
Caractéristiques du complexe ADN-protéine

Nous avons mis en évidence un complexe constitué d'une séquence télomérique et de protéines de levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'étude des propriétés physico-chimiques régissant cette association forme la base du travail de compréhension et d'analyse menant à l'isolement et à l'identification des protéines impliquées. Ces caractéristiques reposent à la fois sur les propriétés propres à chacun des deux partenaires en fonction des conditions du milieu (pH, température, force ionique,...) et sur les interactions entre parties, générées au moment de l'association. Tels sont les sujets abordés dans ce chapitre.

1- La séquence d'ADN télomérique de levure d[(CCCACA)₃CCC]

Nous avons volontairement choisi un fragment d'ADN synthétique pouvant adopter la structure en motif i par repliement intramoléculaire. Le choix de l'organisme, *Saccharomyces cerevisiae*, sur lequel ce travail s'est effectué et les informations concernant la stabilité du motif i intramoléculaire, nous ont conduit à choisir pour séquence de référence, le fragment d[(CCCACA)₃CCC], appelé par la suite **Tlev**.

1-1- La séquence d[(CCCACA)₃CCC]

Cette séquence est formée de 4 répétitions de 3 désoxycytidines pouvant permettre un arrangement en motif i intramoléculaire composé d'un cœur de 6 paires de bases C-CH⁺ coiffé par des boucles ACA, selon les modèles structuraux proposés par X. Han (Han et al., 1998) et A.T. Phan (Phan et al., 2000). On ne trouve ce fragment d'ADN qu'aux extrémités télomériques des chromosomes I, VIII, XII et XIII (données provenant de *Blast alignments* (site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), cf. tableau 3.1.) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Chromosome	Longueur du chromosome (en bases)	Position de la séquence (en bases)	Région
I	230203	230127 → 230159 ^a	Télomérique
VIII	562639	556950 → 556970 562500 → 562520	Sub-télomérique Télomérique
XII	1078172	1065115 → 1065141 ^b	Sub-télomérique
XIII	924430	28 → 48	Télomérique

Tableau 3.1. : Emplacements où l'on retrouve la séquence d[(CCCACA)₃CCC] dans les chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* (*Blast alignments*). ^a Tlev s'inscrit 3 fois dans la séquence ²³⁰¹²⁷[(CCCACA)₅CCC]²³⁰¹⁵⁹; ^b Tlev s'inscrit 2 fois dans la séquence ¹⁰⁶⁵¹¹⁵[(CCCACA)₄CCC]¹⁰⁶⁵¹⁴¹

Nous allons montrer par des mesures de dénaturation thermique (UV) et des expériences de RMN ^1H à 1 et 2 dimensions, que sous certaines conditions, le fragment Tlev peut adopter la structure en motif i.

1-2- Etude par spectroscopie d'absorption

La mesure de la température de dénaturation du fragment d'ADN Tlev en fonction de sa concentration (en monobrin) (figure 3.1.) et en fonction du pH (figure 3.1. en bas à droite) permet de vérifier l'existence d'une structure et la stœchiométrie de celle-ci.

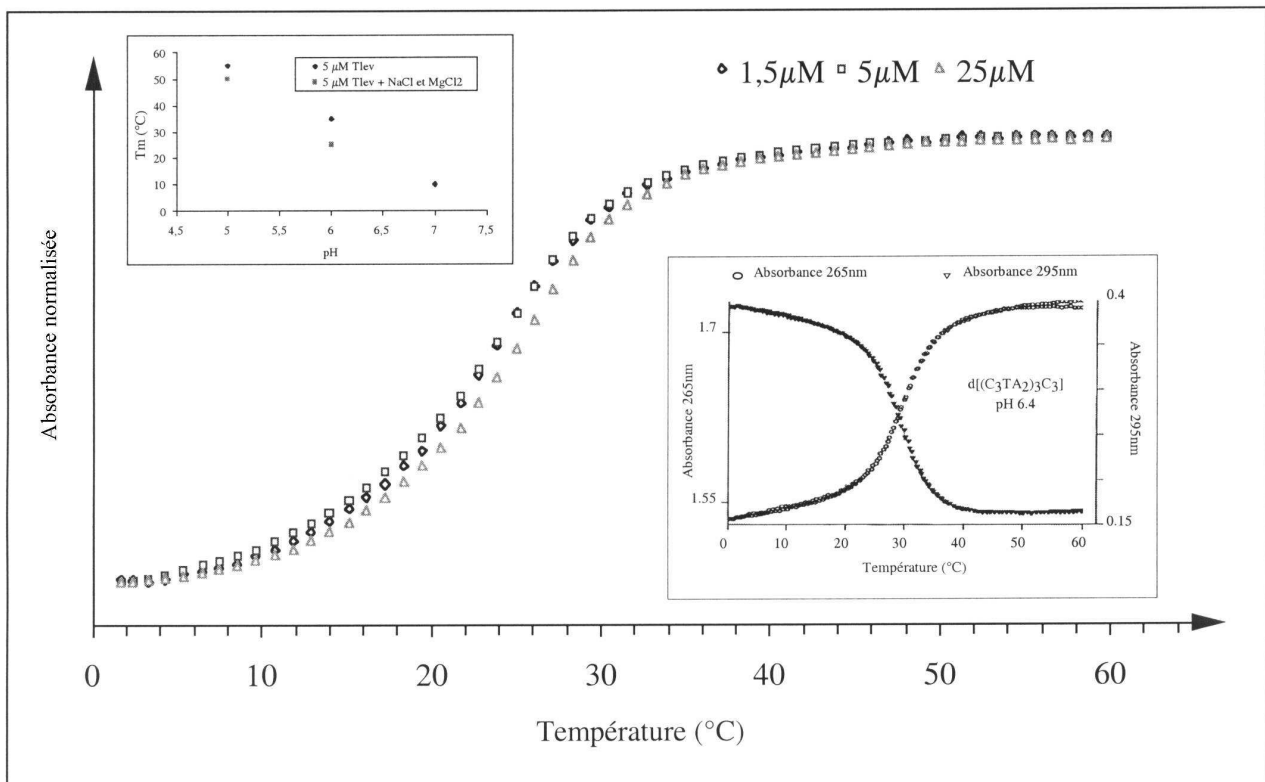


Figure 3.1. : Profil de dénaturation thermique à 265 nm de la séquence Tlev à pH 6 en fonction de la concentration en brin, en présence de 175 mM NaCl et 2 mM MgCl_2 . En haut à gauche : Evolution de la température de demi-dissociation de la séquence Tlev en fonction du pH, sans sel ou en présence de 175 mM NaCl et 2 mM MgCl_2 . En bas à droite : Profil de dénaturation thermique de la séquence télomérique humaine à pH 6 (Leroy et *al.*, 1994).

A pH 6, en présence de NaCl 175 mM et MgCl₂ 2 mM, le profil de dénaturation thermique à 25 μM diffère légèrement de ceux obtenus à 1.5 et 5 μM. La température de dénaturation thermique T_m varie de ~ 24°C (à 1.5 et 5 μM) et ~ 26°C (à 25 μM). A titre de comparaison, la température de dénaturation thermique de la séquence télomérique d[(CCCTAA)₃CCC] des mammifères est de 30°C à pH 6.4 en l'absence de sel (Leroy et *al.*, 1994) (figure 3.1. en bas à droite). L'évolution de T_m en fonction du pH est très semblable à celle observée (figure 3.1 en haut à gauche).

1-3- Etude par spectroscopie RMN du proton

Les expériences de spectroscopie RMN ont été conduites sur la séquence d[(C₃ACA)₃C₃A], dont le spectre à 1 dimension, très proche de celui de la séquence Tlev, présente dans la zone des protons amino un profil un peu mieux résolu (expériences à 1 dimension sur spectromètre RMN à 360 MHz, (figure 2.6.)). La concentration en monobrin de l'échantillon utilisé est de ~ 1 mM.

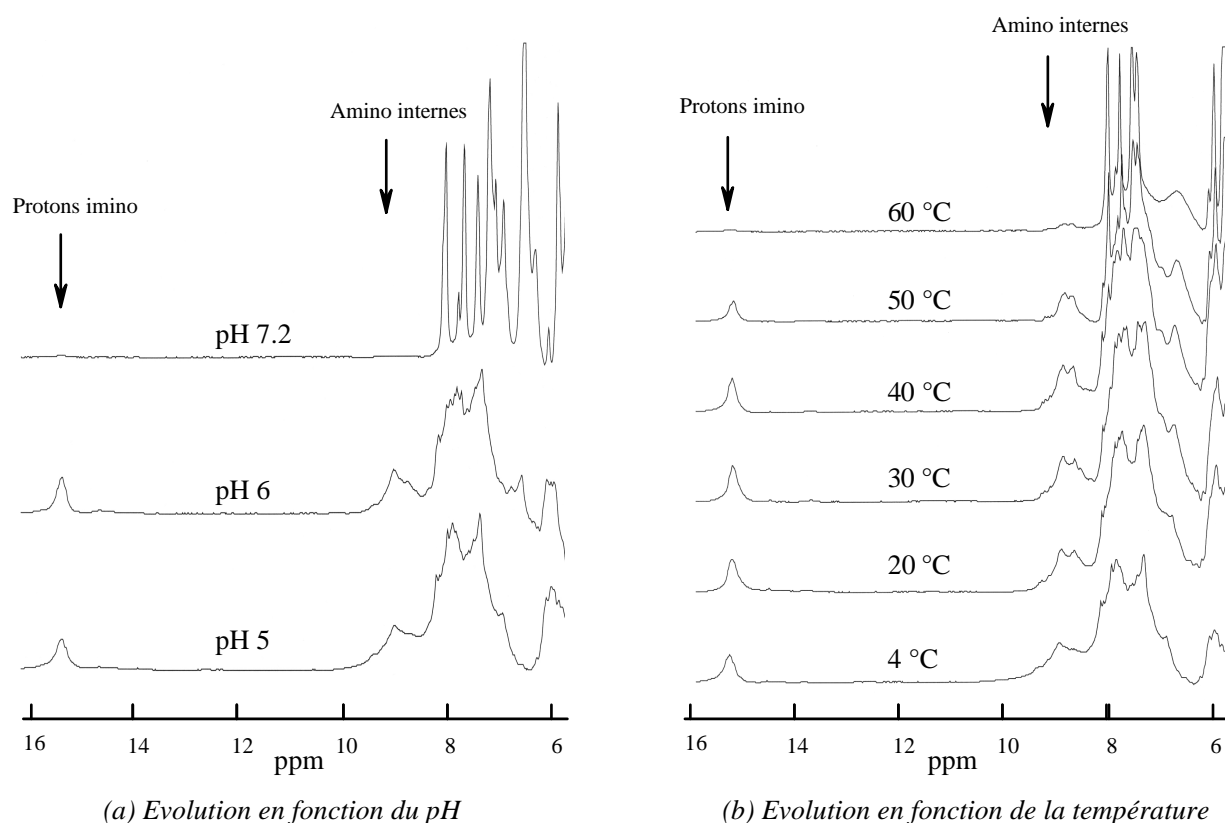


Figure 3.2. : Spectres RMN à 500 MHz du fragment d'ADN télomérique de levure d[(C₃ACA)₃C₃A]. (a) Evolution en fonction du pH à T = 4 °C. (b) Evolution en fonction de la température à pH 5.

La présence d'un pic large centré sur 15.5 ppm est caractéristique de protons imino provenant de bases CH^+ appariées. Ce signal persiste à 50 °C, pH 5, et on en observe encore la trace à pH 7.2, 4 °C et à pH 5, 60 °C (figure 3.2.).

Un spectre NOESY dans H_2O présente des pics croisés entre protons amino et protons $\text{H}_2' / \text{H}_2''$, caractéristiques du motif i (figure 3.3.).

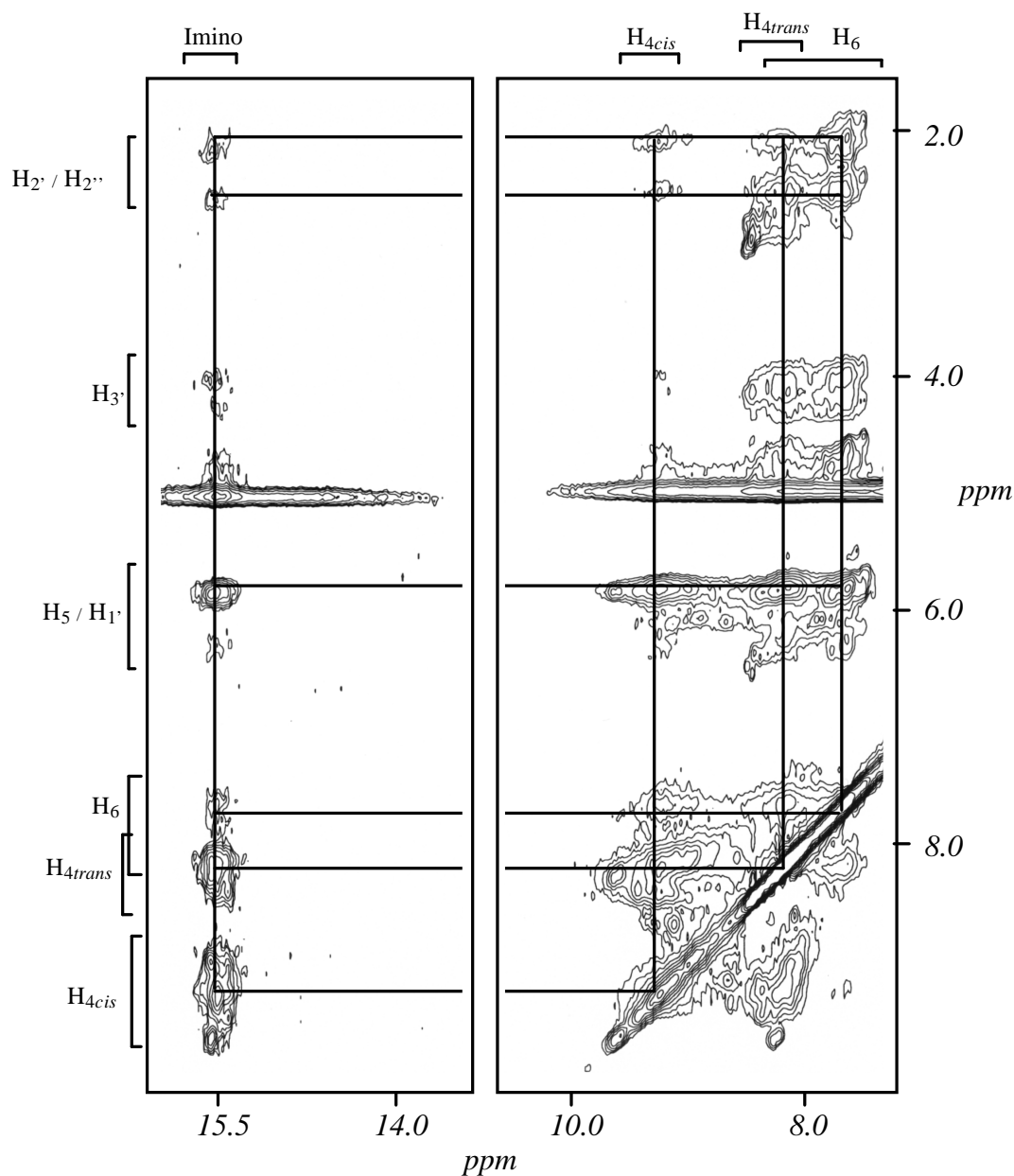


Figure 3.3. : Spectre NOESY à 500 MHz du brin d'ADN télomérique de levure $d[(\text{CCCACA})_3\text{CCCA}]$ dans H_2O , à 125 ms de temps de mélange, à $T = 4\text{ °C}$ et pH 5.

Nous pouvons déduire des résultats obtenus avec le fragment d'ADN télomérique de levure d[(CCCACA)₃CCCA], que la séquence Tlev forme, comme dans le cas de la séquence télomérique humaine, un motif i intramoléculaire *in vitro*, et donc potentiellement *in vivo*.

2- Caractéristiques du complexe ADN-protéines

La visualisation du complexe ADN-protéines se fait uniquement par l'intermédiaire du fragment d'ADN synthétique marqué radioactivement à l'extrémité 5' au ³³P. Cette méthode ne permet pas une observation directe du complexe et apporte une observation différée de la présence de la protéine, notamment au cours des expériences de purification. La visualisation du complexe ADN-protéines dépend de la capacité des protéines à reconnaître et fixer l'ADN, donc de leur intégrité.

2-1- Migration électrophorétique non dénaturante

Le principe des expériences qui vont être maintenant décrites, consiste à incuber des protéines et un fragment d'ADN marqué radioactivement, puis à réaliser une migration électrophorétique native permettant de visualiser d'éventuels complexes ADN*/protéines. Les conditions d'incubation d'une part, les conditions de migration, d'autre part, sont les paramètres ajustables de ces expériences.

Nous avons généralement constaté l'apparition d'un précipité (ou agrégat) dans l'extrait de protéines, à partir de pH 7, phénomène s'amplifiant à pH 6. Afin d'éviter de perdre les protéines que nous recherchions lors de nos expériences, nous avons volontairement travaillé le plus souvent entre pH 7.4 et pH 8.

2-1-1- Conditions d'incubation

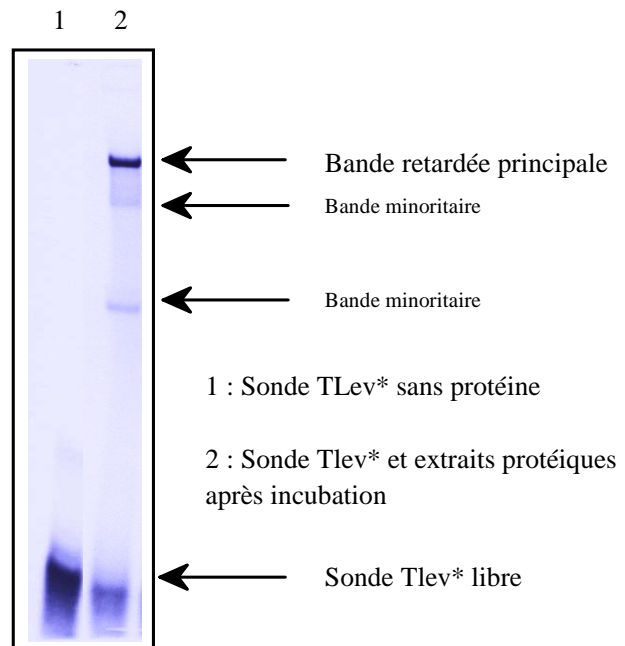
Nous avons défini les paramètres d'une migration électrophorétique servant de référence pour l'ensemble des tests présentés :

- ~ 5 µg de protéines provenant des extraits protéiques de levure (préparés comme décrit au chapitre II et en annexes) sont mélangés avec 0.65 pmol de Tlev partiellement marquée (3%) dans 10µl (soit une concentration de 65 nM)
- le mélange est incubé à température ambiante durant 15 min, dans TBE 0.5x à pH 8
- dans certains cas, la cellule d'incubation contient aussi 0.5 nmol d'ADN d(T₁₄) simple brin en tant que compétiteur non spécifique. Cependant, nous avons constaté que malgré son abondance relative (1000 fois celle de Tlev), ce compétiteur est sans effet sur la formation du complexe. C'est pourquoi la plupart des expériences de migrations électrophorétiques natives décrites par la suite ont été réalisées sans ADN compétiteur.

La migration dure ~ 45 min (voir conditions d'électrophorèse décrites au chapitre II). Dans ces conditions, nous observons principalement une bande retardée intense sur laquelle nous avons focalisé nos efforts de caractérisation et d'identification. Nous observons au moins trois autres bandes d'intensité relative beaucoup plus faible (figure 3.4.) que nous n'étudierons pas.

La quantité d'ADN radioactif est saturante comme l'atteste la présence de sonde libre Tlev* et l'absence de changement de l'intensité obtenue pour la bande retardée principale si on augmente d'un facteur 2 la quantité de Tlev*.

Figure 3.4. : Expérience de référence. Autoradiographie d'un gel non dénaturant avec la sonde d'ADN Tlev* et avec le mélange ADN Tlev*- extraits de protéines de levure.



Nous avons vérifié que nous obtenions des résultats identiques (distance de migration de la bande retardée la plus intense) en utilisant des protéines provenant d'extraits nucléaires préparés dans le laboratoire du Professeur Suzanne Gasser à partir de la même souche Ga59 que celle que nous utilisions (figure 3.4.bis). Cela nous permet également de considérer que l'activité retardée est due à une protéine localisée au moins partiellement dans le noyau. On remarque encore que l'abondance en protéines spécifiques des extraits nucléaires est le 10^{ème} de celle de nos extraits (on a un signal retardé identique pour 10µgr de protéines nucléaires et pour 1µgr de nos extraits protéiques). Ceci nous laisse penser que les 9/10^{ème} des protéines impliquées dans la reconnaissance de l'ADN Tlev pourrait être d'origine cytoplasmique.

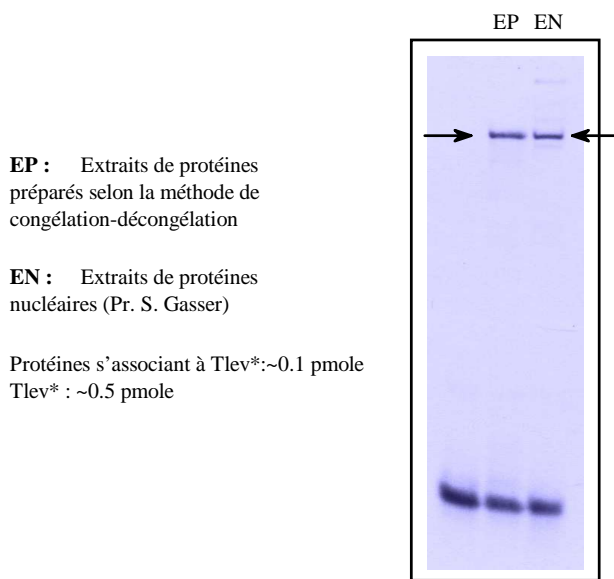


Figure 3.5. : Expérience de référence : Comparaison entre nos extraits de protéines préparés selon la méthode de congélation-décongélation et les extraits de protéines nucléaires (Pr. S. Gasser)

2-1-2- Conditions de migration

Pendant une migration électrophorétique à 4°C, l'intensité du signal retardé reste constante pour une durée de migration totale allant de 30 minutes à 8 heures. Dans ces conditions, le complexe ADN-protéines migre sous une forme stable et n'évolue pas au cours de la migration.

Pour des durées de migration identiques mais à température supérieure (20-30°C), l'intensité de la bande retardée diminue et s'étale, indiquant que le complexe ADN-protéines se dissocie en cours de migration. L'ADN une fois séparé des protéines sort de la zone de migration des protéines et la ré-association avec les protéines devient impossible.

2-1-3- Cinétique de l'association

Nous avons étudié la vitesse d'association de l'ADN avec les protéines à température ambiante. L'intensité du signal observé reste identique à celle de l'expérience de référence pour des temps d'incubation allant de 1 à 60 minutes (conditions expérimentales par ailleurs identiques à l'expérience référence), révélant une association rapide.

Une autre expérience confirme la cinétique rapide. Nous avons commencé par faire migrer les protéines seules (15 minutes), avant de faire migrer l'ADN*. Celui-ci rattrape les protéines et s'y associe dans des proportions identiques à celles de l'expérience de référence, montrant que cette association reste rapide (inférieure au temps de passage de l'ADN (1 min.) dans la zone où migrent les protéines).

En complément de cette expérience, nous avons commencé par faire migrer des protéines préalablement incubées avec le fragment Tlev non marqué radioactivement, puis après 15 min, nous avons fait migrer Tlev marqué radioactivement. Après autoradiographie nous visualisons une bande retardée moins intense que celle observée habituellement, indiquant qu'au passage de l'ADN Tlev*, celui-ci entre en compétition avec l'ADN Tlev non marqué radioactivement.

	Températures d'incubation				
	4°C	25°C	37°C	50°C	60°C
Intensité de la bande retardée (par rapport au signal maximum) après 1 min. d'incubation	50%	100%	100%	100%	-
Intensité de la bande retardée (par rapport au signal maximum) après 15 min. d'incubation	100%	100%	100%	60%	0%

Tableau 3.2. : Evolution de l'intensité de la bande retardée principale en fonction de la température d'incubation.

Enfin la cinétique d'association dépend de la durée mais aussi de la température d'incubation. A 25 et 37°C on n'observe pas de différence de l'intensité de la bande retardée. A 4°C, l'association est ralentie. Après 1 minute, l'intensité du signal retardé est moitié plus faible à 4°C qu'à 25 °C et nous ne discernons pas de différence entre 25 et 37 °C. Après 15 minutes à 4, 25 ou 37 °C, l'intensité du signal retardé est équivalente. A 50°C, le signal est atténué de 60% pour complètement disparaître à

partir de 60°C, ce que l'on peut expliquer par la dégradation des protéines (dénaturation, agrégat par exemple).

2-1-4- Stabilité des protéines

➤ *en fonction de la force ionique*

Après que la force ionique dans les extraits de protéines ait été augmentée en KCl 2M ou en NaCl 4M (1h à T°C), puis ramenée à des conditions permettant de réaliser des migrations électrophorétiques exploitables (50 mM final) (à l'aide d'étapes de dilution - reconcentration dans un tube reconcentrateur avec un tampon sans sel), nous conservons l'activité retardée habituelle.

➤ *en fonction du pH*

Nous avons réalisé deux expériences de migration électrophorétique non dénaturante en fonction du pH de migration (figure 3.6., pH 6.5 et figure 3.7., pH 8) .

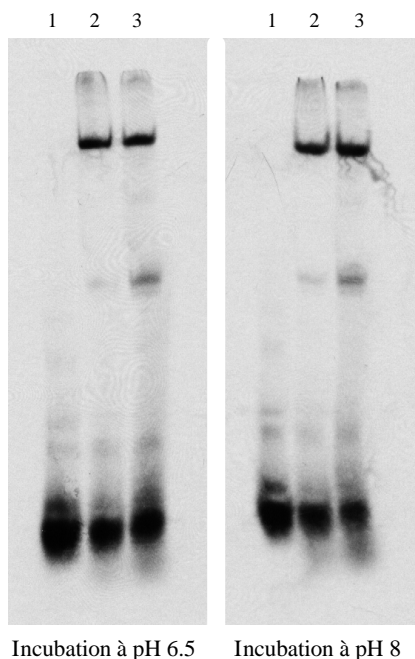


Figure 3.6. : Migration électrophorétique à pH 6.5 en conditions non dénaturantes après incubation à pH 6.5 ou pH 8, à température ambiante, durant 15 minutes, de 1.1 pmol de Tlev* :

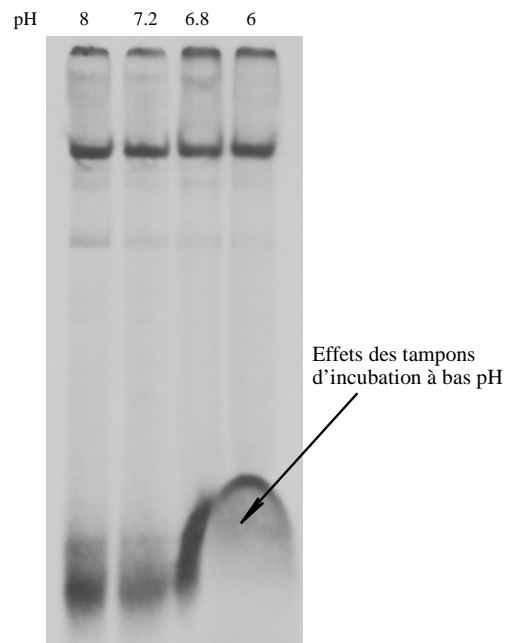
- 1 : en absence de protéines ;
- 2 : en présence de 5 µg d'extraits de protéines de levure et de 500 pmol de d(T₁₄) ;
- 3 : en présence de 5 µg d'extraits de protéines de levure.

Dans le cas de la migration à pH 6.5 (TCE 0.5x), l'incubation a eu lieu à deux pH (tampons TBE pH 8 et TCE pH 6.5), avec ou sans une suite de désoxythymidines d(T₁₄) pour compétiteur non

spécifique (500 fois plus que de Tlev). On observe une bande d'intensité comparable à celle observée pour une migration à pH 8. Une bande d'intensité plus faible et de mobilité électrophorétique plus grande apparaît sensible à la présence de d(T₁₄).

La migration à pH 8 (TBE 0.5x) a lieu après incubation à différents pH (tampons TBE pH 8, HEPES pH 7.2, TCE pH 6.8 et MES pH 6 à 50mM). Aucune variation de l'intensité de la bande retardée intense n'est observée.

Figure 3.7. : Migration électrophorétique à pH 8.0 en conditions non dénaturantes, après incubation à différents pH de 5 µg d'extraits de protéines de levure et 0.65pmol de Tlev*, à température ambiante durant 15 minutes. On remarque les effets dus aux différents tampons d'incubation sur le front de migration.



Cependant, nous ne pouvons établir avec certitude de correspondance directe entre les bandes intenses observées à pH 6.5 et pH 8. Par ailleurs, la cinétique d'association étant rapide, l'effet d'une incubation à un pH différent de celui de la migration montre seulement que les possibilités de fixation des protéines étudiées ne sont pas altérées (figure 3.7.).

Aussi, pour montrer que l'association peut avoir lieu à pH 6 (MES à pH 6 50mM), nous avons déplété presque totalement en protéines spécifiques, un extrait de protéines de levure et comparé les résultats avec un extrait complet. Pour cela, nous avons utilisé une résine d'affinité porteuse d'un ligand comportant la séquence Tlev. Cette expérience sera ultérieurement commentée (cf. Chapitre IV). A partir de ces deux extraits, nous montrons qu'après une incubation à pH 6 pendant 15 min à 4°C et une migration en conditions non dénaturantes à pH 6, les protéines s'associent à la séquence Tlev (figure 3.8.). On observe à pH 6 pour des extraits nucléaires de protéines de levure, une bande

persistante en présence de $d(T_{14})$ (figure 3.8., Bande 1) et une autre pour laquelle la séquence $d(T_{14})$ est compétitrice de Tlev (figure 3.8., Bande 2).

L'incubation des protéines à pH 6 s'accompagnant de l'apparition d'un précipité, pour éviter toute dénaturation ou dégradation des protéines, nous avons réalisé toutes nos expériences à pH 8.

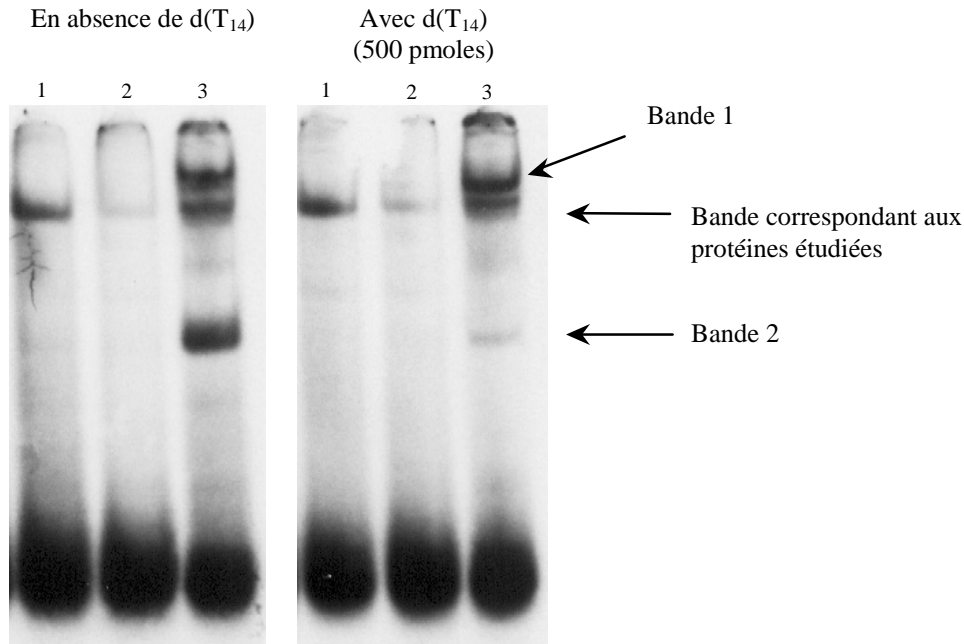


Figure 3.8. : Expérience d'incubation et de migration électrophorétique non dénaturante à pH 6. Incubation 15 minutes à 4°C de 1 pmol de Tlev avec : **1** : 3 µg d'extraits complets de protéines ; **2** : 3 µg d'extraits déplétés en protéines spécifiques de Tlev ; **3** : 24 µg d'extraits nucléaires de protéines de levure.

La formation du complexe Tlev-protéines à pH 6, dans des conditions compatibles avec la formation du motif i, renforce, sans en apporter la preuve, l'idée qu'une association entre Tlev structurée en motif i et des protéines soit possible.

➤ *en fonction de la température*

Indépendamment de toute cinétique d'association avec l'ADN*, la stabilité des extraits protéiques varie en fonction de la température. Nous gardons une activité retardée normale sur des échantillons restés 48 h à 4°C, 15 h à 10°C et 2 h à 37°C. Pour des périodes d'incubation plus importantes à ces températures, l'intensité de la bande retardée diminue. La congélation lente (congélateur à -20 °C)

dégrade totalement les protéines et nous avons systématiquement procédé par congélation à l'azote liquide pour assurer la conservation à -20 °C de nos échantillons. Toutes ces observations sur la stabilité des protéines sont valables pour les extraits protéiques dont la préparation a été décrite préalablement (Chapitre II).

2-2- Protéolyse et hydrolyse des acides nucléiques des extraits de protéines

Nous avons étudié la nature des constituants (acides nucléiques et protéines) du complexe multimérique s'associant à Tlev.

2-2-1- Protéolyse ménagée

Nous avons soumis les extraits de protéines de levure à une protéolyse ménagée, à l'aide d'une protéase alcaline, la subtilisine ou subtilopeptidase A (de masse moléculaire 30 kDa). Cette protéase est active à 37 °C en présence de 10 mM d'acétate de sodium et 5 mM d'acétate de calcium, et est efficace pour $7 < \text{pH} < 11$. Nous avons utilisé 3 µg d'extraits de protéines de levure par essai en testant une gamme allant de 3 ng à 3 µg de protéase. Le volume réactionnel est constant (11 µl). La période d'incubation à 37°C entre protéase et protéines est de 5 minutes. Ensuite, on incube l'échantillon avec l'ADN* pendant 15 minutes à température ambiante (figure 3.9.).

En parallèle, une expérience en l'absence de protéase est menée pour montrer que l'association ADN-protéine reste possible à 37 °C, pH 8, en présence d'acétate de sodium 10 mM et d'acétate de calcium 5 mM.

On ne distingue pas d'effet particulier en présence de 3 ng de protéase. Pour 30 ng de protéase, on observe un épaississement de la bande retardée, traduisant des différences de vitesses de migration, et donc de tailles, dues à l'action de la protéase, dans l'ensemble des protéines qui s'associent à l'ADN. A partir de 300 ng de protéase, nous ne voyons plus trace d'activité retardée. Le complexe retardé observé dépend donc de la présence de protéines.

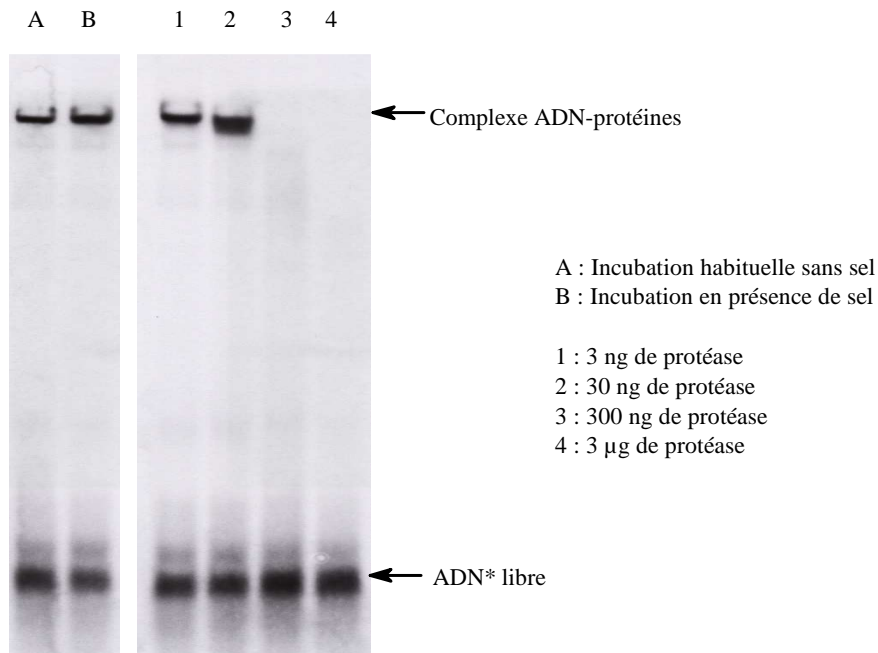


Figure 3.9. : Hydrolyse des acides nucléiques des extraits protéiques de levure. Incubation : 5 min. à 37 °C, en présence de 10 mM de CH_3COONa et 5 mM de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ (réalisée par K. Snoussi).

2-2-2- Hydrolyse des acides nucléiques de l'extrait de protéines

Nous ne pouvons exclure la présence d'acides nucléiques dans les extraits protéiques de levure. Pour s'assurer que ceux-ci ne participent pas activement à l'association du fragment d'ADN Tlev avec une ou des protéines de levure, nous avons hydrolysé les acides nucléiques présents dans les extraits protéiques en utilisant une endonucléase, la benzonase. Cependant, cette endonucléase doit être par la suite séparée des protéines pour que la séquence Tlev* demeure intacte et soit reconnue durant l'incubation préalable à toute visualisation par migration électrophorétique native du complexe ADN*-protéine. Pour cela, nous avons séparé les protéines fixant Tlev de la benzonase (30 kDa) par passage sur une mini-colonne (5 cm) de Superdex 200.

La benzonase dégrade les ADN et ARN simples et double brins, linéaires ou circulaires, en oligonucléotides n'excédant pas 3 à 5 bases de longueur. Elle est active même en présence de détergents ou d'agents dénaturants. Elle fonctionne entre 0 et 42 °C (maximum d'efficacité à 37 °C) entre pH 6 et pH 10 et nécessite 1 à 2 mM d'ions Mg^{2+} pour une activité maximale. L'efficacité de la benzonase a été vérifiée sur la séquence Tlev et sur un fragment d'ARN d'une dizaine de bases

marquées radioactivement. Les fragments radioactifs d'acides nucléiques simple brin obtenus font moins de 4 bases de longueur.

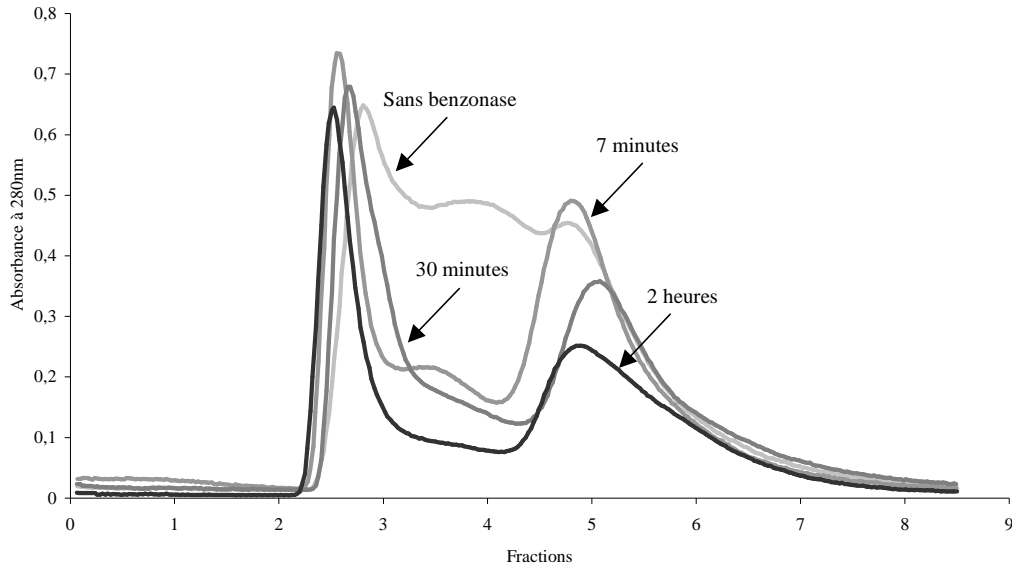


Figure 3.10. : Profils d'élution des essais d'hydrolyse par la benzonase des acides nucléiques présents dans les extraits, en fonction du temps d'incubation.

Nous avons incubé 340 unités de benzonase avec 15 μg de protéines à 37 °C, pendant 7 min, 30 min et 2h, avant de séparer par chromatographie d'exclusion, la benzonase des protéines fixant l'ADN. L'observation des profils d'élution nous permet de constater que l'absorbance à 280 nm est due en partie aux acides nucléiques, lesquels sont bien coupés par la benzonase, comme le montre le décalage de leur sortie vers la fin du profil d'élution avec les poids moléculaires faibles (figure 3.10.).

Les fractions recueillies sont incubées avec l'oligonucléotide Tlev, puis une migration électrophorétique non dénaturante montre que l'intensité de la bande retardée ne varie pas en fonction du temps d'incubation avec la benzonase (figure 3.11.). La masse moléculaire correspondant au signal retardé reste comprise entre 200 et 300 kDa.

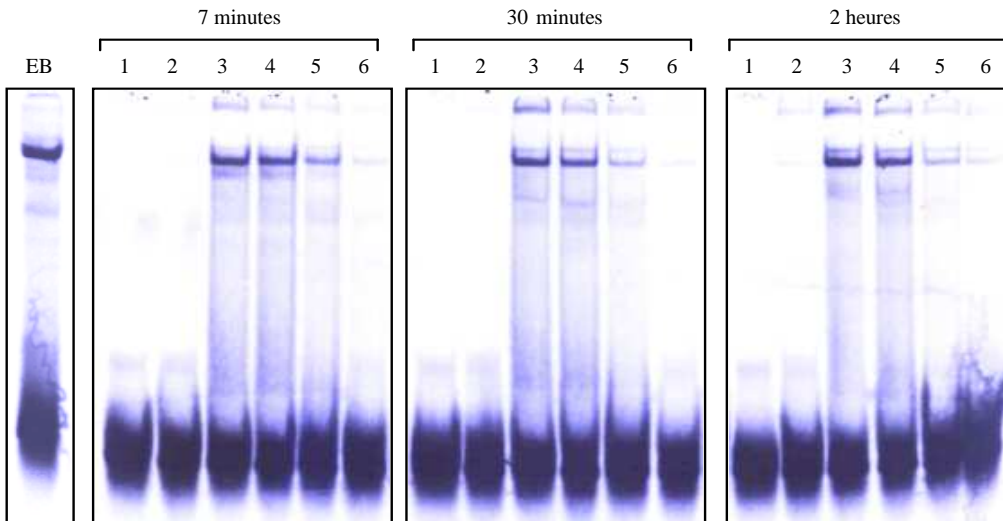


Figure 3.11. : Migrations électrophorétiques natives réalisées à partir des profils d'élution des chromatographies d'exclusion traités à la benzonase en fonction du temps d'incubation des protéines avec la benzonase. EB : extraits protéiques non hydrolysés avant colonne. 1 à 6 : fractions du profil d'élution.

Une expérience complémentaire en fonction de la concentration en benzonase (incubation de 30 minutes à 37 °C), sans élimination de la benzonase par passage sur colonne d'exclusion a été réalisée (figure 3.12.).

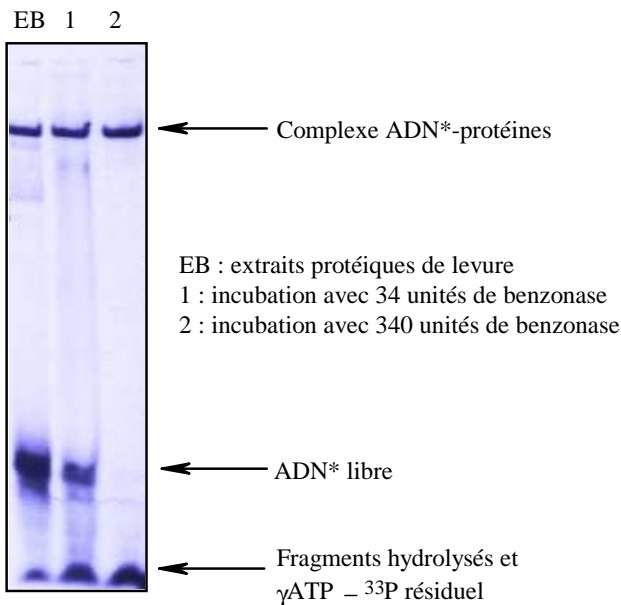
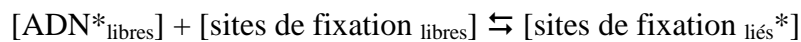


Figure 3.12. : Résultats après incubation avec l'endonucléase sans élimination de celle-ci par passage sur colonne d'exclusion.

Après incubation (15 minutes à température ambiante), l'ADN* libre non fixé par les protéines est dégradé, comme le montre la tache radioactive présente au front de migration. Cependant l'intensité du signal retardé ne varie pas. Ces résultats semblent indiquer qu'après hydrolyse partielle des acides nucléiques présents dans les extraits protéiques (cf. figure 3.10.), la benzonase n'a pas hydrolysé l'ADN Tlev* intervenant dans l'association ADN-protéines ou encore n'a pas hydrolysé l'ADN Tlev* dans des proportions telles que celui-ci ne puisse être reconnu par les protéines alors que la séquence Tlev libre l'était. Cela semble indiquer que Tlev associé aux protéines est relativement bien protégé de l'action de la benzonase.

2-3- Concentration en sites de fixation spécifiques et affinité

La concentration en protéines spécifiques de Tlev et la constante de dissociation du complexe Tlev-protéines formé, peuvent être estimées à partir de la loi d'action de masse. Si l'on considère n sites de fixation de Tlev, équivalents et indépendants, par protéine, la réaction d'association s'écrit à l'équilibre :



ou encore :



$$\text{avec } [\text{sites de fixation}_{\text{liés}^*}] = [\text{ADN}^*_{\text{liés}}] = x .$$

La loi d'action de masse s'écrit alors :

$$\begin{aligned} K_d &= \frac{[\text{ADN}^*_{\text{libre}}] \cdot [\text{sites de fixation}_{\text{libres}}]}{[\text{sites de fixation}_{\text{liés}^*}]} \\ &= \frac{[\text{ADN}^*_{\text{libre}}] \cdot ([\text{sites de fixation}_{\text{total}}] - [\text{sites de fixation}_{\text{liés}^*}])}{[\text{sites de fixation}_{\text{liés}^*}]} \\ &= \frac{[\text{ADN}^*_{\text{libre}}] \cdot ([\text{sites de fixation}_{\text{total}}] - [\text{ADN}^*_{\text{liés}}])}{[\text{ADN}^*_{\text{liés}}]} \end{aligned}$$

En posant : $y = [\text{ADN}^*_{\text{liés}}] / [\text{ADN}^*_{\text{libres}}]$, on obtient :

$$y = \frac{[\text{sites de fixation}_{\text{total}}] - x}{K_d}$$

En faisant varier la concentration en Tlev*, pour un volume d'incubation constant et une concentration en protéines donnée (figure 3.13), on obtient un diagramme de Scatchard (figure 3.14.) qui présente une droite dont la pente correspond à la valeur de la constante de dissociation et l'extrapolation sur l'axe des abscisses permet d'obtenir la concentration totale en sites spécifiques. Cette expérience est réalisée en présence d'un excès de compétiteur non spécifique d(T₁₄).

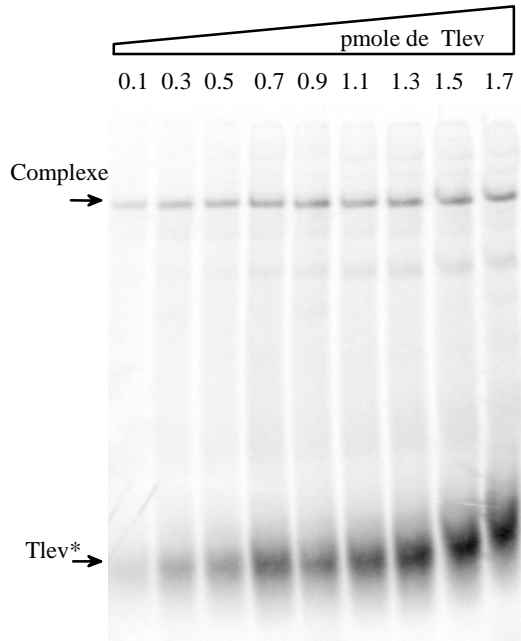


Figure 3.13. : Titration des sites de fixation de la séquence Tlev* : Migration électrophorétique réalisée pour un volume d'incubation constant (15 µl) et 1 µl (=1 µg) d'extraits de protéines de levure en présence de 500 pmol de d(T₁₄). La concentration en Tlev* varie de 6.6 nM à 113 nM.

A partir de ces données, nous obtenons une concentration en sites de fixation de $\sim 6.1 \cdot 10^{-8}$ M pour une constante de dissociation K_d de $\sim 3.2 \cdot 10^{-8}$ M.

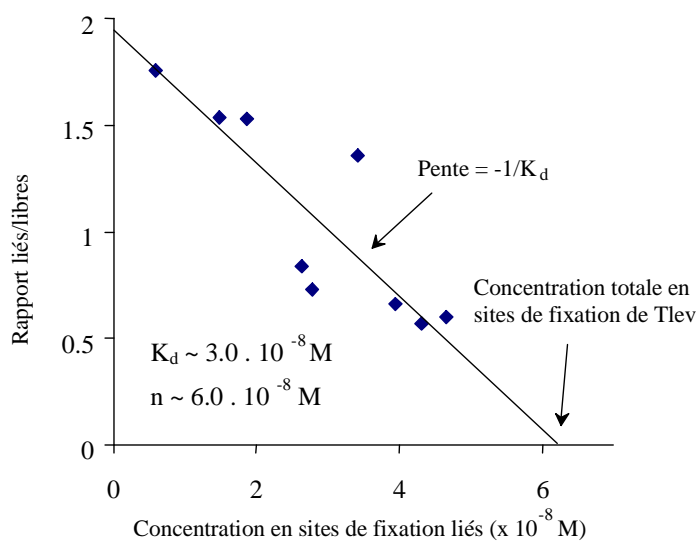


Figure 3.14. : Diagramme de Scatchard : la droite obtenue a une pente proportionnelle à l'inverse de la valeur de K_d et l'intersection avec l'axe des abscisses donne la concentration totale en sites de fixation.

2-4- Masse moléculaire apparente

La masse moléculaire apparente des protéines s'associant à l'ADN est déterminée par chromatographie d'exclusion, sur résine Superdex200 (longueur de la colonne : 90 cm, diamètre : 1cm) préalablement étalonnée. Les fractions du profil d'éluion sont récupérées et testées par électrophorèse non dénaturante après incubation avec Tlev*. La quantité de protéines spécifiques de l'ADN est conservée (comparaison entre l'intensité du signal retardé avant et après passage sur colonne). Dans les conditions décrites au chapitre II, nous trouvons une masse moléculaire comprise entre 200 et 300 kDa.

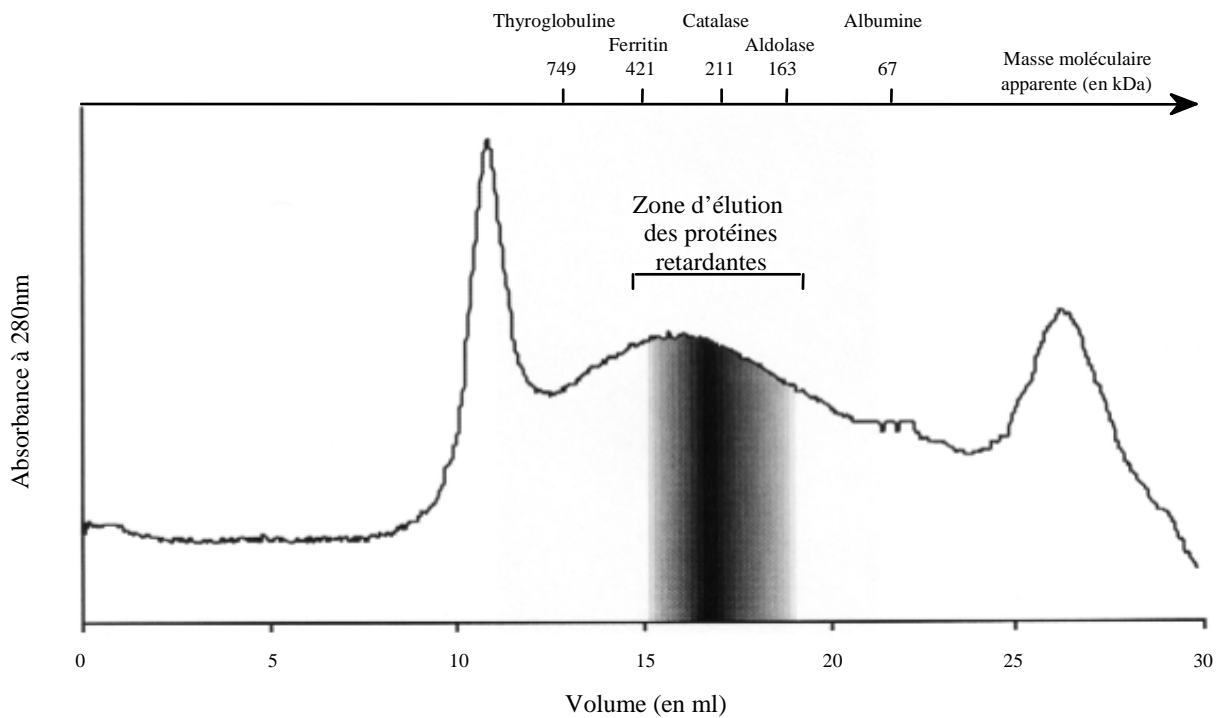
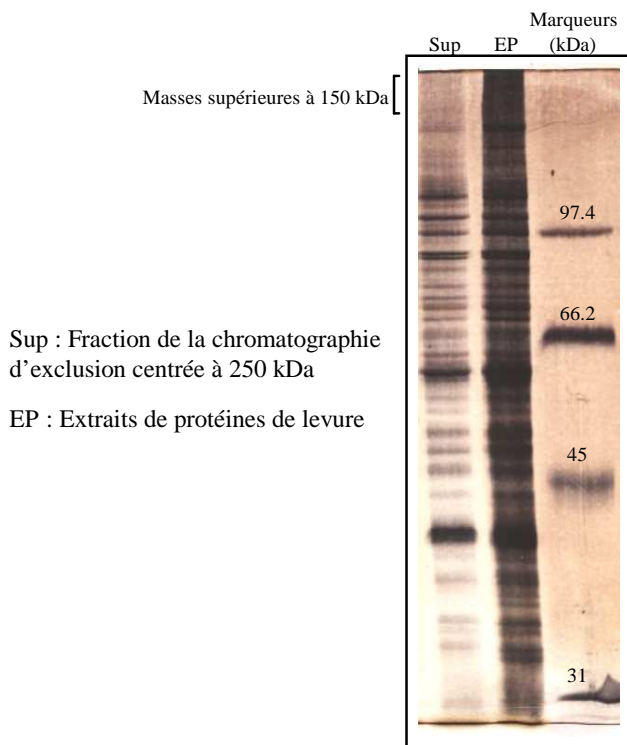


Figure 3.15. : Détermination de la masse des protéines par passage sur tamis moléculaire en conditions natives. Les fractions retardant l'ADN Tlev* sont centrées sur 250 kDa.

La concentration en protéines des extraits étant de 1 g/l, en fonction des résultats obtenus par titration et de la masse moléculaire apparente du complexe protéique (250 kDa), nous pouvons dire que si $n = 1$, la masse en protéines spécifiques représente $6.1 \cdot 10^{-8} \text{ (mol/l)} \times 250000 \text{ (g/mol)} / 1 \text{ (g/l)} = 0.015 \text{ g}$ par gramme de protéines de l'extrait, soit 1.5 % de la masse totale de l'extrait de protéines étudié.

Nous avons dénaturé la fraction du profil d'éluion donnant un signal retardé et nous l'avons comparé avec un extrait protéique dosé pour donner une bande retardée d'intensité identique, lors d'une expérience de migration électrophorétique en conditions dénaturantes. Nous constatons un appauvrissement significatif de l'extrait et nous n'observons aucune protéine abondante ayant une masse supérieure à 150 kDa (figure 3.16.). Il peut donc s'agir d'un complexe multimérique dont nous ne pouvons rien dire de son homogénéité.

Les protéines s'associent à Tlev pouvant se présenter sous la forme d'un complexe multimérique, nous avons étudié la stabilité de ce complexe. En effet, sous certaines conditions (concentration, force ionique, pH, température), un tel complexe pourrait se dissocier. Si un catalyseur (ou un cofacteur) nécessaire à l'association est absent, la dissociation pourrait être irréversible de même que si l'un des composants du complexe est dégradé après dissociation.



En diluant (ou concentrant) d'un facteur 10 les extraits de protéines de levure, nous obtenons un signal retardé proportionnellement plus faible (ou plus fort) que normalement. De plus, en diluant un extrait protéique 800 fois (pendant 1h à 4°C, correspondant à la durée moyenne d'une chromatographie anionique), nous conservons la capacité à retarder habituelle, sans constater de perte de l'intensité du signal. Cela semble indiquer que le complexe protéique, s'il se dissocie, peut se réassocier de façon réversible et rapide.

2-5- Spécificité de l'association ADN-protéines

On peut avoir une idée de la spécificité de l'association entre l'ADN Tlev et les protéines en réalisant des expériences de compétition. En ajoutant au milieu d'incubation un acide nucléique dit 'compétiteur' en plus de la séquence Tlev (l'une des deux séquences étant radioactivement marquée), on observe à partir de quelle concentration ce compétiteur entre en compétition avec Tlev (disparition du signal retardé). Il existe plusieurs catégories de compétiteurs, définies en fonction du rapport $[\text{compétiteur}]/[\text{Tlev}]$ à partir duquel on observe une compétition (diminution supérieure à 50% de l'intensité du signal retardé) :

- les séquences non spécifiques : $[\text{compétiteur}]/[\text{Tlev}] > 1000$
- les mauvais compétiteurs : $10 < [\text{compétiteur}]/[\text{Tlev}] < 1000$
- les compétiteurs spécifiques : $[\text{compétiteur}]/[\text{Tlev}] < 10$
- les compétiteurs interagissant avec l'ADN Tlev

Pour vérifier qu'une séquence s'associe avec une mauvaise affinité ou ne peut pas s'associer aux protéines ciblées, nous avons entrepris des migrations électrophorétiques non dénaturantes pour lesquelles les séquences à tester étaient marquées et l'ADN Tlev était le compétiteur froid.

Tous les essais sont réalisés avec 5 μg de protéines d'extraits de levure, soit environ ~ 0.5 pmol de sites de fixation spécifiques.

➤ *Séquences non spécifiques*

Des fragments d'ADN d'*E. coli* de longueurs variant de 100 à plus de 1000 bases et la molécule d'ATP sont classés dans la catégorie des compétiteurs non spécifiques. Autre compétiteur classé dans cette catégorie, le fragment d(CCC) pour lequel nous n'avons vu aucun effet. Ce fragment peut se structurer en motif i tétramérique à $\text{pH} < 6$, pour une concentration de l'ordre du millimolaire. Il ne peut former cette structure dans les conditions de l'incubation.

Pour le simple brin 21mix (Lacroix et *al.*, 2000), on observe un effet de compétition à partir d'un facteur 1000 de même que pour la séquence T₁₄. Le double brin Igo n'entre pas en compétition avec Tlev*, même pour un rapport [compétiteur] / [Tlev] = 3000 (figure 3.12).

Noms	Séquences non spécifiques (5'→3')	Remarques
Igo	d (CGCGATCGCG)	Double brin d'ADN B ^a
21mix	d (CTCACACTCACACTCACACCC)	Simple brin ^b
T ₁₄	d (TTTTTTTTTTTTTTTT)	Simple brin
C ₃	d (CCC)	Simple brin ou motif i ^c

Tableau 3.3. : Séquences non spécifiques. ^a Leroy et *al.*, 1988, ^b Lacroix et *al.*, 2000, ^c Leroy et *al.*, non publié

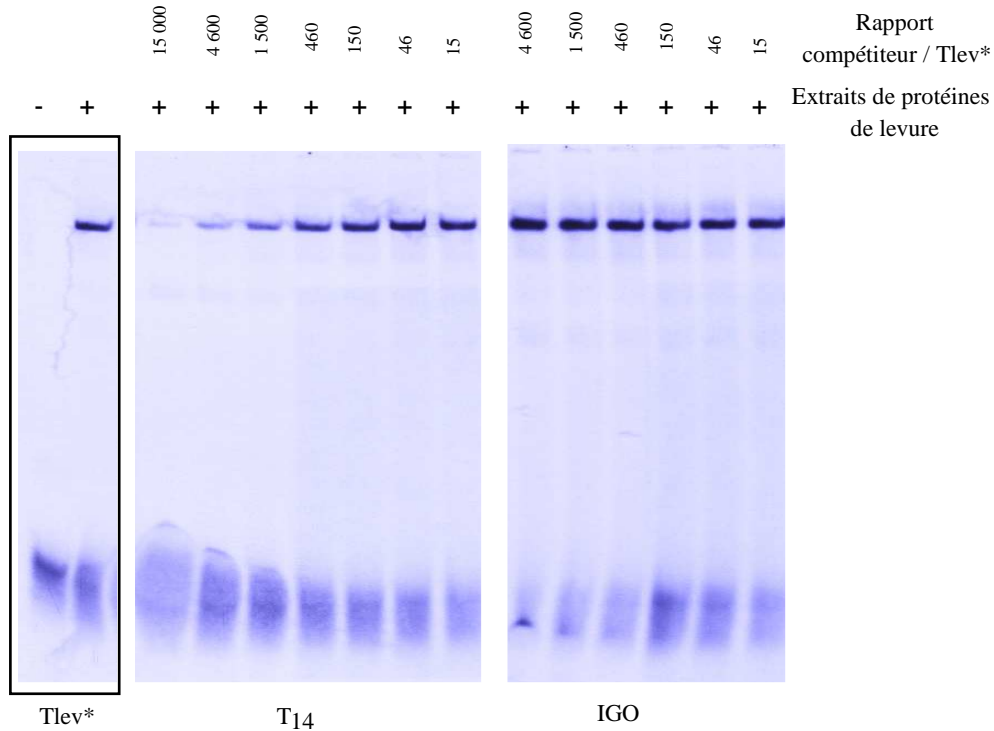


Figure 3.17. : Gel retard non dénaturant obtenu après incubation de Tlev* et avec les séquences T₁₄ et Igo et ~ 0.5 pmol de sites de fixation spécifiques. La concentration en Tlev est de 50 nM et le volume d'incubation de 16.8 µl.

➤ *Mauvais compétiteurs*

multimérique. Ceci peut indiquer que la protéine se fixe à un multimère. La répétition trinuécléotidique 27ccg est capable de former une structure tige-boucle *in vivo* (Moore et al., 1999). Les résultats obtenus avec cette séquence indiquent qu'elle est un mauvais compétiteur de la séquence Tlev.

Lors d'une incubation dans un rapport $[T_{26}] / [Tlev] = 100$, nous observons que le signal retardé est fortement atténué (figure 3.19.). Après incubation avec les extraits de protéines de levure, la séquence T_{26}^* marquée radioactivement présente un retard diffus dans la zone d'observation habituelle du signal caractéristique des protéines de levure s'associant à Tlev (figure 3.19.).

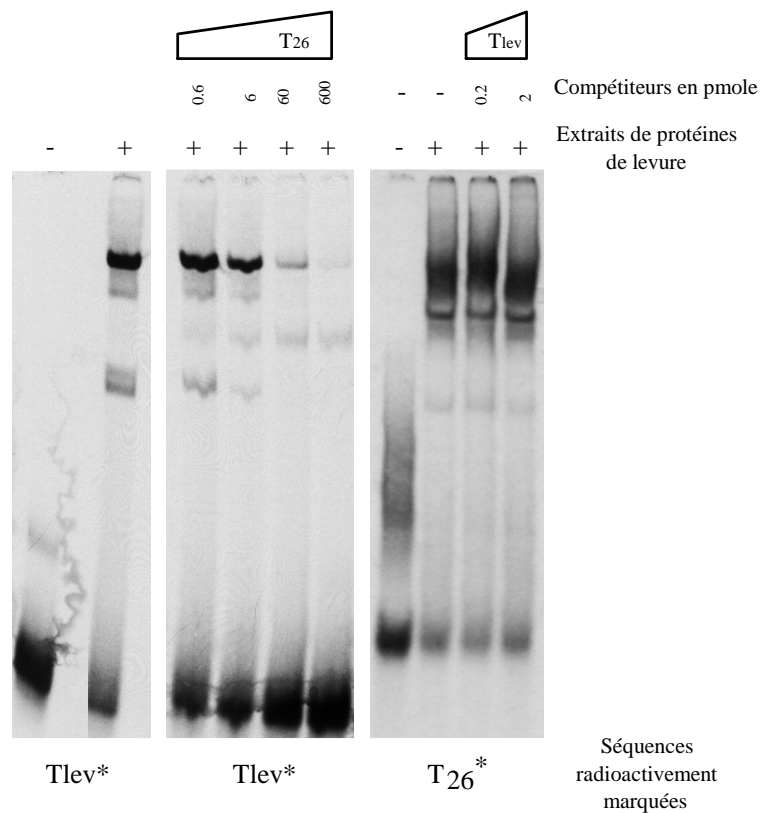


Figure 3.19.: Gel retard non dénaturant obtenu après compétition entre les séquences Tlev et T_{26} , et incubation avec ~ 0.5 pmol de sites de fixation spécifiques de levure. La quantité de Tlev* est constante (0.65pmol) de même que pour T_{26}^* (0.2pmol).

➤ *Compétiteurs spécifiques*

Les séquences testées retenues dans cette catégorie peuvent toutes adopter un motif i intramoléculaire. A l'exception de la séquence C_{26} , ces séquences présentent toutes 4 blocs de 2 à 5 désoxycytidines entre lesquels sont intercalées des variations de 2 à 3 bases A et / ou T. Aucune différence n'a pu être faite sur l'efficacité des compétiteurs testés en fonction de la nature de ces variations de séquences.

Les séquences comportant des répétitions à 2 désoxycytidines ont une affinité moins bonne que celles présentant des répétitions de 3 à 5 désoxycytidines. Parmi les différents oligodésoxynucléotides testés, nous ne mentionnerons dans le tableau suivant que ceux présentant des caractéristiques significativement différentes les uns des autres.

Noms	Compétiteurs spécifiques (5'→3')	Compétitions	Remarques
Tlev	d (CCCACACCCACACCCACACCC)	+++	Possible répétition télomérique de levure / motif i
C ₂₆	d (CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC)	++	Motif i / simple brin ^a
20sc	d (CCACACCACACCACACCACA)	+	Possible répétition télomérique de levure / motif i
24sc	d (CCACACCCACACCCACACCCACAC)	++	Possible répétition télomérique de levure / motif i
50sc	d [C ₂₋₃ A (CA) ₁₋₆] (50 bases)	+*	Séquence télomérique naturelle provenant de levure (50 bases)
Centmod	d (CCTTTCCTTTACCTTTCC)	+	Motif i intramoléculaire ^b
Mcent-u	d (CCATTCCAUTCCUTTCC)	+	Centromère modifié / motif i intramoléculaire ^c
Cena	d (CCATTCCATTCCATTCCA)	+	Centromère (satellites II et III humain, satellite CDE III de levure) / motif i ^d
Centro6	d (ATTCCATTCCATTCCATTCCATTCC)	+*	Centromère (satellites II et III humain, satellite CDE III de levure) / motif i ^d
22hm	d (CCCTAACCCTAACCCTAACCCT)	+++	Possible répétition télomérique humaine / motif i intramoléculaire ^e
27hm	d (TAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA)	+++	Possible répétition télomérique humaine / motif i intramoléculaire ^a
45hm'	d (CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAAC CCTAACCCTAACCCT)	++*	Possible répétition télomérique humaine / motif i intramoléculaire ^a
BTlev	B-d (TTTT CCCACACCCACACCCACACCC)	+++	Séquence Tlev biotinyllée en 5'
T ₄ Tlev	d (TTTT CCCACACCCACACCCACACCC)	+++	Séquence BTlev sans biotine
Crypt25	d (CCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCT)	++*	Possible répétition télomérique de <i>Cryptococcus</i> / motif i ^d
Tetra22	d (CCCCACCCCAACCCCAACCC)	+++*	Possible répétition télomérique de <i>Tétrahymena</i> / motif i ^f
29h	d (CCCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCT)	+++*	Motif i ^a
29i	d (CCCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCT)	+++*	Motif i ^a

Tableau 3.5. : Compétiteurs spécifiques. +, ++, +++ : diminution de moitié du signal retardé pour un rapport compétiteur / Tlev* de 100, 10 et 1 respectivement ; * séquences pour lesquelles on observe la formation de complexes ADN*-protéines autres que celui sur lequel porte cette étude. ^a Lacroix et al., 2000, ^b Han et al., 1998, ^c Nonin-Lecomte & Leroy, 2001, ^d Nonin-Lecomte, communication personnelle, ^e Phan et al., 2000, ^f Leroy J.L., non publié

Dans le cas des séquences Centmod, Mcent-u et 22hm, nous avons observé qu'elles s'associaient aux protéines lors d'incubation à pH 6.8 suivi de migration à pH 6.8 (tampon d'électrophorèse TCE 0.5x, pH 6.8), dans des conditions où elles ont été observées structurées en motif i par RMN. Les séquences 29h et 29i (structurées en motif i à pH 6.8) s'associent elles aussi avec les protéines dans ces conditions.

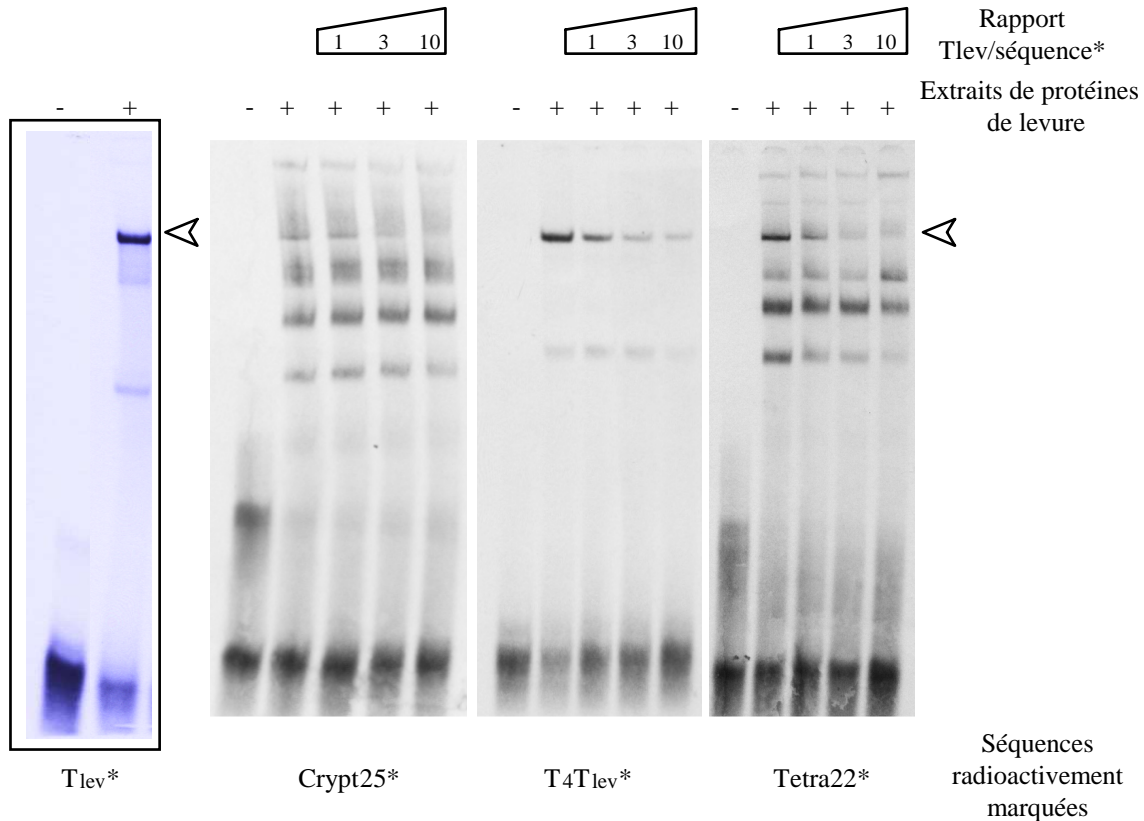


Figure 3.20. : Gels retard non dénaturant obtenus pour différents compétiteurs spécifiques. La séquence Tlev est utilisée comme compétiteur froid et les séquences testées (Crypt25, T₄Tlev et Tetra22 sont radioactivement marquées).

Comme on peut le remarquer sur les exemples donnés en figure 3.20., certaines séquences testées peuvent s'associer à des protéines pour lesquelles la séquence Tlev n'est pas compétitrice. Ces séquences sont indexées d'un * dans la colonne 'compétitions' du tableau 3.5. .

➤ *Compétiteurs en interaction avec Tlev*

Dans cette catégorie, nous regroupons les séquences pour lesquelles on observe une compétition due vraisemblablement à l'interaction avec la séquence Tlev. Les fragments d'ADN Ghum et

GTlev, partiellement ou totalement complémentaires de la séquence Tlev, peuvent interagir avec cette séquence (double brin). Nous décrirons ultérieurement les phénomènes intervenant en présence de ces séquences riches en G.

Noms	Compétiteurs interagissant avec la séquence Tlev (5'→3')	Remarques
27cgg	d (CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG)	Tige-boucle ^a
21gc	d (CCCTAACCCCTAAGGGTTAGGG)	Tige-boucle ^b
Ghum	d (AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)	Possible répétition télomérique humaine / tétrade de G ^c
GTlev	d (GGGTGTGGGTGTGGGTGTGGG)	Brin complémentaire de Tlev

Tableau 3.6. : Séquences interagissant avec Tlev. ^a Moore et *al.*, 1999 ; ^b Mergny, communication personnelle ; ^c Thèse Phan Anh Tuan

➤ Conclusion

Les protéines recherchées sont spécifiques de séquences d'ADN riches en cytosines. Cependant, elles ne s'associent pas au fragment élémentaire d(CCC) dont nous avons montré qu'il formait un motif i intermoléculaire sous des conditions de concentration et de température différentes de celles dans lesquelles peuvent avoir lieu le contact avec les protéines (Leroy et *al.*, en préparation).

Par ailleurs, l'association avec les fragments Crypt1.5 et Sacc1.5 est fonction de la concentration en ADN, ce qui peut traduire l'éventuelle association entre les protéines et une forme multimérique adoptée par ces séquences.

Il existe une différence d'affinité entre les séquences de type centromérique à 4 répétitions de deux désoxycytidines et les séquences télomériques à 4 répétitions de 3 désoxycytidines et plus. Toutes les séquences à 4 répétitions de désoxycytidines testées sont capables d'adopter un motif i intramoléculaire. Cependant, la stabilité des séquences de type centromérique est moins grande que celle des séquences télomériques. Ainsi dans le cas du fragment centromérique humain, Mcen-u, deux intercalations sont observées en fonction du pH (Nonin-Lecomte & Leroy, 2001). Toutes ces constatations nous orientent vers l'hypothèse d'une association spécifique entre les protéines et un motif i intramoléculaire, sans cependant en apporter la moindre preuve.

2-6- Comparaison de nos résultats avec des protéines connues

Nous avons étudié la participation éventuelle dans le complexe protéique associé au fragment télomérique Tlev de protéines connues pour interagir avec les télomères de levure. Nous avons regardé ce qu'il en était des protéines Rap1p, Sir1p, Sir3p et Sir4p.

Nous avons disposé de sérum anti-Rap1p et d'une souche d'*E. coli* portant le plasmide de la protéine Rap1p, fournis par M. E. Gilson (Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon).

Après incubation des extraits protéiques et de Tlev* des anticorps de Rap1p, nous n'avons pas observé d'effet de supershift ou de disparition partielle ou totale de la bande retardée habituelle lors d'une électrophorèse non dénaturante. De même, nous n'avons pas observé de bande retardée après migration des protéines produites à partir du plasmide de Rap1p [Expériences réalisées par Mme M. Leblond (Gilson et *al.*, 1993)].

Pour les protéines Sir1p, Sir3p et Sir4p, nous disposions pour chacune, de souches de levure où les protéines n'étaient pas exprimées (tableau 3.7). Nous avons produit des extraits de protéines à partir de ces souches selon le mode opératoire défini précédemment. Après incubation entre ces différents extraits et Tlev*, nous avons procédé à des migrations électrophorétiques natives. La bande retardée habituelle est apparue sans changement.

Dénomination	Génotype
YLS 126	<i>MATα, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, 15, ura3-1, hmr :: TRP1 Δ sir3::LEU2</i>
YLS 134	<i>MATα, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, 15, ura3-1, hmr :: TRP1 Δ sir4::LEU2</i>
YLS 396	<i>MATα, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, 15, ura3-1, hmr :: TRP1 Δ sir1::LEU2</i>

Tableau 3.7. : Souches où les protéines Sir1p, Sir3p et Sir4p n'étaient pas exprimées.