



THESIS / THÈSE

LICENCE EN ZOOLOGIE

Caractérisation de protéines liant le promoteur hépatique d'un gène codant la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase

Pierreux, Christophe

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

2021 213 - 2a

286 (at)

UNITE DE GENETIQUE

Année académique 1993-1994

Promoteur : J.Vandehaute

Co-Promoteur : G.Rousseau

**CARACTERISATION DE PROTEINES LIANT LE PROMOTEUR
HEPATIQUE D'UN GENE CODANT LA 6-PHOSPHOFRUCTO-2-
KINASE/FRUCTOSE-2-6-BISPHOSPHATASE**

Christophe
PIERREUX

Caractérisation de protéines liant le promoteur hépatique d'un gène codant la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase.

Pierreux Christophe

Résumé

A ce jour, le stimulateur le plus puissant de la glycolyse est le fructose-2,6-bisphosphate. C'est aussi un inhibiteur de la gluconéogenèse hépatique. Sa synthèse et sa dégradation sont catalysées par une enzyme bifonctionnelle, la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2). Dans le foie, l'étude du promoteur du gène de la PFK-2/FBPase-2 a révélé une séquence riche en guanine (PFK-VI) située à -269 pb du site d'initiation de la transcription.

En retard sur gel, nous avons montré que dans un extrait nucléaire de foie, six interactions protéine/PFK-VI sur neuf sont spécifiques. Nous avons ensuite observé que les six complexes spécifiques requièrent la présence de zinc pour se lier à l'ADN. De plus, nous avons prouvé qu'aucun des six complexes spécifiques n'est hépato-spécifique. Grâce à ces caractéristiques et à la détermination de la M_r d'un des complexes, nous pensons que la protéine doigt à zinc et ubiquiste BTEB est un bon candidat pour se lier à PFK-VI. Par ailleurs, nous attribuons deux autres de ces complexes à un ou deux membres de la famille Sp1 (également doigt à zinc et ubiquiste).

Enfin, nous avons établi les bases d'une purification par chromatographie sur héparine-agarose et lectine-agarose.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : J. Vandenhaute.

Promoteur : G.G. Rousseau.

Lundi 29 novembre, 7h25, le mémoire est presque bouclé... Il ne reste qu'à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, à la réalisation de cet ouvrage.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur J. Vandenhoute pour avoir bien voulu accepter mon projet de mémoire.

Mes plus vifs remerciements vont au professeur Guy Rousseau pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Je retiens tout particulièrement son intérêt tout au long de ce travail, ses judicieux conseils, et son humour.

Un tout grand merci à Frédéric pour m'avoir guidé tout au long de cette année. Je le remercie plus particulièrement pour ses connaissances et son aide de tout moment. Son suivi et sa disponibilité n'ont jamais été mis à défaut.

Mes remerciements s'adressent également à Serge et à Vincent pour m'avoir fait profiter de leur expérience.

Je pense bien entendu à Luc qui a facilité mon intégration, et à tous les membres de l'unité Hormones et Métabolisme qui ont contribué à la bonne humeur permanente.

Pour terminer, je voudrais remercier mes frères et ma maman pour leur soutien moral au cours de ces cinq années. Un merci "spécial" à Nancy pour sa présence et le partage des moments difficiles.

Guillaume

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. Régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes	2
1.1. La région 5'-flanquante des gènes	3
1.2. Les protéines liant l'ADN	3
1.2.a. Les facteurs <i>trans</i>	3
1.2.b. Motifs de liaison à l'ADN	4
1) structure en hélice-coude-hélice et homéoprotéines	4
2) Les domaines en "doigt à zinc"	4
- C ₂ H ₂	5
- C ₄	5
- C ₆	5
3) Le domaine basique hélicoïdal	6
1.2.c. L'interaction <i>cis-trans</i> cognitive	6
1) Mat α 2	7
2) Zif 268	8
3) GAL4	8
4) GCN4	9
1.2.d. Domaines activateurs	9
1.3. L'ARN polymérase II	11
1.4. Facteurs généraux de la transcription	11
1.5. Les coactivateurs	12
1.6. Modulation de l'activité des facteurs de la transcription	12
1.6.a. Association entre facteurs transcriptionnels et non transcriptionnels	12
1.6.b. Association de facteurs transcriptionnels entre eux	13
1.6.c. Dimérisation de facteurs	13
1.6.d. Modifications post-traductionnelles	14
1.6.e. La chromatine	14
1.6.f. La méthylation de l'ADN	15
1.6.g. Le superenroulement	15
1.6.h. Les régulateurs négatifs	16
1.7. Modèle moléculaire de l'activation de la transcription	17

2. Le système PFK-2/FBPase-2	19
2.1. La glycolyse	19
2.2. Le fructose-2,6-bisphosphate	19
2.3. La 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate	20
2.3.a. Les isozymes de la PFK-2/FBPase-2	20
2.3.b. Contrôle à court terme de la PFK-2/FBPase-2 dans le foie	20
2.3.c. Régulation hormonale	21
- Les glucocorticoïdes	21
- Les hormones thyroïdiennes	21
- Insuline et glucagon	21
2.4. Caractérisation génique des isozymes	22
2.4.a. Le gène B	22
2.4.b. Le gène A	22
2.4.c. Interactions cis-trans sur le promoteur de type foie du gène A	23
3. But du travail	25
MATERIEL et METHODES	26
A. Extrait nucléaire	26
A.1. Principe	26
A.2. Solutions	26
A.3. Protocole	27
A.3.1. Préparation des noyaux	27
A.3.2. Lyse des noyaux	27
A.3.3. Dosage protéique	28
B. Retard de migration sur gel	29
B.1. Principe	29
B.2. Sonde radioactive	29
B.2.1. Solutions	29
B.2.2. Protocole	30
B.2.2.a. Hybridation	30
B.2.2.b. Marquage	30
B.2.2.c. Extraction	30
B.2.2.d. Elimination des nucléotides non incorporés	31
B.2.2.e. Extraction	31

B.2.2.f. Précipitation	31
B.3. Gel TAE 6%	31
B.3.1. Solutions	31
B.3.2. Protocole	32
B.4. Retard de migration sur gel	32
B.4.1. Solution	32
B.4.2. Protocole	32
B.4.2.a. Prémigration	32
B.4.2.b. Incubation de la sonde PFK- VI en présence de protéines nucléaires	33
B.4.2.c. Incubation de la sonde PFK- VI en présence de protéines nucléaires et d'ADN compétiteur	33
B.4.2.d. Incubation de la sonde PFK- VI en présence de protéines nucléaires et d'un chélateur de cation bivalent	34
B.4.3. Séchage et autoradiographie	34
C. Renaturation des protéines se liant à l'ADN	35
C.1. Principe	35
C.2. SDS-PAGE	35
C.2.1. Solutions	35
C.2.2. Préparation du gel	36
1. Gel de séparation	36
2. Gel de tassement	36
C.2.3. Préparation des échantillons	36
C.2.4. Migration	37
C.3. Renaturation	37
C.3.1. Solutions	37
C.3.2. Coloration	38
C.3.3. Découpage des bandes	39
C.3.4. Précipitation et lavage	39
C.3.5. Dénaturation et resuspension	39
C.3.6. Renaturation et élimination de l'effet de la guanidine-HCl	39
C.4. Retard sur gel	40

D. Détermination de poids moléculaires de protéines par réticulation aux ultraviolets	41
D.1. Principe	41
D.2. Synthèse de la sonde radioactive et substituée	41
D.2.1. Solution	41
D.2.2. Hybridation	42
D.2.3. Extension d'amorce	42
D.2.4. Extractions, purification et précipitation	42
D.3. Cross-linking aux ultraviolets	42
D.3.1. Retard sur gel	42
D.3.2. Irradiation	42
D.4. SDS-PAGE	43
E. Purification de protéines sur colonne de streptavidine-agarose	44
E.1. Principe	44
E.2. Biotinylation de l'oligonucléotide à la terminale transferase	44
E.2.1. Solutions	44
E.2.2. Marquage	45
E.2.3. Extraction et précipitation	45
E.3. Test de biotinylation	45
E.3.1. Principe	45
E.3.2. Solution	45
E.3.3. Protocole	46
E.4. colonne de streptavidine-agarose	46
E.4.1. Solutions	46
E.4.2. Protocole	46
E.5. Retard de migration sur gel	47
F. Séparation de protéines sur Héparin-agarose et lectine-agarose	48
F.1. Héparin-agarose	48
F.1.1. Principe	48
F.1.2. Protocole	48
F.2. Lectine-agarose	49
F.2.1. Principe	49
F.2.2. Protocole	49
Liste des produits utilisés	50

RESULTATS et DISCUSSION	51
1) Caractérisation des facteurs trans liant le site VI	52
1.1. Spécificité de liaison	52
1.2. Capacité de liaison à d'autres séquences	52
1.3. Influence du zinc sur la formation des complexes spécifiques	55
1.3.a. Inhibition par la phénanthroline	55
1.3.b. Restauration par le zinc	56
1.4. Détermination de la masse moléculaire relative par réticulation aux ultraviolets	57
1.5. Détermination de la masse moléculaire relative par renaturation	57
1.6. Distribution tissulaire	58
2) Purification partielle	60
2.1. Streptavidine-agarose	60
2.2. Héparin-agarose	61
2.3. Lectine-agarose	62
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

Liste des abbréviations

1. Générale

A = adénine

a.a. = acide aminé

ADN = acide désoxyribonucléique

AMPc = adénosine monophosphate cyclique

APS = ammonium persulfate

ARN = acide ribonucléique

ARNm = acide ribonucléique messenger

ARNpII = ARN polymérase II

ATP = adénosine triphosphate

bU = bromodéoxyuridine

C = cytosine

CTD = carboxy-terminal domain

CTP = cytidine triphosphate

DTT = dithiothreitol

EDTA = acide éthylènedinitrilotétraacétique

EGTA = ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N,N,N',N' -tetraacetic acid

FBPase-1 = fructose-1,6-bisphosphatase

FBPase-2 = fructose-2,6-bisphosphatase

G = guanine

GTP = guanosine triphosphate

HEPES = N-(2-hydroxyéthyl) piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid

kb = kilobases

kDa = kilo Dalton

M_r = masse moléculaire relative

NP-40 = Non ionic detergent P-40

pb = paire de base

PFK-1 = 6-phosphofructo-1-kinase

PFK-2 = 6-phosphofructo-2-kinase

PKA = protéine kinase dépendante de l'AMPc

PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride

poly(dIdC) = acide poly (déoxyinosinique)-poly (déoxycytidylique)

SAB = sérum d'albumine bovine

SDS = sodium dodecyl sulfate
T = thymine
TTP = thymidine triphosphate
TEMED = N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
Tris = tris (hydroxyméthyl) aminométhane

2. *Facteurs de transcription*

AP-1 (2) = activating protein-1 (2)
BGP1 = G-string binding protein-1
BTEB = basic transcription element binding
C2BP = C2 binding protein
C/EBP = CAAT/enhancer binding protein
COUP-TF = chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor
CREB = cAMP response element binding
CTF/NF-1 = CAAT box transcription factor/nuclear factor-1
ETF = ~~EGFR~~ (epidermal growth factor receptor)-specific transcription factor
GABP = guanine-adenine binding protein
G10BP = guanine 10 binding protein
GCF = GC factor
GR = glucocorticoid receptor
GRE = glucocorticoid response element
GRU = glucocorticoid response unit
HNF-4 = hepatocyte nuclear factor-4
IHF = integration host factor
Krox = "krüppel-Hox"
LSF = late SV40 factor
MTF-1 = metal inducible transcription factor-1
Oct-1 = octamer transcription factor
Pit-1 = pituitary transcription factor
Sp1 (2 et 3) = stimulating protein-1 (2 et 3)
SRF = serum response element
TF1 = transcription factor 1
USF = upstream stimulating factor
WiF-1 = Wnt-1 (= int-1)- inducing factor-1

INTRODUCTION

Le fructose-2,6-bisphosphate est le stimulateur de la glycolyse le plus puissant connu, par son action sur la 6-phosphofructo-1-kinase. Dans le foie, il inhibe par ailleurs la fructose-1,6-bisphosphatase et donc la gluconéogenèse. La biosynthèse du fructose-2,6-bisphosphate est catalysée par la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2), sa dégradation par la fructose-2,6-bisphosphatase (FBPase-2). Les deux activités étant portées par le même peptide, il s'agit d'une enzyme bifonctionnelle (PFK-2/FBPase-2) (Hue et Rider, 1987). Plusieurs isozymes, qui diffèrent entre autres par leur distribution tissulaire, masse moléculaire relative et réponses à des kinases, ont été caractérisés.

Un gène C, encore inconnu, coderait l'isozyme de testicule (T), alors que le gène B code l'isozyme cardiaque (H). Le gène A code les isozymes d'hépatome, de muscle squelettique et de foie par l'utilisation alternative de 3 promoteurs appelés respectivement promoteur F, M et L (Darville *et al*, 1989; Dupriez *et al*, 1993; Rousseau et Hue, 1993). Chacun de ces promoteurs est la cible de plusieurs facteurs *trans* qui vont activer, par leur liaison à une séquence particulière, l'initiation de la transcription.

L'étude de la régulation de la transcription sur les différents promoteurs du gène A de la PFK-2/FBPase-2 est donc fort intéressante.

L'introduction de ce mémoire se compose de deux parties :

-Dans la première partie, nous commencerons par décrire les facteurs *trans* qui se lient aux éléments *cis*, et nous étudierons leur modulation pour finalement arriver à un modèle moléculaire de l'activation de la transcription.

-Dans un deuxième temps, nous étudierons plus en détail le système de biosynthèse et de biodégradation du fructose-2,6-bisphosphate en nous focalisant sur l'isozyme du foie et plus particulièrement sur son promoteur (L).

1. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE L'EXPRESSION DES GENES : (Latchman, 1991)

Alors que toutes les cellules d'un organisme possèdent le même assortiment de gènes, elles n'ont cependant pas toutes les mêmes fonctions. Par exemple, les immunoglobulines ne sont synthétisées que par les lymphocytes B, l'hémoglobine ne l'est que par les précurseurs des globules rouges et l'insuline n'est produite que par les cellules β du pancréas. Les cellules suivent donc des voies distinctes à travers des étapes successives de différenciation. Une part fort importante de la régulation de l'expression des gènes se produit lors de leur transcription en ARN. La différenciation des cellules repose donc en partie sur la régulation de la transcription et sur les interactions entre séquences *cis* et facteurs *trans* dans les promoteurs des gènes.

Le processus de la transcription permettant la production d'un ARN à partir d'une matrice d'ADN se déroule en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'enzyme responsable de la transcription est appelée l'ARN polymérase (ARNp). Chez les eucaryotes, trois polymérases différentes existent mais leurs actions sont limitées à certains types de gènes :

- Les gènes codant les ARN ribosomiaux sont transcrits par l'ARN polymérase I (ARNpI).
- Tous les gènes qui codent des protéines, ainsi que ceux codant certains petits ARN nucléaires (small nuclear ribonucleic acid-snRNA) impliqués dans l'épissage, sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARNpII).
- Les gènes codant les ARN de transfert, l'ARN ribosomial 5S, le snRNA U6 et les séquences Alu sont transcrits par l'ARN polymérase III (ARNpIII).

Dans cette introduction, nous nous limiterons à la synthèse d'ARN messager c'est-à-dire à la transcription par l'ARNpII, et tout particulièrement lors de la première phase de ce processus : l'initiation de la transcription. Nous passerons en revue les "partenaires" impliqués dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, et nous terminerons par un modèle mécaniciste explicatif de ce processus complexe.

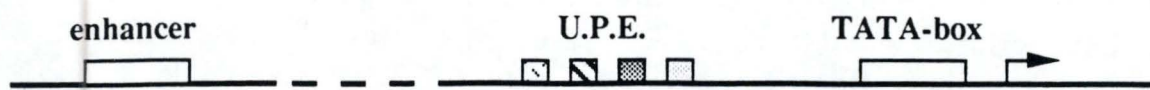


figure 1) Illustration de l'organisation physique "type" de la région 5'-flanquante d'un gène eucaryotique transcrit par la polymérase II. Les formes géométriques représentent des sites de fixation pour des facteurs transcriptionnels, et la flèche désigne le site d'initiation de la transcription (adapté de Latchman, 1991).

1.1. La région 5'-flanquante des gènes

Les gènes ont des régions en amont du site d'initiation de la transcription qui diffèrent par la présence ou l'absence de certaines séquences (on parle de séquences *cis*) et par l'arrangement de ces séquences entre elles. Le promoteur de transcription (*sensu stricto*) est composé de séquences *cis* nécessaires et suffisantes pour promouvoir la transcription basale de l'ADN (figure 1). Ce promoteur contient en général une séquence appelée boîte TATA, le site d'initiation de la transcription, et éventuellement un élément initiateur (Smale et Baltimore, 1989).

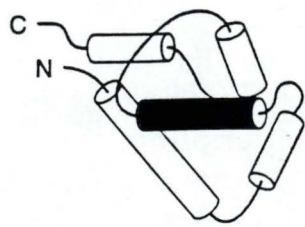
En plus de ce promoteur, une variété d'autres séquences *cis*, appelées UPE (pour Upstream Promoter Element), modulent l'activité basale du promoteur et déterminent la spécificité fonctionnelle. On connaît, par exemple, le motif octamérique, la boîte CCAAT, le motif de liaison d'AP-1, de Sp-1 et de CREB. D'autres éléments, ne faisant pas partie des UPE, sont localisés à grande distance (kb) en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription. Ils sont appelés "enhancers" ou "silencers" selon qu'ils ont un effet positif ou négatif sur l'activation de la transcription.

1.2. Les protéines liant l'ADN (Pabo et Sauer, 1992; Angrand, 1993)

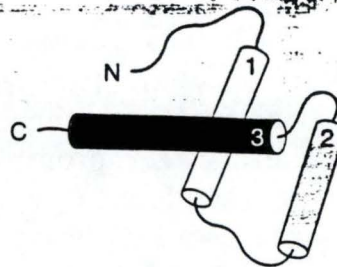
Les protéines de liaison à l'ADN jouent des rôles centraux en biologie. Parmi les activités de ces protéines, on peut citer la réplication du génome, la recombinaison, la transcription de gènes et la réparation de l'ADN. La plus diversifiée et la plus grande des classes de protéines liant l'ADN est celle des facteurs de transcription qui régulent l'expression génique.

1.2.a. Les facteurs *trans*

Quand on parle de phénomènes régulés par la liaison de facteurs *trans* en plusieurs sites *cis* spécifiques de l'ADN, on se pose différentes questions. Quelles structures secondaires peuvent générer une surface complémentaire à la structure de la double hélice de Watson-Crick ? Quels contacts avec l'ADN permettent la reconnaissance spécifique d'un site *cis* ? Par quels mécanismes moléculaires ces facteurs permettent ils l'expression d'un gène particulier ?



Domaine "hélice-coude-hélice"
(Répresseur de λ)



Domaine "homéo"
(*Engrailed*)

figure 2) Comparaison des structures tridimensionnelles du domaine hélice-coude-hélice (HTH) et de l'homéodomaine. Les hélices 2 et 3 du domaine HTH et de l'homéodomaine se superposent globalement. L'hélice de reconnaissance est en noir (Angrand, 1993).

Des études structurales et de comparaisons de séquences ont permis de grouper les facteurs *trans* en classes qui utilisent des domaines de liaison à l'ADN apparentés. Ce domaine de liaison, permettant l'ancrage sur la séquence *cis*, est complété d'un domaine activateur responsable de la régulation de la transcription (voir au point 1.2.d.). Plusieurs motifs de liaison à l'ADN ont déjà été caractérisés.

1.2.b. Motifs de liaison à l'ADN (Harrison, 1991)

1) Structure en hélice-coude-hélice et homéoprotéines (Treisman *et al*, 1992)

Le motif HTH (Helix-Turn-Helix) découvert chez les procaryotes comporte deux hélices α , de huit à dix acides aminés chacune, séparées par trois acides aminés formant un coude. Ce motif HTH ne peut se replier ou fonctionner par lui-même, il fait partie d'un plus grand domaine de liaison qui, par sa structure et son mode de contact avec le squelette de l'ADN, ajuste l'hélice de reconnaissance (=hélice 2 ou C-terminale du motif HTH) dans le grand sillon de l'ADN.

Chez les eucaryotes, on a identifié de nombreuses protéines comportant un homéodomaine de structure quasi identique au motif HTH (figure 2). Ces homéoprotéines se lient généralement à des séquences cibles dont le coeur est constitué du motif 5'-TAAT-3' (voir au point 1.2.c.). Beaucoup d'homéoprotéines possèdent un domaine conservé supplémentaire qui est impliqué dans la reconnaissance de séquences d'ADN situées au voisinage des séquences reconnues par l'homéodomaine. Les protéines de la famille POU illustrent bien ce phénomène. On a identifié chez les facteurs de transcription de mammifères Pit-1, Oct-1, Oct-2 et dans la protéine Unc-86 de *C. elegans* (Herr *et al*, 1988) un domaine conservé appelé domaine POU (pour Pit, Oct et Unc). Ce domaine est constitué de deux régions : un sous-domaine spécifique (POUs) modulant l'affinité et augmentant la spécificité de liaison, et dans la moitié C-terminale l'homéodomaine responsable de la liaison spécifique.

2) Les domaines en "doigt à zinc"

De nombreuses protéines régulatrices interagissent avec l'ADN grâce à des petits domaines peptidiques contenant du zinc. Ces doigts à zinc (zinc finger) ont été identifiés pour la première fois chez le Xénope dans TFIIIA, qui est une protéine impliquée dans la transcription du gène codant l'ARN ribosomial 5S.

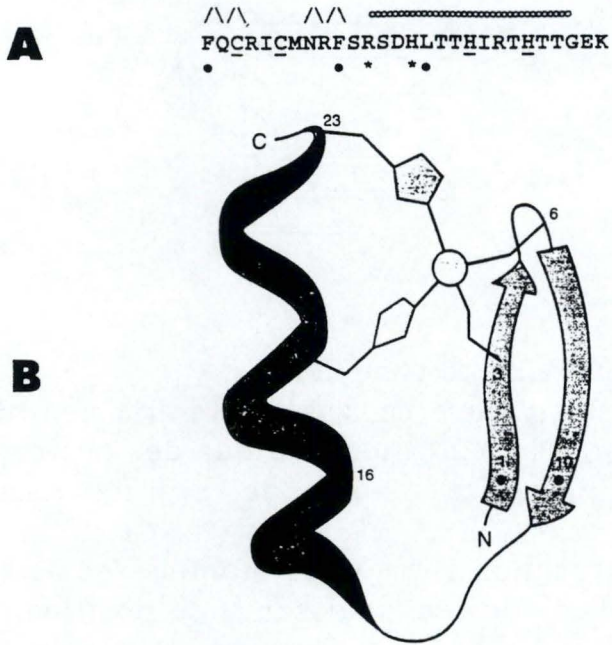


figure 3) Le motif du doigt à zinc de type C_2H_2 .

A) Séquence en acides aminés du deuxième doigt de la protéine Zif 268. Les acides aminés impliqués dans la structure en brin β sont notés $\wedge\wedge$, et ceux qui adoptent une conformation en hélice α sont marqués Les cystéines (3 et 6) et les histidines (19 et 23) sont soulignées, alors que les acides aminés formant le coeur hydrophobe (1, 10 et 16) et interagissant avec les bases sont représentés respectivement par • et par *.

B) Structure tridimensionnelle schématique du motif doigt à zinc avec les résidus histidines (19 et 23) et cystéines (3 et 6) qui coordonnent l'ion zinc (Angrand, 1993).

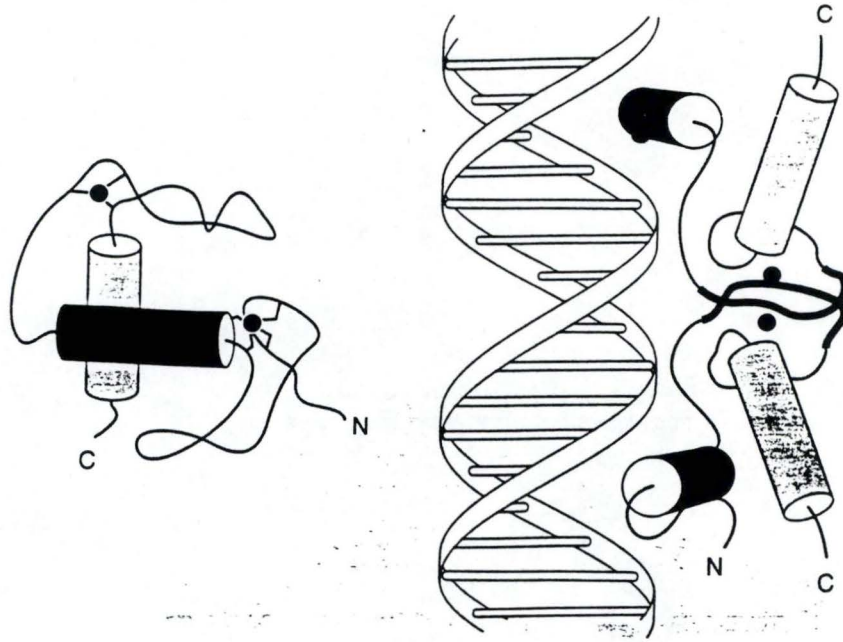


figure 4) Le motif du doigt à zinc de type C₄.

- Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des oestrogènes, en double boucle-zinc-hélice. L'hélice de reconnaissance est en noir.

- Modèle de l'interaction entre deux monomères de récepteur et l'ADN. Les hélices de reconnaissance se positionnent dans les sillons majeurs de l'ADN. La région de dimérisation est représentée en gras (Angrand, 1993).

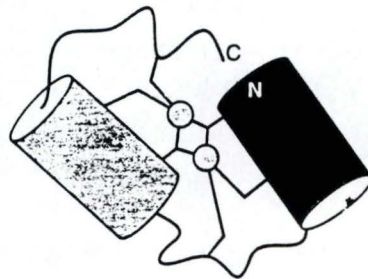


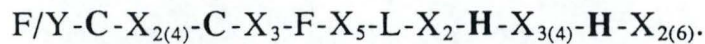
figure 5) Le motif en doigt à zinc de type C₆.

Structure tridimensionnelle de GAL4 (résidus 1-40). L'hélice de reconnaissance (en noir) est maintenue proche d'une autre hélice grâce aux six cystéines coordinatrices du zinc (Angrand, 1993).

Depuis, de nombreuses protéines nécessitant du zinc pour se lier à l'ADN ont été décrites. Les structures tridimensionnelles des motifs de ces protéines peuvent être très différentes (voir ci-dessous). Normalement, le terme "doigt à zinc" ne peut-être utilisé que quand on a une protéine avec un motif riche en cystéines et histidines structurellement homologue à la protéine dactyle TFIIA.

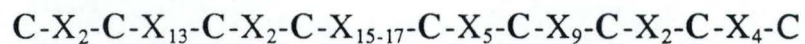
L'usage veut néanmoins que l'on parle de motifs en "doigt à zinc" pour toutes les protéines qui utilisent le zinc pour stabiliser un domaine globulaire de liaison à l'ADN.

- les protéines dactyles de la famille de TFIIA, ou C₂-H₂ (Sp1, Zif268, krüppel, hunchback...) possèdent des répétitions en tandem d'un motif en doigt à zinc de 30 résidus (figure 3), avec chaque motif contenant la séquence :



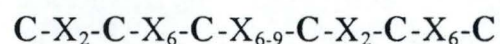
Un doigt à zinc est composé d'un feuillet β antiparallèle et d'une hélice α . Les deux cystéines, dans le feuillet β , et les deux histidines, dans l'hélice α , coordonnent un ion zinc (Zn^{++}), créant ainsi un domaine globulaire compact. Selon la protéine le nombre de doigts varie de 2 à 37.

- les protéines de la deuxième classe de "doigt à zinc" est la famille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes, ou famille C4. Leur motif de liaison :



est organisé en deux modules (deux fois quatre cystéines). Ces deux modules adoptent des conformations globalement similaires, où une boucle est suivie d'une hélice α amphipatique de 11-13 résidus. Deux cystéines de la boucle ainsi que deux cystéines de l'hélice α chélatent un ion zinc. On a donc, pour les deux ions zinc, une structure en double boucle-zinc-hélice (figure 4). Ces récepteurs des hormones stéroïdes se lient sous forme de dimère sur les HRE (*hormone responsive elements*) palindromiques.

- les membres de la famille C₆ sont des activateurs de transcription chez la levure (GAL4, HAP1, LEU3...). GAL4 est le mieux caractérisé. Il se fixe sous forme dimérique sur une séquence en palindrome. Son domaine de liaison :



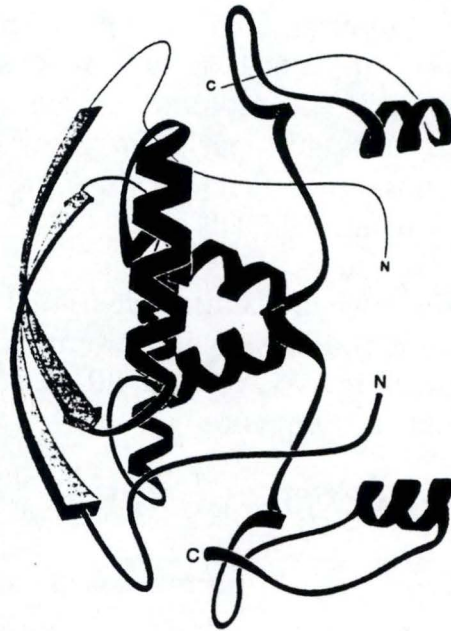


figure 6) Représentation des structures secondaires présente dans le dimère met J. Le feuillet β antiparallèle (un brin de chaque monomère) se lie dans le sillon majeur de l'ADN (Harrison, 1991).

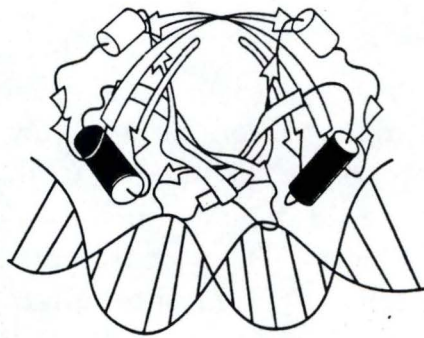


figure 7) Structure du domaine de liaison à l'ADN de la protéine E2. Ce domaine forme un cylindre β de 8 brins antiparallèles composé de deux demi-cylindres identiques. En plus des 4 brins β par demi cylindre, une longue hélice α connecte les brins 1 et 2 à l'extérieur du cylindre, c'est l'hélice de reconnaissance (en noir) (Hegde *et al*, 1992).

contient six cystéines qui lient deux ions zinc (figure 5). Deux hélices α adoptent une structure globulaire grâce aux interactions cystéine-zinc (voir 1.2.C.).

3) Le domaine basique hélicoïdal

Le domaine basique de liaison à l'ADN est associé soit au motif hélice-boucle-hélice (HLH pour Helix-Loop-Helix), soit à la tirette à leucine (Zip), soit encore au motif combiné HLH-Zip (Baxevanis et Vinson, 1993.). Ces protéines seront décrites au point 1.6.C.

4) Chez les procaryotes, il y a deux classes de protéines qui interagissent avec l'ADN grâce à des éléments de reconnaissance en feuillet β (Harrison, 1991). La première classe est représentée par le répresseur MetJ de *Escherichia coli* et par deux répresseurs trouvés chez *Salmonella*, Arc et Mnt. La deuxième classe comporte la protéine HU qui forme des structures nucléoprotéiques condensées, le facteur d'intégration d'hôte IHF et le facteur de transcription de *B. subtilis*, TF1. Ces protéines sont des dimères composés de 4 hélices α et d'un feuillet β antiparallèle. C'est ce dernier qui interagit avec le sillon majeur de l'ADN (figure 6).

5) La protéine E2 du virus du papillome utilise, comme la grande majorité des protéines liant spécifiquement l'ADN, les résidus d'une hélice α pour contacter les bases du sillon majeur (Hegde *et al*, 1992). Néanmoins, elle présente ces hélices à l'ADN en adoptant une nouvelle conformation protéique (figure 7).

La longue hélice α de chaque monomère sert d'hélice de reconnaissance à l'ADN. Les contacts résidus-bases sont réalisés par une courbure de l'ADN qui enveloppe partiellement le cylindre β et permet ainsi aux hélices α de pénétrer les sillons majeurs.

6) Il existe d'autres motifs de liaison, moins caractérisés comme ceux des facteurs ets, CTF/NF-1 et AP-2.

1.2.c. L'interaction *cis-trans* cognitive (Wolberger, 1993)

Après cette description, non exhaustive, des différents domaines de liaison des facteurs *trans*, étudions plus en détail l'interaction cognitive qui existe entre les bases de l'ADN et les résidus de quelques facteurs *trans* cristallisés.

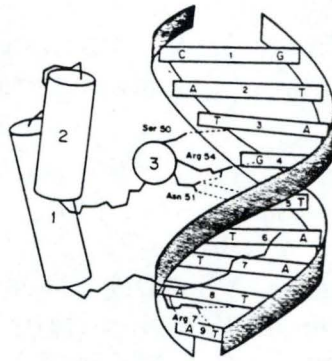


figure 8) Représentation des 4 contacts de l'homéodomaine Mat $\alpha 2$ avec les bases de l'ADN (Wolberger *et al*, 1991).

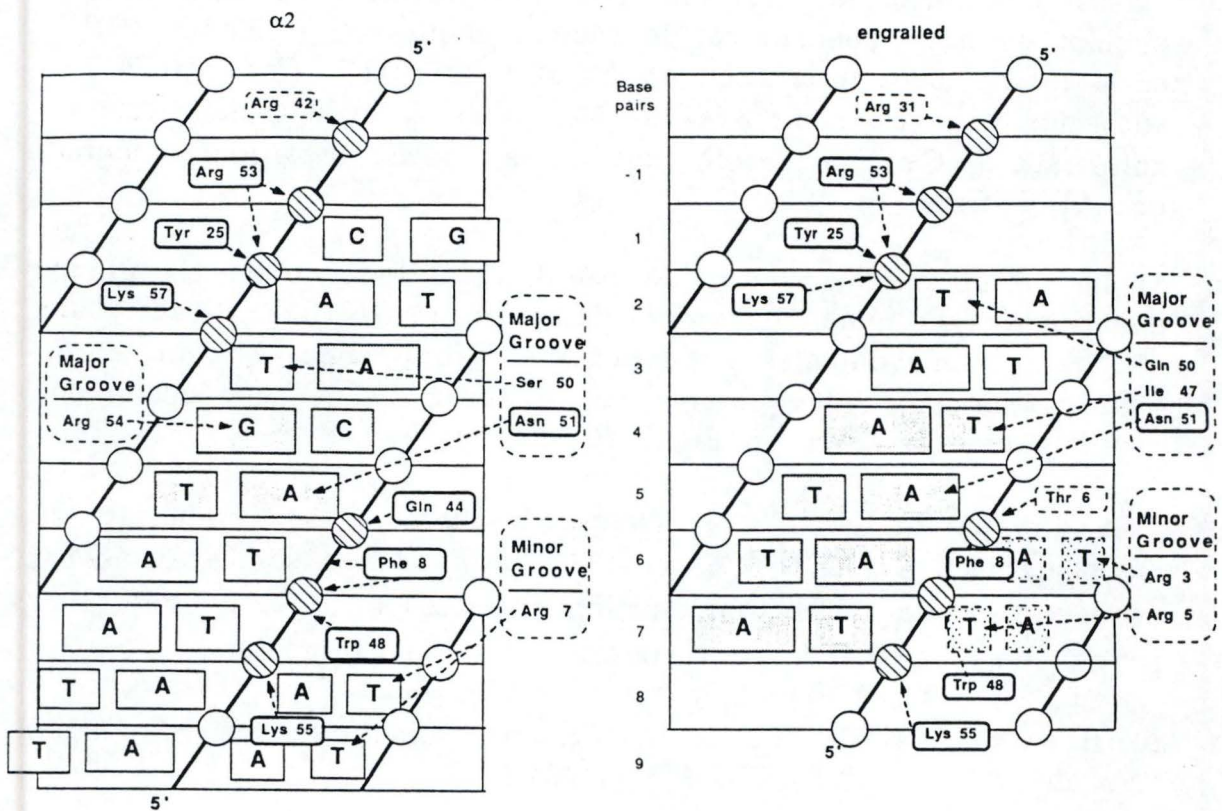


figure 9) Comparaison des contacts avec l'ADN dans les deux homéodomaines Mat $\alpha 2$ et engrailed. L'ADN est représenté en une projection cylindrique où les phosphates du squelette sont des cercles et les bases des rectangles. De part et d'autre de la double hélice "aplatie", les résidus réalisant des contacts avec l'ADN sont indiqués. Les phosphates contactés par des résidus sont hachurés. Les résidus identiques dans les deux protéines sont encadrés en gras, les autres le sont en pointillé (Wolberger *et al*, 1991).

1) Le produit du gène MAT α 2 est le répresseur α 2 qui régule l'expression de gènes spécifiques du type cellulaire chez la levure (Wolberger *et al*, 1991). Il lie l'ADN grâce à un homéodomaine de 60 acides aminés formant 3 hélices α et un bras amino-terminal (figure 8). Les hélices 1 et 2, antiparallèles, se collent l'une à l'autre. L'hélice 3 est perpendiculaire aux deux premières hélices, et sa face hydrophobe forme avec les hélices 1 et 2 l'intérieur de la protéine. L'homéodomaine lie l'ADN comme un monomère en insérant la longue hélice 3 dans le sillon majeur, et le bras amino-terminal dans le sillon mineur adjacent.

Les contacts formés par l'homéodomaine MAT α 2 avec son site de liaison sont montrés schématiquement à la figure 8. Un total de quatre chaînes latérales entrent en contact avec les bases : trois de l'hélice 3 (Asn 51, Arg 54 et Ser 50) contactent les bases du sillon majeur, et une (Arg 7) du bras amino-terminal contacte deux bases dans le sillon mineur. Huit chaînes latérales additionnelles forment des contacts avec le squelette de l'ADN.

Une comparaison de ce complexe (figure 9) avec celui de l'homéodomaine engrailed-ADN révèle que les deux homéodomains (qui ont 27% d'identité au niveau de la séquence en acides aminés) sont de structure hautement similaire et présentent leur hélice de reconnaissance (hélice 3) à leur site de liaison de manière identique. En fait, sept des huit chaînes latérales contactant le squelette désoxyribonucléique dans le complexe MAT α 2-ADN sont identiques dans le complexe engrailed-ADN. De plus, un des résidus contactant une base (Asn 51-Ade) est conservé dans les deux protéines. Comme les deux homéodomains reconnaissent des sites *cis* différents, la spécificité de liaison doit venir des trois autres résidus contactant les bases dans le sillon majeur (Ser 50 et Arg 54) et le sillon mineur (Arg 7).

Les autres facteurs *trans* liant l'ADN grâce à un homéodomaine doivent probablement être orientés de manière similaire sur leurs sites de liaison. En effet, le résidu Asn 51 (contacte une adénine) et les résidus Trp 48 et Arg 53 (contactent des phosphates du squelette) sont invariants dans tous les homéodomains connus. Cinq autres contacts avec le squelette sont hautement conservés. Ces contacts doivent servir à ancrer l'homéodomaine sur l'ADN dans une position permettant à l'hélice 3 et au bras N-terminal de rentrer respectivement dans le sillon majeur et mineur.



figure 10) Représentation des 3 doigts C_2H_2 de Zif 268 qui interagissent dans le sillon majeur de l'ADN. Chaque doigt est représenté par le brin β suivi de l'hélice α . L'ion zinc n'est pas représenté (Angrand, 1993).

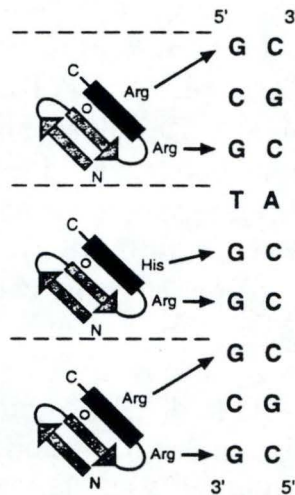


figure 11) Résumé des contacts entre les 3 doigts de Zif 268 et l'ADN. Dans chaque doigt de Zif268, l'arginine (Arg) qui précède l'hélice α est responsable d'un contact avec une base (guanine). Ce contact est aidé par le deuxième résidu de l'hélice α qui est un acide aspartique. Dans le deuxième doigt, une histidine (His), en position 3 de l'hélice α , contacte une base (guanine). Le sixième résidu, arginine, de l'hélice 1 et de l'hélice 3 réalise aussi un contact avec une guanine (Angrand, 1993)

2) La protéine Zif268 (Krox 24) est une protéine doigt à zinc de la famille des C_2H_2 (Kaptein, 1991). Elle contient trois doigts qui lient l'ADN dans le sillon majeur (figure 10). Chaque doigt s'arrime à l'ADN de manière similaire, et contacte des sous-sites de 3 paires de bases. Les trois doigts de Zif268 entrent donc en contact avec une séquence de 9 paires de bases adjacentes (figure 11).

Tous les contacts impliquent des ponts hydrogènes avec des guanines du site de liaison (5'-GCGTGGGCG-3'). Le peptide lie l'extrémité 3' avec le doigt 1 et aucun des doigts de Zif268 ne contacte les trois bases de sa cible. Toutefois, le résidu précédant l'hélice α contacte la troisième base (5' _ _ G), le troisième résidu de l'hélice α (ici, l'hélice 2) peut contacter la deuxième base (5' _ G _), et le sixième résidu de l'hélice α contacte la première base (5'G _ _). Ce modèle de liaison simple reflète le fait que chaque doigt de Zif268 s'ancre sur l'ADN de manière très similaire. Il n'y a cependant aucune raison de croire que toutes les protéines à doigt de zinc de type C_2H_2 interagissent avec l'ADN selon ce modèle de liaison simple. En effet, la détermination de la structure cristallographique des cinq doigts à zinc de GLI, un oncogène humain, apporte de nouvelles données sur les interactions doigt à zinc-ADN (Pavletich et Pabo, 1993).

3) La protéine transactivatrice de levure GAL4 (famille C_6) reconnaît son site *cis* grâce à un module de reconnaissance, où deux ions métalliques sont coordonnés tétrahédriquement par six cystéines (figure 12) (Marmorstein *et al*, 1992).

GAL4 se lie en tant que dimère à une séquence de 17 paires de bases. Le domaine liant les ions zinc, à l'extrémité amino-terminale de chaque sous-unité, se trouve en contact dans le sillon majeur de l'ADN avec 3 paires de bases CCG aux extrémités du palindrome. Un linker de neuf résidus connecte le domaine métallique à une hélice α amphipatique. Cette dernière forme une bobine "bobinée" (coil coiled) par interactions hydrophobes avec l'hélice α de l'autre sous-unité et permet la dimérisation.

Considérons une sous-unité avec son domaine de liaison métallique centré sur un triplet conservé CCG (paires de bases 6 à 8, avec la base centrale du palindrome numérotée 0). Ce sont les résidus lysine 17 et lysine 18 qui contactent le triplet. De manière assez surprenante, deux de ces trois bases sont contactées par des carbonyles de la chaîne principale. La stabilisation de GAL4 sur son site de liaison doit sans doute provenir de contacts entre les phosphates du squelette et des chaînes latérales du domaine de liaison métallique, du linker et de l'élément de dimérisation.

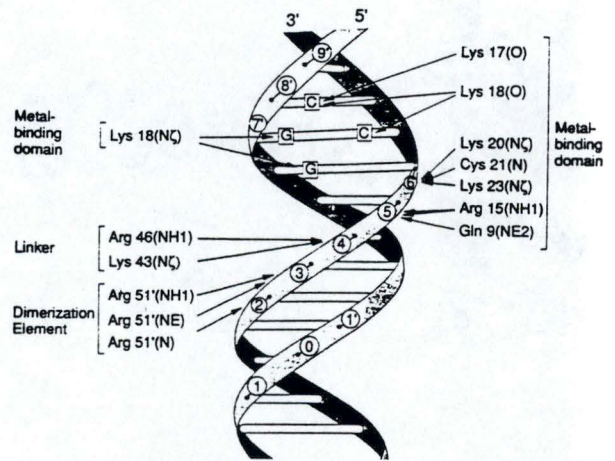
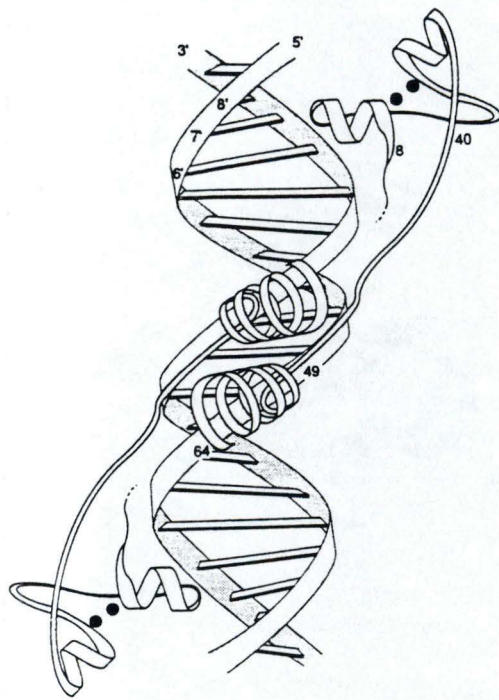


figure 12) Structure du domaine de liaison de GAL4.

- Un monomère est constitué de 3 sous-unité : un module de reconnaissance, où 6 cystéines coordonnent deux ions zinc (figure 5), est suivi d'un "linker" et d'un élément de dimérisation.

- Résumé des contacts entre un monomère de GAL4 et les bases d'un demi site de liaison (Marmorstein *et al*, 1992)

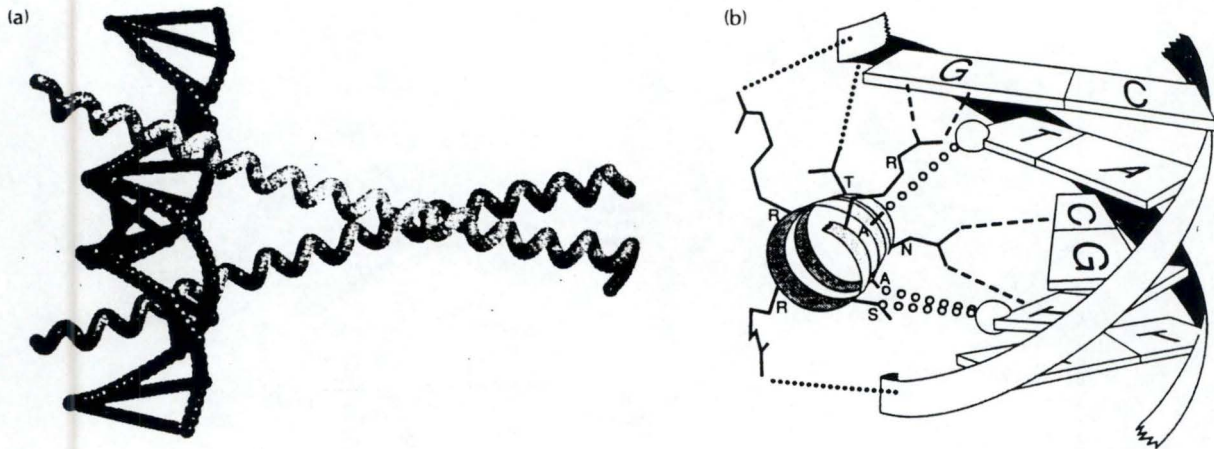


figure 13) La protéine bZIP GCN4.

A) Structure du complexe GCN4-ADN. La région de dimérisation des monomères (à droite) est perpendiculaire à l'ADN, tandis que chaque hélice se courbe légèrement dans sa partie NH₂-terminale pour contacter correctement son demi site.

B) Représentation des contacts établis entre les bases d'un demi site et les résidus d'un monomère. Les lignes discontinues indiquent les ponts hydrogènes avec les bases; les lignes pointillées montrent les ponts hydrogènes avec les phosphates du squelette de l'ADN, et les lignes de cercles ouverts indiquent les interactions de van der Waals (Wolberger, 1993).

4) L'activateur transcriptionnel de levure GCN4 est une des trente protéines eucaryotiques connues liant l'ADN par une région basique, et se dimérisant par une tirette à leucine (bZIP) (Ellenberger *et al.*, 1992). Le dimère bZIP est une paire d'hélices α continue formant une "bobine bobinée" du côté carboxy-terminal qui est perpendiculaire à l'axe de la double hélice (figure 13). Les vingt-cinq résidus du côté amino-terminal de chaque monomère passent à travers le sillon majeur, où s'établissent des contacts avec les bases. La séquence, de neuf paires de bases, contactée consiste en deux sites ATGA palindromiques, séparés par une paire de bases GC. Dans la région basique :

- un résidu conservé dans la famille des bZIP (Asparagine 235 = N), contacte la cytosine 2 et la thymine 3 par ponts hydrogènes.
- l'alanine (A) 238 et l'alanine 239 sont respectivement en contact van der Waals avec les groupements méthyl de la thymine 3 et de la thymine 1.
- une sérine (S) en position 242 contacte aussi la thymine 3 par interaction van der Waals.
- la guanine de la paire de base centrale est contactée par l'arginine 243 (R) (pont hydrogène).

GCN4 forme des contacts additionnels avec des phosphates du squelette de l'ADN.

1.2.d. Domaines activateurs

Les motifs liant l'ADN sont nécessaires mais pas suffisants pour la transactivation. Pour activer la transcription, chacune des protéines liant l'ADN possède un ou plusieurs domaines que l'on nomme domaine activateur.

1) Le domaine riche en glutamines, trouvé entre autres dans les protéines suivantes : Sp-1, Oct-1, Oct-2, HAP 1, HAP 2, MIG-1, *Antennapedia*, *ultrabithorax* et AP-2. Pour Sp-1 par exemple, deux des quatre régions importantes pour l'activation transcriptionnelle comportent 25% de résidus glutamine (Mitchell et Tjian, 1989).

2) Le domaine riche en prolines (ex.: CTF/NF-1, AP-2, Jun, Oct-2 et SRF) où 25% des résidus sont des prolines (Mermoud *et al.*, 1989).

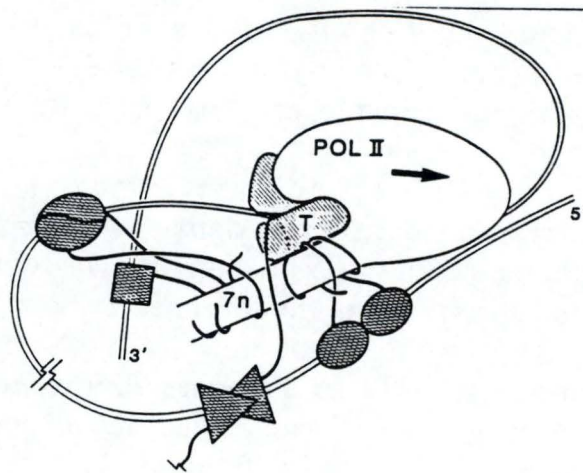


figure 14) Représentation des interactions hypothétiques entre le domaine COOH-terminal de l'ARN polymérase II (7n) et les "nouilles négatives" des activateurs de la transcription (Sigler, 1988).

3) Le domaine riche en sérines et thréonines est retrouvé entre autres dans la séquence de Pit-1 et d'autres protéines POU.

4) Les membres de la plus grande famille de domaine d'activation connu sont définis par leurs richesses en résidus acides, mais ont très peu de similitude de séquence. Il s'agit du domaine activateur acide (D.A.A.). Cette surface d'activation est censée contacter un ou plusieurs facteurs généraux (voir au point 1.7.) pour activer la transcription. Pour comprendre les détails de ces interactions, il faut caractériser la structure du D.A.A.. Deux modèles généraux existaient jusqu'il y a peu :

Ptashne et ses collaborateurs suggèrent que le D.A.A. forme une hélice α amphipatique dans laquelle les résidus acides sont alignés sur une face de l'hélice (Giniger et Ptashne, 1987; Ma & Ptashne, 1987; Ptashne, 1988). Il peut alors y avoir interaction avec une région positive sur une protéine cible pour activer la transcription.

Une autre hypothèse, proposée par Sigler (1988), suggère que le D.A.A. est non structuré. Il interagirait avec sa cible par interaction ionique. Selon lui, la machinerie moléculaire qui contrôle la transcription des gènes par l'ARN polymérase II est basée sur des composants presque sans forme : les "nouilles" négatives. Dans son modèle, on peut imaginer que ces "nouilles" négatives s'accrocheraient au domaine carboxy-terminal (CTD), hydrophile et donc protrudant, de l'ARNpII (figure 14). La phosphorylation (voir 1.4.) du CTD libérerait l'ARNpII des "nouilles" négatives.

Tout récemment, les équipes de Johnston (Leuther *et al*, 1993; Van Hoy *et al*, 1993) proposent un modèle structural différent pour le D.A.A. de GAL4. Ils suggèrent une structure en feuillet β , où une face interagit avec un facteur de la transcription par interaction hydrophobe et où l'autre face est le site de liaison du régulateur négatif de GAL4, GAL80.

Ces nouvelles considérations sur le D.A.A. montrent bien la nécessité d'études physiques et génétiques détaillées pour élucider le mécanisme d'activation de la transcription chez les eucaryotes.

Assemblage des GTFs

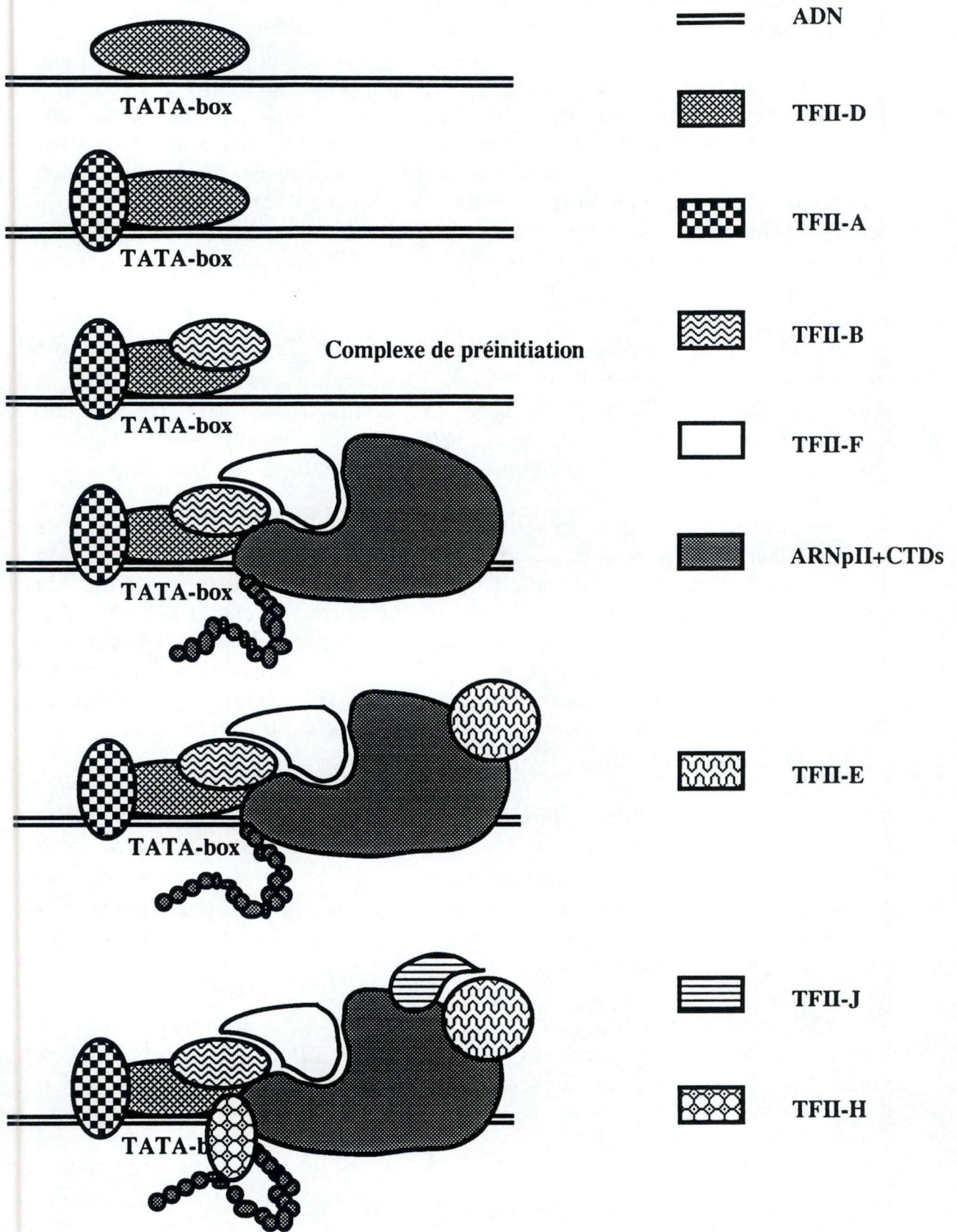


figure 15) Assemblage séquentiel des GTFs et de l'ARNpII pour former le complexe d'initiation de la transcription (voir texte) (adapté de Drapkin *et al*, 1993).

1.3. L'ARN polymérase II (Drapkin *et al*, 1993)

L'ARNpII est une enzyme complexe de masse moléculaire relative d'environ 500.000 et composée d'au moins dix sous-unités. Une caractéristique unique de l'ARNpII est le domaine répétitif carboxy-terminal (CTD) de la plus grosse sous-unité qui est une succession en tandem d'un heptapeptide de séquence Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser que l'on ne retrouve ni chez les polymérases procaryotiques, ni chez les ARN polymérases I et III eucaryotiques. Le nombre de répétition varie de 25, chez les eucaryotes inférieurs, à 52 chez les mammifères. Ce domaine peut être phosphorylé et donner naissance à deux formes d'ARNpII distinguables sur SDS-PAGE.

1.4. Facteurs généraux de la transcription (Corden, 1993)

Chez les procaryotes, la polymérase n'est aidée que par le facteur sigma pour la recherche du promoteur cible. Mais chez les eucaryotes, cette fonction est réalisée par plusieurs facteurs auxiliaires ou facteurs généraux de la transcription (GTF). Ces facteurs se lient au promoteur et créent un complexe nucléoprotéique stable qui est reconnu par la polymérase II. Donc, l'ARNpII reconnaît le promoteur par interaction protéine-protéine plutôt que par liaison à l'ADN (figure 15).

C'est grâce à ces facteurs généraux (TFIIA, IIB, IID, IIE, IIF, IIH, IJJ, pour transcription factor for RNA pol II) que l'ARNpII pourra exercer son rôle transcriptionnel. Le premier événement dans l'établissement d'un complexe d'initiation stable est la liaison de TFIID (l'unique GTF ayant une activité de liaison spécifique à l'ADN) à la TATA box. En fait, TFIID est un complexe protéique composé d'une sous-unité TATA-Binding Protein (TBP) et de facteurs associés ou TAFs (pour TBP-Associated Factors). TFIIA vient alors s'associer à TBP et stabilise le complexe ADN-TFIID. Ensuite, TFIIB se lie à TFIID pour former un complexe de préinitiation (DAB) qui permettra l'entrée de l'ARNpII et des derniers GTFs. C'est TFIIF qui médie l'entrée de l'ARNpII dans le complexe et la liaison est stabilisée par TFIIB. Ceci ne conduit pas directement à l'initiation car il faut attendre la venue des trois facteurs additionnels, TFIIE, TFIIH et TFIIJ pour initier le processus. Il a été suggéré que la forme non phosphorylée de l'ARNpII (ARNpIIA) entrait dans le complexe DAB. Sa conversion en forme phosphorylée (ARNpIIO) se produit ensuite, probablement grâce à l'activité kinase de TFIIH, permettant ainsi à l'ARNpIIO de quitter le promoteur et de transcrire le gène en aval.

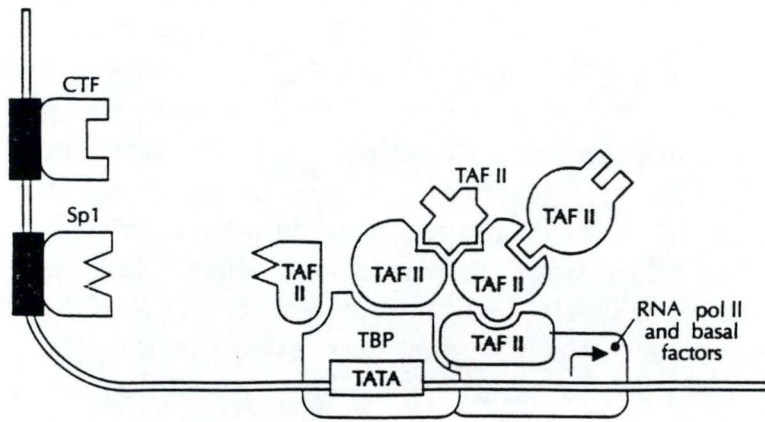


figure 16) Représentation schématique du rôle de coactivation joué par les facteurs associés à la TATA-box binding protein (TAFs) lors d'interactions protéines-protéines (Gill et Tjian, 1992).

Les GTFs et l'ARNpII assurent une transcription basale du gène. On observe que le niveau de la transcription varie grâce à la liaison de facteurs sur les UPE.

1.5. Les coactivateurs (Gill et Tjian, 1992)

On remarque que TBP purifié ne remplit pas toutes les fonctions de la fraction dont il provient (TFIID). TBP peut lier la TATA box et interagir avec les autres GTFs pour former le complexe d'initiation de la transcription. Néanmoins ce complexe ne possède qu'une activité basale qui n'est pas stimulable par d'autres facteurs liant les UPE (ex: Sp-1, CTF ou Gal 4). Ceci est dû à l'absence d'autres composants que l'on trouve dans TFIID et qui joueraient un rôle de coactivation (figure 16). Ce sont les facteurs associés à la TBP (les TAFs) qui par interaction TBP-TAF ou TAF-TAF permettent aux facteurs liant les UPE de contacter l'appareil de transcription basale et d'augmenter le taux de transcription.

1.6. Modulation de l'activité des facteurs de la transcription

Les facteurs de la transcription permettent donc de transcrire préférentiellement un gène par la liaison à des séquences *cis* du promoteur de ce gène. En outre, quelques phénomènes particuliers peuvent se produire pour moduler la transcription.

1.6.a. Association entre facteurs transcriptionnels et non transcriptionnels

Le facteur transcriptionnel *dorsal* (nom venant d'une mutation loss-of-function) est une protéine qui permet le développement des tissus ventraux lors de l'établissement de la polarité dorso-ventrale chez la drosophile. *Dorsal* se trouve dans le cytoplasme, liée à la protéine non transcriptionnelle *cactus*. Un signal émis par les cellules folliculaires maternelles induit la dissociation du complexe *cactus-dorsal*. *Dorsal* migre ensuite vers le noyau et active les gènes assurant la ventralisation (Lawrence, 1992).

Il en va de même pour NF- κ B (structuralement homologue à *dorsal*) qui reste dans le cytoplasme complexé à la protéine I κ B. Ce complexe ne se dissociera que sous la stimulation par la protéine kinase C, permettant à NF- κ B d'entrer dans le noyau et d'agir sur ses gènes cibles (Mitchell et Tjian, 1989).

1.6.b. Association de facteurs transcriptionnels entre eux

La protéine POU Oct-1 se lie sur le motif octamérique ATGCAAAT, mais ne possède pas de domaine activateur intrinsèquement actif. Lors de l'infection par le virus "Herpes Simplex", la protéine VP16, ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, interagit avec la protéine Oct-1 pour activer la transcription des gènes. VP16 apporte un motif activateur à Oct-1 qui permet à ce dernier d'activer la transcription de gènes (Cleary *et al*, 1993).

1.6.c. Dimérisation de facteurs (Baxevanis et Vinson, 1993)

Les protéines possédant une région basique jouxtant une tirette à leucines (bZip), un motif Helix-Loop-Helix (bHLH) ou un motif Helix-Loop-Helix-tirette à leucines (bHLH-Zip), lient l'ADN à l'état de dimère. La famille des bZIP (basic-region leucine-zipper) est constituée de facteurs transcriptionnels de levure (ex.: GCN4), de drosophile (ex.: giant), de mammifères (ex.: C/EBP, c-Jun et c-Fos) et de plantes (ex.: TGA1a).

La famille des bHLH (basic-region Helix-Loop-Helix) comprend entre autres le facteur de détermination musculaire MyoD, les protéines liant l'enhancer des chaînes Kappa des immunoglobulines E12 et E47 ainsi qu'un facteur responsable (en partie) de l'établissement des métamères chez la drosophile : Hairy. La nouvelle famille des bHLH-ZIP (basic-region Helix-Loop-Helix leucine-zipper) est jusqu'à présent représentée par les oncogènes Myc et Max.

Par leur séquence primaire, ces protéines (bZIP, bHLH et bHLH-Zip) engendrent la formation d'hélices alpha amphipathiques et se dimérisent par interaction des motifs HLH et/ou leucine-zipper de deux monomères. Ceci produira une configuration particulière permettant l'interaction de la région basique (b) avec l'ADN.

Notons que ces dimérisations peuvent se faire avec le même partenaire (homodimérisation) ou avec un partenaire différent (hétérodimérisation). De plus, des interactions inhibitrices au point de vue transcriptionnel peuvent se produire entre une protéine bHLH et une protéine bZIP. En effet, l'interaction de MyoD (bHLH) avec c-Jun (bZIP) a une action négative sur la transcription.

On se rend donc bien compte que la dimérisation est une façon simple d'accroître le répertoire des potentialités régulatrices des facteurs transcriptionnels.

1.6.d. Modifications post-traductionnelles

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui se produit sur les sérines et les thréonines de certaines protéines de liaison à l'ADN (Sp-1, AP-1, CTF/NF-1 et HNF-1) (Jackson et Tjian, 1988; Lichtsteiner et Schibler, 1989; Haltiwanger *et al.*, 1992)). Ces groupements N-acétylglucosamine ajoutés sur ces facteurs pourraient servir :

- de signal de translocation nucléaire,
- à moduler la capacité transactivatrice,
- à contacter la machinerie transcriptionnelle,
- ou à masquer des sites de phosphorylation.

La phosphorylation permet aussi de moduler l'activité des facteurs transcriptionnels (Hunter et Karin, 1992; Meek et Street, 1992). En effet, la translocation nucléaire d'un facteur cytoplasmique, la liaison d'un facteur à l'ADN ou l'activation d'un facteur peut dépendre d'un jeu de phosphorylations et de déphosphorylations. Le facteur c-Jun, appartenant à la famille des leucine zipper, possède juste à côté du domaine de liaison trois résidus (thréonine 231, sérine 243 et sérine 249) dont la phosphorylation empêche la liaison à l'ADN. Par contre, c-Jun n'active la transcription que si les sérines 63 et 73 de son domaine d'activation sont phosphorylées. Donc, pour c-Jun il faut une déphosphorylation pour assurer la liaison et une phosphorylation pour permettre l'activation.

D'autres situations existent où, un certain nombre de facteurs (c-Fos, Myc, Myb, CREB, NF- κ B...), sont pris pour cibles par différentes kinases. Ceci nous montre la complexité du phénomène de phosphorylation des protéines nucléaires dans la différenciation, le développement et la transformation cellulaire.

1.6.e. La chromatine (Felsenfeld, 1992)

L'ADN du chromosome eucaryotique est condensé plus de 100.000 fois par l'effet cumulé de plusieurs niveaux d'enroulement et de repliement. A l'intérieur de cette structure, l'ADN est enroulé autour de noyaux d'histones; le complexe histone-ADN est appelé nucléosome. L'organisation nucléosomique diffère selon que la chromatine est dans une configuration "ouverte" c'est-à-dire transcriptionnellement active, ou bien dans une configuration "fermée" c'est-à-dire transcriptionnellement inactive. Cette organisation nucléosomique semble donc déterminante dans la capacité qu'a un gène à être transcrit.



Initial factor binding to a nucleosome core creates a ternary complex



Additional factors may bind the ternary complex



Nucleosome displacement onto histone-binding components allows the binding of additional factors

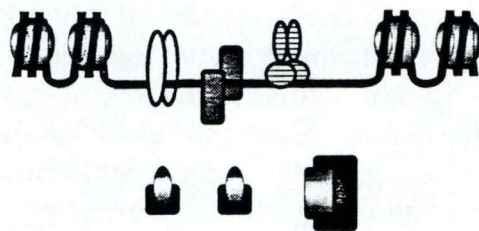


figure 17) Modèle hypothétique du déplacement des nucléosomes par des facteurs de transcription (Adams et Workman, 1993).

En effet, ceci peut représenter un obstacle important aux interactions *cis-trans* permettant l'initiation de la transcription.

Pour que les facteurs de la transcription puissent interagir avec le promoteur, il faut arriver à déplacer les nucléosomes (figure 17). A l'heure actuelle, on imagine, sur base de modèles *in vitro*, un mécanisme en deux étapes où la formation d'un complexe ternaire (ADN-histones-facteurs) serait suivie d'un déplacement des histones sur des molécules acceptrices. On ne connaît que peu de facteurs liant l'ADN qui peuvent former des complexes ternaires. Le récepteur aux glucocorticoïdes, TFIIA et GAL 4 en sont capables. De tels complexes peuvent faciliter la liaison de facteurs supplémentaires ou peuvent déstabiliser les histones afin de les déplacer et de libérer le promoteur (Adams et Workman, 1993).

1.6.f. La méthylation de l'ADN

Dans le génome animal, la méthylation ne se produit qu'en position 5 de la cytosine (m5C) du dinucléotide CpG. Chez les mammifères, environ 70% des CpG sont méthylés. On suppose que la méthylation intervient dans :

- la répression des gènes sur le chromosome X inactif,
- la transition de l'ADN-B vers l'ADN-Z,
- l'empreinte génomique qui distingue les allèles parentaux
- et dans la régulation génique.

Pour ce qui est de la régulation génique, on pense que la méthylation de l'ADN réprime la transcription en empêchant la liaison directe des facteurs de la transcription au promoteur (perte de la reconnaissance du site par modification) ou bien par la liaison de protéines à l'ADN méthylé. De telles protéines existent; on connaît les methyl CpG-binding proteins (MeCP) et les methylated DNA-binding proteins (MDBP) (Lewis et Bird, 1991; Tate et Bird, 1993).

1.6.g. Le superenroulement (Kamenetskii, 1989)

On a longtemps pensé que le superenroulement que l'on peut observer sur la double hélice était un obstacle potentiel à l'avancée de l'ARNpolymérase, et donc à la transcription.

Néanmoins, la cellule possède, pour contrecarrer ces problèmes de superenroulement, une enzyme qui s'appelle l'ADN topoisomérase I. Chez les eucaryotes, elle peut enlever les superenroulements positif et négatif.

De plus, si on examine le processus d'élongation de la transcription, on voit que lorsque l'ARNpolymérase migre de 5' vers 3' pour synthétiser l'ARN, elle doit désappairier la double hélice. L'ADN déjà transcrit est désapparié ou négativement superenroulé. Par contre, devant le complexe d'élongation, l'ADN devient positivement superenroulé et freine l'avancée de ce complexe.

Le superenroulement et la transcription dépendent donc l'un de l'autre.

1.6.h. Les régulateurs négatifs (Drapkin *et al*, 1993)

Il est maintenant clair que cette famille croissante de régulateurs négatifs interagit avec la machinerie de la transcription basale pour réduire sa capacité transcriptionnelle. Parmi ces répresseurs, on connaît Dr1 et Dr2 ainsi que NC1 et NC2, tous décrits chez les mammifères.

Dr1 est une phosphoprotéine nucléaire de 19 kDa qui interagit directement avec la TATA Binding Protein (TBP) et empêche la liaison sur ce dernier de TFIIB. Ceci réprime la transcription. Cette inhibition peut toutefois être levée par E1A, une protéine transactivatrice d'adénovirus, et par l'antigène T de SV40 qui déplacent Dr1 de TBP. Des observations similaires ont été réalisées pour les régulateurs négatifs NC1 et NC2 qui interagissent aussi avec TBP. Les effets de NC1 et NC2 peuvent être éliminés par les activateurs USF et Sp1. Il en va de même pour Dr2 dont la liaison à TBP est levée en présence d'activateurs (voir 1.7.).

Par ailleurs, on vient de montrer un rôle direct de Myc dans l'initiation de la transcription (Roy *et al*, 1993a et 1993b). Myc interagit avec TFII-I, un facteur d'initiation de la transcription qui se lie sur l'initiateur (Inr) quand il est présent. Ceci conduit à une inhibition de l'initiation de la transcription. Par contre, les promoteurs ne contenant pas d'élément initiateur seront activés par Myc.

Tout comme les nucléosomes étaient déplacés pour libérer les sites *cis*, l'effet des régulateurs négatifs est contrecarré par des activateurs. Ce phénomène est appelé antirepression.

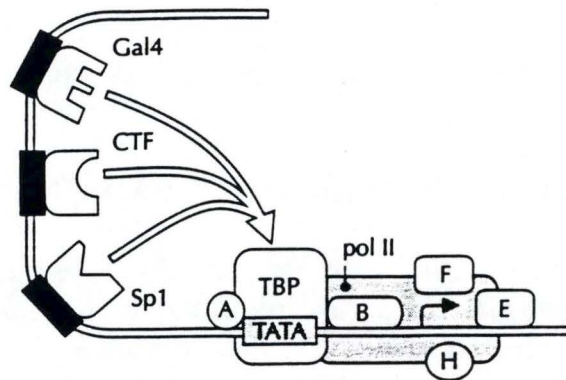


figure 18) Complexe d'initiation de la transcription activé.

La courbure de l'ADN permet les interactions entre les domaines activateurs des facteurs trans et le complexe d'initiation de la transcription basale (Gill et Tjian, 1992)

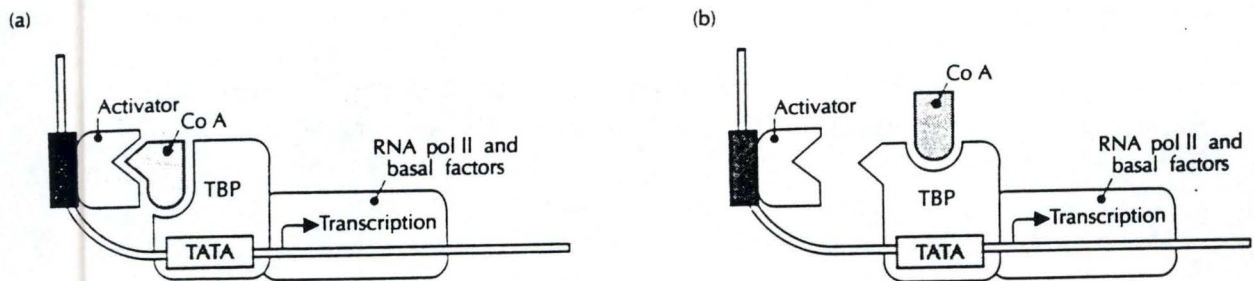


figure 19) Représentation des deux modèles de la coactivation.

a) le coactivateur (CoA) connecte directement l'activateur aux facteurs généraux (GTFs).

b) le coactivateur sert à propager l'effet résultant de l'interaction directe de l'activateur avec les GTFs (Gill et Tjian, 1992).

1.7. Modèle moléculaire de l'activation de la transcription

Nous avons vu que le promoteur d'un gène est une région amont où atterrissent des facteurs de la transcription qui influencent la fréquence d'initiation de la transcription. Ces protéines agissent sur l'activité d'une enzyme responsable de la transcription d'un gène en ARN, l'ARN polymérase. Comment est-ce possible ?

Plusieurs modèles ont été avancés pour tenter d'expliquer le mécanisme moléculaire de la transcription (Ptashne, 1986). Il s'agit du "twisting" ou modèle de la déformation de l'ADN, du "sliding" ou glissement des facteurs *trans*, de l'"oozing" ou la procession de facteurs *trans* de la séquence de contrôle jusqu'au gène et du "looping" ou courbure de l'ADN.

Le quatrième modèle est toujours d'actualité. Ce modèle du looping prédit que des protéines séparées sur l'ADN peuvent interagir par une courbure de la double hélice (figure 18) qui réunit les facteurs *trans*, les facteurs généraux et l'ARNpII dans une sorte de "transcriptosome" aussi complexe que le réplisome (Klug, 1993).

Des études récentes ont montré des interactions spécifiques et directes entre des activateurs et certains GTF (TFIIB, TBP et TFIID) (Drapkin *et al*, 1993; Hahn, 1993). Si on crée des mutations dans le domaine acide d'un activateur, on réduit l'activation de la transcription et on diminue aussi l'interaction avec le GTF. De plus, des mutations de résidus spécifiques de GTF qui éliminent l'interaction avec l'activateur acide, abolissent l'activation de la transcription, mais ont peu d'effet sur la transcription basale. Donc, des contacts, directs ou indirects, entre les composants de la machinerie basale (GTF) et des activateurs de la transcription (facteurs *trans*) sont nécessaires.

Par ailleurs, en plus des activateurs et des facteurs généraux de la transcription, des coactivateurs sont nécessaires pour obtenir une stimulation de la transcription. Deux modèles (Gill et Tjian, 1992) non exclusifs et basés sur le looping existent (figure 19) :

- le coactivateur (CoA) peut servir de pont moléculaire pour connecter l'activateur et les facteurs généraux.
- le coactivateur n'interagit pas directement avec l'activateur. Il est néanmoins nécessaire pour propager l'effet d'une interaction directe entre l'activateur et un facteur général.

Ce processus d'initiation de la transcription repose sur un réseau complexe d'interactions entre activateurs, régulateurs négatifs, coactivateurs et facteurs généraux sur l'ADN enroulé autour de noyaux d'histones et soumis à la méthylation.

Une étude récente sur le régulateur négatif Dr2 permet de proposer un modèle attrayant (Merino *et al*, 1993). En effet, la purification de cet inhibiteur, se liant à TBP et empêchant la formation du complexe de préinitiation DAB, a montré qu'il s'agit en fait de l'ADN topoisomérase I eucaryote (voir superenroulement). Cette même étude montre que l'effet inhibiteur de Dr2/hTopoI est levé (antirepression) par un domaine activateur acide, riche en proline ou riche en glutamine.

Les auteurs postulent que l'ADN topoisomérase I humaine fixée sur TBP a deux destins :

1) En l'absence d'activateur, Dr2/hTopoI reste fixé à la TATA Binding Protein. TFIIA ne pouvant venir stabiliser TFIID, le complexe de préinitiation ne peut se former. Cette interaction induit la répression de la transcription.

2) Mais en présence d'activateur (riche en proline, riche en glutamine ou acide), le phénomène d'antirepression se produit : l'ADN topoisomérase I est déplacée de TBP vers le futur complexe d'élongation. Cette translocation permet :

- la liaison des autres facteurs généraux et donc l'initiation de la transcription,
- l'accomplissement efficace de l'élongation puisque les problèmes topologiques créés par l'avancée de l'ARNpII sont annulés par la présence de l'ADN topoisomérase I.

Il est maintenant clair que le processus de l'activation de la transcription implique au moins deux étapes indépendantes. La première étape consiste en un déplacement des molécules (histones, régulateurs négatifs) qui maintiennent les gènes inactifs. C'est l'antirepression. La deuxième étape, ou activation réelle, consiste en une augmentation du taux d'expression de gènes particuliers. Ces deux étapes se produisant principalement par contacts protéiques grâce à la courbure de l'ADN.

Glycolysis

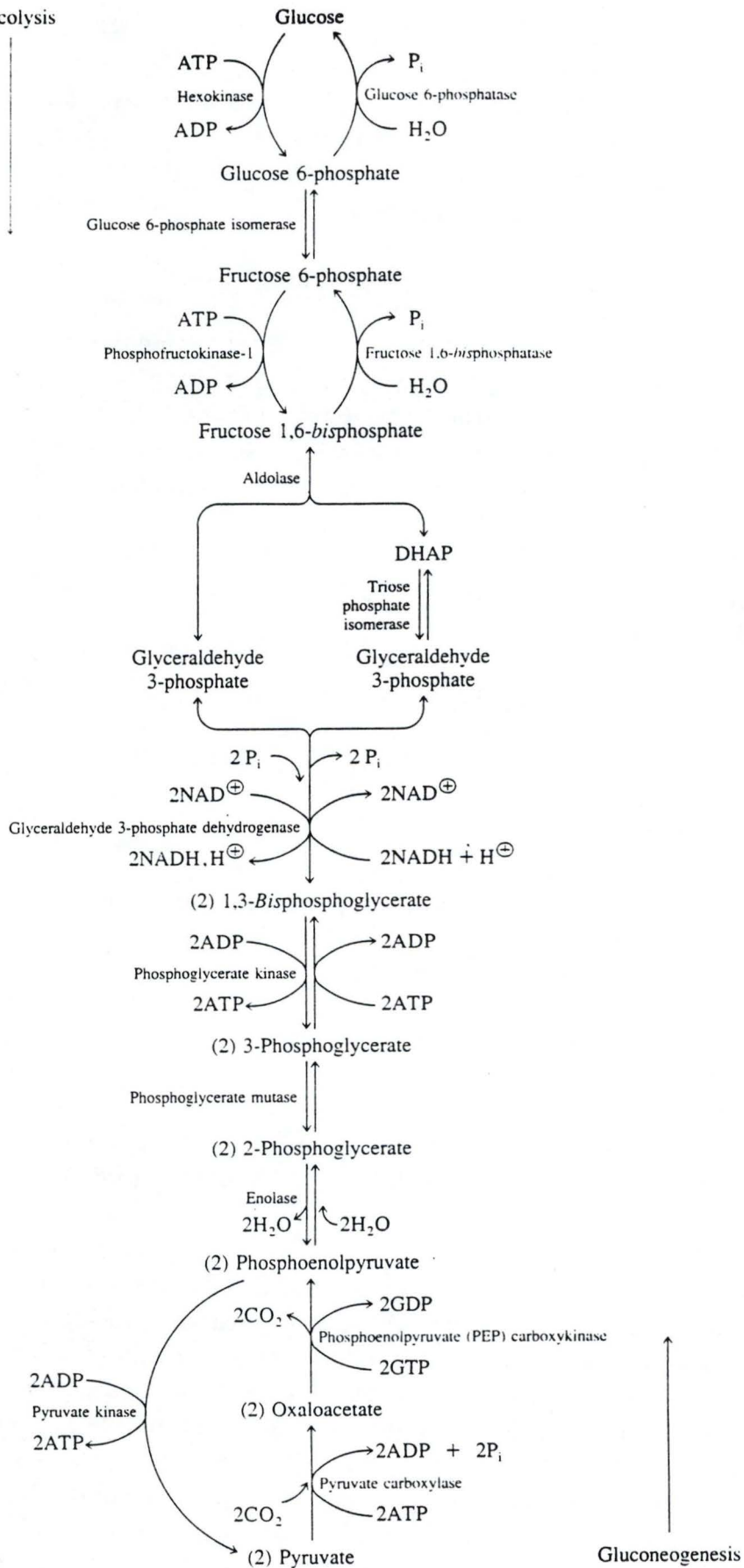


figure 20) La glycolyse et la gluconéogenèse.

Dans les 5 premières étapes (1^{er} tronçon) de la glycolyse, le glucose est scindé en deux trioses-phosphate grâce à deux molécules d'ATP. Dans le 2^e tronçon, de l'ATP et du NADH sont produits au cours de la transformation des trioses-phosphate en pyruvate (Rawn, 1991).

2. LE SYSTEME PFK-2/FBPase-2 : (Rousseau et Hue, 1993)

2.1. La Glycolyse

La glycolyse est la voie du catabolisme du glucose dans toutes les cellules. Elle est composée de dix réactions enzymatiques grâce auxquelles la cellule convertit le glucose en pyruvate en produisant deux molécules d'ATP et de NADH (figure 20). En anaérobiose, le pyruvate produit est réduit et le NAD^+ régénéré. En aérobie, l'oxydation du pyruvate dans le cycle de Krebs génère des réducteurs qui transformeront leur "énergie" en un gradient de protons capable de créer de l'ATP. La glycolyse fournit donc à la cellule de l'énergie grâce au catabolisme du glucose. Toutefois, elle joue aussi un rôle anabolique par la formation de précurseurs en C3 pour la synthèse d'acides aminés, d'acides gras et de cholestérol. C'est donc une voie amphibolique très importante. De plus, certaines cellules (foie, rein, intestin grêle) peuvent produire du glucose grâce à la voie inverse qui est la gluconéogenèse.

2.2. Le Fructose-2,6-bisphosphate

L'équilibre de la troisième étape de la glycolyse est en faveur de la formation de fructose-1,6-bisphosphate et d'ADP à partir de fructose-6-phosphate et d'ATP. La 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), catalysant cette étape d'engagement dans la glycolyse est donc une enzyme-clé dans le contrôle de cette voie.

A l'opposé de l'action inhibitrice de l'ATP (effet Pasteur), le fructose-2,6-bisphosphate est le stimulateur principal de la PFK-1. De plus, l'étape correspondante dans la gluconéogenèse, c'est-à-dire la conversion du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate qui est catalysée par la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase-1), est inhibée par le fructose-2,6-bisphosphate. Outre le fait que cette molécule est décelée chez tous les eucaryotes, elle est active (c'est-à-dire qu'elle augmente l'affinité de PFK-1 pour le fructose-6-phosphate) à des concentrations 1000 fois plus basses (μM) que celles des autres régulateurs de la PFK-1. L'étude du système enzymatique qui catalyse la biosynthèse et la biodégradation du fructose-2,6-bisphosphate prend donc tout son sens (Hue et Rider, 1987).

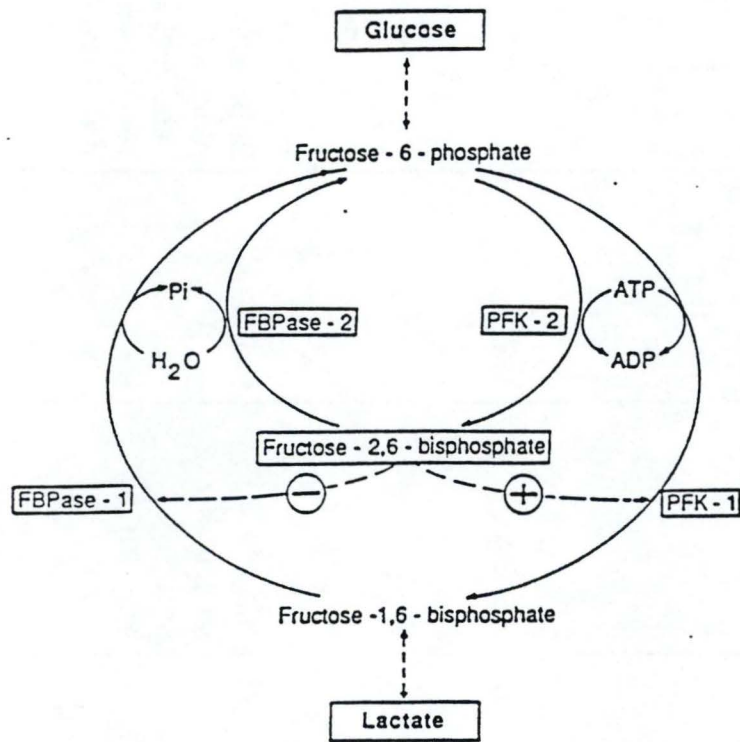


figure 21) La PFK-1 et la FBPase-1 sont les deux cibles principales du fructose-2,6-bisphosphate. Les traits pleins symbolisent les réactions chimiques, alors que les traits discontinus symbolisent les influences régulatrices.

Tableau I : caractéristiques des isozymes de la PFK-2/FBPase-2 de rat

	L	M	H	T	FTO-2B
<u>Rapport des activités</u> PFK-2/FBPase-2	1/1	1/10	100/1	4/1	4/1
<u>Effet de la PKA</u>					
PFK-2	↓	non P	↑	non P	=
FBPase-2	↑	non P	=	non P	=
<u>Sous-unités</u>					
M_r ($\times 10^{-3}$)	55	53	58 & 54	55	55
résidus (a.a.)	470	448	535 & 475	468	?
<u>mRNA</u>					
taille (kb)	2,1	1,9	7 & 4	2	2,2
augmenté par	gluco, T3, insuline				gluco, insuline
présent dans	foie < TAB > muscle	muscle > TAB	coeur testicules poumons cerveau reins	testicules	hepatôme placenta tissu foetaux cellules en prolifération
<u>gène</u>	A	A	B	C	A

Glucoc, glucocorticoïdes; T₃, triiodothyronine; TAB, tissu adipeux blanc; = , phosphorylé mais dans effet sur l'activité enzymatique; non P : non phosphorylé; ↑, la phosphorylation augmente l'activité enzymatique; ↓, la phosphorylation diminue l'activité enzymatique.

2.3. La 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase

La concentration en fructose-2,6-bisphosphate dépend de l'effet balancé des activités 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2), synthétisant le fructose-2,6-bisphosphate, et fructose-2,6-bisphosphatase (FBPase-2) catalysant sa dégradation (figure 21). Ces deux activités catalytiques n'étant pas séparables par purification, il s'agit d'une enzyme bifonctionnelle. Sa masse moléculaire relative de 110,000 provient de deux sous-unités identiques de masse moléculaire relative de 55,000 (isozyme hépatique) qui ont chacune les deux sites catalytiques.

2.3.a. Les isozymes de la PFK-2/FBPase-2

Plusieurs isozymes de la PFK-2/FBPase-2 ont été caractérisées sur base de leur distribution tissulaire, masse moléculaire, propriétés catalytiques et réponses à des kinases. Le tableau I reprend les caractéristiques des isozymes connus, à savoir, les isozymes du foie (L), du muscle squelettique (M), du coeur (H), du testicule (T) et de l'hépatome (F). Ces isozymes sont, du point de vue de la séquence en acides aminés, structuralement similaires. On repère quatre domaines, deux régulateurs et deux catalytiques (voir au point 2.4.a.).

2.3.b. Contrôle à court terme de la PFK-2/FBPase-2 dans le foie

Une telle enzyme bifonctionnelle, jouant un rôle prépondérant dans le devenir du glucose, nécessite un contrôle tout particulier de la part de la cellule.

La PFK-2/FBPase-2 est contrôlée par la concentration de ses substrats et ligands régulateurs ainsi que par modification covalente (phosphorylation). Mais, par l'existence de différentes isozymes, les réponses sont spécifiques des tissus (tableau I).

Lorsque la concentration en glucose sanguin est faible, le glucagon est synthétisé et secrété. Il active la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) qui phosphoryle la sérine en position 32 de l'isozyme L de la PFK-2/FBPase-2. Cette phosphorylation inactive la PFK-2 et active la FBPase-2. La concentration en fructose-2,6-bisphosphate diminue et la gluconéogenèse s'enclenche.

Le citrate est un ligand régulateur de la PFK-2/FBPase-2. Sa concentration augmente lorsque des substrats oxydables autres que le glucose (acides gras, lactate ou corps cétoniques) sont fournis au tissu. Le citrate inhibe ainsi la PFK-2.

gluconeogenic state

glycolytic state

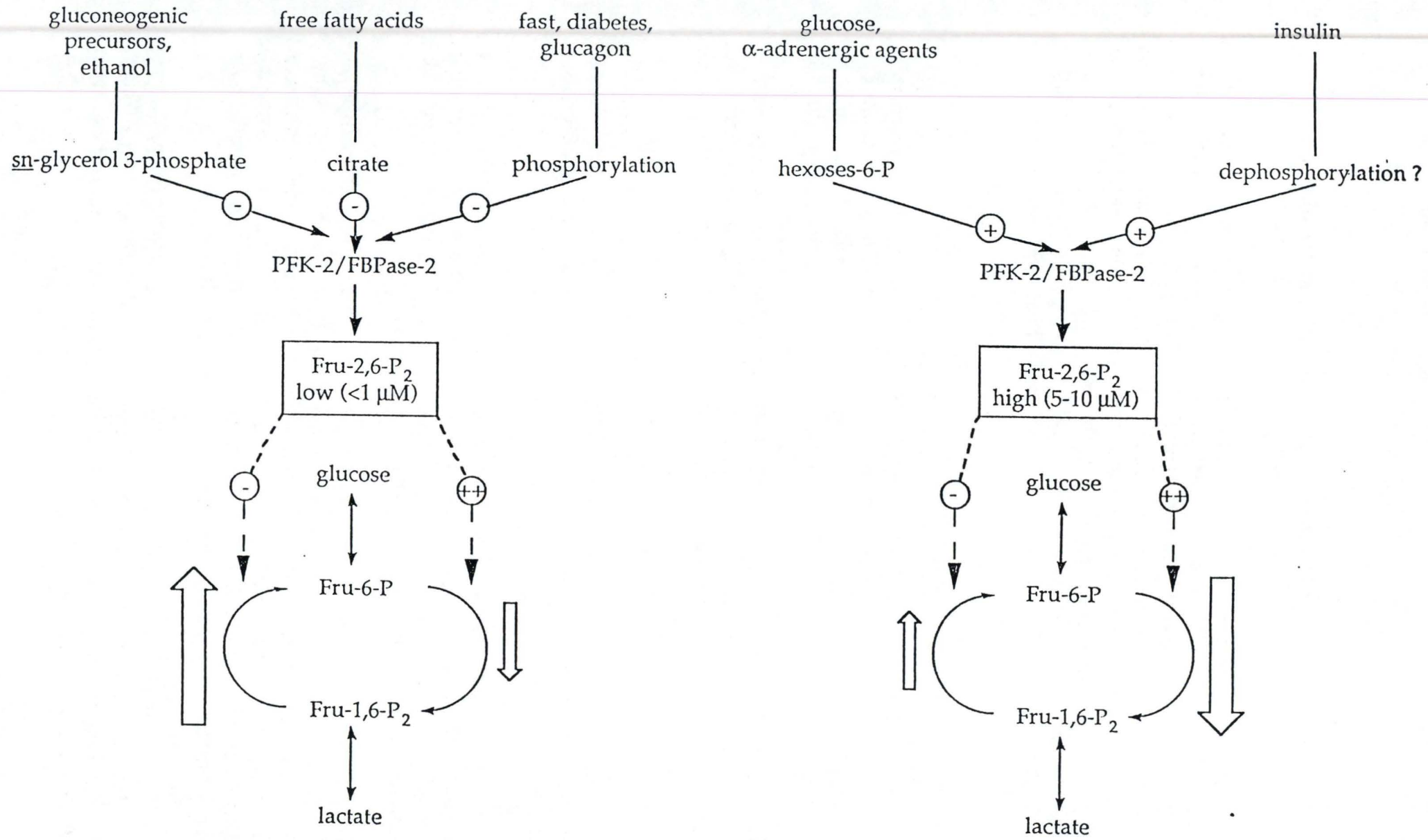


figure 22) Rôle du fructose-2,6-bisphosphate dans le contrôle à court terme de la glycolyse et de la gluconéogenèse hépatique (voir texte) (Rousseau et Hue, 1993).

La PFK-2 sera aussi inhibée si des précurseurs gluconéogéniques ou de l'éthanol sont présents.

Dans ces trois situations (figure 22), la concentration en fructose-2,6-bisphosphate diminuant, on passe d'un état glycolytique à un état de gluconéogenèse. A l'opposé, la déphosphorylation de PFK-2/FBPase-2 probablement provoquée par l'insuline ou la présence de glucose mène à une augmentation de la concentration en fructose-2,6-bisphosphate et donc à la glycolyse.

2.3.c. Régulation hormonale

L'expression de la PFK-2/FBPase-2, ainsi que d'autres gènes du métabolisme des hydrates de carbone dans le foie, est régulée de manière complexe par les hormones telles que le glucagon, via l'AMPC (second messenger), les glucocorticoïdes, l'insuline et les hormones thyroïdiennes.

Les Glucocorticoïdes

Chez le rat surrénalectomisé, la concentration du message L dans le foie chute, mais elle est restaurée par l'administration de glucocorticoïdes. Cet effet est transcriptionnel et reproductible sur des hépatocytes en culture (Marker *et al*, 1990).

Or, en aval de l'exon 1L, à 3.5 kilobases du site L d'initiation de la transcription, Lange *et al* (1992) ont localisé une unité de réponse aux glucocorticoïdes (GRU pour Glucocorticoid-Responsive Unit) qui contient un site potentiel pour CTF/NF-I et deux sites de liaison pour le récepteur au glucocorticoïde (GRE pour Glucocorticoid-Responsive Element). Ces GRE sont des sites de liaison sur l'ADN pour un glucocorticoïde lié à son récepteur (GR pour Glucocorticoid Receptor). Les glucocorticoïdes, par l'intermédiaire des GR et des deux GRE, stimulent la transcription du promoteur L du gène A.

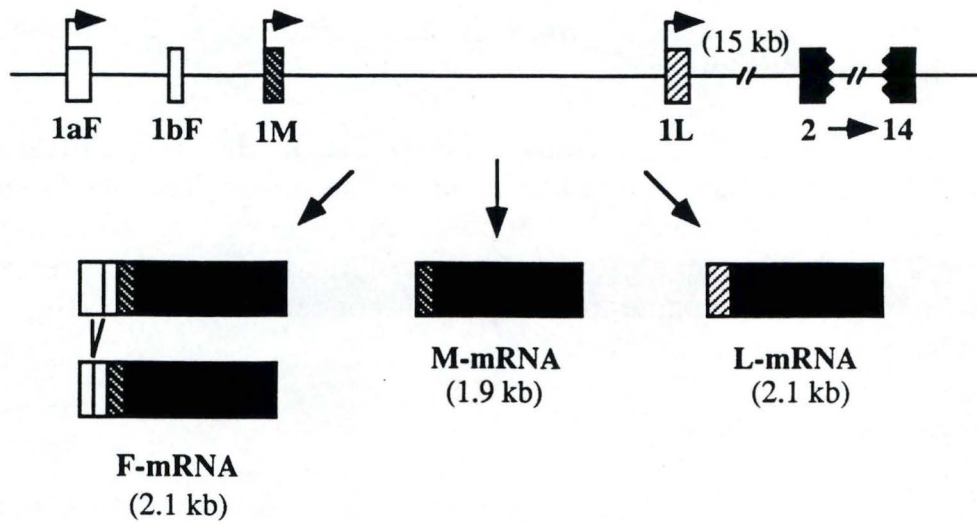
Les hormones thyroïdiennes

Ces hormones restaurent le niveau en ARNm de PFK-2/FBPase-2 de foie chez un rat hypothyroïdien. On ignore si l'effet est transcriptionnel ou post-transcriptionnel (Wall *et al*, 1989)

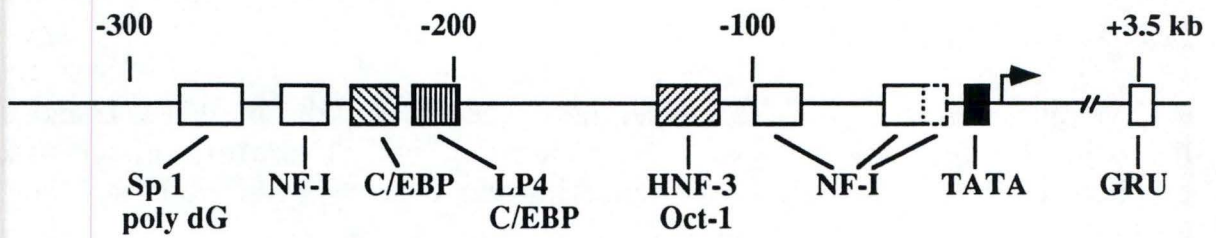
Insuline et glucagon

Une diminution du rapport insuline/glucagon lors du jeûne ou du diabète provoque à long terme une chute du contenu en PFK-2/FBPase-2 dans le foie.

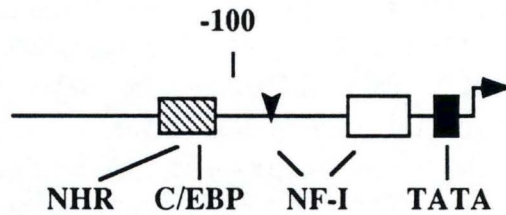
PFK-2/FBPase-2 gene A



L-promoter



M-promoter



F-promoter

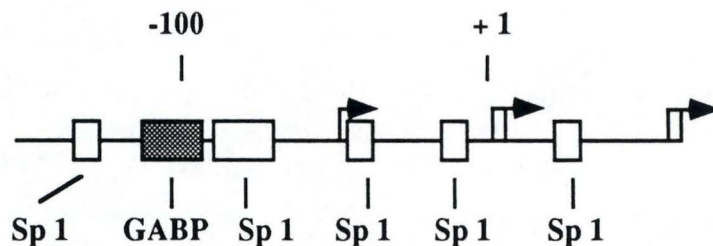


figure 23) Organisation physique du gène A de la PFK-2/FBPase-2 et des trois promoteurs. Les messagers de type F, M et L obtenus à partir de ce gène sont aussi indiqués.

La concentration en ARNm restant constante, il s'agit, apparemment, d'un problème traductionnel. Mais si on renourrit les rats, ou si on les traite à l'insuline, on retrouve le niveau standard en PFK-2/FBPase-2 et la concentration en ARNm augmente de 3 à 6 fois par rapport à la normale. Le mécanisme de l'induction des ARNm reste non expliqué.

L'augmentation en ARNm de PFK-2/FBPase-2 par l'insuline ou par la dexaméthasone est contrecarrée par l'AMPc (Cifuentes *et al*, 1991; Espinet *et al*, 1993).

2.4. Caractérisation génique des isozymes

Les séquences des ARNm des isozymes L (foie), M (muscle squelettique), T (testicule), H (coeur) et tout récemment F (FTO-2B) sont connues, mais seuls deux gènes ont été caractérisés. Le gène A, sur le chromosome X, code les isozymes F, L et M. Le gène B, sur le chromosome 1, ne code que l'isozyme cardiaque (H). Aucune donnée n'est disponible sur l'existence d'un troisième gène (C) qui coderait l'ARNm de type T (Crepin *et al*, 1989; Darville *et al*, 1989; Darville, 1991; Dupriez *et al*, 1993).

2.4.a. Le gène B

En 1q31, le gène B s'étend sur 22 kilobases comprenant 15 introns et 16 exons. Les exons 3 à 8 sont responsables de la génération du domaine PFK-2 et les exons 9 à 14 codent le domaine FBPase-2. L'organisation des 55 kilobases du gène A en Xq27-28 est très similaire. Le domaine catalytique PFK-2 est codé par les exons 2 à 7, et les exons 8 à 13 portent la fonction FBPase-2. Ces deux domaines catalytiques, bien conservés entre les gènes A et B, sont flanqués d'exons régulateurs qui diffèrent entre les deux gènes et qui distinguent ainsi les propriétés des différentes isozymes.

2.4.b. Le gène A

La génération des trois ARNm de type F, L et M à partir du gène A est réalisée grâce à l'utilisation sélective de 3 promoteurs différents et de 17 exons (figure 23). Le promoteur F, le plus en amont, est actif lors de la prolifération cellulaire et est régulé par le facteur de transcription Sp-1 (Stimulatory Protein 1) et le protooncogène GABP (Guanine-Adenine Binding Protein). Il contrôle la synthèse d'un ARNm contenant les exons 1aF, 1bF, 1M et 2 à 14.

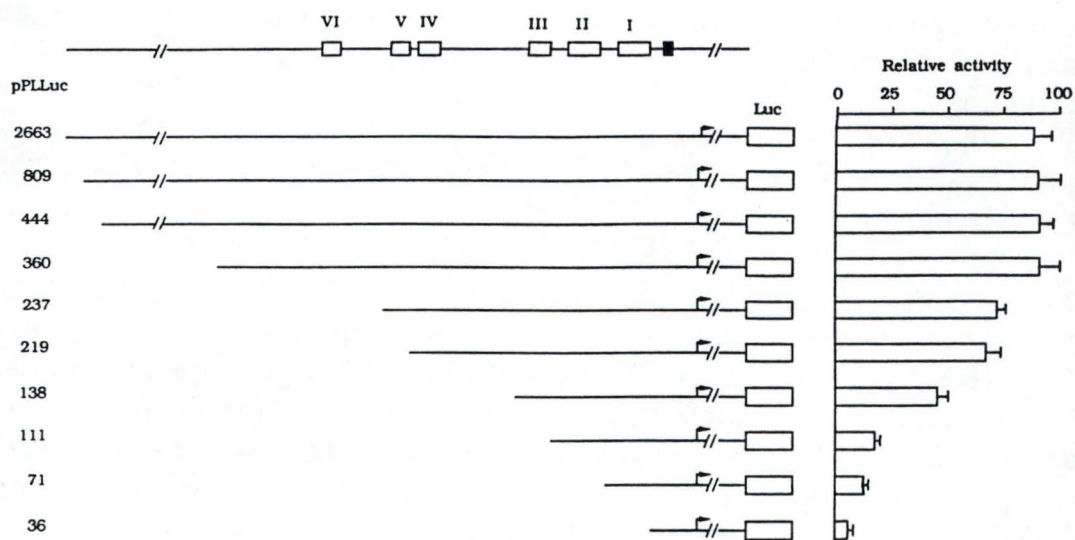


figure 24) Activité transcriptionnelle du promoteur L de la PFK-2/FBPase-2. Les différentes délétions sont réalisées en fonction des empreintes I à VI sur le promoteur L, et clonées devant le gène de la luciférase (pPLLuc). Ces constructions sont transfectées dans des cellules hépatomateuses. On peut ainsi mesurer l'activité transcriptionnelle (représentée à droite en %) des différentes empreintes. Les numéros à gauche indiquent le nombre de base du promoteur L (pPLLuc 36 à pPLLuc 2663) (Lemaigre *et al*, 1991).

L'activité du promoteur M a été détectée dans le coeur, le tissu adipeux, le foie et le testicule mais de manière prédominante dans le muscle. Ce promoteur, contrairement au promoteur F, possède une boîte TATA. Il est la cible de plusieurs facteurs qui régulent la synthèse d'un messenger composé des exons 1M et 2 à 14. Parmi ceux-ci on trouve CTF/NF-I (CAAT box Transcription Factor/ Nuclear Factor-I), des protéines apparentées à C/EBP (CAAT/Enhancer Binding Protein) et, potentiellement, un récepteur hormonal nucléaire.

2.4.c. Interactions *cis-trans* sur le promoteur de type foie du gène A

Le troisième promoteur (L) (Lemaigre *et al*, 1991) est principalement actif dans le foie, mais également dans le muscle squelettique et le tissu adipeux. Des expériences de transfections transitoires dans des cellules hépatomateuse ont révélé que les 360 premières paires de bases du promoteur L placées en amont d'un gène rapporteur (luciférase) apportaient l'activité promotrice maximale (figure 24).

Afin de localiser les régions promotrices importantes dans ce fragment de 360 pb, des expériences de footprinting furent réalisées. Il s'agit d'une digestion par la DNase I du fragment de 360 pb (marqué radioactivement) en présence et en absence de protéines cellulaires, suivie d'un fractionnement sur un gel de séquençage capable de résoudre toutes les bandes. Aux sites de fixation des protéines, la digestion n'a pas eut lieu et il en résulte des absences de fragments marqués de certaines tailles que l'on nomme empreintes. Ce fragment de 360 pb du promoteur de type L en présence d'extrait nucléaire de foie est protégé contre l'attaque de la DNaseI en six régions différentes. L'examen de la séquence nucléotidique de ces empreintes (figure 25), et l'étude des facteurs trans révèle que :

- le facteur ubiquiste CTF/NF-I (CAAT-box transcription factor/nuclear factor-I) est responsable des deux premières empreintes.
- l'empreinte III lie le facteur ubiquiste Oct-1 et le facteur spécifique du foie HNF-3 (Hepatocyte Nuclear Factor-3) de manière mutuellement exclusive.
- l'empreinte IV lie des facteurs apparentés à C/EBP (CAAT/enhancer binding protein) ainsi qu'un autre facteur spécifique du foie que l'on appelle LP4 (L-promoter, site IV).
- l'empreinte V contient une séquence de liaison potentielle pour des protéines apparentées à C/EBP.

- l'empreinte VI est une succession de 11 guanines et il lie plusieurs protéines non caractérisées.

Par des délétions judicieusement choisies dans les 360 paires de bases du promoteur minimal, on peut observer, en transfections transitoires, l'activité transcriptionnelle des séquences correspondant aux six empreintes (figure 24). L'activité promotrice basale augmente de 2 fois avec l'addition de la séquence qui comprend le footprint I, et trois fois avec l'addition de la séquence qui contient aussi le footprint II. L'addition de la région du footprint III double l'activité transcriptionnelle obtenue avec les séquences des footprint I et II. Avec la séquence comprenant le footprint IV, on augmente l'activité transcriptionnelle de une fois et demi. Par contre, aucune augmentation n'est observée avec l'addition de la séquence du footprint V. Finalement, l'addition de la séquence comprenant le footprint VI permet de retrouver l'activité promotrice maximale. Ainsi, l'addition successive des six sites, devant le gène de la luciférase, ramène au fur et à mesure l'activité promotrice à son maximum.

3) BUT DU TRAVAIL :

A partir d'un même patrimoine génétique les cellules peuvent se différencier grâce à l'activation de certains gènes et grâce à l'inactivation d'autres gènes. Cette régulation génique s'effectue principalement lors de la transcription, où l'information codée dans l'ADN est copiée et transcrite en ARN messager. Ce dernier est ensuite utilisé pour la synthèse d'une protéine qui confère un rôle particulier à la cellule.

Chez les organismes pluricellulaires, la transcription de nombreux gènes est commandée par des assemblages de protéines, nommés "complexes de transcription", qui se lient à l'ADN en amont des gènes cibles. Ce regroupement approprié de facteurs de transcription (en *trans*) sur des séquences particulières du promoteur (en *cis*) d'un gène active sa transcription.

La compréhension des mécanismes de l'activation de la transcription suppose l'étude des séquences *cis* et des facteurs *trans*.

Le travail a pour but d'identifier certains des facteurs *trans* interagissant avec les UPE du promoteur de type L du gène A de la PFK-2/FBPase-2. En particulier, nous avons recherché qu'elles étaient les protéines nucléaires de foie de rat qui fixent la séquence nucléotidique de l'empreinte VI.

L'approche expérimentale a consisté à incuber, avec les protéines de l'extrait nucléaire de foie, le fragment d'ADN correspondant à l'empreinte VI, et à visualiser les complexes ADN/protéines par la technique du retard sur gel.

MATERIEL et METHODES

A. EXTRAIT NUCLEAIRE :

A.1. Principe

Les extraits nucléaires de foie, de rate, de cerveau, de poumon et de rein sont réalisés en :

1°) purifiant les noyaux sur un coussin de saccharose (Hattori *et al*, 1990),

2°) et en extrayant les protéines nucléaire par lyse osmotique (Dignam *et al*, 1983).

Pour la stabilité des protéines, les manipulations sont réalisées à 4°C.

A.2. Solutions

1. Tampon d'homogénéisation :

- 0,3 M saccharose
- 10 mM HEPES pH 7,6
- 0,1 mM EDTA
- 0,1 mM EGTA
- 10 mM KCl
- 1% lait en poudre
- 0,7 mM spermidine
- 0,15 mM spermine
- 1 mM DTT
- 0,5 mM PMSF
- 2 mg/ml aprotinine et leupeptine

2. Tampon coussin = Tampon d'homogénéisation, mais à 2,2 M saccharose, et sans lait en poudre.

3. Tampon de liaison :

- 20% glycérol
- 10 mM HEPES pH 7,6
- 0,1 mM EDTA
- 100 mM KCl
- 1 mM DTT
- 0,05 mM PMSF

4. Tampon de lyse = Tampon de liaison, mais à 1 M KCl.

A.3. *Protocole*

A.3.1. *Préparation des noyaux*

Sacrifier les rats par décapitation. Prélever l'organe et hacher en petits morceaux dans une boîte de pétri sur glace contenant 10 ml de tampon d'homogénéisation. Porter le volume à 30 ml avec ce même tampon dans un Potter en verre. Homogénéiser par trois allers-retours du piston en teflon, tournant à la vitesse de 1400 rpm. L'utilisation du teflon contre le verre permet d'homogénéiser sans lyser les noyaux. Filtrer l'homogénat sur gaze et récupérer dans un cylindre de 100 ml. Diluer trois fois le tissu homogénéisé avec le tampon coussin. Répartir ensuite l'homogénat dans trois tubes Beckman de 38 ml contenant déjà 10 ml de tampon coussin.

Equilibrer les tubes et centrifuger à 100000 g pendant 50 minutes à 2°C dans un rotor SW 28. Seuls les noyaux possèdent une densité suffisante pour traverser le coussin de saccharose. Eliminer le surnageant et garder le culot de noyaux.

A.3.2. *Lyse des noyaux*

Resuspendre les culots nucléaires dans 500 µl de tampon de liaison. Homogénéiser la suspension nucléaire par deux coups de piston dans un Dounce B.

Ajuster la concentration en KCl à 400 mM, à l'aide du tampon de lyse, pour permettre par choc osmotique la sortie des protéines du noyau. Agiter la solution pendant 45 minutes et centrifuger ensuite pendant deux heures à 180000 g à 2°C dans un rotor 50 Ti. Prélever le surnageant, aliquoter et congeler dans l'azote liquide. Une partie du surnageant est soumise à un dosage protéique.

A.3.3. Dosage protéique

Le dosage protéique Bio Rad est basé sur la technique de Bradford. Un réactif chimique est ajouté à un échantillon protéique, et sa liaison aux acides aminés basiques et aromatiques provoque un changement de couleur mesurable au spectrophotomètre.

Préparer d'abord plusieurs dilutions d'un standard protéique (ex.: SAB de 1 à 11 mg/ml) afin d'établir une courbe d'étalonnage. Placer 0,8 ml de chacun des standards dans des cuvettes pour spectrophotomètre. Réaliser aussi un blanc (0,8 ml d'eau). Ajouter 0,2 ml de réactif colorant de Bio Rad. Inverser plusieurs fois. Après minimum 5 minutes, mesurer la densité optique à 595 nm (DO₅₉₅). Tracer la droite d'étalonnage DO₅₉₅ en fonction de la concentration des différents standards. Déterminer enfin la concentration protéique de l'extrait nucléaire par la même méthode et en se rapportant à la droite d'étalonnage. Habituellement, la concentration protéique des extraits nucléaires de foie est de 3,5 µg/µl.

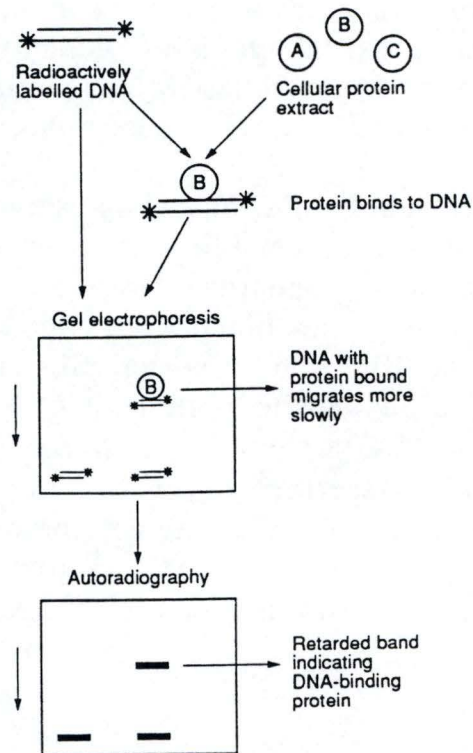


figure 1) Expérience de retard sur gel.

Un fragment d'ADN marqué (radioactif) migrera moins vite dans un gel de polyacrylamide si une protéine (B) de l'extrait nucléaire s'y fixe. L'autoradiographie du gel fera apparaître les fragments d'ADN libre et retardé (Latchman, 1991).

B. RETARD DE MIGRATION SUR GEL :

B.1. Principe

Cette méthode repose sur le principe qu'un fragment d'ADN, sur lequel se lie une protéine, migrera moins vite dans un gel d'électrophorèse que le même fragment d'ADN libre. L'expérience de retard sur gel est réalisée en rendant la séquence d'ADN que l'on veut étudier radioactive. La sonde radioactive est alors incubée avec un extrait nucléaire pour permettre la formation des complexes ADN/protéines. Ces derniers sont alors soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide non dénaturant, et la position de la sonde radioactive est repérée par autoradiographie (figure 1).

B.2. Sonde radioactive (Sambrook *et al*, 1989)

B.2.1. Solutions

1. Tampon TE : - 10 mM Tris-Cl pH 7,6
- 1 mM EDTA
2. Solution de phénol :

Ajouter au phénol de la 8-hydroxyquinoline à une concentration finale de 0,1%, et équilibrer contre du tampon TE.

3. Solution de phénol-chloroforme :

Mélanger un volume de phénol à un volume de chloroforme. Cette solution permet d'inactiver et d'extraire les protéines d'une solution d'ADN.

4. Tampon T4 polynucléotide kinase 10X :
 - 700 mM Tris-Cl pH 7,6
 - 100 mM MgCl₂
 - 50 mM DTT

B.2.2. Protocole

B.2.2.a. Hybridation

Mettre en présence 10 µg de l'oligonucléotide 780 :

5'-GATCTGTTGTGGGGGGGGGGGCTTGTA-3'

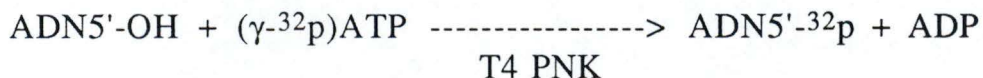
et 10 µg de l'oligonucléotide complémentaire 781 :

3'-ACAACACCCCCCCCCCGAACATTCTAG-5'

dans un volume final de 60 µl d'eau bidistillée ou de TE. Ajuster la concentration en NaCl à 100 mM. Mettre à 100°C pendant 5 minutes, et laisser refroidir sur table jusqu'à 30°C. L'oligonucléotide double brin (780-781) est ainsi à une concentration de 330 ng/µl.

B.2.2.b. Marquage

Pour rendre l'oligonucléotide double brin (780-781) radioactif, nous utilisons la polynucléotide kinase du bactériophage T4 (T4 PNK). Cette enzyme catalyse le transfert du groupement phosphate en position γ de l'ATP vers les extrémités 5'-OH de l'ADN :



Dans un microtube Eppendorf, ajouter :

- 1 µl d'oligonucléotide (780-781) (=50 ng)
- 5 µl de tampon polynucléotide kinase
- 5 µl de (γ-³²p) ATP (= 50 mCi)
- 1,5 µl de T4 polynucléotide kinase (= 15 unités)
- 37,5 µl d'eau distillée

Incuber à 37°C pendant 20 minutes, puis ajouter 1 µl (10 unités) de T4 polynucléotide kinase. Réincuber pendant 20 minutes à 37°C.

B.2.2.c. Extraction

Porter le volume de la solution ADN/T4 polynucléotide kinase à 150 µl avec de l'eau distillée, et ajouter le même volume de la solution phénol/chloroforme. Mélanger vigoureusement avant de centrifuger 1 minute à 13800 g. Récupérer la phase aqueuse (supérieure).

B.2.2.d. Elimination des nucléotides non incorporés

L'élimination des nucléotides non incorporés consiste en une purification sur tamis moléculaire ou chromatographie d'exclusion. Les molécules de poids moléculaire supérieur à la porosité du gel (constitué de microbilles), passent entre les microbilles et s'éluent en premier lieu. Elles sont exclues de la colonne, alors que les molécules de faible poids moléculaire s'éluent plus tard car elles rentrent dans les microbilles et y sont retardées.

Constituer une colonne de Sephadex G25 dans une pipette Pasteur, soit 1,5 ml de gel dans une colonne de 70 mm de haut sur 5 mm de diamètre. Laver la colonne avec 10 volumes de TE pour l'équilibration. Déposer la phase aqueuse radioactive sur la colonne et éluer avec du TE. Récolter les fractions et compter leur radioactivité.

B.2.2.e. Extraction

Grouper les fractions du premier pic et extraire au phénol/chloroforme comme ci-dessus (B.2.2.c.).

B.2.2.f. Précipitation

Ajouter à la phase aqueuse (ADN en solution) 2,5 volumes d'éthanol 95% et de l'acétate de sodium jusqu'à une concentration finale de 0,3 M. Réaliser la précipitation toute une nuit à -20°C puis centrifuger 1 heure à 13800 g à 4°C. Eliminer le surnageant.

Laver le culot d'ADN radioactif avec 500 µl d'éthanol à 80%. Centrifuger 15 minutes dans les mêmes conditions, éliminer le surnageant et sécher sous vide le culot d'ADN radioactif.

Resuspendre le culot dans 50 µl d'eau ou de TE. Conserver à -20°C l'oligonucléotide (780-781) radioactif que l'on appelle sonde PFK-6.

B.3. Gel TAE 6%

B.3.1. Solutions

1. Tampon d'électrophorèse ou tampon TAE 10X :
 - 67 mM Tris-Cl pH 7,9
 - 10 mM EDTA
 - 33 mM acétate de sodium

2. Acrylamide/bisacrylamide (29:1) 30%.

B.3.2. Protocole

Préparer le gel de polyacrylamide à 6% en mélangeant 8 ml d'acrylamide/bisacrylamide (30%) avec 4 ml de TAE 10X. Compléter jusqu'à un volume final de 40 ml avec de l'eau distillée. Dégazer la solution pendant 10 à 15 minutes car l'O₂ est un inhibiteur de la polymérisation.

Initier la polymérisation de l'acrylamide (CH₂=CH-CO-NH₂) avec le N, N'-méthylènebisacrylamide (CH₂=CH-CO-NH-CH₂-NH-CO-CH=CH₂) par l'ajout de 200 µl d'APS 10%, et catalyser la réaction avec 20 µl de TEMED.

Les monomères d'acrylamide polymérisent en longues chaînes liées de façon covalente par des ponts transversaux qui sont les molécules de bisacrylamide.

Couler le gel entre deux plaques de verre. Les dimensions du gel sont de 14 sur 16 cm, et l'épaisseur est de 1,5 mm.

B.4. Retard de migration sur gel

B.4.1. Solution

Tampon d'incubation 2X :

- 20% glycérol
- 20 mM HEPES pH 7,6
- 0,2 mM EDTA
- 100 mM KCl
- 2 mM DTT

B.4.2. Protocole

B.4.2.a. Prémigration (prerun)

Installer le gel dans la cuve d'électrophorèse et partager deux litres de tampon d'électrophorèse 1X (200 ml de TAE et 1800 ml d'eau distillée) entre le compartiment supérieur (qui possède un trop plein) et inférieur de la cuve.

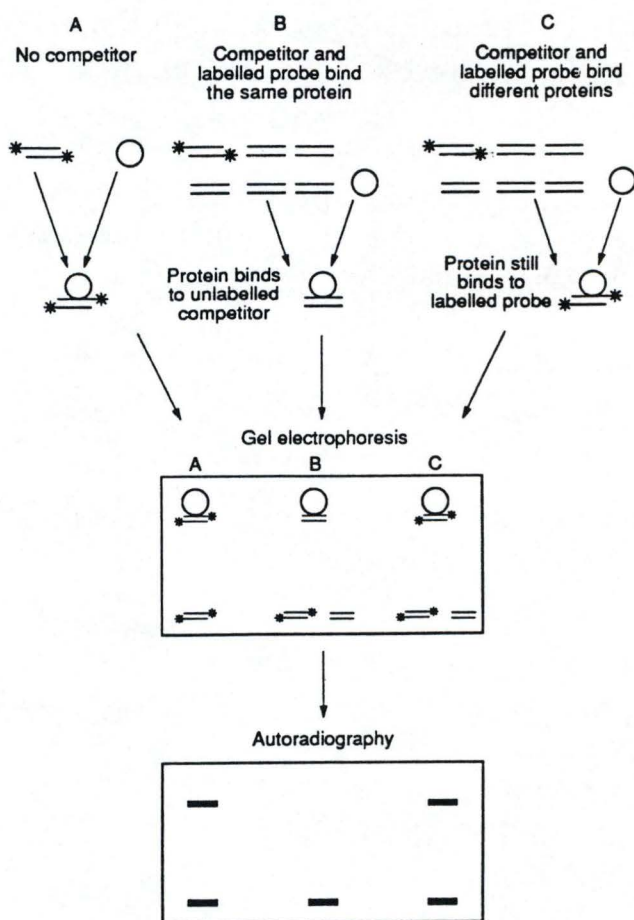


figure 2) Utilisation d'ADN compétiteur non marqué dans une expérience de retard sur gel.

Si une séquence d'ADN non marquée (compétiteur) est capable de lier la même protéine que le fragment marqué (sonde), la bande retardée ne sera pas observée (B). Par contre si le compétiteur non marqué n'est pas reconnu par la protéine liant la sonde, la bande retardée apparaîtra (C) comme en absence de compétiteur (figure 1 ou A) (Latchman, 1991).

Brancher une pompe péristaltique pour assurer une circulation du tampon entre l'anode (compartiment inférieur) et la cathode (compartiment supérieur) afin d'obtenir des conditions constantes lors de la migration. Mettre le gel sous une tension de 150 volts pendant une heure. Le courant passe ainsi de 30 mA à 15 mA, où il se stabilise.

B.4.2.b. Incubation de la sonde PFK-VI en présence de protéines nucléaires

Les conditions optimales de liaison dans nos expériences de retard sur gel sont :

- 10 mM HEPES pH 7,6
- 10% glycérol
- 50 à 100 mM KCl
- 2 mM MgCl₂
- 3 à 8 µg de protéines de l'extrait nucléaire
- du poly(dIdC) pour titrer les protéines liant l'ADN de manière non spécifique (en général : 1 µg pour 2 µg de protéines)
- et de l'eau distillée pour se trouver dans un volume de 20 µl

Incuber pendant 20 minutes sur glace. Ajouter la sonde PFK-VI radioactive (50 cps/µl). Nouvelle incubation de 20 minutes à 0°C.

Arrêter la prémigration et charger les échantillons dans les puits du gel TAE 6% avec une seringue Hamilton. Effectuer la migration (run) pendant deux heures sous une tension de 200 volts avec un courant de 15 mA.

B.4.2.c. Incubation de la sonde PFK-VI en présence de protéines nucléaires et d'ADN compétiteur

Outre l'intérêt du retard sur gel pour observer les protéines liant une séquence d'ADN particulière, la spécificité de liaison des complexes peut aussi être examinée. Ceci est réalisé en incubant avec la sonde marquée et l'extrait nucléaire, un large excès d'une deuxième séquence d'ADN qui n'est pas marquée. Si une protéine lie aussi bien la séquence non marquée que la sonde marquée, l'excès de la séquence non marquée l'emportera. Donc la bande retardée n'apparaîtra pas en présence de ce compétiteur non marqué puisque seuls les complexes sonde marquée/protéine sont repérables en autoradiographie. A l'opposé, si le compétiteur non marqué n'est pas reconnu par la protéine liant la sonde marquée, le complexe apparaîtra (figure 2).

Pour les expériences de retard sur gel avec un compétiteur non marqué, ajouter ce dernier, en excès molaire de 50 à 100 fois, pendant les 20 premières minutes d'incubation. Ajouter ensuite la sonde PFK-VI.

B.4.2.d. Incubation de la sonde PFK-VI en présence de protéines nucléaires et d'un chélateur de cation bivalent

En utilisant le chélateur de cations bivalents métalliques, la 1,10-phénanthroline, les protéines liant l'ADN grâce à un domaine métallique ne retardent plus la sonde PFK-VI.

- Pour les expériences de retard sur gel avec la 1,10-phénanthroline, incuber cette dernière avec l'extrait nucléaire pendant 20 minutes. Ajouter ensuite la sonde PFK-VI

- Pour les expériences de restauration des retards sur gel, incuber la 1,10-phénanthroline avec l'extrait nucléaire pendant 10 minutes et ajouter, ensuite, le $ZnCl_2$. Attendre 10 minutes avant d'ajouter la sonde PFK-VI.

B.4.3. Séchage et autoradiographie

Une fois la migration terminée, démouler le gel et sécher une heure à 80°C sous vide. Exposer le gel avec un film Kodak (X-OMAT AR) ou Fuji (Medical X RAY film) dans une cassette avec écrans intensifiants. Mettre la cassette à -80°C au minimum une nuit.

C. RENATURATION DES PROTEINES SE LIANT A L'ADN

C.1. Principe

Cette méthode a pour but d'estimer la masse moléculaire relative d'une protéine interagissant avec l'ADN. Elle consiste en une séparation de protéines en fonction du poids moléculaire sur un gel dénaturant de polyacrylamide. Les protéines du gel de polyacrylamide dénaturant sont ensuite éluées puis renaturées afin de tester leur liaison à l'ADN en retard sur gel.

C.2. SDS-PAGE

C.2.1. Solutions

1. Acrylamide-Bisacrylamide (30:0,8) 30,8%.
2. Tris-Cl 1,5 M ajusté à pH 8,8 avec de l'HCl à 37% et stocké à 4°C
3. Tris-Cl 0,5 M ajusté à pH 6,8 avec de l'HCl à 37% et stocké à 4°C
4. Tampon d'électrophorèse :
 - 25 mM Tris
 - 192 mM glycine
 - 0,1% SDS
5. Tampon d'incubation 4X :
 - 0,09% bleu de bromophénol
 - 36 mM Tris-Cl pH 7,6
 - 3,6 mM EDTA
 - 7,2% SDS
 - 9% glycérol
 - 1,44 M β -mercaptoéthanol

C.2.2. Préparation du gel

1. Gel de séparation (running gel)

Mélanger les solutions suivantes dans un Erlenmeyer :

- 10 ml d'acrylamide 30%/bisacrylamide 0,8%
- 11 ml d'eau distillée
- 8,5 ml de Tris-Cl pH 8,8
- 0,3 ml de SDS 10%

et dégazer pendant quelques minutes avant d'ajouter :

- 10 μ l de TEMED
- 150 μ l d'APS 10%

Couler la solution entre les deux plaques de verre (dimension 16 X 18 cm; espacement 1,5 mm) jusqu'à environ 4 cm du bord supérieur. Pour obtenir une surface plane et éviter le contact avec l'oxygène de l'air, verser de l'eau au dessus du gel de séparation.

Laisser polymériser une heure.

2. Gel de tassement (stacking gel)

Mélanger les solutions suivantes dans un Erlenmeyer :

- 2,5 ml d'acrylamide 30%/bisacrylamide 0,8%
- 6 ml d'eau distillée
- 5,8 ml de Tris-Cl pH 6,8
- 150 μ l de SDS 10%

et dégazer quelques minutes avant d'ajouter :

- 7 μ l de TEMED
- 150 μ l d'APS 10%

Enlever l'eau au dessus du gel de séparation et couler le gel de tassement. Mettre un peigne avec le nombre de puits désirés, et laisser polymériser une heure.

C.2.3. Préparation des échantillons

Ajouter 17 μ l du tampon 4X à 50 μ l d'extrait nucléaire (=175 mg), et 10 μ l de ce même tampon 4X à 30 μ l de marqueurs de poids moléculaire. Chauffer ces deux échantillons 5 minutes à 95°C.

C.2.4. Migration

Déposer les deux échantillons et réaliser l'électrophorèse avec un courant constant de 40 mA pour traverser le gel de tassement et de 50 mA pour traverser le gel de séparation. Dans le gel de tassement, le pH vaut 6,8 et donc le SDS est moins négatif que dans le gel de séparation. Les protéines ont donc moins tendance à se séparer les unes des autres. En outre, la plus forte concentration en acrylamide/bisacrylamide du gel de séparation (10%) par rapport au gel de tassement (5%) entraîne une "condensation" de l'échantillon au sommet du gel de séparation.

L'utilisation de dodécyl sulfate de sodium (SDS) rend la mobilité des protéines directement proportionnelle au logarithme de leurs masse moléculaire relative. En effet, le SDS rend toutes les protéines uniformément chargées négativement.

C.3. Renaturation

C.3.1. Solutions

1. Tampon d'élution :

1.1. Premier protocole :

- 20 mM HEPES pH 7,9
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 150 mM NaCl
- 0,1% SDS
- 200 mg/ml SAB

1.2. Protocoles 2 et 3 :

- 50 mM Tris-Cl pH 7,9
- 0,1 mM EDTA
- 5 mM DTT
- 150 mM NaCl
- 0,1% SDS
- 100 µg/ml SAB

2. Tampon de dénaturation :

2.1. Protocole 1 :

- 6 M guanidine-HCl
- 20 mM HEPES pH 7,9
- 20% glycérol
- 50 mM KCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 0,5 mM PMSF
- 2,5 mM MgCl₂

2.2. Protocole 2 :

- 6 M guanidine-HCl
- 0,1% NP-40
- 100 mM KCl

2.3. Protocole 3 : 6 M Guanidine-HCl

3. Tampon de dialyse :

- 10 mM HEPES pH 7,9
- 0,1 mM EDTA
- 10% glycérol
- 50 mM KCl
- 2,5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

C.3.2. Coloration

La coloration utilisée est une coloration au cuivre qui produit une image négative des bandes protéiques, incolore, sur un fond semiopaque. Deux phénomènes se produisent sur le gel : d'une part, il y a une précipitation des ions Cu⁺⁺ par le Tris et le SDS, et d'autre part il y a la complexation du cuivre par les protéines. La précipitation donne le bruit de fond homogène, alors que la complexation du cuivre en certains endroits ne permet pas la précipitation. Les bandes protéiques sont ainsi visibles (Lee *et al*, 1987).

Après migration, découper la bande correspondant aux marqueurs de poids moléculaire. Tremper la bande dans 100 ml d'eau distillée et puis immerger 5 minutes dans 100 ml de CuCl₂ 0,3 M en agitant régulièrement. Laver ensuite 3 minutes dans de l'eau distillée.

Réaliser alors une droite d'étalonnage en mesurant la distance parcourue par les différents marqueurs dans le running gel. Cette droite permettra de donner des fourchettes de masse moléculaire relative aux bandes découpées.

Trois protocoles différents ont été testés pour renaturer les protéines de la piste contenant l'extrait nucléaire. Ils diffèrent par les tampons utilisés et les durées d'incubation, mais surtout par l'élimination de la guanidine-HCl.

C.3.3. Découpage des bandes

Découper la piste contenant les protéines nucléaires en tranches de 0,5 à 1 cm. Immerger chacune de ces tranches dans un microtube eppendorf contenant 1 ml de tampon d'élution. Mettre les microtubes eppendorf sous agitation à 37°C toute la nuit. Les protéines diffusent hors des morceaux de gel.

C.3.4. Précipitation et lavage

Pour chaque microtube Eppendorf, récupérer le surnageant et précipiter les protéines avec 5 volumes d'acétone froid. Laisser 4 heures à -80°C et centrifuger 30 minutes à 12300 g. Laver le culot avec 5 ml d'acétone froid et recentrifuger 30 minutes à 12300 g. Eliminer le surnageant et laisser sécher à l'air pendant 15 minutes.

C.3.5. Dénaturation et resuspension

Les échantillons vont subir une nouvelle dénaturation en utilisant la guanidine-HCl.

Resuspendre les culots dans : 20 μ l (protocole 1), 80 μ l (protocole 2), 100 μ l (protocole 3) de tampon de dénaturation. Laisser sur table pendant : 20 minutes (protocole 1), 1 heure (protocole 2), 20 minutes (protocole 3).

C.3.6. Renaturation et élimination de l'effet de la guanidine-HCl

Protocole 1 : Renaturation par dilution

Diluer chaque échantillon 50 fois dans le même tampon que pour la dénaturation, mais sans la guanidine-HCl et avec 250 μ g/ml de SAB. Laisser 20 heures à 20°C.

Protocole 2 : Elimination de la guanidine-HCl par séparation sur Sephadex G25 (Wang *et al*, 1987a)

Couler 1 ml de Sephadex G25 (voir principe en B.2.2.d.) dans une seringue (hauteur 7 cm; diamètre 0,5 cm). Réaliser autant de colonnes que de bandes découpées dans le SDS-PAGE. Equilibrer avec 10 volumes de tampon de dénaturation du premier protocole, mais sans la guanidine-HCl. Placer la colonne dans un statif contenant un microtube Eppendorf au fond. Centrifuger la colonne deux minutes à 500 g et changer les microtubes Eppendorf sans capuchons. Charger chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 2 minutes à 1100 g et laisser ces fractions une heure sur table pour la renaturation.

Protocole 3 : Elimination de la guanidine-HCl par dialyse (Wang *et al*, 1987b)

L'échantillon de 100 ml est dialysé dans un microtube Eppendorf fermé par une membrane de dialyse (les membranes de dialyse sont perméables aux molécules d'un poids moléculaire inférieur à 12 à 14000). Le microtube Eppendorf est immergé dans la solution de dialyse.

Dialyser 20 heures en changeant de tampon de dialyse après 1 heure, 18 heures et 1 heure. Récupérer les échantillons dialysés avec une micropipette.

C.4. Retard sur gel

Tester le retard provoqué par les éluats des différentes tranches du SDS-PAGE sur un gel non dénaturant (TAE 6%).

D. DETERMINATION DE POIDS MOLECULAIRE DE PROTEINES PAR RETICULATION AUX ULTRAVIOLETS (ultraviolet cross-linking) :

D.1. Principe (Hughes *et al*, 1991; Williams *et al*, 1992)

Le poids moléculaire d'une protéine liant l'ADN peut être déterminé par la technique du cross-linking aux ultraviolets. Un rayonnement ultraviolet peut provoquer la formation de liens covalents entre certains acides aminés (cystéines) et certaines bases. L'attachement photochimique de protéines à l'ADN peut être amélioré en utilisant de l'ADN substitué par la bromodéoxyuridine. Le rayonnement ultraviolet entraîne la débromination et la production de radicaux uracyl fortement réactifs. Les protéines se lient donc plus aisément à de l'ADN substitué par la bromodéoxyuridine qu'à de l'ADN non substitué.

Nous utilisons une sonde substituée par la bromodéoxyuridine et à haute activité spécifique pour réaliser un retard sur gel avec un extrait nucléaire. L'ADN radioactif est fixé de manière covalente à la protéine suite à l'irradiation aux ultraviolets. Le complexe ADN/protéines est enfin analysé en gel dénaturant.

D.2. Synthèse de la sonde radioactive et substituée

Afin d'obtenir une sonde à haute activité spécifique et substituée par la bromodéoxyuridine, nous réalisons une extension d'amorce. Nous choisissons la matrice et l'amorce en fonction du nombre et de la position des bromodéoxyuridines que nous pourrions incorporer.

D.2.1. Solution

Tampon klenow 10X :
- 100 mM Tris-Cl pH 7,5
- 50 mM MgCl₂
- 75 mM DTT

D.2.2. Hybridation

Hybrider, comme au point B.2.2.a., 10 μg de l'oligonucléotide 781 (voir B.2.2.a.) servant de matrice, et 4 μg de l'oligonucléotide 21678 substitué avec de la bromodéoxyuridine (5'-bUGbUbUGbUGGGGGG-3') et servant d'amorce. L'oligonucléotide double brin (21678-781) est à une concentration de 280 ng/ μl .

D.2.3. Extension d'amorce

Mélanger dans un microtube Eppendorf :

- 1 μl d'oligonucléotide (21678-781) (=50 ng)
- 7 μl d' (α -³²p)dGTP (= 70 mCi)
- 1 μl de BrdUTP 10 mM
- 1 μl de dATP 10 mM
- 1 μl de dCTP 10 mM
- 5 μl de tampon klenow 10X
- 3 μl de klenow (= 18 unités)
- 31 μl d'eau distillée

et laisser incuber une heure à température ambiante. L'oligonucléotide double brin obtenu est nommé oligonucléotide PFK-6UV.

D.2.4. Extractions, purification et précipitation

Voir aux points B.2.2.c., B.2.2.d. et B.2.2.f.

D.3. Cross-linking aux ultraviolets

D.3.1. Retard sur gel

Sur un gel TAE 6% (voir en B.3.), faire migrer un extrait nucléaire en présence de la sonde PFK-6UV substituée et marquée.

D.3.2. Irradiation

Repérer les complexes retardés du gel, non séché, en autoradiographiant toute une nuit à 4°C. Découper les bandes d'intérêt et les déposer sur une boîte de Petri sur glace. Placer la lampe ultraviolette à une distance de 15 cm, et irradier les tranches de gel avec une longueur d'onde de 254 nm pendant 20 minutes.

D.4. SDS-PAGE

Faire migrer les complexes ADN/protéines dans un gel dénaturant uniquement en fonction de leurs poids moléculaire. La radioactivité de la sonde permet de localiser la protéine dans le gel et donc de déterminer le poids moléculaire de la protéine liant la sonde en se rapportant à des standards de poids moléculaire.

Couler les gels comme décrit au point C.2.2., et dénaturer les protéines dans les tranches de gel par incubation des tranches dans 400 μ l du tampon d'incubation 4X (voir C.2.1.).

Introduire les tranches dans les puits du gel de tassement, et commencer à faire entrer les échantillons dans le gel. Une fois les échantillons (bleu de bromophénol) rentrés à moitié dans le gel, arrêter la migration et charger les marqueurs de poids moléculaires. Remettre le gel sous tension comme au point C.2.4..

Colorer la piste des marqueurs de poids moléculaire avec du cuivre (voir C.3.2.), et sécher le reste du gel.

Vu que l'on travaille avec très peu de matériel, et donc très peu de radioactivité, le PhosphorImager permet un repérage plus sensible et plus rapide des complexes ADN/protéines.

E. PURIFICATION DE PROTEINES SUR COLONNE DE STREPTAVIDINE-AGAROSE :

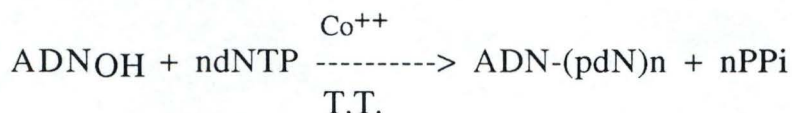
E.1. Principe (Hagenbüchle et Wellauer, 1992; Leblond-Francillard *et al*, 1987)

La purification est réalisée en incubant l'extrait nucléaire avec l'oligonucléotide biotinylé, et en passant ensuite l'incubation sur une colonne de streptavidine-agarose. Seules les protéines ayant de l'affinité pour l'oligonucléotide restent fixées, par la biotine, à la colonne. L'éluion des protéines est réalisée à des concentrations salines ne permettant plus la liaison.

En plus de cet accrochage spécifique sur la colonne, on peut réaliser un décrochage spécifique. En effet, en faisant passer sur la colonne de la phénanthroline, seules les protéines requérant du zinc pour lier l'oligonucléotide sortent de la colonne. Ensuite, une expérience de reconstitution avec du zinc est réalisée (voir en B.4.3.).

E.2. Biotinylation de l'oligonucléotide à la terminal transferase (Sambrook *et al*, 1992)

La terminal deoxynucleotidyl transferase (60000 de poids moléculaire) est une ADN polymérase inhabituelle trouvée dans les prélymphocytes et dans les premiers stades de différenciation de la lignée lymphoïde. En présence de cation divalent, l'enzyme catalyse l'addition aléatoire de dNTPs à l'extrémité 3'-OH de l'ADN :



E.2.1. Solutions

1. Tampon terminal transferase 5X (T.T.) :
 - 1M cacodylate de potassium
 - 125 mM Tris-Cl pH 6,6
 - 1,25 mg/ml SAB
2. Biotine-14-dATP (biodATP)

E.2.2. Marquage

Mettre en présence dans un microtube Eppendorf :

- 10 μ l de tampon T.T.
- 3 μ l de biodATP 0,4 mM
- 2,5 μ l de dCTP 0,5 mM
- 1 μ l de sonde PFK-VI radioactive (=100 cps)
- 2 μ l d'oligonucléotide PFK-VI non marqué à 50 ng/ μ l
- 2,5 μ l de terminal transferase (= 65 unités)
- 24 μ l d'eau distillée

et ajouter pour commencer la réaction 5 μ l de CoCl_2 25 mM. Laisser incuber une heure à 37°C.

La réaction est arrêtée avec 5 μ l d'EDTA 100 mM. L'oligonucléotide obtenu est appelé oligonucléotide PFK-VIbiotinylé.

E.2.3. Extraction et précipitation

Voir points B.2.2.c. et B.2.2.f..

Note : Ne pas séparer sur Sephadex G25 car l'oligonucléotide biotinylé "interagit" avec la colonne.

E.3. Test de biotinylation

E.3.1. Principe

Afin de vérifier si la biotinylation par la terminal transferase s'est bien déroulée, nous devons montrer, sur gel d'agarose 2%, que l'oligonucléotide double brin PFK-VI biotinylé est bien retardé en présence de streptavidine ou de streptavidine-agarose.

E.3.2. Solution

Tampon TBE 10X :

- 89 mM tris-borate pH 8,0
- 89 mM acide borique
- 20 mM EDTA

E.3.3. Protocole

Chauffer 0,6 gramme d'agarose dans 30 ml de TBE 1X jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Refroidir jusqu'à plus ou moins 50°C et couler le gel.

Une fois le gel polymérisé, charger les échantillons dans les puits :

- Oligonucléotide PFK-VIbiotinylé.
- Oligonucléotide PFK-VIbiotinylé + streptavidine.
- Oligonucléotide PFK-VIbiotinylé + streptavidine agarose.

Remplir la cuve avec du tampon TBE 1X, et immerger le gel d'agarose. Réaliser la migration et autoradiographier le gel.

E.4. Colonne de Streptavidine-Agarose

E.4.1. Solutions

Tampon de liaison 2X :

- 40 mM HEPES pH 7,6
- 40% glycérol
- 4 mM MgCl₂
- 1 mM EGTA

E.4.2. Protocole

Dans un embout de pipette, bouché avec de la laine de verre, déposer de la streptavidine-agarose pour obtenir 200 µl de gel tassé. Laver et équilibrer la colonne avec 10 volumes de tampon de liaison 1X à une concentration de 50 mM en KCl.

Ajouter 70 ng d'oligonucléotide double brin PFK-VIbio à 200 µg de protéines dans un volume de 1 ml contenant :

- 500 µl de tampon de liaison 2X
- 50 µl de KCl 1 M
- 5 µl de DTT 1 M
- 5 µl d'aprotinine et de leupeptine à 2 mg/ml
- 75 µl de poly (dIdC)
- et de l'eau distillée pour arriver au volume final.

Laisser incuber pendant 20 minutes. Les protéines vont se fixer sur l'oligonucléotide.

Charger l'incubation sur la colonne de streptavidine-agarose. Récupérer l'incubation et la recharger. Effectuer 4 passages de l'incubation sur la colonne de streptavidine-agarose, afin d'accrocher un maximum d'oligonucléotide complexé aux protéines. Après le quatrième passage, récupérer la fraction appelée "flow-through". Laver la colonne avec 5 volumes de tampon de liaison 1X à 50 mM en KCl.

Ensuite, commencer l'élution :

- au KCl : passer successivement sur la colonne un demi volume de tampon de liaison 1X à 100, 200, 300, 400, 500, 600 et 700 mM en KCl. Récolter les fractions correspondantes (f100, f200, ..., f700).
- à la 1,10-phénanthroline : faire entrer 1 volume de tampon de liaison 1X à 1 mM en phénanthroline dans la colonne, et incuber pendant 20 minutes en bouchant la colonne. Eluer avec 4 fois 1 volume de tampon de liaison 1X à 1 mM en phénanthroline. Récupérer les fractions correspondantes (V_{mort}, E₁, E₂, E₃ et E₄).

E.5. Retard de migration sur gel

Avec les différentes fractions sorties de la colonne de streptavidine-agarose, réaliser une expérience de retard de migration sur gel :

- Elution au KCl : diluer les fractions pour arriver à une concentration finale en KCl de 100 mM.
- Elution à la phénanthroline : rajouter du ZnCl₂ pour arriver à une concentration finale de 200 μ M permettant de restaurer la capacité de liaison.

Faire migrer les fractions, sécher le gel et autoradiographier comme au point B.4.

F. SEPARATION DE PROTEINES SUR HEPARINE-AGAROSE ET LECTINE-AGAROSE :

F.1. Héparine-agarose

F.1.1. Principe (Dean *et al*, 1985)

L'héparine est un mucopolysaccharide acide qui interagit avec les surfaces basiques de nombreuses protéines. De plus, sa structure linéaire ressemblerait à celle des acides nucléiques. Cette colonne d'héparine-agarose est souvent utilisée comme première étape lors de la purification de protéines liant l'ADN. Les protéines de l'extrait nucléaire qui se lient à l'ADN, et donc à la colonne, sont éluées avec des concentrations croissantes en KCl. Ceci permet un fractionnement de l'extrait nucléaire.

F.1.2. Protocole

Pour la stabilité des protéines, travailler à 4°C. Couler l'héparine-agarose dans une colonne (hauteur=50 cm; diamètre=1 cm; volume=40 ml) , et laver avec 10 volumes de tampon de liaison 1X à 200 mM en KCl.

Charger l'extrait nucléaire et récolter le "flow-trough". Laver avec un volume de tampon de liaison 1X à 200 mM en KCl. Commencer l'élution des protéines en passant successivement un volume de tampon de liaison 1X à 300, 400, 500 et 600 mM en KCl, et récolter les fractions correspondantes (f.200, f.300, f.400, f.500 et f.600). Pour affiner la séparation des protéines, la fraction f.400 est éluée et récoltée en deux demi-volumes de colonne et la fraction f.500 en quatre quarts de volumes de colonne.

Décrocher toutes les protéines en passant 3 volumes de tampon de liaison 1X à 1 M en KCl, et puis rééquilibrer la colonne dans du tampon de liaison 1X à 200 mM en KCl et 0,05% azide. L'azide empêche le développement des bactéries dans la colonne.

Doser les protéines dans les différentes fractions et tester ces fractions en retard sur gel.

F.2. Lectine-agarose

F.2.1. Principe

Les lectines sont des protéines végétales qui ont une haute affinité pour des résidus de sucres spécifiques. La *concanavaline A* lie les résidus mannose tandis que l'*agglutinine de germe de blé* lie des résidus terminaux N-acétylglucosamine. La découverte de monosaccharides liés aux hydroxyles des chaînes latérales de sérines ou de thréonines de certaines protéines nucléaires a permis la purification plus aisée de ces facteurs de transcription (Haltiwanger *et al*, 1992; Jackson et Tjian, 1988). En effet, le passage d'un extrait nucléaire ou d'une fraction d'héparine agarose sur une colonne de lectine agarose (*agglutinine de germe de blé*) permet de retenir les protéines glycosylées sur la colonne (Lichsteiner et Schibler, 1989). L'élution se réalise par compétition avec le sucre libre.

F.2.2. Protocole

Couler et laver la lectine-agarose avec 10 volumes de tampon de liaison 1X à 100 mM en KCl. La colonne a une hauteur de 2,5 cm, un diamètre de 0,5 cm et un volume de 500 ml.

Charger l'extrait nucléaire ou la fraction d'héparine-agarose d'intérêt à une concentration en KCl de 100 mM. Récupérer le "flow through" et laver la colonne avec 4 volumes de tampon de liaison 1X à 100 mM en KCl. Eluer avec un demi volume et 5 fois 1 volume de tampon de liaison 1X à 100 mM en KCl et 200 mM en N-acétylglucosamine. Récupérer les fractions d'élution E₁ à E₆.

Régénérer la colonne avec 10 volumes de Tris 100 mM pH 8,5, NaCl 500 mM et puis avec 10 volumes de CH₃COONa 100 mM pH 4,5, NaCl 500 mM. Stocker la colonne dans du tampon de liaison 1X à 100 mM en KCl et 0,05% azide.

Doser les protéines et tester en retard sur gel les différentes fractions.

Liste des produits utilisés

- acétone : Merck
- N-acétyl-D-glucosamine : Koch
- acrylamide : BDH
- agarose : Gibco BRL
- bio-14-dATP : Gibco BRL
- Bio Rad protein assay : Biorad (Richmond, USA)
- CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂ : Merck
- CH₃COONa : Merck
- chloroforme : Merck
- chlorure de guanidinium : BDH
- dithiothreitol : Calbiochem
- EDTA : Boehringer Mannheim
- EGTA : Sigma
- glycérol : Gibco BRL
- héparine-agarose : Sigma
- HEPES : Polylab
- H₃BO₃ : Merck
- lait écrémé en poudre : Gloria-Nestle
- lectine-agarose (*wheat germ agglutinin*) : Sigma
- N, N'-méthylènebisacrylamide : BRL
- β-mercaptoéthanol : Merck
- MgCl₂ : Merck
- NaCl : Merck
- (NH₄)₂SO₄ : Merck
- 1,10-phénanthroline : Sigma
- PMSF : Sigma
- poly(dIdC) : Pharmacia
- SAB : Gibco BRL
- saccharose : Gibco BRL
- SDS : Fluka Chemica
- Sephadex G25 : Pharmacia
- streptavidine-agarose : Sigma
- TEMED : Gibco BRL
- Tris : Gibco BRL
- ZnCl₂ : Merck

RESULTATS et DISCUSSION

Le site VI du promoteur L de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase contient la séquence

5'-GTGGGGGGGGGGG-3',

qui se caractérise par sa richesse en résidus guanine (Lemaigre *et al*, 1991). Des séquences similaires ont été décrites dans d'autres promoteurs et plusieurs facteurs *trans*, reconnaissant ces séquences, ont été caractérisés. Chacune de ces protéines est donc *a priori* capable de se fixer sur le site VI du promoteur L de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. La liste des protéines et leurs principales propriétés sont reprises dans le tableau I.

Notre travail réalisé sur l'empreinte VI comporte deux parties. Dans un premier temps, nous avons caractérisé par des expériences de retard sur gel les facteurs se liant sur le site VI du promoteur L de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Pour ce faire, nous avons testé leur capacité à reconnaître différentes séquences d'ADN, étudié leur sensibilité à un chélateur de cations bivalents, et déterminé leur masse moléculaire relative (M_r) et leur distribution tissulaire. Ces critères devraient nous permettre de déterminer si les protéines qui se lient au site VI sont apparentées aux facteurs repris au tableau I. Dans un second temps nous avons établi les bases d'une séparation par chromatographie des facteurs liant le site VI.

Tableau I : facteur trans pouvant à priori fixer le site VI

	Nom	Séquences-cible	Motif	M _r /kDa	Tissus	Effet sur la transcription	Référence
1	AP-2	CCC ^A /cN ^G /c ^G /c ^G /c	domaine basique	50 kDa	HeLa HepG2	stimulation en réponse à PKC et PKA	Imagawa, 1987
2	E.T.F.	CAGCCCCCGCGCAGC	?	120 kDa	cellules de carcinome épidermoïde humain	stimulation	Kageyama, 1988
3	G10BP	AAAGGGGGGGGGAAGT	?	< Sp1	E1A	inhibition	Nakamura, 1992
4	G.C.F.	c ^G CG ^C /c ^C /g ^C /g	?	91 kDa	cellules de carcinome épidermoïde humain	inhibition	Kageyama, 1989
5	L.S.F.	GGGCGN4GGGCGG	?	63.000	HeLa	stimulation	Huang, 1989
6	HNF-4	G ^G /T ^G CA ^A /T ^{AA} /G ^{GT} /G ^C /T ^{CA} C ^C /T	doigt à zinc (C ₄)	54 kDa	foie, rein et intestin	stimulation	Sladek, 1990
7	COUP-TF	CCAGGGGTCA ^G /T ^G GGGGGGGGTGCTT	doigt à zinc (C ₄)	43 à 53 kDa	HeLa HIT	stimulation	Hwung, 1988 Wang, 1987

	Nom	Séquences-cible	Motif	M_r /kDa	Tissus	Effet sur la transcription	Référence
8	MTF-1	GAGACGTGAGGCGGGC	doigt à zinc ?	< Sp1	HeLa	stimulation en réponse aux métaux lourds	Westin, 1982
9	C2BP	GGTTTCGGGTGTGGTGGTATAGA	?	75.000-80.000	HeLa, foie	stimulation en coopération avec GR	DeVack, 1993
10	C3BP	GGTTTCGGGTGTGGTGGTATAGA	?	35.000-40.000	HeLa, foie	stimulation en coopération avec GR	DeVack, 1993
11	WiF-1	GGGGGCGGGGTGAGCCC	?	65.000	P19, testicules de souris	stimulation	St-Arnaud, 1993
12	BTEB	GAGAAGGAGGCGTGGCCAAC	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	28.000	ubiquiste	inhibition si 1 boîte GC stimulation si plusieurs boîtesGC	Imataka, 1992
13	BTEB2	GAGAAGGAGGCGTGGCCAAC	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	25.000	testicules et placenta	stimulation	Sogawa, 1993
14	BGP1	GGGGGGGGGGGGGGGGCC	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	66.000	érythrocyte de poulet	?	Clark, 1990 Lewis, 1988

	Nom	Séquences-cible	Motif	M _r /kDa	Tissus	Effet sur la transcription	Référence
15	NGF I-C	GCGGGGGCG	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	50 kDa	cerveau, PC12	stimulation	Crosby, 1991
16	Krox24 = Egr1 = Zif268 = NGFI-A = Tis8	GCGGGGGCG	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	80 kDa	ubiquiste	stimulation	Cao, 1990 Lemaire, 1990 Nguyen, 1993
17	Krox20 = Egr2	GCGGGGGCG	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	48 kDa	NIH3T3	stimulation	Vesque, 1992
18	Egr3	GCGGGGGCG	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	43 kDa	pas dans le foie	stimulation	Pathwardkan, 1991
19	Sp1	G ^G /T ^G /AGGC ^G /T ^G /A ^G /A ^G /T	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	95 kDa 105 kDa	ubiquiste	stimulation	Dynana, 1985 Kadonaga, 1986
20	Sp2	GGTGGGTGGAG	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	80 kDa	ubiquiste	stimulation	Kingsley, 1991
21	Sp3	GGTGGGTGGAG	doigt à zinc (C ₂ H ₂)	100 kDa	ubiquiste	stimulation	Kingsley, 1992

1) CARACTERISATION DES FACTEURS TRANS LIANT LE SITE VI

1.1. Spécificité de liaison

Nous avons incubé un extrait nucléaire de foie en présence d'un oligonucléotide marqué (sonde PFK-VI) correspondant à la séquence de l'empreinte VI détectée en footprinting à la DNase I. Les complexes liés à l'ADN sont séparés de l'ADN libre par électrophorèse en gel non dénaturant.

L'autoradiographie du gel montre neuf complexes désignés *a* à bande *i* (figure 1, piste 1). A ce stade, nous ne pouvons pas dire si ces complexes sont spécifiques c'est-à-dire s'ils correspondent à une liaison de haute affinité avec un nombre limité de molécules d'une protéine particulière ou s'ils correspondent au contraire à l'interaction non-saturable de la sonde avec des constituants non définis de l'extrait. Dans ce dernier cas on s'attendrait à ce qu'un excès de sonde non marquée n'épuise pas ces constituants et à ce que la bande retardée persiste. Nous observons qu'un excès molaire d'au moins 50 fois de sonde non radioactive n'influence pas les bandes *f*, *g* et *h*, mais prévient l'apparition des bandes *b*, *c*, *e* et *i*, et entraîne l'atténuation des bandes *a* et *d* (figure 1, piste 4).

Un excès d'oligonucléotide de séquence non apparentée à PFK-VI (oligonucléotide USF; upstream stimulating factor), n'inhibe pas l'apparition des neuf complexes (figure 2, piste 7).

Nous en concluons que les complexes *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *i* sont spécifiques, contrairement aux complexes *f*, *g* et *h*. Les complexes spécifiques *a* et *d* sont les plus abondants. Ceci suggère que la (ou les) protéine(s) impliquée(s) dans la formation de ces complexes sont nettement plus abondante(s).

1.2. Capacité de liaison à d'autres séquences

La séquence du site VI présente des similitudes avec des séquences reconnues par certains facteurs de transcription. En utilisant de l'ADN compétiteur non marqué qui contient le site de liaison pour un facteur déjà décrit, nous pouvons déterminer si ce facteur est responsable d'un des six retards spécifiques.

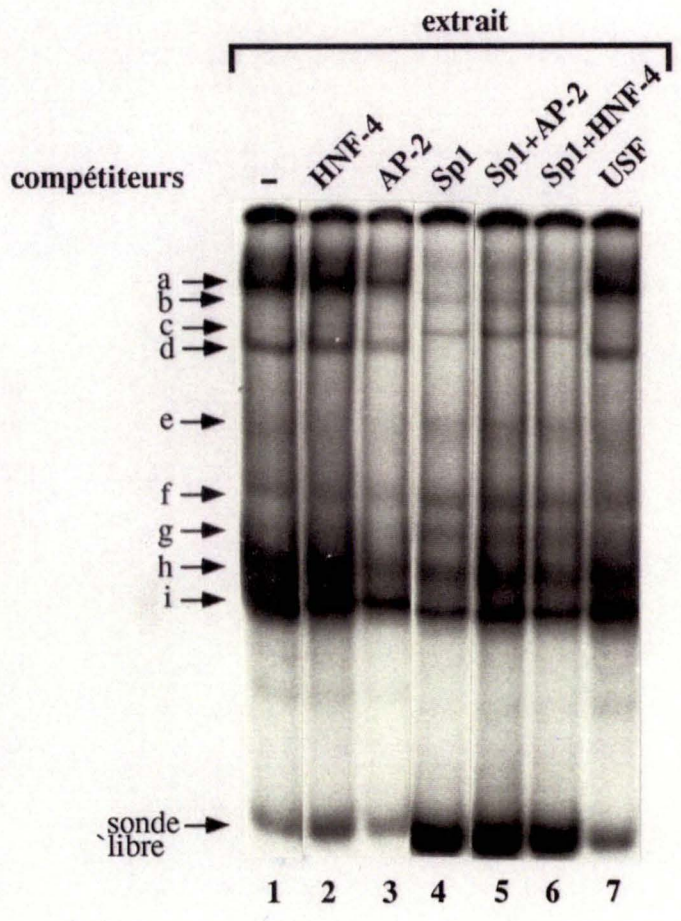
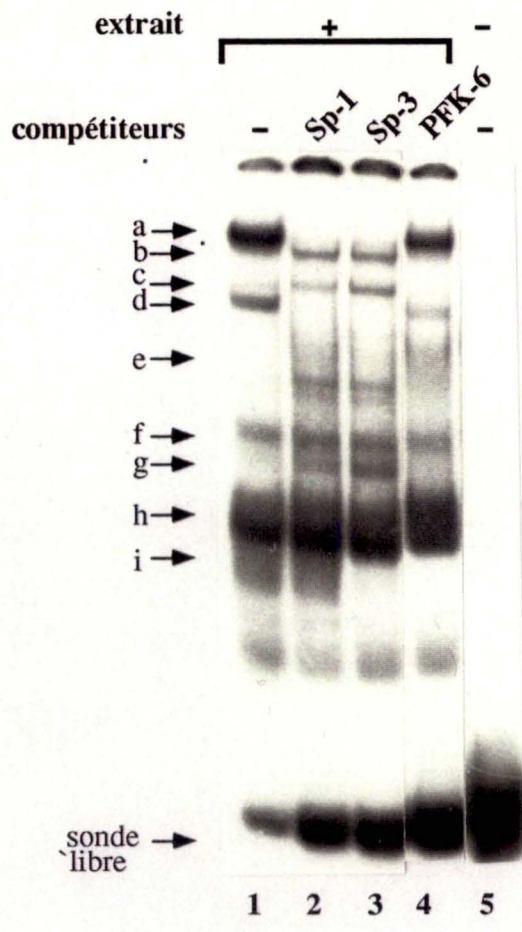


figure 1) Spécificité de liaison.

Incubation de l'extrait nucléaire de foie avec (pistes 2, 3 et 4) ou sans (piste 1) compétiteur pendant 20 minutes. Puis, ajouter la sonde PFK-VI marquée. La piste 5 montre la sonde PFK-VI seule. Les neufs complexes, ainsi que la sonde libre sont indiqués à gauche de l'autoradiographie.

figure 2) Capacité de liaison à d'autres séquences.

La piste 1 ne contient que l'extrait nucléaire avec la sonde PFK-VI, alors que les pistes 2 à 7 contiennent en plus un compétiteur.

Tableau II : Oligonucléotides double brin compétiteurs

PFK IV GATCTGTTGTGGGGGGGGGGGGCTTGTA
 ACAACACCCCCCCCCCGAACATTCTAG

Sp1 CGAGCGGGGCGGGGCTAGCTTA
 GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT

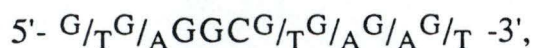
Sp3 TCGAGAGGGTGGGTGGAGTTCGCG
 CTCCACCCACCTCAAAGCGCAGCT

AP-2 ATGAACTGACCGCCCGCGGCCCGTGCTAG
 CTTGACTGGCGGGCGCCGGGCAC

HNF-4 GATCGGCGCTGGGCAAAGGTCACCTGC
 CGCGACCCGTTTCCAGTGGACGGCTAG

USF GTAGGCCACGTGACCGGG
 CATCCGGTGCACTGGCCC

Un premier candidat était le facteur transcriptionnel ubiquiste Sp1 (stimulatory protein 1). En effet, la séquence consensus ("boîte GC") reconnue par cette protéine :

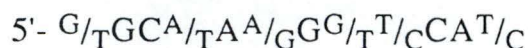


ressemble à la séquence du site VI. La protéine Sp1 a été identifiée grâce à sa capacité d'activer la transcription des gènes précoces du virus simien, SV40. Sp1, qui a été cloné, est une protéine phosphorylée (Jackson *et al.*, 1990) et glycosylée (Jackson et Tjian, 1988) dont l'analyse en SDS-PAGE montre deux bandes de masse moléculaire relative de 105000 et 95000 (Briggs *et al.*, 1986). A l'heure actuelle plusieurs protéines de structure apparentée à Sp1 ont été clonées. Les membres de cette nouvelle famille Sp1 sont appelés Sp2, Sp3 (Kingsley *et al.*, 1992) et Sp4 (Frédéric Lemaigre, communication personnelle). Notons que Sp2 ne reconnaît pas la boîte GC mais bien une séquence dite boîte GT car riche en guanines et en thymines. Sp1 et Sp3 se lient aussi bien à la boîte GC qu'à la boîte GT.

Un second candidat était la protéine AP-2 (activating protein-2), activateur de 50 kDa qui reconnaît la séquence consensus suivante :



Le troisième candidat, HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4), est une protéine de 54 kDa typique du foie. Elle lie le consensus



en formant des dimères.

Les sites de liaison des protéines Sp1, Sp3, AP-2, HNF-4 et USF, ainsi que la séquence de la sonde PFK-VI sont montrés au tableau II.

Nous avons donc réalisé des retards sur gel avec les compétiteurs Sp1, Sp3, AP-2 et HNF-4. Nous incubons les oligonucléotides double brin compétiteurs en excès (1,25 ng/ μ l) avec l'extrait nucléaire de foie pendant 20 minutes avant d'ajouter la sonde PFK-VI radioactive (moins de 0,025 ng/ μ l).

Nous remarquons que l'oligonucléotide compétiteur Sp1 (boîte GC) empêche l'apparition des retards *a* et *d* (figure 1, piste 2). Par contre, les bandes *b* et *c* sont renforcées en présence du compétiteur Sp1. Ce renforcement peut s'expliquer en admettant que le compétiteur Sp1 distraie la protéine Sp1 de la sonde PFK-VI marquée par compétition. Une plus grande quantité de cette dernière est alors disponible pour les complexes *b* et *c*.

Le compétiteur Sp3 prévient l'apparition des bandes *a* et *d* et les complexes *c* et *d* sont également renforcés (figure 1, piste 3). Par ailleurs, ce compétiteur Sp3 lève partiellement la bande *i*.

Les oligonucléotides compétiteurs AP-2 et HNF-4, ajoutés seuls ou en présence du compétiteur Sp1 ne font disparaître aucune bande (figure 2, pistes 2 à 6).

Notons que les six complexes spécifiques disparaissent lorsque l'incubation, de l'extrait nucléaire de foie avec la sonde PFK-VI marquée, est conduite en présence d'un mélange d'oligonucléotides compétiteurs Sp1 et PFK-VI.

Ces expériences de compétition nous permettent de formuler les conclusions suivantes :

- Aucun des six complexes spécifiques ne peut être assigné aux protéines AP-2 ou HNF-4, car leurs sites de liaison n'exercent pas d'effet compétiteur sur les six complexes.
- Les complexes *a* et *d* sont vraisemblablement dus à la protéine Sp1 et, ou à un membre de la famille Sp1.
- Les complexes *b*, *c*, *e* et *i* seraient dus à des protéines non apparentées à la famille Sp1. De plus, le complexe *i* est dû à une protéine douée d'une plus grande affinité pour une boîte GT que pour une boîte GC.

1.3. influence du zinc sur la formation des complexes spécifiques

Comme nous l'avons vu précédemment, un certain nombre de facteurs *trans* (introduction 1.2.b.) requièrent du zinc pour se lier à l'ADN. Les membres de la famille des protéines apparentées à Sp1 appartiennent à la catégorie des protéines doigt à zinc de type C₂H₂.

1.3.a. Inhibition par la phénanthroline

En vue de vérifier si les protéines impliquées dans les complexes spécifiques requièrent du zinc pour se lier à l'ADN, nous avons réalisé une incubation de l'extrait nucléaire et de la sonde PFK-VI en présence de 1,10-phénanthroline. Ce dernier est un chélateur de cations bivalents.

Une expérience préliminaire a consisté à incuber l'extrait nucléaire de foie avec des concentrations croissantes en phénanthroline. Ceci afin de déterminer la concentration à laquelle la déplétion fait disparaître les retards générés par une protéine requérant le zinc pour se lier à l'ADN. Cette expérience nous apprend qu'une concentration de 0,25 mM atténue les bandes *a* et *d*. L'effet inhibiteur est total à 1 mM final en phénanthroline. Toutes les expériences de chélation seront réalisées à cette dernière concentration.

Dans la piste 2 de la figure 3, nous pouvons observer l'effet de la phénanthroline sur la liaison des protéines à la sonde PFK-VI, par rapport à un contrôle ne contenant pas de phénanthroline (figure 3, piste 1). Les bandes *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *i* n'apparaissent plus en présence de phénanthroline.

En utilisant l'oligonucléotide double brin Sp1 comme compétiteur (figure 3, piste 7) les bandes *a* et *d* ne sont plus visibles et les bandes *b* et *c* se renforcent, comme prévu (cfr figure 1). Cette propriété nous permet de mieux observer l'effet de la phénanthroline sur les bandes *b* et *c* (figure 3, piste 8). En présence du chélateur, les bandes *b* et *c* ainsi que les bandes *e* et *i* disparaissent.

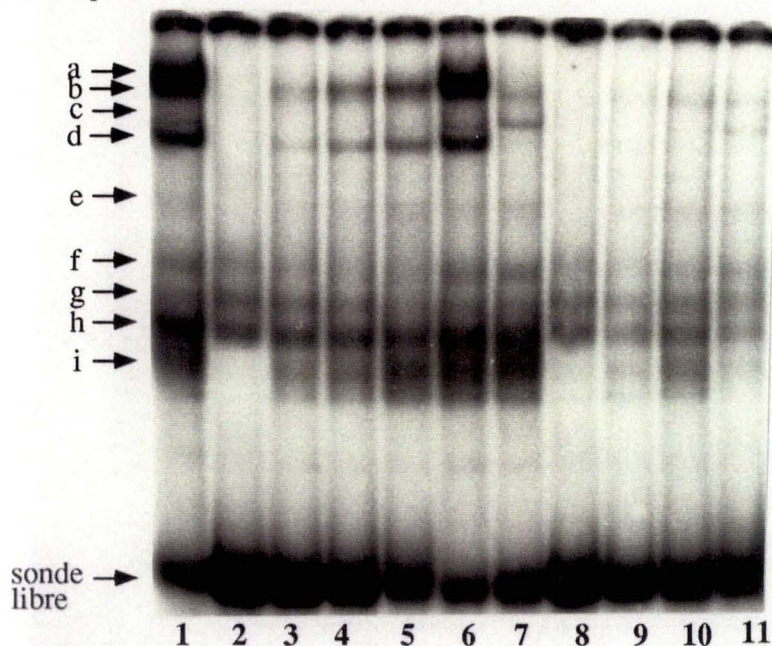
Nous concluons donc que les six complexes *a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *i* résultent de l'interaction de la sonde PFK-VI avec des protéines ayant besoin de cations bivalents pour lier l'ADN.

figure 3) Inhibition par la phénanthroline-restauration par le zinc.
Le contenu de chaque piste est indiqué. L'ordre d'incubation est le suivant : extrait,
+/- compétiteur,
+/- phénanthroline.
Incuber 10 minutes.
Ajouter ou non le zinc.
Incuber 10 minutes.
Ajouter la sonde PFK-VI.

figure 4) Inhibition par la phénanthroline.
Le contenu de chaque piste est indiqué, et l'ordre d'incubation est le même qu'à la figure 3. Mais les cations bivalents testés sont le cobalt (CoCl_2) et le cuivre (CuCl_2).

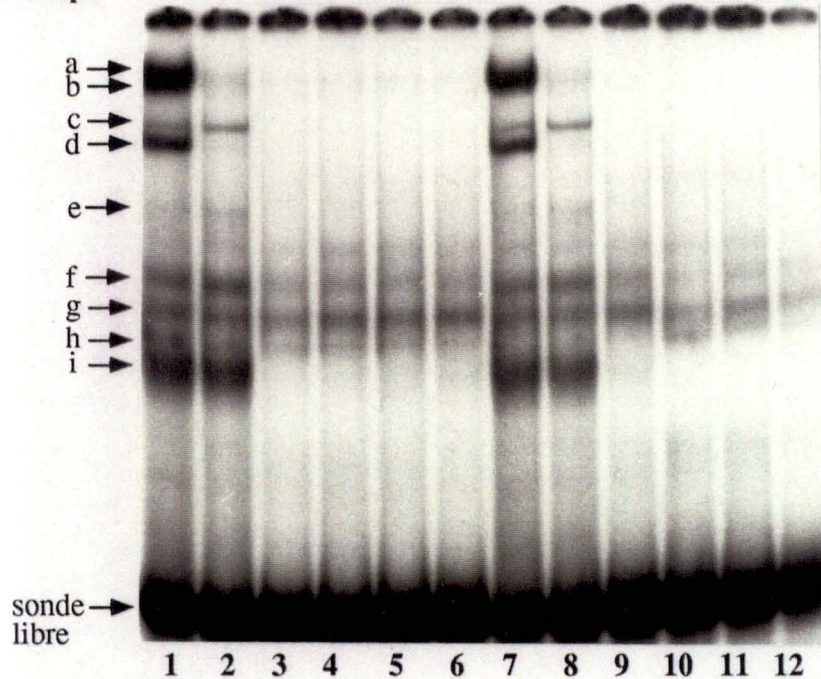
Extrait

Phénanthroline		1mM						1mM				
ZnCl ₂ (μM)	-	-	50	100	200	-	-	-	50	100	200	
Compétiteur Sp1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	



Extrait

		Cobalt (μM)						Cuivre (μM)				
Phénanthroline (1mM)	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Compétiteur Sp1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+



1.3.b. Restauration par le zinc

En outre, si la capture des cations bivalents inhibe la liaison à l'ADN, on s'attendrait à ce que les complexes réapparaissent en ajoutant ces mêmes cations.

Pour tester cette prédiction, nous avons fait agir la phénanthroline 10 minutes avec les protéines de l'extrait nucléaire de foie avant d'ajouter un cation bivalent. La sonde PFK-VI marquée est ajoutée après 10 minutes d'incubation avec le cation.

Toujours en présence de phénanthroline, nous avons testé trois concentrations en chlorure de zinc (ZnCl_2). Dans les pistes 3, 4 et 5 de la figure 3, les concentrations finales en ZnCl_2 sont respectivement de 50 μM , 100 μM et 200 μM . Nous observons la réapparition des six bandes (*a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *i*) à la concentration de 50 μM (figure 3, piste 3) et cet effet se renforce avec l'augmentation de la concentration en ZnCl_2 (figure 3, pistes 4 et 5).

En présence de l'oligonucléotide compétiteur Sp1, les trois concentrations en ZnCl_2 testées (50, 100 et 200 μM dans les pistes 9, 10 et 11 de la figure 3), permettent de faire réapparaître les bandes *b*, *c*, *e* et *i*.

Pour vérifier la spécificité de la reconstitution avec le zinc, nous avons testé d'autres cations bivalents métalliques (cobalt et cuivre) et non métalliques (calcium et magnésium) aux mêmes concentrations que pour le zinc. Ces cations sont ajoutés après 10 minutes d'incubation de l'extrait nucléaire de foie avec la phénanthroline et l'oligonucléotide compétiteur Sp1. La figure 4 montre qu'avec le cobalt (pistes 1 à 6) ou avec le cuivre (pistes 7 à 12), on ne peut s'opposer à l'effet inhibiteur de la phénanthroline. Il en est de même avec le calcium et le magnésium (résultats non montrés).

En conclusion, les six complexes spécifiques (*a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *i*) disparaissent en présence d'un chélateur de cations bivalents et réapparaissent en présence du zinc. Les complexes *a* et *d* appartiennent vraisemblablement à la famille des protéines apparentées à Sp1 (doigt à zinc de type C_2H_2), vu leur comportement vis-à-vis des oligonucléotides compétiteurs Sp1 et Sp3 (figure 1) et vu qu'ils requièrent du zinc (figure 3). Les complexes *b*, *c*, *e* et *i*, bien que requérant du zinc, ne peuvent être classés dans la même famille, étant donné leur comportement différent vis-à-vis des oligonucléotides compétiteurs.

figure 5) Détermination de la M_r par renaturation.

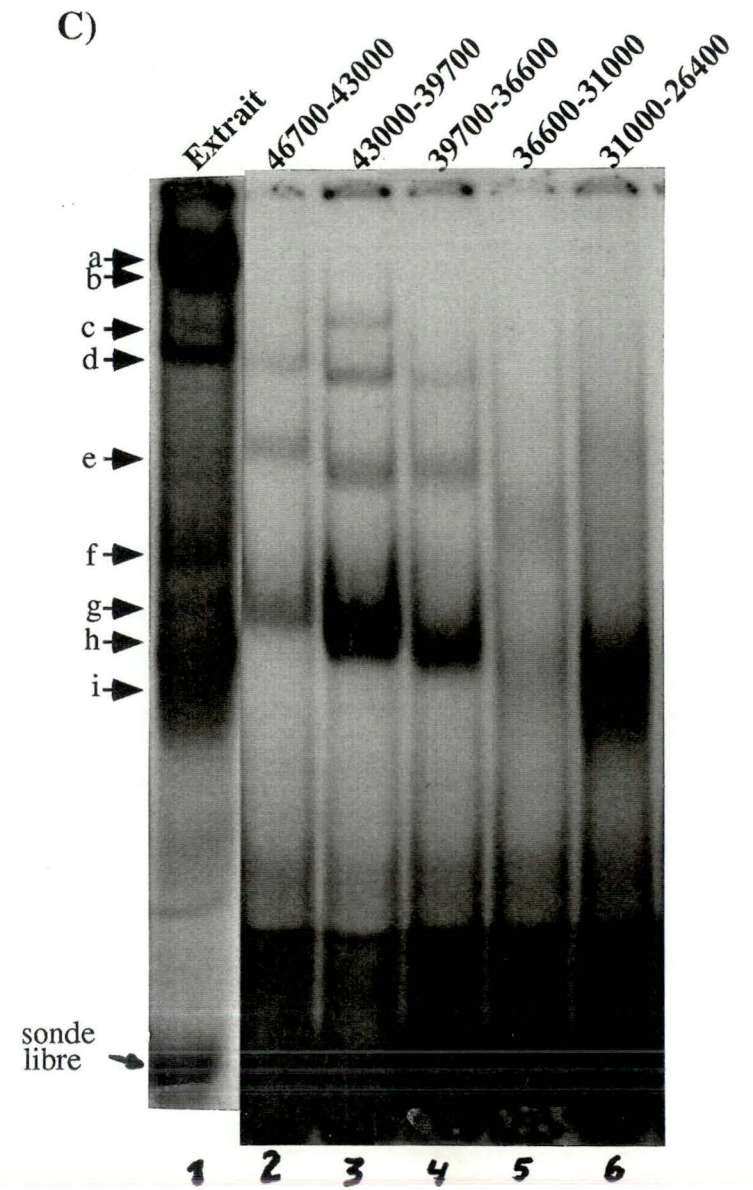
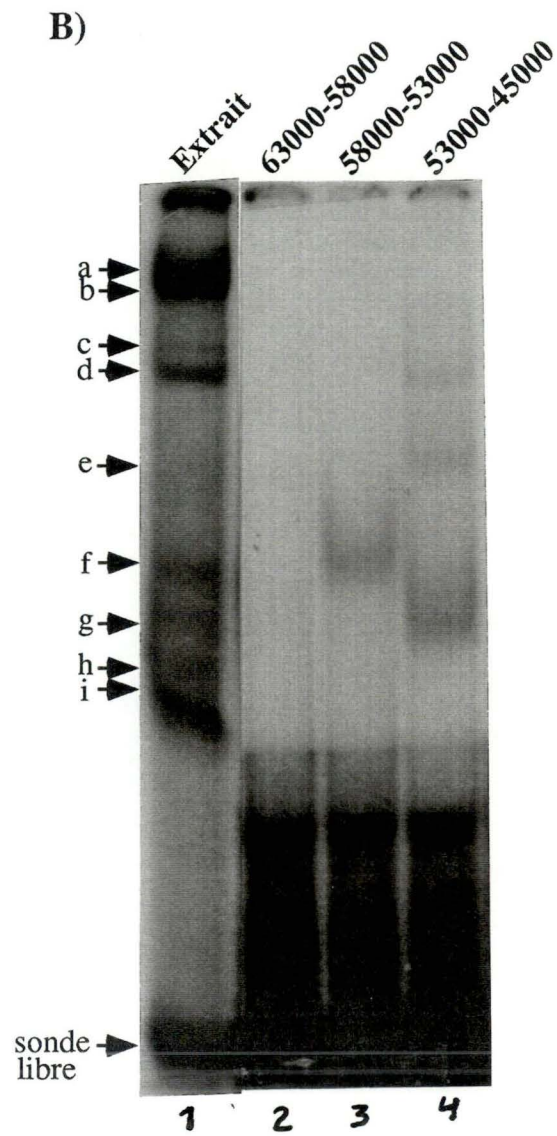
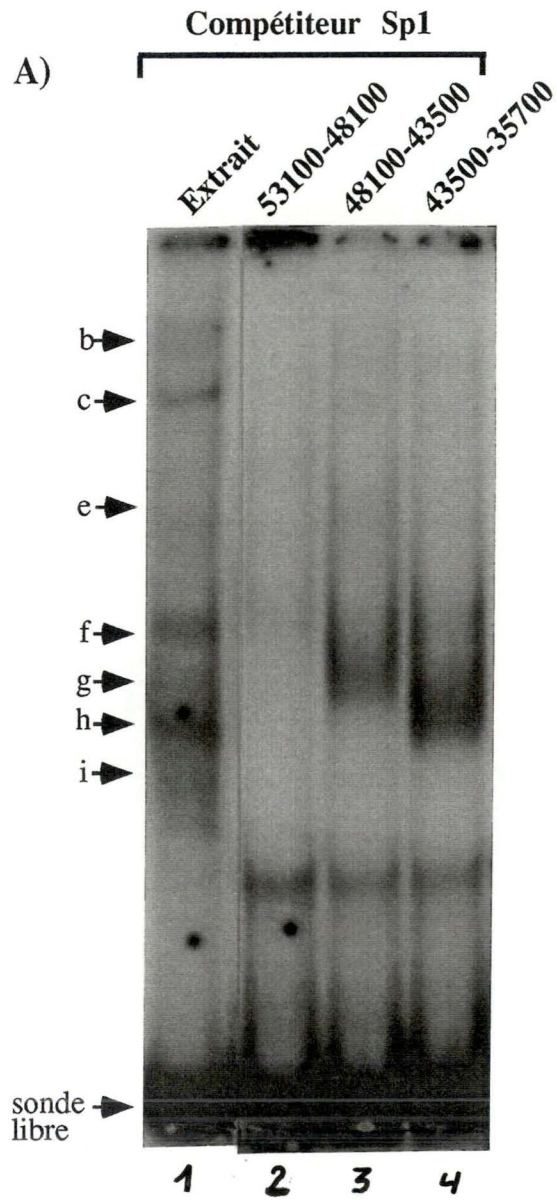
A) Renaturation par dilution de la guanidine-HCl.

Toutes les pistes contiennent le compétiteur Sp1.

B) Renaturation par séparation de la guanidine-HCl sur Sephadex G25.

C) Renaturation par dialyse de la guanidine-HCl.

Les chiffres au sommet des pistes indiquent les M_r des protéines éluées d'une tranche du SDS-PAGE et renaturées.



1.4. Détermination de la masse moléculaire relative par réticulation aux ultraviolets

L'irradiation aux UV des complexes visualisés en retard sur gel peut permettre la formation de liens covalents entre les protéines et l'ADN radioactif. Nous disposons donc d'un moyen pour marquer les protéines, permettant ainsi leur visualisation après analyse sur SDS-PAGE (cfr matériels et méthodes). Cette technique utilisée pour déterminer la masse moléculaire relative des complexes spécifiques s'est révélée infructueuse.

1.5. Détermination de la masse moléculaire relative par renaturation

Pour déterminer la masse moléculaire relative (M_r) des complexes spécifiques, nous avons séparé les protéines sur SDS-PAGE, et testé leur liaison à la sonde PFK-VI après élution du gel et renaturation en solution. Trois protocoles de renaturation ont été utilisés (cfr matériel et méthodes).

Les résultats de ces expériences sont montrés à la figure 5. Notons tout d'abord que la renaturation ne s'est correctement réalisée que pour les protéines de M_r inférieure à 60000.

Lorsque la renaturation est effectuée par dilution de la guanidine-HCl (protocole 1), deux complexes g' et h' sont détectés. Leur M_r est respectivement estimée entre 48100 et 43500, et entre 43500 et 35700 (figure 5A, pistes 3 et 4). Le second protocole de renaturation (élimination de la guanidine-HCl sur Sephadex G25) montre en retard sur gel, non seulement la bande g' (M_r comprise entre 53000 et 45000; figure 5B, piste 4), mais aussi une bande f' (M_r comprise entre 58000 et 53000; figure 5B, piste 3). Enfin, la renaturation par dialyse de la guanidine-HCl révèle l'existence des bandes g' (M_r comprise entre 46700 et 43000; figure 5C, piste 2) et h' (M_r comprise entre 43000 et 36600; figure 5C, pistes 3 et 4). Ce protocole permet également la production d'un complexe i' (M_r comprise entre 31000 et 26400; figure 5C, piste 6).

Notons que g' et h' produisent des retards supplémentaires et moins intenses, qui sont compatibles avec la formation de complexes multimériques (figure 5B, piste 4; figure 5C, pistes 2, 3 et 4).

Tableau III : masse moléculaire relative (M_r) de plusieurs complexes

Complexe	protocole	M_r ($\times 10^{-3}$)	candidats pour la gamme de M_r
f'	II	58 - 53	HNF-4 COUP-TF
g'	I	48,1 - 43,5	COUP-TF AP-2
	II	53 - 45	NGFI-C Krox 20
	III	46,7 - 43	Egr3
h'	I	43,5 - 35,7	
	III	43 - 39,7	COUP-TF
	III	39,7 - 36,6	
i'	III	31 - 26,4	BTEB

La spécificité des complexes g' et h' a été établie par compétition avec la sonde PFK-VI non marquée (résultats non montrés). Cette expérience n'a pas pu être réalisée avec les complexes f' et i' , faute de matériel.

Ces données sont récapitulées dans le tableau III.

La bande f' est générée par une protéine de M_r comprise entre 58000 et 53000. Le tableau I, montre que la protéine typique du foie, HNF-4 et la facteur de la transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet, COUP-TF sont dans cette fourchette de masse moléculaire relative.

La M_r du complexe g' est comprise entre 53000 et 43000. Les protéines Egr 3, Krox 20, NGFI-C, AP-2 et COUP-TF ont une M_r compatible avec celle de g' . Néanmoins, la protéine Egr 3 peut être éliminée car elle ne se trouve pas dans le foie.

Quant à h' , sa M_r est comprise entre 43000 et 36000, ce qui est compatible avec celle de C_3BP .

La bande i' , produite par une protéine de M_r comprise entre 31000 et 26400 pourrait correspondre à la protéine BTEB, une protéine ubiquiste doigt à zinc. Il faut toutefois noter que cette bande i' comigre avec la bande i qui disparaît en présence de phénanthroline.

1.6. Distribution tissulaire

Les caractéristiques propres à un tissu proviennent en partie de la régulation de l'expression génique, exercée principalement lors de la transcription des gènes en ARN. Certains facteurs *trans* sont restreints à un seul tissu ou type cellulaire et induisent la transcription de gènes particuliers. Puisque notre travail consiste à caractériser des protéines qui lient l'empreinte VI du promoteur de type hépatique de la PFK-2/FBPase-2, nous voulions savoir si une ou plusieurs de ces protéines étaient spécifiques du foie.

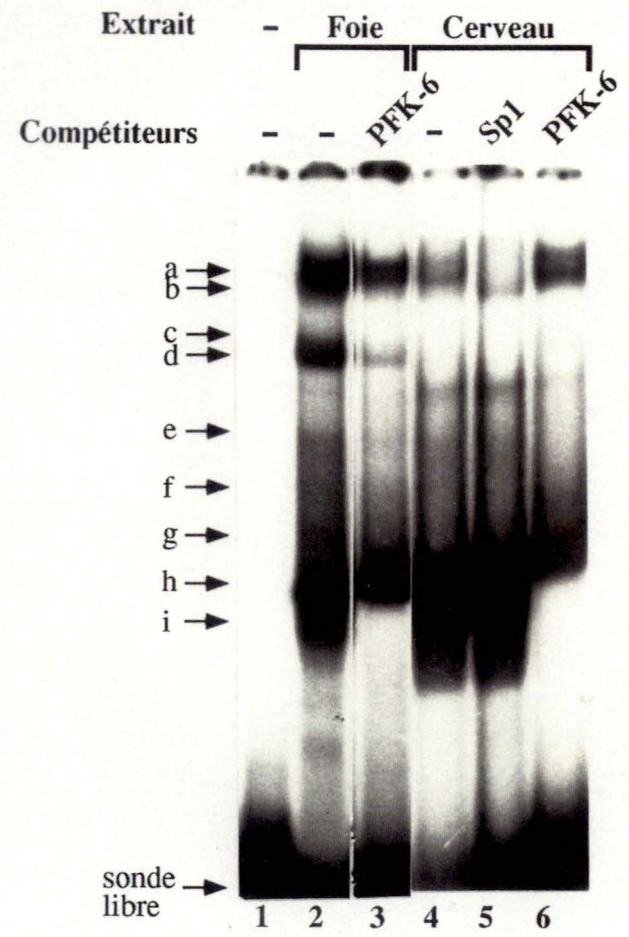
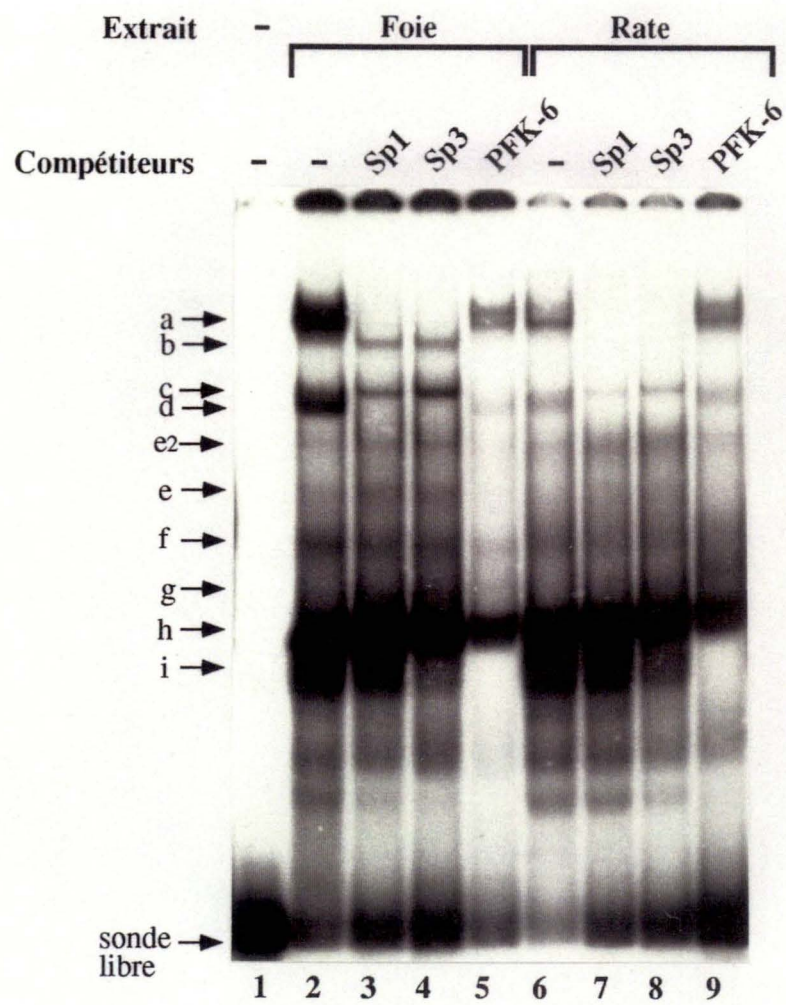
Pour ce faire, nous avons réalisé des extraits nucléaires à partir de rein, de poumon, de rate et de cerveau. Nous avons testé en retard sur gel la présence dans ces extraits de facteurs capables de se fixer sur le site VI de la PFK-2/FBPase-2.

figure 6) Distribution tissulaire.

Le comportement des complexes observés avec un extrait nucléaire de foie (pistes 2 à 5) en présence de compétiteurs et de la sonde PFK-VI, est comparé à un extrait nucléaire de rate.

figure 7) distribution tissulaire.

Comparaison des complexes observés avec un extrait nucléaire de foie et un extrait nucléaire de cerveau.



Si l'on ne tient pas compte de l'extrait nucléaire de rein dont les protéines ont subi une forte dégradation, chacun des complexes spécifiques détectés avec l'extrait nucléaire de foie se retrouve dans au moins un des extraits. Nous avons examiné plus en détail les résultats obtenus avec les extraits nucléaires de rate et de cerveau en nous référant à l'extrait nucléaire de foie. Pour nous aider à identifier les complexes formés, nous avons utilisé les compétiteurs Sp1, Sp3 et PFK-VI.

Avec l'extrait nucléaire de rate, nous observons les complexes *a*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h* et *i* (figure 6, piste 6). La spécificité de liaison est démontrée dans la piste contenant le compétiteur PFK-VI non marqué. Nous remarquons un éclaircissement des bandes *c* et *e*, et une disparition du complexe *i* (figure 6, piste 9). Une autre bande (*e*₁) apparaît au dessus de la bande *e*. Le complexe *b* n'est pas visible, même en présence des compétiteurs Sp1 et Sp3 (figure 6, pistes 7 et 8). La bande *c*, par contre, apparaît clairement dans ces conditions. Sur les six complexes spécifiques du foie (*a*, *b*, *c*, *d*, *e* et *i*), cinq (*a*, *c*, *d*, *e* et *i*) sont observés avec l'extrait de rate.

Avec l'extrait nucléaire de cerveau, les complexes que nous retrouvons sont les suivants : *a*, *b*, *e*₁, *e*, *f*, *g*, *h* et *i* (figure 7, piste 4). L'addition de compétiteur PFK-VI non marqué, provoque la disparition des bandes *b* et *i* et l'atténuation de la bande *e* (figure 7, piste 6). Le compétiteur Sp1 fait disparaître la bande *a*, et renforce la bande *b* (figure 7, piste 5). Ces expériences suggèrent que les bandes *a*, *b*, *e* et *i* sont spécifiques.

Nous pouvons conclure en disant que nous n'avons pu détecter la liaison, à la séquence VI, d'un facteur qui serait hépatospécifique. Nous notons toutefois les deux différences suivantes. Premièrement, le complexe *b* ne se forme pas avec l'extrait nucléaire de rate. Deuxièmement, les complexes *c* et *d* ne sont pas détectés avec l'extrait nucléaire de cerveau.

2) PURIFICATION PARTIELLE

La caractérisation détaillée des facteurs *trans* qui interagissent avec les séquences *cis* d'ADN requiert leur purification.

2.1. Streptavidine-agarose

En se basant sur la haute affinité de la streptavidine pour la biotine, une méthode de purification, ou d'enrichissement, de protéines liant l'ADN peut être mise au point. Elle est basée sur le principe qu'une protéine liée à un oligonucléotide double brin biotinyllé peut être captée sur une colonne constituée d'agarose-streptavidine. Cette méthode offre plusieurs avantages. Tout d'abord, les complexes ADN biotinyllé/protéines sont formés en solution dans les mêmes conditions que les retards sur gel. Ensuite, ces mêmes complexes se fixent rapidement sur la colonne grâce à la haute affinité de la streptavidine pour la biotine. Enfin, la matrice présente une grande capacité ce qui permet de travailler avec des petits volumes de colonne et donc d'éviter de diluer les protéines.

Nous avons tout d'abord vérifié que les protéines qui reconnaissent la sonde PFK-VI, lient bien l'oligonucléotide PFK-VI biotinyllé, en utilisant ce dernier comme compétiteur non marqué dans une expérience de retard sur gel. Les bandes *b*, *c*, *e* et *i* disparaissent comme avec le compétiteur PFK-VI. Par contre, le devenir des bandes *a* et *d* ne changent pratiquement pas.

Pour purifier les protéines se liant au site PFK-VI, nous avons incubé l'oligonucléotide PFK-VI biotinyllé avec l'extrait nucléaire et nous avons chargé l'incubation sur la colonne de streptavidine-agarose. Après lavage de celle-ci, nous avons décroché les protéines de l'oligonucléotide PFK-VI biotinyllé au moyen de concentrations croissantes en KCl. Les différentes fractions d'élution ont été testées en retard sur gel avec la sonde PFK-VI. Tous les complexes spécifiques observés avec l'extrait brut se forment avec les fractions 200 et 300 mM en KCl, ce qui ne permet pas de purification.

Nous avons tenté d'éluer spécifiquement avec de la phénanthroline les protéines qui se lient à la séquence VI. Ces protéines sont censées se décrocher de l'oligonucléotide PFK-VI biotinylé si elles ont besoin de zinc pour s'y lier. Cependant, le retard sur gel avec les fractions d'élution en présence de $ZnCl_2$, pour restaurer la capacité de liaison, n'a montré aucun retard de la sonde PFK-VI. Les protéines ne se sont donc pas décrochées de la colonne, ce qui suggère qu'elles sont retenues non spécifiquement sur la streptavidine-agarose. Nous avons en effet découvert que les protéines responsables des retards spécifiques sont retenues sur la colonne même en absence de l'oligonucléotide PFK-VI biotinylé.

En conclusion, ce type de colonne ne s'avère pas utile pour la purification des facteurs se liant sur PFK-VI.

2.2. Héparine-agarose

Ce type de colonne est souvent utilisée comme première étape lors de la purification de facteurs transcriptionnels.

Le facteur transcriptionnel liant l'empreinte IV du promoteur L de la PFK-2/FBPase-2 étant en cours de purification au laboratoire, nous utilisons les fractions d'une colonne héparine-agarose chargée avec environ 400 mg de protéines d'extrait nucléaire de foie de rat, et éluee au moyen d'un gradient discontinu de KCl. Les changements de paliers de concentration en KCl sont effectués après élution par un volume de colonne. Chaque fraction correspond à l'éluat d'un palier, sauf pour les paliers de 400 et 500 mM en KCl, pour lesquels les éluats ont été respectivement sous-fractionnés en deux et en quatre.

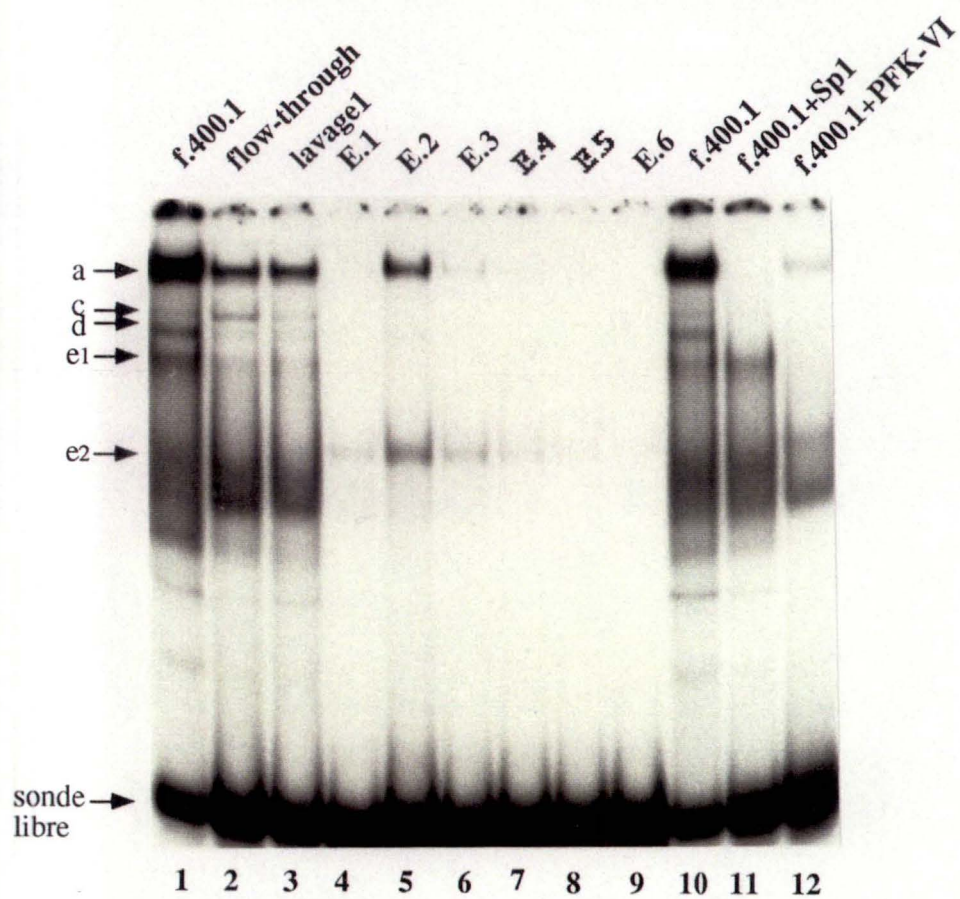
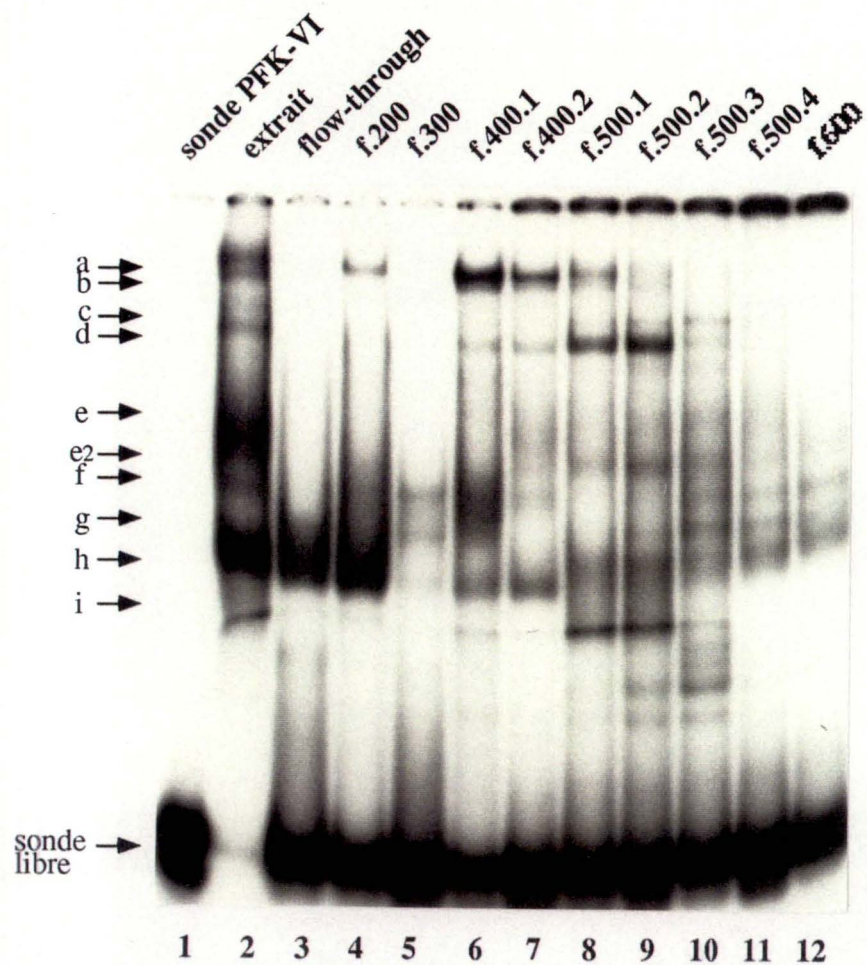
Nous avons testé les différentes fractions en retard sur gel avec la sonde PFK-VI (figure 8, pistes 2 à 11). La bande *a* sort de la colonne dans les fractions de 200 à 500 mM en KCl, avec un pic d'élution dans la fraction 400.1. Dans la piste (5) qui contient les protéines de la fraction de 300 mM en KCl on n'observe pas la bande *a* car la concentration protéique de cet extrait était trop faible. La bande *b* est détectable dans les fractions 500.1 et 500.2, tout comme la bande *c* que nous observons en plus dans les fractions 500.3. Dans les fractions de 400 et de 500 mM, nous détectons la bande *d* qui possède un maximum dans la fraction 500.2. La bande *e* se décroche de l'héparine-agarose à une concentration en KCl de 500 mM, et nous la décelons dans les fractions 500.2 et 500.3.

figure 8) Fractionnement sur une colonne d'héparine-agarose.

La piste 1 contient la sonde PFK-VI seule, et la piste 2 contient l'extrait nucléaire de foie en présence de cette même sonde. Dans les pistes 3 à 12, on observe les complexes produits par les différentes fractions d'éluion. Les fractions sont diluées, si nécessaires, pour arriver à une concentration de 100 mM en KCl.

figure 9) Séparation de la fraction 400.1 d'héparine-agarose sur une colonne de lectine-agarose.

Dans la piste 1 on observe les complexes formés par la fraction 400.1. Les pistes 2 à 9 contiennent les différentes fractions d'éluion de la colonne de lectine-agarose. Les fractions appelées E.1 à E.6 sont éluée au N-acétylglucosamine. Dans les deux dernières pistes, la fraction 400.1 est en compétition avec Sp1 (piste 11) et avec PFK-VI (piste 12).



Les bandes non-spécifiques *f* et *g* sortent au dessus de 500 mM en KCl, alors que la bande *h* (non-spécifique) sort principalement dans le "flow-through" et la fraction 200. Enfin, la bande *i* s'élue à 500 mM dans les deux premières fractions. D'autres bandes sont visibles grâce à ce fractionnement. Notons tout particulièrement l'apparition, autour de 500 mM en KCl, d'un complexe (e_2) migrant entre les bandes *e* et *f*. Entre *g* et *h*, une bande (h_1) s'élue au dessus de 500 mM en KCl. Enfin, bien qu'attribuées à Sp1, les bandes *a* et *d* correspondent à des fractions d'élution différentes.

En conclusion, nous arrivons à bien séparer les complexes sur une colonne d'héparine-agarose.

2.3. Lectine-agarose

Cette colonne de lectine (*agglutinine de germe de blé*)-agarose permet de retenir les protéines qui sont glycosylées et de les éluer, après lavage, par compétition avec du N-acétylglucosamine. Pour savoir si les protéines liant l'empreinte VI sont glycosylées, nous avons passé différentes fractions de l'héparine-agarose sur la lectine-agarose.

Jackson et Tjian (1988) ont montré que la protéine Sp1 portait environ huit résidus N-acétylglucosamine. Donc, si la protéine Sp1 est responsable d'un de nos complexes spécifiques, elle sera retenue sur la colonne de lectine, et on observera son retard dans les fractions d'élution au N-acétylglucosamine. La fraction 400.1 de l'héparine-agarose, qui contient les complexes *a*, *b* et *c* ainsi que d'autres complexes inconnus, a été passée sur la colonne de lectine-agarose (figure 9, piste 1 à 9).

Dans le "flow-through" et le lavage, nous observons les complexes *a*, *c*, *d* et e_1 (pistes 2 et 3). Notons que la bande *c* apparaît bien dans le "flow-through", alors qu'elle est à peine détectée dans la fraction 400.1 elle-même (piste 1). Ceci montre qu'il y a moyen d'enrichir une protéine en utilisant ce type de colonne. La bande *a* et la bande *d* apparaissent dans les fractions d'élution au N-acétylglucosamine (pistes 5 et 6). Une autre bande (e_2) sort aussi de la lectine-agarose lorsque l'on élue au N-acétylglucosamine (pistes 5, 6 et 7). Nous montrons dans les trois dernières pistes des expériences de compétition avec les oligonucléotides double brin Sp1 et PFK-VI.

Le compétiteur PFK-VI nous montre bien la spécificité des bandes *a*, *c*, *d* et *e*₁ (piste 12). Les bandes *a* et *d* de la fraction 400.1 sont bien levées par le compétiteur Sp1 (piste 11).

Nous avons ensuite passé la fraction d'héparine-agarose 500.1 sur la lectine-agarose (figure 10, pistes 1 à 7). Trois bandes (*a*, *d* et *e*₂) apparaissent dans les fractions éluées au N-acétylglucosamine (pistes 4 à 7). Les bandes *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* et *i* sont présentes dans le "flow-through" et le lavage.

L'utilisation des compétiteurs Sp1 et PFK-VI nous montre que les retards de ces fractions (figure 10, pistes 8 et 9) se comportent de la même manière que dans un extrait brut. L'excès de compétiteur PFK-VI empêche la formation de tous les complexes de la fraction 500.1 (piste 9), alors que le compétiteur Sp1 fait disparaître les bandes *a* et *d* (piste 8). Le fait que le compétiteur PFK-VI empêche la visualisation de toutes les bandes, y compris la bande *f*, nous indique que tous les complexes de cette fraction 500.1 sont spécifiques de la sonde PFK-VI. Or, avec un extrait brut, ils ne le sont pas tous (*f*, *g* et *h*). Ceci amène deux hypothèses concernant la bande *f*. La première est que cette bande *f* spécifique n'est pas la bande *f* non spécifique que l'on observe dans un extrait brut. Par ailleurs, on peut penser qu'avec la purification, les interactions protéines-ADN ne sont plus non-saturables, et donc qu'un compétiteur peut les faire disparaître.

La fraction d'héparine-agarose 500.2 permet de former les complexes *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g* et *i* (figure 11, piste 1). Nous avons chargé cette fraction sur la colonne de lectine-agarose, et testé la liaison des différentes fractions à la sonde PFK-VI (figure 11, pistes 2 à 8). Les bandes *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g* et *i* sont visibles dans le "flow-through" et le lavage (pistes 2 et 3). L'elution au N-acétylglucosamine permet de décrocher les protéines responsables des bandes *a* et *d* de l'*agglutinine de germe de blé* (pistes 4 et 5).

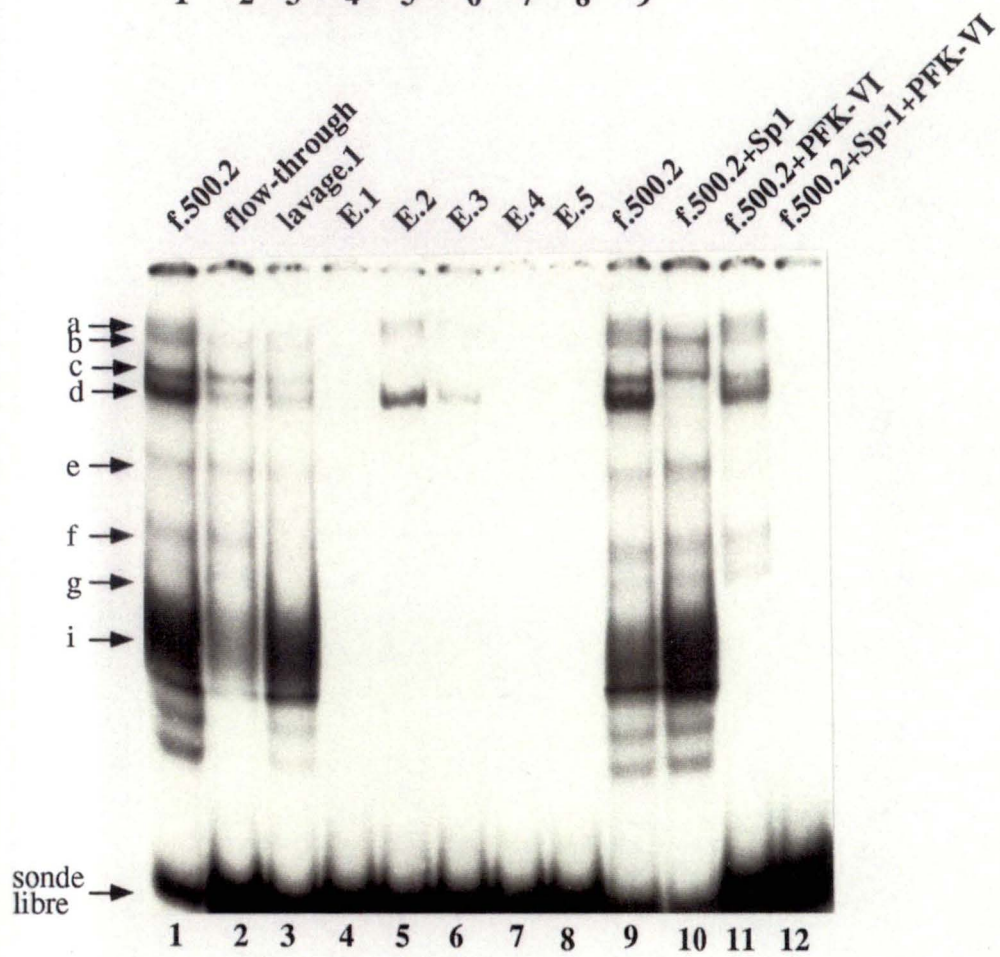
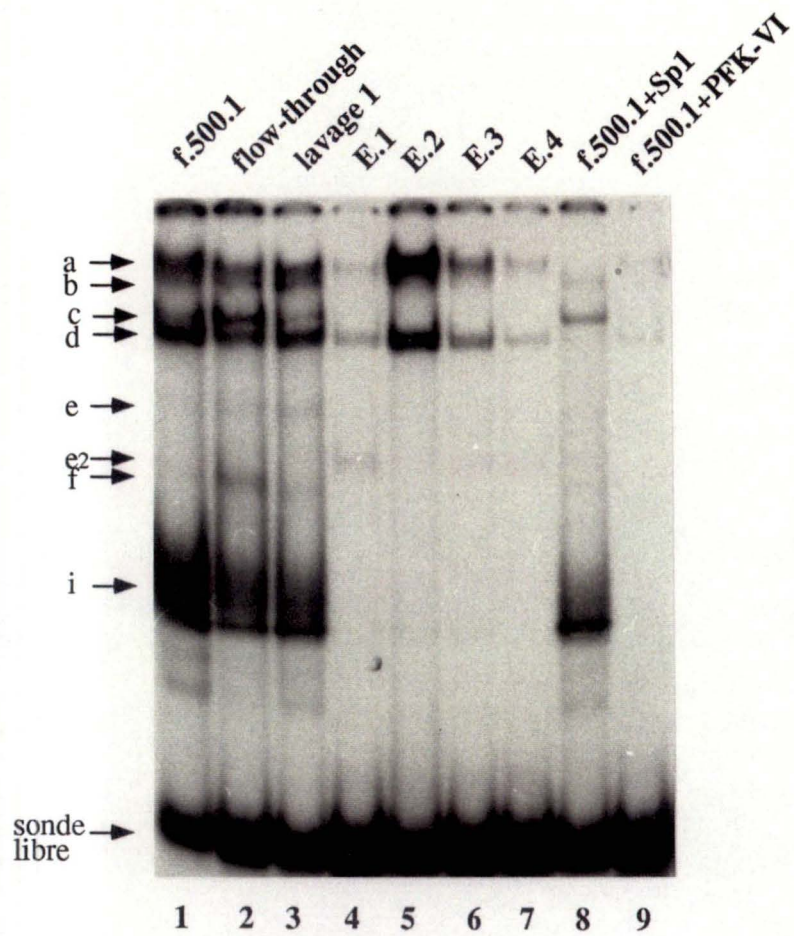
Dans les pistes 9 à 12 de la figure 11, nous observons les résultats obtenus avec les compétiteurs Sp1 et PFK-VI sur la fraction 500.2 en présence de sonde PFK-VI. Par rapport à la piste contrôle (piste 9), la compétition avec Sp1 nous montre la disparition des bandes *a* et *d* (piste 10). Le compétiteur PFK-VI (piste 11), qui sert à montrer la spécificité des complexes de la fraction 500.2, fait disparaître principalement les bandes *e* et *i*, et éclaircit la piste. Dans la piste 12, la présence simultanée des deux compétiteurs (Sp1 et PFK-VI) fait disparaître tous les retards, même les retards qualifiés de non spécifiques dans un extrait brut (*f* et *g*).

figure 10) Séparation de la fraction 500.1 d'héparine-agarose sur une colonne de lectine-agarose.

Les complexes observés avec la fraction 500.1 (piste 1) sont indiqués à gauche de la figure. Les fractions d'élution de la colonne sont testées en retard sur gel avec la sonde PFK-VI. Les pistes 8 et 9 contiennent les compétiteurs Sp1 et PFK-VI avec la fraction 500.1 et la sonde PFK-VI.

figure 11) Séparation de la fraction 500.2 d'héparine-agarose sur une colonne de lectine-agarose.

Dans la piste 1 on observe les retards que la fraction 500.2 peut produire. Les pistes 2 à 8 montrent les retards de cette même fraction, séparée sur la lectine-agarose. Dans les trois dernières pistes, on peut observer l'effet de deux compétiteur.



Ces résultats nous apprennent que la bande *a* est glycosylée et est probablement présente à une concentration élevée vu que nous l'observons dans les "flow-through" et lavages des fractions 400.1 et 500.1. Cette protéine est en excès par rapport à la capacité de la colonne de lectine-agarose. Nous montrons aussi que la bande *a* disparaît en présence d'un excès du site de liaison pour la protéine Sp1. La même conclusion vaut pour la bande *d*, également glycosylée. Une autre protéine glycosylée lie la séquence VI et génère, en retard sur gel, la bande *e*₂. Cette bande n'apparaît pas dans un extrait nucléaire brut. Par contre, toutes les autres bandes (*b*, *c*, *e*, *f*, *g*, *h* et *i*) ne sont pas retenues par l'*agglutinine de germe de blé*, et ne sont donc pas glycosylées.

Nous avons donc entamé les prémices d'une purification qui comporte deux étapes : un fractionnement de l'extrait nucléaire sur une colonne d'héparine-agarose et une séparation des protéines glycosylées des protéines non-glycosylées.

Tableau IV : caractéristiques des complexes *a* à *i*

complexes	compétiteurs non marqués			Zinc		tissus			propriétés chromatographiques	
	PFKVI	Sp1	Sp3	inhibition par la phénanthroline	restauration par le ZnCl ₂	foie	rate	cerveau	élution KCl sur héparine	glycosylation
<i>a</i>	↓	↓ _o	↓ _o	oui	oui	oui	oui	oui	f200-f500.1	oui
<i>b</i>	↓ _o	↑	↑	oui	oui	oui	non	oui	f500.1-f500.2	non
<i>c</i>	↓ _o	↑	↑	oui	oui	oui	oui	non	f500.1-f500.3	non
<i>d</i>	↓	↓ _o	↓ _o	oui	oui	oui	oui	non	f400.1-f500.2	oui
(<i>e1</i>)						oui	oui	oui		non
<i>e</i>	↓ _o	=	=	oui	oui	oui	oui	oui	f500.2-f500.3	non
(<i>e2</i>)									f500.1-f500.2	oui
<i>f</i>	=	=	=	non	non	oui	oui	oui	f500.2-f600	non
<i>g</i>	=	=	=	non	non	oui	oui	oui	f500.2-f600	non
<i>h</i>	=	=	=	non	non	oui	oui	oui	F.T.-f200	non
<i>i</i>	↓ _o	=	↓	oui	oui	oui	oui	oui	f500.1-f500.2	non

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Le motif riche en guanines identifié dans l'empreinte VI du promoteur L du gène A de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase joue le rôle d'un élément régulateur positif. Nous avons utilisé la technique du retard sur gel pour caractériser les protéines d'un extrait nucléaire de foie se liant à ce fragment d'ADN. Le tableau IV résume le comportement des neuf complexes (dont six sont spécifiques de la séquence VI) en présence d'oligonucléotides compétiteurs et d'un chélateur de cation bivalent. En outre, ce tableau IV indique qu'aucun des complexes n'est spécifique du foie, et qu'il est possible de séparer certains complexes au moyen de colonnes d'héparine-agarose et de lectine-agarose.

In vitro, la séquence de l'empreinte VI forme deux complexes prépondérants et spécifiques (bandes *a* et *d*). Les expériences (voir tableau IV) démontrent que les bandes *a* et *d* ont des caractéristiques identiques à la protéine Sp1 ou à un membre de sa famille. Le facteur de transcription Sp1 a été identifié comme une protéine liant les boîtes GC du promoteur précoce de SV40 (Gidoni *et al*, 1984). Le clonage de ce facteur a révélé qu'il appartient à la famille des protéines doigt à zinc de type C₂H₂ (Kadonaga *et al*, 1987) et qu'il est ubiquiste (Saffer *et al*, 1991). D'autre part, cette protéine est glycosylée par environ huit résidus N-acétylglucosamine (Jackson et Tjian, 1988). Enfin, deux autres protéines (Sp2 et Sp3) apparentées à Sp1 ont été clonées. On parle de la famille de Sp1 (Kingsley et Winoto, 1991).

Le fractionnement de l'extrait nucléaire de foie sur une colonne d'héparine-agarose sépare la bande *a*, dont le pic d'élution est dans la fraction 400.1 de la bande *d* dont le pic d'élution est dans la fraction 500.2. En 1986, Briggs et ses collaborateurs observent deux espèces (M_r de 105000 et de 95000) qui portent toutes deux l'activité de liaison Sp1. Ces deux espèces seraient des formes différentes de la même protéine qui subiraient soit une dégradation protéolytique, soit des modifications posttraductionnelles telles que la phosphorylation (Saffer *et al*, 1991) ou la glycosylation (Jackson et Tjian, 1988).

Il est cependant peu probable que les complexes *a* et *d* correspondent à ces deux espèces puisque ces dernières ont été décrites (Briggs *et al.*, 1986) dans la même fraction d'élution (300 mM KCl) d'héparine-agarose.

Une autre possibilité est que la séquence VI puisse lier soit une, soit deux molécules de Sp1 et produire ainsi respectivement la bande retardée *d* et la bande retardée *a*. Dans les gènes connus pour lier Sp1, cette protéine reconnaît le triplet GGC au sein d'un nona- ou d'un décanucléotide. La sonde PFK-VI comprend 24 nucléotides. Elle pourrait donc théoriquement lier deux molécules de Sp1. En raison de l'absence du triplet GGC dans la séquence VI, nous ne pouvons pas déterminer si deux molécules de Sp1 peuvent interagir simultanément avec cette séquence. L'absence de ce triplet GGC pourrait même nous faire écarter la protéine Sp1 comme candidat pour les complexes *a* et *d*. En effet, la substitution de ce triplet par GGG entraîne une chute de l'affinité du site pour Sp1 d'au moins 30 fois (Letovsky et Dynan, 1989).

Ceci offre une troisième hypothèse, celle qui pose que les complexes *a* et *d* sont dus à la protéine Sp2 (masse moléculaire relative de 80000) et (ou) à la protéine Sp3 (masse moléculaire relative de 100000). En effet, les complexes *a* et *d* sont prévenus par un compétiteur (Sp3, boîte GT) connu pour lever Sp2 et Sp3. Mais on sait que la protéine Sp2 ne se lie pas à une boîte GC (Kingsley et Winoto, 1992). Donc, le fait que les complexes *a* et *d* soient levés par l'oligonucléotide compétiteur Sp1 (boîte GC) écarte également la protéine Sp2 comme candidat.

Quant à Sp3, ce facteur a une M_r de 100000, et donne un produit de dégradation, encore capable de lier l'ADN, d'une M_r de 75000 (Kingsley et Winoto, 1992). Il se pourrait donc que les complexes *a* et *d* correspondent à l'interaction de la protéine doigt à zinc Sp3 avec la sonde PFK-VI.

Les protéines impliquées dans les quatre autres complexes spécifiques, *b*, *c*, *e* et *i*, ont une plus grande affinité pour la séquence VI et (ou) sont moins abondantes que les protéines impliquées dans les complexes *a* et *d*. De plus, les complexes spécifiques, *b*, *c*, *e* et *i*, ne s'observent qu'en présence de zinc. Cependant, ces complexes n'étant pas affectés par un oligonucléotide compétiteur Sp1 (boîte GC) ou Sp3 (boîte GT), ils ne font pas partie des membres connus de la famille Sp1.

Les critères utilisés pour déterminer si ces quatre complexes résultent de l'interaction d'une (ou de plusieurs) protéine(s) du tableau I avec la séquence VI, n'ont pas permis de faire correspondre ces protéines aux complexes *b*, *c* et *e*. Par contre, un candidat possible pour le complexe *i* est la protéine ubiquiste doigt à zinc BTEB dont la M_r est de 28000. En effet, la bande *i* est présente dans tous les tissus testés et requiert le zinc pour la liaison. De plus, les expériences de renaturation ont permis de détecter une bande, comigrant avec la bande *i* (*i'*) dont la M_r (31000-26400) est compatible avec celle de BTEB.

A ce stade de l'étude de la régulation transcriptionnelle de la PFK-2/FBPase-2 de foie, deux questions se posent encore quant au rôle de la séquence correspondant à l'empreinte VI. La première est l'identité des facteurs *trans* qui se lient spécifiquement à ce site VI *in vivo* dans le foie. La deuxième porte sur la fonction régulatrice de ce(s) facteur(s) lors de la transcription.

Notre contribution a été d'identifier, parmi les protéines se liant spécifiquement à l'empreinte VI *in vitro*, une ou deux protéines de la famille Sp1 (bandes *a* et *d*) et probablement la protéine BTEB (bande *i*). Les trois autres complexes spécifiques (*b*, *c* et *e*) n'ont pas trouvé, avec les critères utilisés, de candidat parmi le tableau I. La suite du travail sera d'identifier la (ou les) facteur(s) responsable(s) des bandes *b*, *c* et *e* sur base des étapes de purification déjà établies. En effet, nous avons montré que ces trois complexes sont séparables des complexes *a* et *d* par chromatographie sur colonne d'héparine-agarose et de lectine-agarose. La suite du schéma de purification comprendrait une colonne d'affinité avec l'oligonucléotide PFK-VI. Le microséquençage de la protéine purifiée et le clonage seraient les étapes ultimes.

Une autre direction serait d'établir la corrélation entre la liaison d'un facteur en retard sur gel, et l'activité en transfection. Pour ce faire, le site VI serait muté en différents endroits et sa capacité de liaison serait analysée en retard sur gel. La présence d'un complexe particulier pourrait ainsi être corrélée à l'activité transcriptionnelle de ce même site muté, placé dans le contexte du promoteur L testé en transfection.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adams C.C., Workman J.L.** (1993) Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72 : 305-308.
- **Angrand P.O.** (1993) Les domaines de liaison de l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes. *Med./Sci.* 9 : 725-736.
- **Baxevanis A.D., Vinson C.R.** (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors : where is the specificity ?. *Curr. Opin. Gen. and Dev.* 3 : 278-285.
- **Briggs M.R., Kadonaga J.T., Bell S.P., Tjian R.** (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234 : 47-52.
- **Cao X., Koski R.A., Gashler A., McKiernan M., Morris C.F., Gaffney R., Hay R.V., Sukhatme V.P.** (1990) Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 1931-1939.
- **Cifuentes M.E., Espinet C., Lange A.J., Pilgis S.J., Hod Y.** (1991) Hormonal control of 6-PF-2-K/F-2,6-BPase gene expression in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 266 : 1557-1563.
- **Clark S.P., Lewis C.D., Felsenfeld G.** (1990) Properties of BGP1, a poly(dG)-binding protein from chicken erythrocytes. *Nucleic Acids Res.* 18 : 5119-5126.
- **Cleary M.A., Stern S., Tanaka M., Herr W.** (1993) Differential positive control by Oct-1 and Oct-2 : activation of a transcriptionally silent motif through Oct-1 and VP16 corecruitment. *Genes & Dev.* 7 : 72-83.
- **Corden J.L.** (1993) RNA polymerase II transcription cycle. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3 : 213-218.

- Crosby S.D., Puetz J.J., Simburger K.S., Fahrner T.J., Milbrandt J. (1991) The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 3835-3841.
- Darville M.I., Crepin K.M., Hue L., Rousseau G.G. (1989) 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86 : 6543-6547.
- Dean P.D.G., Johnson W.S., Middle F.A. (1985) Affinity chromatography. A practical approach. IRL Press.
- DeVack C., Lupp B., Nichols M., Kowenz-Leutz E., Schmid W., Schütz G. (1993) Characterization of the nuclear proteins binding the CACCC element of a glucocorticoid-responsive enhancer in the tyrosine aminotransferase gene. *Eur. J. Biochem.* 211 : 459-465.
- Dignam J.D., Lebovitz R.M., Roeder R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolate mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11 : 1475-1489.
- Drapkin R., Merino A., Reinberg D. (1993) Regulation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 : 469-476.
- Ellenberger T.E., Brandl C.J., Struhl K., Harrison S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α -helix : crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71 : 1223-1237.
- Espinet C., Vargas A.M., Raafat El-Maghrabi M., Lange A.J., Pilgis S.J. (1993) Expression of the liver 6-PF-2-K/F-2,6-BPase mRNA in FAO cells. *Biochem. J.* 293 : 173-179.
- Felsenfeld G. (1992) Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355 : 219-224.
- Gidoni D., Dynan W.S., Tjian R. (1984) Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature* 312 : 409-413.

- **Gill G., Tjian R.** (1992) Eukaryotic coactivators associated with the TATA box binding protein. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 2 : 236-242.
- **Giniger E., Ptashne M.** (1987) Transcription in yeast activated by a putative amphiphatic alpha helix linked to a DNA-binding unit. *Nature* 330 : 670-672.
- **Hagenbüchle O., Wellauer P.K.** (1992) A rapid method for the isolation of DNA-binding proteins from purified nuclei of tissues and cells in culture. *Nucleic acids Res.* 20 : 3555-3559.
- **Hahn S.** (1993) Efficiency in activation. *Nature* 363 : 672-673.
- **Haltiwanger R.S., Kelly W.G., Roquemore E.P., Blomberg M.A., Dony L.-Y. D., Kreppel L., Chou T.-Y., Hart G.W.** (1992) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem. Soc. Trans.* 20.
- **Harrison S.C.** (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353 : 715-719.
- **Hattori M., Tugores A., Veloz L., Karin M., Brenner D.A.** (1990) A simplified method for the preparation of transcriptionally active liver nuclear extracts. *DNA Cell Biol.* 9 : 777-781.
- **Hegde R.S., Grossman S.R., Laimins L.A., Sigler P.B.** (1992) Crystal structure at 1,7 Angström of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359 : 505-512.
- **Herr W., Sturm R.A., Clerc R.G., Corcoran L.M., Baltimore D., Sharp P.A., Ingraham H.A., Rosenfeld M.G., Finney M., Ruvkun G., Howitz H.R.** (1988) The POU domain : a large conserved region in mammalian Pit-1, Oct-1, Oct-2 and *Caenorhabditis elegans* Unc-86 gene products. *Genes & Dev.* 2 : 1513-1516.
- **Huang H.-C., Sundseth R., Hansen U.** (1990) Transcription factor LSF binds two variant bipartite site within the SV40 late promoter. *Genes & Dev.* 4 : 287-298.
- **Hue L., Rider M.H.** (1987) Role of fructose-2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 245 : 313-324.

- **Hughes M.J., Liang H., Jost J.P.** (1991) Molecular weight determination of DNA-binding protein by UV crosslinking combined with SDS polyacrylamide gel electrophoresis *in A laboratory guide to in vitro studies of protein-DNA interactions*, Jost J.P., Saluz H.P. (eds). *Biomethods*
- **Hunter T., Karin M.** (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70 : 375-387.
- **Hwung Y.-P., Crowe D.T., Wang L.-H., Tsai S.Y., Tsai M.-J.** (1988) The COUP transcription factor binds to an upstream promoter element of the rat insulin II gene. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 2070-2077.
- **Imagawa M., Chiu R., Karin M.** (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways : Protein kinase C and cAMP. *Cell* 51 : 251-260.
- **Imataka H., Sogawa K., Yasumoto K.-I., Kikuchi Y., Sasano K., Kobayashi A., Hayami M., Fujii-Kuriyama Y.** (1992) Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene. *The EMBO Journal* 11 : 3663-3671.
- **Jackson S.P., MacDonald J.J., Lees-Miller S., Tjian R.** (1990) GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63 : 155-165.
- **Jackson S.P., Tjian R.** (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors : implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55 : 125-133.
- **Kadonaga J.T., Carner K.R., Masiarz F.R., Tjian R.** (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51 : 1079-1090.
- **Kageyama R., Merlino G.T., Pastan I.** (1988) A transcription factor active on the epidermal growth factor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86 : 5016-5020.
- **Kageyama R., Merlino G.T., Pastan I.** (1989) Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoter without a TATA box. *J. Biol. Chem.* 264 : 15508-15514.

- **Kageyama R., Pastan I.** (1989) Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. *Cell* 59 : 815-825.
- **Kamenetskii M.F.** (1989) Waves of DNA supercoiling. *Nature* 337 : 206.
- **Kaptein R.** (1991) Zinc finger structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 : 109-115.
- **Kingsley C., Winoto A.** (1992) Cloning of GT box-binding proteins : a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 4251-4261.
- **Klug A.** (1993) Opening the gateway. *Nature* 365 : 486-487.
- **Lange A.J., Espinet C., Hall R., Raafat El-Maghrabi M., Vargas A.M., Misicek R.J., Granner D.K., Pilkis S.J.** (1992) Regulation of gene expression of rat skeletal muscle/liver 6-PFK-2/FBPase-2. *J. Biol. Chem* 267 : 15673-15680.
- **Latchman D.S.** (1991) Eucaryotic transcription factors. Academic Press.
- **Leblond-Francillard M., Dreyfus M., Rougeon F.** (1987) Isolation of DNA-protein complexes based on streptavidin and biotin interaction. *Eur. J. Biochem.* 166 : 351-355.
- **Lee C., Levin A., Branton D.** (1987) Copper-staining : a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 166 : 308-312.
- **Lemaigre F.P., Durviaux S.M., Rousseau G.G.** (1991) Identification of regulatory sequences and protein-binding sites in the liver-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 1099-1106.
- **Lemaire P., Vesque C., Schmitt J., Stunnenberg H., Frank R., Charnay P.** (1990) The serum-inducible gene Krox -24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 3456-3467.
- **Letovsky J., Dynan W.S.** (1989) Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* 17 : 2639-2653.

- **Leuther K.K., Salmeron J.M., Johnston S.A.** (1993) Genetic evidence that an activator domain of GAL4 does not require acidity and may form β -sheet. *Cell* 72 : 575-585.
- **Lewis J., Bird A.** (1991) DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett.* 285 : 155-159.
- **Lewis C.D., Clark S.P., Felsenfeld G., Gould H.** (1988) An erythrocyte-specific protein that binds to the poly(dG) region of the chicken β -globin gene promoter. *Genes & Dev.* 2 : 863-873.
- **Lichsteiner S., Schibler U.** (1989) A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. *Cell* 57 : 1179-1187.
- **Ma J., Ptashne M.** (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51 : 113-119.
- **Marker A.J., Colosia A.D., Tauler A., Solomon D.H., Cayre Y., Lange A.J., El-Maghrabi M.R., Pilgis S.J.** (1989) Glucocorticoid regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression. *J. Biol. Chem.* 264 : 7000-7004.
- **Marmorstein R., Carey M., Ptashne M., Harrison S.C.** (1992) DNA recognition by GAL4 : structure of a protein-DNA complex. *Nature* 356 : 408-414.
- **Meek D.W., Street A.J.** (1992) Nuclear protein phosphorylation and growth control. *Biochem. J.* 287 : 1-15.
- **Merino A., Madden K.R., Lane W.S., Champoux J.J., Reinberg D.** (1993) DNA topo I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* 365 : 227-232.
- **Mermod N., O'Neill E.A., Kelly T.J., Tjian R.** (1989) The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58 : 741-753.
- **Mitchell P.J., Tjian R.** (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245 : 371-378.

- Nakamura T., Nakajima T., Tsunoda S., Nakada S., Oda K., Tsurui H., Wada A. (1992) Induction of E1A-responsive negative factors for transcription of the fibronectin gene in adenovirus E1-transformed rat cells. *J. Virol.* 66 : 6436-6450.
- Nardelli J., Gibson T., Charnay P. (1992) Zinc finger-DNA recognition : analysis of base specificity by site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 20 : 4137-4144.
- Nikolov D.B., Hu S.H., Lin J., Gasch A., Hoffmann A., Horikoski M., Chua N.H., Roeder R.G., Burley S.K. (1992) Crystal structure of TFII-D TATA-box binding protein. *Nature* 360 : 40-46.
- Pabo C.O., Sauer R.T. (1992) Transcription factors : structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61 : 1053-1095.
- Pavletich N.P., Pabo C.O. (1993) Crystal structure of the five-finger Gli-DNA complex : new perspectives on zinc fingers. *Science* 261 : 1701-1717.
- Ptashne M. (1986) Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 322 : 697-701.
- Ptashne M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work ?. *Nature* 335 : 683-689.
- Rousseau G.G., Hue L. (1993) Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase : a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Progr. Nucleic Ac. Res. Mol. Biol.*
- Roy A.L., Carruthers C., Gutjahr T., Roeder R.G. (1993) Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* 365 : 359-361.
- Roy A.L., Malik S., Meisterernst M., Roeder R.G. (1993) An alternative pathway for transcription initiation involving TFII-I. *Nature* 365 : 355-359.
- Saffer J.D., Jackson S.P., Annarella M.B. (1991) Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 2189-2199.

- **Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Sawadogo M., Roeder R.G.** (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 43 : 165-175.
- **Sigler P.B.** (1988) Acid blobs and negative noodles. *Nature* 333 : 210-212.
- **Sladek F.M., Zhong W., Lai E., Darnell J.E.Jr.** (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes & Dev.* 4 : 2353-2365.
- **Smale S.T., Baltimore D.** (1989) The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57 : 103-113.
- **Sogawa K., Imataka H., Yamasaki Y., Kusume H., Abe H., Fujii-Kuryama Y.** (1993) cDNA cloning and transcriptional properties of a novel GC box-binding protein, BTEB2. *Nucleic Acids Res.* 21 : 1527-1532.
- **StArnaud R., Moir J.M.** (1993) Wnt-1-inducing factor-1 : a novel G/C box-binding transcription factor regulating the expression of Wnt-1 during neuroectodermal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 1590-1598.
- **Tate P.H., Bird A.P.** (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3 : 226-231.
- **Treisman J., Harris E., Wilson D., Desplan C.** (1992) The homeodomain : a new face for the helix-turn-helix. *Bio Essays* 14 n°3 : 145-150.
- **Van Hoy M., Leuther K.K., Kodadek T., Johnston S.A.** (1993) The acidic activation domains of the GCN4 and GAL4 proteins are not α -helical but forms β -sheets. *Cell* 72 : 587-594.
- **Vesque C., Charnay P.** (1992) Mapping functional regions of the segment-specific transcription factor Krox-20. *Nucleic Acids Res.* 20 : 2485-2492.

- **Wall S.R., van den Hove M.F., Crepin K.M., Hue L., Rousseau G.G.** (1989) Thyroid hormone stimulates expression of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* 257 : 211-214.
- **Wang J., Nishiyama K., Araki K., Kitamura D., Watanabe T.** (1987) Purification of an octamer sequence (ATGCAAAT)-binding protein from human B cells. *Nucleic acids Res.* 15 : 10105-10116.
- **Wang L.-H., Tsai S.Y., Sagami I., Tsai M.-J., O'Malley B.W.** (1987) Purification and characterization of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 262 : 16080-16086.
- **Westin G., Schaffner W.** (1988) A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *The EMBO Journal* 7 : 3763-3770.
- **Williams M., Brys A., Weiner A.M., Maizels N.** (1992) A rapid method for determining the molecular weight of a protein bound to nucleic acid in a mobility shift assay. *Nucleic Acids Res.* 20 : 4935-4936.
- **Wolberger C.** (1993) transcription factor structure and DNA binding. *Curr. Opin. Struct. Biol* 3 : 3-10.
- **Wolberger C., Vershan A.K., Liu B., Johnson A.D., Pabo C.O.** (1991) Crystal structure of a Mat $\alpha 2$ homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67 : 517-528.
- **Workman J.L., Buchman A.R.** (1993) Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription. *Trends Biochem. Sci.* 18 : 90-95.