilisé la séquence TBTlev\* comme sonde radioactive. Dans un premier essai, nous avons vérifié que cette séquence

s'associait avec de la streptavidine à pH 8, température ambiante, en présence de KCl 50 mM durant 15 minutes dans un volume d'incubation de 25  $\mu$ l (figure 4.3.a.). Nous avons constaté la présence d'un complexe streptavidine-biotine-ADN-protéines (sous la forme d'une bande retardée supplémentaire) après incubation dans des conditions d'incubation non dénaturantes (figure 4.3.b.). De plus, l'intensité de la bande retardée habituellement observée a diminué.



(a) Complexe streptavidine-TBTlev\* en fonction de [TBTlev\*]

(b) Complexe streptavidine-TBTlev\*-protéines en fonction de [streptavidine]

Figure 4.3. : (a) Formation du complexe streptavidine-biotine-ADN. (b) Formation du complexe streptavidine-biotine-ADN-protéines unique.

### 1-3- Description du mode opératoire

Afin de vérifier qu'il n'existait pas d'interaction entre la résine-streptavidine et les protéines, nous avons procédé à des essais d'incubation par lots entre la résine (sans le ligand d'ADN) et les protéines. Pour un rapport égal à 1/5 et une incubation de 18h à 4°C dans TBE 0.5x, pH 7.4, 150 mM KCl, l'activité retardante n'est pas affectée. Mais elle est perdue, de même que toutes les autres protéines de l'extrait, si le rapport (volume de billes en suspension (1.4 mg de streptavidine / ml de

résine en suspension) / volume de protéines (1mg de protéines /ml d'extraits)) est supérieur à 1 (vraisemblablement suite à une agrégation ou un amalgame entre résine et protéines).

Lors de nos essais de purification par affinité, nous avons travaillé avec 20  $\mu$ l de résine-streptavidine en suspension ( $\sim$  2 nmol de sites de fixation de biotine ), pour 100 - 200 $\mu$ l d'extraits protéiques ( $\sim$  8 - 24 pmol de sites de fixation spécifiques), à pH 7.4 et température ambiante.

#### 1-4- Essais de purification en conditions natives

Selon le principe de la séparation par affinité, après incubation des protéines avec la résine-streptavidine préalablement saturée en ADN ligand BTlev, nous avons procédé à des lavages successifs des billes avec le même tampon que celui servant à l'incubation (6 x 1 ml de TBE 0.5x, pH 7.4, 150 mM KCl), avant d'essayer de séparer les protéines du ligand BTlev par élution.

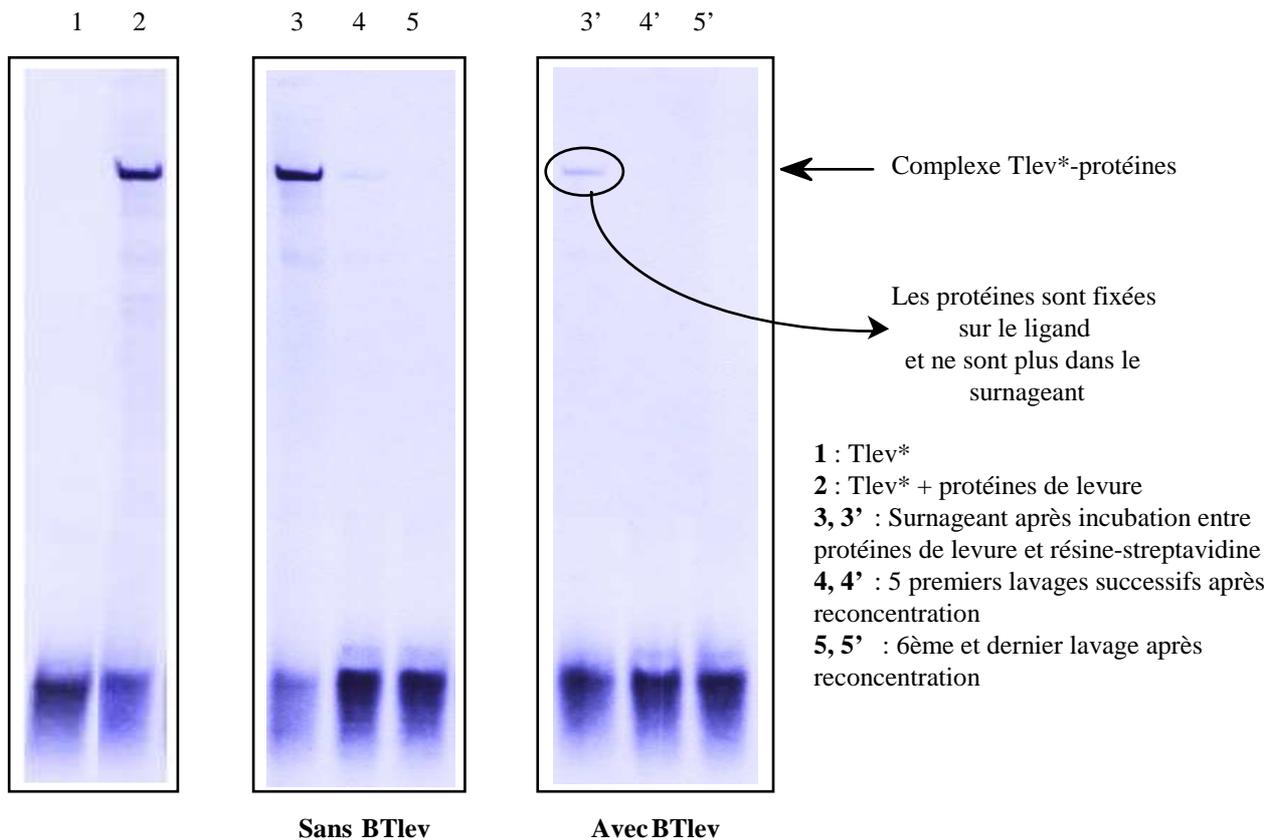


Figure 4.4. : Comparaison entre les surnageants obtenus après contact entre les protéines de levure et la résine-streptavidine porteuse ou non du ligand BTlev

Pour contrôler l'efficacité de l'association spécifique des protéines avec le ligand, nous avons observé systématiquement par migration électrophorétique non dénaturante, les différents surnageants obtenus lors des lavages (figure 4.4.). Aucune bande retardée n'étant relevée pour ces lavages, nous en avons conclu que les protéines sont effectivement fixées sur la matrice d'affinité.

Pour procéder à la séparation entre protéines et ligands, nous avons testé différentes conditions d'élution :

- variation du pH (de pH 7 à pH 8)
- augmentation de la force ionique (de 150 mM à 2 M KCl)
- passage en NaCl (variation de la concentration de 150 mM à 2 M)
- passage en urée (de 2 à 6 M, puis élimination de l'urée par filtration à l'aide des tubes reconcentrateurs).

Aucun de ces procédés n'a permis d'obtenir une activité retardante. Deux types d'explications sont possibles :

- les protéines sont restées liées à l'ADN sur les billes;
- les protéines recherchées sont partiellement éluées, mais le complexe protéique s'est dissocié de manière irréversible pendant ou après l'élution.

## 2- Identification différentielle de protéines

### 2-1- Principe de l'expérience

Ayant mis en évidence la fixation des protéines spécifiques sur la résine d'affinité, (figure 4.4.), nous avons entrepris d'identifier ces protéines par différenciation entre l'ensemble des protéines provenant de résines porteuses du ligand BTlev et celles provenant de résines sans ligand.

Pour éliminer les protéines s'associant à la résine d'agarose, nous procédons à une incubation préalable entre les protéines et de la résine-streptavidine sans ligand BTlev. Ce premier surnageant est partiellement débarrassé des protéines spécifiques de la résine et contient cependant les

protéines recherchées, comme en atteste une migration électrophorétique non dénaturante après incubation avec Tlev\*.

Afin d'éliminer des associations artéfactuelles entre des protéines non spécifiques et la séquence BTlev, l'incubation entre les protéines du premier surnageant et les résines porteuses ou non de BTlev, a lieu en présence d'un excès de T<sub>14</sub> dont on a vu au chapitre III paragraphe 2-5 qu'il ne s'associait pas trop avec les protéines recherchées.

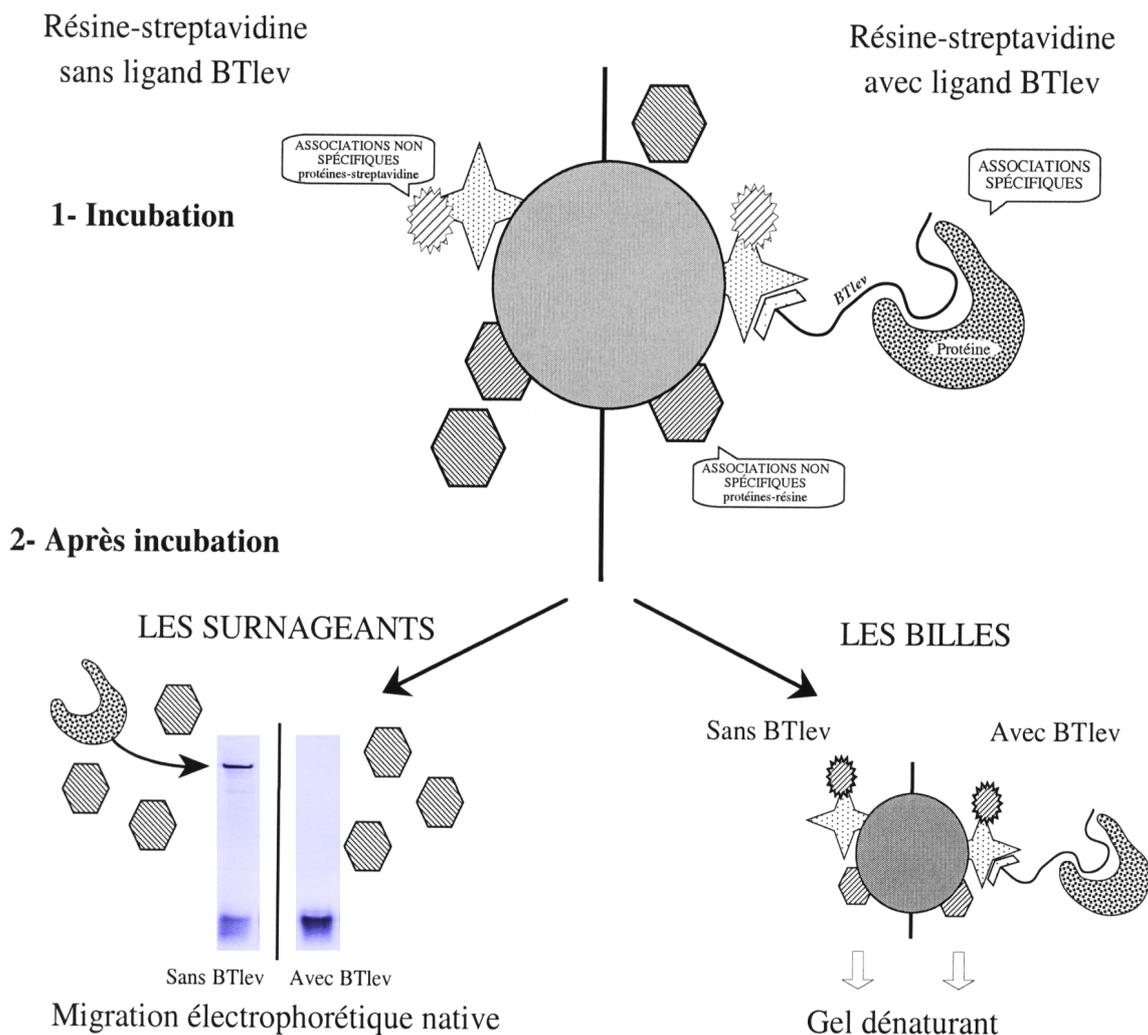


Figure 4.5. : Principe permettant d'identifier les protéines recherchées par différenciation entre l'ensemble des protéines provenant des billes de résine porteuses du ligand BTlev et celles provenant de billes ne portant pas la séquence BTlev.

On étudie dans les deux cas, avec et sans ligand, les protéines restant sur les billes, en les dénaturant et en faisant une migration électrophorétique dénaturante (cf. chapitre II). Nous nous assurons de la

réussite de l'association entre les protéines et le ligand BTlev en réalisant un gel non dénaturant avec les différents surnageants.

En l'absence de T<sub>14</sub>, on visualise 12 bandes de protéines, absentes dans le cas des billes sans ligand BTlev et 9 bandes quand l'incubation a lieu en présence de 100 fois plus de T<sub>14</sub> que de ligand (figure 4.6.). En présence de 1000 fois plus de T<sub>14</sub> on ne visualise plus que trois bandes différenciées, dont un doublet intense (agrandissement de la figure 4.6.). C'est donc en présence de 1000 fois plus de T<sub>14</sub> que de ligand lors de l'incubation que nous avons procédé aux découpages des bandes de protéines devant servir aux identifications par spectrométrie de masse. On proposera une brève étude de la bande de plus faible intensité au chapitre V.

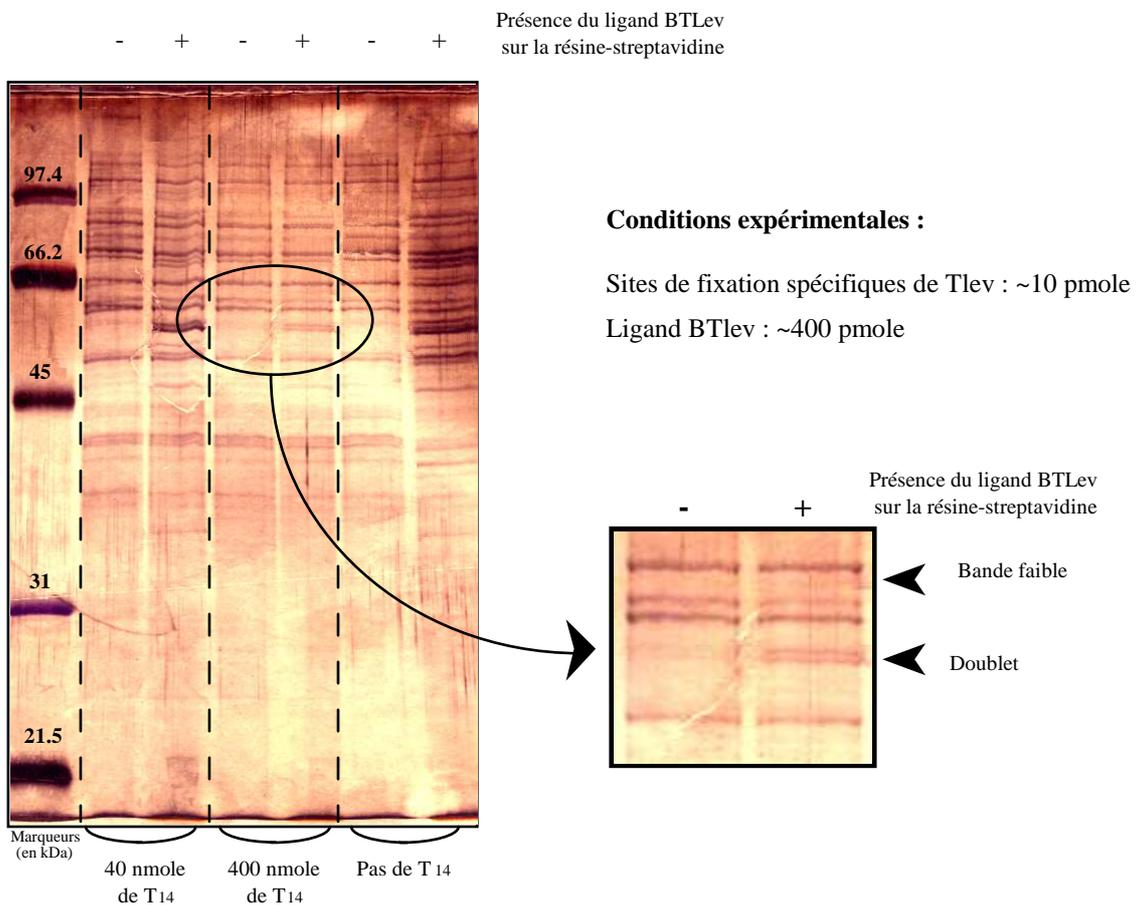


Figure 4.6. : Migration électrophorétique dénaturante réalisée à partir de résine-streptavidine porteuse ou non du ligand BTlev, en fonction d'un excès de T<sub>14</sub> par rapport à BTlev. La coloration des protéines est obtenue par double coloration (Bleu de Coomassie / nitrate d'argent).

## 2-2- Séquençage des protéines identifiées

Lors de l'étude des protéines du doublet, nous identifions trois protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p, s'associant à la séquence Tlev. Ces trois protéines ont des séquences extrêmement proches (voir figure 4.7. et alignements de séquences en annexes). Aussi, afin de lever les incertitudes inhérentes à ces similitudes, nous avons dû procéder selon trois voies d'identification distinctes :

- la spectrométrie de masse MALDI
- la spectrométrie de masse en tandem MSMS
- le séquençage N-terminal par dégradation d'Edman

	1	11	21	31	41	51		
YHR216W	1	MAAIRdykta	ldftkslprp	dglsvqelmd	skirggltyn	dflilpplvd	fassevslqt	60
YLR432W	1	maavrDYKTA	LEFAKSLPR	<b>DGLSVQELMD</b>	SKtrggltyn	dflvlpplvd	fpssevslqt	60
YML056C	0	MSAAPLDYKKA	LEHLKTYSSK	DGLSVQELMD	STTRGGLTYN	DFLVLPLVNV	FPSSAVSLQT	60
YHR216W	61	kltrnitlni	plvsspmdtv	tesematfma	llggigfihh	nctpedqadm	vrrVKNYENG	120
YLR432W	61	kltrnitlnt	pfvsspmdtv	tesemaifma	llggigfihh	nctpedqadm	vrrVKNYENG	120
YML056C	61	kltkkitlnt	pfvsspmdtv	teadmaiyma	llggigfihh	nctpkEQASM	VKKVKMFENG	120
YHR216W	121	FINNPVIVISP	TTTVGEAKSM	KEKYGFAGFP	VTTDGKRNAK	LVGVITSRDI	QFVEDNSLLV	180
YLR432W	121	FINNPVIVISP	TTTVGEAKsm	kERFGFSGFP	VTEDGKRNGK	LMGIVTSRDI	QFVEDNSLLV	180
YML056C	121	FINSPIVIVISP	TTTVGEVKvm	krKFGFSGFP	VTEDGKCPGK	LVGLVTSRDI	QFLEDDSLV	180
YHR216W	181	QVMTKKNPVT	GAQGITLSEG	NEILKkikk	rllvvdekgn	lvsmlsrtdl	mkNQNYPLAS	240
YLR432W	181	QVMTKKNPVT	GAQGITLSEG	NEILKkikk	kLLIVDDNGN	LVSMLSRDLD	MKNQNYPLAS	240
YML056C	181	SEVMTKnpvt	gikgitlkeg	neilkQTKKG	KLLIVDDNGN	LVSMLSRADL	MKNQNYPLAS	240
YHR216W	241	Ksantkqllc	gasigtmdad	kerLRLLVKa	gldvildss	qgnsifelnm	lkwvkesfpg	300
YLR432W	241	KSATTKQLLC	GAAIGTIDAD	KERLRLlvea	gldvildss	qgnsifqlnm	ikWIKETFPD	300
YML056C	241	KSATTKQLLC	GAAIGTIEAD	KERlrlvea	gldvildss	qgnsvfqlnm	ikWIKETFPD	300
YHR216W	301	leviagnvvt	rEQAANLIAA	GADGLRigm	tgsicitqev	macgrpqgta	vynvcefanq	360
YLR432W	301	LEIIAGNVAT	REQAANLIAA	GADGLRigm	sgsicitqev	macgrpqgta	vynvcefanq	360
YML056C	301	LEIIAGNVAT	REQAANLIAA	GADGLRigm	sgsicitqev	macgrpqgta	vynvcqfanq	360
YHR216W	361	fgvpcmadgg	vqnightka	lalgssstvm	ggmlagttes	pgeyfyqdgk	rlkAYRGMGS	420
YLR432W	361	fgvpcmadgg	vqnightka	lalgssstvm	ggmlagttes	pgeyfyqdgk	rlkAYRGMGS	420
YML056C	361	fgvpcmadgg	vqnightka	lalgssstvm	ggmlagttes	pgeyfykdgk	rlkayrGMGS	420
YHR216W	421	IDAMQKTGTK	GNASTSRYFS	ESDSVLVAQG	VSGAVVDKGS	IKKfipylyn	glqhsccdig	480
YLR432W	421	IDAMQKTGTK	GNASTSRYFS	ESDSVLVAQG	VSGAVVDKGS	IKKfipylyn	glqhsccdig	480
YML056C	421	IDAMQKTGNK	GNASTSRYFS	ESDSVLVAQG	VSGAVVDKGS	IKKfipylyn	glqhsccdig	480
YHR216W	481	crSLTLLKNN	VQRgkVRFEF	RTASAQLEGG	VHNLHSYEKR	LHN		
YLR432W	481	ykSLTLLKEN	VQSGKVRFEF	RTASAQLEGG	VHNLHSYEKR	LHN		
YML056C	481	cesltslken	vqngevrFEF	RTASAQLEGG	VHNLHSYEKR	LYN		

Figure 4.7. : Identifications obtenues. En rouge, les peptides identifiés par spectrométrie de masse MALDI; en bleu, les peptides identifiés par séquençage N-terminal par dégradation d'Edman ; en encadré, le peptide déterminé par spectrométrie de masse en tandem, spécifique de Ylr432p

Pour nous assurer que nous avons bien identifié des protéines spécifiques de Tlev, nous avons procédé à une expérience parallèle où le ligand d'ADN était la séquence T<sub>26</sub> biotinylée à l'extrémité 5'. Nous ne retrouvons aucune bande correspondant aux protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p

dans cette expérience parallèle. Ce résultat conforte nos identifications et relativise la compétition observée entre T<sub>26</sub> et Tlev.

### 2-2-1- Spectroscopie MALDI

Les résidus peptidiques de la trypsine ont servi pour la calibration interne des expériences de spectrométrie de masse MALDI (figure 4.8. pour exemple). La plupart des peptides identifiés sont communs à deux ou trois des protéines (cf. alignements de séquences en annexes). Cependant la présence d'au moins trois peptides réellement spécifiques de chaque protéine a permis une identification sûre. En spectrométrie de masse, l'intensité d'un pic de spectrométrie de masse n'est pas directement reliée à la concentration du peptide correspondant dans l'échantillon. En effet, l'efficacité de la désorption de la matrice de DHB est différente selon les peptides. De plus, certains peptides peuvent être perdus par adsorption sur les surfaces des récipients de préparation, etc.

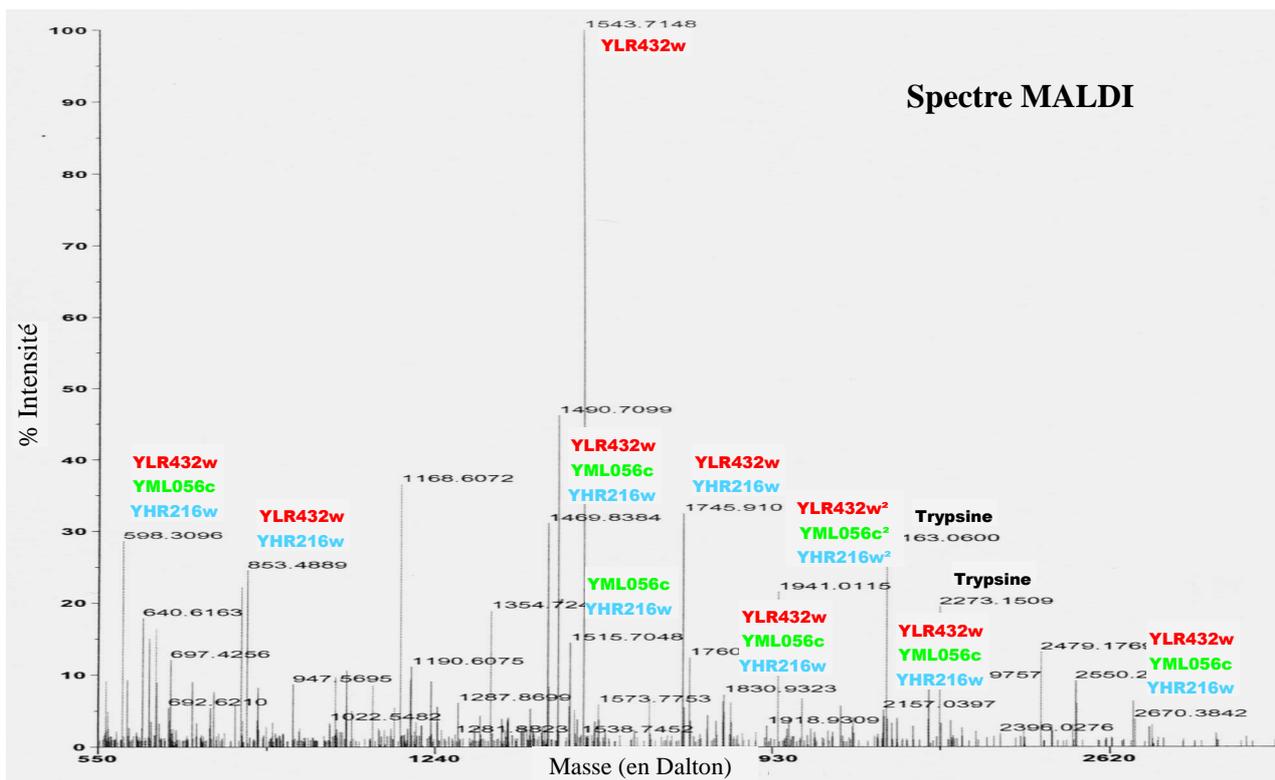


Figure 4.8. : Exemple de spectre MALDI-TOF. Seuls les pics les plus intenses correspondant à des peptides des protéines Yhr216p, Yml056p et Ylr432p ou de la trypsine sont indexés. Nous avons identifié pour cette expérience, 24 peptides pour la protéine Ylr432p, 19 peptides pour la protéine Yml056p et 18 peptides pour la protéine Yhr216p, représentant des taux de recouvrement des séquences de 45.3%, 40.1% et 36.5% respectivement. <sup>2</sup> Le pic à 1941.0115 Da correspond à deux peptides communs aux trois protéines (masses de ces peptides : 1940.946 Da et 1941.029 Da).

D'autre part, les spectres de la bande inférieure du doublet de protéines (figure 4.6.), ne contiennent aucun peptide provenant des parties N-terminales des protéines Ylr432p, Yml056p et Yhr216p. Ceci suggère que cette bande correspond à une dégradation N-terminale.

Gènes	Acides aminés identifiés	Taux de recouvrement	Nombre de fragments peptidiques identifiés
<i>YHR216W</i>	217 / 523	41.5 %	23
<i>YLR432W</i>	296 / 523	56.6 %	35
<i>YML056C</i>	304 / 524	58.0 %	36

Tableau 4.2. : Résultats obtenus lors des identifications MALDI réalisées avec la séquence BTlev

### 2-3-2- Spectroscopie en tandem ESI Q-TOF MSMS

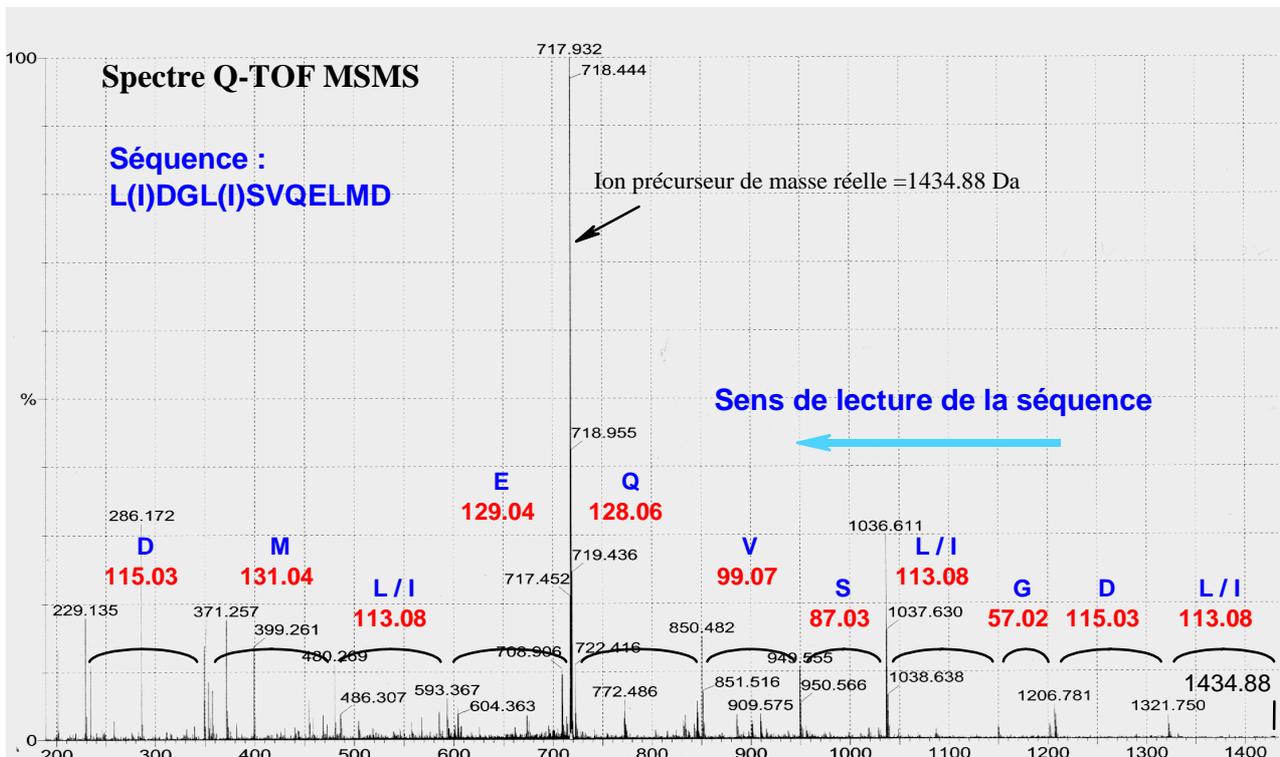


Figure 4.9. : Exemple de spectre obtenu par spectroscopie de masse en tandem MS/MS. Le peptide précurseur sélectionné a une masse de 1434.8 Da. La séquence déterminée ici est spécifique d'un peptide de la protéine Ylr432p.

Après avoir sélectionné un peptide (choisi par analyse des résultats obtenus en spectrométrie de masse MALDI) pouvant correspondre spécifiquement à une seule des trois protéines, nous avons procédé à des expériences de spectrométrie de masse en tandem visant à confirmer l'identification et la présence des trois protéines dans les bandes de protéines sélectionnées. Ces expériences ont permis de formellement identifier un peptide (figure 4.9.) spécifique de la protéine Ylr432p dont la masse réelle de l'ion précurseur est :  $718.44 \times 2 - 2 = 1434.88$  Da. Ces expériences ont confirmé plusieurs autres peptides communs à deux des trois protéines identifiées.

### 2-3-3-Séquençage par dégradation d'Edman

Aucun séquençage N-terminal n'a pu être pratiqué directement à partir de protéines séparées préalablement lors d'une migration électrophorétique dénaturante, transférées sur membrane de PVDF, et identifiées après coloration au noir amido. La cause probable de ce blocage est l'acétylation prédite dans l'étude réalisée par Huang (Huang *et al.*, 1987).

Cependant, après digestion enzymatique (endolysine-C) réalisée sur les protéines du doublet étudié par spectrométrie de masse, on obtient l'identification d'un peptide spécifique de la protéine Yml056p (MFENGFINSPIVISP) et d'un peptide commun aux protéines Yhr216p, Ylr432p et Yar073p (NPVTGAQGITLSEGN). Cette analyse confirme définitivement la présence de la protéine Yml056p dans les bandes de protéines analysées.

## 3- Reconnaissance du brin complémentaire riche en G

### 3-1- Caractérisation de l'association

Après incubation du brin complémentaire de la séquence Tlev, d[(GGGTGT)<sub>3</sub>GGG] (appelé par la suite GTlev) avec les extraits de protéines de levure non purifiés, on procède à une migration électrophorétique en conditions non dénaturantes. On observe trois bandes retardées, nommées A, G et B (piste 2, figure 4.10.). La bande retardée G est au même niveau et présente une intensité comparable à la bande retardée (notée C) observée dans le cas d'une incubation avec comme sonde radioactive la séquence Tlev\* (piste 6).

Lorsque l'on mélange les deux brins complémentaires marqués radioactivement, de façon à avoir un excès de brin Tlev\*, on observe en piste 3 la formation du double brin, et l'excès de brin Tlev\*. Après incubation avec les extraits de protéines, nous constatons l'apparition de trois nouvelles bandes retardées correspondant vraisemblablement à des protéines fixant le double brin d'ADN. La majeure partie du signal Tlev\* est complexée soit avec les protéines, soit avec le brin complémentaire GTlev\*. La résolution du gel ne permet pas de résoudre les bandes C et G. Les quantités de brin GTlev\* utilisées lors de ces expériences étant constantes, la séquence radioactive GTlev\*, qui se répartissait totalement entre les bandes A, G et B (piste 2), se répartit maintenant entre les bandes A, db3, db, G, db2, B et dans l'association en double hélice avec le brin complémentaire Tlev\*.

	+	+	+	+	-	-	+	+	GTlev*
	-	-	+	+	+	+	-	-	Tlev*
	-	-	-	-	-	-	+	+	Tlev
	-	+	-	+	-	+	-	+	Sites spécifiques de
	1	2	3	4	5	6	7	8	Tlev : ~0.5 pmole

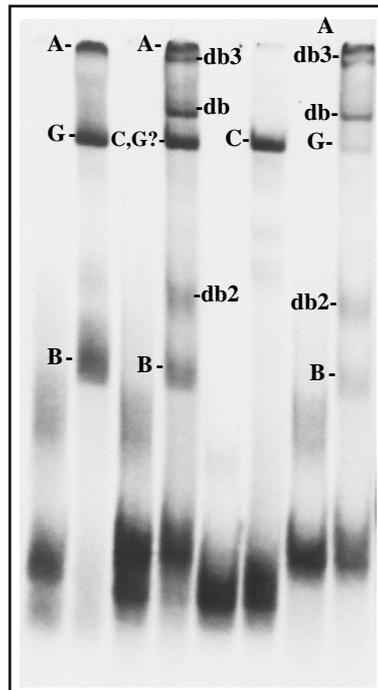


Figure 4.10. : Migration électrophorétique en conditions non dénaturantes réalisées après incubation des protéines de levure avec les fragments télomériques Tlev\*, Tlev et GTlev\*.

Brins Tlev\* et Tlev : ~ 1pmol

Brin GTlev\* : ~ 0.5 pmol

Pour les pistes 7 et 8, le brin Tlev est en quantité identique à celles de Tlev\* utilisées dans les autres pistes et n'est pas marqué radioactivement. On confirme que tout le brin GTlev\* est recruté dans la formation du double brin d'ADN. En piste 8, on note la présence des bandes db, db2 et db3, d'intensités plus faibles qu'en piste 4 (où les deux brins étaient radioactivement marqués), indiquant

que ces protéines sont spécifiques du double brin. On remarque aussi la présence des bandes retardées A, G et B, ayant dans le cas des bandes G et B une intensité nettement plus faible que celles observées en piste 2.

Toutes ces observations ne permettent pas de conclure que la bande G et la bande C correspondent à une seule et même protéine, car tout le brin GTlev\* est associé en double brin d'ADN, pour lequel la protéine de la bande G ne semble pas avoir d'affinité. Mais on peut penser qu'il s'agit de la même protéine, saturée par la séquence Tlev (cf. piste 6) plus affine que le double brin ou GTlev\*.

Pour vérifier que les bandes G et C étaient vraisemblablement dues à une même protéine, nous avons profité des propriétés des surnageants récupérés après incubation entre les résines greffées ou non avec le ligand BTlev. Dans un cas, nous obtenions un signal retard avec la séquence Tlev\*, dans l'autre cas, un faible signal (figure 4.4).

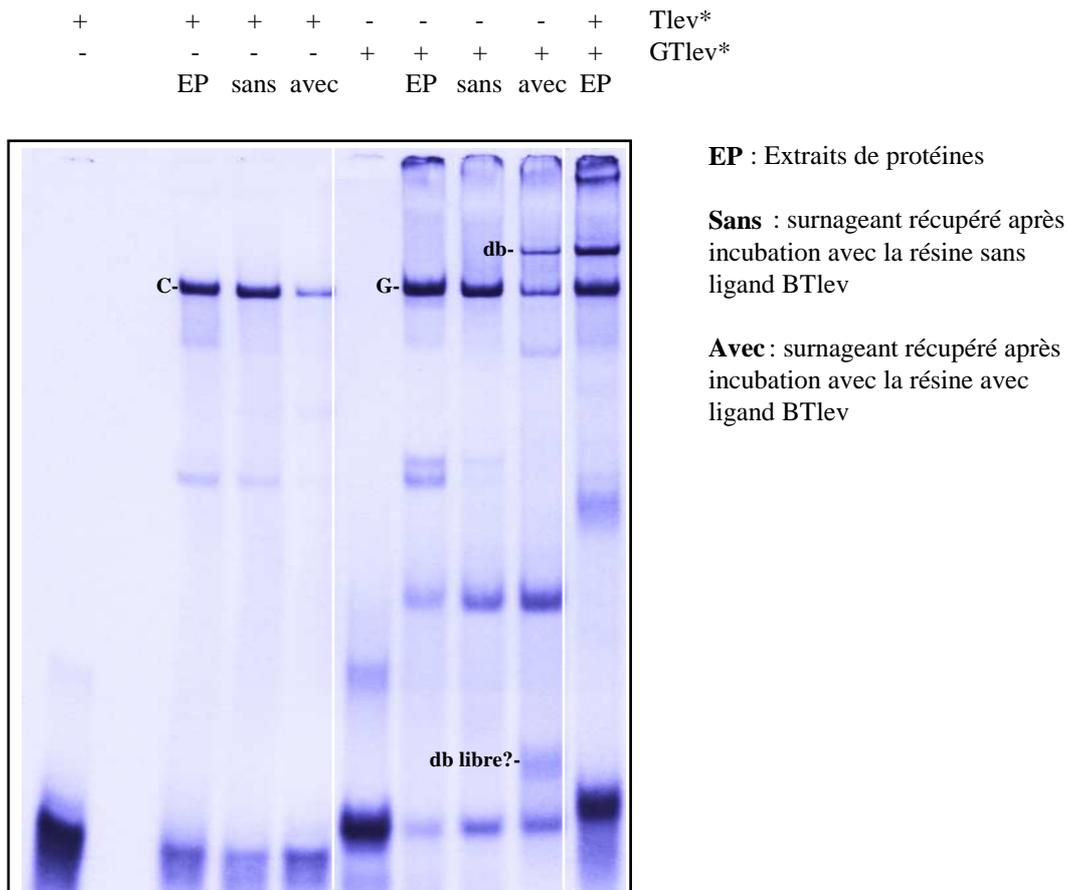


Figure 4.11. : Migrations électrophorétiques natives obtenues à partir des surnageants de l'expérience d'identification par affinité avec ou sans le ligand BTlev, pour les sondes radioactives Tlev\* et GTlev\*.

Lors de l'expérience présentée en figure 4.11., on note que l'intensité de la bande G décroît comme celle de la bande C, pour le surnageant correspondant aux protéines ayant incubé en présence du ligand BTlev. Cela semble confirmer que les protéines responsables de la bande retardée C obtenue avec la séquence Tlev\* ont une mobilité électrophorétique identique à la bande retardée G.

Par ailleurs, on visualise à nouveau la bande référencée db dans la figure 4.10. On peut supposer que les protéines de la bande C sont initialement partiellement liées à de l'ADN riche en cytosines présents dans les extraits protéiques. Lors de l'incubation avec la résine porteuse du ligand BTlev, la compétition entre la séquence BTlev et l'ADN riche en C libère celui-ci. Présent dans le surnageant, il peut alors former avec GTlev\* un double brin, dont la bande diffuse notée 'db libre?' pourrait correspondre à la forme libre, et s'associer avec les protéines spécifiques du double brin.

Sans réaliser une étude aussi complète que celle entreprise pour déterminer la spécificité de l'association de Tlev à des protéines, nous avons vérifié ce qui se passait avec les compétiteurs T<sub>14</sub> et ds10 précédemment définis. Nous n'observons aucune compétition avec ces séquences (rapport compétiteur / GTlev\* ~ 10000).

Par contre, l'affinité des protéines pour les séquences GTlev et d[A(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG] semble être la même.

### 3-2- Identification par affinité

Il était intéressant de vérifier l'identification par affinité des protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p avec le ligand BGTlev (=d[BTTTT(GGGTGT)<sub>3</sub>GGG]). Pour cela, nous avons utilisé le même mode opératoire que dans le cas de l'identification avec la séquence BTlev.

Comme dans le cas de l'expérience d'identification différentielle réalisée avec le ligand BTlev, nous procédons à une première incubation entre les protéines et de la résine-streptavidine non porteuse de ligand. Puis nous avons procédé à une incubation entre les protéines et les résines greffées ou non avec le ligand BGTlev, en présence d'un excès de T<sub>14</sub>.

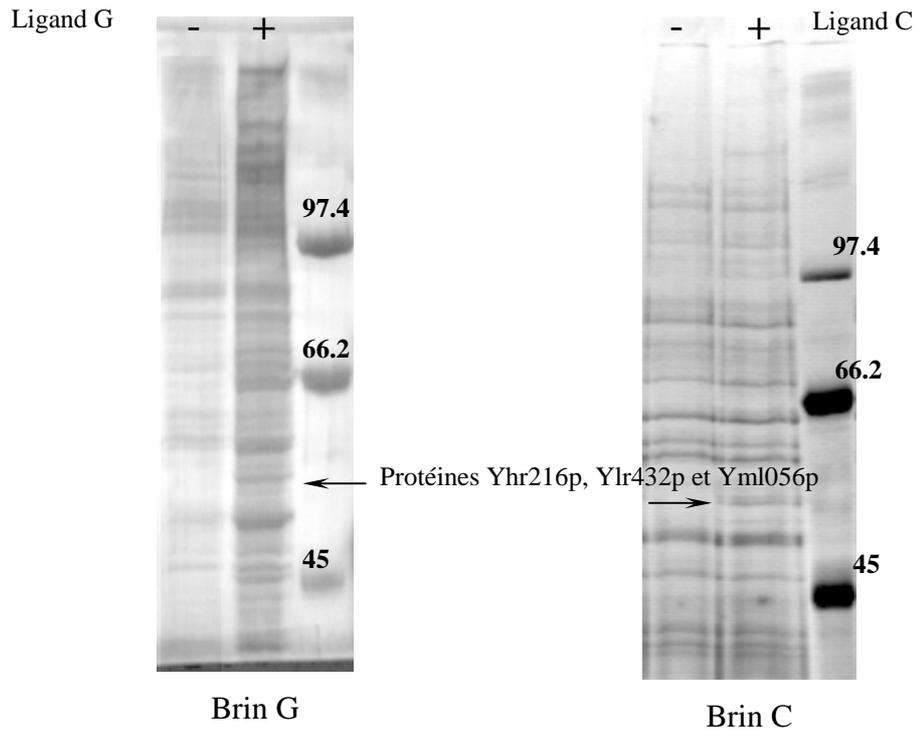


Figure 4.12. : Comparaison entre les migrations électrophorétiques dénaturantes réalisées à partir de résine-streptavidine porteuse ou non du ligand BGTlev (gel de résolution à 8% d'acrylamide) ou du ligand BTlev (gel de résolution à 10% d'acrylamide). Les photographies présentées correspondent aux gels colorés selon le protocole de coloration au sulfate de zinc avant découpage de bandes de protéines pour analyse par spectrométrie de masse.

Nous différencions plusieurs bandes de protéines (migration électrophorétique dénaturante colorée au sulfate de zinc de la figure 4.12.) d'intensités inégales, dont une bande intense de masse ~ 50 kDa. A nouveau, nous obtenons une identification par spectrométrie de masse MALDI des protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p. Les résultats obtenus (figure 4.13.) sont présentés et comparés aux résultats obtenus précédemment dans le tableau 4.2. Comme dans le cas des identifications réalisées avec le brin BTlev, certains peptides identifiés sont spécifiques d'une seule des trois protéines, ce qui nous assure de la présence de ces trois protéines lors de l'association avec le ligand BGTlev.

Aucune des autres bandes ne permet d'obtenir d'identification formelle de protéines (principalement par manque de matériel peptidique à analyser). Nous n'avons pas noté d'autres protéines communes entre les expériences réalisées avec l'ADN télomérique riche en cytosines et l'ADN télomérique riche en guanines, ni de protéines déjà connues pour se lier au brin G des télomères de levure.

	1	11	21	31	41	51	
YHR216W	1	maairdykTA	LDFTKslprp	dglsvqelmd	skirggltyn	dflilpplvd	fassevslqt 60
YLR432W	1	maavrдыkta	lefakslprl	dglsvqelmd	sktrggltyn	dflvlpplvd	fpsssevslqt 60
YML056C	0	msaaplдыkka	lehlktyssk	dglsvqelmd	sttrggltyn	dflvlpplvn	fpssavslqt 60
YHR216W	61	kltrnitlni	plvsspmdtv	tesematfma	llggigfihh	nctpedqadm	vrrvknyeng 120
YLR432W	61	kltrnitlnt	pfvsspmdtv	tesemaifma	llggigfihh	nctpedqadm	vrrvknyeng 120
YML056C	61	kltkkitlnt	pfvsspmdtv	teadmaiyma	llggigfihh	nctpkeqasm	vkkvkMFENG 120
YHR216W	121	finnpivisp	tttvgeaksm	kekygfagfp	vttgdgkrnak	LVGVITSRdi	qfvednsliv 180
YLR432W	121	finnpivisp	tttvgeaksm	kerfgfsgfp	vtedgkrNGK	LMGIVTSRdi	qfvednsliv 180
YML056C	121	FINSPIVISP	TTTVGEVKvm	krkfgfsgfp	vtedgkcpgek	LVGLVTSRdi	qfledsliv 180
YHR216W	181	qdvmtkNPVT	GAQGITLSEG	NEILKkikk	rllvvdekgn	lvsmrlrtdl	mknqnyplas 240
YLR432W	181	qdvmtkNPVT	GAQGITLSEG	NEILKkikk	kllivddngn	lvsmrlrtdl	mknqnyplas 240
YML056C	181	sevmtnpvt	gikgitlkeg	neilkqtkek	kllivddngn	lvsmrlrADL	MKnqnyplas 240
YHR216W	241	ksantkqllc	gasigtmdad	kerlrllvka	gldvvildss	qgnsifelnm	lkvwkesfpg 300
YLR432W	241	kSATTKQLLC	GAAIGTIDAD	KERlrllvea	gldvvildss	qgnsifqlnm	ikwikETFPD 300
YML056C	241	ksattkqllc	gaaigtiead	kerlrllvea	gldvvildss	qgnsvfqlnm	ikwikETFPD 300
YHR216W	301	leviagnvvt	rEQAANLIAA	GADGLRigmg	tgsicitqev	macgrpqgta	vynvcefanq 360
YLR432W	301	LEIIAGNVAT	REQAANLIAA	GADGLRigmg	sgsicitqev	macgrpqgta	vynvcefanq 360
YML056C	301	LEIIAGNVAT	REQAANLIAA	GADGLRigmg	sgsicitqev	macgrpqgta	vynvcqfanq 360
YHR216W	361	fgvpcmadgg	vqnighitka	lalgssstvm	ggmlagttes	pgeyfyqdgk	rlkayrGMGS 420
YLR432W	361	fgipcmadgg	vqnighitka	lalgssstvm	ggmlagttes	pgeyfyqdgk	rlkayrGMGS 420
YML056C	361	fgvpcmadgg	vqnighitka	lalgssstvm	ggmlagttes	pgeyfykdgk	rlkayrGMGI 420
YHR216W	421	IDAMQKtgtk	gnastsrYFS	ESDSVLVAQG	VSGAVVDKgs	ikkFIPYLYN	GLQHSCQDIG 480
YLR432W	421	IDAMQKtgtk	gnastsrYFS	ESDSVLVAQG	VSGAVVDKgs	ikkFIPYLYN	GLQHSCQDIG 480
YML056C	421	IDAMQKtgkn	gnastsrYFS	ESDSVLVAQG	VSGAVVDKgs	ikkfipylyn	glqhsccdig 480
YHR216W	481	CRsltllknn	vqrgkvrFEF	RTASAQLEGG	VHNLHSYEK	lhn	
YLR432W	481	YKsltllken	vqsgkvrFEF	RTASAQLEGG	VHNLHSYEK	lhn	
YML056C	481	cesltslken	vqngevrFEF	RTASAQLEGG	VHNLHSYEK	lyn	

Figure 4.13. : Résultats obtenus par identification MALDI avec le ligand BGTlev.

Gènes	Acides aminés identifiés	Taux de recouvrement
YHR216W	121 (217) / 523	23.1 % (41.5 %)
YLR432W	154 (296) / 523	29.6 % (56.6 %)
YML056C	120 (304) / 524	22.9 % (58.0 %)

Tableau 4.3. : Résultats obtenus lors des identifications MALDI réalisées avec la séquence BGTlev et comparaisons avec ceux obtenus avec le ligand BTlev entre parenthèses.

### 3-3- Implication biologique

Les trois protéines identifiées pourraient fixer séparément le simple brin télomérique riche en C et le simple brin riche en G. Or sur le modèle des fragments télomériques humains, ces deux séquences sont capables de former *in vitro*, des structures canoniques particulières. (le motif i (Phan, 1999 et Phan et al., 2000) pour la séquence d[(CCCTAA)<sub>3</sub>CCCT] et un quadruplexe de guanines (Wang et Patel, 1993) pour la séquence d[A(GGGATT)<sub>3</sub>GGG]). Rappelons que les conditions dans lesquelles a lieu l'association entre les protéines et le brin GT<sub>lev</sub> sont favorables à la formation d'un quadruplexe de guanines et que l'association avec le brin T<sub>lev</sub> reste possible à pH 6.

La compétition existant entre la formation d'un duplexe d'une part, et celles d'un motif i et d'un quadruplexe de guanines, d'autre part, pourrait être modulée par la présence de protéines s'associant à l'une ou l'autre de ces structures non canoniques. Dans ce contexte, une protéine pouvant s'associer à chacun des brins de l'ADN télomérique et pouvant éventuellement stabiliser le motif i et le quadruplexe de guanines, place la compréhension des mécanismes de formation éventuelle et concertée de ces structures, sous un nouveau jour (figure 4.14.).

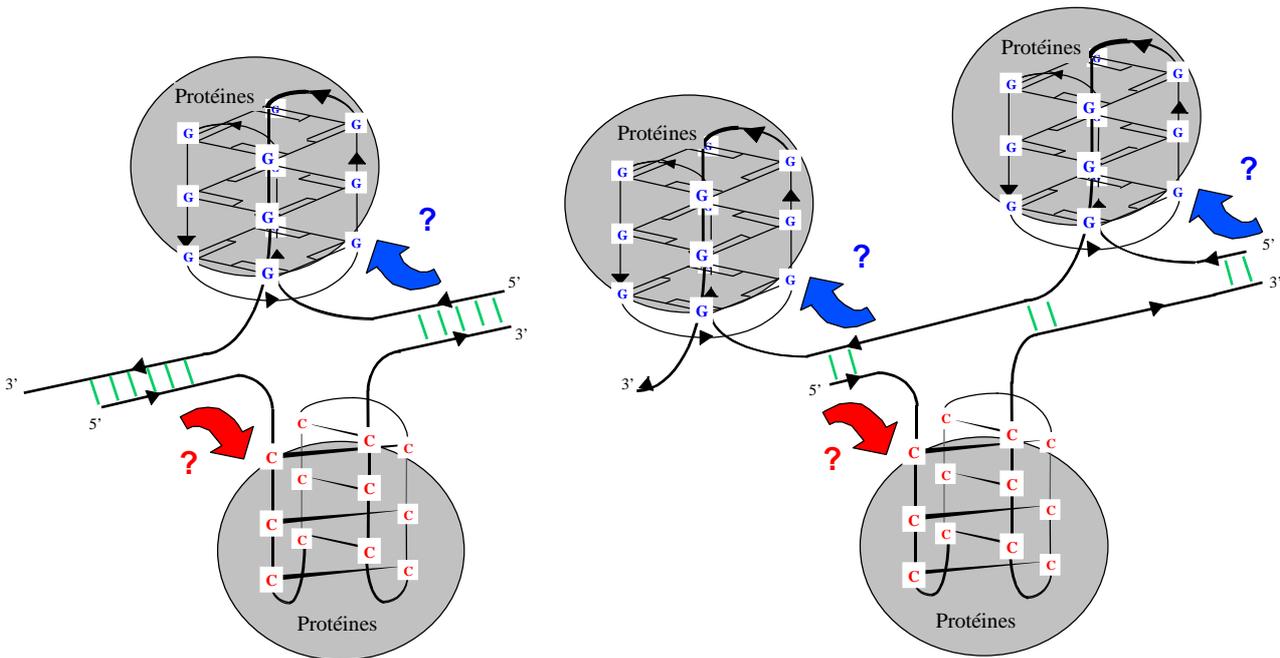


Figure 4.14. : Différentes possibilités de coexistence du motif i et de quadruplexe de guanines en présence de protéines stabilisant ces deux structures. L'ouverture du duplexe pourrait permettre la formation concertée de ces structures (schéma de gauche).

La formation de ces deux structures non canoniques nécessitant l'ouverture du double brin d'ADN, nous avons essayé de savoir si ces protéines reconnaîtraient également le duplexe d'ADN télomérique, en variant par exemple, l'ordre et les temps d'incubation des deux brins d'ADN T<sub>lev</sub>\*

et GTlev avec l'extrait protéique. Les difficultés d'interprétation inhérentes au mode de visualisation utilisé ne nous permettent pas de conclure sur la possible reconnaissance du double brin d'ADN télomérique par les protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p. Un moyen de vérifier si l'association est possible avec un double brin d'ADN, serait d'utiliser, par exemple, la séquence GTlev et la séquence d(CCCACACCC) (dont on a vu qu'elle ne s'associait aux protéines qu'à concentration élevée), pouvant former partiellement un double brin.

## 4- Aspects biologiques des IMPDH

### 4-1- Caractéristiques des protéines identifiées

#### 4-1-1- La protéine Yhr216p

Le gène *YHR216W* (ou *IMD2*) est situé à l'extrémité du chromosome VIII (figure 4.15.). Cette position le place sous une possible régulation par le phénomène de Telomere Position Effect. Par homologie de séquence avec *Candida albicans* (Kohler et al., 1997), cette protéine aurait un rôle dans le métabolisme des purines. D'une masse calculée de 56 kDa, sa mobilité électrophorétique en conditions dénaturantes correspond à une masse de 54 kDa (Perrot et al., 1999).

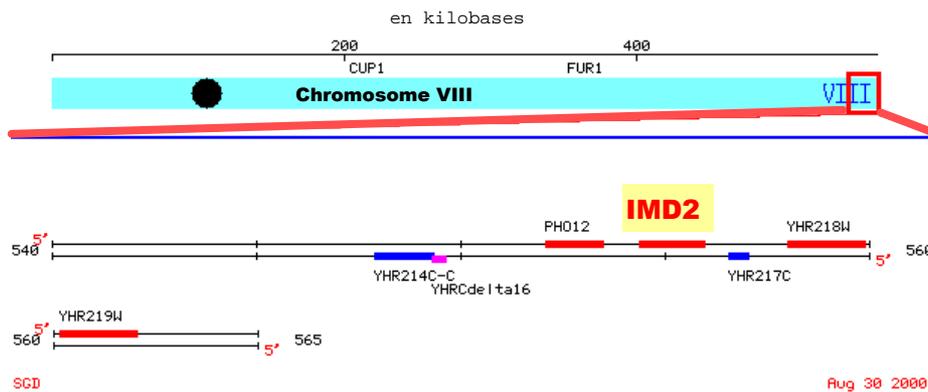


Figure 4.15. : Représentation de la zone du chromosome VIII où se situe le gène *YHR216W*.

Cette protéine est en interaction avec la protéine Lhp1p (protéine s'associant et stabilisant le pré t-RNA) (Rosenblum et al., 1998).

Il existe à l'extrémité du chromosome I une région de 25 kilobases que l'on retrouve quasiment à l'identique sur le chromosome VIII (Barton et al., 1997). On trouve ainsi un gène, *YAR073W* (ou *IMD1*, figure 4.15), quasiment identique à l'extrémité N-terminale du gène *YHR216W* (voir les alignements de séquences en annexes).

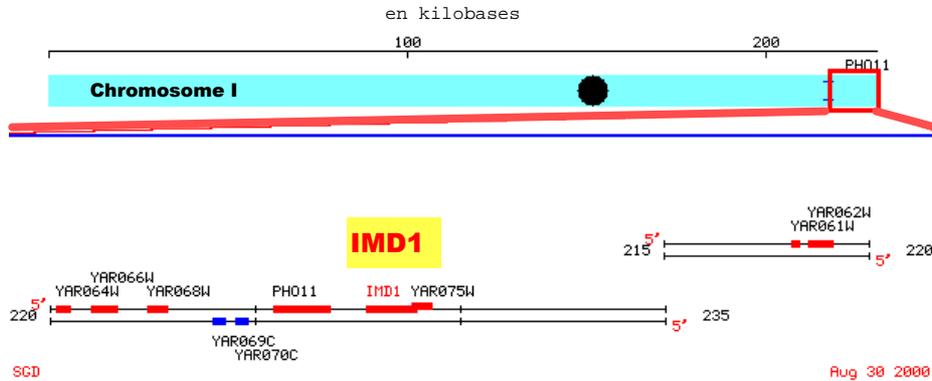


Figure 4.16. : Représentation de la zone du chromosome I où se situe le gène *YAR073W*.

Les gènes situés sur le chromosome I sont faiblement transcrits par rapport aux gènes existants sur le chromosome VIII. Barton et al. suggèrent qu'ils seraient réprimés par un effet naturel de TPE et qu'ils auraient un rôle structural pour les chromosomes.

La protéine Yar073p aurait une masse de 44.4 kDa, et pourrait être confondue avec les protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p, dégradées à l'extrémité N-terminale de la bande inférieure (masse de ~ 47 kDa) du doublet étudié lors des expériences réalisées avec le ligand BTlev. L'identité de séquence avec la protéine Yhr216p est telle que nous n'avons aucun moyen de vérifier cette hypothèse. Les identifications de peptides pouvant correspondre à Yar073p sont reprises dans la figure 4.17. et représentent 25.6 % de recouvrement de séquence.

1	11	21	31	41	51		
1	maairdykta	ldltkslprp	dglsvqelmd	skirgglayn	dflilpplvd	fassevslqt	60
61	kltrnitlni	plvsspmdtv	tesematfma	lldgigfihh	nctpedqadm	vrrVKNYENG	120
121	FINNPVISP	TTTVGEAK <sup>sm</sup>	keygfagfp	vtadgkrnak	lvgaitstrDI	QFVEDNSLLV	180
181	QDVMTKNPVT	GAQGITLSEG	NEILKkikg	rllvvdekgn	lvsmlsrtdl	mknqkyplas	240
241	ksantkqlw	gasigtmdad	kerLRLLVKa	gldvildss	qgnsifqlnm	ikWIKETFPD	300
301	LEIIAGNVVT	KEQAANLIAA	GADGLRigmg	tsicitqkv	macgrpqgta	vynvcefanaq	360
361	fgvpcmadgg	vqkhwsyyyq	sfgswffycy	dgwyvgryyr	itr		

Figure 4.17. : Reprise des résultats obtenus avec le ligand Tlev pour la protéine Yar073p. On peut noter l'absence de peptides dans la région N-terminale.

Cependant, dans le cadre des expériences réalisées à partir du ligand d'ADN BGTlev, en l'absence de bande pouvant correspondre aux protéines dégradées, l'écart de masse semble trop important pour que l'on puisse prétendre que Yar073p fixe le brin G.

#### 4-1-2- La protéine Ylr432p

Le gène *YLR432W* (ou *IMD3*) est situé à l'extrémité du chromosome XII (figure 4.18.), non loin du gène *SIR3* (Silent Information Regulator (Ivy et *al.*, 1986)). Il est suffisamment près du télomère pour être sensible à une régulation par le Telomere Position Effect.

La protéine est en interaction avec les protéines Ydr469p (rôle et localisation inconnus), Gcn3p (synthèse des protéines), Gdh2p (glutamate déshydrogénase (NAD)) et Taf25p (transcription de Pol II (Poon et *al.*, 1995 ; Klebanow et *al.*, 1996), localisée dans le noyau) (Uetz et *al.*, 2000). La protéine Ylr432p serait donc partiellement présente dans le noyau.

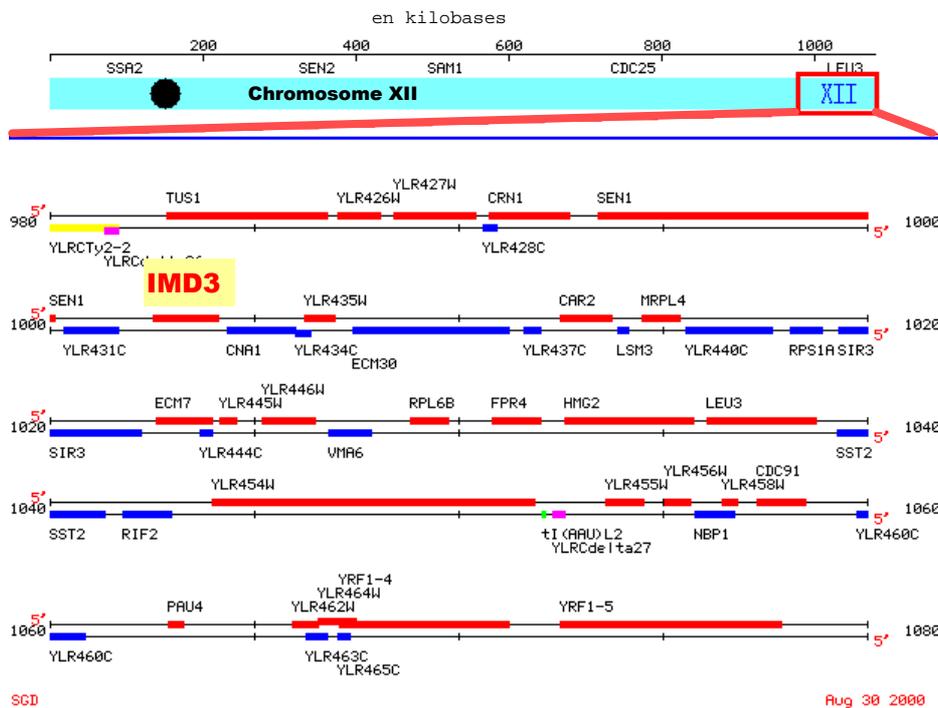


Figure 4.18. : Représentation de la zone du chromosome XII où se situe le gène *YLR432W*.

#### 4-1-3- La protéine Yml056p

Le gène *YML056C* (ou *IMD4*) est situé sur le chromosome XIII (figure 4.19.). Des trois protéines identifiées, Yml056p est celle qui se différencie le plus (84% et 89% d'identité de séquence par rapport à Yhr216p et Ylr432p respectivement).

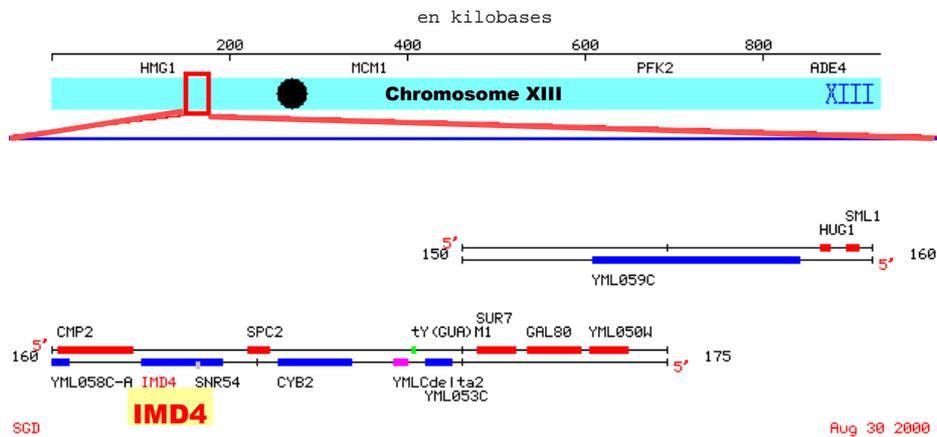


Figure 4.19. : Représentation de la zone du chromosome XIII où se situe le gène *YML056C*.

#### 4-1-4- Conclusions

Du point de vue de leurs séquences respectives, les trois protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p sont très proches. La viabilité des mutants *yar073w yhr216w* (Barton et al., 1997), *ylr432w* et *yml056c*, montre qu'elles peuvent avoir une (ou plusieurs) fonctions biologiques communes. Cependant il existe des interactions spécifiques avec d'autres protéines, propres à chacune des trois, permettant de les différencier.

Il existe sur le chromosome I un gène, *YAR073W*, qui est la fidèle copie d'une partie du gène *YHR216W*. Sa transcription pourrait être régulée par un effet naturel de TPE.

Les 4 gènes *YAR073W*, *YHR216W*, *YLR432W* et *YML056C* sont situés sur les chromosomes I, VIII, XII et XIII. Dans le séquençage disponible des chromosomes de levure *S. cerevisiae* (*Blasts alignments*), il s'agit des 4 chromosomes dont on retrouve la séquence Tlev inscrite dans les télomères et dont, par ailleurs, les régions télomériques et subtélomériques sont assez proches de

Tlev alors que l'ADN télomérique des autres chromosomes apparaissent singulièrement différents. Coïncidence fortuite ou possible particularisme structurale de ces chromosomes ? Nous n'avons à ce jour aucun élément nous permettant d'en parler.

	Chromosome	Nombre d'acides aminés	pI	Masse moléculaire	% iden <sup>a</sup>	% sim <sup>a</sup>	Interaction protéine-protéine
<i>YHR216W</i>	VIII	523 aa	8.79	56534 Da	93%	97%	Lhp1p
<i>YLR432W</i>	XII	523 aa	7.31	56452 Da	-	-	Taf25p <sup>b,c</sup> , Gdh2p <sup>b</sup> , Ydr463p <sup>b</sup> , Gnc3p <sup>b</sup>
<i>YML056C</i>	XIII	524 aa	8.46	56396 Da	89%	95%	
<i>IMPDH1<sup>e</sup></i>	7q31.3-q32	506 aa			61%	78%	
<i>IMPDH2<sup>f</sup></i>	3p21.2	505 aa			62%	78%	

Tableau 4.4. : Tableau résumant les principales caractéristiques des protéines 5'-inosine monophosphate déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae* et de leurs homologues chez l'homme <sup>a</sup> Comparaison par rapport à *YLR432W*, <sup>b</sup> Uetz et *al.*, 2000 ; <sup>c</sup> ARN polymérase et localisation nucléaire, <sup>d</sup> Rosenblum et *al.*, 1998 ; <sup>e,f</sup> 5'-inosine monophosphate déshydrogénase humaines

#### 4-2- Rôle biologique

Les protéines Yhr216p, Ylr432p et Yml056p sont les homologues, chez *Saccharomyces cerevisiae*, de protéines qui catalysent la conversion de l'inosine monophosphate (IMP) en xanthosine 5' monophosphate (XMP) avec réduction de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en NADH (figure 4.20.). Ces protéines, appelées inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), interviennent dans le métabolisme des guanines.

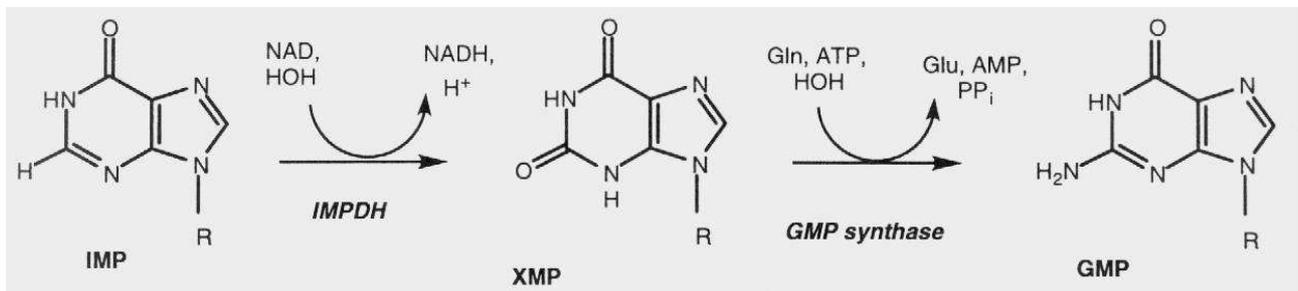


Figure 4.20. : Schéma des étapes menant à la synthèse de la guanosine monophosphate (GMP).

Elles font depuis longtemps l'objet d'études chez différents organismes et présentent d'importantes homologies de séquences entre espèces (voir en Annexes 2.2. les alignements de séquences). Elles

ont une grande importance dans différents phénomènes biologiques. La concentration en IMPDH dans la cellule décroît en présence de l'anti-oncogène p53 et les inhibiteurs de IMPDH induisent une différenciation dans les cellules tumorales (Sokoloski et *al.*, 1986 ; Sherley, 1991 ; Liu et *al.*, 1998). Aussi, ces protéines sont depuis longtemps considérées comme cibles de thérapies immunosuppressives et de chimiothérapies anticancéreuse et antivirale (Weber, 1983 ; Robins, 1982 ; Malinovski & Stollar, 1981).

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur les protéines IMPDH de *Saccharomyces cerevisiae*, malgré l'importante homologie de séquence entre espèces.

Plusieurs structures, obtenues par cristallographie, dont celle de l'IMPDH de type II humaine, sont aujourd'hui disponibles. Chacune de ces structures cristallise sous forme d'un tétramère homogène offrant 4 sites de fixation à l'IMP et au NAD (figure 4.21.).

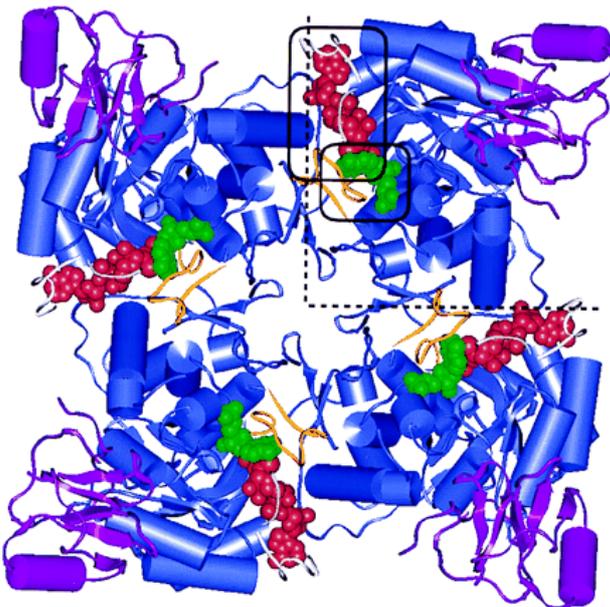


Figure 4.21. (tirée de Colby et *al.*, 1999) : IMPDH tétramérique humaine de type II et sites de fixation de SAD (Selenazole-4-carboxamide adénine dinucléotide), analogue de NAD (cercles rouges) et de 6-Cl-IMP (6-chloropurine riboside 5'-monophosphate), analogue de l'IMP (cercles verts). Le dinucléotide se fixe à l'interface monomère/monomère.

Nous avons incubé des extraits de protéines de levure et Tlev\* en présence d'IMP et/ou de NAD. Pour cela, nous avons réalisé différentes incubations en présence de 20 mM IMP, 20 mM NAD en présence de 20 mM KCl (correspondant à une activité maximale de l'IMPDH humaine de type II (Xiang et *al.*, 1996)). La migration électrophorétique après incubation des protéines avec Tlev\* (figure 4.22.) ou GTlev\* (non montrés) est identique et ne montre aucune variation d'intensité du signal retardé.

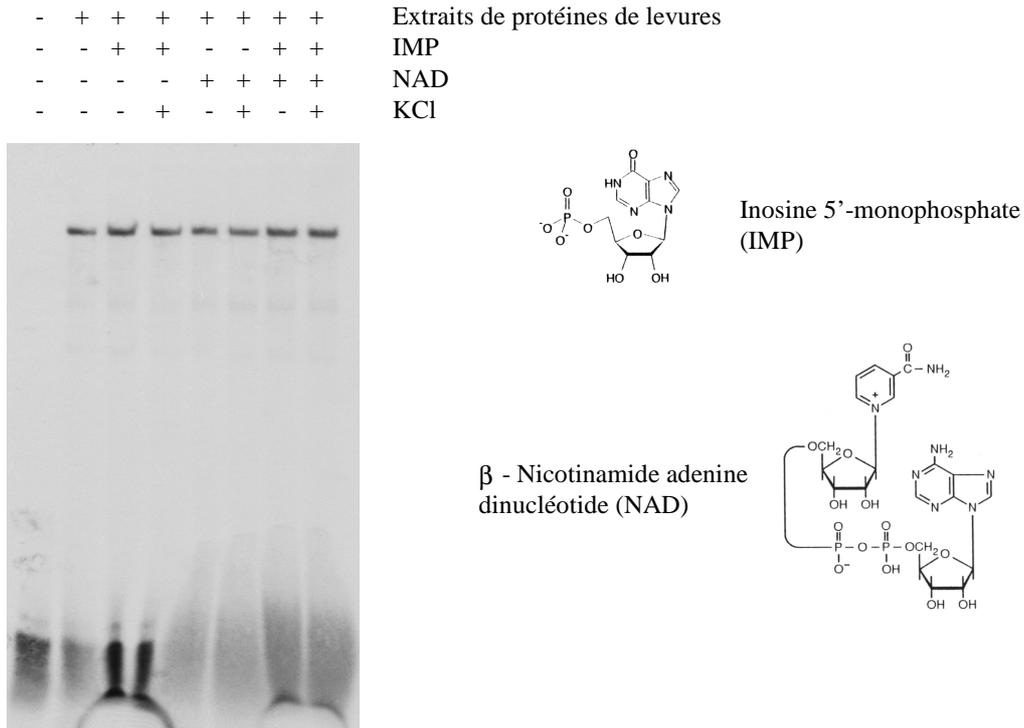


Figure 4.22. : Migrations électrophorétiques obtenues en présence d' IMP (20 mM), NAD (20 mM) et KCl (20 mM ) et rappels des représentations chimiques de l' IMP et du NAD.

Plusieurs inhibiteurs de IMPDH sont bien connus et utilisés cliniquement, entre autre, dans les traitements anti-cancéreux et anti-viraux (Robins, 1982 ; Allison *et al.*, 1993a ; Allison *et al.*, 1993b ; DeClerq, 1993). Parmi ceux-ci, l'acide mycophénolique (ou MPA) est considéré comme un puissant inhibiteur spécifique des IMPDH humaines.

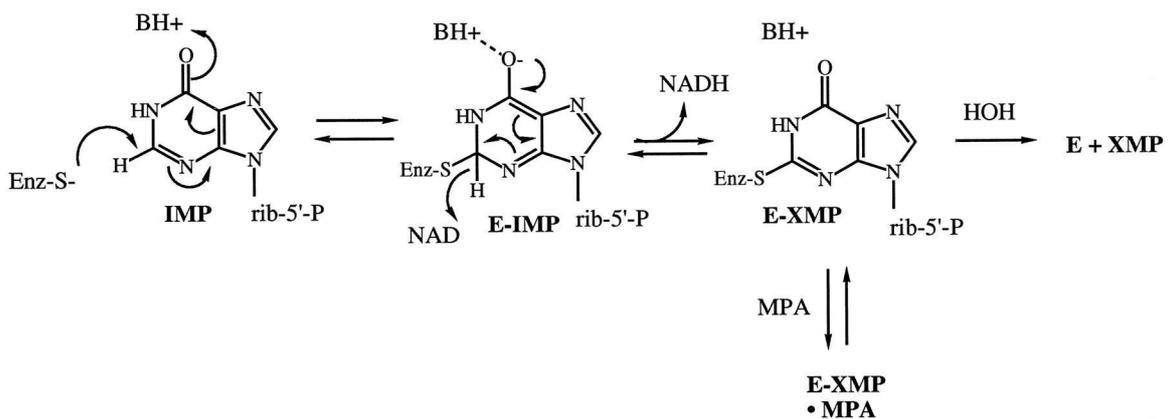


Figure 4.23. : Mécanisme réactionnel et inhibition de l'IMPDH par l'acide mycophénolique.

Le MPA piège l'intermédiaire E-XMP lors du passage de IMP à XMP (Farazi *et al.*, 1997) (figure 4.23.). L'inhibition de l'activité des IMPDH par l'acide mycophénolique varie grandement selon les

organismes. Par exemple, la constante de dissociation  $K_d$  de MPA, est de 22 nM pour les IMPDH humaines, 50 nM pour celle de *Bacillus subtilis*, et 20  $\mu$ M pour celle d'*Escherichia coli*.

En ajoutant de l'acide mycophénolique lors de l'incubation entre les protéines et les séquences Tlev\* (figure 4.24.) et GTlev\* (résultats non montrés), nous n'avons pas constaté de changement dans l'intensité du signal retardé habituellement observé.

Nous avons donc montré que la présence d'un inhibiteur des protéines IMPDH pendant l'incubation entre les protéines de levure et les fragments télomériques Tlev\* et GTlev\*, n'entraînait pas de modification dans la migration électrophorétique du complexe ADN\*-protéines.

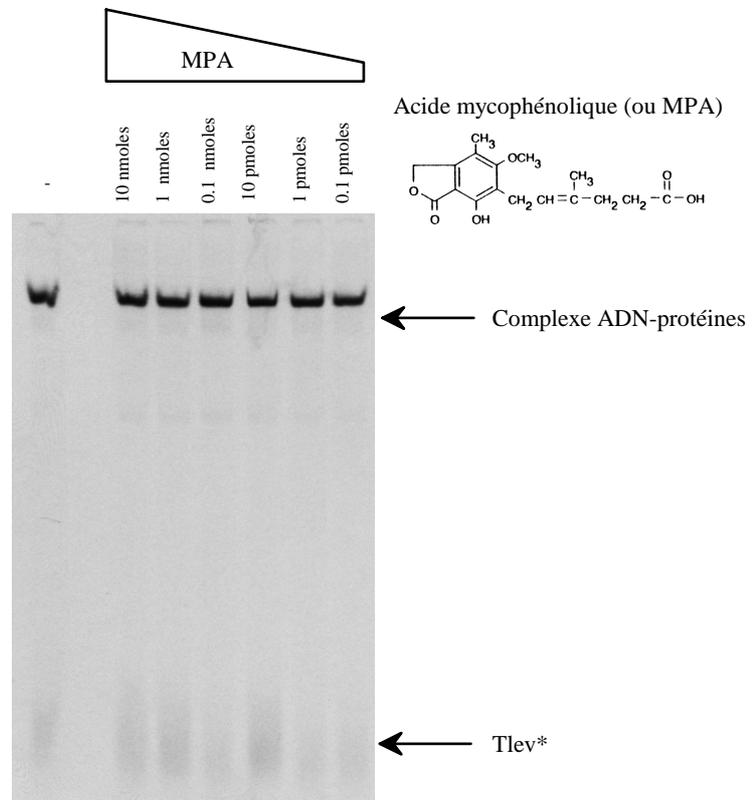


Figure 4.24. : Migration électrophorétique en fonction de la concentration en acide mycophénolique présente pendant l'incubation entre les protéines de levure et l'ADN Tlev\* et représentation chimique de MPA.

#### 4-3- Comparaison avec les protéines humaines

Le Professeur G.D. Markham (Institute for Cancer Research, Philadelphie, USA) nous a fourni de l'IMPDH humaine de type II purifiée. De plus, le Professeur B.S. Mitchell (Internal Medicine and Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina School of Medicine, USA) nous a fourni des IMPDH humaines de types I et II purifiées. Nous avons réalisé des migrations

électrophorétiques en conditions non dénaturantes avec ces protéines humaines, après incubation avec les fragments d'ADN télomériques humain d[(CCCTAA)<sub>3</sub>CCCT]\* ou de levure Tlev\* (incubation en présence ou en absence de 20 mM KCl). Aucun retard n'a été observé lors de ces expériences, indiquant qu'aucune des deux homologues humaines des IMPDH de levure, ne s'associait avec une séquence d'ADN télomérique riche en cytosines.

Cependant, en l'absence de compétiteur non spécifique, nous observons qu'une protéine provenant d'extraits nucléaires de cellules HeLa, s'associe avec les séquences télomériques Tlev, 22hm et 27hm. Cette protéine a une mobilité électrophorétique identique à celles des protéines IMPDH des extraits de levure, mais migre à des positions différentes des protéines hnRNP K et ASF/SF2 (identifiées comme fixant la séquence 27hm (Lacroix et *al.*, 2000)). Nous remarquons encore que cette protéine humaine fixe également la séquence centromérique Mcent-u, comme les protéines IMPDH de levure.

Par contre, l'association ne se fait plus en présence du compétiteur non spécifique T<sub>26</sub>. Nous envisageons d'entreprendre une électrophorèse en conditions non dénaturantes après incubation entre les protéines humaines et la séquence T<sub>26</sub>\* radioactivement marquée pour vérifier la spécificité de l'association observée avec les séquences Tlev et 22hm.

#### 4-4- Conclusion de ces identifications et perspectives

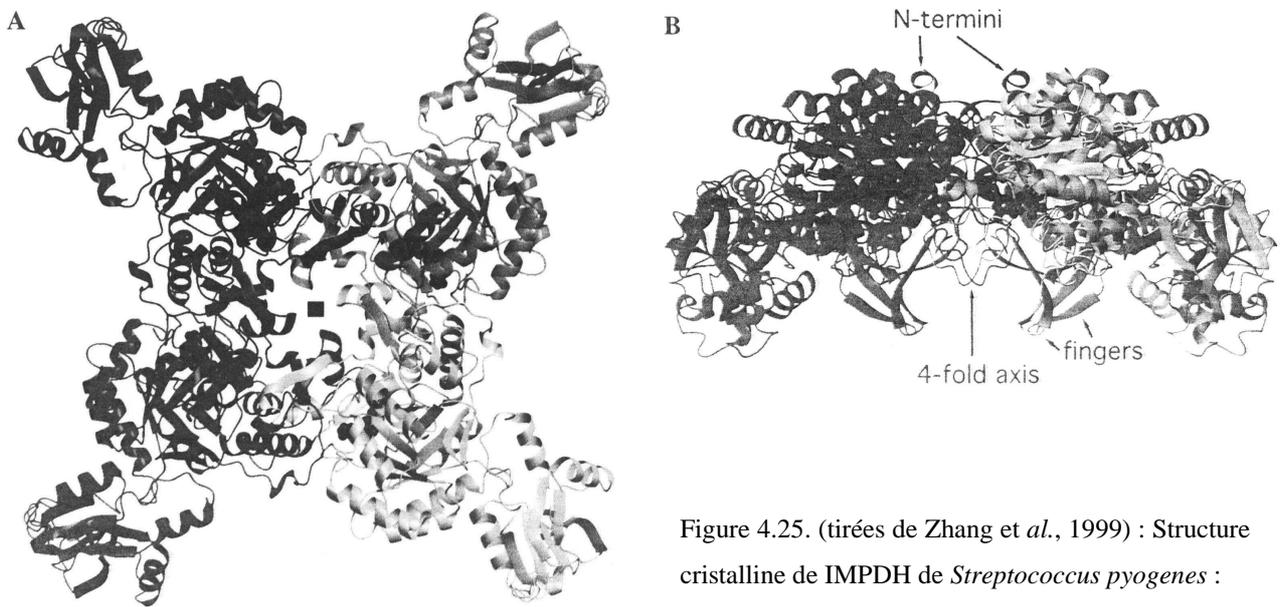
Si on identifie bien l'association entre les séquences télomériques de levure Tlev et GTlev, et les protéines IMPDH, celle-ci peut-elle avoir lieu avec les seules protéines IMPDH ?

En regardant la structure habituelle des IMPDH, on observe qu'elle se présente toujours sous la forme d'un tétramère homogène possédant un axe de symétrie d'ordre 4 (figures 4.22. et 4.26.A.). En regardant la structure sur la tranche (figure 4.25.B), on observe que la partie N-terminale de chaque IMPDH se trouve sur le dessus et qu'il existe en dessous du plateau formé, 4 doigts flexibles (Zhang et *al.*, 1999). Ces doigts sont constitués de deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles et forment une région structurale conservée d'une espèce à l'autre. Ils n'interviennent pas dans la fonction catalytique de IMPDH, mais des mutations dans ces domaines sont associées à des conséquences pathologiques (Zhang et *al.*, 1999). Il est possible (Bateman, 1997) que ce domaine puisse être

impliqué dans des fonctions de régulation. Dans tous les cas, la dépense énergétique requise pour la conservation de ces structures suggère un rôle fonctionnel sous-jacent (Zhang *et al.*, 1999).

Dans le cas où il n'y aurait qu'un site spécifique de Tlev par tétramère d'IMPDH, on pourrait supposer que l'association entre les protéines et l'ADN se fasse soit par le dessus, soit par le dessous, ou encore en passant par le centre, du plateau constitué par le tétramère d'IMPDH.

On peut encore penser que l'association se fasse à d'autres endroits du tétramère. Dans ce cas, la symétrie axiale des structures obtenues par cristallographie, laisse penser qu'il pourrait y avoir 4 sites de fixation de Tlev par tétramère.



Toutes ces remarques sont à confronter avec les observations précédentes. L'absence de la partie N-terminale des protéines IMPDH ne semble pas influencer l'association avec l'ADN télomérique (puisque l'on montre lors des expériences MALDI que des protéines IMPDH dont la partie N-terminale est absente se sont associées avec le ligand BTlev). Donc celle-ci se ferait soit par le cœur, soit par le dessous du plateau formé par les quatre IMPDH.

On sait aussi que la masse observée du complexe protéique en conditions non dénaturantes est supérieure à 200 kDa. Or le tétramère d'IMPDH a une masse d'environ 220-240 kDa. L'imprécision sur la masse du complexe protéique s'associant à Tlev ne permet pas de déterminer si les IMPDH seules s'associent à ce fragment d'ADN. D'autre part, si les tétramères habituellement observés sont

homogènes, *Saccharomyces cerevisiae* est la seule espèce possédant plusieurs IMPDH quasiment identiques, pouvant laisser penser qu'elles pourraient s'associer de façon 'pseudo'-hétérogène.

Enfin, de récents travaux montrent que la protéine Sir2p utilise le NAD comme substrat lors d'une réaction de désacétylation requérant la présence de lysines acétylées (telles que celles présentes à l'extrémité N-terminale des histones). Le recrutement de NAD par Sir2p lors de cette réaction suggère que cette protéine pourrait être un senseur de l'état énergétique ou de l'oxydation des cellules (Imai et *al.*, 2000 ; Landry et *al.*, 2000 ; Smith et *al.*, 2000). S'associant à ces travaux, les propriétés associatives des protéines IMPDH pour l'ADN télomérique renforcent l'idée suggérée par Imai et *al.* d'interactions possibles entre métabolisme, 'silencing' génomique et sénescence chez la levure.