

ANNEXE V ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES TÉLOMÈRES

Une cellule humaine contient environ 6 pg d'ADN, soit $\pm 6 \times 10^9$ pb**, réparti entre 46 chromosomes. Pour étudier la structure des télomères, et notamment pour mesurer leur longueur, il est souvent utile de les séparer du reste de l'ADN. Une simple remarque suffit pour faire comprendre l'étendue du problème. Observée au microscope électronique à un grossissement de 20 000 fois, une molécule non brisée d'ADN humain mesure plus d'un km et se présente sous la forme d'une pelote inextricable, dont il est impossible de repérer les bouts.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer la longueur des répétitions terminales de l'ADN. L'une recourt à l'hybridation sur réplique ou *Southern blot* sur les télomères isolés préalablement. Une autre recourt à un procédé d'amplification in vitro de l'ADN, appelé PCR⁺. Elle permet de dénombrer les répétitions coiffant une paire déterminée de chromosomes, et d'identifier les bases terminales de l'ADN. La technique de l'hybridation est également utilisée pour repérer la présence de répétitions terminales sur des chromosomes préparés pour l'examen histologique. Cette variante du procédé d'hybridation est appelée Fish⁺.

V.A. ISOLEMENT DES TÉLOMÈRES

Pour isoler les télomères, on tire parti du fait que les répétitions terminales ne comportent pas de séquences qui pourraient être reconnues et coupées par des endonucléases d'origine bactérienne, appelées enzymes de restriction (*fig. V.A*). Ces enzymes coupent l'ADN chromosomique en fragments très courts, mais laissent intactes les séries terminales de six pb. Il suffit d'éliminer les petits fragments par une méthode de filtration sur gel pour enrichir la préparation d'ADN en séquences télomériques.

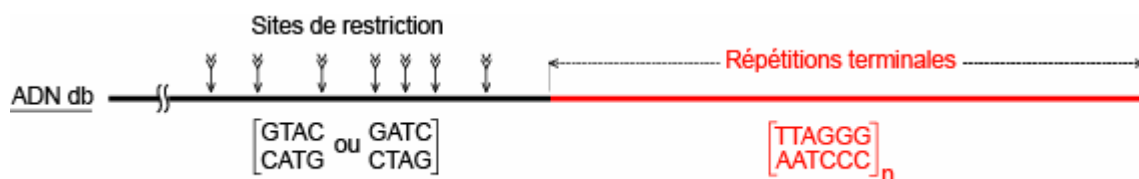


Fig. V.A. Action des enzymes de restriction sur l'ADN des télomères humains.

Ces enzymes coupent l'ADN au niveau de courtes séquences palindromiques*, appelées sites de restriction. De tels sites parsèment les régions internes et subterminales de l'ADN, mais n'existent pas dans les régions terminales, qui sont des répétitions monotones d'une séquence non palindromique. Des enzymes reconnaissant des palindromes de quatre bases, tels que GTAC et GATC, coupent les régions intérieures de l'ADN en petits fragments, mesurant en moyenne $256 (4^4)$ pb, mais respectent la continuité des répétitions terminales.

V.B. MESURE DE LA LONGUEUR GLOBALE DES TÉLOMÈRES

L'hybridation sur réplique sert à caractériser des fragments de restriction portant des répétitions [TTAGGG/CCCTAA]_n. Elle comporte six étapes.

L'étape **1** consiste à digérer l'ADN par un ou plusieurs enzymes de restriction (*fig. V.A*). L'étape **2** a pour objectif de séparer les fragments de restriction en fonction de leur taille, en les soumettant à une électrophorèse en milieu gélifié, où ils migrent vers le pôle (+) d'autant plus vite qu'ils sont plus petits. L'étape **3** consiste à transférer les fragments sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon, qui portera une empreinte ou *réplique*, conservant la position des fragments dans le gel. Il faut d'abord dénaturer l'ADN, c'est-à-dire séparer ses deux brins, en plongeant le gel dans une solution alcaline. Après neutralisation, le gel est placé au contact d'une membrane, qui adsorbe l'ADN sb** et, une fois qu'elle est séchée, ne le laisse plus diffuser, ni réassocier ses brins. L'étape **4** est l'hybridation proprement dite. La membrane est placée pendant quelques heures à 50 - 65°C dans une solution saline contenant une ADN sb radioactif de séquence [CCCTAA]_n ou [TTAGGG]_n, faisant office de sonde. Cette dernière s'apparie avec le brin complémentaire de l'ADN télomérique et forme des molécules hybrides [TTAGGG/CCCTAA]_n ou [CCCTAA/TTAGGG]_n. L'étape **5** a pour objet d'éliminer par une série de lavages l'excès de sonde non hybridée. Seul l'endroit où la membrane porte des molécules hybrides reste radioactif. L'étape **6** révèle la position de la zone marquée. Il faut pour cela exposer la membrane à un film de radiographie. Le développement fait apparaître une ou plusieurs taches noires. Pour estimer la taille des fragments terminaux, il suffit de comparer la distance qu'ils ont parcourue dans le gel avec les distances couvertes par des fragments de longueur connue.

V.C. MESURE DE LA LONGUEUR DES TÉLOMÈRES INDIVIDUELS

Pour mesurer les télomères d'un chromosome déterminé, il faut amplifier l'ADN qui les constitue. Le procédé d'amplification permet d'obtenir de nombreuses copies d'une région déterminée d'un ADN, comprise entre deux bornes, matérialisées par de courtes séquences (± 20 pb), connues de l'expérimentateur. Pour amplifier les répétitions terminales d'une paire de chromosomes (par exemple X et Y), on utilise des bornes (A et B) situées de part et d'autre de ces répétitions (*fig. V.B*).

L'amplification recourt à une ADN polymérase* bactérienne qui fait la navette entre les bornes et produit à chaque fois deux copies db de la région intermédiaire. Le milieu réactionnel contient : **(1)** l'ADN à amplifier, **(2)** les quatre précurseurs de l'ADN (dATP, dTTP, dGTP et dCTP), **(3)** une dose de polymérase fonctionnant et résistant à une température élevée (que l'on appelle Taq, parce qu'elle provient de la bactérie *Thermus aquaticus*) et **(4)** deux oligonucléotides qui fournissent les amorces nécessaires au fonctionnement de la polymérase.

La réaction est déclenchée par des variations de température. Un bref passage à haute température (94° C) sépare les brins de l'ADN. Un refroidissement jusqu'à 65° C permet à chaque amorce de s'apparier avec le brin complémentaire de l'ADN dénaturé. Un réchauffement à une température un peu supérieure déclenche la polymérisation. L'opération est renouvelée plusieurs dizaines de fois. À chaque cycle de réactions, le nombre de copies db présentes dans le milieu

réactionnel est multiplié par deux. Le succès de l'expérience est attesté par l'obtention de fragments d'ADN dont la longueur correspond à la distance entre les deux bornes sur l'ADN qui a été amplifié.

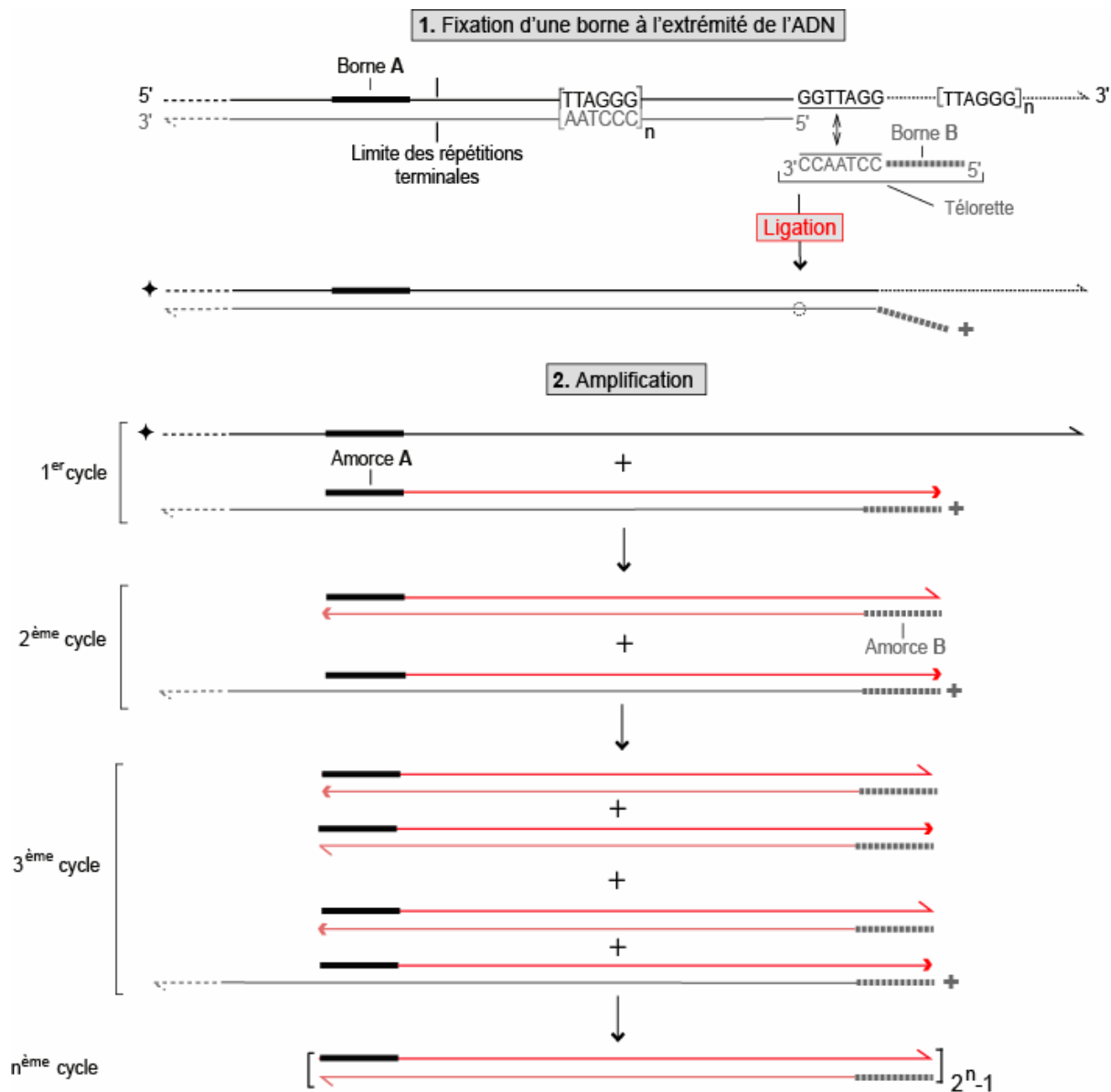


Fig. V.B. Amplification des répétitions terminales d'une paire de chromosomes.

L'opération se déroule en deux étapes. Elle exige la présence de deux bornes de séquence connue encadrant la région à amplifier. L'une de ces bornes (**A**) préexiste dans l'ADN. Elle se trouve dans la zone subterminale, en deçà des répétitions TTAGGG/CCCTAA. La borne **B** est un oligonucléotide de 27 bases, appelé télorette, que l'on fixe à l'extrémité 3' de l'ADN. Elle comporte une séquence aléatoire de 21 bases et se termine par la séquence CCTAACC, qui peut s'apparier avec une répétition GGTTAGG de la queue sb du télomère.

1. La première opération consiste à incuber l'ADN chromosomique et la télorette en présence d'une dose d'ADN ligase suffisante pour attacher la borne **B** à l'extrémité 5' de l'ADN.
2. L'amplification proprement dite utilise deux amorces (**A** et **B**), reproduisant la séquence de chaque borne. Elle produit des de la zone intermédiaire. Le brin de l'ADN se terminant en 3' (♦) ne peut jamais être copié, parce qu'il ne contient pas de séquence complémentaire de celle de l'amorce **B**. L'autre brin (+) produit lors du premier cycle d'amplification un fragment court, qui subsiste pendant les cycles suivants et produit d'autres fragments courts. Le nombre de ces fragments croît de manière exponentielle. À la fin de l'opération, leur longueur se mesure par hybridation sur réplique, comme indiqué ci-dessus.

(D'après Baird DM *et al. Nature Genet* 2003 ; **33** : 203-7).

V.D. MESURE DE LA LONGUEUR DES QUEUES SB DE L'ADN

Plusieurs procédés ont été mis au point pour déterminer la longueur des queues sb des télomères. Le plus simple, mais probablement le plus imprécis, consiste à examiner au microscope électronique les fragments terminaux de l'ADN décorés au moyen d'une protéine qui s'attache aux régions sb (*fig. V.C*).

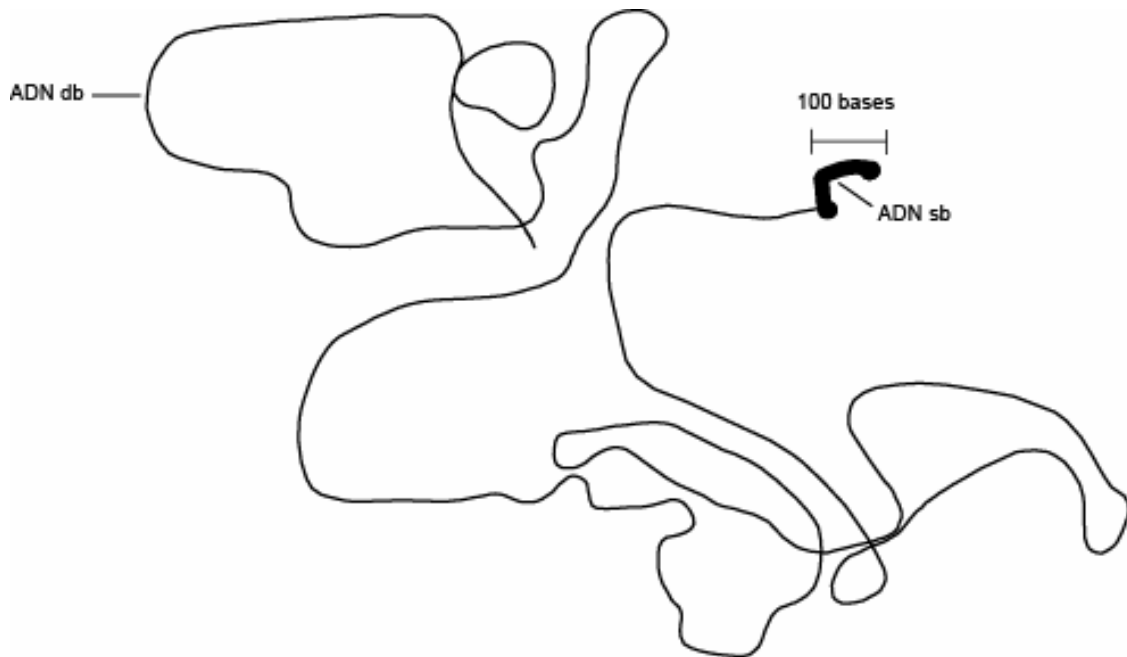


Fig. V.C. Mise en évidence de la queue sb d'un fragment terminal de l'ADN humain.

L'ADN télomérique, isolé comme décrit précédemment (*fig. V.A*), a été incubé avec une préparation de protéine **T4 GP32** (*phage T4 Gene Product 32*), qui se lie préférentiellement à l'ADN sb. L'ADN a ensuite été préparé pour l'examen au microscope électronique. La queue sb apparaît comme une région fortement épaissie, parce qu'elle est enrobée par la protéine GP32. Des mesures réalisées avec des molécules sb de longueur connue montrent qu'un ADN de 100 bases mesure environ 42 nm.

(D'après Wright WE *et al. Genes Dev* 1997; **11**: 2801-9).

V.E. IDENTIFICATION DES BASES TERMINALES DE L'ADN

La méthode décrite plus haut (*fig. V.B*) peut être utilisée pour identifier les bases terminales de l'ADN. En ce qui concerne l'extrémité 5', il convient de remarquer qu'il en existe six versions possibles, décalées d'une unité, de l'hexamère terminal : CTAACC, TAACCC, AACCCCT, ACCCTA, CCCTAA ou CCTAAC. Pour déterminer quelle version est la bonne, il faut déterminer quel oligonucléotide (télorette) rend le brin se terminant en 5' amplifiable par le système PCR (*fig. V.D*).

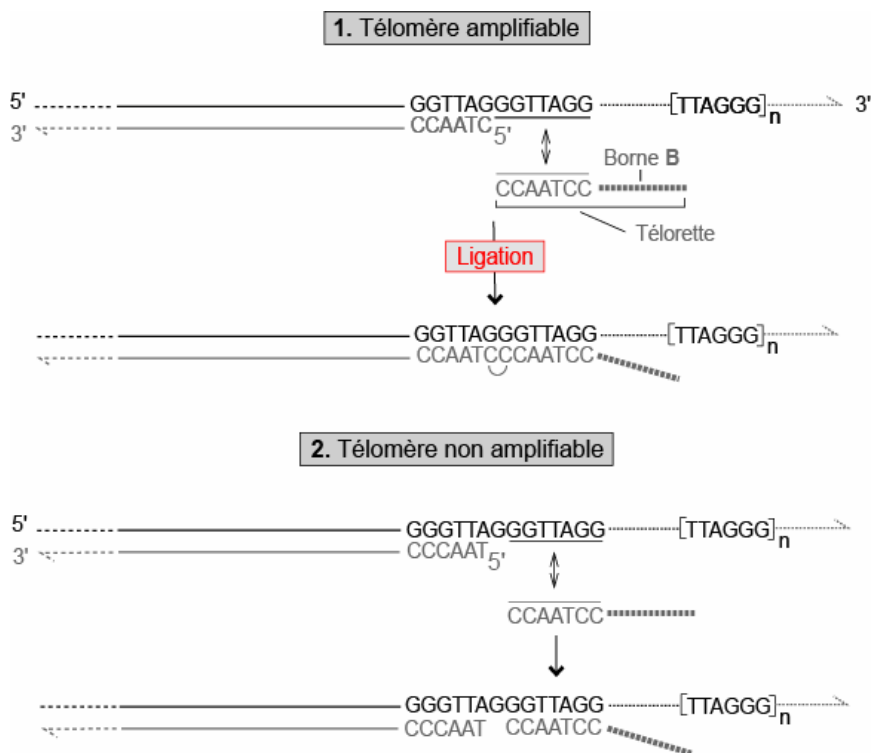


Fig. V.D. Identification de la base 5' terminale de l'ADN humain.

L'ADN télomérique n'est amplifiable que si la télorette contenant la borne B s'apparie avec le brin se terminant en 3' de manière que les bases terminales des deux molécules à réunir soient contiguës. On teste donc six télorettes dont l'extrémité 3' reproduit de manière décalée la séquence télomérique :

CCTAATCC; CTAACCC ; TAACCCT ; AACCCCTA ; ACCCTAA et CCCTAAC.

1. Si la séquence 5'-terminale de l'ADN est CTAACC, seule la télorette CCTAACC permettra d'obtenir une molécule amplifiable.
2. Si la séquence terminale est TAACCC, il subsistera entre l'extrémité 5' de l'ADN et l'extrémité 3' de la télorette une brèche qui ne peut pas être comblé par l'ADN ligase, de sorte que le brin d'ADN riche en C + A ne sera pas amplifiable avec la télorette CCTAACC.

Schéma inspiré des travaux de Sfeir AJ *et al. Mol Cell* 2005 ; **18** : 131-8.

Pour déterminer la séquence de l'extrémité 3' (qui est saillante), une étape supplémentaire est indispensable. Il faut prolonger le brin se terminant en 5', de manière à obtenir une plate-forme permettant de déterminer quelle télorette s'ajuste à la séquence terminale de l'autre brin, et le rende amplifiable par PCR (*fig. V.E*).

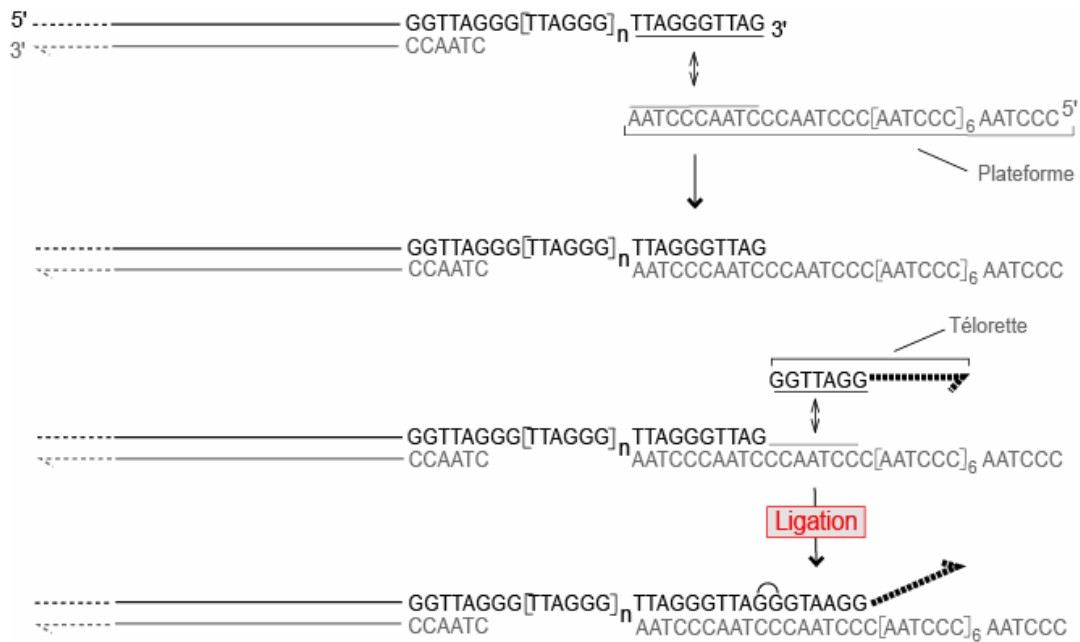


Fig. V.E. Identification de la base 3' terminale de l'ADN humain.

Comme le brin se terminant en 3' dépasse de plusieurs dizaines de bases le brin se terminant en 5', on ne peut pas déterminer directement quelle télomère doit lui être attachée pour qu'il puisse être amplifié. Il faut ménager sur le brin se terminant en 5' une plate-forme de séquence $[AATCCC]_n$, en hybridant avec l'ADN chromosomique un oligonucléotide contenant dix de ces unités de répétition. On peut alors tester six télomères de séquence décalée pour déterminer laquelle permet d'obtenir un brin continu, donc amplifiable. La brèche subsistant sur le brin riche en C + A n'a aucune importance, car il ne doit pas être amplifié.

Schéma inspiré des travaux de Sfeir AJ *et al. Mol Cell* 2005 ; **18** : 131-8.

V.F. MISE EN ÉVIDENCE DES TÉLOMÈRES SUR PRÉPARATIONS HISTOLOGIQUES

On peut repérer la présence de répétitions terminales sur les chromosomes de cellules collées sur des lames de microscope. Les cellules bloquées en métaphase sont fixées, puis traitées par la soude de manière à dénaturer l'ADN. Les préparations histologiques sont ensuite mises en contact à une température favorisant l'hybridation avec une sonde de séquence $[CCCTAA]_n$ ou $[TTAGGG]_n$, couplée à une molécule fluorescente. Après lavage, les segments d'ADN hybride sont repérés par examen au microscope éclairé par une lampe UV. Les télomères apparaissent comme des points lumineux.

Normalement, les cellules humaines en métaphase doivent présenter 92 paires de points fluorescents, puisque chaque chromosome est scindé en deux chromatides, qui restent associées au niveau de leur centromère (fig. V.F). Des chromosomes ou des chromatides ne présentant pas de signal doivent avoir perdu la plupart ou la totalité de leurs répétitions télomériques.



Fig. V.F. Mise en évidence des télomères sur un chromosome en métaphase.

Si les répétitions télomériques sont suffisamment longues, le marquage au moyen d'une sonde fluorescente les fait apparaître sur les chromosomes en métaphase comme des points lumineux à l'extrémité des chromatides.

Il est même possible de faire la distinction entre les télomères « directeurs » et les « télomères retardataires ». Il faut détruire sélectivement un des deux brins de l'ADN avant de l'hybrider avec une sonde fluorescente. Dans ce cas, une seule chromatide d'une même paire est marquée (*fig. V.G*).

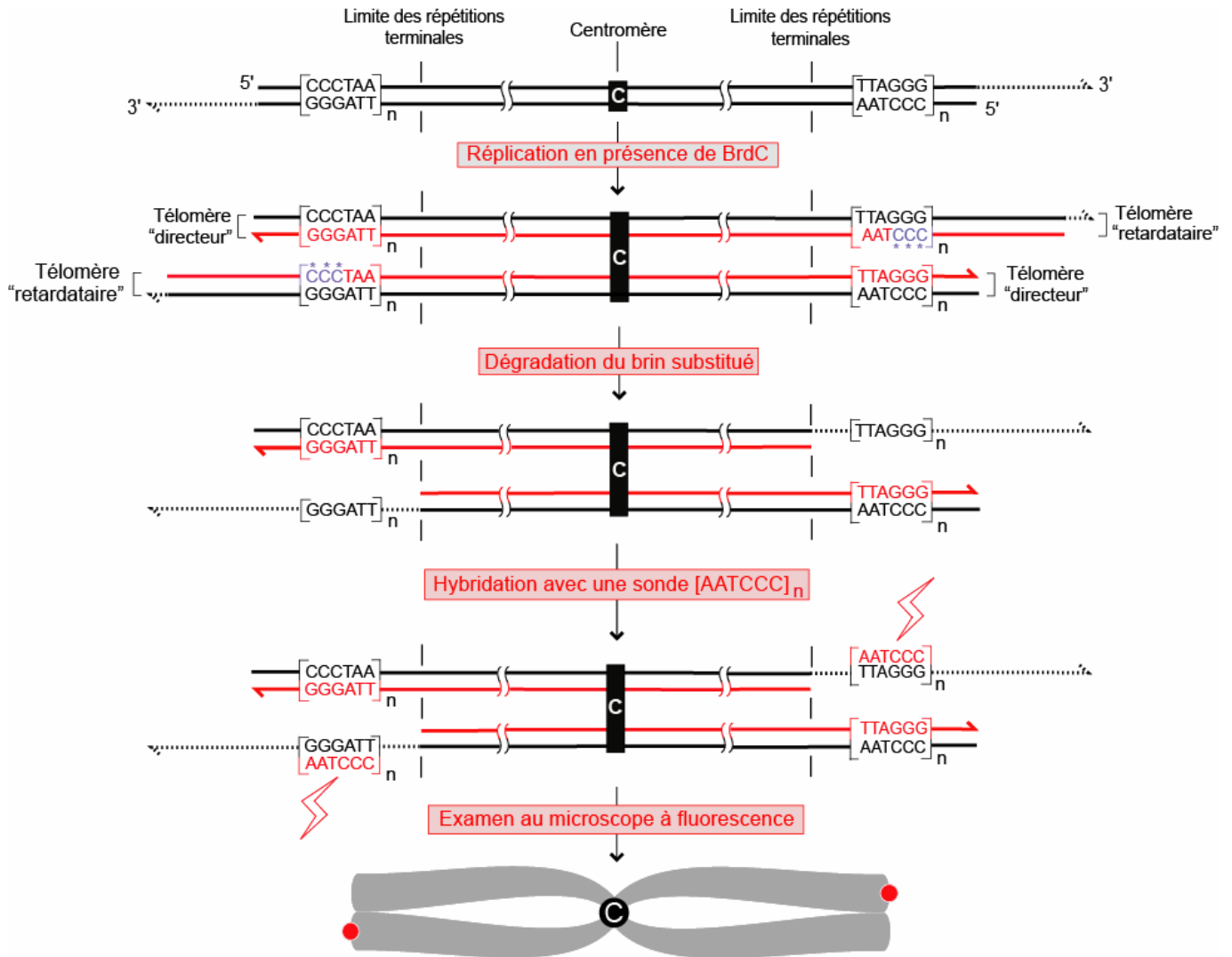


Fig. V.G. Marquage sélectif des télomères retardataires sur un chromosome en métaphase.

L'expérience est réalisée sur des cellules en culture qui ont été mises en présence de 5-bromodésoxycytidylate (BrdC) pendant une génération, de manière que leur ADN incorpore la bromocytosine au lieu de cytosine dans le brin riche en C + A. Le brin substitué fait partie des télomères « retardataires ». Les cellules sont ensuite préparées pour l'examen histologique, puis soumises à un traitement (exposition aux UV, digestion par un mélange d'exonucléases*), qui détruit le brin substitué (qui est plus fragile), mais laisse intact l'autre brin. L'hybridation avec une sonde [CCCTAA]_n fluorescente, sans dénaturation préalable de l'ADN, fait apparaître un seul point lumineux à l'extrémité des chromosomes. On peut de même révéler les télomères « directeurs », à condition d'utiliser le 5-bromodésoxyuridylate pour fragiliser le brin riche en G + T et une sonde [TTAGGG]_n pour marquer le brin subsistant.

(D'après Bailey *et al. Science* 2001 ; 293 : 2462-5).

EXPLICATION DES SIGLES ET ACRONYMES

***PCR.** *P*olymerase *C*hain *R*eaction.

***Fish.** *F*luorescent *i*n *s*itu hybridization.

BIBLIOGRAPHIE

Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature Genet* 2003; **33**: 203-7.

de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR *et al.* Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 518-27.

Southern EM. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol* 1979; **68**: 152-76.