

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université A. MIRA, Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Techniques de Biologie Moléculaire

**Etude de cas: Techniques d'études des interactions ADN-
protéine et protéine-protéine**

**Polycopié destiné aux étudiants de troisième année Licence
et première année Master de la filière Sciences Biologiques**

Par

Mme DEBBACHE-BENAIDA Nadjat

Maître de Conférences, Classe B

Septembre 2016

Remerciements

Ce polycopié est l'aboutissement de plusieurs années de recherches et d'enseignements consacrés à la biologie moléculaire et cellulaire. Je voudrais ici remercier collectivement ou nommément certaines des personnes qui m'ont guidé et accompagné sur ce chemin.

Je pense d'abord à tous mes collègues avec qui j'ai partagé les enseignements de certains modules et la préparation des travaux pratiques. A toute l'équipe de recherche du laboratoire de Biochimie appliquée. À tous ceux qui m'ont gratuitement consacré de leur temps, à tous ceux qui ont simplement pris la peine de discuter avec moi sur l'enseignement, merci pour leur regard objectif.

Je ne peux taire plus longtemps la gratitude particulière que j'aie vis-à-vis de quelques êtres chers. Mes ex-étudiantes et amies Farida Bensadi et Asma Ourabah qui ont transformé une aventure intellectuelle individuelle en aventure collective. Qu'elles acceptent ma reconnaissance de dette! Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans votre collaboration. Merci pour la lecture attentive et attentionnée d'une première version de ce travail.

Un très grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de ma vie. Merci à ma très chère mère qui a su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous, mes chers parents je vous dédie ce travail.

Une présence chaleureuse, bienveillante, qui sait me faire du bien. Elle me connaît mieux que quiconque et c'est réciproque, du moins je l'espère. C'est toi Hania qui mérite le mieux le titre de meilleure amie. Merci pour ton soutien dans les périodes les plus difficiles.

Il y a une personne de très grande importance dans ma vie, qui m'accompagne et qui me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles, mon mari, je te remercie pour tout. Je ne vais pas oublier les beaux sourires de mes enfants Amine et Nayla qui me font oublier les fatigues. Je vous aime.

Préface

Le but de cet ouvrage n'est pas d'offrir un cours complet de Biologie moléculaire alors que d'autres ouvrages s'y sont parfois très bien employés et que le cours de l'enseignant s'avère toujours irremplaçable, mais d'offrir aux étudiants déjà à l'aise avec les rudiments de la biologie moléculaire un recueil de méthodes de biologie moléculaires.

Ainsi, cet ouvrage propose un véritable outil d'apprentissage de Technique de biologie moléculaire et cellulaire, et particulièrement les techniques d'étude des interactions ADN-protéine et interactions protéine-protéine.

Dans une première partie, un rappel des concepts fondamentaux est associé aux interactions entre les biomolécules et leur intérêt dans les systèmes biologiques. Cette partie fait le point sur les Techniques de biologie cellulaire et moléculaire couramment utilisées pour l'étude des interactions entre les biomolécules.

Dans une deuxième partie, différents types d'interaction seront exposés et leur caractérisation par les techniques de biomoléculaire sera rapportée.

Objectifs Généraux

L'objectif de cet ouvrage est de fournir à l'étudiant un outil lui permettant, en s'appuyant sur une démarche à la fois expérimentale et méthodologique, de vérifier l'acquisition et l'assimilation de ses connaissances en biologie moléculaire.

Sur la base d'une bonne connaissance de la structure des acides nucléiques et des protéines, l'étudiant doit avoir assimilé les grands principes de base impliqués dans la régulation de l'expression des gènes.

Ce travail sera mis à la disposition des étudiants inscrits en Licence sciences biologiques et en Master Biochimie, Biologie moléculaire, génétique et microbiologie.

Il a comme objectifs :

1. Obtenir des connaissances en biologie moléculaire concernant les outils et techniques nécessaires au diagnostic moléculaire.
2. Se familiariser avec les concepts et l'interprétation des méthodes expérimentales utilisées en Biologie Moléculaire
3. Comprendre les principales méthodes de diagnostic moléculaire et leur utilisation en pratique.
4. L'étudiant doit être capable d'interpréter des résultats expérimentaux obtenus par les techniques les plus courantes de biologie moléculaire appliquées à l'étude des interactions entre les biomolécules. Et pouvoir proposer une technique de caractérisation ou de mise en évidence d'une interaction entre les ADN-protéine ou protéine-protéine.
5. L'étudiant doit ainsi avoir acquis les bases nécessaires à l'application des méthodes d'étude des interactions entre les biomolécules et savoir choisir parmi les différentes techniques, celle qui serait la plus adéquate dans un contexte bien défini.
6. Les étudiants doivent être capables de lire et comprendre un article rapportant des travaux originaux et utilisant des techniques d'études des interactions entre ADN-protéine et protéine-protéine.

Liste des abréviations

6-4PP : 6-4 Pyrimidine-pyrimidone.

ATF2 : Activating transcription factor-2.

AP1 : Activator protein-1.

Bax : Bcl-2 – associated X protéin.

Bcl2 : B-cell lymphoma 2.

BH₃ : Bcl-2 homology domain 3.

Bir : Baculovirus inhibitory repeat.

CAP : Catabolite Activator Protein.

CAP-AMPC : Protéine activatrice des catabolite-Adénosine monophosphate cyclique.

CBP : Calmodulin binding protein.

ChIP :Chromatine Immuno Precipitation.

CPD : Cyclobtuane pyrimidine dimers.

CREB/ATF : Response Element-binding protein/ activating transcription factor.

DGP : Dimères cyclobutyliques de pyrimidines

DMS ; Sulfate de diméthyle.

DsRed : Discosoma sp Red.

ECFP : Enhanced cyan fluorescent protein.

EDTA : Ethylene diamine tetra-acetic acid.

EGTA : Ethylene glycol tetraacetic acid.

EMSA : Electromobility shift assay.

EYFP : Enhanced yellow fluorescent protein.

Fab : Fragment antigen-binding.

FRET : Forster Resonance Energy.

Fv : Variable fragment.

GST :Gluthatione-S-transférase.

GFP : Protéine fluorescente verte ,

IAP : Inhibitors of apoptosis proteins.

ITC : Isothermal titration calorimetry..

LM PCR ; Ligation-Mediated - polymerase chain reaction.

PCA : Protein-fragment Complementation Assay.

PCR : Polymerase chain reaction.

PPI : Interactions protéine-protéine.

RecA :Rrecombinant Escherichia coli protein A.

REMSA : RNA electromobility shift assay.

RhoA – RhoGAP : Ras homolog gene family, member A- Ras homolog gene family, member A GTPase-activating protein.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

scFv : Single chain variable fragment.

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium.

Smac :second mitochondria-derived activator of caspases.

Smac-XIAP : second mitochondria-derived activator of caspases- X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein.

SPR : Surface plasmon resonance.

TAP-TAG : Tandem affinity purification by tag.

TNF α -NF κ B : Tumor necrosis factor α -Nuclear factor-kappa B.

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand..

UAS :Upstream Activated Sequence.

UV : Ultraviolet.

UVB/UVC : Ultraviolet de type B ou C.

VIH :Immuno-déficiencie Humaine.

VMT : Tobacco mosaic virus.

XIAP : X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein.

Liste des Figures

Figure	Page
Figure 1: Système de double hybride de la levure.....	5
Figure 2: résultats de la méthode double hybride.....	6
Figure 3 : Les faux positifs du système double hybride.....	7
Figure 4. Principe de la PCA.....	8
Figure 5: Expression du rapporteur de la β -galactosidase.....	9
Figure 6: Révélation de l'interaction entre la protéine A et B par la FRET.....	11
Figure 7: Les résultats de l'étude de l'interaction entre deux protéines par la FRET.....	11
Figure 8: Le système de la SPR.....	13
Figure 9: Le système ITC avec une représentation graphique du thermogramme.....	14
Figure 10: Ultracentrifugation	15
Figure 11: Co-immunoprécipitation.....	17
Figure 12: Représentation schématique du principe du GST-pulldown.....	18
Figure 13: Principe de purification par affinité en tandem.....	20
Figure 14: Représentation schématique du bactériophage filamenteux fd.....	21
Figure 15: Expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide.....	22
Figure 16: Le phage display Banque de phage M13 avec PIII rec ou PVIII rec.....	23
Figure 17: Les étapes de la méthode phage Display.....	24
Figure 18: Interaction Bcl-xL-Bak.....	26
Figure 19 : Principe de la cristallographie.....	27
Figure 20: Interaction XIAP-Smac	28
Figure 21: Types d'interactions ADN-Protéine.....	31
Figure 22: Le motif à doigts de zinc interagit avec l'ADN.....	32
Figure 23: Le motif de leucine zipper interagit avec l'ADN	33
Figure 24: L'interaction des protéines homodimériques.....	34
Figure 25: Une protéine aux motifs hélice-tour-hélice.....	35
Figure 26: Technique attache de filtre.....	36
Figure 27: Technique de décalage de mobilité.....	38
Figure 28 : Principe du schift et supersshift.....	39
Figure 29 : Effet de la fixation de la protéine sur l'ADN.....	40
Figure 30: Caractérisation de l'interaction ADN-Protéine par ADNase I.....	42
Figure 31: mode d'action du sulfate de diméthyle.....	43

Figure 32: photoproduits	45
Figure 33: Principe du simple hybride.....	48
Figure 34: Southwestern blotting	49
Figure 35: Principe du Biacore.....	51
Figure 36: Immunoprécipitation de la chromatine pontée.....	54
Figure 37: Les étapes du ChIP on chip.....	56

Liste des Tableaux

Tableau	Page
Tableau I: Quelques exemples d'agents de caractérisation (sondes) ADN-Protéine.....	47

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Avant propos

Remerciements

Objectifs

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
I. Techniques d'études des interactions protéine / protéine	2
I.1. Différents types d'interactions.....	2
I.2. Détection et caractérisation des interactions protéiques.....	3
I.2.1. Gène rapporteur.....	3
I.2.2. Double hybride.....	4
I.1.3 Protein-fragment Complementation Assay (PCA)	7
I.1.4. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)	9
I.1.5 SPR (Surface plasmon resonance)	12
I.1.6 Calorimétrie isotherme à titration.....	13
I.1.7. Ultracentrifugation analytique	14
I.1.8. Co-immunoprécipitation.....	15
I.1.9. Purification par affinité par l'intermédiaire d'étiquettes.....	17
I.1.10. Technique TAP-TAG	19
I.1.11. Phage Display.....	21
I.1.12. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	25
I.1.13. Cristallographie.....	26

II. Techniques d'études des interactions ADN-Protéines.....	29
II.1. Interactions acide nucléique-protéine.....	29
II.2. Exemple d'interaction ADN- protéine.....	29
II.3. Mécanisme d'interaction ADN-Protéine.....	30
II.4. Motifs protéiques de fixation aux acides nucléiques.....	32
II.4.1. Motifs à doigts de zinc.	32
II.4.2. Motifs de fermetures éclair à leucine.....	32
II.4.3. Motifs hélice-boucle-hélice.....	33
II.4.4. Motifs hélice-tour-hélice.....	34
II.5. Techniques d'étude des interactions ADN-protéine.....	35
II.5.1. Technique d'attache de filtre et décalage de mobilité.....	36
II.5.1.1. Attache de Filtre.....	36
II.5.1.2. Décalage de Mobilité (<i>Retards sur gel</i>).....	37
II.5.2. Technique de Footprints.....	41
II.5.2.1. Sondes enzymatiques.....	41
II.5.2.2. Sondes chimiques.....	43
II.5.2.3. Sondes physiques.....	44
II.5.3. Simple Hybride.....	48
II.5.4. Southwestern blotting.....	48
II.5.5. Technique surface plasmon résonance (SPR).....	49
II.5.6. Immunoprécipitation de chromatine.....	51
II.5.7. Hybridation sur « chip » - ChIP on chip ou ChIP to chip.....	55
References bibliographiques.....	57

INTRODUCTION

Introduction

Les génomes de différentes espèces ont été séquencés ces dernières années, la majorité des efforts de la communauté scientifique se porte aujourd'hui sur l'analyse du produit des gènes, les protéines. En effet, les fonctions biologiques de la plupart de ces molécules codées par les gènes ne sont pas encore connues.

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.

L'étude des protéines est appelée la protéomique. L'identification des interactions entre protéines permet de mieux comprendre leur fonction (si la fonction des partenaires de la protéine est connue, cela nous donnera des informations sur sa propre fonction) et permettra éventuellement de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'ensemble des interactions protéine-protéine forme l'interactome. Il est obtenu par l'identification systématique des partenaires protéiques de toutes (ou partie) les protéines d'une cellule ou d'un organe ou d'un organisme.

L'accès aux interactions permet:

- De comprendre l'action concertée dans le temps et dans l'espace du produit des gènes.
- Connaissance des détails des interactions au sein d'un complexe, de l'organisation des «machines cellulaires» et de leur dynamique (variation de la composition des complexes en fonction des conditions).
- Confirmer l'existence de protéines qui n'étaient que prédites, et attribution d'un rôle potentiel aux protéines de fonction inconnue.
- Synthèse de principes actifs pouvant empêcher une interaction *in vivo*.

CHAPITRE I

Techniques d'étude des interactions Protéine-Protéine

I. Techniques d'étude des interactions protéine / protéine

Les protéines agissent rarement de façon isolée. La plupart d'entre elles réalisent leurs fonctions biologiques en interagissant avec d'autres protéines. Ces interactions correspondent à des contacts physiques entre les protéines qui ont lieu dans la cellule et sont appelées interactions protéine-protéine (PPI). Elles sont fortement impliquées dans la formation de structures macromoléculaires, dans la signalisation, dans la régulation et dans les différentes voies métaboliques (Chen et Xu, 2003; Leudet *et al.*, 2007).

Les signaux extra-cellulaires, par exemple, sont transmis à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de telles interactions. Ce processus, appelé transduction du signal, joue un rôle très important dans de nombreux processus biologiques, ainsi que dans plusieurs pathologies, dont le cancer.

Les interactions protéine-protéine ont un rôle conséquent dans les processus importants pour la pathogenèse des infections bactériennes et virales. La haute spécificité de ces interactions fait d'elles des cibles idéales pour les agents thérapeutiques. L'identification et la caractérisation de ces interactions sont donc essentielles pour mieux comprendre les mécanismes des processus biologiques au niveau moléculaire. Les interactions n'ont pas lieu dans toutes les cellules ou à un moment quelconque. Le contexte biologique est, au contraire, un élément essentiel. Ainsi, les interactions dépendent du type de cellule, de la phase du cycle cellulaire, du stade de développement, des conditions environnementales, des modifications post-traductionnelles des protéines, ou encore de la présence d'autres partenaires (De Las Rivas et Fontanillo, 2010).

I.1. Différents types d'interactions protéines-protéines

Il existe plusieurs types d'interaction. On peut notamment les classer en fonction de leur durée de vie. On distingue :

- **Interactions permanentes**, qui sont en général des interactions très stables, où les protéines n'existent que sous leurs formes associées, par exemple les protéines du ribosome (Perkins *et al.*, 2010).

- **Interactions transitoires** où les protéines existent, dans la cellule, sous la forme associée et dissociée (Perkins *et al.*, 2010). Parmi ces interactions transitoires, il existe :

Les interactions transitoires faibles, caractérisées par des oligomères dynamiques où l'interaction se forme et se reforme continuellement. C'est le cas par exemple de l'hétérodimère non obligatoire RhoA – RhoGA, impliqué dans les complexes de signalisation cellulaire ;

Les interactions transitoires fortes, comme les protéines G hétérodimériques qui sont dissociées en sous-unités $G\alpha$ et $G\beta$ sous l'action de guanosine triphosphate (GTP), mais qui forment un complexe stable avec la liaison de guanosine diphosphate (GDP) (Layden *et al.*, 2010).

I.2. Détection et caractérisation des interactions protéiques

Plusieurs techniques ont été développées pour étudier les interactions protéine-protéine, la plupart de ces dernières font appel aux gènes rapporteurs, ainsi nous allons introduire quelques généralités sur le gène rapporteur.

I.2.1. Gène rapporteur

Un gène rapporteur est un gène témoin, un marqueur codant pour une protéine d'activité connue et détectable, il est utilisé pour étudier l'activité d'un autre gène. Ainsi le gène rapporteur est rajouté à un gène d'intérêt dans une construction génétique afin de visualiser la protéine recombinante produite.

Les gènes rapporteurs peuvent être des gènes codant des protéines fluorescentes ou des enzymes dont l'action provoquera l'apparition d'un produit coloré.

- exemple de protéines fluorescentes: la protéine fluorescente verte (GFP), la luciférase qui émet une lumière jaune (Bagchi *et al.*, 2015)..

-exemple de protéine à activité enzymatique: le gène GUS, codant une enzyme (la bêta-glucuronidase) qui colore en bleu les cellules où il est actif, mais il est létal. Le gène lac Z codant la β -galactosidase (Lac Z) qui métabolise le X-gal fait apparaître une coloration bleue.

-Les variants spectraux de la GFP obtenus par modification génétique de la GFP sont la ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) ou la EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) ont des propriétés identiques à la GFP. La DsRed de l'anémone de mer est aussi obtenue par modification génétique, elle émet une fluorescence rouge.

Gènes marqueurs doivent obéir à 3 conditions:

- être étrangers au génome de l'organisme modifié afin que leur produit n'intervienne pas dans le métabolisme.
- leur produit doit permettre une visualisation rapide et précise afin de déterminer dans quel tissu agit le gène modifié (précipitation du produit dans son site de production exp transformation du X-glu par l'enzyme GUS donnant un produit bleu dans le site)
- leur produit doit être quantifiable afin de mesurer l'activité du promoteur induisant la modification.

I.2.2. Double hybride

Cette méthode ne permet de déterminer que des interactions binaires entre protéines. La méthode repose sur l'utilisation d'un facteur de transcription modulaire chez la levure, ayant un domaine d'activation de la transcription et un domaine de liaison à l'ADN (figure 1).

Pour évaluer l'interaction entre une protéine X (appelée appât) et une protéine Y (appelée cible), on commence par en faire des hybrides par génie génétique: un premier hybride entre la protéine appât et un domaine de fixation à l'ADN, et un second entre la protéine cible et un domaine d'activation de la transcription (Joung *et al.*, 2000).

Construction des hybrides

La séquence codant la protéine 1 (l'appât) sera fusionnée à la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 clonée dans un plasmide La proie (protéine Y) correspondra soit à l'ADNc de la protéine dont on veut tester son interaction avec la protéine X, soit une banque d'ADNc si aucune expérience préliminaire n'a encore été réalisée. Sa séquence sera fusionnée avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4 et seront clonés dans un plasmide. Le gène rapporteur, précédé du promoteur portant les sites de liaison de Gal 4 (répétés 6x), est inséré dans le génome de la levure. Parmi les sites de liaison de Gal4, l'UAS (*Upstream Activated Sequence*) de Gal1 est souvent utilisé.

Les deux plasmides sont co-transformés dans la souche de levure appropriée présentant le gène rapporteur sous la dépendance d'une UAS de Gal4 et déficiente pour les gènes d'auxotrophie utilisés comme marqueurs de sélection.

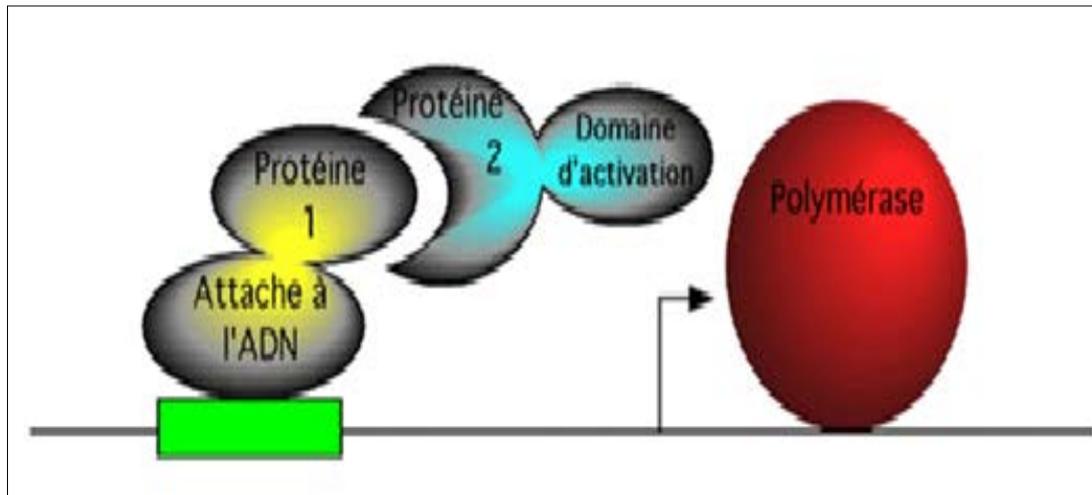


Figure 1: Système de double hybride de la levure (Chen et Xu, 2003).

Un facteur de transcription est découpé en deux parties : un domaine de fixation sur l'ADN (BD ou *Binding Domain*) et un domaine d'activation (AD ou *Activation Domain*). Chaque protéine d'intérêt est couplée à l'un des domaines et si les deux protéines interagissent ensemble, le facteur de transcription devient actif et le gène rapporteur est transcrit.

Si les deux protéines entrent en contact et le gène rapporteur sera transcrit (Figure 2). L'hybride 1 va se lier au promoteur.

Si les protéines appât et cible ont réellement de l'affinité l'une pour l'autre, l'hybride 2 va entrer en contact avec l'hybride 1 et se trouver positionné au promoteur lui aussi, là où son domaine d'activation de la transcription (le facteur de transcription sera reconstitué) stimulera l'expression du gène rapporteur.

Le gène rapporteur GAL1-lacZ, qui encode pour la β -galactosidase, est alors transcrit. Cette enzyme transforme un substrat soluble et incolore X-gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*) en un composé bleu insoluble. Le X-gal, est un dérivé du galactose, lié à un noyau indole. Il peut être hydrolysé par la β -galactosidase, produit du gène LacZ, en formant un composé bleu, ce qui permet de détecter la présence de cette enzyme (Plessis et Camonis, 1994).

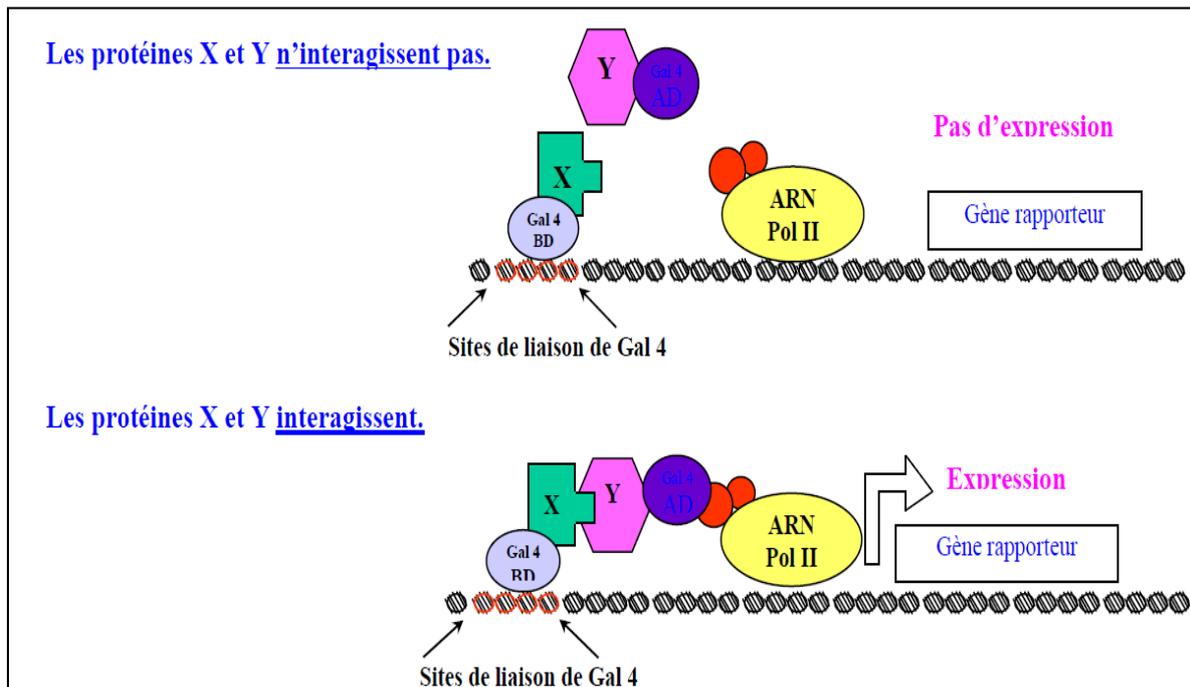


Figure 2: Résultats de la méthode double hybride (Plessis et Camonis, 1994).

Cette méthode permet d'identifier des interactions protéine-protéine à l'échelle du protéome. Des cartes d'interaction ont ainsi été identifiées chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, la bactérie *Helicobacter pylori*, la mouche *Drosophila melanogaster*, le ver *Caenorhabditis elegans* et l'Homme (Chen et Xu, 2003). Cette technique étant utilisée *in vivo*, elle permet de détecter des interactions transitoires et instables. Cependant, le principal inconvénient de cette méthode concerne les taux importants de faux positifs (Figure 3) (interactions détectées expérimentalement mais qui n'existent pas) et de faux négatifs (interactions existantes qui n'ont pas été détectées par la méthode). Ces erreurs découlent en partie du fait que les interactions sont testées dans le noyau, or ce n'est pas le compartiment d'origine de beaucoup de protéines (Joung *et al.*, 2000).

Avantages

- Signal facile à mettre en place (biologie moléculaire)
- Possibilité de faire des approches globales

Inconvénients

- L'interaction physique a lieu hors contexte
- Cette méthode donne de nombreux faux positifs.

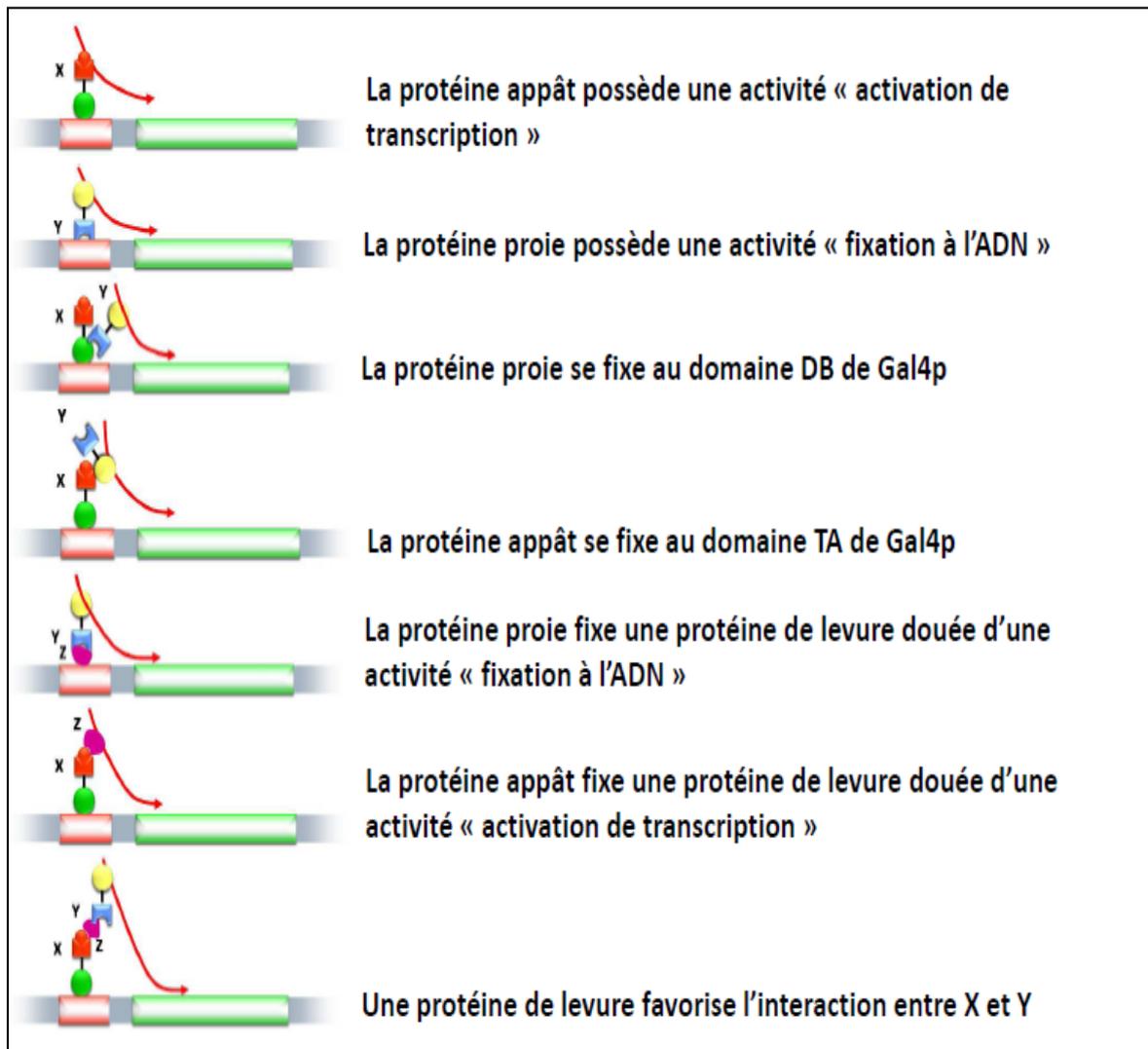


Figure 3 : Les faux positifs du système double hybride (Joung *et al.*, 2000).

I.2.3 Protein-fragment Complementation Assay (PCA)

Les systèmes de complémentation par fragments de protéine, PCA est une technique consistant à vérifier l'interaction protéine-protéine en couplant chacune des protéines d'intérêt avec une des sous-unités d'une protéine reportrice (luciférase ou autres). L'activité du rapporteur n'est restaurée que lors de l'association des deux protéines d'intérêt. Cela signifie que les deux protéines interagissent et ont permis aux 2 sous unités de la luciférase d'être suffisamment proche pour se compléter (Rossi *et al.*, 1997) (Figure 4).

Les stratégies de complémentation de fragment de protéine (parfois appelés rapporteurs split) se basent sur plusieurs protéines et enzymes, y compris la dihydrofolate reductase (DHFR), β -galactosidase, β -lactamase, protéine GFP et la luciférase. Cela ont été utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine dans des cellules mammaliennes (Villalobos *et al.*, 2007 ; Hu et Kerppola, 2003).

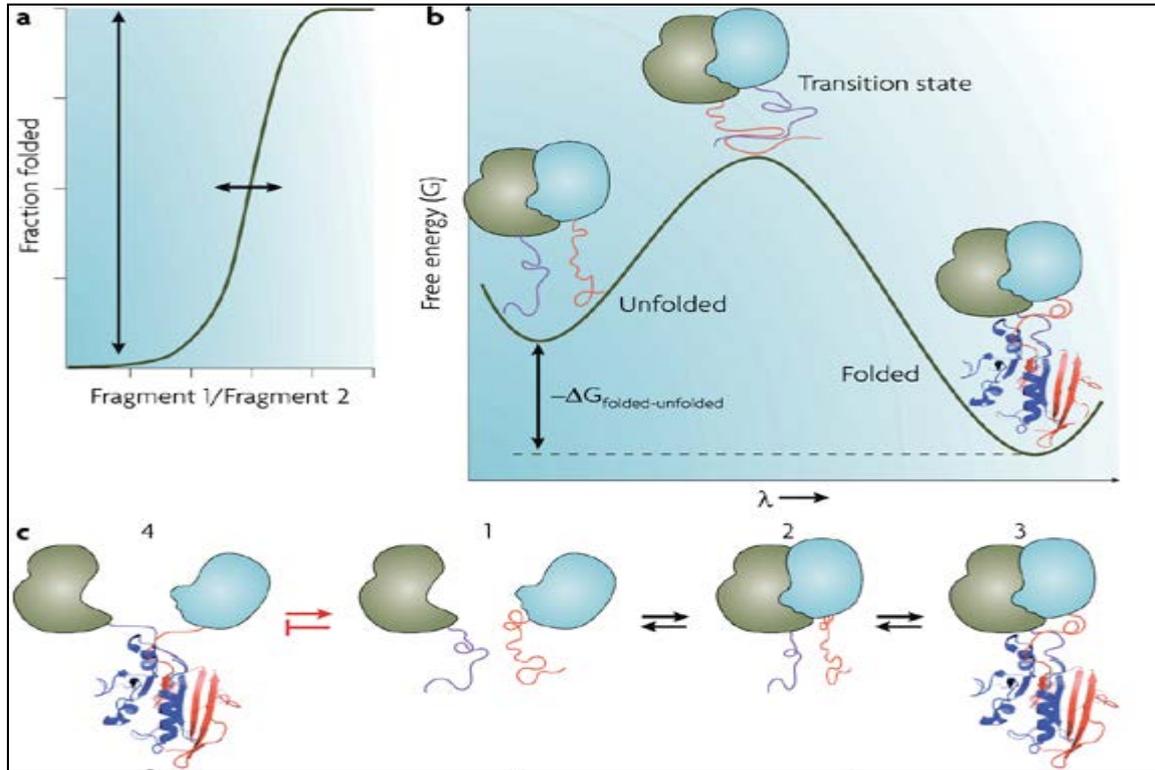


Figure 4. Principe de la PCA (Michnick, 2003).

La détection des interactions peut ensuite se faire soit directement par fluorescence, par bioluminescence, par colorimétrie ou survie de la cellule, soit indirectement en passant par l'activation d'un gène rapporteur.

Exemple : Rapporteur de la β -Galactosidase (Figure 5)

L'association des polypeptides X et Y permet la liaison des fragments T25 et T18 et ainsi la restauration de l'activité du rapporteur qui activera la synthèse de l'APMc. Celle-ci se liera à CAP (Catabolite Activator Protein) permettant ainsi l'expression du gène de la β -galactosidase (Figure 5) (Villalobos *et al.*, 2007).

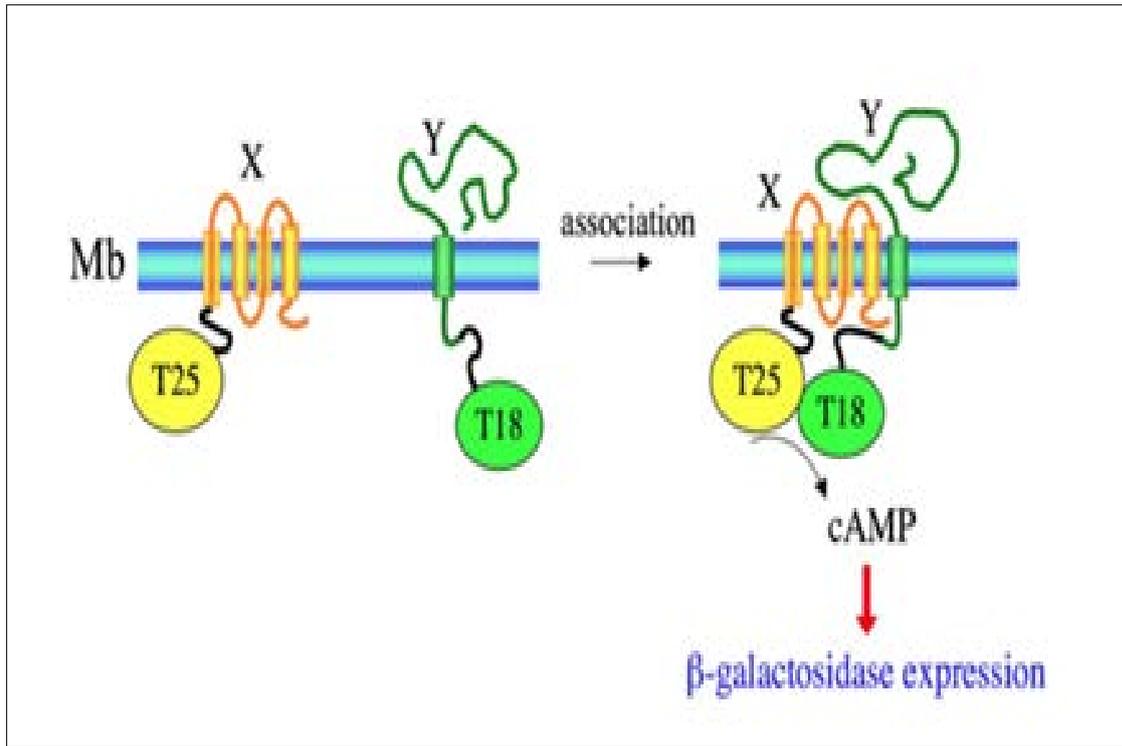


Figure 5: Expression du rapporteur de la β -galactosidase (Villalobos *et al.*, 2007).

Ce système a été perfectionné en rajoutant sur chacune des constructions des séquences de l'intégrine entre la protéine et la sous unité catalytique. L'intégrine, qui est une protéine ligase, va faire une liaison covalente entre les 2 protéines et reformer la luciférase.

Cependant, toutes les protéines ne peuvent être utilisées comme rapporteuse, en effet, il faut qu'elles possèdent des domaines bien distincts qui soient solubles lorsqu'ils sont séparés l'un de l'autre.

I.2.4. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

La FRET (*Forster Resonance Energy*) est une technique qui permet de détecter la proximité de deux molécules fluorescentes. La première, (dite le « donneur »), est excitée par une longueur d'onde λ_1 . Le donneur va libérer des photons de longueur d'onde λ_2 , qu'on peut détecter. Il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'excitation à la seconde molécule fluorescente (le « receveur ») qui libérera aussi des photons, mais à une longueur d'onde qui lui est propre, λ_3 (Figure 6). Le donneur et le receveur doivent être séparés par 10-100 Angstroms (Å°) pour qu'il y ait transfert

d'énergie entre eux. Le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher le spectre d'émission du donneur ; et les orientations des dipôles du donneur et de l'accepteur doivent être parallèles (Villalobos *et al.*, 2007) (Figure 7).

La distance à laquelle le transfert est efficace à 50% est appelé distance de Förster et varie selon les agents fluorescents utilisés.

Une forme de FRET utilise des protéines fluorescentes comme donneur et accepteur ; cette approche permet d'utiliser la FRET dans un contexte *in vivo* (Trugnan *et al.*, 2004 ; Leudet *et al.*, 2007). On lui donne parfois le nom de BRET pour Bioluminescent Resonance Energy Transfer. Cette technique est utilisée dans les cellules vivantes en incitant celles-ci à produire des protéines de fusion avec des domaines naturellement fluorescents, comme la GFP et ces variantes que sont la ECFP ou la EYFP (De *et al.*, 2007 ; Villalobos *et al.*, 2007).

Selon qu'elle soit appliquée *in vitro* ou *in vivo*, la mesure du transfert de fluorescence par résonance peut se faire soit par méthode fluorimètre ou par microscope à fluorescence (Trugnan *et al.*, 2004).

La FRET permet une mesure d'interaction intra- et inter-moléculaires, suivre le changement conformationnel des protéines et le fonctionnement des molécules de signalisation cellulaire, l'étude de l'état de phosphorylation des protéines et l'étude de l'activité enzymatiques.

Avantage:

- Etude dynamique en temps réel.
- Applicable *in vivo* dans le système cellulaire original.
- Peut être couplé à un signal biologique.
- Applicable dans tous les compartiments cellulaires.

Par contre la création de protéines chimériques peut modifier les interactions et nécessite la surexpression des protéines testées.

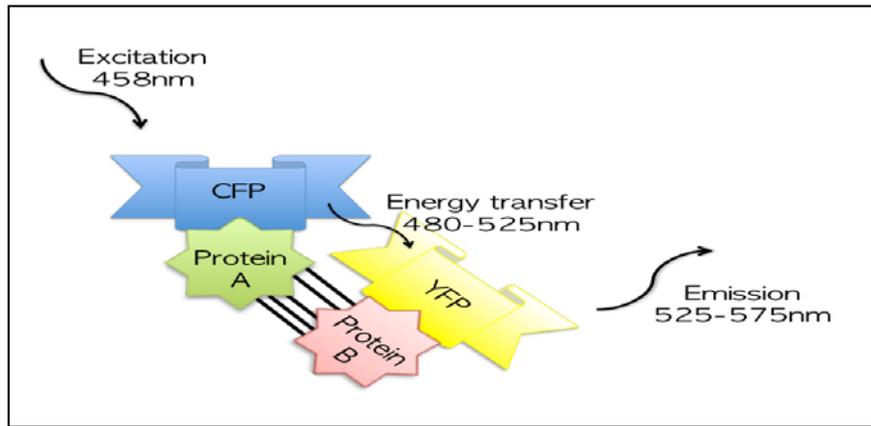


Figure 6: Révélation de l'interaction entre la protéine A et B par la FRET (Trugnan *et al.*, 2004).
CFP : cyan fluorescent protein, YFP : yellow fluorescent protein.

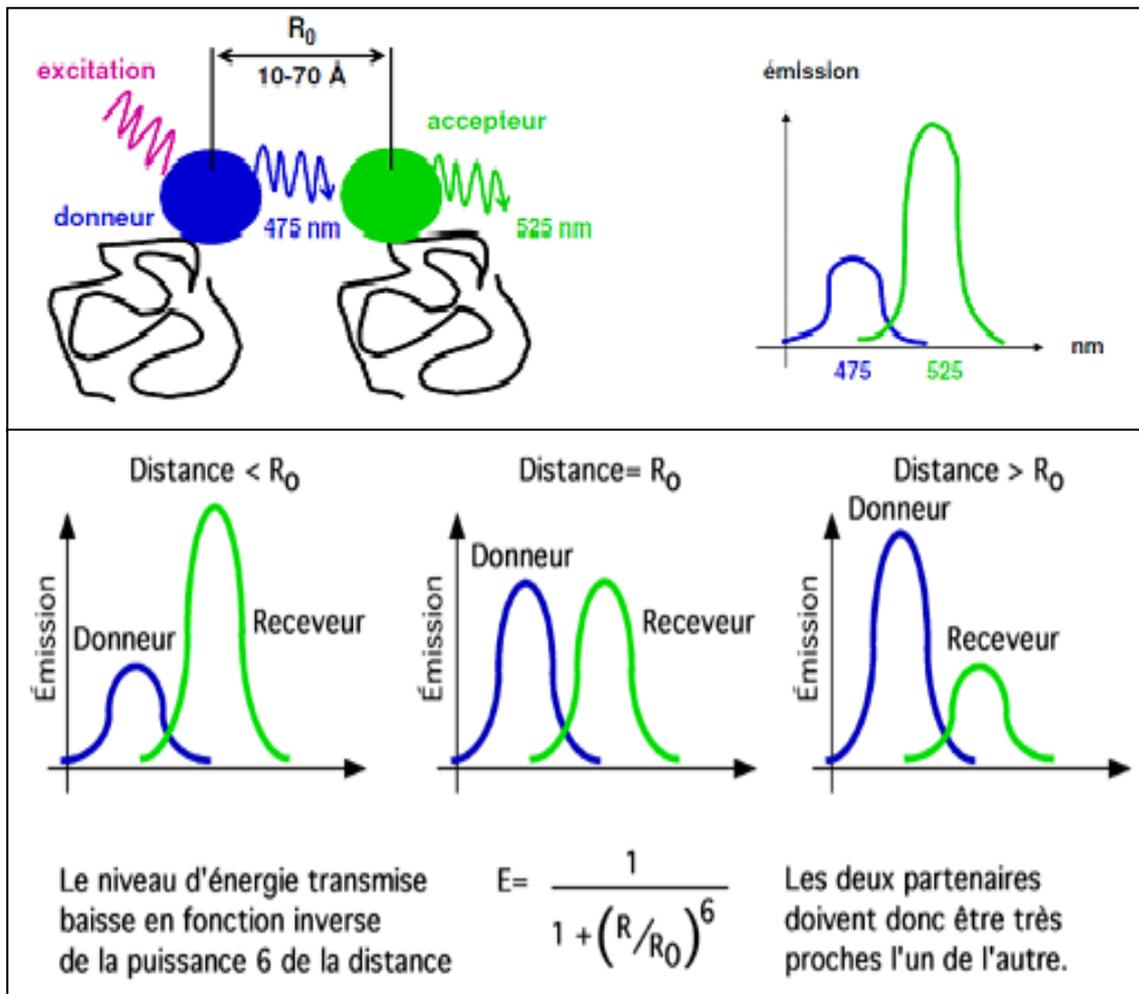


Figure 7: Les résultats obtenus de l'étude de l'interaction entre deux protéines par la FRET.

I.2.5. SPR (Surface plasmon resonance)

Le principe de fonctionnement de la SPR est d'enregistrer, en continue, à la surface d'une lamelle réactive (appelée « sensor chip »), la modification de résonance induite par toute interaction moléculaire. Cette modification est directement proportionnelle à la masse de molécule liée et à sa quantité fixée sur le chip (Zhao *et al.*, 2013).

Le système de mesure est composé de trois éléments :

-Le sensor chip : il comprend une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé sur lequel on couple de façon covalente la première molécule impliquée dans la réaction que l'on veut étudier.

Le couplage peut se faire par les groupements amines, par les sucres ou par les groupements thiols selon des procédés de chimie classique.

-La microplaque fluide : Elle contrôle l'injection (de 5 à 300 microlitres) et le débit (de 1 à 100 microlitres/min) des réactifs à la surface du sensor chip.

-L'unité optique : Une lumière polarisée est envoyée sur un prisme de verre, en contact direct avec la lamelle de verre du sensor chip. L'appareil mesure et enregistre les changements de l'indice de réfraction générés par un faisceau de lumière polarisée dirigée vers la face opposée de la feuille d'or lors du processus d'association et de dissociation de la protéine immobilisée A et de son ligand B. Les signaux obtenus, mesurés en unités arbitraires (unités de résonance ou RU) sont proportionnels à la masse de B absorbée à la surface (Figure 8).

Le graphe enregistré est appelé « sensogramme ». Il est composé de trois phases : phase d'adsorption, phase de désorption et phase de régénération (Villalobos *et al.*, 2007).

Cette technique est utilisée dans des détecteurs biologiques immunitaires. Elle permet une mesure directe en temps réel ne nécessitant pas de marquage du ligand.

L'inconvénient d'application de la méthode est que cette dernière nécessite une étape d'immobilisation et un phénomène de transport dans la matrice, d'où perturbation de l'équilibre.

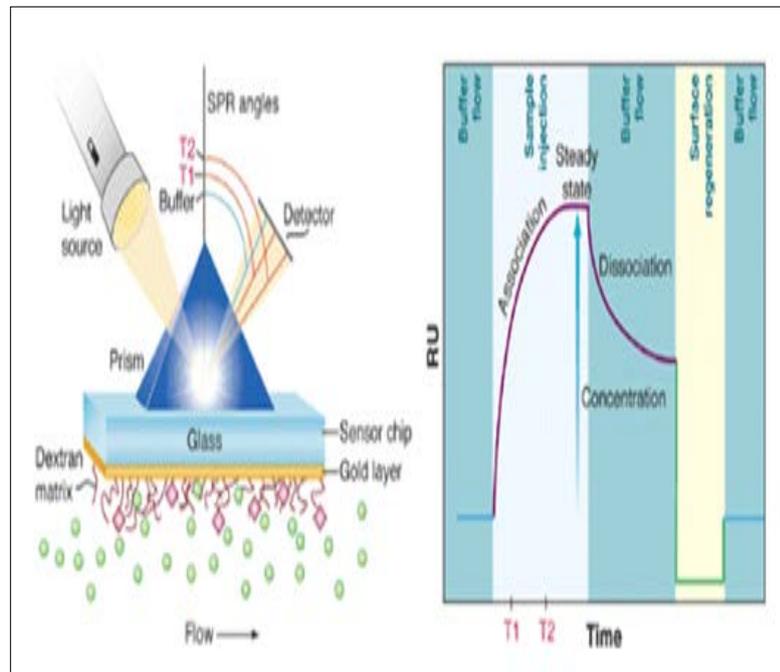


Figure 8: Le système de la SPR (Villalobos *et al.*, 2007).

I.2.6. Calorimétrie isotherme à titration

La calorimétrie isotherme à titration, ITC (*Isothermal titration calorimetry*) est une technique quantitative, elle permet de mesurer les interactions de substance entre elles. Quand deux molécules se lient, il y a génération ou absorption de la chaleur. La mesure directe de cette chaleur (ΔH) nous donne les valeurs de constantes de liaison, la stœchiométrie de la réaction, la variation de l'énergie de Gibbs (ΔG) et la variation d'entropie qui peuvent être déterminées en utilisant la relation :

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \text{ (Pierce et al., 1999).}$$

Cette technique fournit ainsi un profil thermodynamique complet de l'interaction moléculaire dans une seule expérience. Ces données thermodynamiques, enthalpie (ΔH) et entropie (ΔS) serviront à identifier les forces qui interviennent dans la formation du complexe et le mécanisme d'action. En plus, la thermodynamique fournit des informations sur les changements de conformation et les types d'interaction : hydrogène, hydrophobe et interaction charge-charge. Cette information est utilisée pour décrire la fonction et le

mécanisme au niveau moléculaire (Pierce *et al.*, 1999; Jelesarov et Bosshard, 1999) (Figure 9).

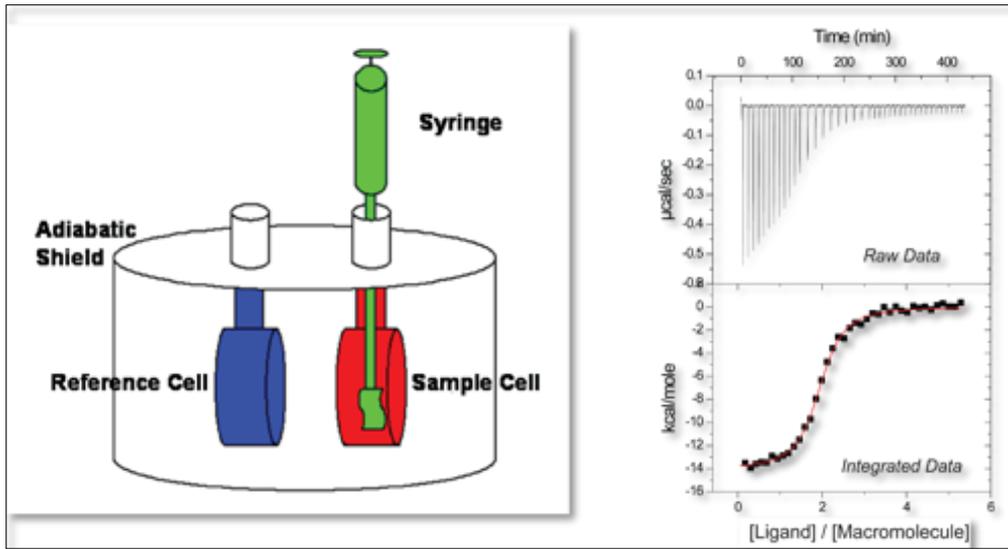


Figure 9: Le système ITC (Jelesarov et Bosshard, 1999).

L'ITC est composée de deux cellules identiques constituées par de matériaux chimiquement inertes présentant des propriétés d'une conductivité hautement efficace entourés par une enveloppe adiabatique.

Les mesures consistent à évaluer en fonction du temps la quantité d'énergie nécessaire pour maintenir des températures égales entre les cellules échantillon et référence. La différence d'énergie enregistrée par rapport à la cellule de référence est rapportée sur un thermogramme (Jelesarov et Bosshard, 1999) (Figure 9).

I.2.7. Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique permet l'observation du comportement de macromolécules en solution. Cette technique permet de caractériser des interactions entre macromolécules biologiques (complexes protéine-protéine, complexes acides nucléiques-protéine, protéines oligomériques) (Laudet *et al.*, 2007).

Les molécules sont soumises à une force centrifuge et leur sédimentation est directement mesurée pendant la centrifugation par un système optique, constitué d'une source lumineuse (lampe au xénon) et d'un monochromateur. La densité optique des échantillons est mesurée de 230 à 600 nm, en fonction de la distance radiale et à différents temps.

Les paramètres tels que la température, la vitesse et l'acquisition des données sont contrôlés par ordinateur. Deux types de mesures peuvent être entrepris: les mesures de la vitesse de sédimentation et celles de l'équilibre de sédimentation. Le premier type de mesure permet de déterminer un certain nombre des paramètres hydrodynamiques: coefficients de sédimentation, de diffusion et de friction. Le second type de mesures permet de déterminer la masse moléculaire des macromolécules et les constantes d'association-dissociation de complexes (Lebowitz *et al.*, 2002) (Figure 10).

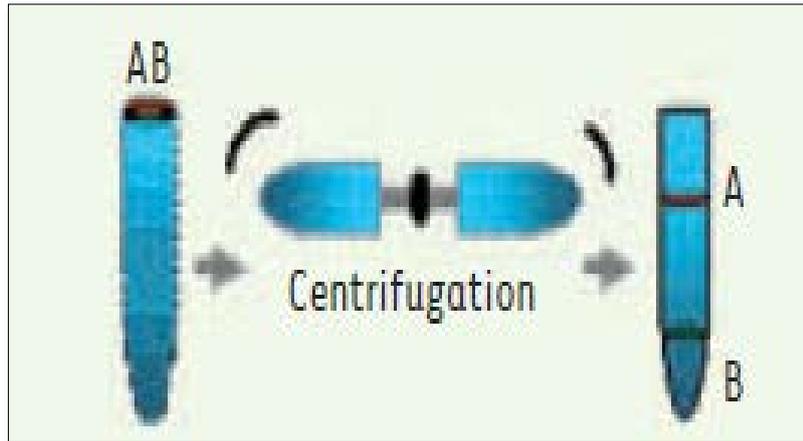


Figure 10: Ultracentrifugation (Laudet *et al.*, 2007).

I.2.8. Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation est la méthode principale d'étude des interactions protéiques puisqu'il est possible d'utiliser des protéines endogènes, marquées avec une étiquette (« tag ») et/ou surexprimées.

Cette technique repose sur le fait que lors de l'immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique, les protéines qui sont associées à la protéine d'intérêt par des interactions protéine-protéine sont également précipitées.

A partir d'un lysat cellulaire traité ou non, la protéine d'intérêt est immunoprécipitée avec un anticorps spécifique lié à des billes de protéine A ou G couplées à de la sépharose. Les conditions étant non dénaturantes, toutes les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt vont être aussi précipitées.

Après lavages, les complexes protéiques sont dénaturés et les partenaires d'interaction sont analysés sur gel dénaturant d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie du Western blot, spécifique de la protéine cible supposée (Figure 11) (Masters, 2004).

Les protéines partenaires de la protéine d'intérêt peuvent alors être identifiées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques.

Avantage :

- Facile à mettre en œuvre.
- Protéine appât native.
- L'affinité Ag/Ac est généralement très forte.
- Possibilité de faire des lavages à forte force ionique.

Inconvénients :

- Reconnaissance de l'épitope pas toujours possible.
- Difficile à mettre en œuvre pour les protéines membranaires.
- Protéine A ou protéine G sépharose selon l'origine de l'Ac.
- Présence de l'anticorps sur le gel SDS-PAGE.
- Si la quantité d'appât est trop faible, la quantité de complexe isolé sera insuffisante pour l'identification.
- Possibilité d'évaluer les contaminants non-spécifiques (protéome de la bille) par analyse protéomique quantitative (expérience réalisée avec anticorps spécifique versus expérience réalisée avec anticorps non spécifique).

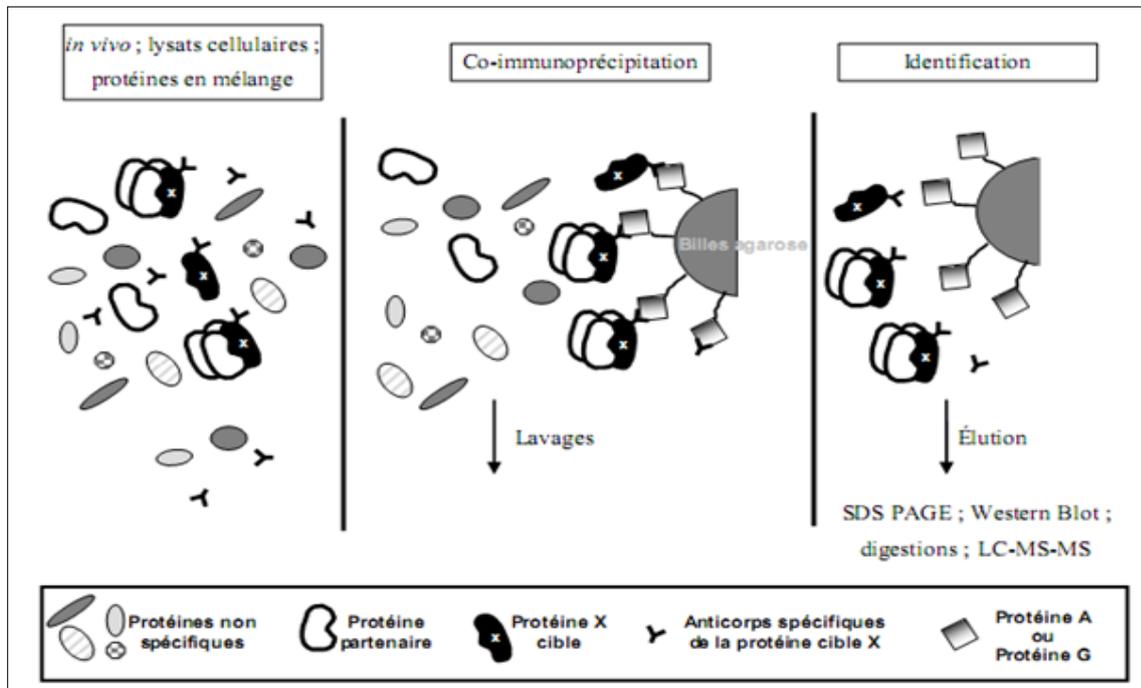


Figure 11: Co-immunoprécipitation (Masters, 2004).

Le complexe protéine 1/protéine 2 présent dans le lysat cellulaire est hybridé avec l'anticorps anti-protéine 1 (Y) puis précipité par fixation de billes de sépharose (●) à l'anticorps anti-protéine 1. La présence de la protéine 2 liée à la protéine 1 est analysée par western blot.

I.2.9. Purification par affinité par l'intermédiaire d'étiquettes

La purification par affinité consiste à fixer sur un support la protéine cible par l'intermédiaire de son étiquette. On introduit à une des extrémités de la séquence codante de X une étiquette qui peut être reconnue par un anticorps commercial. Ainsi, si on utilise une étiquette portant l'épitope FLAG de Sigma, on utilisera un anticorps anti-FLAG pour récupérer le complexe X-Y; si on utilise une étiquette GST (*glutathione-S-transférase*) on se servira de glutathione-sepharose, sans anticorps, puisque la GST se lie spontanément à la glutathione (Figure 12). Si on utilise une étiquette de six histidines, on pourra utiliser des billes de sepharose Ni-NTA (Nguyen et Goodrich, 2006).

Variantes :

- fixation préalable de la protéine de fusion sur la colonne de Glutathion sépharose
- autres étiquettes : 6His, Streptavidine, HaloTag,

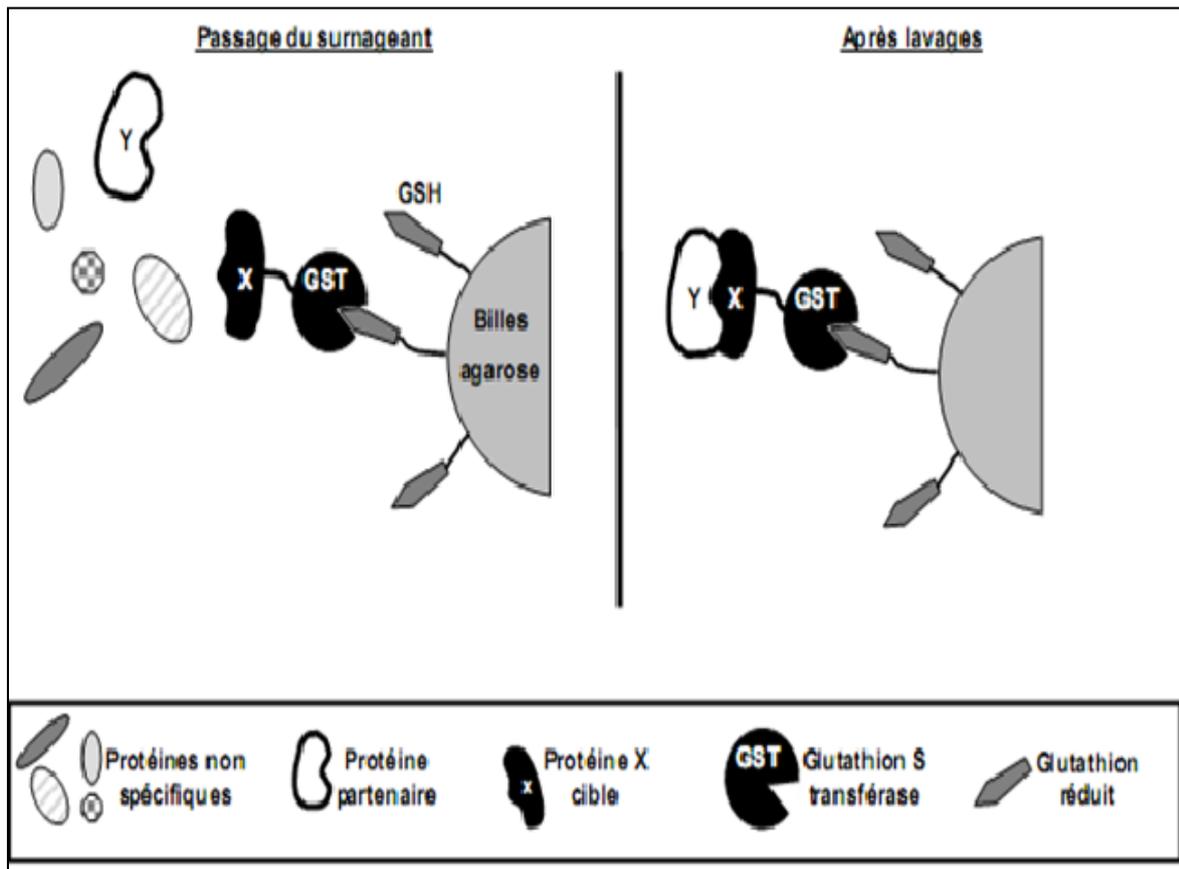


Figure 12: Représentation schématique du principe du GST-pulldown (Nguyen et Goodrich, 2006).

Avantages :

-Simple et rapide à mettre en œuvre.

Inconvénients :

-Fait en dehors du contexte cellulaire.

-La protéine appât est une protéine recombinante.

-L'étiquette peut empêcher des interactions.

-L'étiquette peut favoriser des interactions.

-Il faut valider les interactions mises en évidence par une autre technique in vivo.

I.2.10. Technique TAP-TAG (*Tandem affinity purification by tag*).

Dans cette approche, ce sont les complexes présents dans la cellule d'intérêt qui sont extraits puis analysés. De ce fait, l'influence des modifications post-traductionnelles est prise en compte. Cette technique permet de déterminer des complexes protéiques à l'échelle de cellules entières.

Méthode : 2 étapes de purification par affinité

Conditions d'élution douces.

Pas de surproduction de la protéine étiquetée.

- Etiquette TAP : Calmodulin Binding Peptide (5kDa)
 - Site de coupure par la protéase TEV
 - 2 domaines de fixation aux IgG de la protéine A (20 kDa)
- Variante: étiquette SP: Calmodulin Binding Peptide (5kDa)
 - Site de coupure par la protéase TEV
 - 3 répétitions de l'épitope Flag

Il s'agit de créer une protéine de fusion avec un morceau conçu à l'extrémité, le tag TAP qui consiste en 3 composés. Du peptide de liaison à la calmoduline (CBP) à l'extrémité N-terminal, suivi par un site de clivage de la protéase du virus du tabac (TEV protéase) et de la protéine A, qui se lie étroitement aux IgG. L'ordre relatif des modules de la balise est important parce que la protéine A doit être à l'extrémité de la protéine de fusion de sorte que l'ensemble du complexe peuvent être récupérées en utilisant une matrice IgG. La protéine d'intérêt et le tag TAP se lient d'abord à billes recouvertes d'IgG, le tag TAP sera décomposé par TEV protéase. Après deux colonnes d'affinité la protéine d'intérêt liée à ses partenaires est éluée par chélation du calcium utilisant l'EGTA (Figure 13) (Kaiser *et al.*, 2008).

Avantages:

- Simple et rapide à mettre en œuvre.
- Possibilité de faire des approches globales.
- Haut degrés de purification.
- Possibilité de rechercher des complexes mineurs.

Inconvénients :

- Difficile à mettre en œuvre pour les protéines membranaires.
- Difficile de faire des approches globales en dehors de la levure.
- La protéine appât est une protéine recombinante :
- L'étiquette peut empêcher des interactions.

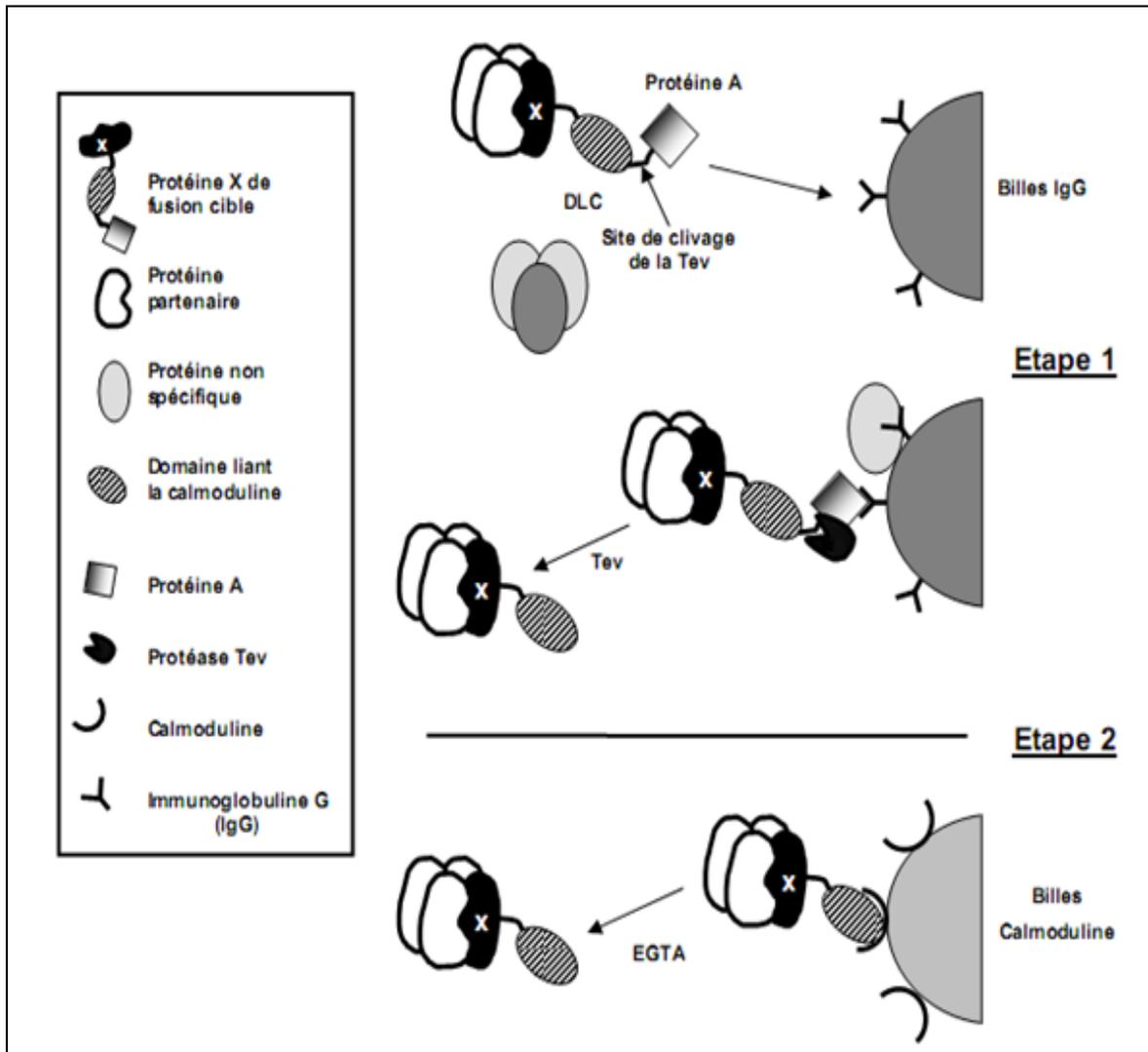


Figure 13: Principe de purification par affinité en tandem (Kaiser *et al.*, 2008).

I.2.11. Phage Display

La méthodologie du phage display, c'est à dire la présentation de peptides à la surface de phages filamenteux (Figure 14), est devenue un très puissant outil de synthèse combinatoire et de sélection des peptides. La présentation de peptides à la surface de phages filamenteux a été démontrée pour la première fois par Georges Smith en 1985, mais il a fallu attendre quelques années pour comprendre l'importance de ce puissant outil de sélection (Arap, 2005 ; Chin *et al.*, 2016).

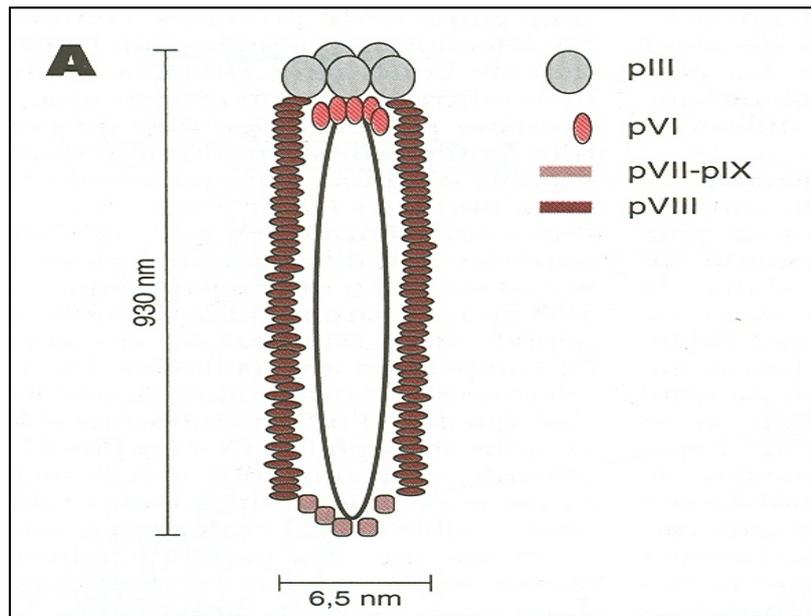


Figure 14: Représentation schématique du bactériophage filamenteux fd.

Le phage présente une longueur de 930 nm et un diamètre de 6,5 nm. Son ADN est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2 700 monomères de protéine pVII. Une extrémité de la particule présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI. Les protéines pIII exposées sur la tête du phage sont impliquées dans l'attachement aux pili de la bactérie hôte qui précède l'infection. Les protéines pVIII composent le manteau du phage.

Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface, en fusion avec le domaine amino-terminal de leurs protéines pIII ou pVIII, des molécules telles que des peptides aléatoires, des fragments d'anticorps (Fab, Fv, ou scFv single chain Fv) ou d'autres protéines. Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible (Figure 15) (Weichel *et al.*, 2008). Cette approche consiste à cloner le gène d'intérêt, en fusion avec un gène exprimant une protéine de la capsid du phage, dans un plasmide (phagémide) ou dans le génome du bactériophage. Lors de l'expression de la protéine de fusion, les peptides ou les protéines d'intérêt sont alors présentés en surface de

la capside. Le nombre de copies de ligand par phages peut aller de 1 à 2700. Des banques de peptides aléatoires ou de domaines de protéines, mutés ou non de façon aléatoire sur un ou plusieurs résidus, exposés à la surface des phages, sont ainsi obtenues. Ces banques sont sélectionnées sur des protéines cibles immobilisées sur microplaques

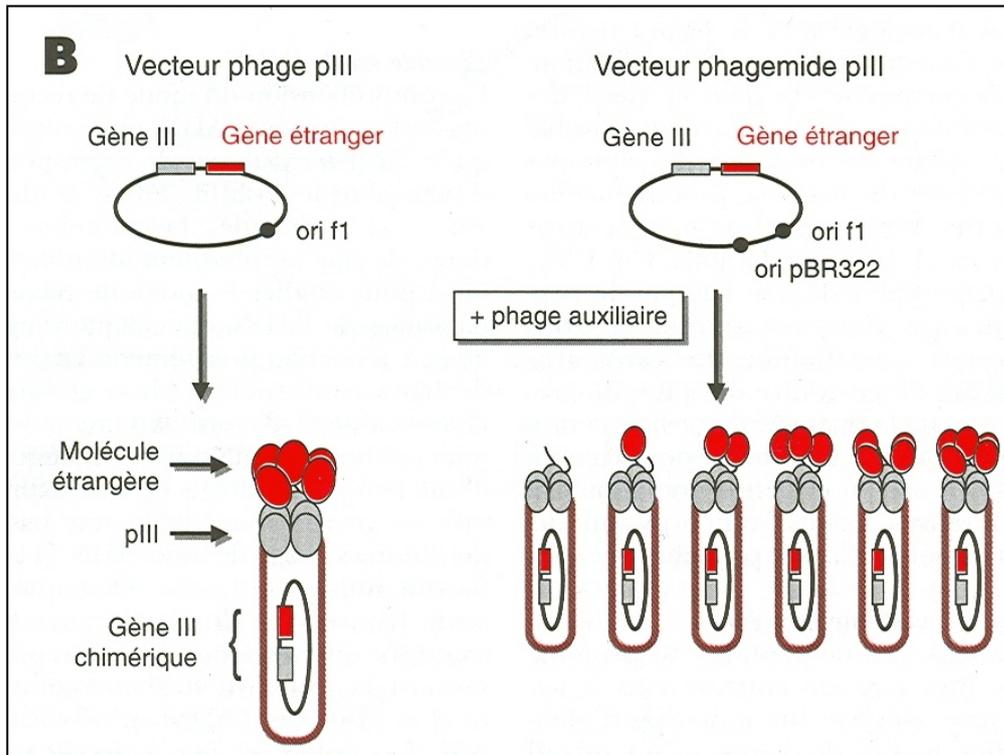


Figure 15: Exemple d'expression à la surface d'un vecteur phage ou d'un vecteur phagemide (Weichel *et al.*, 2008).

Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phage pIII, toutes les protéines pIII du phage sont fusionnées à la molécule étrangère. Dans le cas d'une expression à la surface d'un vecteur phagemide pIII, la protéine pIII du phagemide fusionnée à la molécule étrangère et la protéine pIII sauvage codée par le phage auxiliaire sont exprimées dans la même cellule. Plusieurs combinaisons d'expression sont possibles et le nombre de molécules étrangères exprimées en surface est variable.

Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries (Figure 16). Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après trois à six tours de sélection-amplification, l'ADN des phages sélectionnés est analysé pour donner la séquence protéique correspondante. Des pressions

de sélection peuvent être introduites à chaque tour ainsi qu'une diversité additionnelle par mutagenèse (Figure 17) (Georgieva et Konthur, 2011).

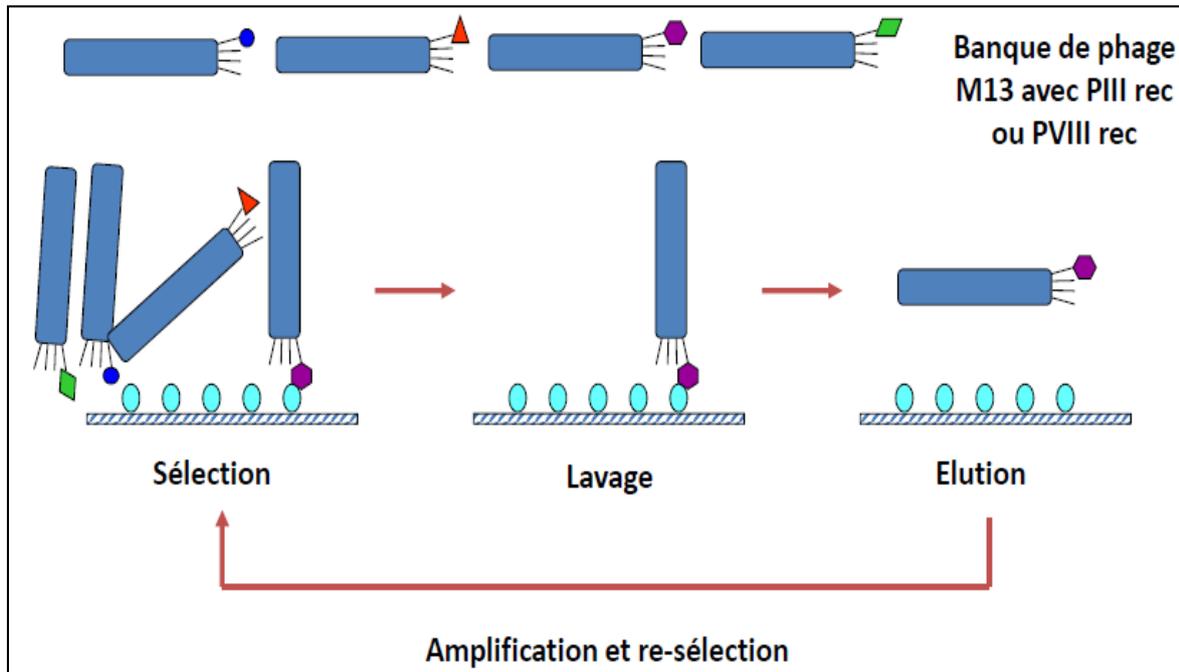


Figure 16: Le phage display Banque de phage M13 avec PIII rec ou PVIII rec (Georgieva et Konthur, 2011).

Avantages:

- Simple et rapide à mettre en œuvre.
- Très sensible (amplification).

Inconvénients:

L'inconvénient repose en la nature de virus non lytique. Ainsi, toutes les protéines avant d'être incorporées dans la capsid doivent être exportées dans le périplasme et traverser la membrane bactérienne.

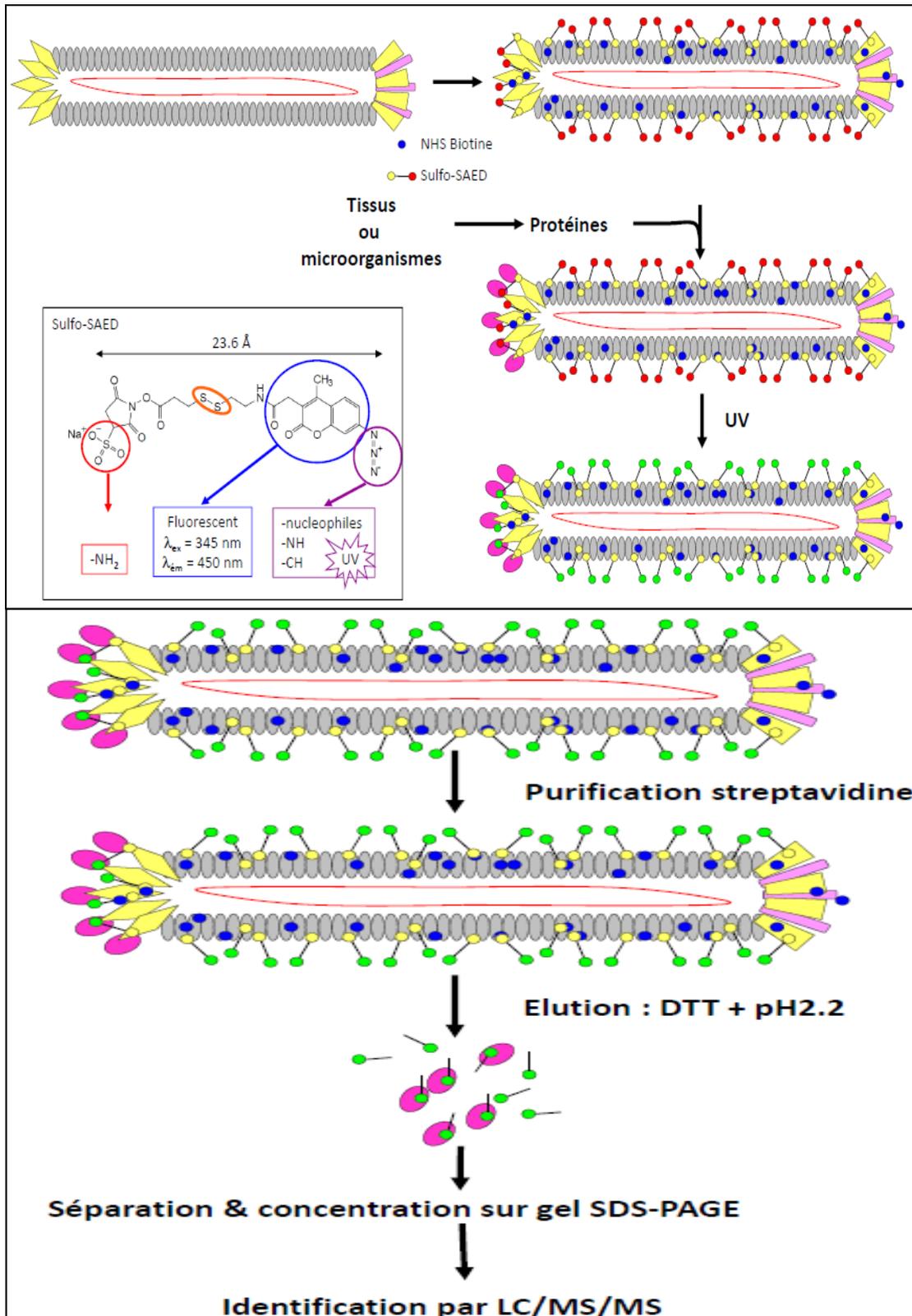


Figure 17: Les étapes de la méthode phage Display (Chin *et al.*, 2016)

I.2.12. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN repose sur l'analyse des propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Les noyaux des atomes engendrent l'existence d'un moment cinétique propre au noyau appelé spin. Le spin prend comme valeurs 0, 1/2, 1, 3/2, et ainsi de suit. Cette quantification du spin implique celle du moment magnétique μ qui lui est associé. Lorsque l'échantillon est soumis à un champ magnétique, à chacune de ces orientations correspond un niveau d'énergie. Pour le proton dont le nombre de spin vaut 1/2, il existe deux niveaux d'énergies, avec un léger excès de population sur le niveau d'énergie le plus bas. Ce sont les transitions entre ces niveaux qui constituent le phénomène de résonance magnétique nucléaire (Ochsenbein et Gilquin, 2007). Par conséquent, la RMN mesure ainsi les variations des spins nucléaires des atomes interagissant lors de l'interaction des protéines (Leudet *et al.*, 2007).

Exemple : Interaction Bcl2-Bax

La découverte de molécules capables de sensibiliser des cellules résistantes à l'apoptose est une stratégie attractive pour le développement de nouveaux agents anticancéreux. Certains membres de la famille des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL et Bcl-2 interagissent avec des protéines pro-apoptotiques appartenant à la même famille, telles que Bak ou Bax. Des études en RMN ont révélé que ces interactions reposent sur un domaine BH₃ (*Bcl-2 homology domain 3*) présent dans Bax. Un peptide de 16 acides aminés (*BH₃ peptide*) dérivé du domaine BH₃ de Bax forme une hélice α qui interagit avec une poche hydrophobe de Bcl-xL (Sattler *et al.*, 1997) et inhibe l'interaction Bcl-xL-Bax (Figure 18.A). Le criblage d'une banque de 16 320 petites molécules chimiques a, par la suite, permis d'identifier deux composés capables d'inhiber la liaison du peptide BH₃ à Bcl-2. L'un de ces composés, ABT-737, bloque l'hétérodimérisation entre Bax et Bcl-2 (Figure 18.B) ; il induit l'apoptose de cellules transformées et sensibilise les cellules tumorales surexprimant Bcl-2 aux chimiothérapies (Degterev *et al.*, 2001). Par ailleurs, d'autres composés chimiques ciblant cette interaction provoquent la régression de tumeurs du poumon dans un modèle de xénogreffe chez la souris (Oltersdorf *et al.*, 2005).

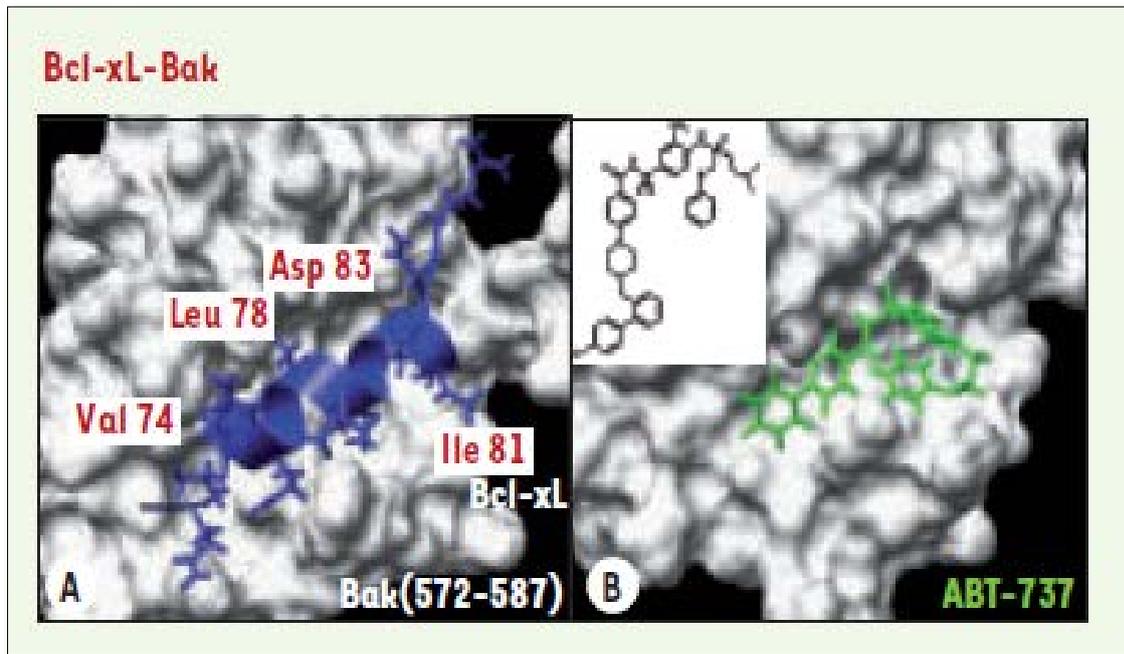


Figure 18: Interaction Bcl-xL-Bak (Leudet *et al.*, 2007).

A. Quatre résidus de Bak représentent des hot spots pour son interaction avec Bcl-Xl. **B.** Une molécule chimique (ABT-737) inhibe l'interaction Bcl-xL-Bak avec une IC_{50} de 1nM.

I.2.13. Cristallographie

La détermination de la structure atomique d'un cristal s'effectue le plus souvent par diffraction des rayons X ou des neutrons, dont les longueurs d'onde sont de l'ordre des distances qui séparent les plans atomiques de la structure cristalline. La cristallographie des protéines par rayons-X permet d'étudier la conformation tridimensionnelle des protéines et de pouvoir ainsi mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leurs liaisons avec d'autres molécules présentes dans la cellule. L'analyse des rayons X projetés sur les protéines cristallisées permet de reconstituer le complexe entre protéines (Dauter *et al.*, 2005)(Figure 19).

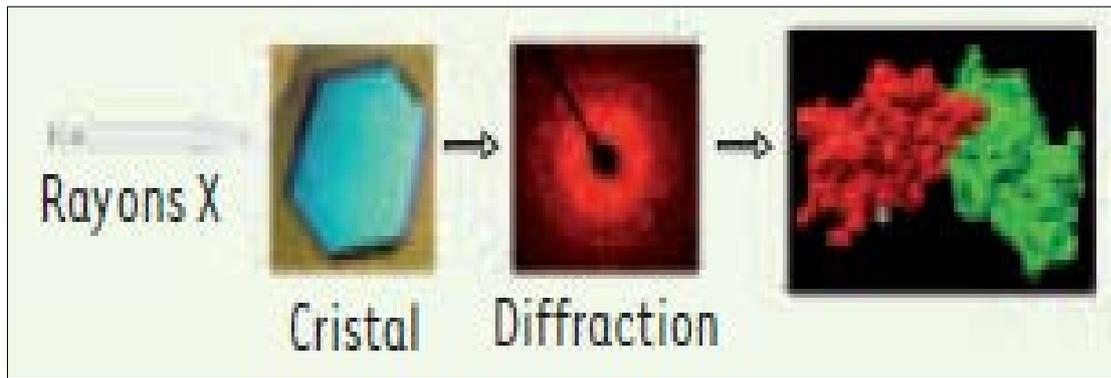


Figure 19 : Principe de la cristallographie (Leudet *et al.*, 2007).

Exemple : Interaction Smac-XIAP (*second mitochondria-derived activator of caspases-X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*).

Les protéines de la famille des IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) sont des inhibiteurs endogènes des caspases ; elles sont surexprimées dans de nombreux cancers, où elles contribuent aux mécanismes de résistance à l'apoptose observée dans les cellules cancéreuses (Bilim *et al.*, 2003). Les IAP possèdent un domaine à doigt de zinc, appelé Bir (*Baculovirus inhibitory repeat*), qui est le site d'interaction avec Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*), une protéine mitochondriale activatrice des caspases au cours de l'apoptose (Du *et al.*, 2000). Un tripeptide non naturel dérivé de Smac inhibe son interaction avec XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*) (Figure 20.D). Ce type de peptides sensibilisent des cellules tumorales à l'apoptose induite par le facteur apoptotique TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et stimulent l'activité antitumorale de ce facteur dans un modèle de xénotransgreffe intracrânienne de gliome (Fulda *et al.*, 2002). Des études cristallographiques ont montré que seuls quatre acides aminés de Smac se fixent sur le domaine Bir de XIAP (Figure 20.C) et sont essentiels pour bloquer ses effets anti-apoptotiques (Liu *et al.*, 2000). Là encore, la conformation de ces quatre acides aminés au sein du complexe IAP-Smac a servi de support pour la synthèse rationnelle d'une molécule chimique capable, en se fixant avec une haute affinité à IAP, de promouvoir l'activation des caspases, en synergie avec le TNF α et TRAIL, et d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses humaines. Enfin, en raison de son interférence avec la signalisation TNF α -NF κ B ce « mime chimique » de Smac pourrait conduire au

développement d'agents thérapeutiques dans le cadre des pathologies de l'inflammation (Li *et al.*, 2004).

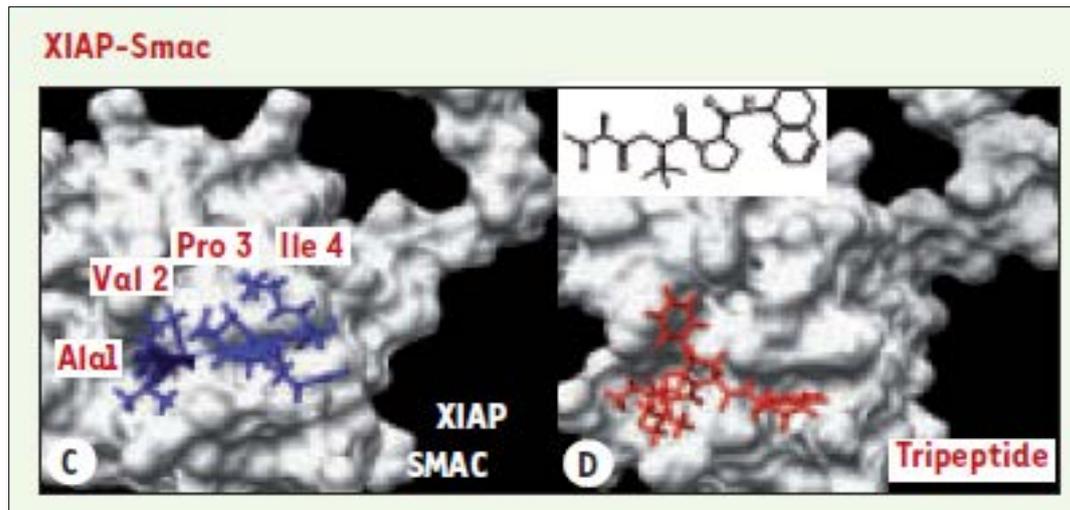


Figure 20: Interaction XIAP-Smac (Leudet *et al.*, 2007). *C.* La protéine Smac interagit avec XIAP via 4 résidus essentiels aminoterminaux, Ala₁, Val₂, Pro₃, Ile₄. *D.* Un tripeptide non naturel optimisé inhibe l'interaction avec une IC₅₀ de 5 nM.

CHAPITRE II

Techniques d'étude des interactions ADN-Protéines

II. Techniques d'étude des interactions ADN-Protéines

II.1. Interactions acide nucléique-protéine

Les acides nucléiques et les protéines sont les biomolécules les plus importantes pour la survie de l'organisme, car les premières portent l'information génétique et les autres permettent la régulation du processus de survie (Xiong et Sundaralingam, 2001).

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.2. Exemple d'interaction ADN-protéine

De très nombreuses protéines sont capables d'interagir avec l'ADN et interviennent dans les mécanismes de réplication, de transcription et de réparation de l'ADN (Luscombe *et al.*, 2000).

- Interactions protéines/acides nucléiques lors des contrôles de l'expression génétique
 - Régulation de la transcription chez les procaryotes

Régulation de l'opéron lactose: Interactions répresseur lacI et ADN, interactions de la Protéine activatrice des catabolite-Adénosine monophosphate cyclique (CAP-AMPC) et ADN (Campbell et Reece, 2004).

- Régulation de la transcription chez les eucaryotes

Fixation de protéines activatrices ou inhibitrices sur séquences régulatrices (ex.enhancers, silencers).

Fixation de protéines de courbure sur l'ADN pour rapprocher les séquences régulatrices éloignées du gène (Fixation par doigts à zinc, homéodomaine).

Modification des interactions entre les protéines histones et ADN par acétylation ou désacétylation ce qui modifie l'état de condensation de l'ADN plus ou moins propice à la transcription (Campbell et Reece, 2004).

- Infection virale et parasitisme de l'expression génétique de l'hôte

Interactions protéines virales / ADN cellulaire: cas de l'intégrase coupant l'ADN pour l'insertion de l'ADN viral, (inhibiteur de l'expression génétique de l'hôte).

Interactions protéines virales / génome viral : réplisase du Tobacco mosaic *virus* (VMT), transcriptase inverse du *Virus* de l'Immunodéficiência Humaine,(VIH) intégrases (ex du phage λ et du VIH), répresseurs (ex. λ) (Campbell et Reece, 2004).

II.3. Mécanisme d'interaction ADN-Protéine

La reconnaissance entre une protéine et un acide nucléique fait intervenir d'une part 4 bases et d'autre part 20 acides aminés. Ces interactions permettront (Figure 21) d'obtenir 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 (Luscombe *et al.*, 2001):

1. Des ponts salins formés entre les phosphates et les chaînes latérales d'acides aminés chargés positivement (N de la Lys, guanidinium de l'Arg, His protonée).
2. 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.
3. Des interactions d'empilement (stacking) impliquant les chaînes latérales des acides aminés aromatiques (Trp, Tyr, Phe, His voire le cycle indol des prolines) et les bases.

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

Si l'on considère les acides aminés et les nucléotides comme des objets isolés, on s'aperçoit que les ponts salins et les liaisons H sont mieux adaptés et probablement dominants. Si on considère maintenant l'ADN et l'ARN sous leur forme double hélice, de nombreux sites de formation de liaison H vont être masqués par l'appariement des bases en Watson-Crick.

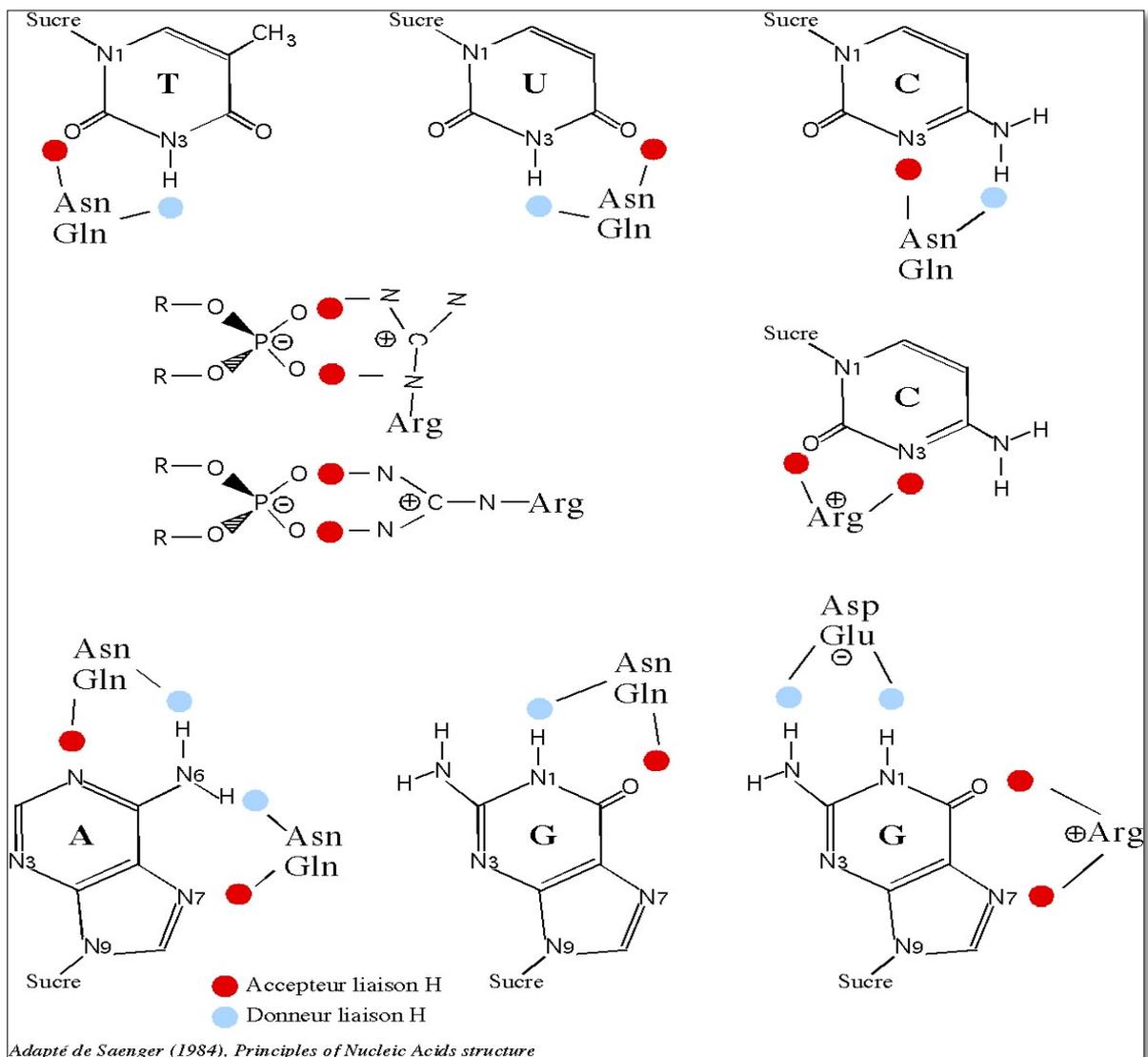


Figure 21: Types d'interactions ADN-Protéine (Sanger, 1984).

II.4. Motifs protéiques de fixation aux acides nucléiques

Les domaines protéiques interagissant avec l'ADN peuvent être classés en fonction de leurs organisations structurales tridimensionnelles (Luscombe *et al.*, 2000) comme suite:

II.4.1. 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 feuillets 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 (Figure 22) (Luscombe *et al.*, 2000).

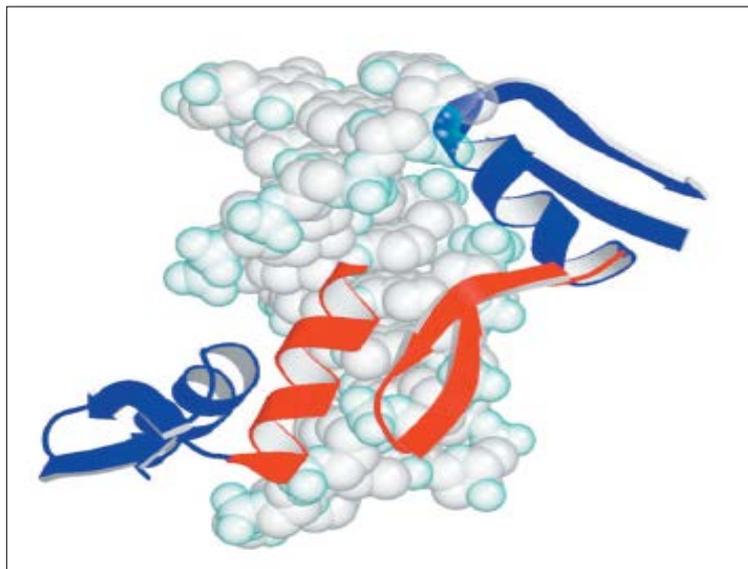


Figure 22: Le motif à doigts de zinc interagit avec l'ADN (Luscombe *et al.*, 2000).

II.4.2. 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, 4 (Bornberg-Bauer *et al.*, 1998; Hakoshima, 2014). Ce motif a une conformation d'une α hélicoïdale, ce qui facilite sa dimérisation et dans certains cas son oligomérisation (Figure 23). 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 (Hakoshima, 2014). 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)... (Bornberg-Bauer *et al.*, 1998).

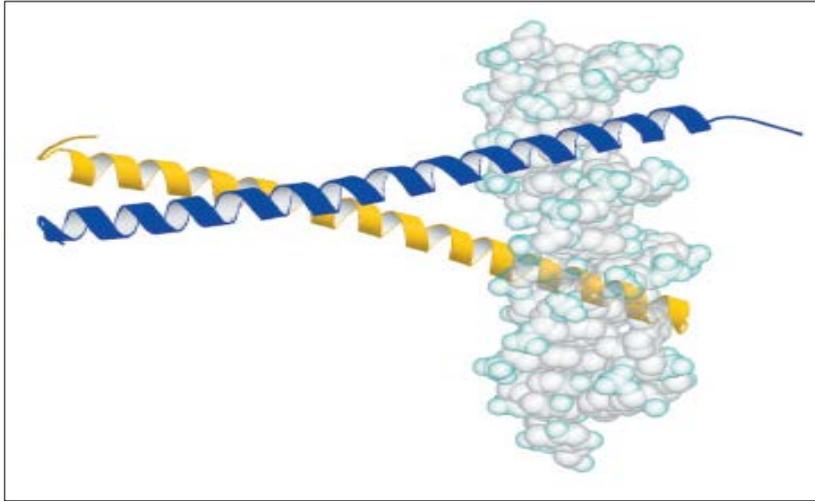


Figure 23: Le motif de leucine zipper interagit avec l'ADN (Luscombe *et al.*, 2000).

II.4.3. 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 (Figure 24) (Lodish *et al.*, 2005). Ce motif est stabilisé par des interactions de van der Waals entre les résidus hydrophobiques 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 (Massari et Murre, 2000).

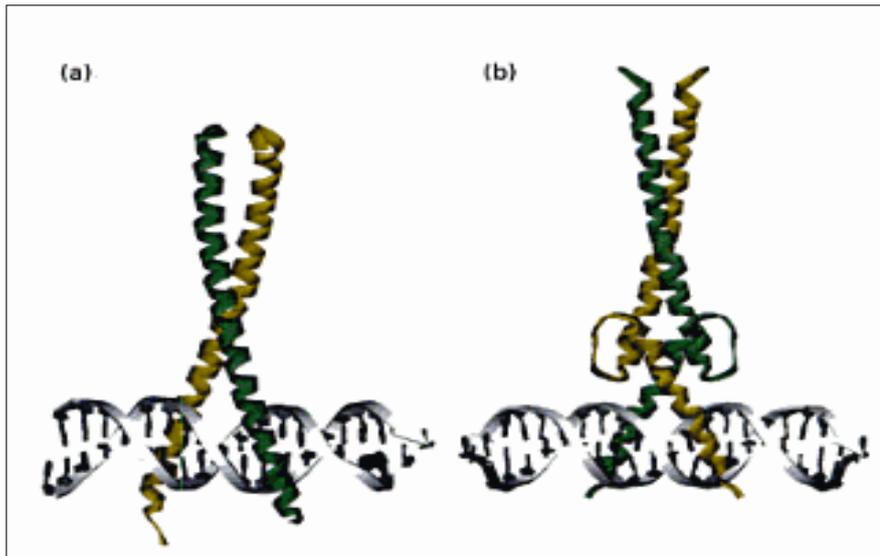


Figure 24: L'interaction des protéines homodimériques (a) le motif leucine zipper ; (b) le motif hélice boucle hélice (Lodish *et al.*, 2005).

II.2.4.4 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 (Struhl, 1989; Luscombe *et al.*, 2000). 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 (Figure 25) (Brennan et Matthews, 1989) et rarement aux petits sillons de l'ADN (Luscombe *et al.*, 2000). Ce motif forme des homodimères chez les procaryotes, bien qu'il forme des monomères ou hétérodimères chez les eucaryotes (Struhl, 1989; Luscombe *et al.*, 2000). Parmi les protéines présentées par ce motif on trouve le répresseur tryptophane d'*E. coli*, le cytochrome c peroxydase, le répresseur du phage 434... (Brennan et Matthews, 1989).

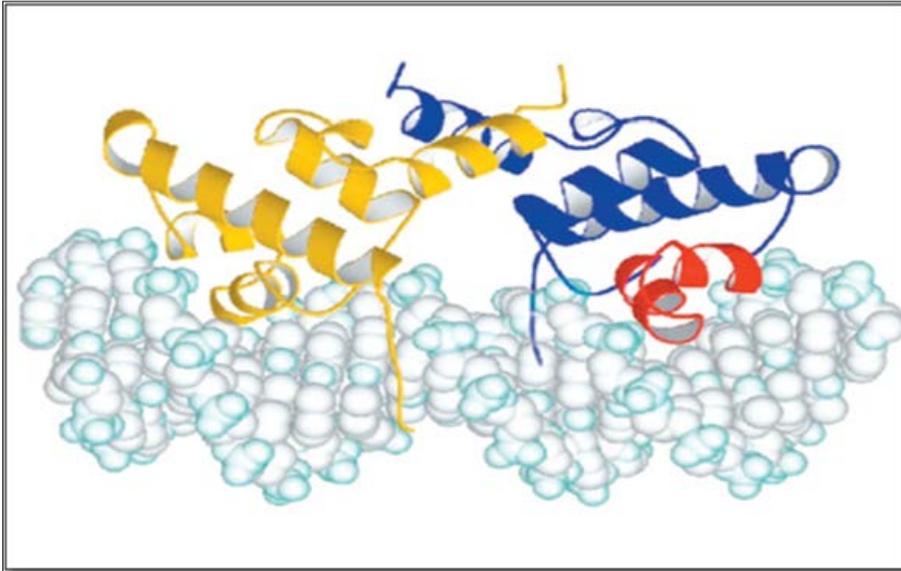


Figure 25: Une protéine de la famille des répresseurs appartient aux motifs hélice-tour-hélice, interagit avec l'ADN. Ce motif se lie à l'ADN sous forme de dimère, un monomère est en bleu et l'autre est en jaune ; c'est la région rouge qui interagit avec l'ADN (Luscombe *et al.*, 2000).

II.5. 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.

II.5.1. Techniques d'attache de filtre et décalage de mobilité

II.5.1.1. 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 26). 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 (Coombs et Pearson, 1978).

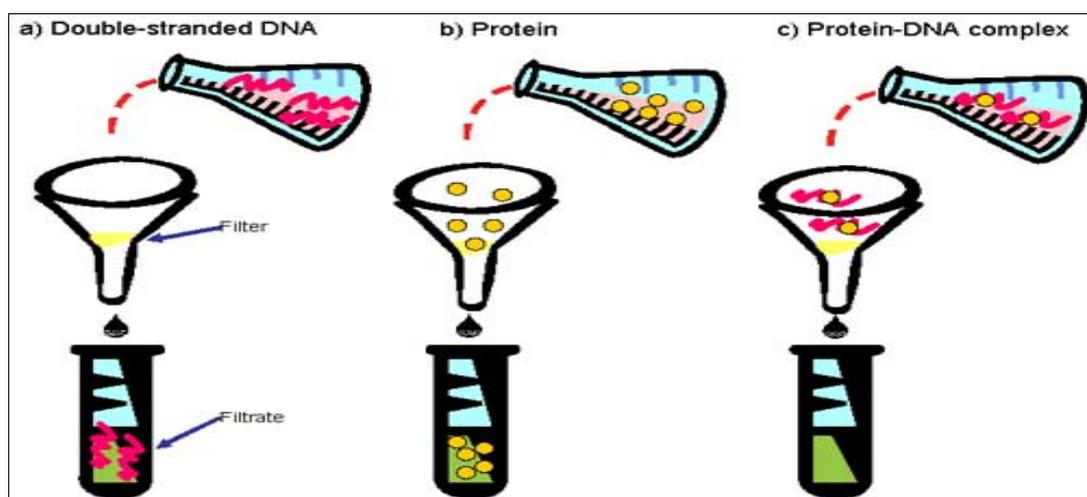


Figure 26: Technique attache de filtre (Coombs et Pearson, 1978).

II.5.1.2. 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 (Lane *et al.*, 1992) (Figure 27).

La variation de migration des duplexes (ou sondes) complexés aux protéines par rapport aux duplexes libres est suivie grâce au marquage radioactif au ³²P 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) (Lane *et al.*, 1992).

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 (Lane *et al.*, 1992).

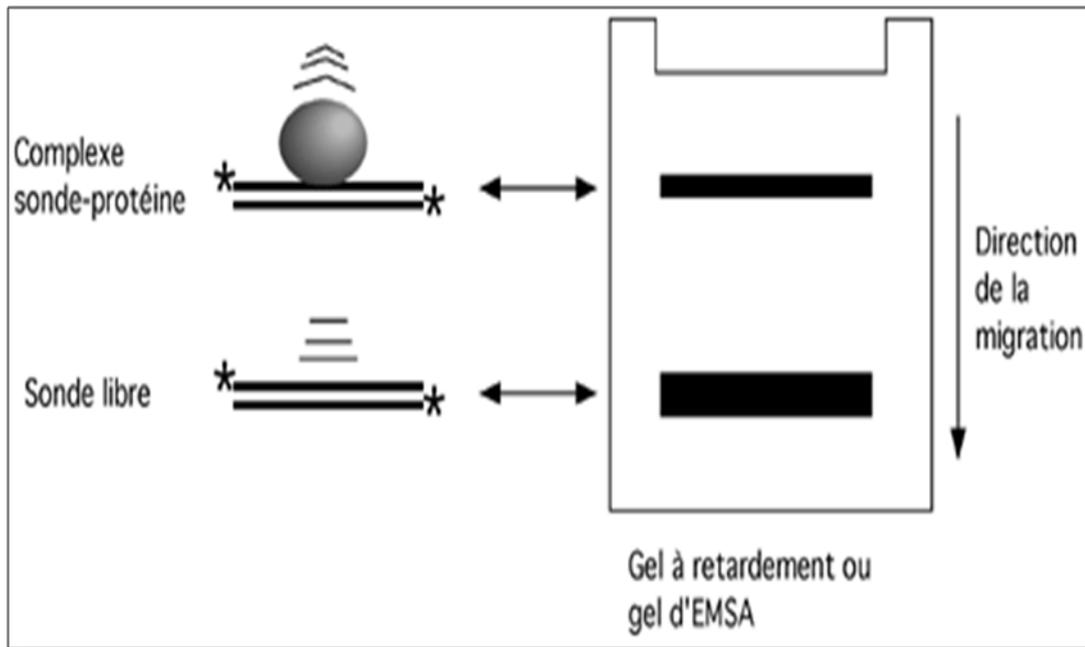


Figure 27: Technique de décalage de mobilité (Tsai *et al.*, 2012).

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* (Figure 28). 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.

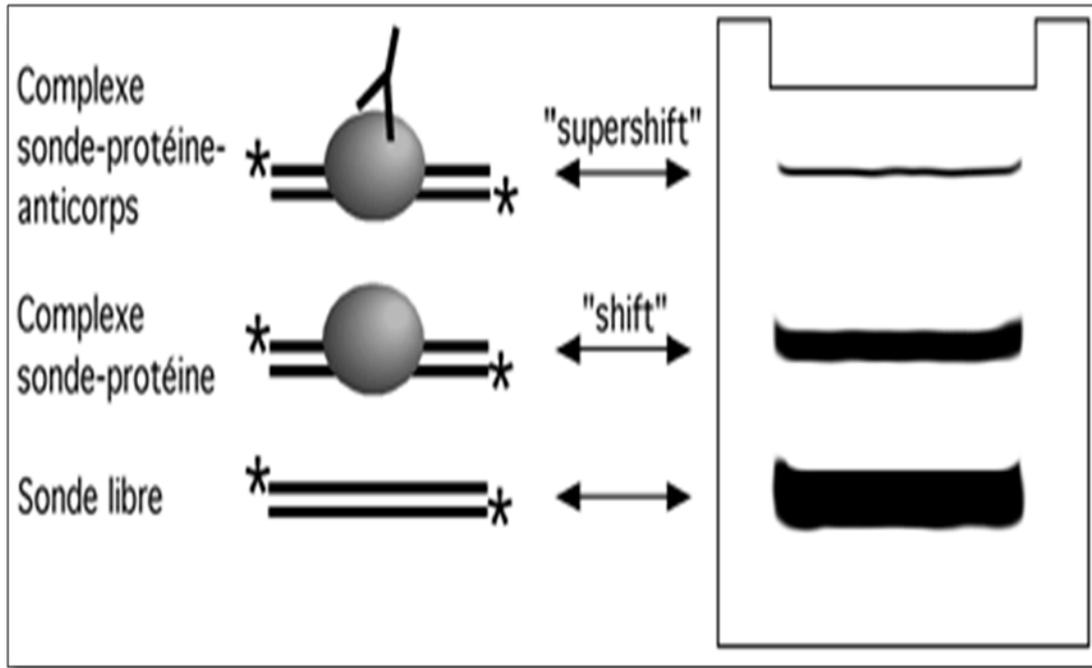


Figure 28 : Principe du schift et supersshift (Tsai *et al.*, 2012).

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 a 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:

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

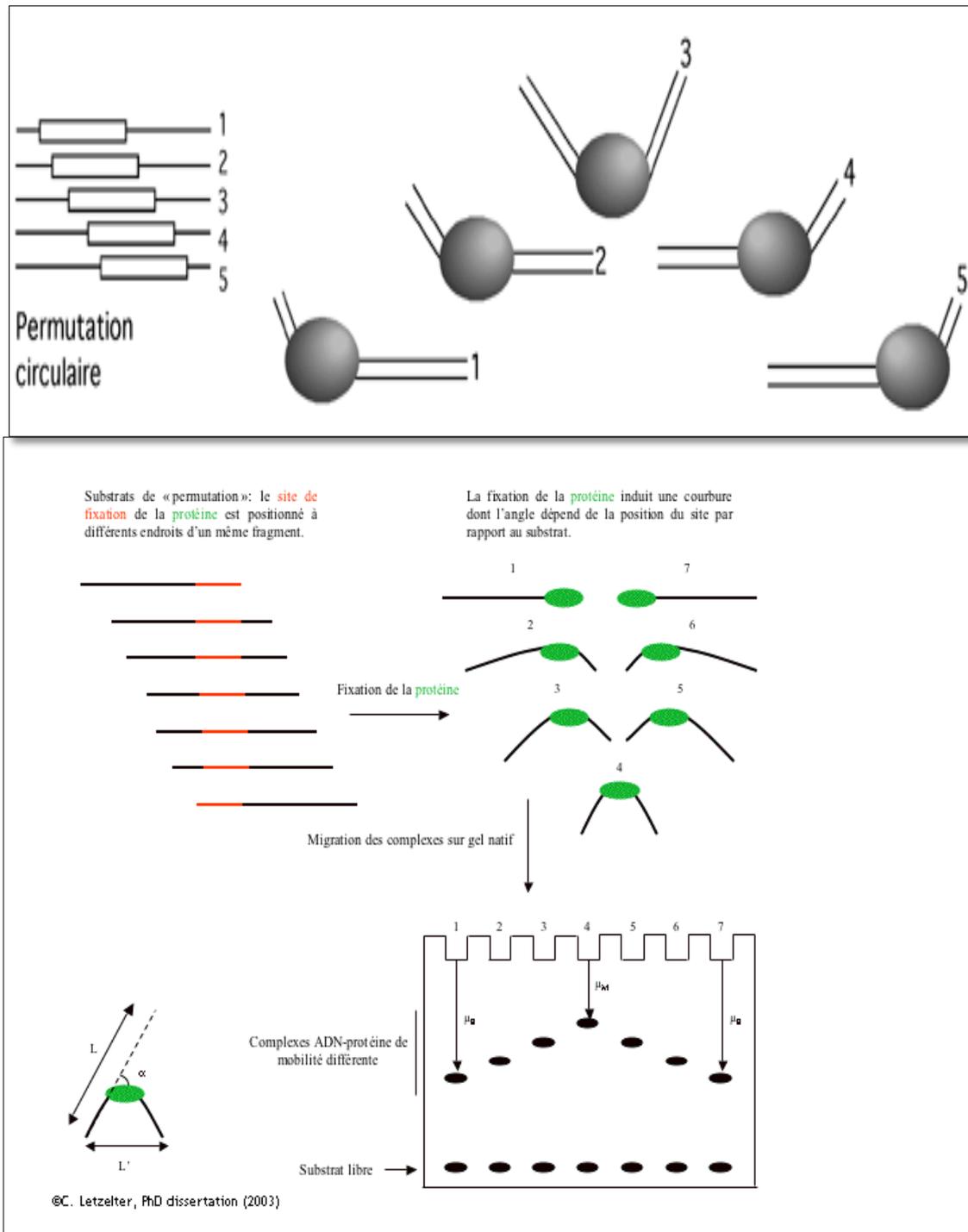


Figure 29 : Effet de la fixation de la protéine sur l'ADN (Qiu et Wang, 2009).

II.5.2 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 plus ou moins au hasard. Par conséquent, il apparaît comme une «échelle» de bandes et les sites protégés par des protéines n'ont pas de bandes correspondantes (Xiong et Sundaralingam, 2001).

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).

II.5.2.1. Sondes enzymatiques

L'ADNase I est le réactif le plus largement utilisé de l'empreinte car il ne possède pas une spécificité de séquence apparente (Xiong et Sundaralingam, 2001). Autres nucléases fréquemment utilisées dans les expériences d'empreintes 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 (Xiong et Sundaralingam, 2001).

- 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 (Brenowitz *et al.*, 1997). 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).

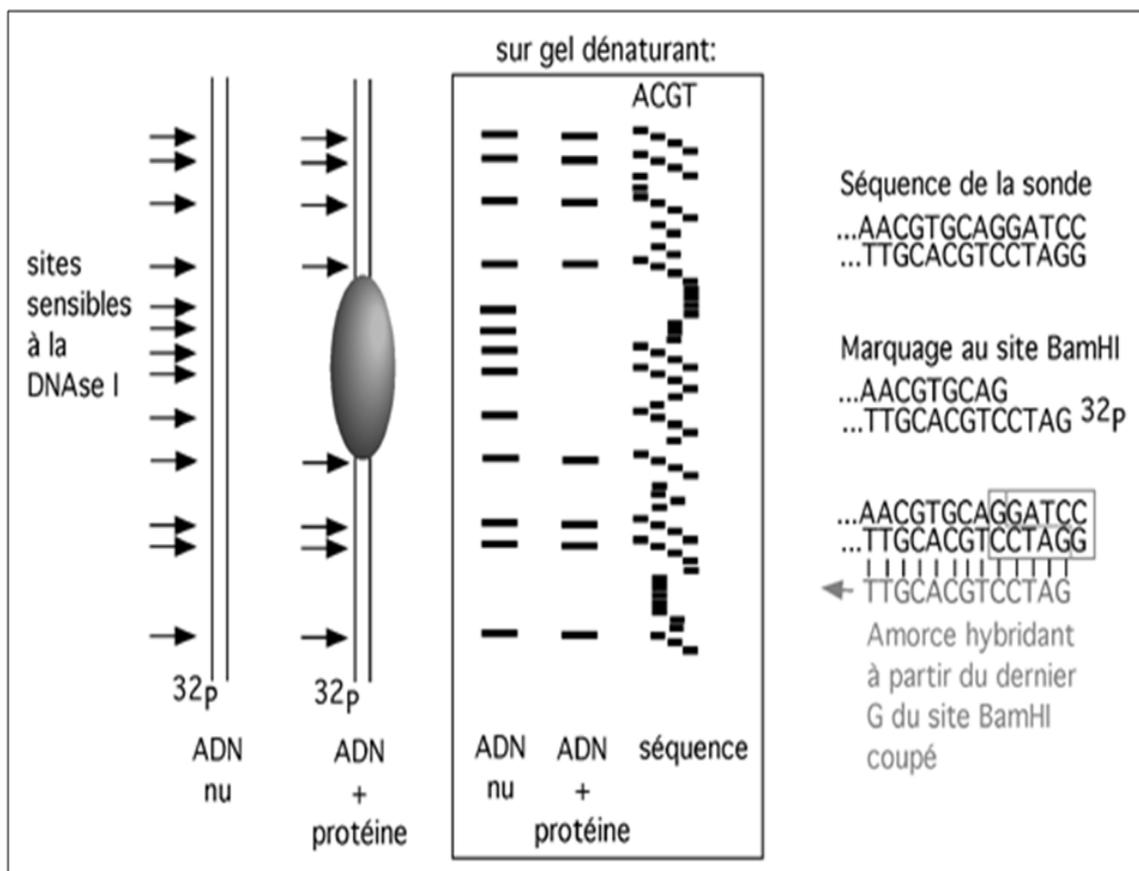


Figure 30: Caractérisation de l'interaction ADN-Protéine par ADNase I (Brenowitz *et al.*, 1997).

II.5.2.2. Sondes chimiques

Le DMS est la sonde chimique la plus utilisée pour les études d'empreintes. DMS méthyle facilement les guanines et les adénines en positions N₇ et N₃ respectivement (Figure 31). 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 (Ethylene diamine tetra-acetic acid) méthidium-propyle, et de l'EDTA de fer sont également des réactifs utiles dans ces expériences (Xiong et Sundaralingam, 2001).

- Empreinte au sulfate de diméthyle

C'est le même principe qu'en DNase footprinting (Tijerina *et al.*, 2007):

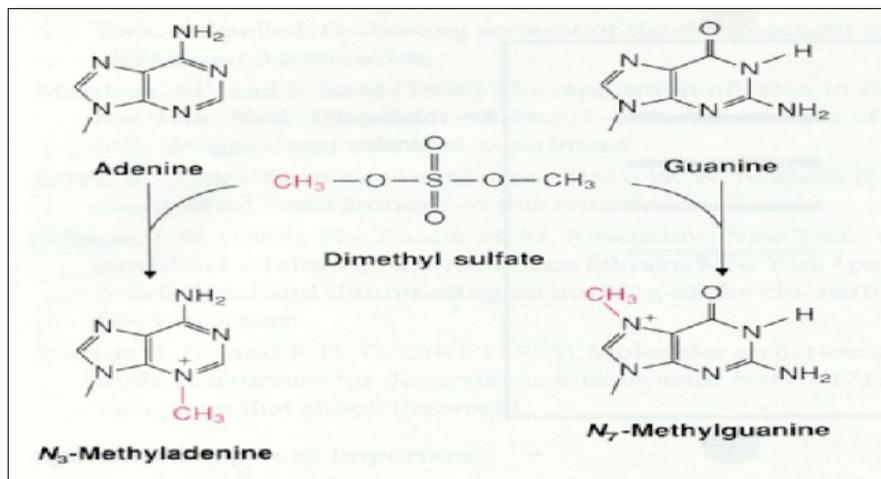


Figure 31: mode d'action du sulfate de diméthyle (inspiré de Tijerina *et al.*, 2007) .

- 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 (Nunoshiba *et al.*, 1999).

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).

II.5.2.3. 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 (Xiong et Sundaralingam, 2001).

- 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 32). 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 (Suter *et al.*, 2000).

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.

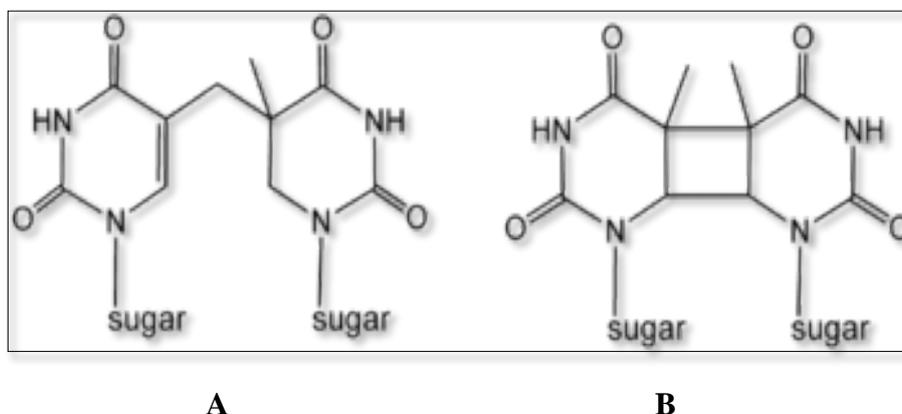


Figure 32: photoproduit A: 6-4, pyrimidine-pyrimidone. B: Cyclobutane pyrimidine dimer.

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 I, résumé quelques sonde de caractérisation de l'interaction ADN-protéine, leur mode d'action, apport et limites.

Tableau I: 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 <i>in vivo</i> 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 <i>in vivo</i> 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 <i>in vivo</i> 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>

II.2.5.3 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 (Helwa et Hoheisel, 2010) (Figure 33).

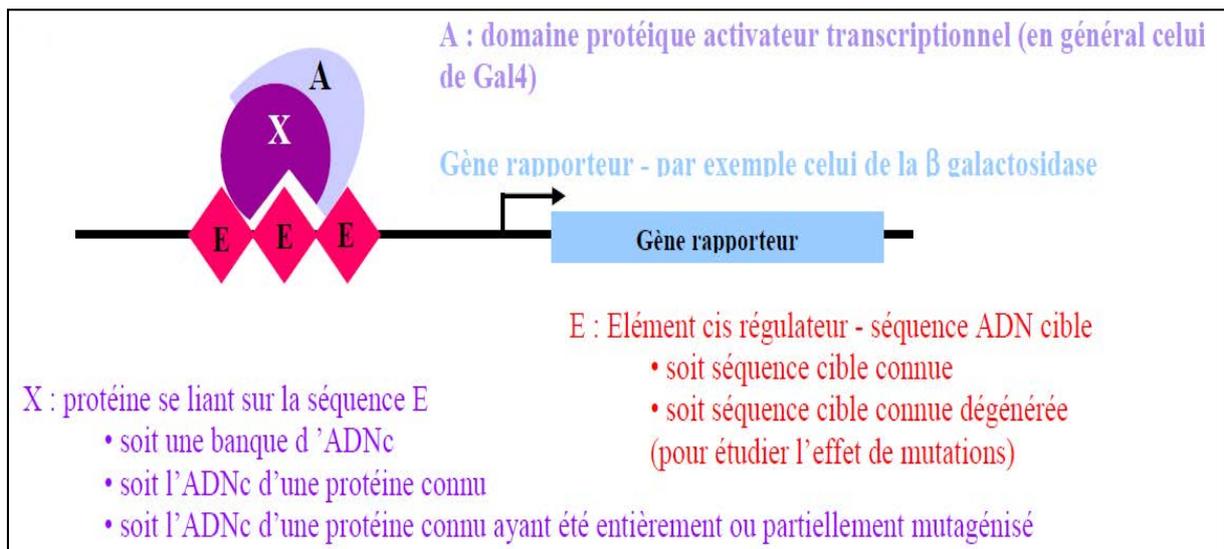


Figure 33: Principe du simple hybride

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).

II.2.5.4 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 sondes (Dey *et al.*, 2012).

L'extrait cytoplasmique/nucléique des cellules contenant la protéine d'intérêt, brute ou purifié, 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 34). Cette technique permet de connaître 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).

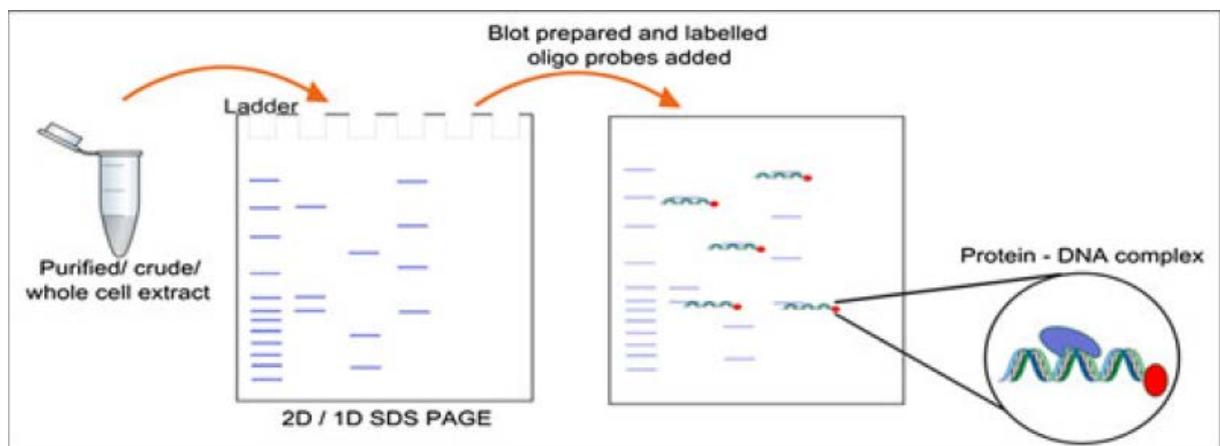


Figure 34: Southwestern blotting (Dey *et al.*, 2012).

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).

II.2.5.5. 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 (Daghestani et Day, 2010)..

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 35).

La résonance de plasmon cause une réduction de l'intensité de la lumière réfléchie à un angle spécifique de réflexion. Cet angle varie avec l'indice de réfraction près de la surface du côté opposé à la lumière réfléchie (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 réfléchie, 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 (Daghestani et Day, 2010).

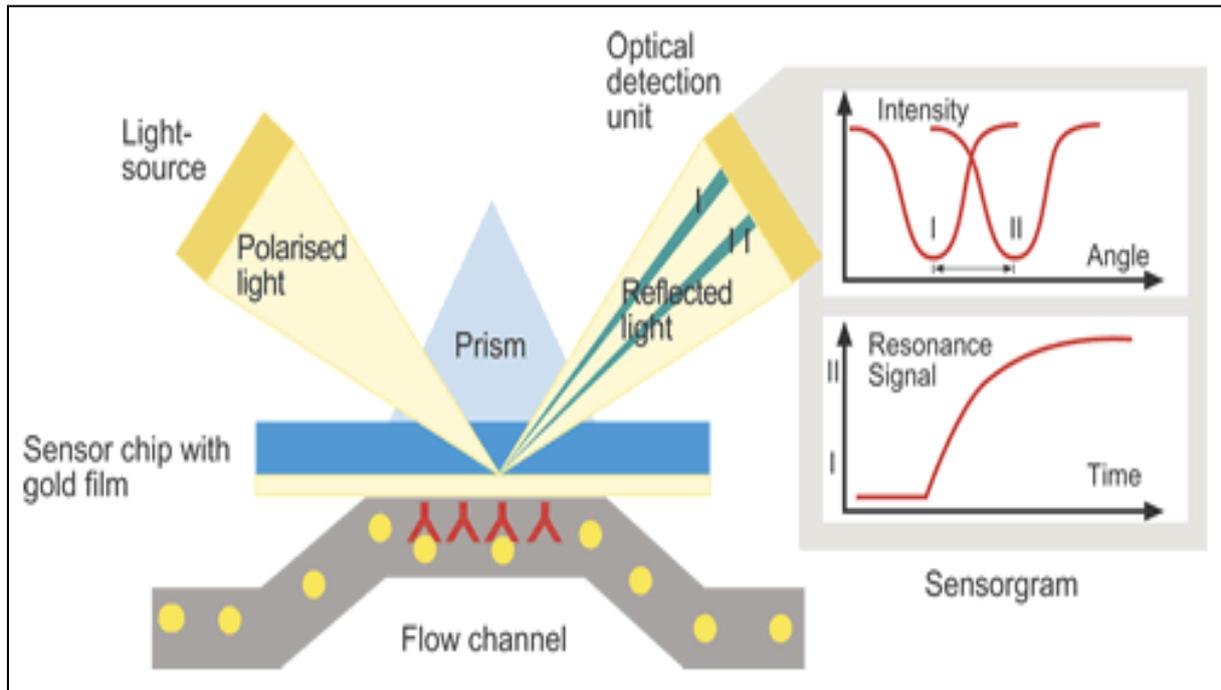


Figure 35: Principe du Biacore.

II.2.5.5. 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 (Helwa et Hoheisel, 2010).

Le formaldéhyde est une petite molécule de 2 Angström, c'est un agent de liaison qui va permettre de produire un lien *in vivo* à la fois « acides nucléiques – protéines » et « protéines – protéines ». Le formaldéhyde est un composé dipolaire très réactif dans lequel les atomes de carbones agissent comme des centres nucléophiles. Les groupements « amines » et « imines » des acides aminés (Lysines, Arginines et Histidines) et de l'ADN (Adénines et Cytosines)

réagissent avec le formaldéhyde pour former une base de Schiff. Cet intermédiaire peut alors réagir avec un second groupe aminé pour donner le complexe ADN-protéine final. 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 36):

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 biotinyllé, 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 (Kolodziej *et al.*, 2009).

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) (Orlando *et al.*, 1999; Kuo et Allis, 1999).

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.

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 » (Furey, 2012).

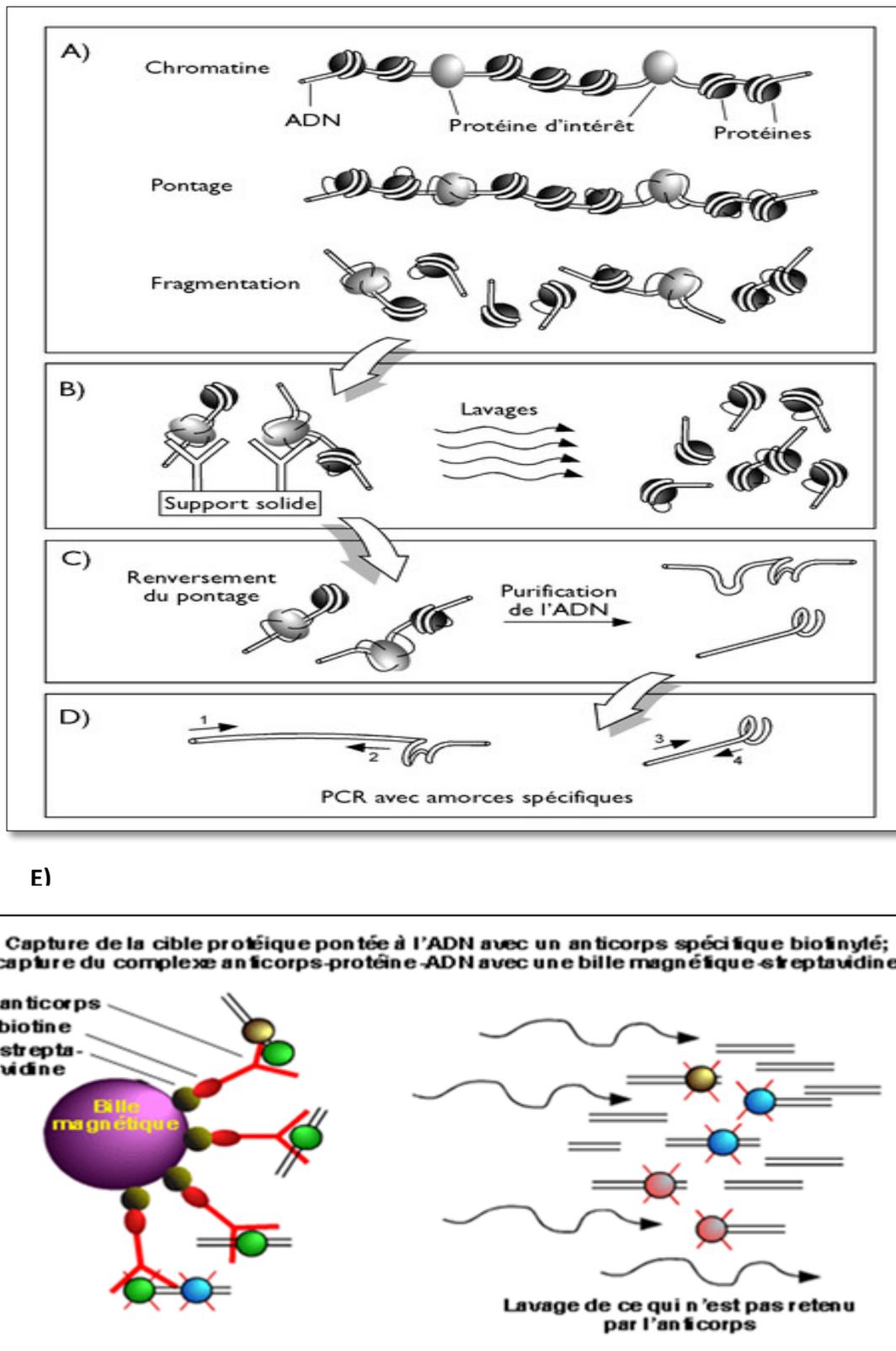


Figure 36: A, B, C, D: Etapes de l'immunoprécipitation de la chromatine pontée. E : Capture de la cible pontée (Kolodziej *et al.*, 2009).

II.2.5.7 Hybridation sur « chip » - ChIP on chip ou ChIP to chip

Cette technique a été développée pour la première fois chez la levure (Ren *et al.* 2000). Sa validation a été réalisée au cours de l'étude du facteur de transcription Gal4. C'est un des facteurs de transcription les mieux caractérisés qui active les gènes nécessaires au métabolisme du galactose. Dans l'expérience appelée « ChIP on chip », tous les fragments d'ADN co-immunoprécipités avec la protéine d'intérêt sont amplifiés. Ceci est réalisé en ajoutant par ligation des linkers classiques sur les extrémités des fragments d'ADN réparés (LM PCR ; *Ligation-Mediated - polymerase chain reaction*). Le matériel amplifié est alors hybridé à une puce d'ADN (DNA microarray) portant les sondes appropriées – fragments d'ADN génomique voire oligonucléotides correspondant à des séquences promotrices. Chaque ADN enrichi par l'immunoprécipitation est enregistré comme un site de liaison potentiel pour la protéine étudiée (Figure 37) (Gade et Kalvakolanu, 2012).

Types de puces souvent utilisés :

- Les puces génomiques: portent l'ensemble du génome, plutôt utilisées pour des organismes peu complexes (levure, drosophile). Ces puces permettent de cribler l'ensemble du génome, l'inconvénient est que la résolution est mauvaise (de l'ordre de 0.5 méga base), on ne peut voir que des régions d'interaction et non des sites. Beaucoup de faux positifs seront difficile à analyser.
- Les puces à promoteurs : leur utilisation ont montré peu ou pas de faux positifs. Permet de déterminer l'identité du gène concerné. Cette méthode présente des inconvénients car ne portent que les promoteurs proximaux, alors que des séquences régulatrices très importantes sont en dehors de ces régions. Ce type d' « array » n'existe que pour quelques organismes modèles.

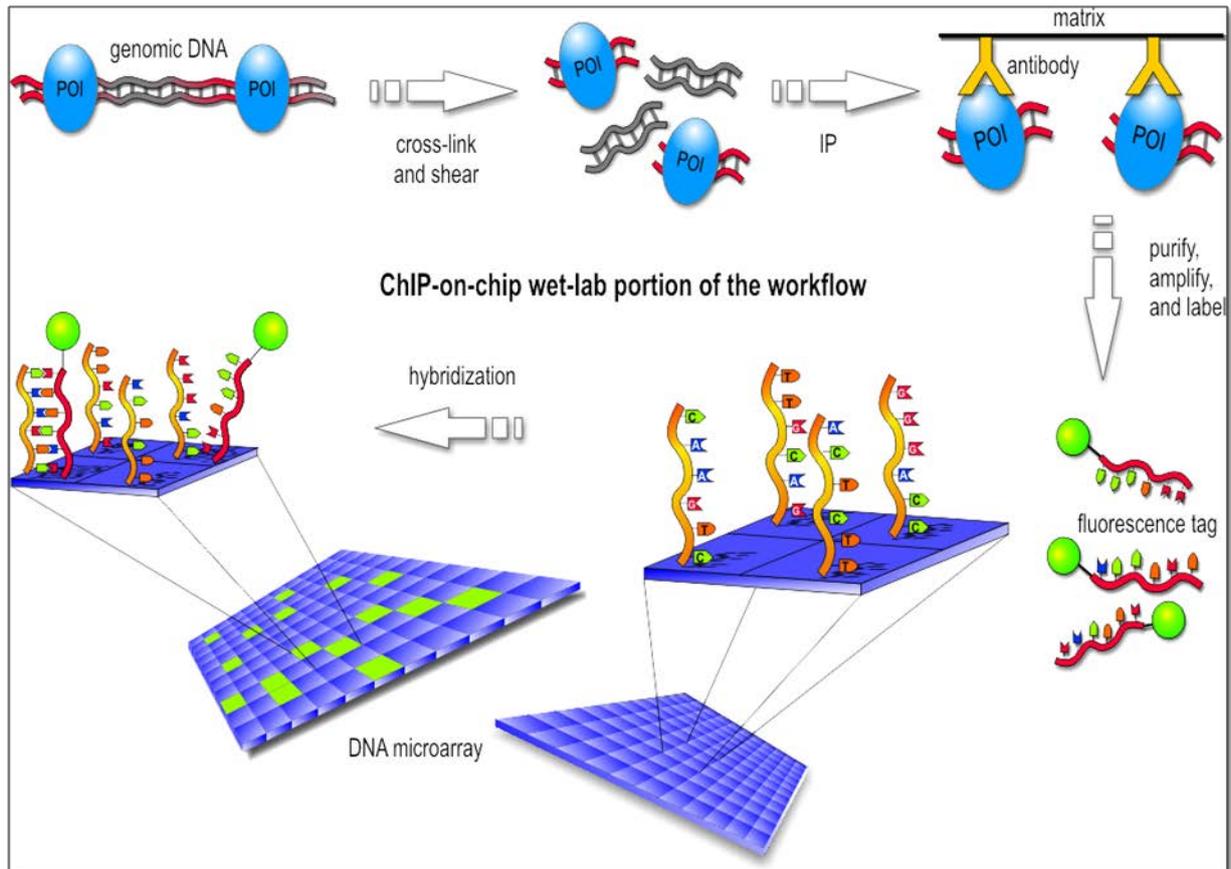


Figure 37: Les étapes du ChIP on chip (Gade et Kalvakolanu, 2012).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Arap, M. A. (2005). Phage display technology - Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*. 28 (1) :1-9.

B

Bagchi, R.A. ; Mozolevska, V. ; Abrenica, B. et Czubryt, M. P. (2015). Development of a high throughput luciferase reporter gene system for screening activators and repressors of human collagen I α 2 gene expression. *canadian journal physiology pharmacology*. 93(10): 887-92.

Bilim, V. ; Kasahara, T. ; Hara, N.; Takahashi, K. et Tomita, Y. (2003). Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC *in vitro*. *The International Journal of Cancer*. 103: 29-37.

Bornberg-Bauer, E.; Rivals, E. et Vingron, M. (1998). Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Research*. 26(11) : 2740-2746.

Brennan, R. G. et Matthews, B. (1989). The Helix-Turn-Helix DNA Binding Motif. *Biological chemistry*. 264(4): 1903-1906.

Brenowitz, M.; Senear, D. F. et Kingston, R. E. (1997). DNase I Footprint Analysis of Protein-DNA Binding. In : « *Current Protocols in Molecular Biology* » Ausubel, F.; Brent, R. ; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. et Struhl, K. (2001). NewYork : Wiley. PP :12.4.1-12.4.16.

C

Campbell, N.A. et Reece, J.B. (2004). La génétique des virus et des procaryotes ; Structure et régulation du génome chez les eucaryotes. In : *BIOLOGIE*. 2^{ème} éd. Canada : ERPI. Pp: 355-400.

Chen, Y. et Xu, D. (2003). Computational Analyses of High-Throughput Protein-Protein Interaction Data. *Current Protein and Peptide Science*. 4: 159-181.

Chin, C.F.; Ler, L.W.; Choong, Y.S.; Ong, E.B.; Ismail, A.; Tye, G.J. et Lim, T.S. (2016). Application of streptavidin mass spectrometric immunoassay tips for immunoaffinity based antibody phage display panning. *Journal of Microbiological Methods*. 120: 6-14.

Coombs, D. H. et Pearson, G. D. (1978). Filter-binding assay for covalent DNA-protein complexes: Adenovirus DNA-terminal protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 75(11): 5291-5295.

D

Daghestani, H. N. et Day, B. W. (2010). Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors. *Sensors*.10: 9630-9646.

Dauter, Z. (2005). Current state and prospects of macromolecular Crystallography. *Acta Crystallographica Section D*. 62: 1-11.

De, A.; Loening, A. M. et Gambhir, S. S. (2007). An Improved Bioluminescence Resonance Energy Transfer Strategy for Imaging Intracellular Events in Single Cells and Living Subjects. *Cancer Research*. 67(15): 7175-7183.

Degterev, A.; Lugovskoy, A.; Cardone, M.; Mulley, B. ; Wagner, G. ; Mitchison, T. et Yuan, J. (2001). Identification of small molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nature Cell Biology*. 3(2): 173-182.

De Las Rivas, J. et Fontanillo, C. (2010). Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactive networks. *PLOS Computational Biology*. 6(6): e1000807, 06.

Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., Manghani, C. et Rani, V. (2012). DNA-protein interactions: methods for detection and analysis. *Molecular and Cellular Biochemistry* , 365: 279-299.

Du, C. ; Fang, M. ; Li, Y. ; Li, L. et Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102(1): 33-42.

F

Fulda, S.; Wick, W.; Weller, M. et Debatin, K.M. (2002). Smac agonists sensitize for Apo2L/ TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo*. *Nature Medicine*. 8: 808-815.

Furey, T. S. (2012). ChIP-seq and Beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nature Reviews Genetics*. 13(12): 840-852.

G

Gade, P. et Kalvakolanu, D. V. (2012). Chromatin Immunoprecipitation Assay as a Tool for Analyzing Transcription Factor Activity. *Methods in Molecular Biology*. 809: 85-104.

Georgieva, Y. et Konthur, Z. (2011). Design and Screening of M13 Phage Display cDNA Libraries. *Molecules*.16: 1667-1681.

Guille, M.J. et Kneale, G.G. (1997). Methods for the Analysis of DNA-Protein Interactions. *Molecular Biotechnology*. 8: 35-52.

H

Hakoshima, T. (2014). Leucine Zippers. *Encyclopedia of life sciences*. Pp:1-5.

Helwa, R.et Hoheisel, J. D.(2010). Analysis of DNA–protein interactions: from nitrocellulose filter binding assays to microarray studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398: 2551-2561.

Hu, C-D. et Kerppola, T. K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*. 21(5): 539-545.

J

Jelesarov, I. et Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of molecular recognition*. 12: 3-18.

Joung, J. K. ; Ramm, E. I. et Pabo, C. O. (2000). A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(13): 7382-7387.

K

Kaiser, P. ; Meierhofer, D. ; Xiaorong, W. et Huang, L. (2008). Tandem Affinity Purification Combined with Mass Spectrometry to Identify Components of Protein Complexes. *Methods in Molecular Biology*. 439: 309-326.

Kolodziej, K. E. ; Pourfarzad, F. ; de Boer, E.; Krpic, S. ; Grosveld, F. et Strouboulis, J. (2009). Optimal use of tandem biotin and V5 tags in ChIP assays. *BioMed Central Molecular Biology*. 10(6): 1-14.

Kuo, M.H. et Allis, C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods*. 19(3): 425-433.

L

Lane, D.; Prentkiand, P. et Chandler, M. (1992). Use of Gel Retardation To Analyze Protein-Nucleic Acid Interactions. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*. 56(4) : 509-528.

Laudet, B. ; Prudent, R. ; Filhol, O. et Cochet, C. (2007). Des agents Thérapeutiques ciblant des interactions protéine-protéine Mythe ou réalité ? *MEDECINE/SCIENCES*. 23: 273-278.

Layden, B. T.; Vivek Durai, M.D. et Lowe, W. L. (2010) .G-Protein-Coupled Receptors, Pancreatic Islets, and Diabetes. *Nature Education*. 3(9): 13.

Lebowitz, J.; Lewis, M. S. et Schuck, P. (2002). Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science*. 11: 2067-2079.

Li, L.; Thomas, R.M.; Suzuki, H.; De Brabander, J.K. ; Wang, X. et Harran, P.G. (2004). A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF alpha-mediated cell death. *Science*. 305(5689): 1471-1474.

Liu, Z.; Sun, C.; Olejniczak, E.T.; Meadows, R.P.; Betz, S.F.; Oost, T.; Herrmann, J.; Wu, J.C. et Fesik, S.W. (2000). Structural basis for binding of Smac/ Diablo to the XIAP BIR3 domain. *Nature*.408: 1004-1008.

Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, S.; Zipursky, L. et Darnell, J. (2005). Le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes. *In: Biologie moléculaire de la cellule*. 3ème éd. Bruxelles : Préface de Stefan Constantinescu. Pp: 463-467.

Lucombe, N.M.; Austin, S.E.; Berman, H.M. et Thornton, J.M. (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biology*. 1(1): 1-10.

Luscombe, N.M.; Laskowski,R.A. et Thornton, J.M. (2001). Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*. 29(13): 2860-2874.

M

Massari, M. et Murre, C. (2000). Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Molecular and cellular biology*. 20(2): 429-440.

Masters, S.C. (2004). Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods in molecular biology*. 261: 337-348.

Michnick, S.W. (2003). Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 610-617.

N

Nguyen, T. N. et Goodrich, J.A. (2006). Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. *Nature Methods*. 3(2): 135-139.

Nunoshiba, T.; Obata, F.; Boss, A.C.; Oikawa, S.; Mori, T.; Kawanishi, S. et Yamamoto, K. (1999). Role of Iron and Superoxide for Generation of Hydroxyl Radical, Oxidative DNA Lesions, and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 34832-34837.

O

Ochsenbein, F. et Gilquin, B. (2007). La RMN pour comprendre les protéines. *CLEFS CEA* .56: 52-55.

Oltersdorf, T.; Elmore, S.W.; Shoemaker, A.R.; Armstrong, R.C.; Augeri, D.J.; Belli, B.A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T.L.; Dinges, J. et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 435(7042): 677-681.

Orlando, T. P.; Mooij, J. E.; Tian, L.; Van der Wal, C. H. ; Levitov, L. S. ; Lloyd, S. et Mazo, J. J. (1999). Superconducting persistent-current qubit. *Physical Review Letters*.60 (22) :15398.

P

Perkins, J. R. ; Diboun, I.; Dessailly, B. H.; Lees, J. G. et Orengo, C. (2010). Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure Review*. 18: 1233-1243.

Pierce, M.M.; Raman, C.S. et Nall, B.T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*. 19(2): 213-221.

Plessis, A. et Camonis, J. H. (1994). Le système double-hybride, mode d'emploi. *Société Française de Génétique*. 10: 1-11.

Q

Qiu, H. et Wang, Y.(2009). Exploring DNA-binding Proteins with *In Vivo* Chemical Crosslinking and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 8(4): 1983-1991.

R

Ren, B.; Robert, F.; Wyrick, J. J.; Aparicio, O.; Jennings, E. G. ; Simon, I.; Zeitlinger, J.; Schreiber, J.; Hannett, N. et al. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*. 290(5500): 2306-2309.

Rossi, F.; Charlton, C.A. et Blau, H.M. (1997). Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94(16): 8405-8410.

S

Sattler, M. ; Liang, H.; Nettlesheim, D. ; Meadows, R.P. ; Harlan, J.E.; Eberstadt, M.; Yoon, H.S. ; Shuker, S.B.; Chang, B.S. et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275: 983-986.

Struhl, K. (1989). Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 14: 137-140.

Suter, B. ; Schnappauf, G. et Thoma, F. (2000). Poly (dA.dT) sequences exist as rigid DNA structures in nucleosome-free yeast promoters in vivo. *Nucleic Acids Research*. 28(21): 4083-4089.

T

Tijerina, P.; Mohr, S. et Russell, R. (2007). DMS Footprinting of Structured RNAs and RNA-Protein Complexes. *Nature Protocols*. 2(10): 2608-2623.

Trugnan, G. ; Fontanges, P. ; Delautier, D. et Ait-Slimane, T. (2004). FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur! *Medecine/Science*. 20: 1027-1034.

Tsai, Z.T.; Tsai, H.K.; Cheng, J.H.; Lin, C.H.; Tsai, Y.F. et Wang, D. (2012). Evolution of cis-regulatory elements in yeast de novo and duplicated new genes. *BioMed Central Genomics*. 13(717): 1-12.

V

Villalobos, V. Naik, S. et Piwnica-Worms, D.(2007). Current State of Imaging Protein-Protein Interactions In Vivo with Genetically Encoded Reporters. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 9: 321-349.

W

Weichel, M.; Jaussi, R. ; Rhyner, C. et Cramer, R.(2008). Display of E. coli Alkaline Phosphatase pIII or pVIII Fusions on Phagemid Surfaces Reveals Monovalent Decoration with Active Molecules. *Open Biochemistry Journal*. 2: 38-43.

X

Xiong, Y. et Sundaralingam, M. (2001). Protein-Nucleic Acid Interaction: Major Groove Recognition Determinants. *Encyclopedia of life science*. Pp.1-8.

Z

Zhao, H.; Gorshkova, I. I.; Fu, G. L. et Schuck, P. (2013). A comparison of binding surfaces for SPR biosensing using an antibody-antigen system and affinity distribution analysis. *Methods*. 59(3): 1-16.