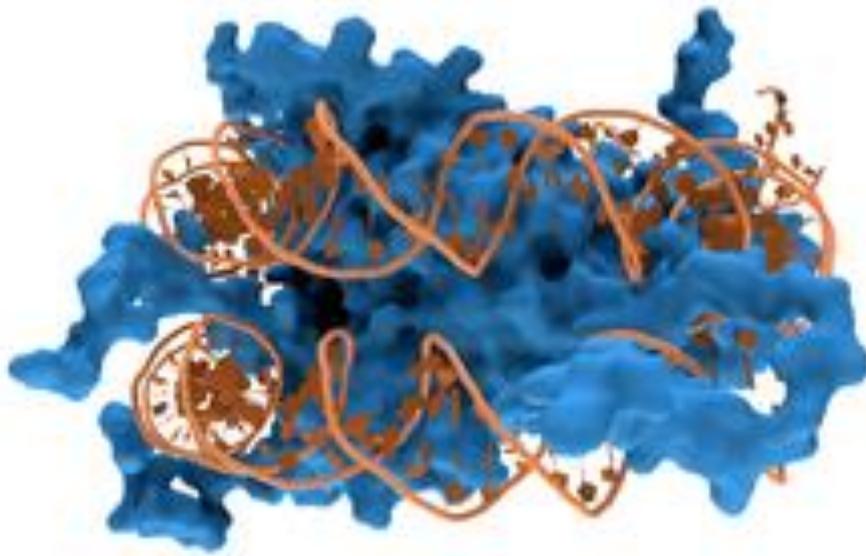


Techniques d'Etude des interactions ADN-Protéine

COURS II

Matière : Techniques de Biologie Moléculaire et Cellulaire Moderne

Matière : Techniques et Instrumentation en Biologie Moléculaire et Cellulaire



Au profit des Etudiants des spécialités

M1 Biochimie Fondamentale

M1 Génétique Fondamentale et Appliquée

Chargée de la matière

Dr Debbache-Benaida Nadjet

L'ADN interagit avec de nombreuses protéines qui remplissent leurs fonctions en conjonction avec l'ADN. Certaines protéines qui entrent en contact avec l'ADN comprennent plusieurs ADN, modification des enzymes et des protéines de liaison. Il s'agit notamment des méthylases, polymérase, nucléases, ligases, kinases et Phosphatases. Chacune de ces enzymes ont l'activité et la fonction spécifique.

I. Exemple d'interaction

Plusieurs classes d'interactions entre ces biomolécules peuvent exister:

Protéines-ADN simple brin (par exemple RecA).

Protéines - ARN simple brin (par exemple le ribosome).

Protéines - ARN double brin (par exemple, amino acyl tRNA synthétases).

Protéines-ADN double brin.

C'est principalement cette dernière classe d'interactions qui est abordée ici. Cette famille peut également se décomposer en interactions des protéines avec des séquences spécifiques (régulateurs transcriptionnels, histone-like bactériennes, enzymes de restriction, ...) ou non spécifiques (ADN polymérase, histones, topoisomérases...). Ces interactions sont caractérisées par des liaisons d'hydrogènes, de Van der Waals, d'électrostatiques et d'hydrophobes (Xiong et Sundaralingam, 2001) entre les chaînes latérales des acides aminés des protéines et les bases nucléotidiques des acides nucléiques.

II. Mécanisme d'interaction ADN-Protéine

La reconnaissance entre une protéine et un acide nucléique va faire intervenir d'une part 4 bases et d'autre part 20 acides aminés. Ces interactions permettront d'obtenir si nécessaire une spécificité de reconnaissance. Quatre types d'interactions potentielles peuvent exister entre protéines et acides nucléiques. Du plus fort au plus faible, on peut avoir:

Des ponts salins formés entre les phosphates et les chaînes latérales d'acides aminés chargés positivement (N de la Lys, guanidinium de l'Arg, histidine protonée)

Des liaisons hydrogène pouvant s'établir entre les phosphates, sucres et bases des acides nucléiques et les liaisons peptidiques ou les chaînes latérales des acides aminés hydrophiles.

Des interactions d'empilement (stacking) impliquant les chaînes latérales des acides aminés aromatiques (Trp, Tyr, Phe, His voire le cycle indol des proline) et les bases.

Des interactions hydrophobes entre les bases des acides nucléiques et les chaînes latérales des acides aminés non polaires.

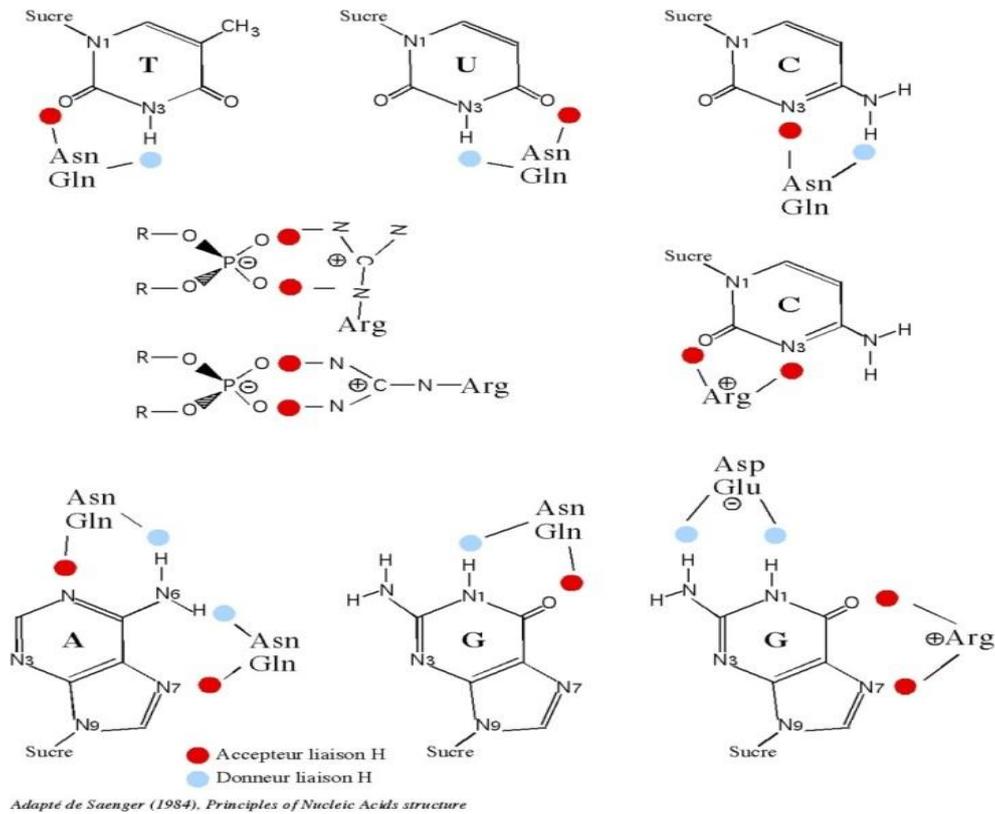


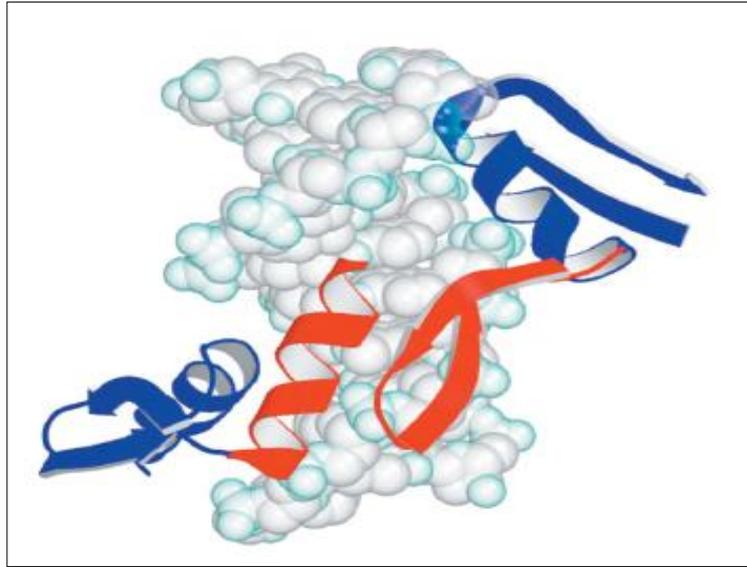
Figure : types de liaison ADN-Protéine

III. Motifs protéiques de fixation aux acides nucléiques

Les domaines protéiques interagissant avec l'ADN peuvent être classés en fonction de leurs organisations structurales tridimensionnelles comme suite:

- **Motifs à doigts de zinc**

C'est un petit domaine qui requiert la coordination d'un ou plusieurs atomes de Zn^{2+} pour stabiliser son repliement. Sa structure est en général constituée de deux feuilletts β anti parallèles liés par une hélice α . L'atome de Zn est chélaté par des résidus histidine et/ou cystéine formant des structures qui ressemblent aux doigts appeler « doigts de zinc », ces derniers interagissent avec les grands sillons d'ADN .



Le motif à doigts de zinc interagit avec l'ADN.

- **Motifs de fermetures éclair à leucine (*leucine zipper*)**

C'est un motif qui consiste à une répétition périodique du résidu leucine après chaque six acides aminés (à chaque septième poste) en formant des heptades. Le nombre de ces heptades varient de 3 à 6, typiquement. Ce motif a une conformation d'une α hélicoïdale, ce qui facilite sa dimérisation et dans certains cas son oligomérisation. La stabilisation de la structure de ce motif est basée sur des liaisons hydrophobes, alors que, la formation des dimères et des oligomères de la leucine zipper nécessite des liaisons électrostatiques. Ce motif interagit avec le grand sillon de l'ADN par le côté N-terminale. Plusieurs protéines appartiennent à cette classe telle que Fos, Jun, Response Element-binding *protein*/ activating transcription factor (CREB/ATF), (C-AMP, activating transcription factor-2 (ATF2) et Activator *protein*-1 (AP1).

- **Motifs hélice-boucle-hélice**

C'est un autre motif des domaines de liaison à l'ADN qui présente une structure semblable au motif leucine zipper, à l'exception du fait qu'une boucle non hélicoïdale de la chaîne polypeptidique sépare deux régions en hélice α dans chaque monomère. Ce motif est stabilisé par des interactions de van der Waals entre les résidus hydrophobes conservés et le glutamate

présent dans la région basique interagit avec les cytosines et/ou les adénines du grand sillon de l'ADN. La position de ce glutamate est stabilisée grâce à un résidu d'arginine qui interagit directement avec les nucléotides, exactement, avec le squelette phosphodiésthère .

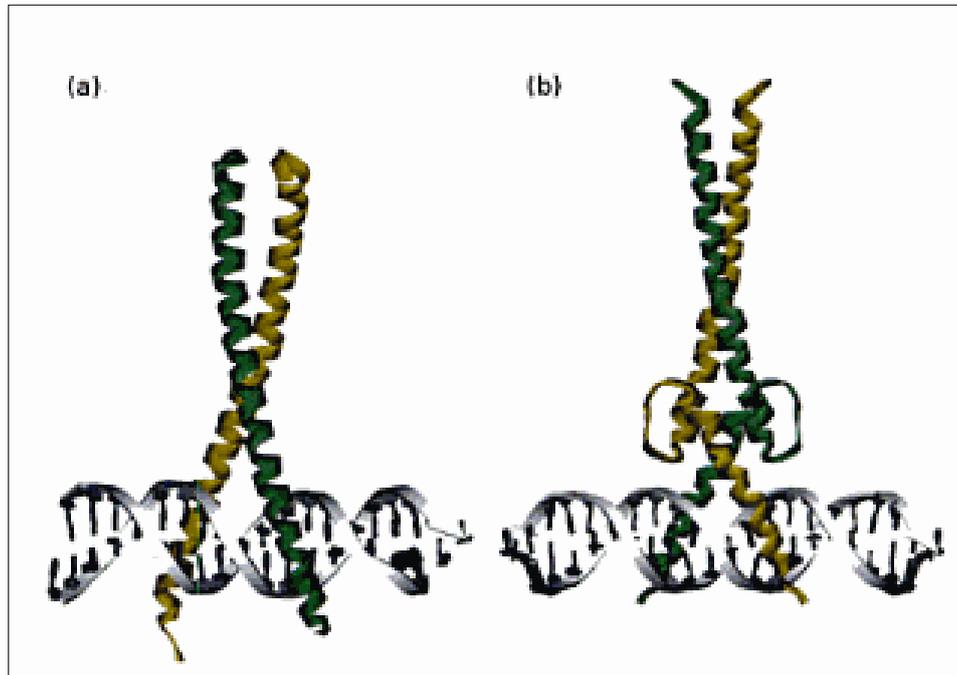


Figure : L'interaction des protéines homodimériques (a) le motif leucine zipper ;
(b) le motif hélice boucle hélice

- Motifs hélice-tour-hélice

Cette classe est très reconnue pour les facteurs de transcriptions et les enzymes chez les procaryotes et les eucaryotes. La structure de cette classe des protéines contient deux hélices α qui sont séparées part quarts résidus d'acides aminés qui forment un tour β . Généralement, la seconde hélice de ce motif interagit par des liaisons hydrogènes et de van der waals à des séquences palindromiques avec le grand sillon d'ADN , et rarement aux petits sillons de l'ADN. Ce motif forme des homodimères chez les procaryotes, bien qu'il forme des monomères ou hétérodimères chez les eucaryotes. Parmi les protéines présentées par ce motif on trouve le répresseur tryptophane d'*E. coli*, le cytochrome c peroxydase, le répresseur du phage 434...

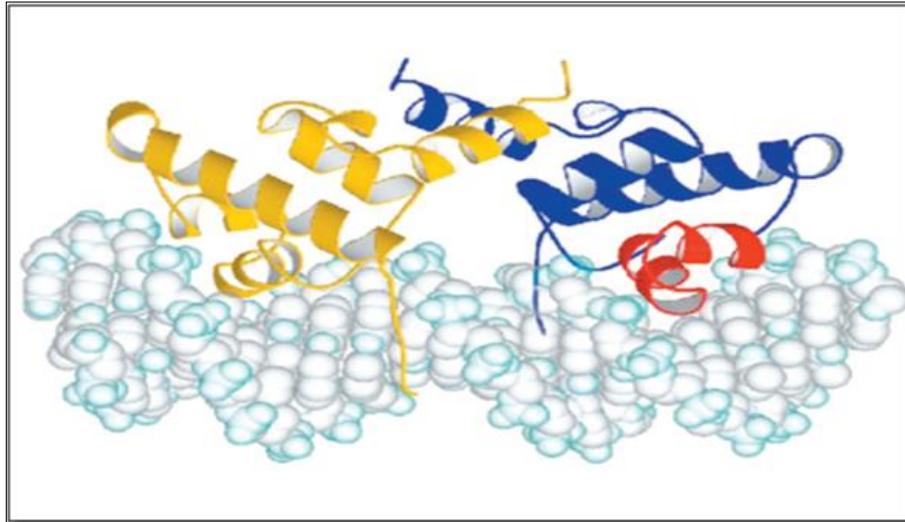


Figure : L'interaction des protéines hélice-tour-hélice

Une protéine de la famille des répresseurs appartient aux motifs, interagit avec l'ADN. Ce motif se lie à l'ADN sous forme de dimère, un monomère est en bleu et l'autre est en jaune ; c'est la région rouge qui interagit avec l'ADN.

IV- Les techniques d'étude des interactions ADN-protéine

L'étude des interactions ADN/protéines est fondamentale pour la compréhension des mécanismes de croissance, développement, différenciation, évolution et le processus de certaines pathologies ainsi que développer des stratégies thérapeutiques contre plusieurs désordres physiologiques. La principale difficulté de l'étude des interactions protéines -acides nucléiques est d'observer simultanément deux macromolécules associées. D'une manière générale, les méthodes d'analyse spectrophotométrique sont mal adaptées. La détermination de structure aux rayons X ou par Résonance magnétique nucléaire (RMN) dans le cas de petits objets est très informative mais inadaptée par exemple à l'étude d'assemblages dynamiques.

Il existe toute une série de méthodologies utilisables *in vitro* ou *in vivo* qui permettent de décrire assez précisément les interactions entre une protéine et des acides nucléiques. Ces techniques sont réparties en deux principales classes :

-Attache de filtre et décalage de mobilité sur un gel: Elles déterminent si l'ADN agit l'un sur l'autre avec la protéine.

-Techniques Footprinting: indiquant le site d'interaction entre la protéine et l'ADN se trouvant sur l'ADN.

IV.1 Criblage de séquence d'ADN

Il s'agit d'utiliser une technique de criblage d'une banque d'expression, le criblage se fait avec un oligonucléotide double brin marqué radioactivement. Les clones exprimant la protéine interagissant avec cet ADN seront donc repérés après autoradiographie du filtre (à voir en TD).

Une alternative à cette technique consiste à utiliser des phages lytiques de type lambda afin d'éviter les étapes de lyse des bactéries. **A voir en TD.**

On peut aussi faire du phage display qui consiste à fixer sur la colonne l'oligonucléotide double brin correspondant à la cible ADN.

Dans la technique phage display, des phages filamenteux spécifiques des entérobactéries sont utilisés pour présenter à leur surface, en fusion avec le domaine amino-terminal de leurs protéines pIII ou pVIII membranaires, des molécules telles que des peptides à étudier leur interaction avec des séquences d'ADN. Les phages recombinants sont sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible (séquence oligonucléotidiques). Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après 3 à 4 tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée. Il s'agit de leur capacité à se fixer sur la colonne d'oligonucléotides double brin (la cible) (on verra cette technique en détails dans le chapitre II).

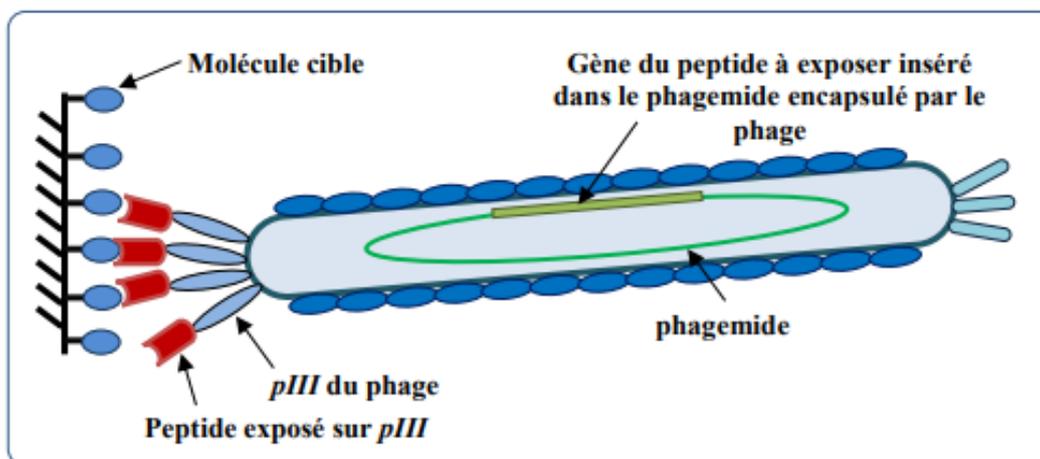


Figure : Phage filamenteux M13

IV.2 Les techniques d'attache de filtre et décalage de mobilité

a) Attache de Filtre

Des filtres de membrane de nitrocellulose sont généralement utilisés pour stériliser par filtration des solutions. Les filtres de nitrocellulose peuvent lier l'ADN, mais seulement dans certaines conditions. La sélection des complexes ADN-protéine se fait soit sur filtre de nitrocellulose soit par immunoprécipitation.

Une extrémité étiquetée ADN bicaténaire est mélangée à une protéine non étiquetée à laquelle elle lie pour former un complexe d'ADN-protéine (Figure). Après, le complexe est filtré à l'aide de la nitrocellulose. L'ADN étiquetée lie maintenant au filtre en raison de l'association avec la protéine. Ainsi, les complexes bicaténaires de protéine d'ADN lient à la nitrocellulose, et ceci fournit une analyse commode pour l'association entre l'ADN et la protéine.

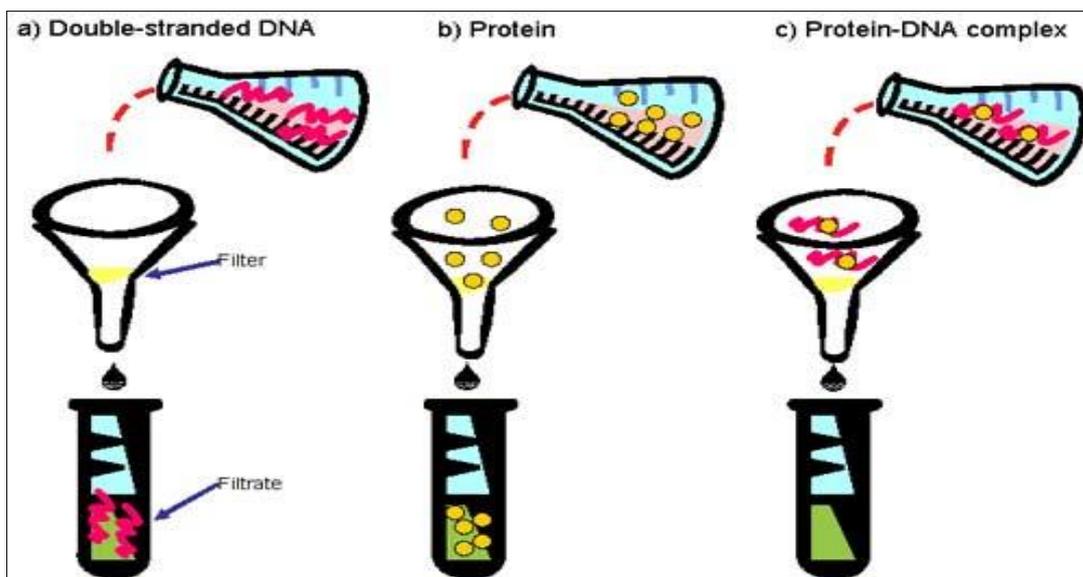


Figure: Technique attache de filtre

b) Le Décalage de Mobilité (*Retards sur gel*)

La fixation d'une protéine à l'ADN affecte sa mobilité électrophorétique. EMSA (electromobility shift assay) et REMSA (RNA electromobility shift assay), Cette technique, la plus simple qui soit pour étudier une interaction entre un acide nucléique et des protéines, repose sur le fait qu'un complexe ADN- protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel non-dénaturant qu'un ADN ou un ARN nu. Ce retard de migration permet de juger au premier coup d'œil si une séquence particulière d'ADN ou d'ARN a été reconnue et liée par une protéine.

La variation de migration des duplexes (ou sondes) complexés aux protéines par rapport aux duplexes libres est suivie grâce au marquage radioactif au ^{32}P des sondes nucléotidiques. Le gel retard peut être réalisé à partir de protéines purifiées mais aussi à partir d'un extrait protéique plus complexe (un extrait nucléaire par exemple).

La petite taille de l'ADN est importante dans cette analyse. Si un gène entier était utilisé sa mobilité serait déjà très faible et il serait difficile de détecter le décalage de mobilité provoqué par sa liaison à une protéine. Par conséquent nous devons savoir approximativement où la protéine se lie à l'ADN ainsi nous pouvons préparer un fragment court de restriction, ou même un oligonucléotide bicaténaire synthétique qui contiendra le site cible pour la protéine.

Cette technique permet

- De vérifier l'interaction d'une protéine avec une séquence ADN,
- D'étudier les nucléotides importants dans cette séquence (mutagenèse des différents nucléotides de la cible ADN, test de leur interaction avec la protéine X par gel retard)
- D'étudier l'affinité apparente de la protéine pour la cible ADN, la spécificité de reconnaissance des sondes marquées peut être testée par l'ajout en excès du même duplex non radioactif qui entrent en compétition avec la forme radioactive.

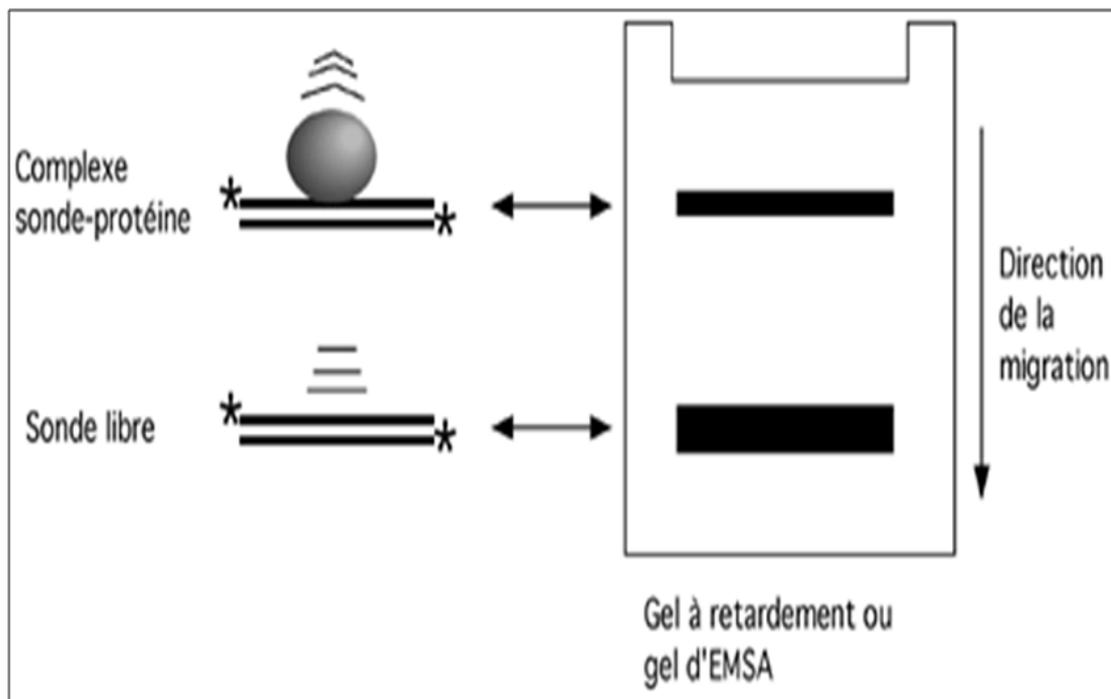


Figure: Technique de décalage de mobilité.

On peut vérifier la spécificité de l'interaction ADN-protéine par l'incubation préalable du complexe avec un anticorps qui se fixe à la protéine. Le complexe ternaire ADN-protéine-anticorps

a une migration encore plus retardée, qu'on qualifie de *supershift*. Notez qu'il arrive qu'un anticorps qui fonctionne très bien en western ne peut être utilisé en supershift. Peut-être que :

- son épitope est moins accessible,
- son affinité n'est pas assez forte pour résister aux conditions présentes pendant la migration.
- On peut aussi trouver des anticorps qui interfèrent avec la liaison ADN-protéine; ceux-là, au lieu de provoquer un supershift, vont même inhiber le gel-shift ordinaire.

Certaines protéines font courber l'ADN. Dépendant de l'endroit où elle se lie sur une sonde d'ADN, une protéine qui fait courber l'ADN affectera de façon différente la migration sur le gel d'EMSA. Plus la courbure est au centre de la sonde et plus la migration est retardée (Figure 29). On peut utiliser une même sonde en y déplaçant le site de reconnaissance de la protéine pour juger de l'habileté d'une protéine à courber l'ADN.

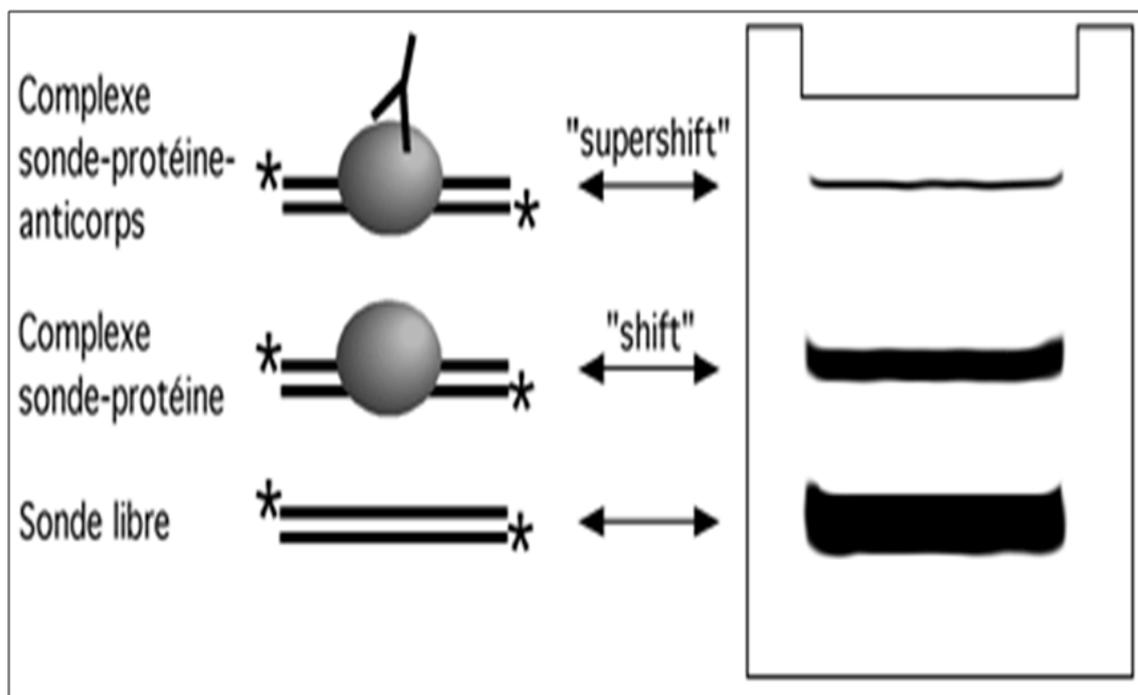
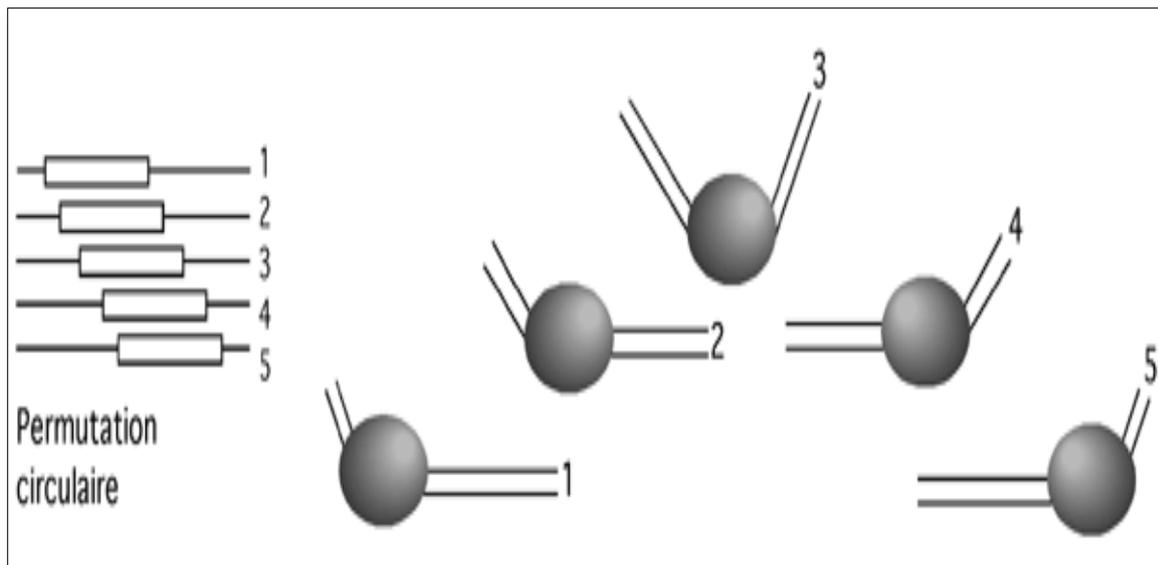


Figure: Principe du schift et supershift.

Principe de la détermination de la courbure induite par la fixation d'une protéine sur son site ADN :

La mobilité (μ) d'un complexe dépend de la distance entre ses extrémités (L). Cette distance est modifiée en fonction de l'angle de courbure α induit par la fixation de la protéine. μ_M représente la plus faible mobilité obtenue lorsque la protéine est fixée au centre du fragment d'ADN. La plus



forte mobilité μ_E est obtenue lorsque la protéine est fixée à une extrémité. L'utilisation de substrats de permutation va permettre d'accéder à la valeur de l'angle de distorsion induit par la fixation de la protéine. Plus le gel utilisé sera concentré, plus l'effet observé sur la migration sera important. L'angle de courbure a peut être estimé d'après la relation empirique:

$$\mu_M/\mu_E = \cos(a/2)$$

Pour la plus faible mobilité (μ_M) la distance entre les extrémités devient:

$$L' = L \cos(a/2).$$

Figure: Effet de la fixation de la protéine sur l'ADN.

IV.3 La technique de Footprints

Dans cette méthode, des produits chimiques ou des enzymes sont utilisés pour modifier et digérer la molécule d'ADN marquée.

Il existe différentes possibilités pour faire ce marquage unilatéral mais, généralement, ce marquage est réalisé par PCR en utilisant un oligonucléotide marqué en 5'. Le fragment est incubé en présence d'extrait nucléaire (ou d'une protéine purifiée).

Les protéines liées à l'ADN, protègent le squelette phosphodiester de l'ADN de la modification ou de la digestion. Cela peut ensuite être visualisé par une électrophorèse sur gel dénaturant, où l'ADN non protégé est clivé. Par conséquent, il apparaît comme une «échelle» de bandes et les sites protégés par des protéines n'ont pas de bandes correspondantes.

Il existe plusieurs méthodes d'empreintes qui ont le même principe mais qui diffèrent par la sonde utilisée. Différentes sondes ont été développées et utilisées :

Trois agents de caractérisation (sondes) sont généralement utilisés pour analyser les interactions ADN-protéine *in vivo* et *in vitro*.

Il s'agit de la Désoxyribonucléase I (DNase I, un agent biochimique), du Sulfate de diméthyle (DMS, un agent chimique) et des irradiations ultraviolet de type B ou C (UVB, UVC; des agents physiques).

a) **Les sondes enzymatiques**

L'ADNase I est le réactif le plus utilisé de l'empreinte car il ne possède pas une spécificité de séquence. Autres nucléases fréquemment utilisées comprennent la nucléase micrococcique (MNase), l'exonucléase III (Exo III), la nucléase P1 et l'ADN méthylases (ADNMTase). Cette dernière modifie les bases d'ADN par méthylation des cytosines, à l'exclusion des sites de liaison aux protéines protégés. L'ADN est ensuite clivé aux sites de méthylation soit par des enzymes de restriction ou des produits chimiques sensibles à la méthylation.

- **Empreinte à l'ADNase I**

La protéine liée protège le squelette phosphodiester d'ADN de l'hydrolyse catalysée par la DNase I. L'ADN ainsi protégé par les éléments trans- est soumis à une digestion douce par la DNase I en présence d'ions Ca^{++} . La réaction est stoppée avec de l'EDTA et l'ADN ainsi digéré est déprotéinisé. Une expérience sans extrait protéique est réalisée et sert comme contrôle.

Après séparation des séquences d'ADN par électrophorèse sur des gels dénaturants, les sites de liaison sont visualisés par une autoradiographie des fragments d'ADN résultant de l'hydrolyse, la longueur des fragments est analysée par un séquenceur. Aussi, pour déterminer les positions exactes des séquences protégées, une réaction de séquençage (type Maxam and Gilbert) est réalisée et déposée en parallèle sur le gel (Figure 30).

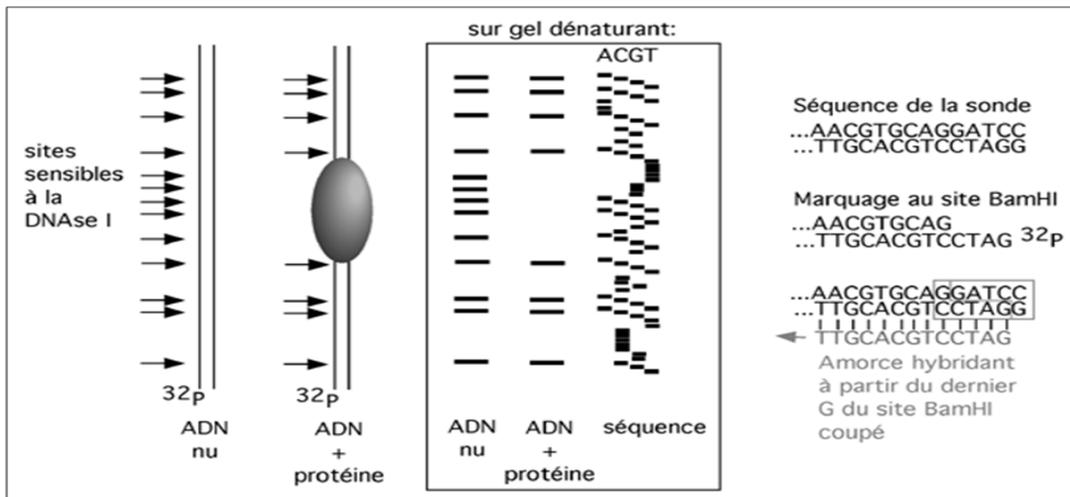


Figure: Caractérisation de l'interaction ADN-Protéine par ADNase I

b) Les sondes chimiques

Le DMS est la sonde chimique la plus utilisée pour les études d'empreintes. DMS méthyle les guanines et les adénines en positions N₇ et N₃ respectivement (Figure). Mais, les nucléotides impliqués dans les interactions protéine-ADN sont protégés de la méthylation. L'ADN modifié est ensuite traité par la chaleur dans un milieu alcalin, ce qui provoque le clivage de l'ADN au niveau des bases spécifiquement modifiées.

D'autres produits chimiques, tels que la phénanthroline-cuivre, EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) méthidium-propyle, et de l'EDTA de fer sont également des réactifs utiles dans ces expériences.

- Empreinte au sulfate de diméthyle

C'est le même principe qu'en DNase footprinting

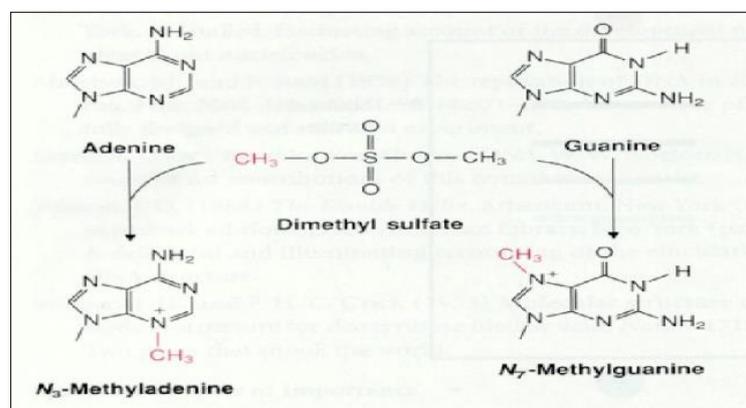


Figure: mode d'action du sulfate de diméthyle.

- L'ADN et la protéine sont étiquetés.
 - Méthylation du complexe d'ADN-protéine avec de la DMS, en utilisant un traitement doux de sorte qu'en moyenne seulement une méthylation se produise même par molécule d'ADN.
 - Dissociation de la protéine, et traitement de l'ADN avec du réactif qui élimine les purines méthylées, créant les sites apurinic sur l'ADN.
 - Cassures de l'ADN à ces sites apuriniques.
 - Les fragments seront soumis à une électrophorèse et autoradiographie.
- Chaque bande termine à côté d'un nucléotide qui a été méthylé et ainsi non protégé par la protéine.

- **Empreinte aux radicaux libres**

Le principe de l'empreinte se prête à différents réactifs outre les nucléases. On peut par exemple générer dans le milieu d'incubation des radicaux hydroxyl libres qui attaquent la chaîne de phosphate de l'ADN et cassent un des brins de l'ADN. La réaction pour générer ces radicaux est la suivante:



Ce radical est une espèce hautement réactive, qui peut être générée durant la réaction de Haber-Weiss/Fenton qui consiste en une étape de réduction du fer par $\text{O}_2\cdot^-$ et une étape de génération de $\text{OH}\cdot$ via la réaction de Fenton.

Le radical $\text{HO}\cdot$ attaque l'ADN et il n'a pas de préférence quant à la séquence. Une telle empreinte peut donner plus de bruit de fond qu'une empreinte à la DNase I parce que cette dernière, beaucoup plus massive, peut difficilement atteindre des sites situés sous la protéine qui protège l'ADN, alors qu'une petite molécule comme $\text{HO}\cdot$ y arrive plus facilement ((Nunoshiba et *al.*, 1999).

b) Les sondes physiques

ADN photofootprint avec les rayons ultraviolets (UV) qui consiste à la formation des dimères pyrimidiques, après illumination UV, entre deux pyrimidines adjacentes dans un brin de la double hélice. La formation de ces photodimères exigera le déroulement de l'ADN. Ces déformations sont empêchées ou modifiées par la présence de protéines de liaison, ce qui conduit à une modulation du taux des lésions dues aux UV. Des réactions spécifiques (enzymatiques et

chimiques) qui brisent le squelette de l'ADN sur les sites de photodimères sont développées pour faire ressortir les traces des sites de liaison.

- Empreinte aux UV ou photofootprinting

Les UVB (280-320 nm) et les UVC (200-230 nm) peuvent induire la formation de dimères de pyrimidines quand deux pyrimidines se voient: on obtient alors des CPD (cyclobutane pyrimidine dimers) ou des 6-4PP (photoproduits pyrimidine-pyrimidone) (Figure). Les 6-4PP se forment à un taux d'environ 15-30% des CPDs. Les 6-4PP peuvent être coupés par la piperidine chaude; les CPD doivent être traités à la T4 endonuclease V et re-traités aux UVA (320-400nm) et à la photolyase.

Cette technique vise plus particulièrement les régions riches en pyrimidines. Elle se prête bien aux techniques *in vivo*, car aucune perméabilisation membranaire n'y est requise; de plus, l'irradiation peut être très brève si l'intensité de l'irradiation est élevée, permettant de prendre une "photo" de ce qui se passe dans la cellule à un moment précis, avec un minimum de perturbations.

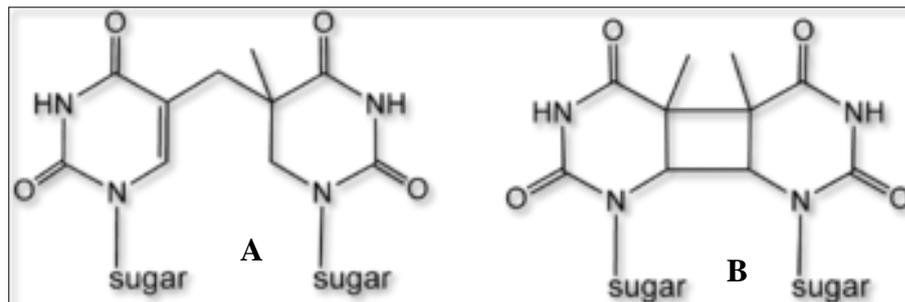


Figure: photoproduit A: 6-4, pyrimidine-pyrimidone. B: Cyclobutane pyrimidine dimer.

La pipéridine est utilisée pour convertir en cassures monocaténaire les dommages produits par les rayons UVB et UVC, les dimères cyclobutyliques de pyrimidines CPD peuvent être spécifiquement convertis en cassures monocaténaire suite à un traitement avec des enzymes de réparation de l'ADN.

Les agents de caractérisation intracellulaire de l'interaction ADN-protéine doivent posséder les caractéristiques :

- 1) l'agent doit être capable de pénétrer dans la cellule et agir rapidement sur l'ADN afin de réduire les perturbations qui pourraient modifier la nature des interactions ADN-protéine. Il est toujours possible de perméabiliser la membrane plasmique afin de faire pénétrer l'agent.

2) l'agent devrait produire des cassures monocaténares à l'ADN. Un agent qui ne produit pas directement de cassures à l'ADN peut toutefois être utilisé si les dommages qu'il cause à l'ADN peuvent être convertis en cassures monocaténares.

Le Tableau ci-dessous, résume quelques sonde de caractérisation de l'interaction ADN-protéine, leur mode d'action, apport et limites.

Tableau: Quelques exemples d'agents de caractérisation (sondes) ADN-Protéine.

Approches	Applications	Avantages	Limites
<p>DNase I</p> <p>Action : Produit des cassures à l'ADN sans égard à la séquence.</p> <p>Conversion en cassures : Inutile.</p>	<p>-Localise in vivo les interactions ADN-protéine.</p> <p>-Cartographie <i>in vivo</i> les sites hypersensibles à la DNase.</p>	<p>-Aucune restriction de séquence.</p> <p>-N'exige pas de conversion.</p> <p>-Capable de détecter la plupart des interactions ADN-protéine.</p>	<p>-Techniquement plus complexe et plus difficilement reproductible.</p> <p>-La DNase I est une grosse protéine qui nécessite une perméabilisation membranaire pour pénétrer dans la cellule.</p>
<p>Sulfate de diméthyle (DMS)</p> <p>Action : Méthylation préférentielle de l'azote en position 7 des guanines.</p> <p>Conversion en cassures : par un traitement à la pipéridine (80°C).</p>	<p>-Localise in vivo les interactions ADN-protéine.</p> <p>-Détecte certaines structures spéciales de l'ADN.</p>	<p>Techniquement simple, le DMS est une petite molécule très réactive qui n'exige pas de perméabilisation pour pénétrer à l'intérieur des cellules</p>	<p>-Requiert des guanines dans la séquence</p> <p>-est incapable de détecter toutes les interactions ADN-protéine.</p>
<p>Irradiation UV (UVA ou UVC)</p> <p>Action : Produit 2 types majeurs de dommages impliquant 2 pyrimidines adjacentes</p> <p>1) Dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP).</p> <p>2) Photoproduits 6-4(6-4pp).</p> <p>Conversion en cassures :</p> <p>1) DCP : T4 endoV suivie de la photolyase</p> <p>2) 6-4pp : photolyase suivie de la pipéridine (80°C)</p>	<p>-Localise in vivo les interactions ADN-Protéine.</p> <p>-Détecte certaines structures spéciales de l'ADN.</p> <p>-Détermine parfois le positionnement des nucléosomes.</p>	<p>-Techniquement simple, les rayons UV traversent la membrane cytoplasmique sans la déstabiliser.</p> <p>-Fixe les interactions ADN-protéine sans perturber le milieu.</p>	<p>-Requiert deux pyrimidines adjacentes dans la séquence.</p> <p>-Il est parfois difficile de discerner une interaction ADN-protéine d'une structure spéciale de l'ADN.</p>

IV.4 Simple Hybride

Cette technique permet d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec un fragment d'ADN connu de vérifier une interaction entre une séquence d'ADN et une protéine d'étudier les nucléotides et/ou acides aminés impliqués dans une interaction connue (Figure).

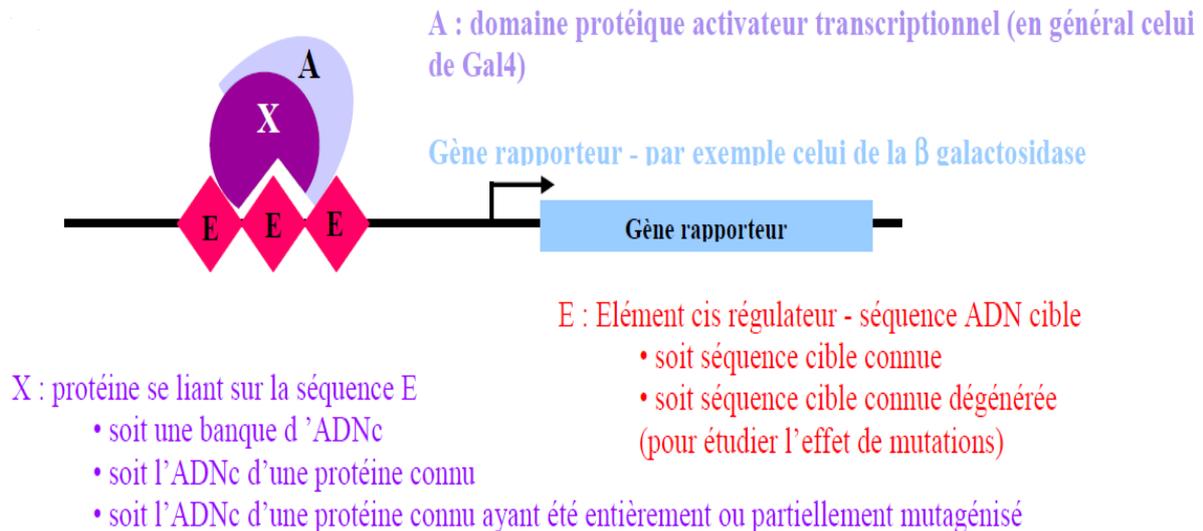


Figure 33: Principe du simple hybride

Si la protéine X se lie sur la séquence cis régulatrice E, il y aura activation de la transcription du gène rapporteur. Si on fait pousser les levures ayant reçu ce vecteur sur un milieu en présence de X-gal, les colonies obtenues seront bleues. Afin d'améliorer le rendement de l'activation transcriptionnelle, la séquence cible E est répétée plusieurs fois (Helwa et Hoheisel, 2010).

IV.5 Southwestern blotting

Cette méthode est une combinaison entre la technique de Southern et celle de western blotting, elle est utilisée pour approcher le poids de la protéine dans le complexe ADN protéine. Elle implique un western blot modifié en utilisant des oligonucléotides marqués au lieu d'anticorps comme sonde.

L'extrait cytoplasmique/nucléique des cellules contenant la protéine d'intérêt, brute ou purifiée, est soumis à une SDS-PAGE, suivie d'un transfert électrophorétique des protéines sur une membrane de nitrocellulose dans des conditions favorisant la renaturation des protéines. Les protéines liées aux membranes sont ensuite incubées avec des oligonucléotides radioactives. La membrane est photographiée et seule la bande correspondant à la borne oligonucléotide apparaît dans l'image finale (Guille et Kneale, 1997 ; Dey et *al.*, 2012) (Figure). Cette technique permet de connaître le

Le poids moléculaire de la protéine qui se lie à une séquence d'ADN, elle peut également être utilisée pour trouver la séquence d'ADN qui se lie à une protéine connue (Dey et al., 2012).

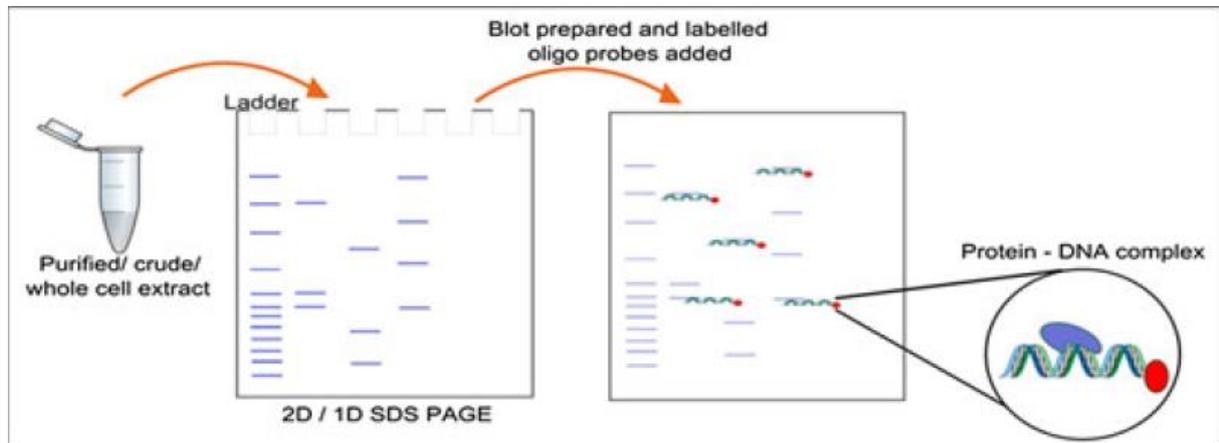


Figure 34: Southwestern blotting (Dey et al., 2012).

Cette technique possède plusieurs inconvénients, elle est limitée car les oligonucléotides ne peuvent pas pénétrer directement dans le gel de SDS-PAGE. Aussi dans cette méthode les protéines à plusieurs sous unités se dissocient dans l'étape de SDS-PAGE donc s'échappent à la détection et même les protéines monomérique ont un risque de ne pas se renaturer correctement. Cela l'empêche de reconnaître la séquence ciblée d'ADN d'intérêt (Dey et al., 2012).

IV.6 Technique surface plasmon résonance (SPR), plus communément appelée Biacore

La technique permet de mesurer l'interaction entre deux partenaires moléculaires grâce à une machine mesurant l'intensité d'un rayon de lumière.

Le système BIACORE® est un biocapteur utilisant le principe physique de la résonance plasmonique de surface (SPR). Il permet de mesurer en temps réel, et sans marquage spécifique, les caractéristiques d'interaction entre deux molécules sur une surface biospécifique. Pour cela, une des molécules (le ligand) est immobilisée sur la surface "sensor" et l'autre (l'analyte) est injectée. La SPR, se produit quand un rayon lumineux est réfléchi sous certaines conditions par un film conducteur à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents.

Le principe de détection par SPR quantifie des changements de l'indice de réfraction près de la surface, reliés à la variation de masse à la surface du biocapteur, due à la formation et à la dissociation des complexes moléculaires

Dans le système Biacore^(tm) ces milieux sont (1) la solution dans laquelle se trouvent les molécules à analyser et (2) le verre d'une lame qui sert de senseur. Le film conducteur à l'interface des deux est un très fin film d'or à la surface de la lame de verre (Figure).

La résonance de plasmon cause une réduction de l'intensité de la lumière réfléchi à un angle spécifique de réflexion. Cet angle varie avec l'indice de réfraction près de la surface du côté opposé à la lumière réfléchi (du côté de l'échantillon).

Le système détecte ce changement et enregistre une interaction. La mesure du niveau d'interaction en fonction du temps permet d'évaluer le taux d'association. Une unité de résonance (RU) correspond à un changement de 0.0001° dans l'angle donnant une intensité minimale de lumière réfléchi, ce qui pour la plupart des protéines correspond à un changement de concentration de l'ordre de 1 pg/mm^2 de surface sur la lame de verre. Le Biacore est donc extrêmement sensible .

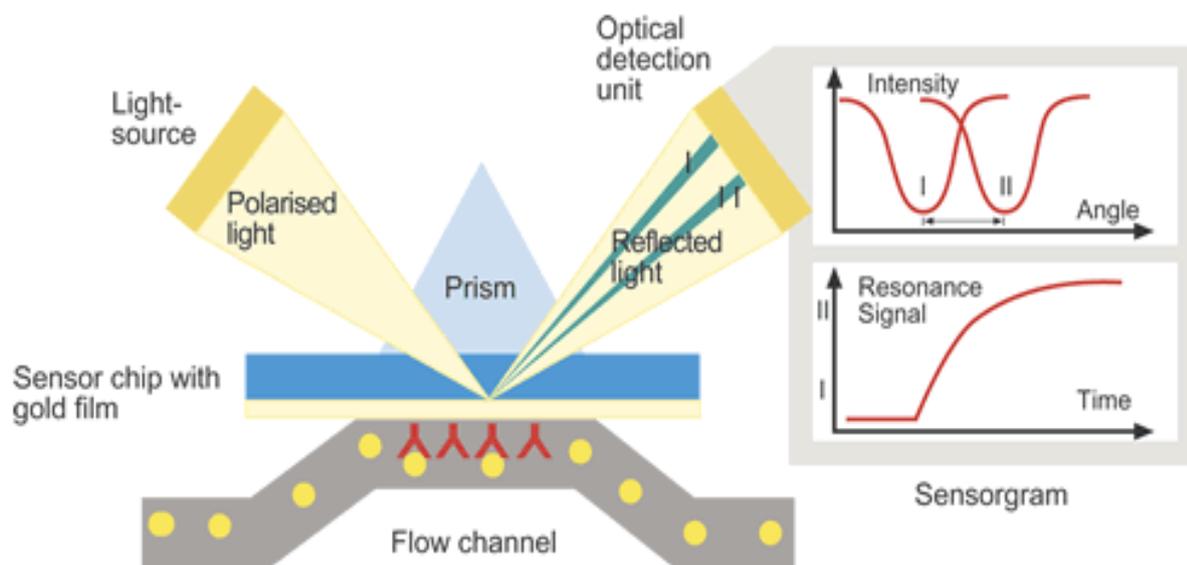


Figure: Principe du Biacore.

IV.7 Immunoprécipitation de chromatine

Le « ChIP » (Chromatine Immuno Precipitation) repose sur la combinaison de différentes techniques, parmi lesquelles le pontage covalent, l'immunoprécipitation, et la PCR (*Polymerase chain reaction*).

Le ChIP sert à déterminer si une protéine donnée lie un fragment précis d'ADN. L'avantage majeur du ChIP est qu'il s'effectue *in vivo*, c'est-à-dire que l'information tirée de cette expérience provient directement d'une analyse faite sur les cellules vivantes.

Ainsi, après la croissance des cellules dans les conditions souhaitées, toutes les protéines qui touchent l'ADN y sont immobilisées par des liens covalents à l'endroit précis de leur interaction grâce à un traitement au formaldéhyde.

Ces réactions se mettent en place *in vivo* en quelques minutes seulement après l'ajout de formaldéhyde sur les cellules vivantes. L'avantage de l'utilisation du formaldéhyde est que la réaction est totalement réversible.

Par la suite, les cellules sont lysées, puis les complexes ADN-protéines sont fragmentés en courts segments avant d'être immunoprécipités.

Cette technique peut être décomposée en plusieurs étapes de la façon suivante (Figure):

A) Liaison covalente de l'ADN aux protéines *in vivo* (pontage). Plusieurs méthodes sont pratiquées comme l'utilisation des UV, de la formaldéhyde ou du bleu de méthylène.

Le complexe ADN-protéine (la chromatine pontée) est fragmenté. Pour cela la sonication ou la digestion par les enzymes de restriction sont utilisées. Ces techniques sont normalisées pour produire des fragments d'ADN pontés de l'ordre de 500 paires de bases minimum.

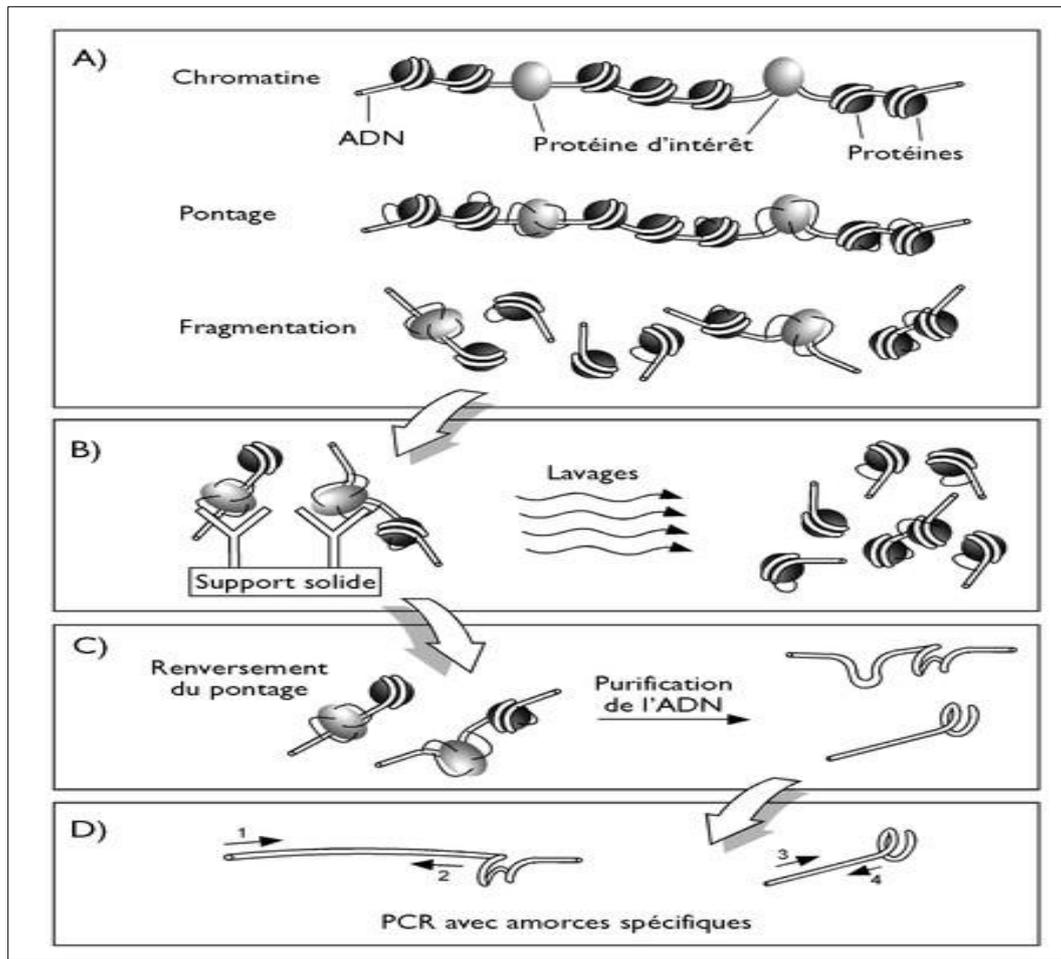
B) Immunoprécipitation de la chromatine pontée. C'est un des points clés de la méthode et il est nécessaire d'avoir des anticorps d'excellente qualité pour que la technique fonctionne correctement : Pour récupérer les fragments d'ADN sur lesquels se trouve pontée la protéine qui nous intéresse, on utilise un anticorps spécifique contre cette dernière. L'anticorps sera biotinylé, ce qui permettra de le retenir contre une bille magnétique couplée à la streptavidine. Le complexe bille magnétique- streptavidine- anticorps- protéine pontée- ADN est retenu au fond d'un tube par un aimant pendant que tous les autres complexes ADN-protéines sont éliminés par lavage. Après les lavages, la bille magnétique a permis de retenir tous les fragments d'ADN avec lesquels la protéine d'intérêt a une interaction assez importante pour permettre le pontage au formaldéhyde.

C) Purification de l'ADN. Les complexes ADN/Protéines sont dissociés par la chaleur et les protéines sont digérées par la Protéinase K. La protéine étudiée était associée à la région qui nous intéresse, des fragments d'ADN contenant cette séquence auront été retenus lors des lavages (Ils sont en faible quantité et il faut ensuite les amplifier par PCR pour pouvoir établir leur présence).

D) -Analyse de l'ADN: Celle-ci est réalisée soit par Slot blot soit par Southern blot après amplification par PCR de l'ADN immunoprécipité: L'ADN sur lequel elle était liée la protéine est récupéré et amplifié par PCR .

-Analyse par PCR: Si on a une idée des régions chromosomiques sur lesquelles la protéine étudiée a pu se fixer, on peut réaliser une analyse par PCR. Pour cela, on va dessiner des oligonucléotides qui s'hybrident de par et d'autre de la séquence à tester (séquence sur laquelle on pense que s'est fixée la protéine étudiée puis on réalise une PCR à l'aide de ces amorces afin de tester la présence

du fragment d'ADN correspondant parmi les fragments précipités. Il y aura amplification par PCR, avec des «primers» choisis sur les régions promotrices d'intérêt: La libération des fragments d'ADN, qui sont récupérés et purifiés.



E)

Capture de la cible protéique pontée à l'ADN avec un anticorps spécifique biotinylé; capture du complexe anticorps-protéine-ADN avec une bille magnétique streptavidine

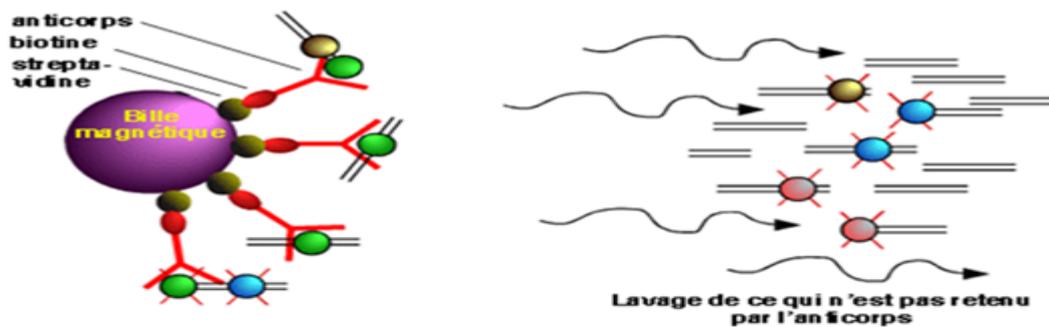


Figure: A, B, C, D: Etapes de l'immunoprécipitation de la chromatine pontée. E : Capture de la cible pontée .

Cette technique permet un enrichissement en séquences d'ADN reconnues par la protéine. Les expériences étant menées *in vivo* nous obtiendrons également des informations sur la dynamique de l'interaction protéine/ADN. Tout récemment un nouveau développement de la technique chIp est apparu, qui va l'associer à la technique des puces à ADN d'où son nom de « chIP on chip ».