
Biochimie des protéines et des acides nucléiques

L'organisme servant de base de travail à l'étude présentée dans ce manuscrit est une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, communément appelé « levure du boulanger » dont le génome est entièrement séquencé.

1-1- Culture de *Saccharomyces cerevisiae* et extraits de levure

1-1-1- Souches utilisées

Plusieurs souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées durant cette étude (tableau 2.1. pour les deux principales).

Dénomination	Génotype
YDS 38	<i>MATα, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, 15, ura3-1, hmr :: TRP1</i>
EG124 = GA59	<i>MATa, trp1 ura3-52 leu2-3, 112 prb1-1122 pep4-3 prc1-407 gal2</i>

Tableau 2.1. : Les deux principales souches de levure sources des extraits protéiques étudiés dans ce projet. Nous avons commencé par travailler avec la souche YDS 38. A partir de décembre 1998, tout le travail a été effectué avec la souche EG124 construite pour produire peu de protéases (Cockell et al, 1995).

1-1-2- Conditions de culture

La culture des levures *Saccharomyces cerevisiae* est réalisée en milieu liquide YPG (Yeast Peptone Glucose), sous agitation permanente (oxygénation des levures), à une température de 30°C. Pour permettre un bon démarrage de la culture, une colonie isolée provenant de levures souches (stockées sur boîtes de Petri à 4°C) est prélevée pour incubation pendant 24h dans un milieu de préculture d'une vingtaine de millilitres. Ce milieu est ensuite versé directement dans un farnbach de 1 litre de YPG pour 60 heures environ à 30°C sous agitation continue. La croissance des levures est suivie par la mesure de l'absorbance à 600 nm, lors de prélèvements de 1 ml du milieu de culture. Le développement de la culture est stoppé en fin de phase de croissance exponentielle.

1-1-3- Extraction des protéines

Plusieurs méthodes permettent de briser les levures en vue d'en extraire des protéines. Parmi les plus répandues, citons la méthode consistant à les écraser, dite « French press », ou celle consistant à déchirer les membranes par frottements contre des billes de verre. Nous avons commencé à travailler selon ces modes de préparation (cf. Annexes). Ces deux méthodes ne permettent pas de traiter des quantités conséquentes de levures (faible volume de la chambre d'écrasement dans le cas de la French press et viscosité croissante du milieu d'extraction dans le cas des billes de verre, diminuant d'autant l'efficacité de ces méthodes). Ne pouvant atteindre un objectif de production (plusieurs millilitres d'extraits de protéines à une concentration moyenne de $1 \mu\text{g} / 1\mu\text{l}$, provenant de plusieurs dizaines de grammes de levures) nous permettant de travailler durablement avec des protéines venant d'une même préparation, nous avons développé une méthode d'extraction plus adaptée à nos besoins.

Cette méthode repose sur la cassure des levures par des congélations quasi-instantanées (azote liquide) et successives, avec entre chaque congélation des périodes de réchauffement en bain-marie à $25^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$. Pour faciliter ces opérations, les levures récupérées par centrifugation après culture, sont remises en suspension dans un faible volume d'eau (maximum 5% volume / masse des levures).

Nous avons pu contrôler l'efficacité de la méthode par inspection des cellules au microscope, lors des étapes de congélation/décongélation. En présence de SDS (1%), les levures cassées forment des agrégats alors que celles dont les membranes sont intactes restent isolées. La première congélation n'est efficace qu'à 30% alors qu'après la seconde congélation, plus de 95% des levures sont agrégées, donc effectivement cassées. Cependant, cette technique ne s'applique pas à la récupération de protéines membranaires, car les membranes sont simplement rompues. Elle ne donne pas non plus de résultats satisfaisants lorsque les levures sont collectées en phase stationnaire (membranes trop épaisses).

1-1-4- Protection contre les protéolyses

L'ensemble des étapes menant à l'obtention d'extraits de protéines de levure se fait en présence d'anti-protéases (voir modes opératoires en Annexes) afin d'éviter les protéolyses, principalement

lors des phases de réchauffement. Les anti-protéases utilisées au cours de la préparation de nos extraits protéiques, ainsi que les concentrations efficaces sont données dans le tableau 2.2..

Anti-protéases	Cibles	Concentrations habituellement utilisées
PMSF	Trypsine, Chymotrypsine, protéases à sérine	0.1 – 1 mM
Pefabloc®	Kallikrein, Thrombine, TPA, Subtilisine A, Trypsine, Chymotrypsine, Plasmine, protéases à sérine	0.4 – 4 mM
Benzamidine	Peptidases	0.1 µM
Aprotinine	Kallikrein, Trypsine, Chymotrypsine, Plasmine	0.01 – 0.3 µM
Inhibiteur de Trypsine (ovomucoïde)	Trypsine	0.5 – 5 µM
EDTA	Metalloprotéases	0.5 – 1.3 mM

Tableau 2.2. : Anti-protéases utilisées lors des étapes d'extraction des protéines de levure et de purification par chromatographie liquide. (sources : Sambrook et *al.*, 1989 ; Boehringer Mannheim : The complete guide for protease inhibition, 1998)

1-1-5- Préparation des extraits protéiques. Dosage colorimétrique des protéines.

Les levures cassées sont centrifugées et le surnageant récupéré. Les acides nucléiques présents sont éliminés par précipitation à la streptomycine (8mg /ml) (Spelsberg, 1983). Aucune amélioration à cette séparation n'est apportée par une précipitation complémentaire à l'aide de polyéthylèneimine (PEI) (Murray P., 1990). Nous avons vérifié qu'aucune co-précipitation importante de protéines du surnageant n'avait lieu lors de ces étapes en hydrolysant les acides nucléiques précipités à la streptomycine (utilisation d'une endonucléase, la benzonase, et gel de protéines).

Les protéines sont ensuite précipitées au sulfate d'ammonium à 55%, et le précipité obtenu est repris dans du tampon Tris (45 mM) borate (45 mM) EDTA (1 mM) (= TBE 0.5x) à pH 8, en présence de β -mercaptoéthanol (5mM), de détergent non ionique Nonidet P40 (20µl/l), de PMSF (0.5 mM), de Pefabloc® (4 mM), de benzamidine (6 µM), d'aprotinine (8.5 nM), d'inhibiteur de trypsine (3 nM) et de NaCl (50 mM). L'extrait de protéines obtenu est dialysé pour éliminer le sulfate d'ammonium, pendant 5 heures à 4°C contre du TBE 0.5x en présence de NaCl 10 mM, β -mercaptoéthanol 5mM, de MgCl₂ 2 mM et de Nonidet (20µl/l).

Le dosage des protéines présentes dans l'extrait est réalisé par colorimétrie (Bradford, 1976) à l'aide du kit Biorad Protein Micro Assay (1-20 μ g/l). Une gamme étalon est réalisée à l'aide de BSA (sérumalbumine bovine). La concentration finale en protéines des extraits préparés varie de 1 à 2 μ g protéines / μ l d'extraits.

1-2- Synthèse d'oligodésoxynucléotides

La synthèse des acides désoxyribonucléiques est réalisée avec un synthétiseur Gene Assembler (Pharmacia). La séquence d'ADN est synthétisée de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' (Blackburn Gait, 1990), à partir des dérivés β -cyanoéthyle phosphoramidites des nucléosides. Le support solide utilisé est constitué de billes de silice sur lesquelles est greffé le premier nucléotide. La réaction de couplage est conduite en milieu anhydre dans l'acétonitrile, en présence de tétrazole comme activateur. Les synthèses sont réalisées à l'échelle de 2 μ mol ou de 15 μ mol. L'insertion d'une biotine dans la chaîne d'ADN est possible en utilisant une biotine amidite ou biodite[®] (Pharmacia) comme base modifiée. La partie biotine de la molécule est séparée de la partie amidite par un lien d'une dizaine d'atomes à partir du groupement carboxyle de la chaîne latérale de la biotine. Nous avons généralement procédé à ce type d'insertion à l'extrémité 5' de la séquence synthétisée.

Les oligodésoxynucléotides synthétisés sont purifiés par passage sur colonne anionique Q-Sepharose (Pharmacia), dans un tampon à 60 mM NaOH (pH 12). L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de NaCl optimisé selon la séquence de l'oligodésoxynucléotide à purifier, et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm (longueur d'onde choisie pour ne pas saturer le détecteur). Après neutralisation, l'échantillon est dessalé par dialyse. La concentration est déterminée à partir du coefficient d'extinction molaire établi en fonction des premiers voisins (Cantor et *al.*, 1970) et de la mesure de l'absorbance à 265 nm. La biotine n'absorbant pas à 265 nm, elle n'affecte pas la mesure d'absorbance.

1-3- Marquage radioactif des oligodésoxynucléotides

Les oligodésoxynucléotides sont marqués radioactivement à l'aide de γ ATP-³³P. La phosphorylation en 5' est réalisée à l'aide de la T4-polynucléotide kinase (Roche). La réaction a

lieu à 37°C pendant 30 minutes, selon les procédures communément utilisées (Sambrook et *al.*, 1989). L'ADN phosphorylé est séparé de la polynucléotide kinase par précipitation dans l'éthanol. Le précipité est lavé avec de l'éthanol à 70% puis repris dans 30 à 50 µl de Tris (90 mM) citrate (90 mM) EDTA (2 mM) (= TCE 1x) à pH 7.

L'efficacité de la réaction de phosphorylation est visualisée par migration sur couche mince d'un échantillon du milieu réactionnel prélevé avant l'incubation à 37°C, et d'un échantillon de même volume prélevé en fin d'incubation. Le γ ATP-³³P non utilisé est visualisé au front de migration. La différence de signal relevée entre les deux échantillons permet d'établir le rendement de kination. Les séquences radioactivement marquées seront annotées d'un « * » par la suite.

1-4- Gel dénaturant (ADN marqué)

La qualité des échantillons d'acides nucléiques purifiés est contrôlée par migration électrophorétique dénaturante. L'échantillon préalablement marqué radioactivement est dénaturé à 90°C en présence d'urée (6M) pendant cinq minutes avant d'être déposé sur gel (acrylamide/bisacrylamide 12%, urée 6M). La migration se fait sur système d'électrophorèse non réfrigéré, à 30W (pour un gel de 20 cm x 20 cm x 0.8 mm). Après migration, les acides nucléiques sont fixés et l'urée éliminée dans un mélange acide acétique 10% - éthanol 20%. Le gel est séché sur papier Whatman. Les résultats sont obtenus après exposition nocturne et développement d'un film Kodak Biomax MR. Le rendement final de la synthèse d'ADN est généralement de 97 % pour une séquence de 20-25 bases, 75% si une biodite[®] est insérée en fin de synthèse.

1-5- Electrophorèse en conditions non dénaturantes

Les techniques de migration électrophorétique non dénaturante ont servi à la mise en évidence des interactions entre ADN* (radioactivement marqué) et protéines, nécessaires pour déterminer la spécificité de l'association entre ADN et protéines, et pour suivre les étapes de purification menant à l'identification des protéines recherchées.

Nous avons utilisé pour cela des gels de polyacrylamide de 18 cm x 20 cm x 0.8 mm généralement à 7% d'acrylamide (acrylamide / bisacrylamide, 29 :1, sous forme liquide, Biorad). Le tampon d'électrophorèse est du TBE 0.5x, à pH 8-8.3. Le dépôt des échantillons (volume ~15 µl) est facilité par l'ajout de glycérol (5% v/v) après incubation. La vitesse de migration est visualisée par la progression de deux marqueurs colorés, le xylène cyanol et le bleu de bromophénol (Sambrook et *al.*, 1989).

Pour éviter un échauffement des protéines durant la migration, nous avons travaillé en chambre froide et nous avons eu recours à un système de doubles cuves d'électrophorèse à réfrigération centrale. Dans ces conditions, la migration a lieu à 15W constant (~ 25V/cm). Après migration, les gels sont séchés et autoradiographiés.

Les autoradiographies sont numérisées à l'aide d'un scanner. Le bruit de fond est éliminé par traitement de l'image à l'aide des programmes Scion Image (PC Windows) ou NIH Image 1.62 (Macintosh). Ces mêmes programmes permettent de mesurer l'intensité des bandes retardées.

1-6- Gel de protéines (électrophorèse dénaturante)

1-6-1- Conditions de migration

La migration électrophorétique en conditions dénaturantes des extraits protéiques partiellement purifiés a été utilisée à la fois comme outil de contrôle de l'avancement des différentes étapes de purification et comme étape de purification. Il s'agit d'un passage obligé avant le séquençage de protéines.

Les gels sont préparés selon la méthode développée par Laemmli (1970). Un gel de concentration (pH 6.8, 5.1 % d'acrylamide) est coulé au-dessus d'un gel de résolution. La zone de concentration mesure 2 cm pour une profondeur des puits de dépôts de 1 cm. Le pourcentage d'acrylamide du gel de résolution dépend de la masse des protéines que l'on veut observer. Les gels sont de mêmes dimensions que les gels natifs détaillés précédemment. Dans ces conditions, la distance de migration possible dans le gel de résolution est de 16 cm. La tension au début de la migration est de 500V, à puissance constante de 60W dans le gel de concentration. Après passage des protéines dans

le gel de résolution, la puissance maximale est ramenée à 40-50W. L'ensemble de la migration est thermiquement régulé entre 60 et 70°C (système de double cuves d'électrophorèse à réfrigération centrale).

Les échantillons d'extraits protéiques en phase liquide sont dénaturés par incubation à 80°C pendant 5 minutes en présence de SDS (1%) et de β -mercaptoéthanol (100 mM). La dénaturation de protéines piégées sur un support (gel retard natif ou billes d'agarose) a lieu dans le même milieu et les mêmes conditions d'incubation, en présence d'urée, 2.5 M.

1-6-2- Coloration des gels de protéines

La visualisation d'une bande de protéine repose sur l'utilisation de colorants se fixant spécifiquement sur les peptides. La résolution et la sensibilité dépendent du colorant utilisé, de la concentration, de la masse de la protéine et de son affinité pour les colorants. A titre indicatif, la sensibilité des colorants utilisés pour l'albumine bovine (Bovine Serum Albumine Fraction V, Sigma) et le temps moyen d'obtention du résultat sont donnés dans le tableau 2.3.

Différents types de coloration utilisés	Sensibilité (/BSA)	Durée moyenne avant obtention de résultats	Remarques
Rouge Ponceau	10-100 μ g	10 minutes	Coloration réversible
Noir Amido	1-10 μ g	1 heure	
Bleu de Coomassie	0.1-1 μ g	12 heures	
Sulfate de zinc	10-100 ng	10 minutes	Coloration en négatif et réversible
Nitrate d'argent	0.1-10 ng	2 heures	

Tableau 2.3. : Sensibilités par rapport à la BSA des différentes colorations utilisées lors de la coloration de gels de protéines.

La coloration au nitrate d'argent est effectuée en utilisant le kit « Silver Stain Plus » de BioRad. Cette méthode ne nécessite pas de fixation préalable des protéines à l'aide de glutaraldéhyde, fixation qui empêcherait l'exploitation d'échantillons par spectrométrie de masse.

➤ Remarques concernant les différents types de coloration :

Le temps total de coloration / décoloration des protéines au bleu de Coomassie est réduit en chauffant le gel pendant l'étape de coloration / fixation. On constate que la décoloration est accélérée et le bruit de fond diminué.

La sensibilité et l'affinité de la coloration au nitrate d'argent sont augmentées si le gel est préalablement coloré au bleu de Coomassie, puis quasi-totalement décoloré avec du méthanol à 40%. La figure 2.1. donne une idée des gains de sensibilité obtenus. De plus la sélectivité de la coloration est fortement diminuée. Mais nous n'avons pas pu exploiter en spectrométrie de masse d'échantillons obtenu par double coloration, contrairement à l'une ou l'autre des deux colorations.

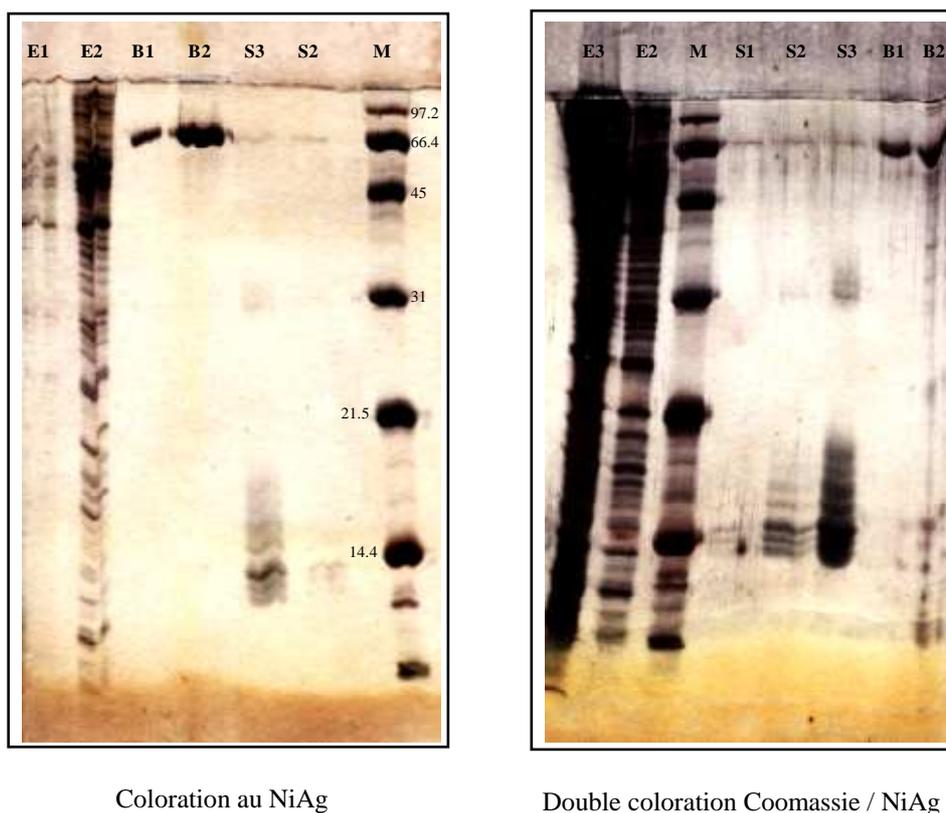


Figure 2.1. : Comparaison entre coloration au nitrate d'argent et double coloration Coomassie/AgNO₃. B1 = BSA 0.1 µg ; B2 = BSA 1 µg; E1 = 0.1 µl d'extraits de protéines de levure; E2 = 1 µl d'extraits de protéines de levure; E3 = 10 µl d'extraits de protéines de levure; M = marqueurs de poids moléculaire (en kDa); S1 = 0.01 µg de streptavidine; S2 = 0.1 µg de streptavidine; S3 = 1 µg de streptavidine

Dans le cadre de la préparation d'échantillons destinés à la spectrométrie de masse (par découpage du gel dénaturant dans les zones correspondant aux protéines à analyser), nous avons systématiquement procédé à une identification des protéines par coloration au sulfate de zinc. Cette coloration est réversible mais reste moins sensible que la double coloration bleu de Coomassie – nitrate d'argent.

La coloration au noir amido est mal adaptée à la coloration d'un gel de protéines faiblement concentrées. En revanche, elle se justifie pour les gels riches en protéines à partir desquels sont préparés les échantillons pour le séquençage par dégradation d'Edman. Nous avons constaté une augmentation du contraste entre protéines et bruit de fond de la coloration à l'amido black, par coloration préalable au sulfate de zinc, suivie d'une décoloration.

1-6-3- Transfert sur membrane

Les protéines sont transférées à partir du gel d'acrylamide sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (ou PVDF) Immobilon-P (Millipore) à l'aide d'un système de transfert humide de type Trans-Blot Cell (BioRad). La membrane est préalablement trempée dans du méthanol (99.8%), puis rincée avec de l'eau type Milli Q, avant d'être équilibrée dans le tampon Tris-Borate 50 mM (~ pH 9) servant lors des transferts.

Le gel et la membrane sont maintenus entre des carrés de papier Whatman, puis immergés dans le système. Le transfert s'effectue sur la nuit. On règle la tension de transfert en fonction de la masse des protéines à transférer, de l'épaisseur et de la concentration en acrylamide du gel, de façon à éviter un transfert incomplet ou un sur-transfert. Par exemple, une protéine de 50 kDa séparée sur un gel à 7% d'acrylamide et de 0.8 mm d'épaisseur, est électro-transférée sous une tension maintenue constante de 28V. Le courant est de 120 mA à 140 mA pour un gel de 10 cm² et 0.8 mm d'épaisseur.

1-7- Séquençage d'Edman

Les micro-séquençages séquentiels ont été réalisés par dégradation d'Edman automatique avec un séquenceur de protéines en phase liquide Procise (Perkin Elmer, Applied Biosystems division) au Laboratoire de micro-séquençage des protéines de l'Institut Pasteur. L'identification est obtenue à partir de 1 à 10 µg de protéines. Le gel a une épaisseur de 1.5 mm, de façon à permettre le dépôt d'un volume plus conséquent de protéines. Les conditions de migration, les temps de transfert sur membrane et de coloration, sont ajustés par rapport aux conditions précédemment décrites pour un gel de 0.8 mm.

Les protéines sont directement analysées après transfert sur membrane PVDF. En cas de blocage de la partie N-terminale de la protéine, une digestion enzymatique en présence d'endolysine-C est pratiquée. Les peptides obtenus sont séparés par HPLC sur colonne DEAE – C₁₈ de 1 mm de diamètre, éluée par un gradient eau-acétonitrile (de 2 à 70 % acétonitrile) en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) 0.1%, avant d'être analysés.

1-8- Tamis moléculaire

En première approximation, la masse moléculaire des protéines natives est déterminée par filtration sur tamis moléculaire. Cette séparation en fonction de la masse a également servi d'étape de purification.

Le support utilisé dans notre étude est une résine Superdex (Pharmacia), matrice composée d'agarose et de dextran. Les protéines sont séparées sur une colonne de 90 cm de long et de diamètre 1 cm, préparée à partir de résine Superdex 200 (résolutive de 100 kDa à 600 kDa). La colonne est préalablement calibrée à l'aide des protéines des kits de calibration Pharmacia (poids moléculaires de 67 à 749 kDa).

La colonne est éluée dans un tampon TBE 0.5x à pH 8 et NaCl 175 mM (le sel évite les interactions ioniques entre matrice et protéines), à un débit de 1 ml/min, en présence d'antiprotéases. Les échantillons collectés sont analysés par migration électrophorétique native, après incubation avec l'ADN*.

1-9- Purification par affinité

La purification par affinité repose sur les interactions spécifiques existant entre deux molécules. La streptavidine est une glycoprotéine d'origine bactérienne formée de 4 sous-unités (masse moléculaire = 16.4 kDa chacune). Elle est neutre à pH 7.6, non glycosylée, et donne une très faible fixation non-spécifique. Chaque sous-unité est capable de lier la biotine, un coenzyme de transfert de CO₂, avec une très forte affinité ($K_d = 10^{-15}$ M). La biotine ne présente pas d'absorption significative dans l'ultraviolet ou dans le visible.

L'identification de protéines se liant spécifiquement à l'ADN télomérique peut donc être entreprise en mettant à profit les propriétés associatives de la streptavidine pour la biotine et la spécificité de l'association entre la séquence « biotine-ADN » et les protéines (figure 2.2.). Pour cela, nous avons utilisé de la streptavidine immobilisée sur des billes d'agarose de diamètre 1µm (Sigma) comme support.

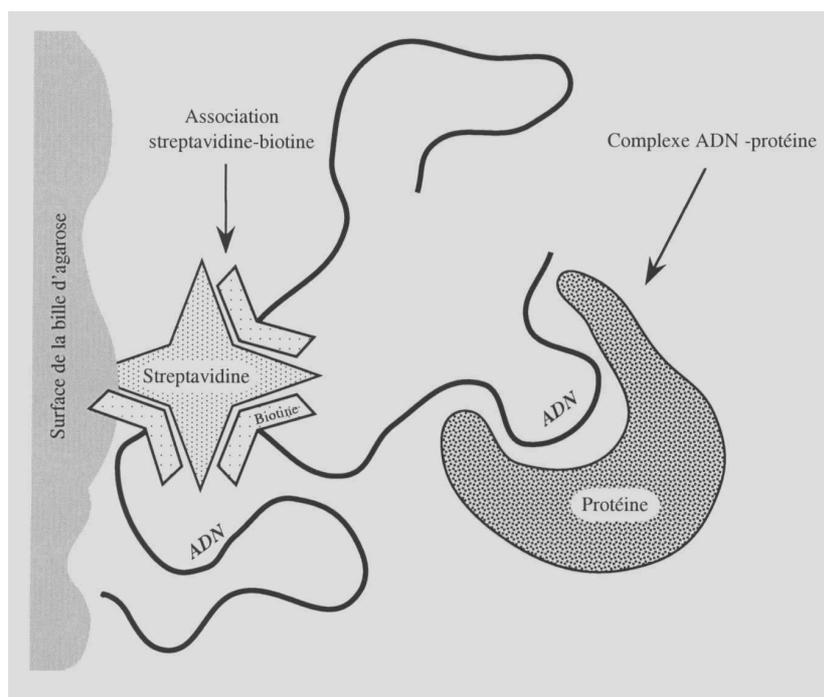


Figure 2.2. : Associations spécifiques streptavidine - biotine et ADN - protéine.

Pour préparer la résine d'affinité, la 'résine-streptavidine' (20-50 µl) est équilibrée dans du phosphate de potassium (20 mM), pH 7.5, en présence de NaCl (150 mM). La résine est mise en contact avec l'ADN biotinylé (~ 400 pmol), 30 minutes à température ambiante, sous agitation

ménagée, avant d'être finalement équilibrée en TBE 0.5x, pH 7.4, KCl (150 mM). L'ADN biotinyllé est amené en excès sur la résine et la quantité d'ADN liée est calculée en mesurant l'absorbance du surnageant après incubation et sédimentation de la résine (correspondant au ligand en excès).

Le contact entre la résine d'affinité et les protéines se fait selon une procédure de lots, sous agitation ménagée. Après incubation, une centrifugation légère (une impulsion à 2000 tr/mn) permet de séparer les deux phases. Cette procédure a été préférée à une chromatographie classique à l'aide d'une colonne pour éviter de se retrouver dans une situation où le nombre de ligands serait très élevé par rapport à l'estimation du nombre de protéines à fixer.

1-10- Reconcentration, dessalage et changement de pH

La dilution inhérente aux expériences de séparation (chromatographie, lot, ...) nécessite la reconcentration des échantillons. A cet effet, nous avons utilisé un dispositif d'ultrafiltration Vivaspin (Vivascience) pour centrifugeuse de laboratoire. La membrane en polyéthersulfone (PES) est disposée longitudinalement, ce qui assure une grande surface de filtration et élimine le risque de reconcentration à sec.

Le changement de milieu des échantillons protéiques a été obtenu principalement par dilutions successives et reconcentrations, moyens mieux adaptés pour de petits volumes que la dialyse. Plusieurs seuils de filtration ont été testés (5 kDa, 30 kDa et 50 kDa) sans modification apparente des résultats. Nous avons choisi de travailler avec un seuil de coupure de 5kDa.

1-11- Autres techniques utilisées

1-11-1- Chromatographie anionique

Nous avons recouru à la chromatographie anionique pour deux applications distinctes : la purification des oligodésoxynucléotides synthétisés au laboratoire (*cf.* paragraphe 2-) et la séparation de protéines en fonction de leur charge. Dans les deux cas, le support utilisé est la

matrice Q Sepharose (Pharmacia). Le groupement échangeur d'ions est une amine quaternaire qui reste chargée entre pH 2 et pH 12.

La séparation des protéines s'effectue par passage sur une colonne de 2 cm de long par 1 cm de section. Le tampon d'éluion est du TBE 0.5X à pH 7.4, en présence d'anti-protéases. Nous avons utilisé du chlorure de potassium (KCl) comme sel d'éluion. La colonne est préparée à l'aide d'un gradient (de 50 mM à 2 M de KCl puis retour à 50 mM). Pour obtenir une meilleure séparation des protéines, nous avons procédé à une éluion par plateaux de KCl.

1-11-2- Autres types d'éluion par chromatographie

D'autres modes de séparation ont été essayés, dont la séparation par pseudo - affinité à l'aide d'héparine (Pharmacia) ou de résines colorées (Sigma) (interactions hydrophobes, échangeuse d'ions). Aucune de ces résines n'a permis d'isoler les protéines recherchées.

1-11-3- Combinaison d'électrophorèses non dénaturante / dénaturante

La migration de protéines au cours d'une électrophorèse non dénaturante est un moyen de séparation en fonction de la charge et de la forme. Il est possible de visualiser les protéines présentes à une distance de migration donnée, en les électrotransférant dans un gel dénaturant.

Sur le gel natif, la zone correspondant aux protéines que l'on souhaite analyser est repérée à l'aide de marqueurs colorés (xylène cyanol et bleu de bromophénol) et confirmée par autoradiographie du gel (les protéines migrant sous la forme complexée à l'ADN*). On prélève le fragment de gel natif (bande de gel d'un millimètre de hauteur) que l'on insère sur le dessus d'un gel dénaturant. La dénaturation des protéines est réalisée par l'immersion de la bande de gel natif dans du tampon Laemmli porté à 90°C en présence d'urée (2.5 M). La migration en conditions dénaturantes a lieu selon le mode opératoire défini précédemment. L'ADN* est dissocié des protéines et migre au front de migration. Une autoradiographie de ce front de migration permet de vérifier que la zone découpée correspond à la position du complexe ADN*-protéines du gel natif.

1-11-4- Pontage ADN*-protéines par irradiation aux UV

L'irradiation aux UV de complexes ADN*-protéines peut donner lieu à des pontages entre bases de l'ADN* et acides aminés aromatiques. Le complexe covalent formé peut être visualisé aisément par autoradiographie.

La préparation des échantillons est la même que celle définie dans le cadre de migrations électrophorétiques natives. Les échantillons sont ensuite irradiés sur lit de glace pendant 1 h, avec une lampe UV de paillasse (254 nm, 6 W), avant d'être dénaturés et analysés par gel SDS dénaturant. Le gel est coloré puis séché sur papier Whatman. Après autoradiographie, la superposition du gel de protéines et du signal radioactif indique l'emplacement des protéines associées à l'ADN.

2- Biophysique

2-1- Spectroscopie d'absorption

Les oligodésoxynucléotides possèdent une bande d'absorption dans l'ultraviolet, avec un maximum compris entre 255 et 270 nm. La spectroscopie d'absorption permet d'établir la concentration d'un échantillon d'ADN.

On peut également déterminer si un brin d'ADN est structuré. En effet, le coefficient d'absorption optique d'un oligodésoxynucléotide est différent selon qu'il est structuré ou non (effet hypochromique). L'observation de l'absorbance d'un échantillon en fonction de la température permet de déterminer la température de dénaturation, T_m , point de demi-transition de la dénaturation thermique, lors du passage d'une structure ordonnée à une structure désordonnée. Des observations de ce type ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Kontron-Uvikon 940 au Laboratoire de Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Les échantillons sont introduits dans des cellules en quartz (1 cm de chemin optique), recouvertes d'une mince couche de paraffine. La température des cellules est réglée par circulation de liquide thermostaté. L'évolution du profil d'absorbance en fonction de la température est observée à 265 et

295 nm. A 265 nm, le coefficient d'absorption ne dépend pas de la protonation de la cytosine (point isobestique) et l'absorbance reflète directement le changement de structure (Mergny *et al.*, 1995). Les profils sont enregistrés en fonction de la température. Pour s'assurer de la réversibilité des phénomènes observés, l'enregistrement a lieu durant un cycle de descente-montée en température (variation de 0.2°C / minute) (figure 2.3.). Si les courbes correspondant à la montée et à la descente sont superposables, on peut conclure que chaque point de ces courbes correspond à une valeur à l'équilibre.

Indépendamment de la température, on peut faire varier la concentration (15 à 50 µM selon la longueur des séquences d'ADN traitées), le pH (pH 4 et 5, tampon acétate de sodium 10 mM ; pH 6, 7 et 7.5, tampon cacodylate de sodium 10 mM), ou la force ionique des échantillons (175 mM NaCl et 2 mM MgCl₂) que l'on observe. Ces observations ont permis de déterminer les conditions dans lesquelles certaines séquences d'acides nucléiques étaient structurées.

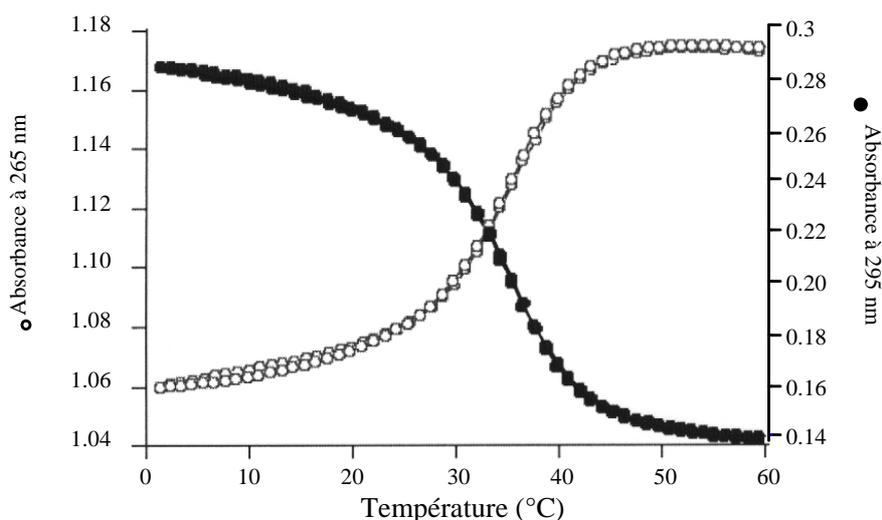


Figure 2.3. : Profil de dénaturation thermique de la séquence d(CCCACACCCACCCACACCC) à 265 nm et 295 nm [$\rightarrow T_m=34^\circ\text{C}$], à pH 6, pour une concentration de 5 µM.

Une autre application de la spectroscopie d'absorption consiste à suivre l'avancement d'une purification en disposant une cellule de détection en série au sortir d'une colonne de chromatographie. Pour les protéines, deux acides aminés, le tryptophane et la tyrosine, absorbent à 280 nm.

2-2- Spectrométrie de masse

2-2-1- Introduction et principe

La spectrométrie de masse a pris de plus en plus d'importance dans l'étude et la caractérisation des biomolécules. La cartographie par mesure des masses moléculaires de mélanges peptidiques obtenus après digestion enzymatique permet d'identifier une protéine. L'analyse par spectrométrie de masse peut être couplée à des digestions enzymatiques (aminopeptidase ou carboxypeptidase), pour déterminer des séquences d'acides aminés. Technique en plein essor, la spectrométrie de masse présente l'avantage de nécessiter très peu de matériel biologique (quelques dizaines de femtomol) en comparaison des méthodes de séquençage habituelles.

Un spectromètre de masse permet de mesurer le rapport masse/charge (m/z) des ions formés à partir de l'échantillon analysé. Il est constitué d'une source d'ions (passage en phase gazeuse [vaporisation / sublimation / désorption], ionisation et décomposition des ions de l'échantillon à analyser), d'un analyseur triant les ions en fonction de leur rapport m/z , d'un enregistreur et d'un système de calibration (figure 2.4.). Deux approches sont possibles pour l'ionisation de l'échantillon : le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), et l'électrospray. Ces deux techniques sont brièvement décrites ci-après.

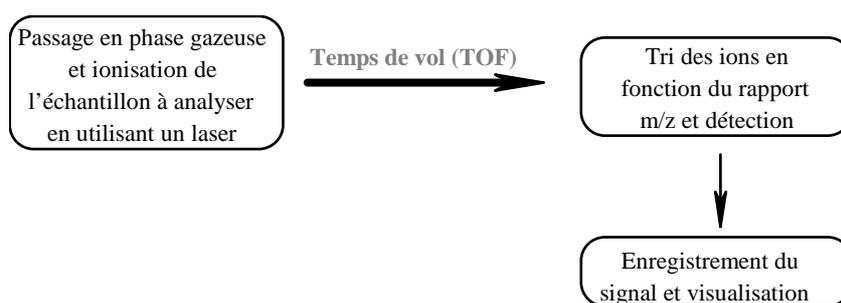


Figure 2.4. : Principe schématisé de l'expérience de spectrométrie de masse MALDI.

L'ensemble des expériences de spectrométrie de masse a été réalisé en collaboration avec M. Jean-Pierre Le Caer du Laboratoire de Biologie de l'ESPCI.

2-2-2- Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser sont sélectionnés après identification par coloration au sulfate de zinc sur gel de protéines dénaturant. Les fragments de gel sont lavés (élimination du SDS), puis les protéines sont réduites avec du DTT et de l'iodoacétamide avant d'être digérées à la trypsine. Les peptides obtenus sont extraits du gel SDS par traitement à l'acétonitrile et à l'acide formique, puis dessalés à l'aide de micro colonnes C₁₈ (voir mode opératoire en annexes).

2-2-3- Spectrométrie de masse MALDI

La technique MALDI utilise un laser UV pulsé pour désorber et ioniser le mélange de matrice/échantillon co-cristallisé. La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par le faisceau laser incident. L'énergie absorbée par la matrice provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon sous forme d'un mélange d'ions mono- ou multi- chargés notés $[M + nH]^{n+}$, où M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée, M + nH à la masse moléculaire de molécule ionisée (masse moléculaire + masse de n protons). Les ions mono chargés sont généralement majoritaires. La masse M peut être déterminée très simplement par déconvolution du spectre et transformation de ce dernier en une courbe masse-intensité. La résolution pour la masse d'un peptide lors de ce genre d'expérience, est de ± 0.1 Dalton.

Dans les expériences réalisées, l'échantillon peptidique est associé à une matrice DHB (acide gentisique ou 2,5-hydroxybenzoïque) en proportions 1:1, pour un volume final de 1 μ l. Le dépôt s'effectue sur une plaque métallique en acier inoxydable, pouvant supporter jusqu'à 100 dépôts. L'analyse a lieu après cristallisation du dépôt. L'appareil utilisé est un Voyager Elite (PerSeptive Biosystems).

2-2-4- Spectrométrie de masse ESI et fonctionnement en tandem MS/MS

Le principe de l'électrospray est relativement simple : une solution est introduite dans un capillaire porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qu'un gradient de champ électrique et un

gradient de pression (entre la pression atmosphérique et le vide poussé à 10^{-6} bar) transforment en ions désolvatés $[M + nH]^{n+}$.

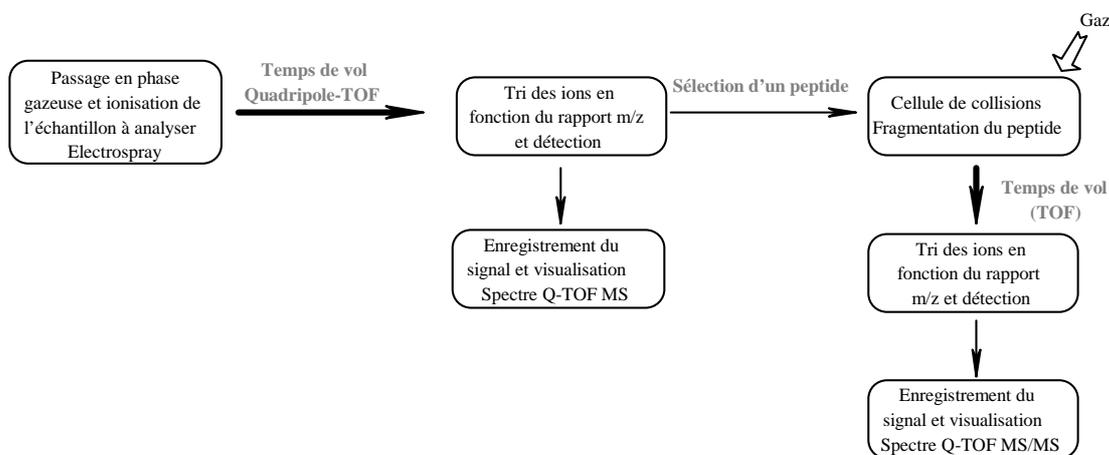


Figure 2.5. : Principe de l'expérience de spectrométrie de masse en tandem (MS /MS).

Un analyseur quadripolaire, constitué de quatre barreaux de section hyperbolique ou circulaire, disposés parallèlement le long de la trajectoire des ions, permet de les filtrer en fonction de leur rapport m/z . Chaque paire de barreaux diamétralement opposés est portée à un potentiel électrique opposé à celui de l'autre paire. On peut alors sélectionner un ion précurseur, lequel passera ensuite dans une cellule de collisions. Lors de ces collisions, son énergie interne augmente et certaines liaisons chimiques sont rompues, ce qui provoque sa décomposition en ions fragments. Un deuxième analyseur en temps de vol, à accélération par impulsion électrique, orthogonal au premier analyseur, sert alors à l'étude de ces fragments (Dawson & Guilhaus, 1989) permettant d'accéder à la séquence d'un peptide.

Un spectre Q-TOF MS/MS d'un peptide de n acides aminés correspond à la superposition du signal de l'ion précurseur, des pics correspondants aux différents fragments de tailles $(n-1) - i_{0 \rightarrow n-1}$ et des pics de tailles $i_{0 \rightarrow n-1}$ correspondant aux fragments complémentaires, généralement de plus faibles intensités.

L'ion précurseur apparaît comme ayant une masse apparente correspondant à $(\text{masse réelle} + 2) / 2$. A partir de cette masse initiale (correspondant à la masse des n acides aminés du peptide étudié), on procède de proche en proche [fragment $n-1$, $n-2$, etc..] (cf. table des masses des acides aminés en

annexes) et on obtient la séquence du peptide sélectionné. A ce stade, l'indétermination demeure entre leucine et isoleucine.

L'échantillon peptidique à analyser doit être dissous à une concentration de 0.01 à 10 μM dans un solvant de type eau-méthanol avec 5% d'acide formique. Cette méthode nécessite très peu de matériel ($\sim 10^{-17}$ mol).

2-2-5- Analyse des résultats

L'analyse des résultats obtenus avec ces deux méthodes s'effectue grâce à des logiciels (Profound et Peptident) accessibles sur internet, utilisant toutes les banques de données disponibles. Pour les expériences MALDI, l'identification est réalisée à partir des données expérimentales suivantes : masses des peptides, erreurs sur les mesures, et masse moléculaire déterminée sur gel SDS dénaturant.

2-3- Spectroscopie RMN

L'accès à la structure haute définition de macromolécules biologiques peut être mené selon deux approches complémentaires : l'analyse par diffraction de rayons X dans un cristal et la résonance magnétique nucléaire (RMN). La RMN permet l'étude dynamique et structurale en solution, ce qui autorise des modifications importantes du milieu, comme le pH, la température, la force ionique ou la concentration.

Nous avons étudié certains des acides nucléiques utilisés lors de ce travail par RMN ^1H à l'aide des spectromètres RMN à 360 MHz et à 500 MHz disponibles au Groupe de Biophysique de l'Ecole Polytechnique. L'expérience acquise par le laboratoire concernant la RMN des acides nucléiques et particulièrement les études sur la structure en motif i adoptée par les fragments d'ADN synthétiques riches en cytosines, a servi de référence dans la détermination du type d'association pouvant exister entre des séquences d'ADN télomériques et des protéines.

2-3-1- Principe

Les noyaux atomiques possèdent un moment cinétique intrinsèque, le spin \mathbf{I} , auquel est associé un moment magnétique colinéaire et caractéristique de la particule étudiée, $\boldsymbol{\mu}$, tel que :

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \hbar \mathbf{I}$$

où le rapport gyromagnétique γ est une constante propre à la particule étudiée.

L'expérience de RMN consiste à modifier l'aimantation sous l'action d'un champ magnétique radiofréquence \mathbf{B}_1 en présence d'un champ magnétique fort statique \mathbf{B}_0 et à observer son évolution. Deux effets contribuent au retour à l'équilibre : un couple, $\mathbf{C} = \mathbf{M} \wedge \mathbf{B}$, provenant de l'interaction avec le champ magnétique, et la relaxation due à des champs magnétiques microscopiques. Le mouvement résultant sera une précession autour du champ \mathbf{B}_0 à une fréquence ω_0 , la fréquence de Larmor, telle que $\omega_0 = \gamma \mathbf{B}_0$. On enregistre la précession libre avec une bobine perpendiculaire à \mathbf{B}_0 et le spectre en fréquence est obtenu par transformation de Fourier du signal de précession. L'environnement spatial et le type de groupement auxquels appartient un proton modifient sa fréquence de résonance. Bien qu'ayant un même rapport gyromagnétique, chaque proton aura donc sa propre fréquence de résonance.

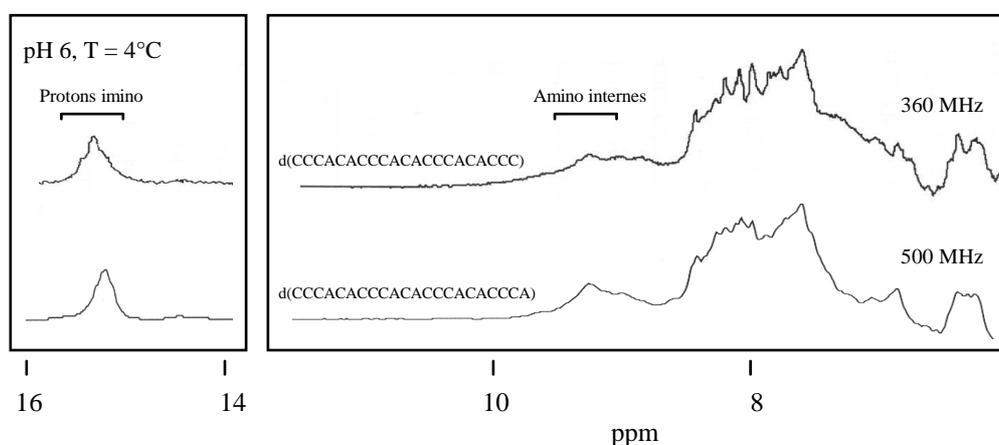


Figure 2.6. : Comparaison des spectres RMN ^1H de deux fragments télomériques de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) [les concentrations en brin d'ADN sont de 1 mM].

Les interactions entre deux moments magnétiques nucléaires sont liées à la distance les séparant. L'observation de ces interactions permet de remonter à certaines distances internucléaires et de là, d'accéder à la structure de la molécule étudiée.

2-3-2- Préparation des échantillons et expériences réalisées

L'échantillon d'ADN synthétique (concentration 1 mM) est dissous dans un mélange H₂O / D₂O (90 / 10), en présence d'EDTA (1 mM) et de DSS (0.5 mM, servant de marqueur de déplacement chimique), dans un volume final de 450 µl.

Les expériences RMN à une dimension ont été réalisées en utilisant une séquence d'impulsion JR pour annuler le signal de l'eau (Guéron et *al.*, 1991). L'expérience RMN à deux dimensions est une expérience de type JR-NOESY.