



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Méthylation in vitro de l'ARN poly (A+) de levure par un extrait de noyaux de foie de rat

Menozzi, F. D.

Award date:
1984

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.

1984



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

*Méthylation in vitro de l'ARN
poly(A⁺) de levure par un
extrait de noyaux de foie de rat.*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

F. D. Menozzi

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

FACULTES DES SCIENCES

Laboratoire de Génétique Moléculaire et Physiologie Cellulaire

Année Académique 1983-1984

Promoteur Prof. J. Delcour

Méthylation in vitro de l'ARN poly(A)⁺
de levure par un extrait de noyaux de
foie de rat.

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Licencié en
Sciences Biologiques
par
F. D. Menozzi

di tante cose quant' i' ho vedute,
dal tuo podere e dalla tua bontate
riconosco la grazia e la virtute.
Tu m'hai di servo tratto a libertate
per tutte quelle vie, per tutt'i modi
che di ciò fare avéi la potestate.
La tua magnificenza in me custodi,
si che l'anima mia, che fatt'hai sana,
piacentea te dal corpo si disnodi.

Dante Alighieri,
La Divina Commedia, Paradiso Canto XXXI.

di tante cose quant' i' ho vedute,
dal tuo podere e dalla tua bontate
riconosco la grazia e la virtute.
Tu m'hai di servo tratto a libertate
per tutte quelle vie, per tutt' i modi
che di ciò fare avéi la potestate.
La tua magnificenza in me custodi,
si che l'anima mia, che fatt'hai sana,
piacentea te dal corpo si d'isnodi.

Dante Alighieri,
La Divina Commedia, Paradiso Canto XXXI.

Ce travail n'aurait jamais pu être réalisé sans la coopération de toute une équipe dont je voudrais ici souligner la compétence, la disponibilité et la gentillesse. A tous j'exprime ma gratitude.

Au Professeur J. Delcour qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a toujours su, par ses conseils judicieux et l'attention qu'il a eue à mon égard, être le principal artisan de la réussite de cette recherche.

Au Docteur Vandenhoute qui au cours des longues discussions que nous avons partagées, m'aida à cerner les interrogations fondamentales qui survenaient tout au long du travail.

Au Docteur C. Locht qui m'initia à la pratique de la recherche scientifique avec une extrême compétence et une rare rigueur.

J'adresse mes remerciements également à tous les membres du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Physiologie Cellulaire des Facultés Notre-Dame de la Paix, spécialement à Madame R.M. Wilmet-Génicot et à Madame M. Dewez-Jadin.

Un grand merci aussi à Sylvie avec qui j'ai partagé quelques moments de découragement mais surtout de grande joie.

A mes parents qui furent toujours à mes côtés et qui ont apporté leur aide précieuse à la réalisation de ce travail.

A Anna et Thierry qui parvinrent toujours à me stimuler dès que le doute s'emparait de mes pensées.

A Béatrice dont l'appui m'est très cher.

Je ne voudrais pas oublier J.P. Vonckx qui voilà plus de sept années me fit partager en toute indépendance de pensée, sa passion et son enthousiasme pour l'étude du phénomène qu'on appelle le vivant.

Treignes, mai 1984,

ABREVIATIONS.

Ac : Acétate.

ARNhn : Acide ribonucléique hétérogène nucléaire.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

cpm : Coups par minute.

d : Dalton.

DEAE : Diéthylaminoéthyle.

EDTA : Ethylènediamine-tétraacétate.

EGTA : Ethyleneglycol bis (β -aminoethylether)-N,N'-tetra-acetic acid.

IF : Facteur d'initiation.

$m_3^{2,2,7}$ G : Triméthylguanosine.

m^5 C : 5-méthylcytidine.

m^7 G : 7-méthylguanosine.

PFC : Protéine fixatrice de la coiffe.

SAdoHcy : S-adénosyl-L-homocystéine.

SAdoMet : S-adénosyl-L-méthionine.

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane.

VSV : Vesicular stomatitis virus.

Les autres abréviations sont définies dans le texte.

INTRODUCTION

The transforming principle is DNA.

Neither heat-killed smooth bacteria nor live rough (mutant) bacteria can kill mice. But the mixture kills mice from which live smooth bacteria can be recovered. The transformation of inactive rough bacteria into virulent smooth bacteria can be accomplished *in vitro* by the addition of DNA that was extracted from smooth bacteria.

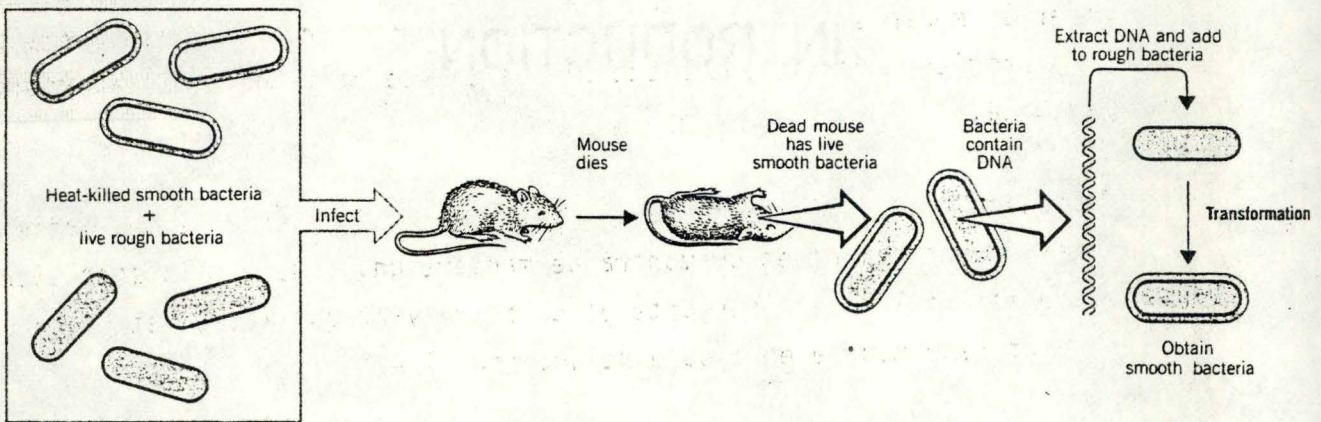


Fig. 1: Des pneumocoques non pathogènes de type "R" peuvent être transformés par des pneumocoques virulents de type "S" tués par chauffage modéré. (154)

1. LE CONCEPT DE MESSAGER.

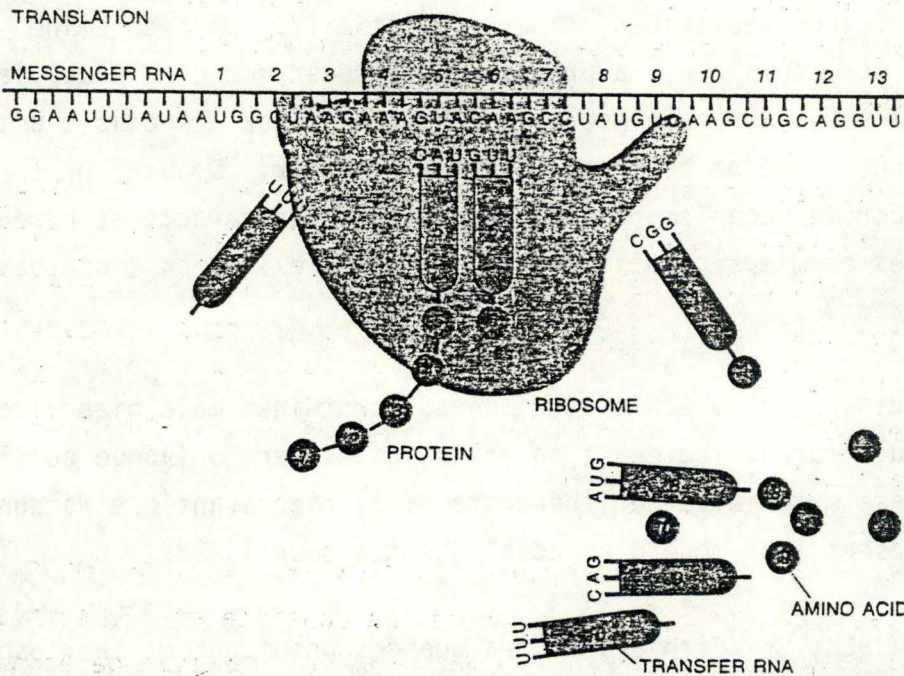
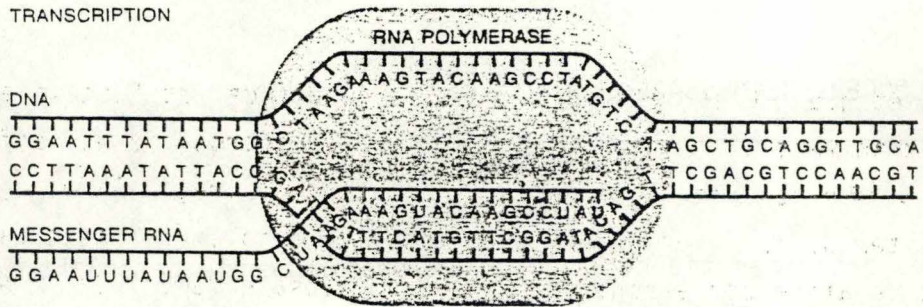
Les protéines tiennent une place prépondérante dans l'homéostasie cellulaire. Ce rôle biologique résulte de la structure tridimensionnelle de la molécule qui elle-même dépend de la structure primaire, c'est-à-dire de la séquence des acides aminés constitutifs. L'acide aminé est donc l'unité structurale de la protéine. Le mécanisme par lequel la cellule assemble selon une séquence hautement spécifique des acides aminés pour former une protéine est resté longtemps obscur. D'autre part, la volonté d'élucider le mécanisme de la transmission des caractères héréditaires a amené les premiers généticiens à postuler l'existence d'une base matérielle de l'hérédité.

Jadis, ce rôle était attribué aux protéines mais bien vite les acides nucléiques furent isolés et on montra de manière univoque qu'ils sont bien cette base matérielle de l'hérédité et ce bien avant que Watson et Crick ne proposent leur modèle en double hélice pour l'ADN.

En 1928, Griffith (1) montra que des pneumocoques de l'espèce *Diplococcus pneumoniae* non pathogènes de type "R" (colonies rugueuses ou "rough") injectés à des souris en même temps que des pneumocoques virulents de type "S" (colonies lisses ou "smooth") mais tués par chauffage modéré, peuvent être transformés et devenir pathogènes (Fig. 1).

Un an plus tard, Dawson et Sia (2) montrèrent que cette transformation peut avoir lieu *in vitro*. Ce n'est qu'en 1944 que Avery, MacLeod et McCarty démontrèrent que le "principe transformant" est l'ADN (3).

Les hélices d'ADN renferment deux types d'informations génétiques interprétées de manière très différentes (4). Le message génétique, c'est-à-dire l'information qui détermine la structure des protéines est contenu dans une succession continue de triplets de bases codés selon le



TRANSCRIPTION AND TRANSLATION are the fundamental genetic processes in the making of a ribosome. Transcription (*top*) is the copying of the genetic information in DNA into RNA. The four nucleotides in DNA are adenine, cytosine, guanine and thymine (*A, C, G* and *T*). In RNA uracil (*U*) takes the place of thymine. *A* can form a bond only with *T* or *U*, and *C* can form a bond only with *G*. Bases that can form a bond are said to be complementary. In transcription the enzyme RNA polymerase binds to the bacterial chromosome and temporarily separates the strands of DNA. The enzyme then uses one strand as a template for adding complementary nucleotides to a growing chain of messenger RNA or ribosomal RNA. Translation (*bottom*) is the joining of amino acids into a protein according to the information carried by the mRNA. Each codon, or group of three nucleotides in the mRNA, codes for one amino acid. The small molecules called transfer RNA's (tRNA's) have anticodons: three bases complementary to the codon. Each tRNA is specific to one amino acid. The ribosome moves down the mRNA reading the codons in turn. The anticodon on the tRNA binds to the codon and the amino acid on the other end of the tRNA is attached to the growing amino acid chain. When the ribosome moves on to the next codon, the tRNA is ejected and a new one takes its place.

Fig. 2: La transcription et la translation sont les deux étapes qui constituent la biosynthèse protéique. (164)

code génétique. L'expression du message génétique est "extrinsèque", car le transfert de l'information de l'ADN à la protéine est différé puisqu'elle nécessite l'existence d'un intermédiaire, l'ARNm. Il ne semble pas exister de relation structurale entre un triplet de bases particulier et l'acide aminé correspondant. Outre le message génétique, l'ADN contient les instructions qui permettent la transcription sélective de l'information. Les connaissances dont nous disposons à l'heure actuelle sur ce type d'information proviennent pour l'essentiel d'études de la régulation génétique des bactéries (5).

Le répresseur bactérien reconnaît spécifiquement un opérateur parce que des interactions cognitives s'établissent entre ces deux structures. Ceci suggère que la double hélice d'ADN s'adapte à la conformation stéréochimique de la protéine répresseur, ce qui veut dire que dans ce cas l'information qui détermine la régulation génétique est tridimensionnelle et que son décodage est "intrinsèque", il ne dépend que de propriétés de la protéine et de la double hélice d'ADN.

Les protéines sont le produit du flux de l'information génétique et le processus de la biosynthèse protéique consiste en l'assemblage séquentiel d'acides aminés dans l'ordre spécifié par le programme génétique dont l'ADN est le support matériel.

Cette spécification ne peut être obtenue que si l'on invoque l'existence d'un médiateur qui "exporte" le message génétique contenu dans l'ADN de la cellule vers le site où se fera l'assemblage des acides aminés à partir des unités informatives du gène, les codons, grâce à la machinerie de synthèse protéique. *A priori*, ce médiateur pourrait ne pas exister chez les procaryotes dans la mesure où le génome n'est pas physiquement séparé de la machinerie de synthèse.

En infectant *E. coli* par le phage T₂ et en recueillant immédiatement après l'infection l'ARN synthétisé, Volkin et Astrachan observent que la composition en bases de cet ARN ressemble plutôt à celle de l'ADN du phage

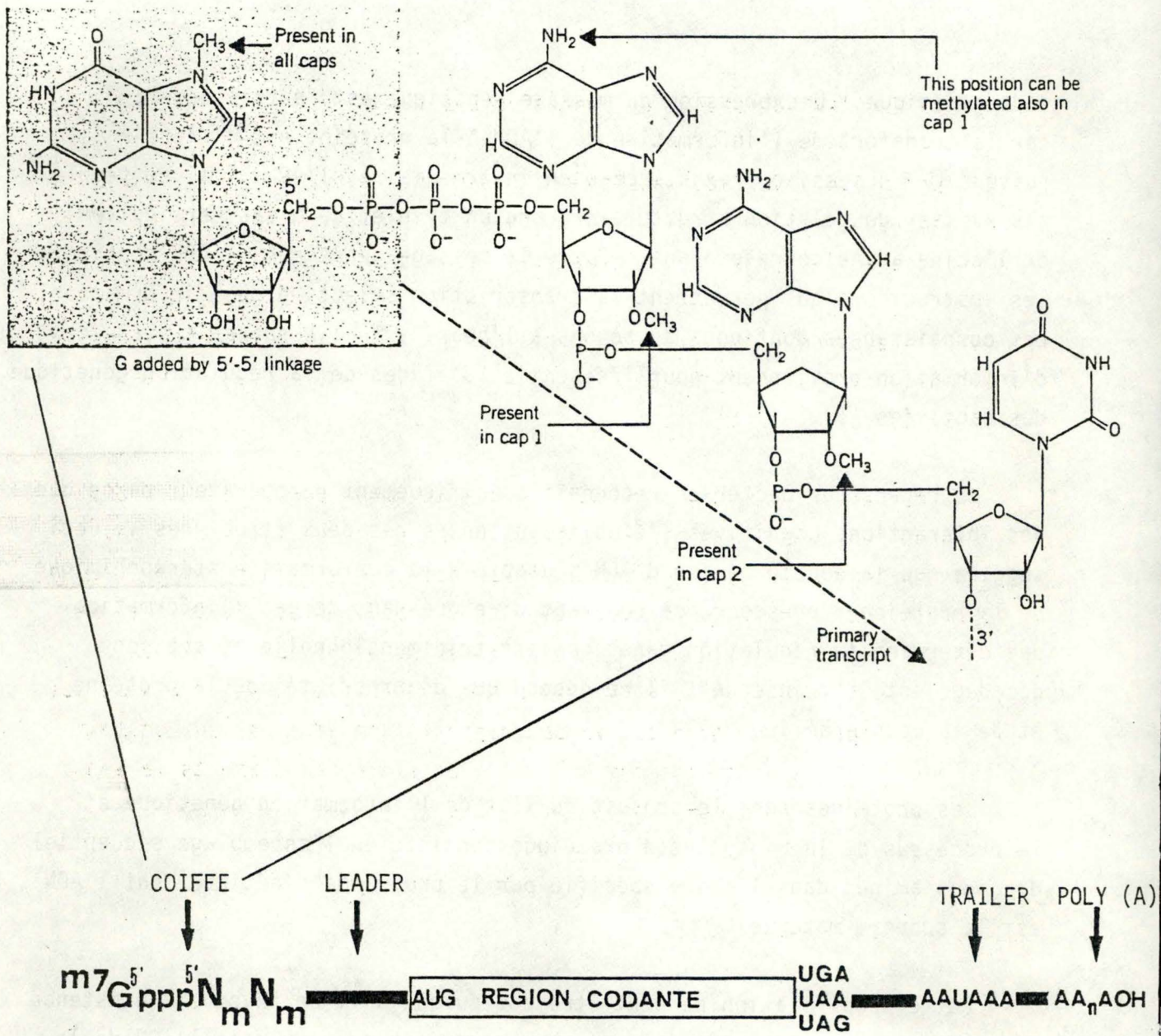


Fig. 3: Structure primaire (séquence nucléotidique) d'un ARN messager eucaryote mature. (154)

qu'à celle de l'ARN de bactéries non infectées (6).

C'est en 1961 que Jacob et Monod proposèrent le terme d'ARN messenger comme médiateur informatif dans leur modèle explicatif du contrôle génétique de la synthèse d'enzymes inductibles chez les bactéries (7).

L'existence de l'ARN messenger comme classe séparée d'ARN fut définitivement admise après la découverte des polysomes dans le réticulocyte de lapin (8) et par la suite, dans nombres de cellules.

A l'heure actuelle, on sait que l'ARNm, produit modifié de la transcription du gène, est le substrat universel de la traduction protéique. La relation univoque entre les unités informatives de l'ARN messenger (codons ou triplets) et les unités structurales de la protéine (acides aminés) se réalise par l'intermédiaire d'une molécule vectrice à savoir l'ARN de transfert (ARNt) qui joue le rôle d'adaptateur spécifique. Le ribosome est la véritable tête de lecture qui va parcourir l'ARNm et c'est en son sein que se réalisent les interactions moléculaires entre les éléments faisant partie de la machinerie de synthèse protéique (Fig. 2).

2. L'ARN MESSAGER EUCARYOTE.

2.1. Architecture moléculaire.

L'ARN messenger est synthétisé dans le noyau cellulaire sous forme d'un précurseur transcriptionnel appelé ARN hétérogène nucléaire (ARNhn) dont la taille est sensiblement plus élevée que celle de l'ARNm mature et fonctionnel (Fig. 3).

La portion codante de l'ARNm commence par le codon initiateur AUG et se termine par un des trois codons stop ou "non-sens" UGA, UAA et UAG.

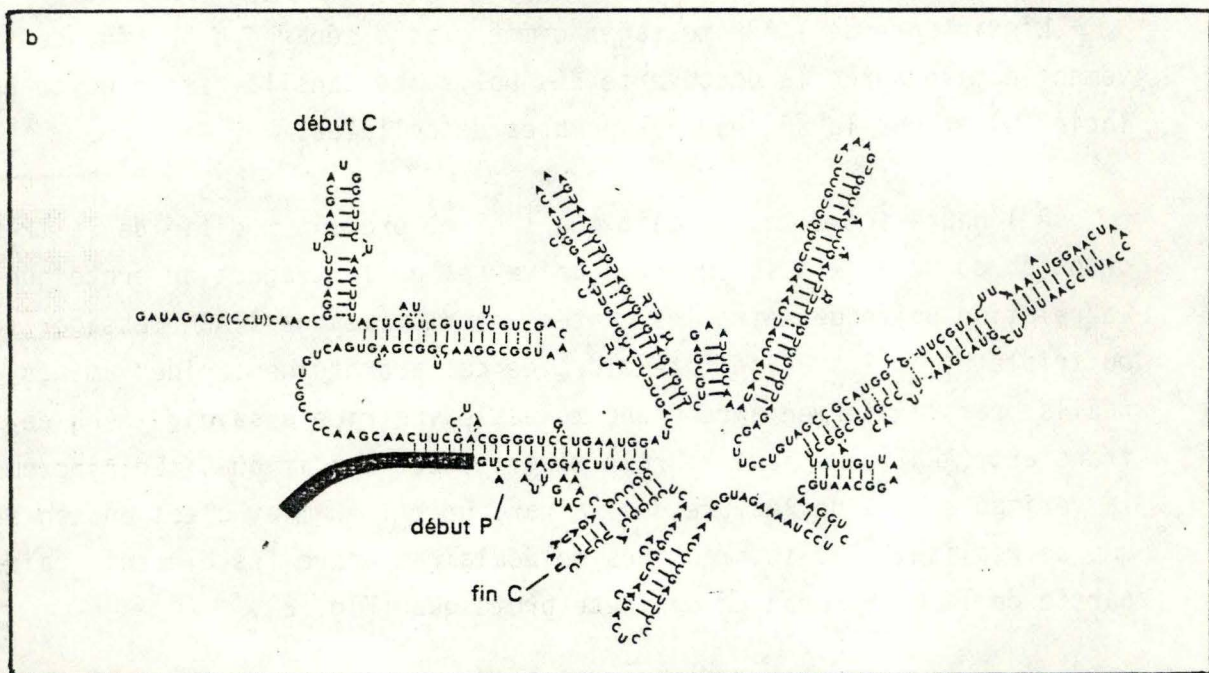
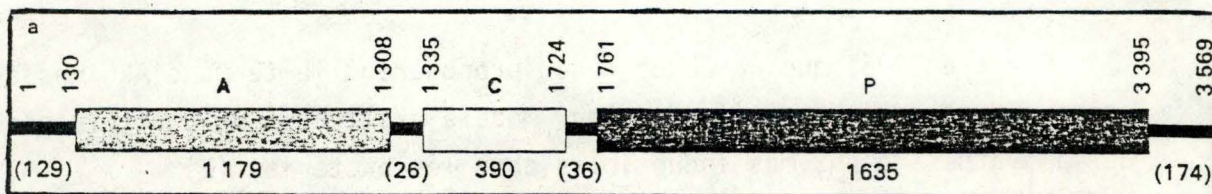


Fig. 5: Structure du génome du bactériophage MS2.

a) Ordre des gènes. Le génome de MS2 comprend de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' une séquence non traduite de 129 nucléotides puis le gène de la protéine A (1179 nucléotides), une séquence non traduite de 26 nucléotides, le gène C (390 nucléotides), une séquence non traduite de 36 nucléotides, le gène P (1635 nucléotides) et enfin une séquence non traduite de 174 nucléotides. La séquence des 3569 nucléotides est connue et la structure de l'ARN peut en être déduite.

b) Séquence des nucléotides dans le gène C codant pour une protéine capsidale. La forte proportion de séquences appariées est frappante. (163)

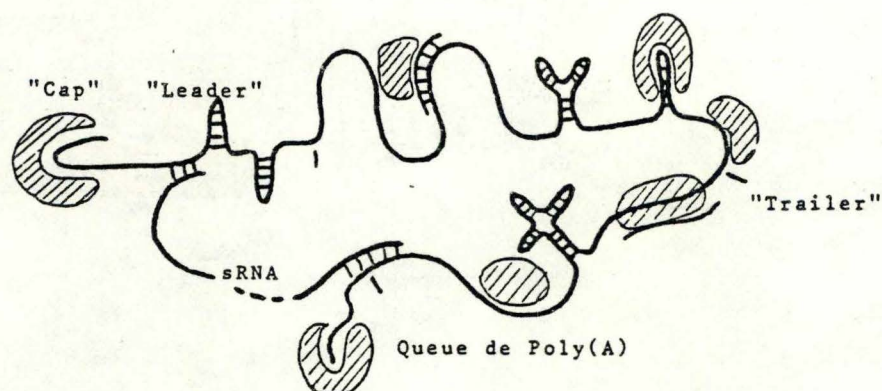


Fig. 4. : Représentation schématique d'un ARNm eucaryote où figurent de manière symbolique les principales caractéristiques structurales, avérées ou hypothétiques. Les zones hachurées représentent des protéines.

Des structures secondaires (appariement de séquences anti-complémentaires conduisant à la formation de boucles ou "hairpin"), tertiaires (repliement globularisé de la molécule) et quaternaires (formation d'un complexe avec des protéines ou de petits ARN) viennent modifier la configuration de la chaîne nucléotidique (Fig. 4). L'ARN du phage MS₂ est à cet égard un exemple illustratif.

Les travaux maintenant classiques de Fiers et de ses collaborateurs (9,10) ont permis en effet d'élucider la séquence complète de l'ARN de MS₂ et d'élaborer un modèle de configuration secondaire thermodynamiquement le plus stable au sens physico-chimique du terme. La figure 5 illustre la structure secondaire potentielle de l'ARN de MS₂. De nombreuses études physiques (11) indiquent clairement qu'un degré semblable d'appariement serait présent dans les messagers cellulaires eucaryotes. Dans le cas

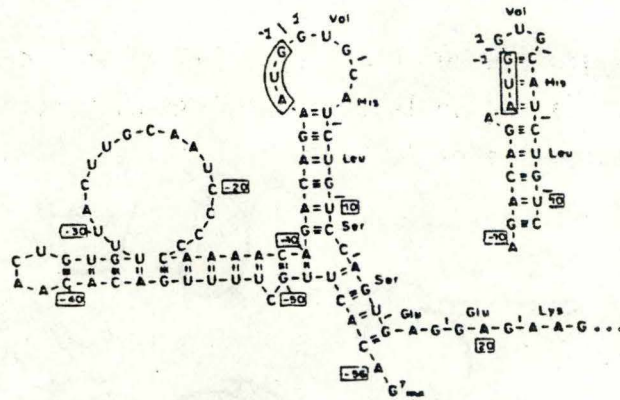


Fig. 6: Structure secondaire hypothétique de la région 5' de l'ARNm de la β globine. Dans le modèle de droite, le codon initiateur AUG est impliqué dans une structure bihélicoïdale, tandis que dans le modèle de gauche au contraire il est situé dans une boucle.

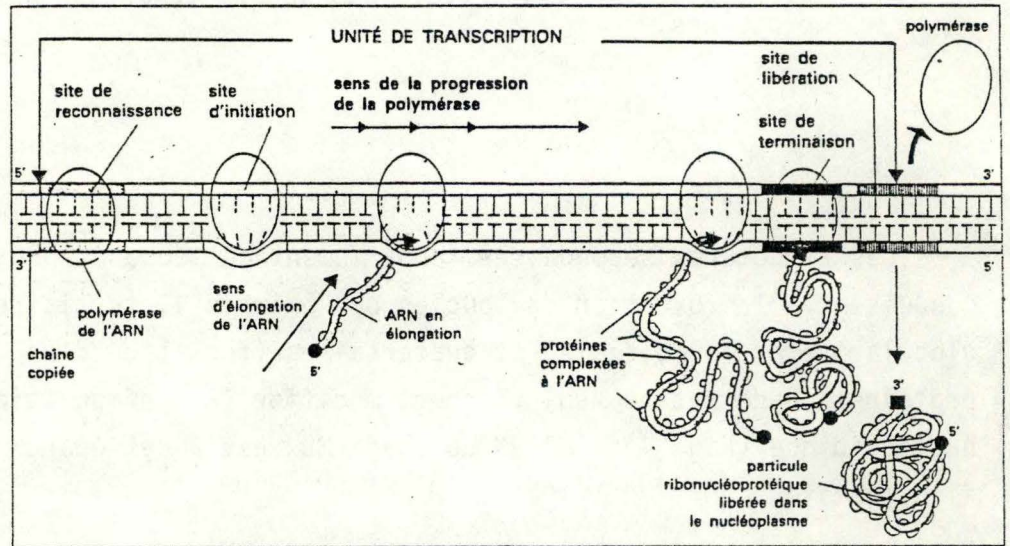


Fig. 7: Représentation schématique des étapes de la transcription. La polymérase de l'ARN après s'être introduite sur le duplex d'ADN au niveau d'un site spécifique de reconnaissance, commence la polymérisation au niveau du site d'initiation. C'est au site de terminaison que la polymérase achève la transcription. (163)

de l'ARNm de la globine des Anatidés, plus de 45 % des bases seraient sous forme appariée. La région leader de l'ARNm du virus du sarcome de Rous (RSV) de même que celle de la β -globine (12) est caractérisée par une importante structure secondaire potentielle.

Ces travaux ont montré que le codon AUG initiateur du messager de la β -globine peut être impliqué dans une structure bihélicoïdale ou être exposé à l'extrémité d'une boucle de la molécule et par conséquent être aisément accessible aux éléments de l'appareil de traduction avec lesquels il pourrait interagir fonctionnellement (Fig. 6). Cependant, à la lumière du modèle d'initiation de la traduction de Kozak, nous verrons que l'accessibilité directe de l'AUG n'est plus une condition *sine qua non* de l'initiation de la traduction (cfr. paragraphe 4.3.5.).

Les ARNm sont associés à de nombreuses protéines et petits ARN pour former des mRNP ("ARNm ribonucléoprotéines"). Du reste, à aucun stade l'ARNm ne serait à l'état nu dans la cellule. A l'heure actuelle, deux protéines majeures et plusieurs protéines mineures associées ont été isolées, dont certaines pourraient d'ailleurs être des facteurs de la traduction. Une protéine d'un poids moléculaire de 78 000 se liant au poly(A) des messagers a été particulièrement étudiée (13). En 1975, Rao (ref. *in* 14) suspecta l'existence d'une protéine fixatrice de la région de la coiffe; la "cap binding protein" (PFC ou CBP). Par la suite, plusieurs protéines de ce type furent caractérisées dans de nombreux types cellulaires. Dans les cellules HeLa par exemple, Patzelt *et al.* (15) identifièrent par photoaffinité 4 protéines capables de se fixer à la coiffe dont les poids moléculaires sont 37 000, 80 000, 89 000 et 120 000.

L'ARNm ainsi complexé avec de nombreuses protéines verra sa structure spatiale modifiée notamment en ce qui concerne l'inclinaison des bases ("tilting") dans les zones bicaténaires (11). En outre, des polynucléotides de petite taille désignés à l'heure actuelle comme ARNs_n (small nuclear RNA) sont associés aux mRNP (14). On a tout d'abord pensé que ces fragments polynucléotidiques étaient générés lors de la maturation de l'ARNm (16). A l'heure actuelle, on dispose de la preuve de l'existence de gènes codant

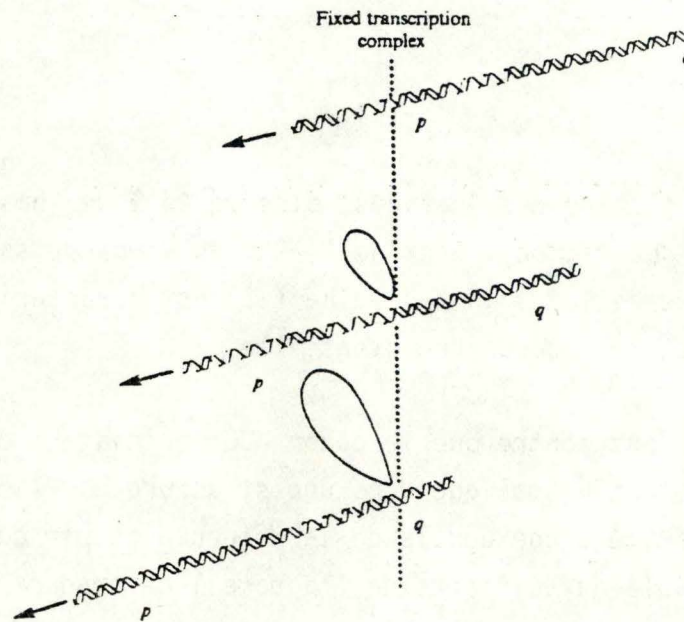


Fig. 8: Le modèle de transcription proposé par le groupe de Jackson (19) postule que l'ADN passe au travers du complexe enzymatique de transcription qui pourrait contenir les enzymes de la maturation nucléaire de l'ARN. La chaîne naissante d'ARN ainsi synthétisée reste cependant attachée en ses deux extrémités à la "cage nucléaire" pour former une boucle qui sera excisée par la suite de manière enzymatique.

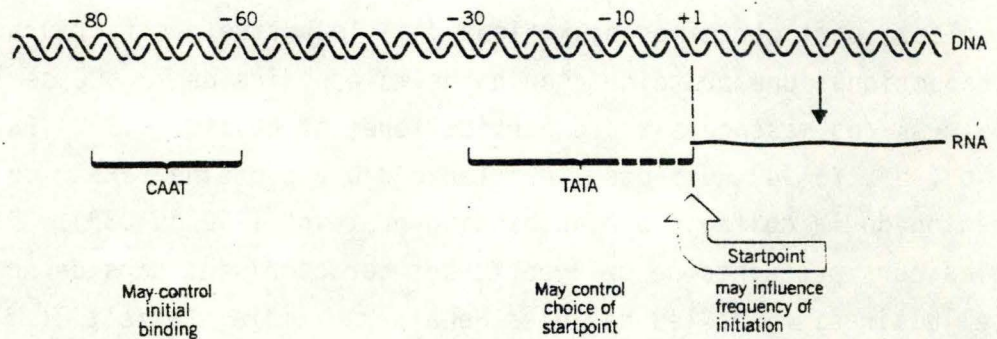


Fig. 9: La séquence consensus $GG^C CAATCT$ (CAAT box) se retrouve en amont de de nombreux gènes eucaryotes, elle pourrait intervenir dans l'interaction cognitive entre l'ADN et la polymérase de l'ARN.

pour de petits ARN dont le rôle pourrait être capital dans la maturation des ARNm des gènes en mosaïque (17).

2.2. Transcription du pré-ARNm.

La transcription de l'ADN en ARN comporte trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Par opposition aux procaryotes où seule une ARN polymérase a été mise en évidence, les eucaryotes possèdent trois ARN polymérases. Le tableau I décrit succinctement les trois classes d'ARN polymérases eucaryotes.

Classe de l'enzyme	Localisation subcellulaire	sensibilité à l' α -amanitine	ARN transcrit	Poids moléculaire global $\times 10^3$
I	nucléole	insensible	pré-ARNr	550
II	nucléoplasme	inhibée à 10^{-8} à 10^{-9} M	ARNhn	500
III	nucléoplasme	inhibée à 10^{-4} à 10^{-5} M	pré-ARNt	450

Tableau I : Principales caractéristiques des trois classes d'ARN polymérases eucaryotes (18).

L'ARN polymérase II a une activité stimulée de façon plus ou moins équivalente par la présence de Mn^{++} et de Mg^{++} (18). Elle est constituée de deux grandes sous-unités aux poids moléculaires de 140 000 et 200 000, et d'une dizaine de peptides dont les tailles s'échelonnent de 10 000 à 20 000 daltons.

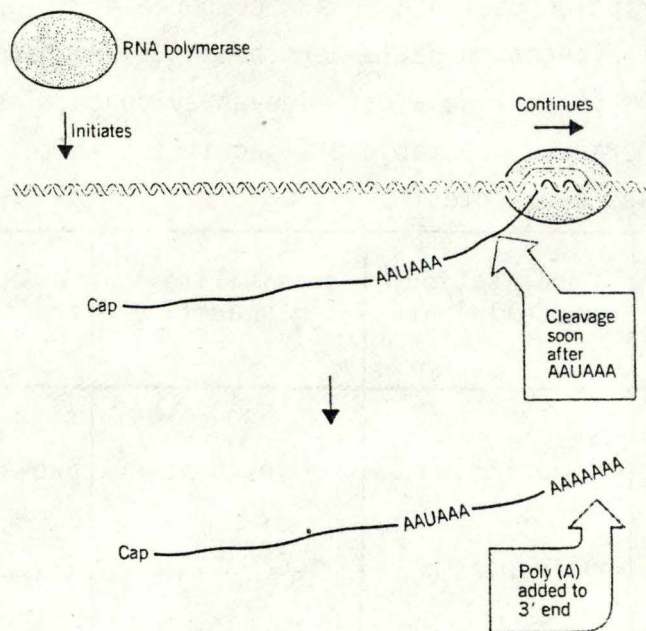


Fig. 10: La séquence AAUAAA est nécessaire pour le clivage et la polyadénylation des ARN messagers du virus SV 40.

Au niveau du mécanisme d'action de ce complexe, Jackson *et al.* (19) ont proposé un modèle de transcription pour les ARN polymérases eucaryotes où celles-ci ne seraient plus l'élément mobile qui parcourt l'ADN comme le montrent les photographies de "gènes en action" de Miller, mais ce serait l'ADN qui passerait littéralement au travers d'un complexe de transcription associé à une structure subnucléaire que ces auteurs ont nommé la cage nucléaire ("nuclear cage") faite essentiellement de protéines non identifiées et d'ARN (Fig. 7 et 8).

L'ARN polymérase II interagit avec une séquence d'ADN hautement conservée appelée le promoteur. Cette séquence comprend 7 nucléotides situés 25 à 30 nucléotides en amont de l'endroit où la polymérisation commence. Ces 7 nucléotides conservés sont $TATA\overset{A}{\underset{T}{A}}\overset{A}{\underset{T}{A}}$ et forment une séquence consensus connue sous le nom de "Goldberg-Hogness box" (20).

Dans certains gènes, plus en amont se retrouve une séquence située à -80 bases du point d'initiation de la polymérisation, le consensus est le suivant : $GG\overset{C}{\underset{T}{CAATCT}}$ (CAAT box). A l'heure actuelle, on ne sait pas encore si cette séquence est une caractéristique générale de tous les promoteurs de l'ARN polymérase II ou si elle est spécifique de certaines classes de gènes (Fig. 9) (21).

Au voisinage de certains promoteurs eucaryotes, il existe une séquence nucléotidique ne faisant pas partie du promoteur, qui est capable d'augmenter la fréquence d'initiation de l'ARN polymérase II. Cette séquence est appelée "enhancer" (138). Elle a été particulièrement bien étudiée chez le virus SV40; cette séquence est constituée de deux éléments identiques de 72 paires de bases qui sont juxtaposés à environ 200 paires de bases en amont du nucléotide où débute la transcription. Une délétion dans la région "enhancer" réduit très fortement la transcription *in vivo*. Le déplacement de la région "enhancer" en aval du promoteur n'a aucune répercussion sur la fréquence d'initiation de l'ARN polymérase II.

L'ARN polymérase II achève la transcription au niveau d'une séquence spécifique, le terminateur. Une endonucléase clive le polynucléotide

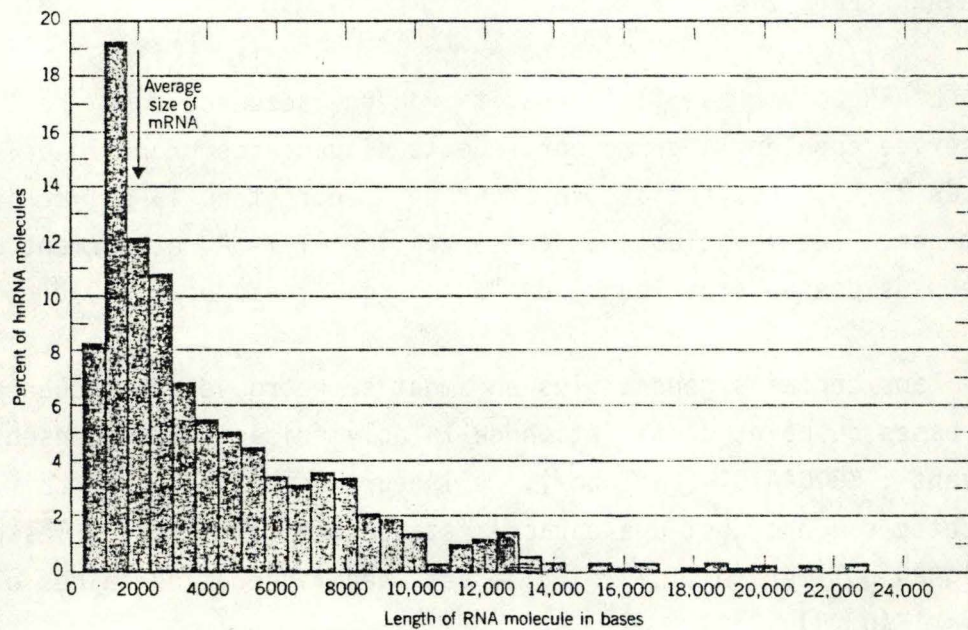


Fig. 11: La taille moyenne de l'ARN messager eucaryote est très inférieure à celle de l'ARN hétérogène nucléaire. (154)

transcrit à plus ou moins 15 nucléotides en aval d'une séquence hautement conservée AAUAAA (Fig. 10).

Par la suite la poly(A) polymérase ajoute quelques dizaines à quelques centaines d'adénines. Une caractéristique commune à la plupart des ARNm eucaryotes est la présence de la séquence AAUAAA précédant le poly(A). Cette séquence pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance du site de clivage et participer à la polyadénylation de l'extrémité 3' du messager. En effet, une mutation dans la séquence AAUAAA conduit à la formation d'un ARNm beaucoup plus long (139,140).

Tous les ARNm ne sont cependant pas polyadénylés, comme les ARNm d'histones et d'autres ARNm non identifiés (141). La levure de bière semblerait aussi constituer une exception, car sa polyadénylation est dépourvue de cette séquence spécifique (22). Cette observation suggère que la séquence AAUAAA ne serait pas obligatoire pour l'action de la poly(A) polymérase (142). La queue de poly(A) ne semble pas nécessaire à la traduction de l'ARNm mais jouerait un rôle dans la résistance de la molécule face aux nucléases et éventuellement dans son transport vers le cytoplasme (23,24).

2.3. La maturation posttranscriptionnelle, régulations possibles de l'expression du message.

La maturation de l'ARNm est le processus par lequel un ARNhn, produit primaire de la transcription d'un gène, devient un ARNm fonctionnel. Cette maturation peut comprendre :

- des additions de nucléotides aux extrémités terminales de la molécule (coiffage et polyadénylation).
- des modifications de nucléotides (méthylations sur sucres et bases)
- des clivages et resoudures ("cut and splice") permettant l'excision des séquences introniques (Fig. 11) de gènes en mosaïque.

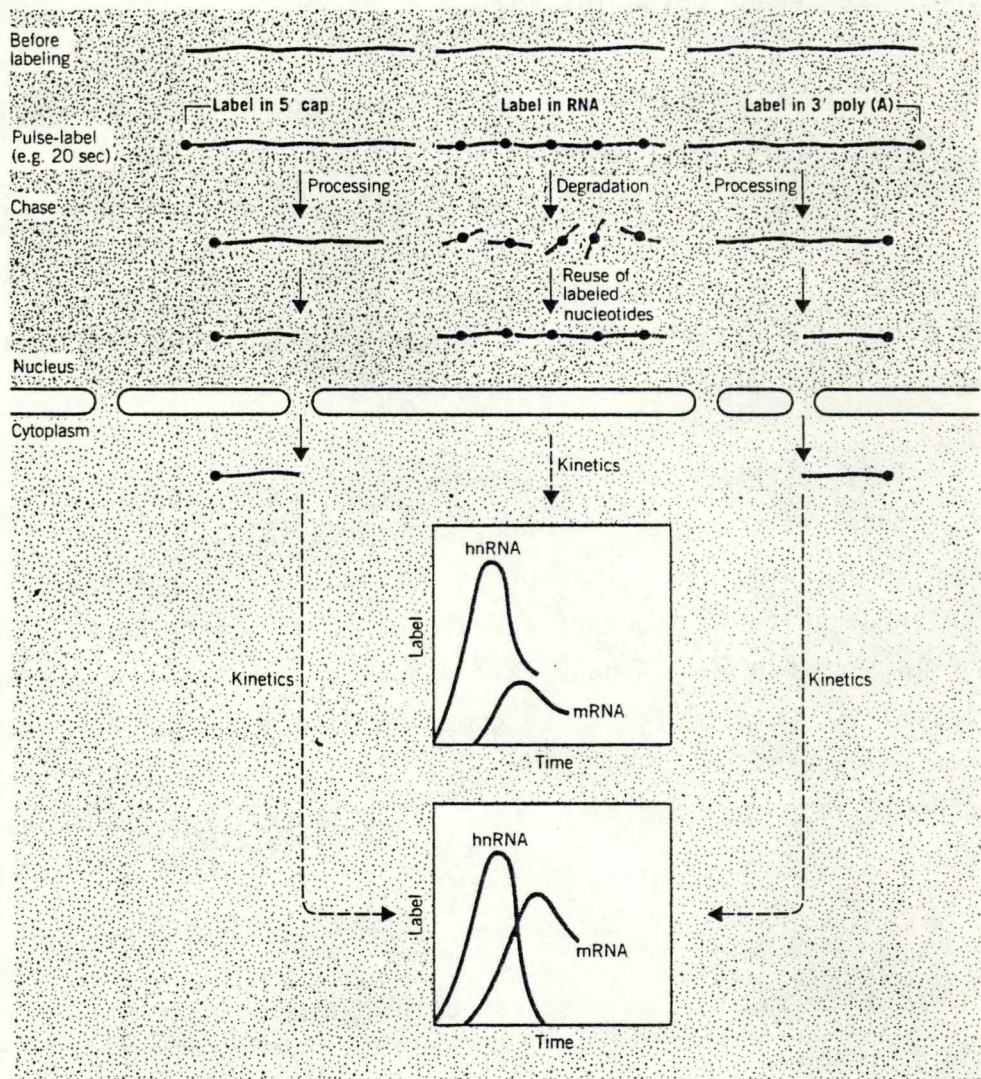


Fig. 12: Lors d'une expérience de marquage radioactif des extrémités 3' et 5' des ARNm, on s'aperçoit que la radioactivité apparaît d'abord sur l'ARNhn. La radioactivité portée sur des résidus internes est dans une large mesure "libérée" de la molécule et se retrouve sur des résidus isolés qui peuvent être réutilisés.

2.3.1. Le coiffage 5'-terminal.

Le coiffage 5'-terminal des messagers eucaryotes est une étape précoce dans leur maturation. En effet, dès le stade ARNhn, une coiffe est déjà positionnée (Fig. 12) (25). Quand on soumet à une hydrolyse alcaline un ARNm eucaryote, les résidus méthylés apparaissent sous forme de di-, tri- ou tétranucléotides (cfr. paragraphe 3.2.2.). Cette alcalino-stabilité ne peut s'expliquer que si on invoque une modification chimique de certains nucléotides. Reddy *et al.* (26) furent amenés à postuler la même hypothèse lorsqu'ils ont hydrolysé en milieu alcalin les ARNsn des cellules ascites d'hépatome de Novikoff. Par la suite, ces auteurs mirent en évidence une structure 5'-terminale remarquable dans les ARNsn qui portent en cette extrémité une 2,2,7-triméthylguanosine attachée au pénultième nucléotide par un pont 5'-5' triphosphate. Une structure coiffante 5' a été depuis lors observée dans la plupart des ARNm eucaryotes, la figure 13 en rappelle la structure chimique générale.

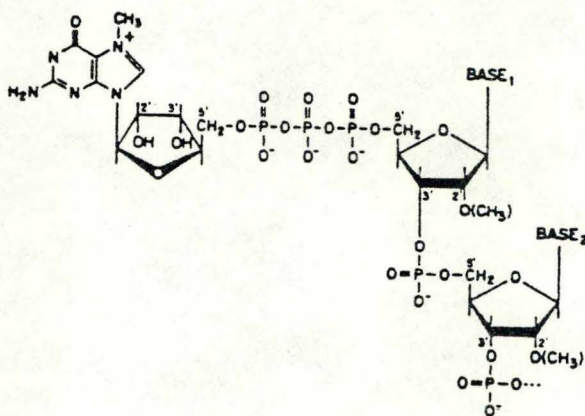


Fig. 13: Structure générale de la coiffe 5'-terminale des ARN messagers eucaryotes.

La 7-méthylguanosine terminale et le pénultième nucléotide sont reliés par un pont 5'-5' triphosphate inverse par rapport aux liaisons phosphodiester habituelles 3'-5' du reste de la chaîne polynucléotidique (27). Bien que beaucoup d'ARNm eucaryotes se terminent côté 5' par une 7-méthylguanosine, le pénultième nucléotide peut présenter une méthylation variable selon l'espèce et le type cellulaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae* comme le germe de blé, les ARNm portent une coiffe dite de "type zéro" : $m^7G(5')ppp(5')Xp-$ dont le seul groupe méthyle est situé sur la guanine en position N-7. Chez l'oursin de mer par exemple, les ARNm contiennent un groupement méthyle supplémentaire en position 2'-O du pénultième ribose pour former une coiffe de "type 1" : $m^7G(5')ppp(5')X^m p-$. Il faut signaler que si la pénultième base est une adénine, une méthylation supplémentaire peut se rencontrer en position N-6, ce type de coiffe est appelé de "type 1'" : $m^7G(5')ppp(5')m(N)^6A^m p-$. Les coiffes 1 et 1' sont fréquentes dans les ARNm viraux et cellulaires des métazoaires. Une seconde méthylation en 2'-O du ribose de l'antépénultième nucléotide se rencontre chez beaucoup de mammifères, y compris l'homme, modifie encore plus l'extrémité 5'-terminale de ces messagers pour former une coiffe de "type 2" : $m^7G(5')ppp(5')X^m pY^m p-$ (28). Chez *Drosophila melanogaster* adulte par exemple, les quatre types de coiffe sont rencontrés sur les ARNm. Au stade embryonnaire, seule la coiffe zéro est présente sur les ARNm de cet insecte. Cette observation soulève la question de la relation entre le coiffage des messagers et le développement. La même observation a été réalisée chez les lépidoptères par Kastern et Berry (29). Il semblerait que la complexification de la coiffe s'accompagne d'une augmentation du taux de synthèse protéique.

2.3.2. La polyadénylation 3'-terminale.

La queue de poly(A) synthétisée par une poly(A) polymérase consiste en une séquence monotone d'environ 150 à 250 adénosines reliée de façon covalente à l'extrémité 3'-OH des messagers (30). La polyadénylation constitue une étape nucléaire de la maturation des ARNm. Sawicki *et al.* (31) suggèrent qu'une adénylation supplémentaire consommant de l'ATP puisse avoir lieu

essentiellement dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau. Cette adénylation secondaire se ferait plus lentement que la première et n'ajouterait qu'une dizaine de bases à la queue de poly(A) pré-existante. La mise en évidence d'ARNm dépourvus de poly(A) comme les messagers d'histones (32) et l'isolation d'ARNm procaryotiques notamment chez *E. coli*, portant des queues de poly(A) courtes plaident en faveur d'une intervention de la polyadénylation qui ne se limiterait pas au transport nucléo-cytoplasmique (33,34).

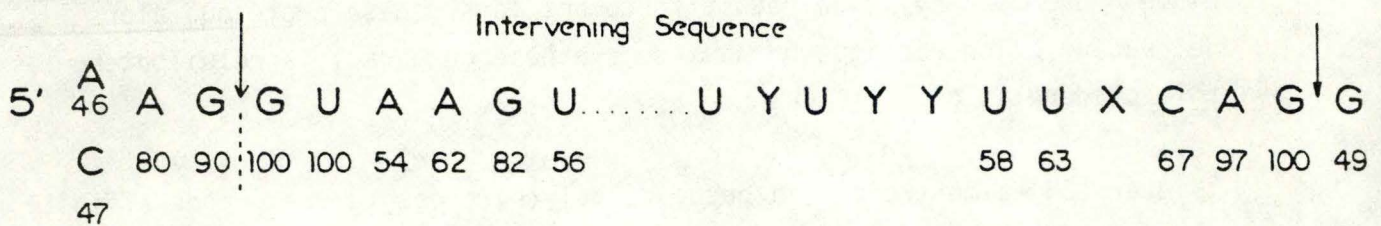
Huez *et al.* (34 - 37) ont montré que la queue de poly(A) contribue à la stabilité de l'ARNm de globine *in vivo*. Après microinjection de cet ARNm dans l'oocyte de xénope, les auteurs ont mesuré le niveau de synthèse protéique. Une déadénylation réduit fortement la synthèse protéique alors qu'une réadénylation restitue un taux de synthèse comparable à celui obtenu avant la déadénylation.

Hieter (38) a montré que la queue de poly(A) présente une grande affinité pour les endonucléases. Bien que cela paraisse contradictoire, la queue de poly(A) participe à la stabilisation physiologique des ARNm en focalisant l'activité endonucléolytique en dehors de la partie codante. Cette queue de poly(A) pourrait aussi protéger l'ARNm à la suite d'un empêchement stérique provoqué par un repliement de la séquence polyadénylée sur le reste du message (39).

La mise en évidence d'une poly(A) binding protein étaye l'hypothèse de la protection physique de l'ARNm face aux endonucléases.

2.3.3. Excision et épissage.

L'excision et l'épissage représentent une étape importante dans le processus physiologique par lequel les ARNm de gènes en "mosaïque" sont formés suite à l'excision de morceaux d'ARNhn (introns) et à la resoudure dans un ordre précis de fragments conservés (exons) qui formeront la matrice



Splice junction consensus sequences in eukaryotic precursor mRNA. The splice junction consensus sequences deduced from comparison of the sequences of a large number of eukaryotic genes are drawn in the 5' to 3' direction with vertical arrows marking the boundaries between coding and intervening sequences. A and X denote a pyrimidine or any nucleotides, respectively. The frequency with which each residue shown occurs is given below the sequence.

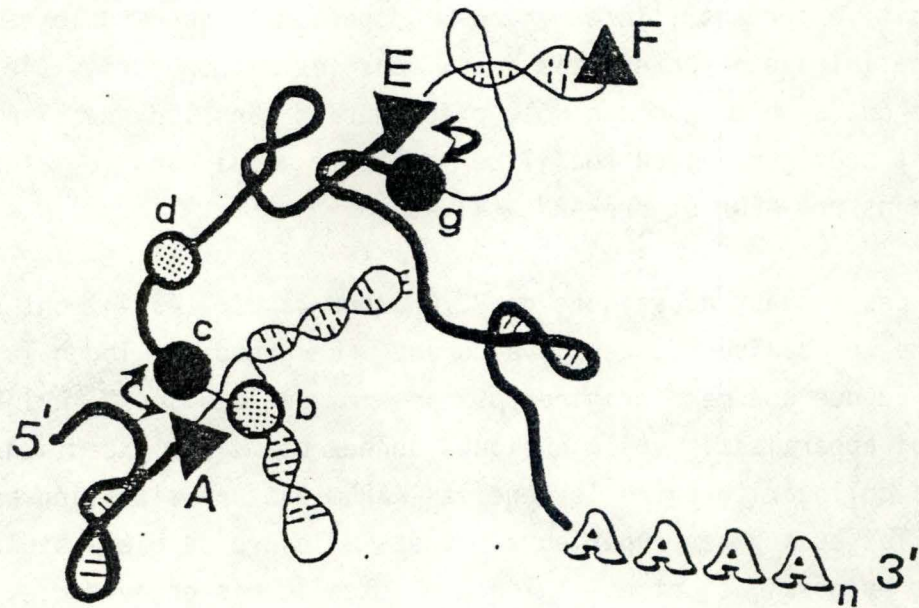
Fig. 14: Séquences consensus hautement conservées entre exons et introns des gènes en mosaïque des cellules eucaryotes. (165)

définitive portant l'information. Ce phénomène se déroule dans le noyau des cellules eucaryotes mais aussi dans les mitochondries (40). Ce mécanisme qui semble jouer un rôle prépondérant dans l'expression génétique serait très général puisqu'il se manifeste aussi dans la maturation de certains pré-ARNr et pré-ARNt (41,42).

Les travaux classiques de P. Chambon *et al.* (43,44) ont démontré la nature en mosaïque du gène ovalbumine. Le groupe de Tonegawa (45) a mis en évidence une même origine pour les immunoglobulines. A l'heure actuelle, ce qui apparaissait voilà quelques années comme des exceptions à la règle de la colinéarité entre le gène et l'ARNm est une situation assez générale chez les eucaryotes supérieurs. Chez la levure de bière seulement quelques gènes en mosaïque ont été à l'heure actuelle mis en évidence.

Les données expérimentales récentes plaident en faveur d'une transcription continue de gène générant un premier "transcript" qui ensuite est clivé et resoudé. L'enzymologie du "splicing" semblait de prime abord devoir être très complexe (46). Cependant, l'analyse des régions frontières entre exons et introns dans le gène ovalbumine et dans les gènes d'immunoglobulines a révélé l'existence de nucléotides invariants (Fig. 14). Cette observation suggérait que le niveau de spécificité du splicing puisse être moins complexe qu'on ne l'avait d'abord imaginé. Les expériences de Breathnach *et al.* (47) montrent que l'épissage pourrait presque toujours avoir lieu entre les dinucléotides invariants AG et GU ("règle de Chambon"). La levure de bière semble cependant constituer une exception.

Récemment, Langford et Gallwitz (145) ont mis en évidence une séquence critique pour l'excision des séquences introniques des gènes en mosaïque de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette séquence composée de l'heptanucléotide TACTAAC, présente dans quelques rares introns d'eucaryotes supérieurs, est située de 20 à 55 nucléotides en amont de tous les sites 3' de clivage des introns connus de levure. Le clivage a souvent lieu au premier dinucléotide AG en aval de la séquence TACTAAC, mais ceci ne constitue pas une règle générale. Ces résultats suggèrent que la machinerie enzymatique d'excision reconnaît la séquence UACUAAC de l'ARN et ensuite elle "balaye"



A model for splice site selection. The model is explained using a hypothetical pre-mRNA as example. Heavy lines, exons; light lines, introns; stacked lines, hydrogen bonds; triangles, '5' splice enzyme'; circles, '3' splice enzyme'; light shading, weak binding; heavy shading, strong binding. Double-headed arrow indicates preferred splicing interaction: when the two complexes join, the splicing enzymes are activated and splicing ensues. Under normal conditions, splicing occurs between A(5') and c(3'), and E(5') and g(3'), respectively. Splicing is rare or non-existent between A(5') and b(3') or d(3') because the complex b is unstable and therefore occurs infrequently, and d is unfavourably located compared with c. If c is mutationally inactivated, A(5') may splice at a lower rate to b(3') or d(3'), which are thereby revealed as cryptic splice sites. Although the sequence of F(5') is typical for a 5' splice region, it is so unfavourably placed that it is never involved in a splicing reaction even if the authentic splice site at E is inactivated, and thus does not constitute a cryptic splice site.

Fig. 15: Modèle proposé par le groupe de Weissman pour la sélection du site de splicing. (50)

("scan") l'intron dans le sens 5'-3' jusqu'au premier dinucléotide AG.

Weissman *et al.* (50) ont proposé un modèle alternatif au "scanning model" (51) pour expliquer la sélection des sites de splicing (Fig. 15).

La plupart des introns des eucaryotes supérieurs sont dépourvus de la séquence TACTAAC mais possèdent une séquence riche en pyrimidines précédant directement tous les sites 3' de clivage. Wieringa *et al.* (147) ont montré que cette séquence doit être intacte pour une excision correcte de l'intron. Cette région pourrait jouer un rôle similaire à celui de la séquence TACTAAC.

2.3.4. Les méthylations internes.

Perry et Kelly (48) ont montré l'existence de méthylations dans l'ARNm des cellules de souris, à la fois sur certains riboses et certaines bases. En moyenne, ces ARNm contiennent environ 2,2 groupements méthyles par 1000 nucléotides, cette fréquence de méthylations internes est six fois inférieure à la fréquence des résidus méthylés de l'ARN ribosomal des mammifères.

Ces auteurs ont aussi montré que la méthylation interne tout comme la polyadénylation est un processus post-transcriptionnel assez tardif. A titre d'exemple, l'analyse des méthylations internes de l'ARNm des cellules d'hépatome de Novikoff (49) révèle l'existence des quatre 2'-O-méthylribonucléotides, de la N-6-méthyladénosine, de la 7-méthylguanosine et de la 5-méthylcytosine. Le rôle de ces méthylations internes est encore inconnu à l'heure actuelle.

Virus	Coiffe 0	Coiffe 1	Coiffe 2	Méthylation interne
<u>VEGETAUX</u>				
<u>à ARN bicaténaire</u>				
WTV	N.D.	X = A	N.D.	N.D.
Virus de <i>Penicillium chrysogenum</i>	-	X = Pu, Py	-	N.D.
<u>à ARN monocaténaire</u>				
CMV	Pas de coiffe			N.D.
STNV	Pas de coiffe			-
Virus de la nécrose du tabac	Pas de coiffe			-
Virus de la mosaïque du tabac	X = G	-	-	-
Virus de la mosaïque de l'orge	X = Pu, Py	-	-	-
Virus de la mosaïque du concombre	X = Pu, Py	-	-	-
Virus de la mosaïque jaune du navet	X = G, A	-	-	-
Virus de la mosaïque de la luzerne	X = G	-	-	-
Virus X de la pomme de terre	X = G	-	-	-
BMV	X = G	-	-	-
<u>ANIMAUX</u>				
<u>à ADN</u>				
<u>à répllication cytoplasmique</u>				
Virus de la vaccine	-	X=A,G, $m(6)N_A$	-	-
<u>à répllication nucléaire</u>				
Adénovirus	-	-	X=A, $m(6)N_A$	$m(6)N_A, m^5_C$
Virus SV 40	-	X=G, $m(6)N_A$	-	$m(6)N_A$
Virus de l'herpès	-	-	+	$m(6)N_A$
Virus du polyome	-	-	X=G, $m(6)N_A$	$m(6)N_A$
<u>à ARN bicaténaire</u>				
<u>à répllication cytoplasmique</u>				
Réovirus	-	-	X = G, Y = C	-
<u>à ARN monocaténaire</u>				
<u>à répllication cytoplasmique</u>				
Spring viremia du Carpe	-	X = A	-	N.D.
Virus de la maladie de Newcastle	X = Pu, Py	-	-	-
Virus de la grippe	-	X=G, $m(6)N_A$	-	$m(6)N_A$
Virus de la stomatite vésiculeuse	-	-	X= $m(6)N_A$, Y=A	-
Virus de Dengue	-	X= $m(6)N_A$	-	-
Virus de Sindbis	X = A	-	-	m^5_C
Calciivirus	Pas de coiffe			N.D.
Virus de la fièvre aphteuse	Pas de coiffe			-
Virus de l'encéphalomyocardite	Pas de coiffe			-
Poliovirus	Pas de coiffe			-
<u>à répllication nucléaire</u>				
Virus du sarcome aviaire	-	X = G	-	$m(6)N_A$
Virus de la leucose féline	-	X = G	-	$m(6)N_A$
Virus de la leucose murine	-	X = G	-	$m(6)N_A$
Virus du sarcome de Rous	-	X = G	-	$m(6)N_A$

Tableau II: Quelques coiffes d'ARNm viraux (pour la légende, voir Tableau II)

3. LA COIFFE 5'-TERMINALE.

3.1. Distribution phylogénique.

	Coiffe 0	Coiffe 1	Coiffe 2	Méth. int.
<u>MICROORGANISMES</u>				
<i>Neurospora crassa</i>	X = A > G	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X = A > G	-	-	-
<i>Dictyostellium discoïdes</i>	X = A > G	X = A(10%)	-	-
<u>VEGETAUX</u>				
Embryons de blé	X = Pu, Py	-	-	-
Mats	X = Pu, Py	-	-	-
Soya	X = Pu, Py	X = Pu, Py	-	-
<u>ANIMAUX</u>				
<u>Invertébrés</u>				
Oocytes d'insectes	X = Pu, Py	-	-	-
<i>Bombyx mori</i>	-	X = A	Y = U	m(6)N _A
<i>Aedes albopictus</i>	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
<i>Artemia salina</i>	X = Pu, Py	N.D.	N.D.	N.D.
Drosophile	X = C	X = Py > Pu	Y = Pu, Py	N.D.
Oursin de mer	-	X = Pu > Py	-	m(6)N _A
<u>Vertébrés</u>				
Ovalbumine	X = A	X=A, m(6)N _A	Y = Py	N.D.
Globine de canard	-	X = Pu, Py	N.D.	-
Globine de souris	-	X=A, m(6)N _A	Y = C	-
Immunoglobuline de souris	-	X=G, m(6)N _A	Y = A	m(6)N _A
Rein de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	+
Cellules L de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Erythroïdes de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Myéline de souris	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Hépatome de rat	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Rein de hamster	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A , m ⁵ C
Globine de lapin	-	X = m(6)N _A	Y = C	-
Rein de singe	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Globine humaine	-	X=A, m(6)N _A	Y = C	-
Cellules HeLa humaines	-	X = Pu, Py	Y = Pu, Py	m(6)N _A
Histones de cellules HeLa	-	X=A,G, m(6)N _A	Y = Pu, Py	-

Tableau III: Quelques coiffes d'ARNm cellulaires. Coiffe 0 = $m^7G(5')ppp(5')Xp-$
 Coiffe 1 = $m^7G(5')ppp(5')X^m pYp-$, Coiffe 2 = $m^7G(5')ppp(5')X^m pY^m pZp-$, N.D. =
 non déterminé, Pu = purine, Py = pyrimidine.

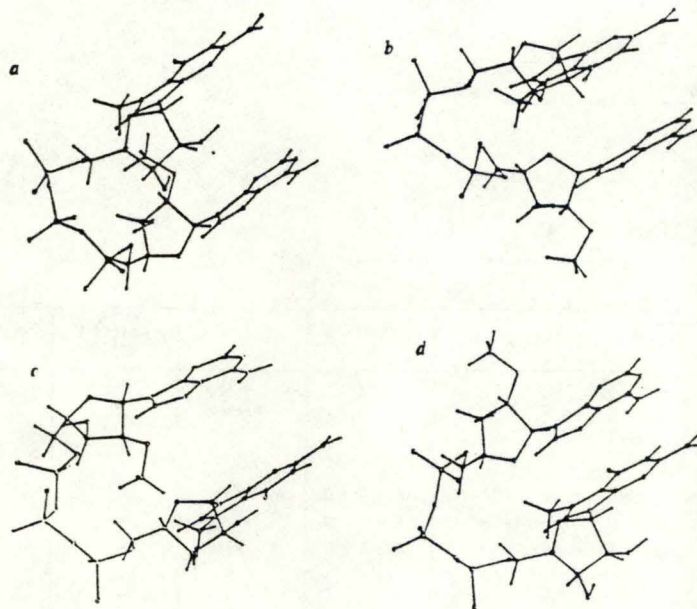


Fig.16: Les quatre conformations possibles que le dimère ${}^m7G(5')ppp(5')A^m$ peut adopter en solution aqueuse. Par l'étude de résonance magnétique nucléaire il apparaît que la conformation a est la plus probable (53).

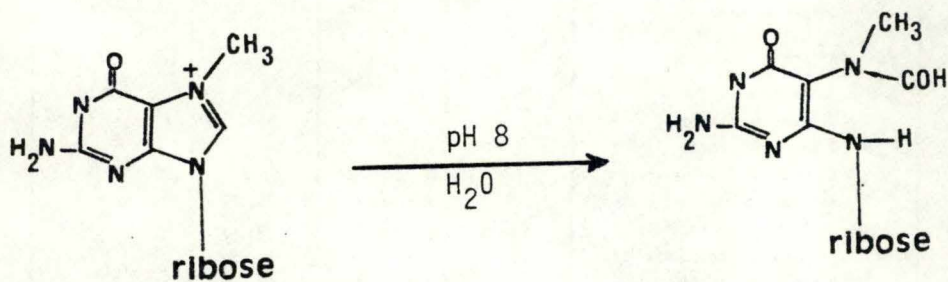


Fig. 17: Instabilité du noyau imidazole à pH alcalin.

Les tableaux II et III reprennent les principales structures coiffantes des ARNm viraux et cellulaires (52). La lecture de ces tableaux suggère une complexification de la coiffe de l'ARNm en parallèle avec une complexification croissante des organismes.

3.2. Propriétés de la coiffe.

3.2.1. Propriétés stériques.

Les travaux de C.H. Kim et R.H. Sarma (53) sur les propriétés stériques des analogues de coiffe ont largement contribué à la compréhension du comportement spatial de l'extrémité 5'-terminale des ARNm eucaryotes. L'étude par résonance magnétique nucléaire d'un dimère comme $m^7G(5')ppp(5')A^m$ révèle une interaction coplanaire de bases entre les deux extrémités du dimère, le pont 5'-5' triphosphate réalisant littéralement la charnière entre les deux bases. La flexibilité importante de la liaison phosphodiester permet plusieurs configurations stériques dont les quatre plus probables sont reprises dans la figure 16. La configuration a en solution aqueuse présente cependant une probabilité d'existence plus élevée.

3.2.2. Propriétés chimiques.

Des agents alkylants comme le diméthylsulfate transforment l'atome 7 de la guanine en 7-alkylguanine dans les acides nucléiques. Cet événement serait responsable des effets mutagène, cytotoxique et cancérigène des agents alkylants (54). L'alkylation de l'atome N-7 de la guanine génère une charge positive sur le noyau imidazole ce qui induit un appariement fautif avec une thymine dans l'ADN (55). De plus, l'alkylation de l'atome N-7 facilite l'échange de l'hydrogène (H8) avec une molécule d'eau, le noyau imidazole devenant instable face à un agent alkylant faible (56) (Fig. 17).

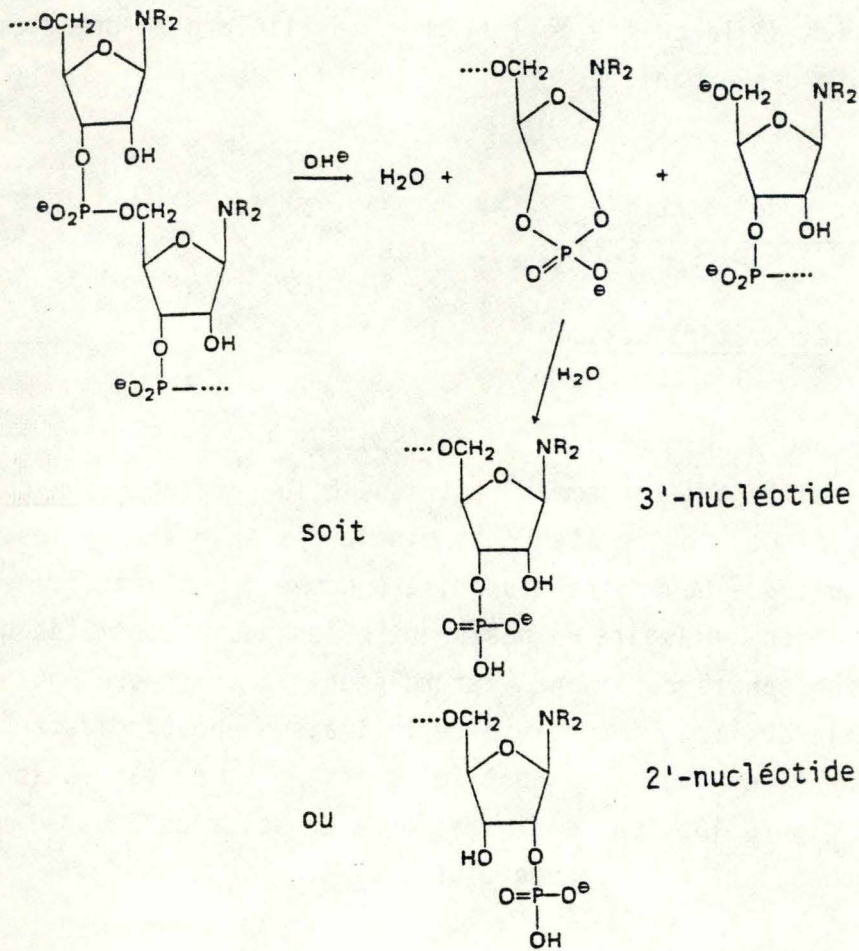


Fig.19: Le groupement 2'-hydroxyle libre est impliqué lors de l'hydrolyse alcaline de l'ARN dans la formation d'un intermédiaire de phosphate cyclique pour former finalement un mélange de 2'- et 3'-nucléotides (60)

L'alkylation de l'atome N-7 de la guanine confère à la coiffe des propriétés chimiques spéciales dont le rôle n'est pas encore précisé aujourd'hui. Le pont 5'-5' triphosphate expose un 2',3'*cis*-diol

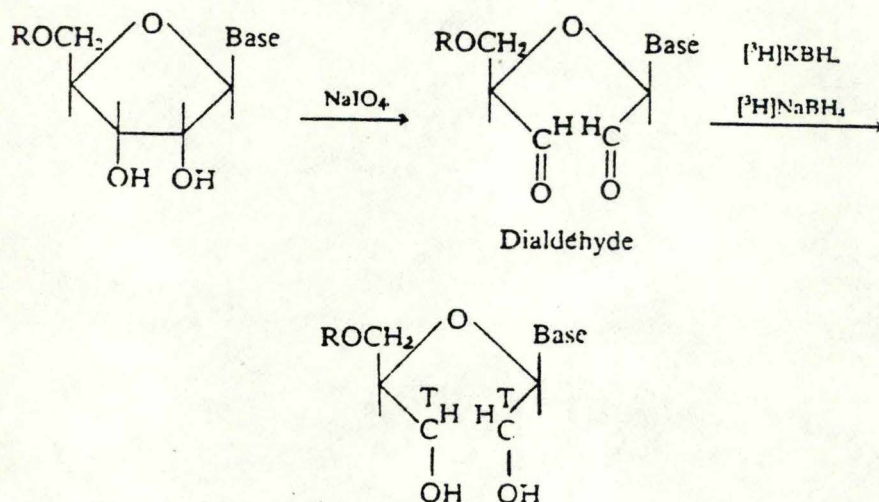


Fig.18: Oxydation d'un ribonucléotide avec un 3'-OH libre par l'action du periodate de sodium en nucléotide dialdéhyde et réduction de ce dialdéhyde par l'action du borohydrure.

5'-terminal qui permet des réactions chimiques habituellement observées du côté 3'-terminal. Il est par exemple possible d'oxyder au periodate le ribose de la m⁷G en aldéhyde nucléosidique (57) (Fig. 18).

Une réaction de β -élimination permet d'enlever la m⁷G oxydée d'un ARN traité au periodate par l'action de l'aniline (58) ou de la cyclohexamine (59).

L'ARN soumis à un traitement alcalin voit ses liaisons 5'-phosphoesters aisément hydrolysées. Le groupement 2'-hydroxyle libre est impliqué dans la formation d'un intermédiaire phosphate cyclique pour former un mélange de 2' et 3' nucléotides (60) (Fig. 19). Tous ces oligonucléotides peuvent être ensuite analysés suivant leur charge par électrophorèse ou par chromato-

graphie sur DEAE-cellulose dans 7 M urée à pH 7,5 (143). Les différentes structures de coiffe peuvent également être analysées par chromatographie à deux dimensions sur couche mince (144) ou par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) (145).

3.2.3. Propriétés enzymologiques.

La coiffe présente différents comportements enzymologiques qui furent utilisés pour la caractérisation fine de la structure 5'-terminale des ARNm eucaryotes. La ribonucléase pancréatique A de boeuf, endonucléase spécifique des ARN monocaténares, hydrolyse les liaisons 5'-phosphoesters après une pyrimidine générant à partir d'un ARNm des oligonucléotides coiffés portant une pyrimidine 3'-phosphate. Cette enzyme ne clive pas les liaisons entre nucléotides portant une 2'-O-méthylation sur le ribose car l'intermédiaire de phosphate 2',3'-cyclique, étape indispensable dans la réaction d'hydrolyse ne peut plus se former (61). La ribonucléase T1 clive spécifiquement après une guanosine (62). La ribonucléase T2, endonucléase non spécifique, clive les liaisons 5'-phosphoesters après passage par un intermédiaire cyclique générant des oligonucléotides dont la coiffe est intacte (63). La phosphodiesterase de venin de serpent dégrade complètement les ARN mais la 7-méthylguanosine des ARNm coiffés reste à l'état de nucléotide 5'-diphosphate (64).

3.2.4 Propriétés immunologiques.

La 7-méthylguanosine reliée à une protéine est un déterminant antigénique et peut induire la production d'anticorps qui reconnaissent immunospécifiquement cet haptène.

Le groupe de Munns (65) a montré que l'anti-m⁷G lié à un gel de Sépharose retient sélectivement les coiffes provenant de l'hydrolyse à

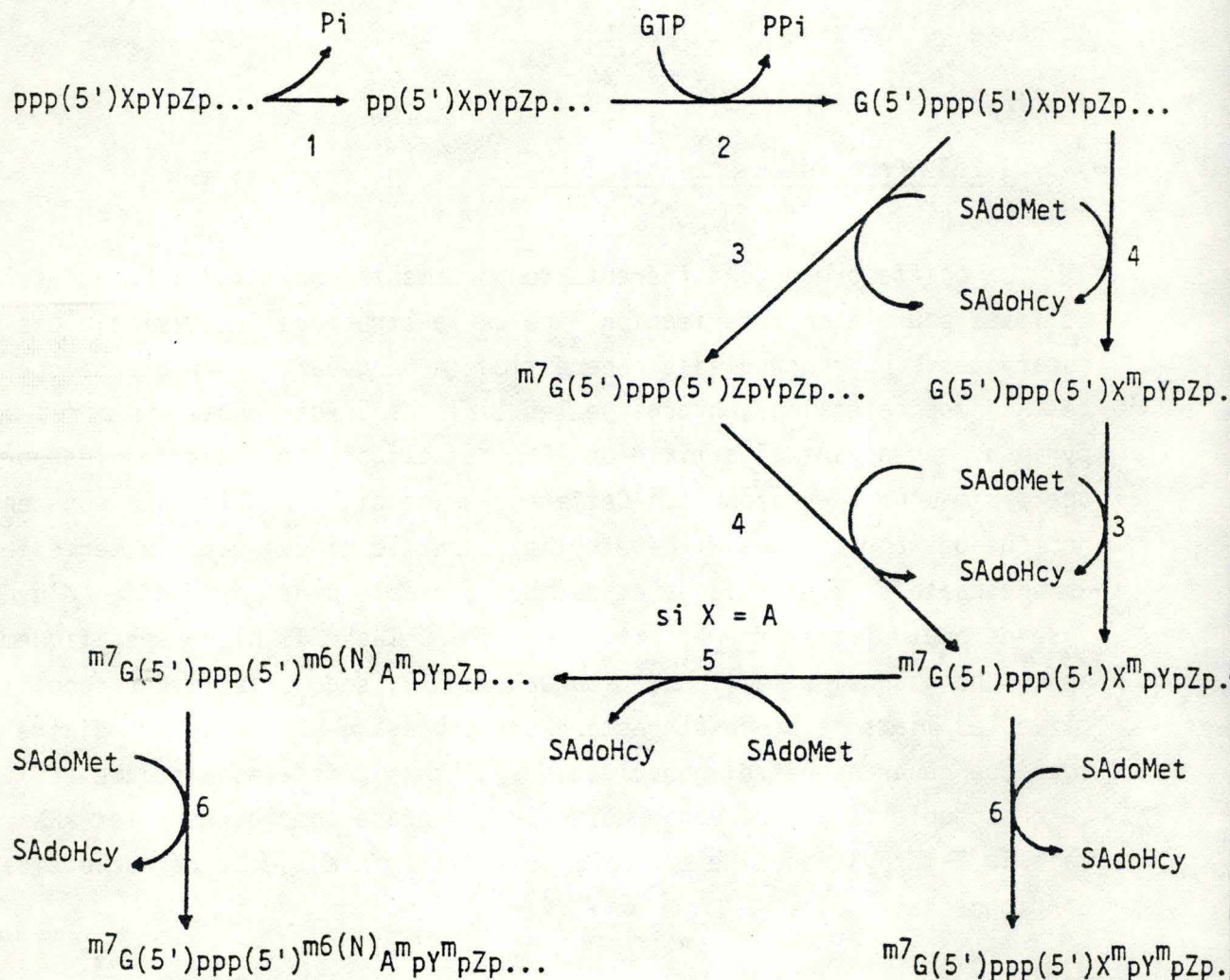


Fig. 20: Voie métabolique proposée pour la modification 5'-terminale des ARNm des cellules HeLa. Les enzymes qui catalysent les réactions indiquées sont: 1) L'ARN-triphosphatase; 2) L'ARN-guanylyltransférase; 3) L'ARN(guanine-7-)-méthyltransférase; 4) La coiffe 1 ARN(nucléoside-2'-)-méthyltransférase; 5) L'ARN(2'-O-méthyladénosine-N-6-)-méthyltransférase et 6) La coiffe 2 ARN(nucléoside-2'-)-méthyltransférase.

la ribonucléase T2 de l'ARNm de l'adénovirus.

Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont montré que la présence d'anti-m⁷G dans un milieu acellulaire de traduction inhibe très fortement la traduction du messager *in vitro*. Une étude approfondie de la nature du complexe anti-m⁷G - ARNm révèle que cet anticorps couvre toute la séquence suivante : m⁷G(5')ppp(5')XpYpZp (66).

Il est aussi intéressant de remarquer que le couplage de cet anticorps à un gel de Sépharose a permis d'isoler des ARNm dépourvus de queue de poly(A) comme les ARNm d'histones qui ne sont pas purifiables par la méthode classique de chromatographie sur oligo(dT)-cellulose.

3.3. Les enzymes de coiffage et de méthylation de l'ARNm eucaryote.

Les différentes enzymes impliquées dans le coiffage et la méthylation sont reprises dans la figure 20.

3.3.1. L'ARNm 5'-triphosphatase.

Ce sont Tutas et Paoletti (67) qui ont observé pour la première fois la présence dans le "core" du virus de la vaccine une enzyme capable d'hydrolyser le γ -phosphate d'un ARN 5'-triphosphate pour générer un ARN 5'-diphosphate qui seul peut être coiffé par la guanylyltransférase de ce virus. Cette enzyme est composée de deux polypeptides de 90 000 et 26 000 daltons, l'activité enzymatique requiert la présence d'ions métalliques divalents et le pH optimum se situe aux environs de 8,4.

Une activité en ARN 5'-triphosphatase fut mise en évidence par Yagi *et al.* (68) dans le foie de rat. Cette enzyme par opposition à celle de *Vaccinia* semble être inhibée par la présence de cations métalliques divalents.

Aucune étape de purification n'a pu dissocier cette enzyme de la guanylyltransférase. L'analyse de la fraction purifiée à l'aide d'une électrophorèse sur gel en SDS-polyacrylamide révèle la présence d'un seul polypeptide d'un poids moléculaire de 69 000 qui posséderait les deux activités enzymatiques. Itoh *et al.* (69) ont également mis en évidence une association étroite de la triphosphatase avec la guanylyltransférase chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il ne faudrait cependant pas croire que cette situation constitue une règle générale. Récemment Venkatesan et Moss (70) ont séparé la guanylyltransférase de l'activité triphosphatase des cellules HeLa.

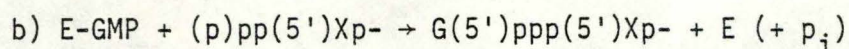
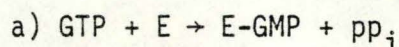
3.3.2. L'ARNm guanylyltransférase.

C'est aussi dans le virus de la vaccine que Martin *et al.* ont pour la première fois mis en évidence une activité d'ARNm guanylyltransférase (71). Le poids moléculaire de cette enzyme après filtration sur Séphadex G-200 et centrifugation sur gradient de sucrose est d'environ 127 000. L'activité d'ARNm guanylyltransférase de *Vaccinia* est fortement liée à celle de guanine-7-méthyltransférase, ceci a été montré après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes où le polypeptide de 127 000 daltons se scinde en 2 molécules de 95 000 et 31 400 daltons responsables des activités de guanylyltransférase et de guanine-7-méthyltransférase.

La guanylyltransférase coiffe spécifiquement un polynucléotide 5'-di- ou -triphosphate avec le GTP comme donneur unique de GMP (72). L'observation montrant qu'un m^7 GTP ne sert pas de donneur de guanine suggère que la méthylation ait lieu après la guanylation.

La guanylyltransférase du virus de la vaccine a un pH optimal de 7,8 et l'activité enzymatique nécessite la présence de Mg^{++} et de Mn^{++} , les ions Ca^{++} et Zn^{++} inhibent fortement la guanylation de même que les pyrophosphates. Shuman *et al.* (73) ont montré que la réaction de guanylation dans le virus de la vaccine est au moins la somme de deux réactions. Tout d'abord, la guanylyltransférase réagit avec le GTP pour former un intermédiaire covalent

enzyme - GMP qui transférera par la suite la guanosine monophosphate sur l'ARN accepteur 5'-di- ou -triphosphate avec libération de l'enzyme et de phosphate inorganique si l'ARN se termine par un triphosphate avant guanylation (74)



La guanylyltransférase eucaryote a été purifiée dans le foie de rat (75), dans les cellules HeLa (76), dans le thymus de veau (77), dans les germes de blé (78) et dans la levure de bière (69).

Mizumoto et Lipmann (75) ont partiellement purifié la guanylyltransférase de noyaux de foie de rat isolés et "soniqués". Une chromatographie sur hydroxylapatite ne permet pas de séparer l'activité de guanylyltransférase de celle de (guanine-7-)-méthyltransférase. La dissociation des deux activités enzymatiques ne se fera qu'après filtration sur gel Séphadex G-150, les poids moléculaires des deux enzymes sont de 65 000 pour la guanylyltransférase et de 130 000 pour la (guanine-7-)-méthyltransférase. L'enzyme de coiffage catalyse l'incorporation de l' α -phosphate du GTP sur l'extrémité 5' de l'ARNm, ni le β - ni le γ -phosphate ne sont incorporés dans la coiffe. Cette réaction demande la présence de dithiothréitol et d'un cation divalent. Mizumoto et Lipmann ont observé que la guanylation d'un ARNm 5'-diphosphate est facilitée à 30 °C par rapport à l'ARNm 5'-triphosphate alors qu'à 40 °C, les deux substrats possibles ont le même comportement. L'hypothèse formulée par ces auteurs selon laquelle une contamination par une ARN triphosphatase pourrait faciliter la guanylation, n'a jamais été vérifiée expérimentalement.

Chez *Saccharomyces cerevisiae* la guanylyltransférase (PM = 45 000) est intimement liée à une activité de triphosphatase. Par opposition aux enzymes décrites pour le foie de rat, le thymus de veau, les cellules HeLa et le germe de blé, la guanylyltransférase de levure de bière semble contenir plusieurs sous-unités. Dans tous les systèmes décrits à l'heure actuelle, la réaction de coiffage passe par un intermédiaire covalent enzyme - GMP (79).

3.3.3. L'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase.

Dans le virus de la vaccine l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase fait partie d'un complexe multienzymatique d'un poids moléculaire de 127 000 comprenant aussi comme activité enzymatique la guanylyltransférase et la triphosphatase (71). Le substrat présentant le plus d'affinité pour la (guanine-7-)-méthyltransférase est un polyribonucléotide portant la séquence 5'-terminale G(5')ppp(5')Xp-. L'enzyme catalyse le transfert d'un groupement méthyle venant de la S-adénosyl-L-méthionine (SAdoMet), donneur universel de groupements méthyles (80), vers la position 7 de la guanine terminale, les guanines internes ne sont jamais méthylées par cette enzyme. Il faut aussi noter que cette réaction de méthylation est inhibée rapidement par la présence de S-adénosyl-L-homocystéine (SAdoHcy). L'optimum de pH de cette enzyme se situe aux environs de la neutralité, l'activité enzymatique ne requiert pas la présence de Mg^{++} (81).

Mizumoto et Lipmann (75) ont partiellement purifié la (guanine-7-)-méthyltransférase de noyaux de foie de rat. Le poids moléculaire de l'enzyme est estimé à environs 130 000. Le test enzymatique mettant en évidence l'activité de méthylation utilise un dinucléotide triphosphate synthétique G(5')ppp(5')G comme accepteur et la SAdoMet comme donneur de méthyle.

Dans les cellules HeLa, Ensinger et Moss (82) ont purifié et caractérisé la même enzyme. Après homogénéisation, ces auteurs localisent 2/3 de l'activité enzymatique dans le cytoplasme. Le poids moléculaire de la (guanine-7-)-méthyltransférase des cellules HeLa est d'environ 56 000.

Locht *et al.* (52) ont purifié plus de 3 000 fois l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de germes de blé par trois chromatographies successives, deux DEAE-cellulose et une DNA-agarose. Comme les embryons de blé contiennent des ARNm coiffés dont le pénultième résidu peut être une guanosine (G), adénosine (A), cytidine (C) ou uridine (U) (83), il était intéressant de comparer le résultat de la méthylation *in vitro* des 4 analogues de coiffe

(G(5')ppp(5')G, G(5')ppp(5')A, G(5')ppp(5')C et G(5')ppp(5')U) en mélange équimolaire pendant une heure à 25 °C. L'enzyme montre une nette préférence pour l'analogue G(5')ppp(5')G qui est quinze fois plus méthylé que G(5')ppp(5')U et trente fois plus que G(5')ppp(5')C (52).

Locht *et al.* (84) ont également purifié partiellement et caractérisé l'ARNm (guanine-7-)-methyltransférase de *Saccharomyces cerevisiae*. Trois chromatographies successives, une DEAE-cellulose, une DNA-agarose et une poly(U)-Sépharose sont nécessaires pour obtenir une fraction enzymatique purifiée 770 fois. Cette enzyme en test de méthylation *in vitro* présente une plus grande affinité pour l'analogue de coiffe G(5')ppp(5')A (52). Le poids moléculaire de l'enzyme est estimé à 49 000, valeur qui est proche du poids moléculaire de la méthyltransférase correspondante des cellules HeLa.

3.3.4. L'ARNm (nucléoside-2'-)-méthyltransférase.

Dans le virus de la vaccine, Barbosa et Moss (85) ont purifié cette enzyme 350 fois après trois chromatographies successives, une DEAE-cellulose, une CM-Séphadex et une ADN-agarose. Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement méthyle de la SAdoMet vers la position 2'-O du pénultième nucléoside générant ainsi une coiffe de type 1 : $m^7G(5')ppp(5')X^m_p-$. Le pH optimum de cette méthyltransférase se situe aux alentours de 7,5 et son poids moléculaire est estimé à 37 000. Cette réaction de méthylation est fortement inhibée par la présence de SAdoHcy (86).

Langberg et Moss ont aussi décrit deux enzymes équivalentes dans les cellules HeLa (88). Tout d'abord, une ARNm (nucléoside-2'-)-méthyltransférase située exclusivement dans le noyau serait responsable de la formation des coiffes de type 1 et ensuite, une enzyme cytoplasmique formerait les coiffes de type 2. Ces deux activités enzymatiques sont purifiées simultanément sur DEAE-cellulose et séparées par chromatographie sur phosphocellulose.

Le plus petit substrat qui peut servir d'accepteur de groupement méthyle dans la réaction de formation de la coiffe 1 est du type G(5')ppp(5')XpYp. D'autre part, la 2'-O-méthyltransférase qui méthyle le pénultième ribose présente une affinité équivalente pour le substrat se terminant par G(5')ppp(5')Xp- ou m⁷G(5')ppp(5')Xp-. Cette observation ne permet pas de déterminer l'ordre selon lequel les différentes enzymes modifient l'extrémité 5' des ARNm. Langberg et Moss (87) suggèrent cependant que la (guanine-7-)-méthyltransférase agisse d'abord puisque la concentration de cette enzyme est très largement supérieure à celle de la coiffe 1 méthyltransférase dans les extraits cellulaires.

La coiffe 2 méthyltransférase agit forcément après la coiffe 1 méthyltransférase à cause de la localisation subcellulaire de ces deux enzymes. Cette hypothèse est corroborée par le fait qu'aucun m⁷G(5')ppp(5')XpY^mp ne fut jamais détecté *in vitro*. L'optimum de pH de la coiffe 1 méthyltransférase semble se situer aux environs de pH 9 et l'activité enzymatique demande une concentration de 150 mM en potassium pour être optimale.

3.3.5. L'ARNm (2'-O-méthyladénosine-N-6-)-méthyltransférase.

Cette enzyme fut isolée la première fois à partir de fraction cytoplasmique de cellules HeLa et elle catalyse le transfert d'un méthyle à partir de SAdoMet vers la position N-6 de la 2'-O-méthyladénosine située en pénultième position 5' d'un messenger pour former la coiffe 1' :

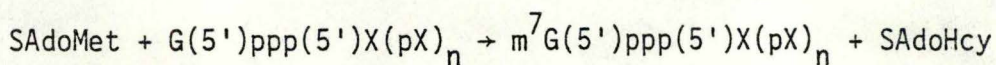
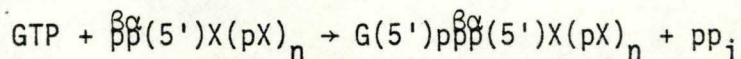
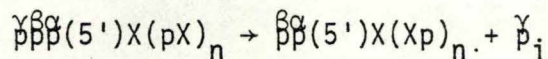
$$m^7G(5')ppp(5')m(6)^NA^m p-$$

Des résidus internes ne sont jamais méthylés par cette enzyme. La formation de la coiffe 1' serait donc postérieure à celle de la coiffe 1. L'enzyme purifiée 500 fois à partir des cellules HeLa a un poids moléculaire de 65 000, présente un pH optimal aux alentours de 7,25 et la réaction de méthylation est inhibée par la présence de SAdoHcy (88).

3.3.6. Le complexe multienzymatique de coiffage et de méthylation.

La majorité des enzymes impliquées dans le coiffage et la méthylation de l'ARNm des virus fait partie d'un complexe multienzymatique comprenant les activités de triphosphatase, guanylyltransférase et (guanine-7-)-méthyltransférase. Chez *Vaccinia*, toutes ces activités demeurent inséparables après purification sur DEAE-cellulose, ADN-agarose, poly(U)-Sépharose et Séphadex G-200. Par sédimentation sur gradient de sucrose, le poids moléculaire de ce complexe fut déterminé à environs 127 000 daltons.

Martin *et al.* (71) ont montré que le complexe enzymatique catalyse spécifiquement la modification d'un ARNm viral naissant dans la séquence suivante :



Il est à noter qu'un ARNm viral se terminant par un nucléotide monophosphate ne peut pas servir de substrat de coiffage. L'association physique de ces trois activités enzymatiques dans un seul complexe expliquerait un rapide coiffage et une méthylation presque concomitante des ARNm viraux naissants.

Dans les cellules eucaryotes, Bajszar *et al.* (89) ont montré que des complexes protéiques 30 S isolés dans le noyau de foie de rat contiennent les activités de guanylyltransférase, de (guanine-7-)-méthyltransférase et de (nucléoside-2'-)-méthyltransférase. Ces complexes protéiques n'ont pas encore été caractérisés très précisément. Salditt-Georgieff (90) suggère que ces complexes enzymatiques augmenteraient l'efficacité de la maturation 5'-terminale des messagers tout comme cela se passe chez le virus de la vaccine.

3.3.7. Les enzymes de décoiffage.

Des enzymes de dégradation de la coiffe ont été mis en évidence dans les cellules de tabac en culture (149), dans les cellules HeLa (150), dans la levure de bière (91) et dans le cristallin de poulet (148).

Stevens (91) a détecté une enzyme de décoiffage dans la fraction dérivée du lavage au KCl des ribosomes de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette enzyme clive uniquement les polynucléotides coiffés, elle n'hydrolyse pas le m⁷GTP comme l'enzyme de dégradation de coiffe des cellules de tabac en culture. La localisation subcellulaire de cette enzyme chez *Saccharomyces cerevisiae* suggère qu'elle pourrait intervenir dans la régulation de l'expression des messagers en hydrolysant plus ou moins rapidement l'extrémité 5'-terminale de l'ARNm

4. LES ROLES FONCTIONNELS DE LA COIFFE DE L'ARNm.

La découverte de cette structure particulière sur toutes les extrémités 5'-terminales des ARNm eucaryotes amena les biologistes moléculaires à s'interroger sur les fonctions potentielles de cette coiffe. Rapidement, on s'aperçut que la coiffe joue de nombreux rôles aussi bien dans la biogenèse, la maturation et le transport cytoplasmique de l'ARNm que dans la stabilité de cette molécule et son interaction avec le ribosome.

4.1. La biogenèse de l'ARNm.

Pendant toute la maturation de l'ARNhn en ARNm fonctionnel la structure coiffante est conservée (92). C'est probablement après l'action des enzymes de décoiffage que la coiffe est dégradée et par là même le messenger, car il n'est plus protégé contre l'activité des exonucléases 5'. Jusqu'à présent

il n'a pas encore été possible de déterminer de manière univoque si la coiffe est impliquée ou même nécessaire à l'initiation de la synthèse de l'ARNm. Cependant chez le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le coiffage pourrait être indispensable à la synthèse des ARNm dans la mesure où on n'a jamais pu isoler des messagers non coiffés dans ce système (93).

La méthylation de la coiffe participe à la maturation de l'ARNm spécialement dans la polyadénylation. En effet, des ARNm de VSV transcrits *in vitro* en présence de SAdoHcy au lieu de SAdoMet, présentent des queues de poly(A) anormalement longues pouvant compter plus de 2 000 nucléotides (94). A l'heure actuelle, on ne sait pas si cette queue anormalement longue de poly(A) résulte d'une inhibition de la méthylation sur la coiffe ou plutôt de la présence de SAdoHcy.

Un autre système viral, le virus de la grippe, nous révèle un mécanisme unique pour la synthèse de ses ARNm. Les messagers coiffés de la cellule hôte sont clivés par une endonucléase spécifique à une dizaine de nucléotides de leurs extrémités 5'. Les polynucléotides générés et portant une coiffe 1 servent ensuite d'amorce pour la synthèse des ARNm viraux (95).

In vitro, la transcription des ARNm du CPV dépend de la présence de SAdoMet (96). Cette observation n'est pas uniquement liée à l'activité de donneur de méthyle de cette molécule, mais aussi à une stimulation de la transcription induite par la SAdoMet et même par la SAdoHcy et ses analogues. Ces composés agiraient comme composés allostériques ayant un effet sur l'ARN polymérase II et/ou les enzymes de coiffage (97). Cette hypothèse est étayée par le fait que la K_M pour l'ATP de l'initiation de la transcription diminue avec l'augmentation de la concentration en SAdoMet (98).

Coppola *et al.* (99) ont montré dans l'adénovirus 2 que tant que les ARNm naissants n'ont pas dépassé 20 résidus, la molécule demeure inaccessible au complexe de coiffage car l'ARN polymérase II couvre toujours le polymère naissant de moins de 20 nucléotides. Ceci suggère que le coiffage n'est pas couplé directement à l'initiation de la transcription.

4.2. La stabilité de l'ARNm.

L'ARNm eucaryote se distingue de l'ARNm procaryote entr'autres caractéristiques par sa longue demi-vie, l'ARNm bactérien peut en effet être dégradé pendant la transcription (100). Cette immense différence concernant les demi-vies de ces deux types d'ARNm a amené les biologistes moléculaires à se demander si la coiffe ne contribuerait pas à assurer une longue demi-vie à l'ARNm eucaryote.

Les expériences classiques du groupe de Furuichi (58) montrent qu'un ARNm coiffé de réovirus injecté dans un oocyte de *Xenopus laevis* est beaucoup plus stable que son homologue non coiffé. D'autre part, un ARNm dépourvu de coiffe est préférentiellement dégradé dans un système acellulaire de germes de blé ou de cellules L de souris. L'étude des cinétiques de dégradation de deux ARNm homologues coiffés mais se différenciant par l'absence de méthyle en position 7 de la guanine 5'-terminale sur une des deux molécules, montre que le blocage 5'-terminal est assuré uniquement par la guanine dans la mesure où les demi-vies de ces messagers sont identiques.

Des observations convergentes furent obtenues en étudiant la stabilité des ARNm pendant la synthèse protéique dans des systèmes utilisant des messagers de globine ou de CPV. (101,102). Dans chaque cas, l'ARNm coiffé demeurait intact alors que l'ARNm non coiffé était rapidement dégradé (dégradation supérieure à 90 %) dans un système acellulaire de traduction de germes de blé. Cette dégradation est probablement due à l'activité d'une exonucléase 5'-3' car les résidus d'hydrolyse sont des mononucléotides 5'.

Quand un ARNm de globine dépourvu de coiffe est injecté dans un oocyte de grenouille, sa dégradation atteint 90 % 96 heures après l'injection. Le même ARN coiffé reste remarquablement stable *in ovo* (103). Tous ces résultats montrent de façon évidente que la coiffe a une action protectrice sur les ARNm. Il faut aussi noter que les ARNm naturellement non coiffés, comme ceux du poliovirus (104), restent stables dans ces systèmes *in vitro* et

in ovo. Dans le cas du poliovirus, il a été clairement démontré que la protection de l'ARNm est assurée par une protéine liée à l'extrémité 5'-terminale.

4.3. La synthèse protéique.

La présence de la coiffe et des méthylations internes sur certains ARNm eucaryotes a interpellé de nombreux chercheurs qui ont tenté de préciser les rôles éventuels de ces structures dans la biosynthèse protéique.

4.3.1. La traduction d'ARNm non coiffés et/ou sous-méthylés.

Indépendamment du fait qu'un messenger coiffé mais non méthylé soit un peu moins stable, Both *et al.* (105) ont montré que la coiffe des ARNm du VSV et du réovirus devait être méthylée pour observer une traduction acellulaire significative de ces messagers. D'autre part, la présence de SAdoMet dans un extrait acellulaire de germes de blé (116) contenant de l'ARNm sous-méthylé de VSV stimule la traduction, probablement par une méthylation catalysée par des enzymes du lysat. Ces observations suggèrent que la méthylation du messenger viral est nécessaire à sa traduction *in vitro*. Muthukrishnan *et al.* (106) obtinrent des résultats comparables avec des messagers non coiffés de globine, d'ovalbumine, de BMV et de TMV. *In vitro*, Rose (107) a montré que les messagers de VSV associés aux polysomes de cellules infectées sont tous coiffés. Furuichi *et al.* (108) ont synthétisé des ARNm de réovirus en culture en présence de S-adenosyl-L-éthionine. Les messagers produits portent essentiellement des coiffes éthylées. Dans un système acellulaire de germes de blé, ces ARNm éthylés sont traduits aussi efficacement que les sauvages. Ceci suggère que c'est la guanine-7-alkylation plutôt que la méthylation proprement dite qui est importante dans la synthèse protéique.

4.3.2. L'inhibition de la traduction par des analogues de coiffe.

L'utilisation d'analogues des coiffes a permis d'étudier l'importance de la coiffe dans la traduction. Les analogues suivants : m^7GMP , m^7GDP , $m^7G(5')ppp(5')X^{(m)}$ inhibent une large gamme d'ARNm coiffés dans différents systèmes acellulaires (109). Les mêmes analogues non méthylés ne présentent pas cette activité inhibitrice, il semblerait que l'inhibition de la traduction soit strictement dépendante de la présence du méthyle sur la guanine 5'-terminale. La concentration en potassium semble faire varier l'intensité de l'inhibition par les analogues de coiffe. De manière générale, l'inhibition augmente proportionnellement avec la concentration en potassium (110). L'augmentation de la force ionique pourrait modifier la structure de la coiffe de l'analogue et suivant la configuration stéréochimique de celle-ci l'effet inhibiteur serait plus ou moins accentué.

Hickey *et al.* (111) ont montré que la présence d'un méthyle en position 7 de la guanine et d'un groupement phosphate 5' constituerait la condition indispensable pour avoir un substrat inhibiteur. Une guanine 3'-phosphate a un pouvoir inhibiteur faible. Il est aussi intéressant de remarquer que les analogues de coiffe peuvent aussi à un niveau moindre, inhiber la traduction d'ARNm non coiffés (112). Tous ces inhibiteurs ont une charge positive provenant de l'alkylation de la position 7 de la guanosine, la perte de cette charge par traitement alcalin s'accompagne de la disparition de l'activité inhibitrice de l'analogue. Il est tout à fait concevable que ces molécules chargées puissent former des ponts hydrogènes avec un composé cellulaire dans l'initiation de la traduction (113) et ainsi inhiber la traduction de l'ARNm *in vitro*. Les analogues de la coiffe ont peu d'effet inhibiteur *in ovo*, ceci pourrait être dû à une rapide dégradation de ces analogues ou à leur trop faible concentration dans les oocytes de *Xenopus laevis* pour obtenir le même effet inhibiteur que celui observé *in vitro* (109).

4.3.3. La liaison ribosome - coiffe.

Les polynucléotides synthétiques coiffés du type $m^7G(5')ppp(5')G^m pC(pU)_n$ ou $m^7G(5')ppp(5')G^m pC(pApC)_n$ sont capables de se lier à la sous-unité ribosomale 40 S avec plus d'efficacité que les mêmes polynucléotides non coiffés (123). L'ajoute d'une coiffe à un ARNm qui en est dépourvu à la suite d'une réaction de β -élimination restaure sa capacité de liaison avec le ribosome via la sous-unité 40 S. Both *et al.* (114) ont montré que la coiffe n'est pas suffisante pour obtenir une interaction durable entre l'ARNm et la sous-unité 40 S du ribosome. Des expériences utilisant des ribopolymères coiffés et non coiffés contenant U et A puis G et C montrent qu'une structure complexe 5' comprenant la coiffe mais aussi d'autres séquences interagissent avec le ribosome. Pour un ARNm naturel, les séquences pour cette interaction pourraient comprendre outre la coiffe, tout le leader jusqu'au codon AUG.

Kozak (115) après avoir circularisé un ARNm par l'intermédiaire d'une ARN ligase a montré qu'un tel messenger ne peut pas interagir avec des ribosomes eucaryotes alors qu'avec des ribosomes d'*E. coli* une interaction a toujours lieu. Ceci suggère que l'interaction avec le ribosome exige un ARNm présentant une extrémité 5' accessible.

Rosenberg et Paterson (116,117) ont montré qu'un ARNm procaryote coiffé grâce à des enzymes de coiffage du virus de la vaccine, peut former un complexe avec des ribosomes de germe de blé. L'interaction de l'ARNm eucaryote avec le ribosome pourrait être médiée par des facteurs d'initiation comme le eIF-4B (118).

4.3.4. La protéine fixatrice de coiffe (PFC).

L'étude du complexe d'initiation de la synthèse protéique a révélé l'existence d'une protéine d'un poids moléculaire de 24 000 qui est capable de se lier aux facteurs d'initiation eIF-3 et eIF-4B (119).

Cette protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur m^7 GDP-Sépharose (120). Quand on ajoute cette protéine purifiée à un extrait de cellules HeLa, la traduction des ARNm coiffés est largement stimulée. Cet effet n'est pas obtenu avec des ARNm non coiffés (121).

Le groupe de Sonenberg (122) en utilisant un anticorps monoclonal contre cette protéine fixatrice de coiffe a montré que cet anticorps inhibe différentiellement la traduction en faveur des ARNm coiffés par rapport aux non coiffés. Ces auteurs ont également remarqué que la fixation de la PFC sur la coiffe induit un relâchement de la structure secondaire 5'-terminale, ce qui pourrait faciliter l'interaction du messenger avec la sous-unité 40S du ribosome. Sonenberg *et al.* (123) observent aussi qu'un système acellulaire préparé à partir de cellules HeLa infectées par le poliovirus, traduit préférentiellement les ARNm non coiffés du virus. L'ajoute de la PFC restaure la traduction des ARNm cellulaires sans pour cela augmenter la traduction des messagers du poliovirus. Cette observation suggère que le poliovirus inhibe la traduction des ARNm cellulaires par une inactivation de la PFC (124).

4.3.5. Le modèle d'initiation de la traduction.

Les observations suivantes ont amené M. Kozak à proposer un modèle d'initiation de la traduction chez les eucaryotes (125,126) :

1. La coiffe semble favoriser la traduction de l'ARNm, même si le codon initiateur se trouve à des centaines de nucléotides de celle-ci.
2. L'interaction entre la sous-unité 40 S du ribosome et l'ARNm exige que la région de la coiffe soit libre d'accès.
3. La sous-unité 40 S peut interagir avec des polynucléotides ne possédant pas de codon initiateur.
4. La sous-unité 40 S est capable de se déplacer le long du messenger.
5. L'ARNm des eucaryotes est monocistronique, même avec un ARNm polycistronique préalablement coiffé et méthylé, seulement le premier cistron est traduit

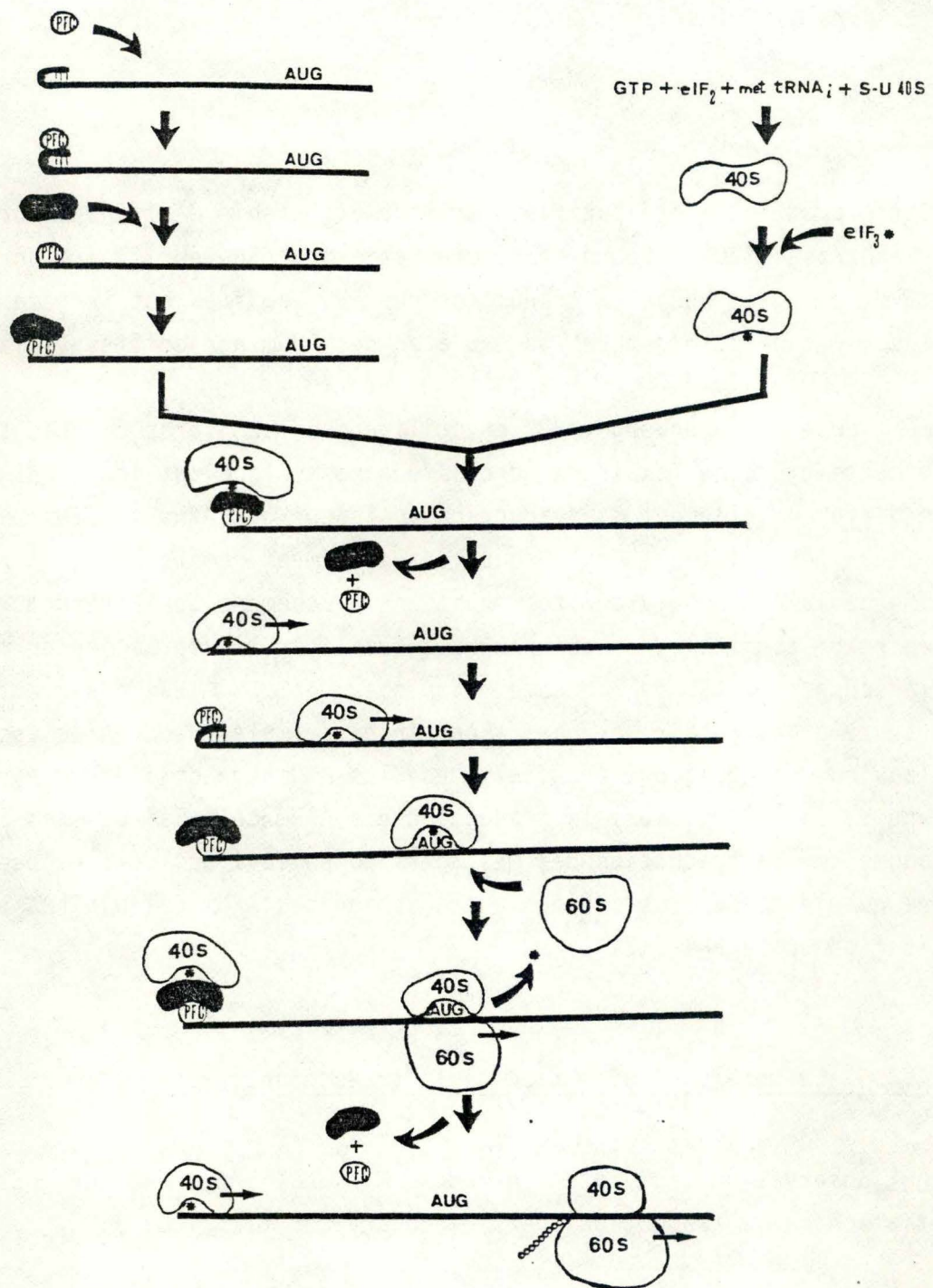


Fig. 21: La protéine fixatrice de la coiffe (PFC) associée à une protéine d'un poids moléculaire de 220 000 d'interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN messager. Le complexe de pré-initiation composé notamment de la sous-unité 40S, du met tRNA initiateur, de GTP et des facteurs d'initiation eIF₂ et eIF₃, rejoint la région de la coiffe. Après la libération de la PFC et de la protéine de 220 000 d, la sous-unité 40S commence à migrer le long de l'ARN jusqu'au premier AUG. L'arrivée de la sous-unité 60S au contact de la 40S permet, après la libération de eIF₃, la biosynthèse d'un peptide.

dans un système acellulaire de germes de blé.

6. La traduction commence au premier AUG en aval de la coiffe. Quand le codon d'initiation de l'iso-1-cytochrome c de levure est inactivé par mutation, la protéine fonctionnelle n'est pas synthétisée (151)
7. Une délétion ou une insertion allant jusqu'à 180 nucléotides affectant la région 5' non codante ne modifie pas la traductibilité d'un ARNm. Ceci suggère que l'interaction avec le ribosome ne dépende ni de la séquence, ni de la structure secondaire de la région leader.

De ces observations Kozak propose le modèle de balayage (Fig. 21) qui postule d'abord "l'entrée" de la sous-unité 40 S associée aux facteurs d'initiation et à l'ARNt^{Met} sur l'ARNm côté 5'-terminal et la migration vers le côté 3' jusqu'au moment où elle rencontre le premier AUG. La sous-unité 40 S attend alors le venue de la sous-unité 60 S et ensemble elles démarrent la synthèse protéique.

Des exceptions à la règle du premier AUG furent mises en évidence (127) et ont amené Kozak à préciser son modèle. L'efficacité avec laquelle la sous-unité 40S se lie au premier AUG est fonction des séquences voisines, chez les eucaryotes, la séquence consensus $\begin{matrix} A \\ G \end{matrix}XXAUGG$ semble être celle qui optimise l'interaction AUG - sous-unité 40 S (128). Si un AUG se trouve dans la portion leader non codante entouré par une séquence plus ou moins optimale, certaines sous-unités 40 S peuvent y initier la traduction mais la majorité des sous-unités ribosomales dépassera cet AUG pour commencer la synthèse protéique plus en aval. Après la formation du complexe d'initiation, la PFC pourrait être recyclée (129).

Liu *et al.* (152) ont introduit un triplet AUG en amont du codon initiateur du gène codant pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B. Ils ont montré conformément au modèle de balayage de Kozak, que l'initiation avait lieu au premier AUG introduit. Ces auteurs ont aussi montré que le ribosome eucaryote peut réinitier une traduction à un AUG en aval d'un codon stop.

5. BUT DU TRAVAIL.

La compréhension du rôle fonctionnel de la coiffe de l'ARNm nécessite d'abord la purification des enzymes impliquées dans ces réactions. Depuis 1974, date de la découverte de la coiffe, de nombreux chercheurs se sont attachés à décrire la voie métabolique conduisant à la formation de la coiffe. Les enzymes de coiffage purifiées ont permis des études complémentaires *in vitro* et *in ovo* qui ont apporté des renseignements quant au rôle fonctionnel de cette structure 5'-terminale.

En ce qui concerne la méthylation de l'ARNm, peu de choses sont connues à l'heure actuelle. La compréhension du rôle fonctionnel que joue la méthylation de l'ARN messenger nécessite aussi une approche enzymologique qui vise à caractériser et à isoler les enzymes impliquées dans la méthylation. Ces enzymes purifiées pourront ensuite méthyler *in vitro* des ARNm dépourvus de certains groupements méthyles (ex. : ARNm sous-méthylé extrait d'une souche de levure strictement auxotrophe pour la SAdoMet, donneur universel de groupement méthyle ou encore des ARNm isolés à partir d'organismes dont les messagers sont dépourvus naturellement de certaines méthylations (cfr. tableaux II et III)). L'étude comparative du comportement de ces messagers en milieu acellulaire de traduction nous renseignera sur l'importance des méthylations effectuées *in vitro*. Si des modifications de traduction sont observées, il est possible de préciser ultérieurement à quelle étape de la synthèse protéique elles se situent : initiation, élongation, terminaison. Une approche similaire *in ovo* complètera l'étude du rôle fonctionnel de la méthylation de l'ARNm.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* ne possède sur son ARN messenger qu'une méthylation située au niveau de la guanine de la coiffe. Cet organisme dont la culture est aisée en laboratoire peut donc nous fournir un ARNm possédant plusieurs sites potentiellement méthylables au moyen d'enzymes appropriées. Celles-ci peuvent être isolées à partir de tissus provenant d'eucaryotes supérieurs dont les ARNm portent une coiffe complexe

et des méthylations internes (ex. : cellules HeLa, cellules de foie de rat...).

Le rat est un organisme aisément disponible en laboratoire qui a déjà fait l'objet de nombreuses études biochimiques. Nous choisissons le foie de rat comme matériel biologique qui va nous servir à extraire les méthyltransférases capables de méthyler l'ARNm de levure.

Le but de ce travail est donc de mettre en évidence une méthyltransférase de noyaux de foie de rat, compartiment cellulaire où se trouvent probablement les méthyltransférases d'ARNm car la méthylation est un processus qui a lieu très tôt dans la maturation des messagers, qui puisse méthyler *in vitro* l'ARNm de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans le foie de rat, cinq activités enzymatiques différentes peuvent potentiellement méthyler l'ARNm de la levure. Ce sont les (nucléoside-2'-O-)-méthyltransférases (de coiffe 1 et 2), les deux (adénine-N-6-)-méthyltransférases (de coiffe 1' et de méthylation interne) et peut-être une (cytosine-5-)-méthyltransférase.

Une fois mise en évidence, l'activité enzymatique sera partiellement décrite et la nature du résidu méthylé sur l'ARNm de levure sera précisée.

Il est possible que l'ARNm de levure ne soit pas méthylable par les enzymes de foie de rat. Le rat et la levure sont en effet des organismes qui au niveau évolutif sont séparés par quelques centaines de millions d'années et il se peut que les signaux moléculaires requis pour la réaction de méthylation soient si différents que la méthylation n'est pas possible.

MATERIEL ET METHODES

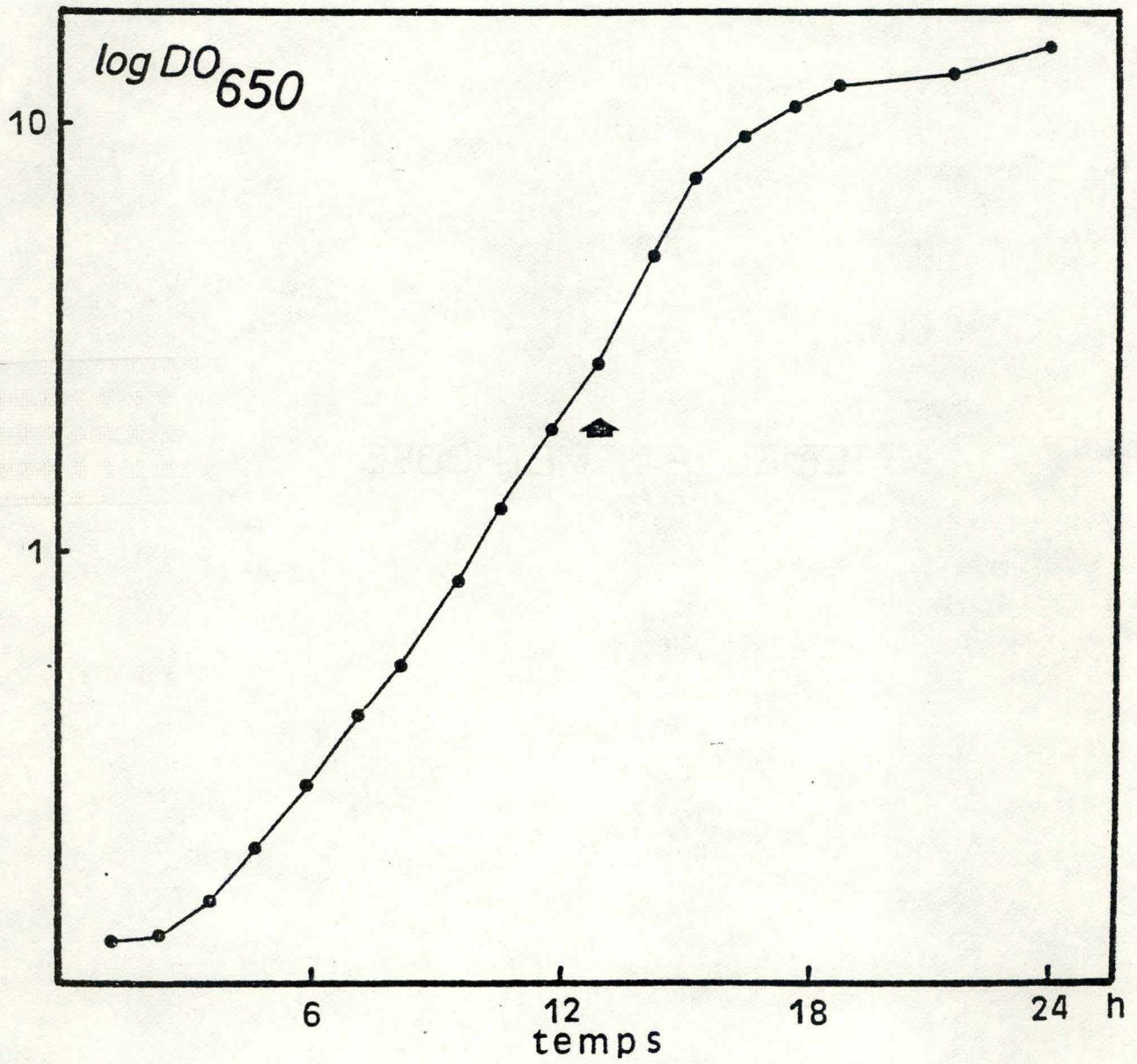


Fig. 22: Courbe de croissance de la souche FL 100 dans le milieu YPD à 30 °C., comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

1. SOUCHE DE LEVURE, MILIEU DE CULTURE ET CROISSANCE.

La souche *Saccharomyces cerevisiae* FL 100 (a) fut généreusement offerte par le Dr. F. Lacroûte du Laboratoire de Génétique Physiologique IBMC du CNRS à Strasbourg. Environ 10^5 cellules/ml sont incubées dans 500 ml de milieu YPD (pH 4,8) à 30 °C sous agitation constante. Le milieu YPD est composé de 1 % Bacto-Yeast Extract (Difco), 2 % peptone de caséine (Merck) et 2 % D(+)-glucose monohydraté (Merck). Le milieu est stérilisé dans une casserole à pression pendant 15 minutes à 120 °C dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau. La croissance de la culture est suivie par la mesure de la densité optique à 650 nm (Fig. 22).

2. EXTRACTION DE L'ARN TOTAL DE LEVURE.

Quand la densité optique de la culture atteint 4 unités de densité optique ($\pm 10^8$ cellules/ml, correspondant au milieu de la phase exponentielle de croissance), la croissance de la culture est arrêtée par refroidissement dans de la glace fondante.

La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 0 °C pendant trois minutes à 6 000 tours/minute dans le rotor HB4 de Sorvall. Le milieu de culture est décanté et les cellules sont lavées deux fois dans 50 ml de tampon TEN, constitué de 10 mM Tris-HCl (pH 9), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Après les deux lavages, les cellules sont resuspendues dans le tampon TEN refroidi à raison de 2,5 ml par gramme de poids frais de levures. Après avoir ajouté 2,5 ml de phénol redistillé et saturé en TEN et 1,5 grammes de billes de verre (diamètre = 0,45 mm) par gramme de levure, la suspension est introduite dans le flacon de broyage B. Braun, Melsungen (50 ml). Les cellules sont broyées dans le Braun Cell Homogenzier (MSK) pendant deux fois 30 secondes à vitesse maximale (8 000 tours/minute). Après le premier

broyage, la suspension est refroidie dans de la glace fondante pendant 30 secondes. La broyat est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 30 000 x g à 0 °C.

La phase supérieure aqueuse contenant les acides ribonucléiques est recueillie en veillant bien à ne pas toucher la phase phénolique. L'ARN total est alors précipité pendant la nuit avec 2,5 vol. d'éthanol et 0,1 vol. d'acétate de sodium 3 M (pH 5,5) à -20 °C. Le précipité est ensuite récolté par centrifugation (20 000 x g, 10 minutes), lavé deux fois à l'éthanol, deux fois à l'éther diéthylique et séché sous vide pendant 15 minutes.

3. PURIFICATION DE L'ARN POLY(A)⁺ DE LEVURE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.

L'ARN total séché est suspendu dans 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) et du KCl est ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,5 M. La suspension est ensuite incubée pendant 5 minutes à 65 °C.

L'ARN suspendu (40 DO_{260nm}/ml) est appliqué sur une colonne (5 x 0,5 cm) d'oligo(dT)-cellulose (Collaborative Research, Type 3), équilibrée avec le tampon TK (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M KCl). La colonne est alors lavée intensément avec le tampon TK. L'ARN poly(A)⁺ est élué avec 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) et recueilli dans une cuvette de spectrophotomètre en quartz préalablement traitée au diéthylpyrocarbonate (Baycovine de Bayer) 1 ‰ pendant 30 minutes de manière à inactiver les RNases.

L'ARN poly(A)⁺ est précipité pendant une nuit à l'éthanol/ acétate de sodium comme décrit plus haut. Le précipité est ensuite récolté par centrifugation à 12 000 x g pendant 15 minutes dans des tubes stériles de type Eppendorff. L'ARN poly(A)⁺ est lavé deux fois à l'éthanol, deux fois à l'éther diéthylique et séché sous vide pendant 15 minutes. Il est ensuite

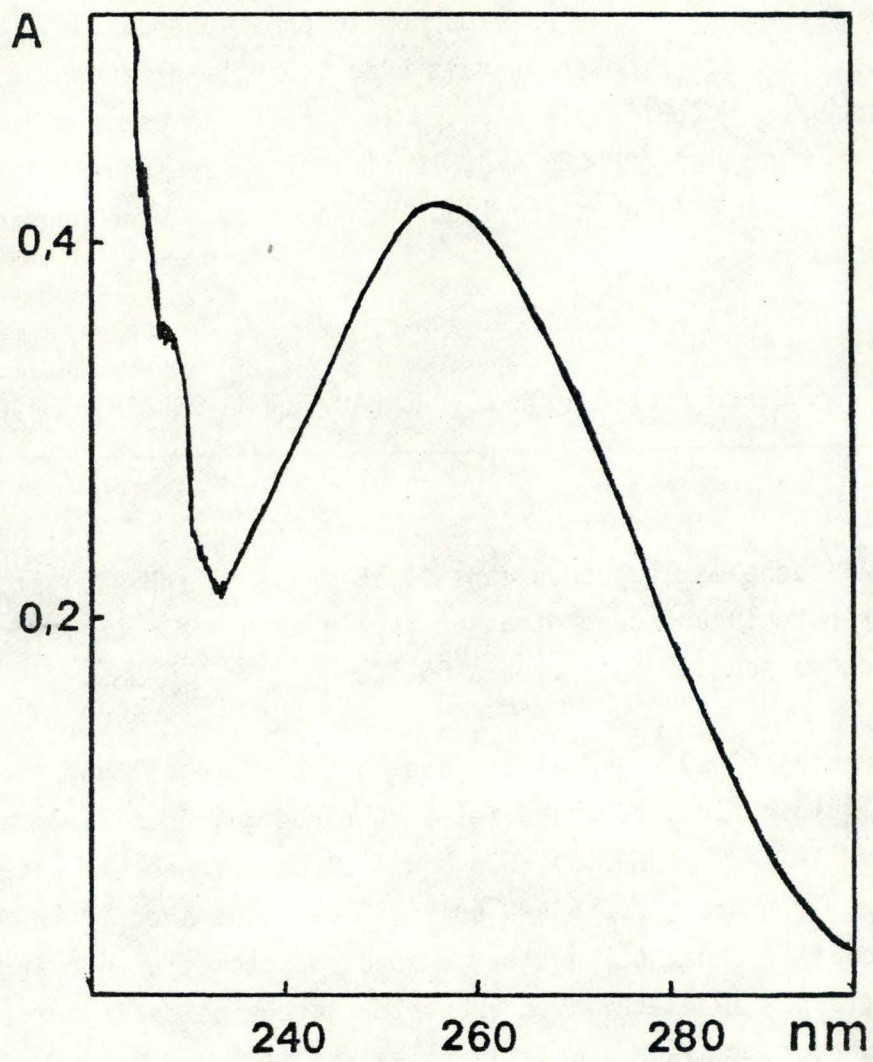


Fig. 24: Absorbance dans l'ultraviolet de l'ARN poly(A⁺).

dissous dans du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,8) de manière à obtenir une concentration de 50 µg d'ARN par 50 µl. Par la suite l'ARN poly(A)⁺ est reparti en fractions aliquots de 10 µl et conservé à -20 °C jusqu'à usage. L'absence de protéines contaminantes dans l'ARN poly(A)⁺ est vérifiée par un scanning U.V. dont un profil est rapporté à la figure 24. La présence de protéines déplacerait le pic d'absorbance vers 280 nm.

4. PREPARATION DE NOYAUX DE CELLULES DE FOIE DE RAT.

Pour préparer les noyaux de foie de rat, nous avons utilisé, sauf indication contraire, la méthode de Sadowski et Steiner modifiée (131,136). Un rat ♀ Wistar âgé de 5 à 8 mois est maintenu à jeûn durant 12 heures dans une cage isolée et a libre accès à un biberon d'eau douce. L'animal est tué par rupture des vertèbres cervicales. Aussitôt, le foie est prélevé (les instruments de dissection ont été préalablement autoclavés), et est déposé après pesage dans un bécher de 25 ml contenant 15 ml de sucrose 0,25 M dans de l'eau distillée.

Toutes les manipulations se font à la température du bain de glace fondante avec les précautions habituelles pour éviter l'action ou la contamination des RNases (vaisselle "baycovinée" ..). Le foie entier est ensuite passé au "presse ail" ("tissue masher") et le broyat est filtré sur une couche de gaze (130). Quatre volumes de solution A (0,25 M saccharose, 0,25 mM spermidine et 5 mM MgSO₄) sont ajoutés au broyat filtré. L'homogénéisation se déroule dans un Potter-Elvehjem avec un piston de téflon ("clearance" du piston = 0,009 pouce) par 10 va-et-vient à 1800 tours/min.

L'homogénat est ensuite filtré sur quatre couches de gaze stérile, puis centrifugé 10 minutes à 3 000 tours par minute dans un rotor à godets oscillants HB4 de Sorvall (131) dans une centrifugeuse RC5 ou RC2 B de Sorvall réfrigérée à 5 °C. Le surnageant est prélevé et recentrifugé de la même manière; le culot recueilli est ajouté au culot précédent tandis

que le surnageant pourra constituer si nécessaire la fraction cytoplasmique. Les culots sont resuspendus à la baguette de verre stérile dans trois volumes de solution TX (0,25 M saccharose, 0,25 mM spermidine, 5 mM $MgSO_4$, 0,5 % (v/v) Triton X-100) et centrifugés 10 minutes à 3 000 tours par minute dans le rotor HB4 de Sorvall. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans quatre volumes de solution TX avec une baguette de verre stérile et est déposé sur 80 ml de solution B (0,88 M saccharose, 15 mM $MgAc_2$, 0,25 mM spermidine) contenus dans quatre Corex de 30 ml contenant chacun 20 ml de solution B.

Les quatre culots obtenus après centrifugation à 8 000 tours par minute pendant 8 minutes dans le rotor HB4 de Sorvall, sont resuspendus à la baguette de verre stérile dans une solution de 2,2 M saccharose et 0,25 mM spermidine. La suspension est homogénéisée dans un Potter-Elvehjem par cinquante-et-un d'un piston de téflon tournant à 1800 tours par minute. La suspension homogénéisée est transférée dans quatre tubes de polyallomère ensuite centrifugée à 40 000 tours par minute dans le rotor SW40 d'une ultracentrifugeuse Beckman L 5.75 à 0 °C pendant 20 minutes. Les culots qui sont resuspendus dans 2,5 ml de solution C (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM $MgAc_2$ et 20 % glycérol) constituant la fraction nucléaire "purifiée". L'examen d'un aliquot de cette suspension au microscope à contraste de phase permet de contrôler le degré de contamination par les débris cellulaires et de juger de l'aspect général des noyaux isolés (136).

5. EXTRACTION DES ENZYMES DE METHYLATION.

La suspension nucléaire est soumise à une sonication discontinue jusqu'à ce que tous les noyaux soient brisés. La sonication est suivie par examen au microscope photonique à contraste de phase. Une centrifugation du "sonicat" de 5 minutes à 3 000 tours par minute dans le rotor HB4 de Sorvall permet la sédimentation des débris nucléaires qui

perturberaient les chromatographies ultérieures. Cette fraction finale est appelée "nucléaire centrifugée".

5.1. Chromatographie de filtration sur Séphadex G-25.

3 ml de fraction "nucléaire centrifugée" sont déposés sur une colonne de Séphadex G-25 (medium, Pharmacia) dont la hauteur est de 25 cm et le diamètre de 2 cm. La colonne est équilibrée dans du tampon TEDG 50 mM NaCl (50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT à ajouter juste avant usage du tampon, 40 % d'éthylène glycol et 0,1 % Triton X-100). L'élution se fait avec un débit de 0,5 ml par minute et chaque fraction éluée représente un volume de 2 ml.

5.2. Chromatographie échangeuse d'ions.

3 ml de fraction "nucléaire centrifugée", pouvant être auparavant filtrés sur Séphadex G-25, sont déposés sur une colonne de DEAE-cellulose (30 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre), équilibrée dans le tampon TEDG 50 mM NaCl. Le débit de la colonne est de 0,5 ml par minute, chaque fraction récoltée représente un volume de 1,5 ml. L'élution de la colonne s'effectue en augmentant la concentration en NaCl du tampon TEDG qui passe soit directement de 50 mM NaCl à 300 mM NaCl ou alors qui augmente de manière discontinue en passant par les valeurs 100, 200 et enfin 300 mM NaCl.

6. DOSAGE DES PROTEINES.

Pour le dosage des protéines, la méthode de M. Bradford (132) a été adoptée. 100 mg de Coomassie Blue G-250 (Sigma) sont dissous pendant une

heure sous agitation constante dans 50 ml d'éthanol à 95 %. A cette solution sont ajoutés 100 ml d'acide phosphorique à 85 % et de l'eau distillée jusqu'à un volume final d'un litre. La solution est ensuite filtrée à travers un filtre en papier et stockée à température ambiante pendant deux semaines maximum.

Dans un tube à essai, 40 μ l de fraction protéique sont introduits, 2 ml du mélange de réaction filtré sont alors ajoutés et l'ensemble est mélangé. Après cinq minutes, l'absorbance est mesurée à 595 nm. Une absorbance de 0,1 à cette longueur d'onde correspond à 20 μ g de protéines et une absorbance de 0,85 correspond à 140 μ g de protéines environ (la référence est la sérum albumine bovine, BSA).

7. TEST DE METHYLATION DE L'ARN POLY(A)⁺ *in vitro*.

Le mélange standard de réaction (50 μ l) est réalisé dans un tube Eppendorff et contient 30 μ l de fraction nucléaire des cellules de foie de rat, différentes concentrations en ARN poly(A)⁺, 50 mM Tris-HCl (pH 9), 5 mM MgAc₂, 1,5 mM EDTA, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 2 mM DTT et 1 μ Ci S-adénosyl-L-méthionine (méthyl-³H, Amersham, TRK 236, 15 Ci/mmmole). Avant incubation, le tube est mélangé vigoureusement à la main et centrifugé à vitesse maximale pendant 3 secondes à l'aide d'une centrifugeuse de table (Beckman Microfuge). L'incubation se fait pendant une heure dans un bain marie à 38 °C. Après l'incubation, 20 μ l du mélange réactionnel sont déposés très lentement sur un filtre de DEAE-cellulose (DE-81, 2,3 cm Whatman) attaché à l'aide d'une épingle sur une plaque de polystyrène. Après environ 10 minutes, le filtre est placé dans une passoire métallique et immergé dans 25 mM formate d'ammonium (pH 8). La solution est mélangée doucement pendant 15 minutes et puis décantée. Le lavage est répété 4 fois et est ensuite suivi d'un lavage bref (30 secondes) à l'eau distillée et à l'éthanol dénaturé (5 minutes).

Le filtre est alors séché en chambre chaude (30 °C) pendant 20 min. Après séchage, l'aiguille est enlevée et le filtre est placé dans une fiole de scintillation. Le matériel radioactif est élué avec 0,5 ml LiCl M et la radioactivité est comptée dans 10 ml de scintillant (Aqua Luma) dans un compteur Beckman LS-3150 T.

8. TEST DE METHYLATION ENDOGENE DE GERME DE BLE.

Un extrait de germes de blé commercial (Sigma, W0125) est préparé selon les conditions mises au point par Keith (133). Dans deux séries de cinq tubes stériles, nous introduisons 22 µl de cette fraction protéique de germes de blé et 1 µCi de S-adénosyl-L--méthionine (méthyl-³H, Amersham TRK 236, 15 Ci/m mole). Dans la première série, nous ajoutons des volumes croissants de fraction cytoplasmique de cellules de foie de rat, de l'eau distillée est ensuite ajoutée pour obtenir un volume final de 50 µl. Dans les cinq tubes à essai restants, nous introduisons les mêmes volumes de fraction nucléaire de cellules de foie de rat, le volume final est toujours de 50 µl. Les tubes sont incubés à 25 °C pendant 60 minutes durant lesquelles une protéine d'un poids moléculaire de plus ou moins 30 000 daltons est méthylée, probablement l'histone H1 (52).

Après l'incubation de 60 minutes dans le test de méthylation *in vitro*, 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 40 % est ajouté pour arrêter toute réaction. Après précipitation à 4 °C pendant 30 minutes, le matériel acido-insoluble est recueilli sur filtre en fibres de verre (Whatman, GF/C 2,4 cm) préalablement trempé dans du TCA 10 %. Le filtre est lavé par trois fois avec 10 ml TCA 10 % et une fois avec 10 ml éthanol dénaturé. Après séchage, le filtre est placé dans une fiole de scintillation et la radioactivité est comptée dans 10 ml de scintillant (Aqua Luma) dans un compteur Beckman LS-3150 T.

9. ANALYSE DE(S) RESIDU(S) METHYLE(S).

9.1. Analyse par chromatographie échangeuse d'ions.

Le mélange réactionnel standard est augmenté 5 fois (volume total 250 μ l). Après une heure d'incubation à 38 °C, l'ARN est extrait avec 250 μ l de tampon TEN (pH 9) et 500 μ l de phénol. Après mélange au vortex et centrifugation à la microfuge Beckman pendant 5 minutes, la phase supérieure est prélevée et mise dans un tube à essai. 500 μ l de TEN sont ajoutés à nouveau sur la phase phénolique restante, puis extraits comme décrit plus haut et ajoutés dans le tube à essai.

250 μ g d'ARN "carrier" sont ajoutés et l'ARN est ensuite précipité à l'alcool pendant une nuit à -20 °C dans 0,1 vol. de NaAc 3 M (pH 5,5) et 2,5 vol. d'éthanol.

L'ARN est ensuite récolté par centrifugation comme décrit plus haut. Le culot d'ARN est ensuite dissous dans 100 μ l d'eau distillée auxquels on ajoute 10 μ l NaOH M. Ce traitement alcalin qui dure 15 heures à 38 °C assure l'hydrolyse de l'ARN selon le mécanisme discuté dans le chapitre introductif. Cet hydrolysât alcalin de l'ARN est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose (20 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre) équilibrée dans un tampon TUN (50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 7 M urée et 50 mM NaCl). Environ 350 μ g d'acide polyadénylique lyophilisé (Boehringer, Mannheim) est soumis à une hydrolyse partielle pendant deux heures dans les mêmes conditions que celles adoptées pour l'hydrolyse de l'ARN poly(A)⁺. Cet acide polyadénylique partiellement hydrolysé va servir de marqueur lors de l'élution de la colonne DEAE-cellulose avec 140 ml d'un gradient continu en NaCl dans le tampon TUN qui s'étale entre 50 mM et 300 mM après lavage avec 20 ml de tampon TUN contenant 50 mM NaCl. Le débit de l'élution est réglé à 0,5 ml par minute, chaque fraction représente un volume de 1,5 ml.

9.2. Analyse par chromatographie descendante sur papier.

Le mélange réactionnel standard augmenté 5 fois est hydrolysé par traitement alcalin comme décrit ci-avant. L'hydrolysate alcalin est ensuite passé sur une colonne de DEAE-cellulose (4 x 0,5 cm), l'élution est réalisée avec 100 mM LiCl. Le matériel élué contenu dans 1 ml est soumis à une hydrolyse à la nucléase P1 (20 unités, ribonucléase de *Penicillium citrinum*, P-L Biochemicals) dans 10 mM NaAc (pH 6) (volume total = 1,1 ml).

600 µl sont déposés par volumes de 5 µl à l'extrémité d'une feuille de papier Whatman N° 1 (6 x 40 cm). Une chromatographie descendante est effectuée dans une solution d'acide isobutyrique/NH₄OH (0,5 M) 10/6 (v/v) pendant une nuit. Après 10 heures de séchage sous la hotte, le papier est découpé en 40 morceaux de 1 x 2 cm et compté dans 25 ml de scintillant (Aqua Luma).

Les 410 µl de matériel restant sont analysés par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose en présence d'urée comme décrit ci-avant dans le but de s'assurer que l'hydrolyse est complète.

RESULTATS

1. MISE EN EVIDENCE D'UN INHIBITEUR NUCLEAIRE DE METHYLATION.

Notre but est de mettre en évidence une activité de méthylation d'ARN messager dans les noyaux de foie de rat autre que la (guanine-7-)-méthyltransférase. C'est pour cette raison que nous utilisons comme substrat l'ARNm de *Saccharomyces cerevisiae* qui porte une coiffe de type zéro.

Le test de méthylation *in vitro* décrit dans "Matériel et Méthodes" ne nous permet pas dans un premier temps de détecter une telle activité. Plusieurs hypothèses peuvent être postulées pour expliquer le manque de résultat positif : nous pouvons invoquer la présence d'un inhibiteur de méthylation, la labilité assez importante des méthyltransférases d'ARNm de foie de rat, la dégradation du substrat lors de sa préparation et/ou de son incubation, les conditions du test *in vitro* qui ne permettent pas de détecter l'activité recherchée.

Nous décidons de tester en premier lieu l'hypothèse selon laquelle l'ARN poly(A)⁺ peut être dégradé lors de sa préparation. Dans un système acellulaire de traduction dérivant de levures et nécessitant de l'ARNm correctement coiffé pour fonctionner, nous injectons 4,2 µg d'ARN poly(A)⁺ qui sert de matrice informationnelle pour une synthèse protéique *in vitro* (137). L'incorporation significative de leucine tritiée est une observation expérimentale qui plaide en faveur d'une bonne intégrité structurale et fonctionnelle de l'ARN poly(A)⁺ utilisé dans le test de méthylation *in vitro* (Fig. 24).

A partir du moment où nous considérons que ce substrat est méthylable par les enzymes extraites de noyaux de foie de rat, il faut avancer une autre hypothèse pour expliquer l'absence de méthylation *in vitro*. Nous pensons à la présence d'un éventuel inhibiteur de méthylation. Cette hypothèse est suggérée par une observation faite par Loch *et al.* (84)

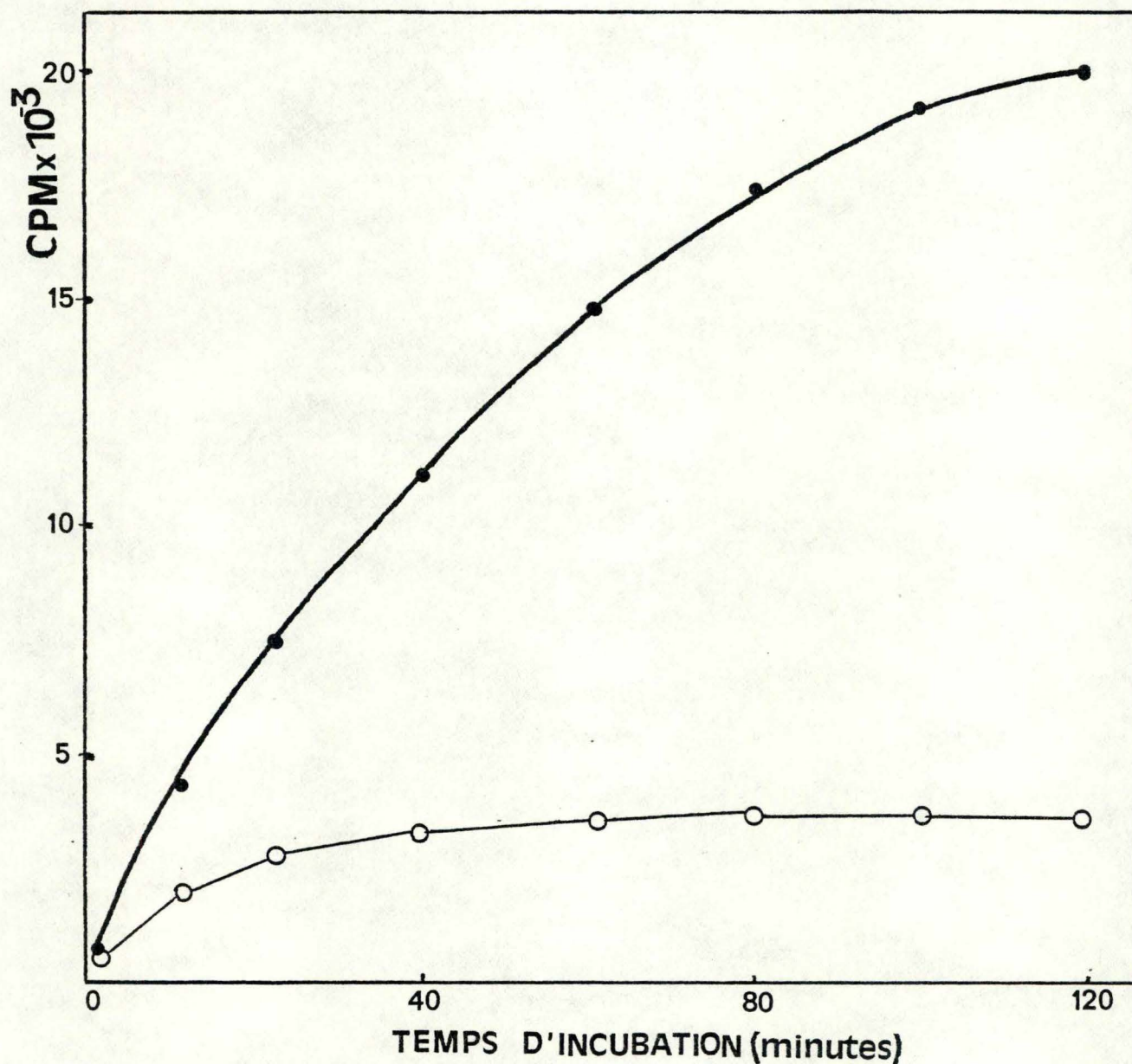


Fig. 24 : Cinétique de traduction de l'ARN poly(A)⁺ dans un lysat de levure préparé suivant la méthode de Moldave *et al.* (137). La traduction *in vitro*, réalisée par Madame R.M. Wilmet-Génicot, se déroule dans un volume de 100 µl contenant 20 µCi de leucine tritiée (Amersham, 158 Ci/mole). La courbe (●—●) représente la cinétique de traduction de 4,2 µg d'ARN poly(A)⁺, le blanc correspondant (sans ARN poly(A)⁺) est représenté par la courbe (○—○).

qui ont mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* un inhibiteur général de méthylation, qui est tout à fait non spécifique. Dans ce cas, l'inhibiteur est une petite molécule qui peut être éliminée par une filtration

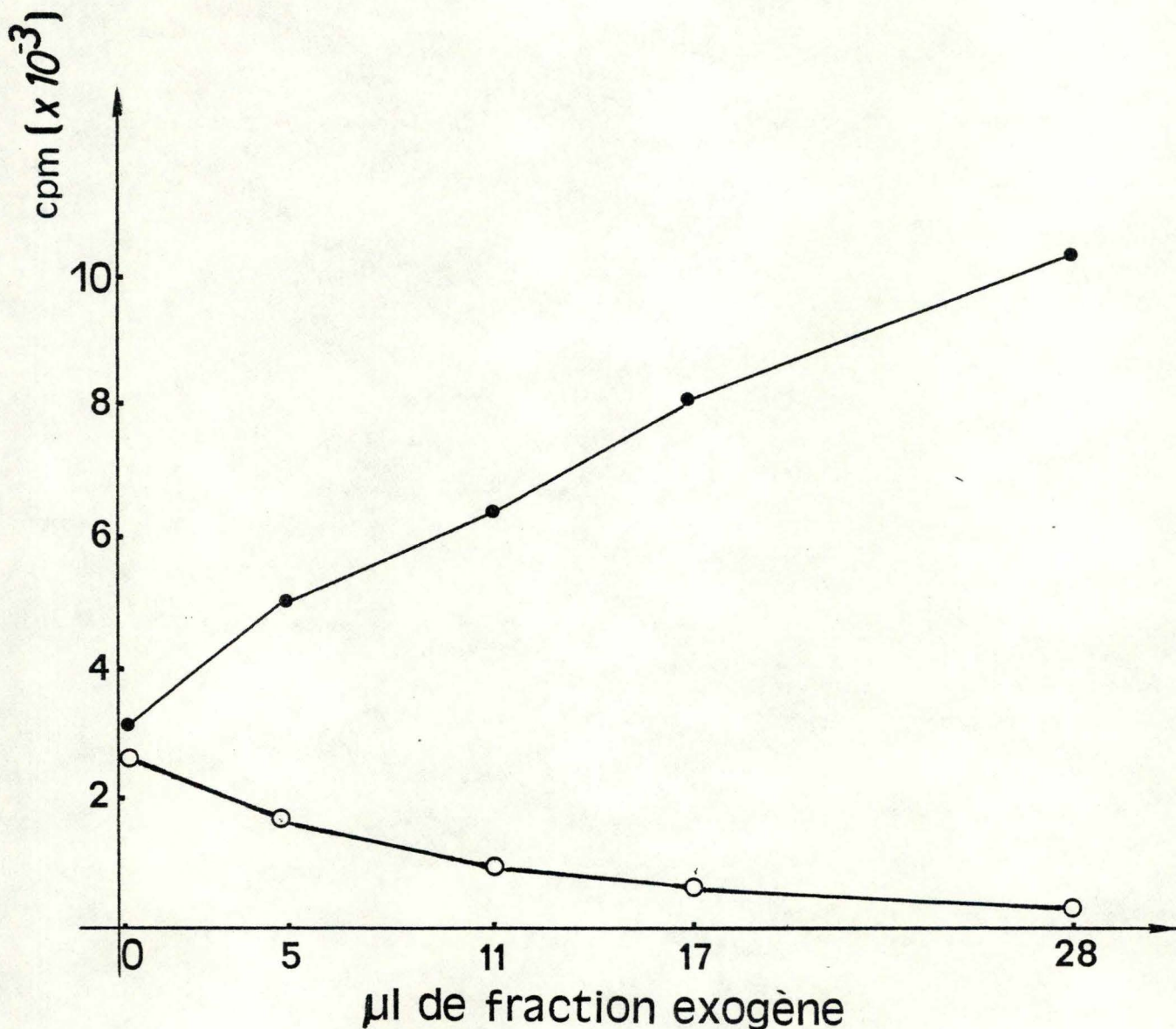


Fig. 25 : Evolution de la méthylation endogène dans une fraction protéique de germes de blé en fonction des volumes croissants en fractions exogènes de foie de rat (○—○: fraction nucléaire, ●—●: fraction cytoplasmique). Les produits de la réaction sont récupérés et la radioactivité incorporée est mesurée comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

sur Séphadex G-25. Pour tester cette hypothèse, nous allons étudier la méthylation endogène dans une fraction protéique d'embryons de germes de blé. La figure 25 montre l'évolution de la radioactivité incorporée en fonction des volumes croissants en fractions exogènes (fraction cytoplasmique ou nucléaire de cellules de foie de rat).

Nous observons que la radioactivité diminue en fonction de l'augmentation du volume de fraction nucléaire introduit dans le mélange réactionnel. Par contre, l'augmentation du volume de fraction cytoplasmique dans le mélange réactionnel s'accompagne d'une accentuation de l'incorporation de groupements méthyles tritiés. Ceci montre sans équivoque qu'il existe une méthylation endogène dans le cytoplasme des cellules de foie de rat. La diminution de la radioactivité accompagnant l'introduction de volumes croissants de fraction nucléaire peut s'expliquer par la présence d'un inhibiteur dans cette fraction. Pour savoir si cet inhibiteur est aussi actif dans la fraction cytoplasmique de foie de rat, nous répétons intégralement l'expérience en remplaçant la fraction protéique de germes de blé par une fraction de même volume de cytoplasme de cellules de foie de rat qui ne semble pas contenir l'inhibiteur. L'incubation va se faire à deux températures différentes 25 °C et 38 °C, cette dernière étant la température physiologique du rat.

La figure 26 montre clairement que l'inhibiteur nucléaire agit aussi sur la méthylation endogène du cytoplasme de cellules de foie de rat. Cette expérience nous apporte aussi une information relative à l'influence de la température sur la méthylation endogène qui sextuple lorsque la température passe de 25 °C à 38 °C.

Une filtration sur Séphadex G-25 de la fraction nucléaire peut nous indiquer si l'inhibiteur est une petite molécule ou une grosse. La figure 27 montre le profil d'éluion de 3 ml de fraction nucléaire de cellules de foie de rat filtrés sur une colonne de Séphadex G-25. Les fractions 20 à 23 sont réunies et forment un volume de 3 ml qui est réparti en fractions aliquots de 300 µl dans des tubes stériles et

conservé à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ce sont ces fractions qui serviront dans les expériences ultérieures.

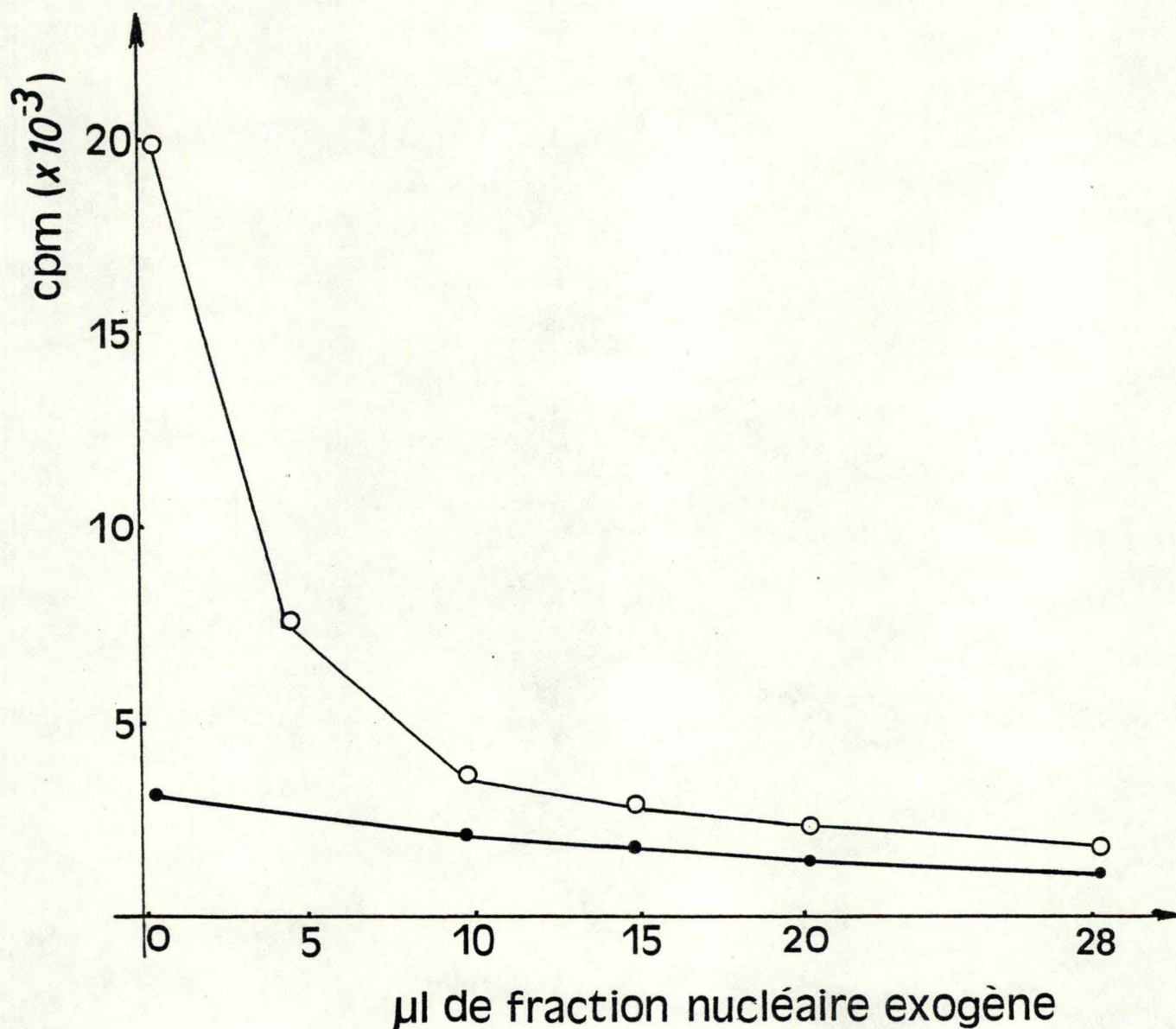


Fig. 25 : Inhibition de la méthylation endogène du cytoplasme de cellules de foie de rat par la fraction nucléaire de ces cellules. (○-○ : réaction *in vitro* effectuée à $38\text{ }^{\circ}\text{C}$, ●-● : réaction *in vitro* effectuée à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.)

La fraction nucléaire filtrée sur Séphadex G-25 est utilisée en comparaison avec une même fraction n'ayant pas subi cette filtration, dans le test de méthylation endogène de cytoplasme de foie de rat qui nous permet de mettre en évidence l'inhibiteur nucléaire.

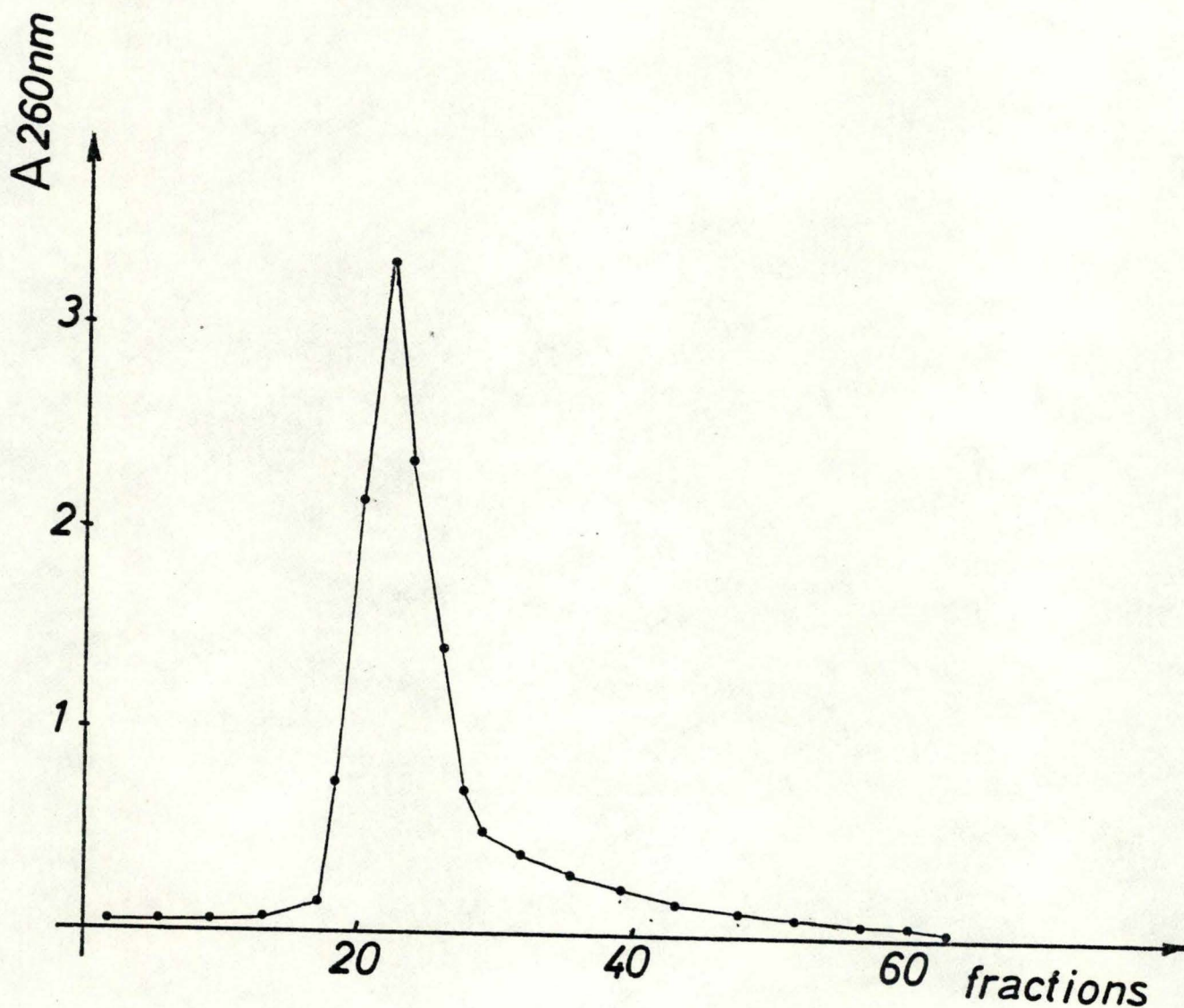


Fig. 27 : Profil d'élution de 3 ml de fraction nucléaire de foie de rat sur Séphadex G-25. Les fractions 20 à 23 sont retenues et conservées à -70°C par aliquots de $300\ \mu\text{l}$ jusqu'à usage ultérieur.

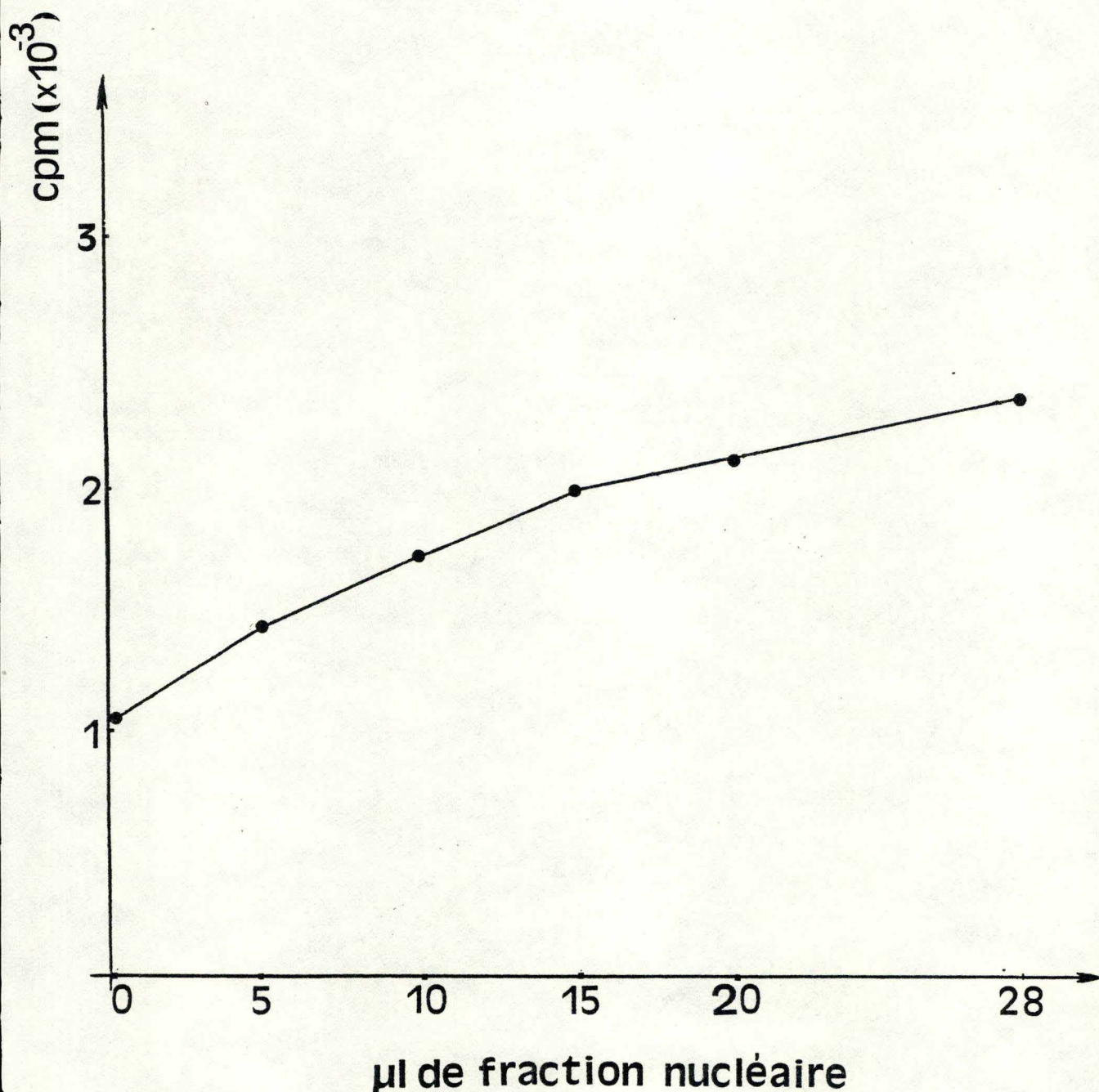


Fig. 28a : Evolution de la méthylation endogène de cytoplasme de foie de rat en fonction de l'augmentation du volume de fraction nucléaire filtrée sur Séphadex G-25 ajouté dans le test de méthylation *in vitro*. L'inhibition de la méthylation cytoplasmique endogène observée sur la figure 28b disparaît quand la fraction nucléaire est filtrée sur Séphadex G-25. L'accroissement de l'incorporation de groupements méthyles tritiés porte même à penser que la fraction nucléaire est aussi le siège d'une méthylation endogène.

Les figures 28a et 28b montrent clairement que la fraction nucléaire filtrée sur Séphadex G-25 ne présente plus l'inhibition de la méthylation endogène alors qu'une fraction analogue non filtrée manifeste toujours cette inhibition. La figure 28a correspondant à la fraction nucléaire

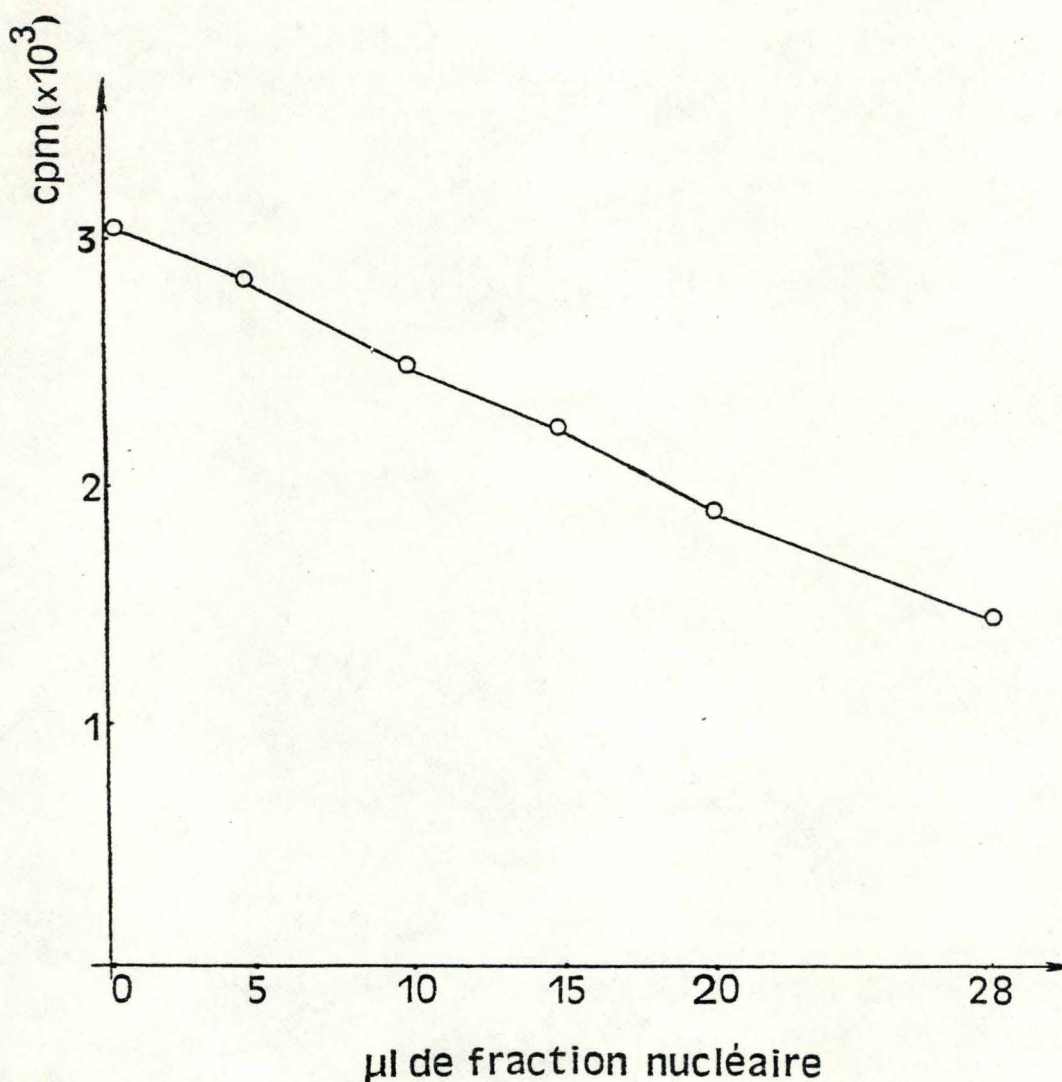


Fig. 28b : Evolution de la méthylation endogène de cytoplasme de foie de rat en fonction de l'augmentation du volume de fraction nucléaire ajouté dans le test de méthylation *in vitro*.

filtrée montre même une augmentation de l'incorporation de méthyles tritiés en fonction de l'augmentation du volume de fraction nucléaire ajouté dans le test *in vitro*, ceci signifierait qu'il existe aussi une méthylation endogène dans la fraction nucléaire. Cette méthylation se révèle lorsque l'inhibiteur de méthylation est enlevé.

2. POSSIBILITE D'UN EFFET INHIBITEUR DES IONS Ca^{++} SUR LES METHYLTRANSFERASES.

La fraction nucléaire filtrée sur Séphadex G-25 va nous servir de source enzymatique dans le test de méthylation *in vitro* de l'ARN poly(A)⁺ de *Saccharomyces cerevisiae*. Malgré l'élimination de l'inhibiteur, aucune incorporation significative de méthyles tritiés dans l'ARN poly(A)⁺ n'est observée dans différents tests de méthylation *in vitro*.

C. Locht (52) a montré un effet inhibiteur puissant de l'ion Ca^{++} sur l'activité de l'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase de *Saccharomyces cerevisiae*. A une concentration de 1 mM Ca^{++} , l'activité enzymatique est presque nulle.

Dans un premier temps, nous suivions intégralement la méthode de Sadowski et Steiner (131) pour isoler les noyaux de cellules de foie de rat. Or les solutions de saccharose utilisées dans cette méthode contiennent toutes 1,5 mM CaCl_2 . Roeder et Rutter (134) ont remplacé le Ca^{++} par de la spermidine dans les solutions de saccharose, car le Ca^{++} semble en effet inhiber beaucoup d'enzymes nucléaires dont les ARN polymérase I et II. Nous décidons donc d'adapter la méthode de Sadowski et Steiner en ajoutant de la spermidine et en retirant le Ca^{++} dans les solutions de saccharose.

C'est en utilisant une fraction nucléaire préparée sans Ca^{++} et filtrée sur Séphadex G-25 que nous mettons pour la première fois en

évidence une méthylation significative dans le test de méthylation *in vitro* contenant 4 μg d'ARN poly(A)⁺ de levure. La figure 29 montre la cinétique d'incorporation de groupes méthyles sur l'ARN poly(A)⁺. Après une heure d'incubation à 38 °C, on peut considérer la réaction terminée.

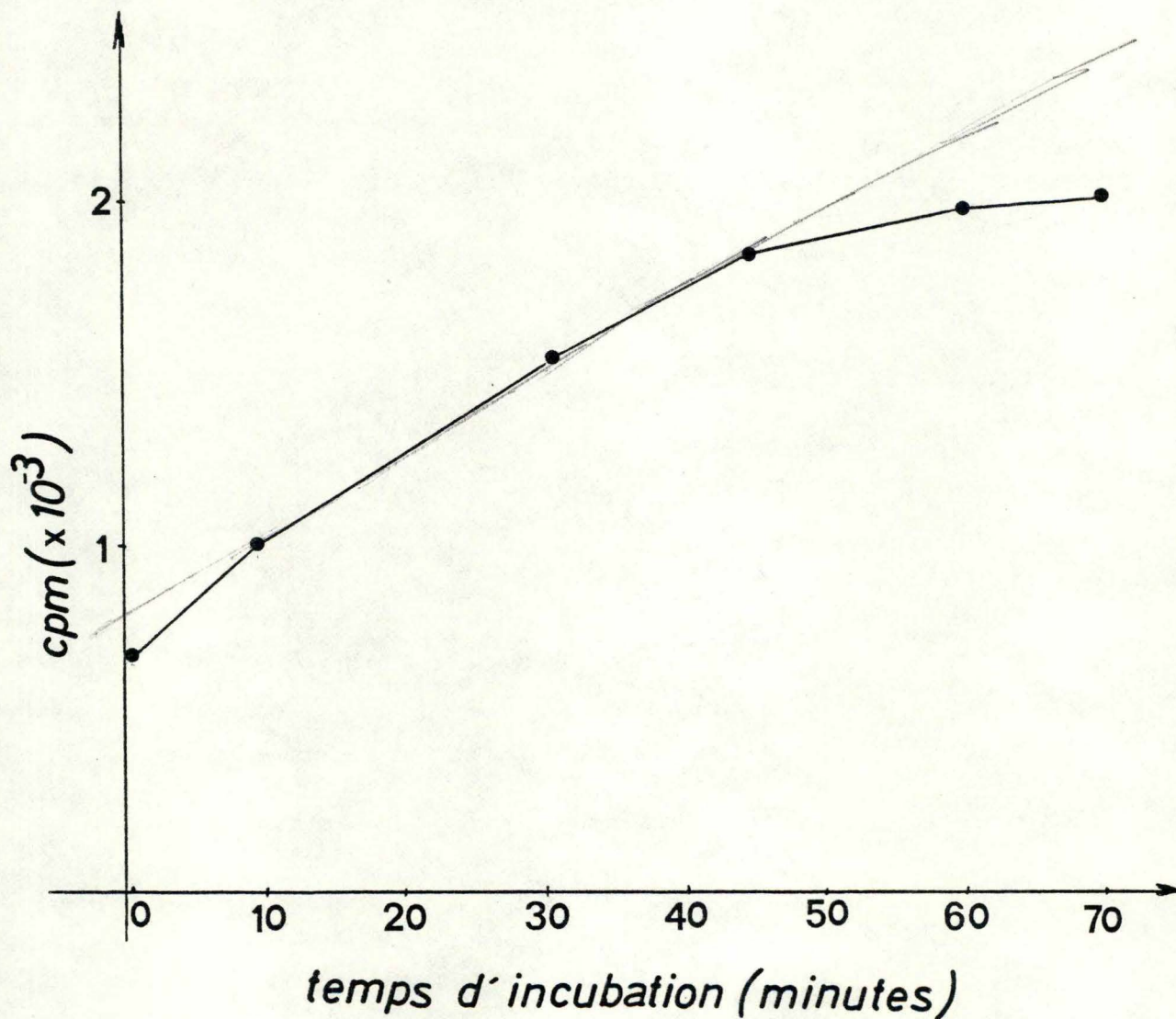


Fig. 29 : Cinétique d'incorporation de méthyles tritiés dans le test de méthylation *in vitro* contenant 4 μg d'ARN poly(A)⁺ de levure.

L'incorporation de radioactivité est linéaire pendant les 40 premières minutes ensuite la courbe s'infléchit assez rapidement pour atteindre un plateau.

A ce stade de l'investigation, on peut penser que le Ca^{++} a un effet inhibiteur sur les méthyltransférases d'ARN poly(A)⁺. Nous ne pouvons cependant pas l'affirmer, l'observation réalisée montre seulement que la nouvelle méthode d'extraction des noyaux permet de détecter une activité de méthylation.

L'EGTA est un agent chélatant très connu du calcium et si l'action de cet ion est inhibitrice, on peut dès lors espérer qu'une fraction nucléaire préparée avec des solutions contenant 1,5 mM CaCl_2 peut quand même servir de source enzymatique si elle est incubée avec l'ARN poly(A)⁺ en présence d'EGTA. Nous avons essayé de méthyler l'ARN poly(A)⁺ en présence d'EGTA avec une fraction enzymatique provenant de noyaux préparés selon la méthode de Sadowski et Steiner non modifiée.

Ces tentatives restent cependant vaines, même pour des concentrations allant jusqu'à 100 mM EGTA qui est neutralisé à pH 7,8 avec du KOH 0,1 M. L'éventuelle inhibition au Ca^{++} sur les méthyltransférases d'ARN poly(A)⁺ semble être irréversible du moins avec l'EGTA.

3. ISOLEMENT DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-25

ET DEAE-CELLULOSE.

Dans le but d'obtenir dans le test de méthylation *in vitro* une incorporation plus importante de méthyles tritiés sur l'ARN poly(A)⁺, nous décidons d'isoler plus complètement l'activité enzymatique. Pour ce faire, nous regroupons les fractions issues de la chromatographie Séphadex G-25

qui présentent une absorbance supérieure à 1 unité d'absorbance à 260 nm (Fig. 27), ce qui représente un volume d'échantillon de plus ou moins 4 ml. Cet échantillon est ensuite déposé sur une colonne de DEAE-cellulose.

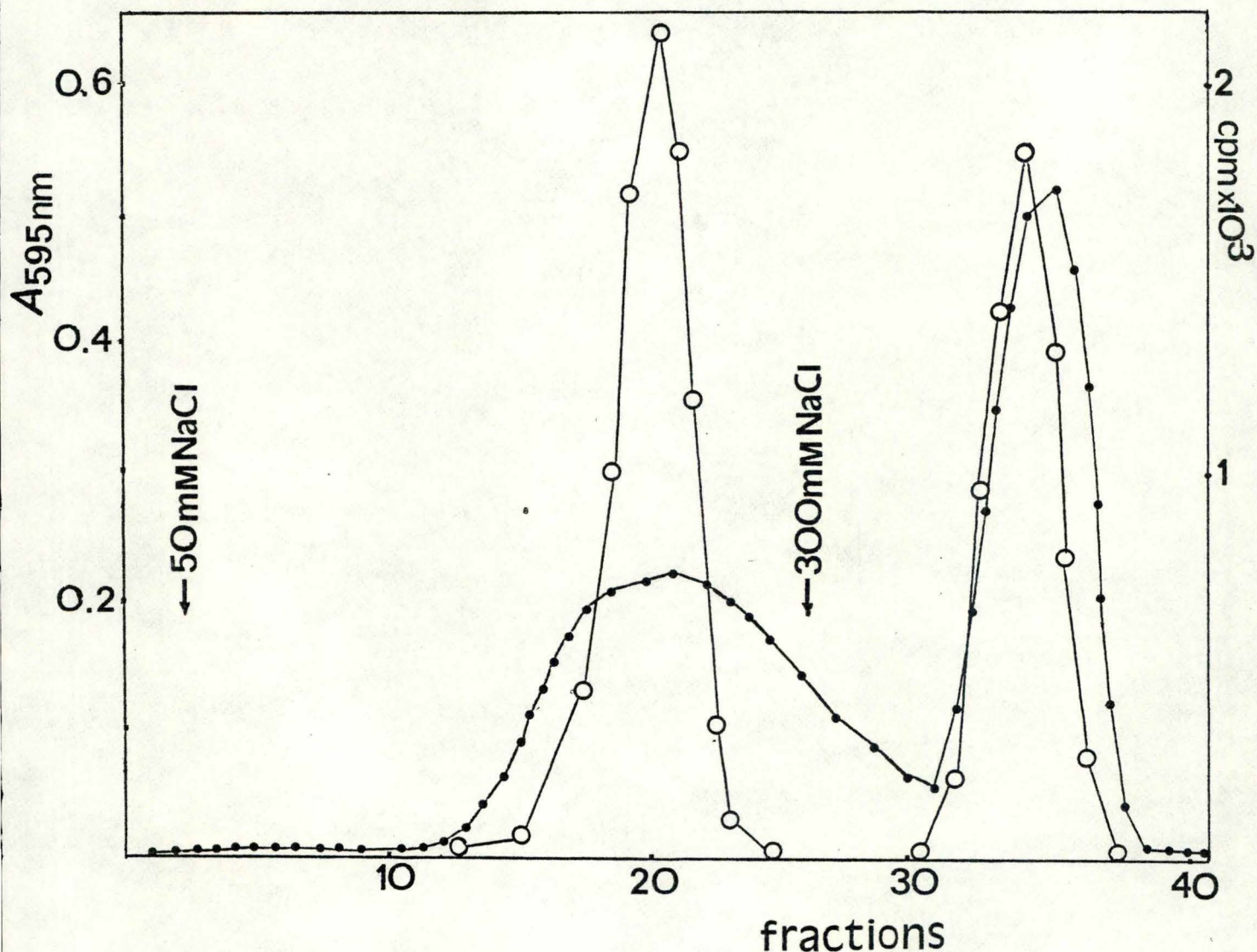


Fig. 30 : Chromatographie sur DEAE-cellulose des fractions issues de la filtration sur Séphadex G-25 qui présentent une absorbance supérieure à 1 unité d'absorbance. Les concentration en protéines (●—●) et de l'activité enzymatique (○—○) sont mesurées comme décrit dans "Matériel et Méthodes". L'éluion est réalisée avec le tampon TEDG contenant 50 mM et 300 mM NaCl comme indiqué par les flèches.

La figure 30 montre le profil d'élution de la chromatographie DEAE-cellulose dont l'élution est réalisée par un gradient discontinu en NaCl qui passe de 50 à 300 mM. L'élution révèle deux activités de méthylation qui éluent respectivement à 50 et 300 mM NaCl. Ces deux activités enzymatiques observées ne se distinguent pas seulement par la force ionique à laquelle elles éluent mais aussi par leur stabilité et leur pH optimum (Fig.31).

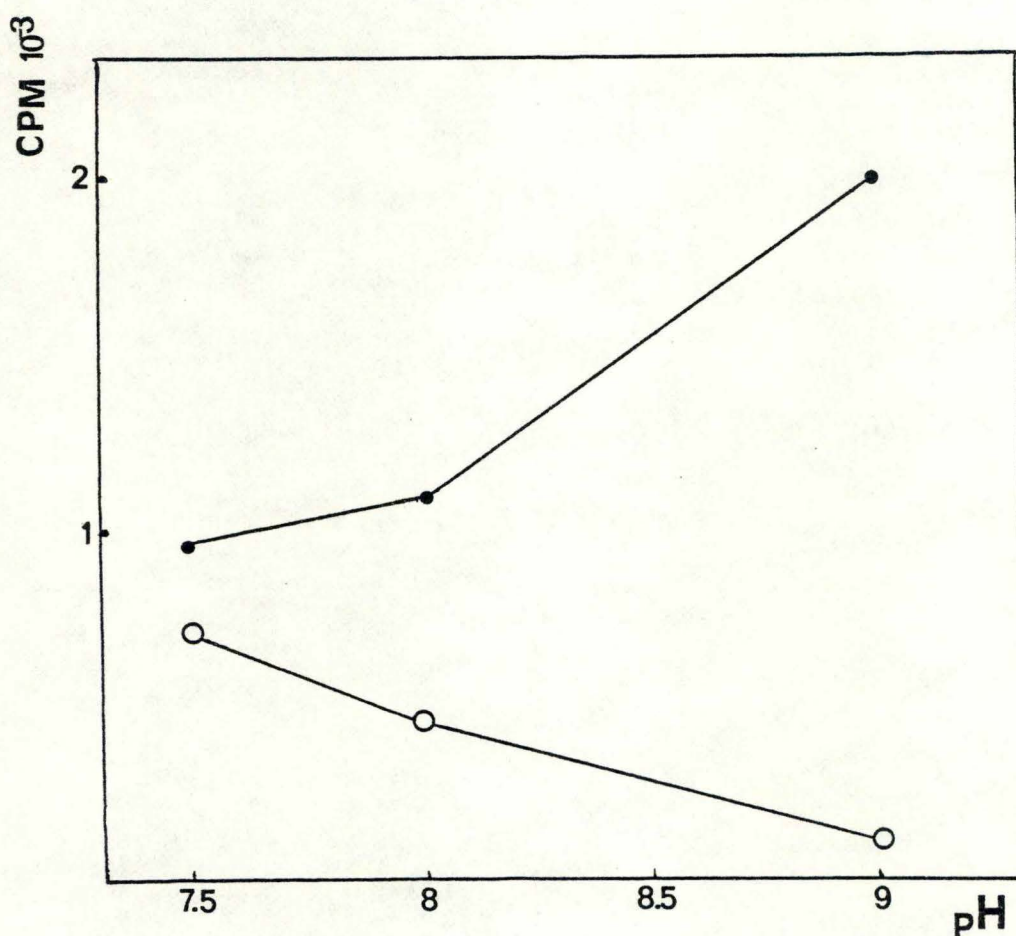


Fig. 31 : Variation de l'activité enzymatique en fonction du pH. La courbe (●—●) représente l'activité élue à 300 mM NaCl et la courbe (○—○) celle élue à 50 mM NaCl.

L'activité de méthylation éluant à 50 mM NaCl présente un pH optimum plus acide que celle éluant à 300 mM NaCl.

D'autre part, l'enzyme éluant à 50 mM est beaucoup plus labile que l'enzyme éluant à 300 mM NaCl. Cette dernière garde son activité pendant au moins une semaine de conservation à -70°C alors que la première perd toute activité après trois jours de conservation dans les mêmes conditions. Vu cette instabilité, nous décidons de consacrer tous nos efforts à la caractérisation de l'activité qui élue à 300 mM NaCl.

Dans le souci de réduire les manipulations lors de la préparation de la fraction enzymatique, nous décidons de ne plus passer par la chromatographie sur Séphadex G-25 mais de chromatographier la fraction nucléaire centrifugée immédiatement sur DEAE-cellulose et d'éluer la colonne par un gradient discontinu en NaCl dans le tampon, qui commence à 50 mM NaCl et qui s'élève ensuite à 100 mM, 200 mM et 300 mM NaCl.

La figure 32 montre le profil d'élution de la chromatographie sur DEAE-cellulose réalisée avec un tel gradient discontinu en NaCl. Nous remarquons que l'activité enzymatique qui élue à 50 mM disparaît lorsque la filtration sur Séphadex G-25 n'est plus réalisée avant la chromatographie sur DEAE-cellulose. Cette observation suggère que l'inhibiteur élue aussi à 50 mM NaCl faisant ainsi disparaître l'activité enzymatique éluant à cette force ionique.

Nous observons aussi que l'activité enzymatique qui élue dans l'expérience précédente à 300 mM élue déjà à 100 mM NaCl. Les fractions 55 à 62 sont regroupées et réparties en fractions aliquots de 200 μl dans des tubes stériles qui sont conservés à -70°C . Ces échantillons seront utilisés pour optimiser le test de méthylation.

Le tableau IV reprend les activités spécifiques obtenues après les différentes chromatographies. L'élution à 300 mM NaCl de la colonne de DEAE-cellulose permet d'augmenter presque par deux l'activité spécifique

par rapport à celle obtenue après filtration sur Séphadex G-25 alors qu'une élution à 100 mM NaCl augmente l'activité spécifique par un facteur 4.

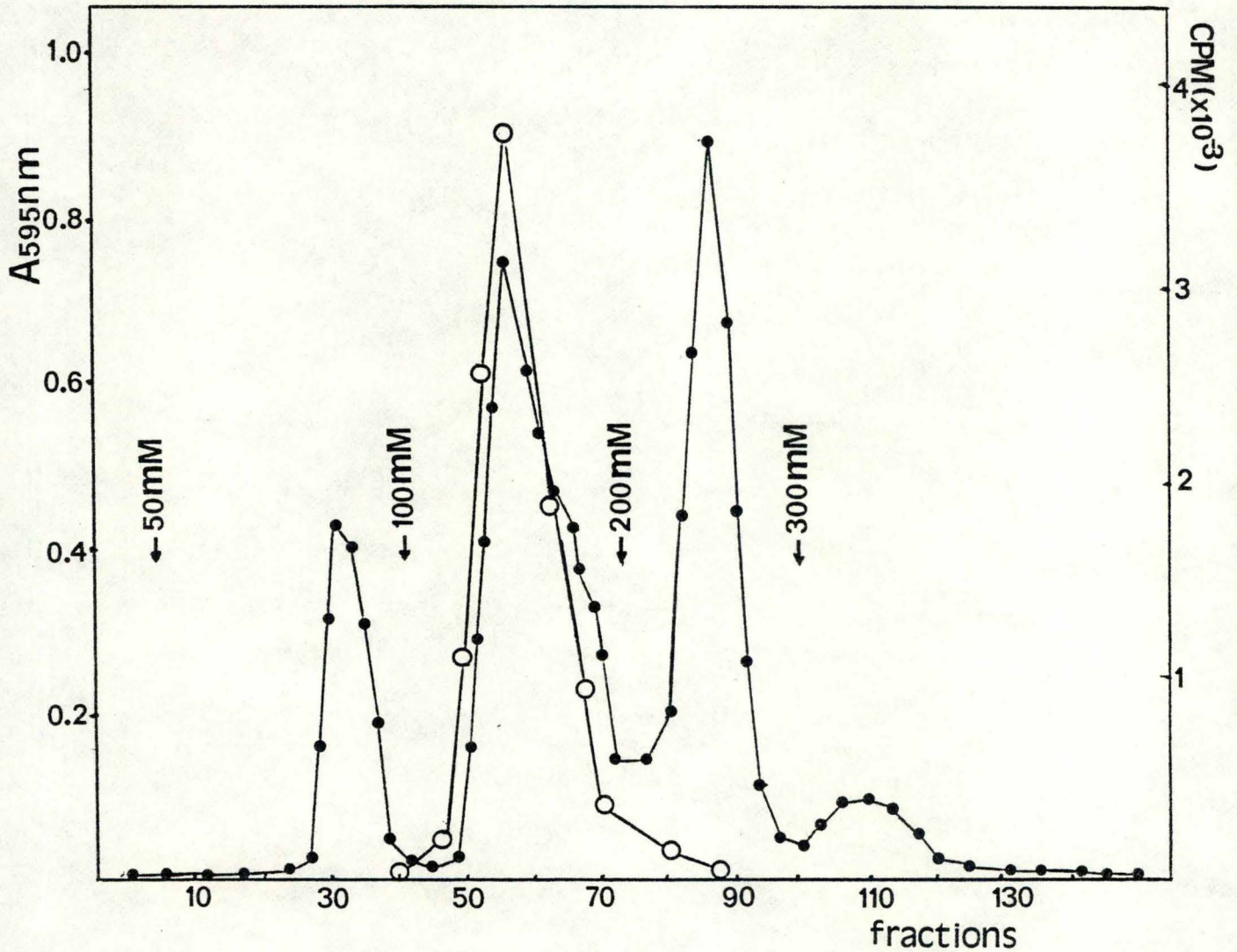


Fig. 32 : Profil d'élution d'une chromatographie sur DEAE-cellulose d'une fraction nucléaire de foie de rat préparée comme décrit dans "Matériel et Méthodes". La concentration en protéines et l'activité enzymatique sont mesurées dans les différentes fractions. L'élution est réalisée avec le tampon TEDG contenant 50, 100, 200 et 300 mM NaCl comme indiqué par les flèches.

Fraction	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité (cpm incorp./ml.min.)	Activité spécifique (cpm incorp./mg prot.min.)
Séphadex G-25	4,9	432	88
DEAE-cellulose 300 mM NaCl	4,2	666	168
DEAE-cellulose 100 mM NaCl	3,5	1 320	377

Tableau IV: Evolution de l'activité spécifique après chromatographie sur Séphadex G-25 et DEAE-cellulose de l'extrait de noyaux de foie de rat.

4. OPTIMISATION DU TEST DE METHYLATION *in vitro*.

A ce stade de l'isolement de l'activité enzymatique, il nous semble intéressant de caractériser quelques paramètres réactionnels tels le pH, la force ionique, la concentration en ARN poly(A)⁺ etc. en vue d'optimiser le test de méthylation *in vitro*.

4.1. Influence du pH.

La figure 33 montre l'évolution de l'activité enzymatique de méthylation

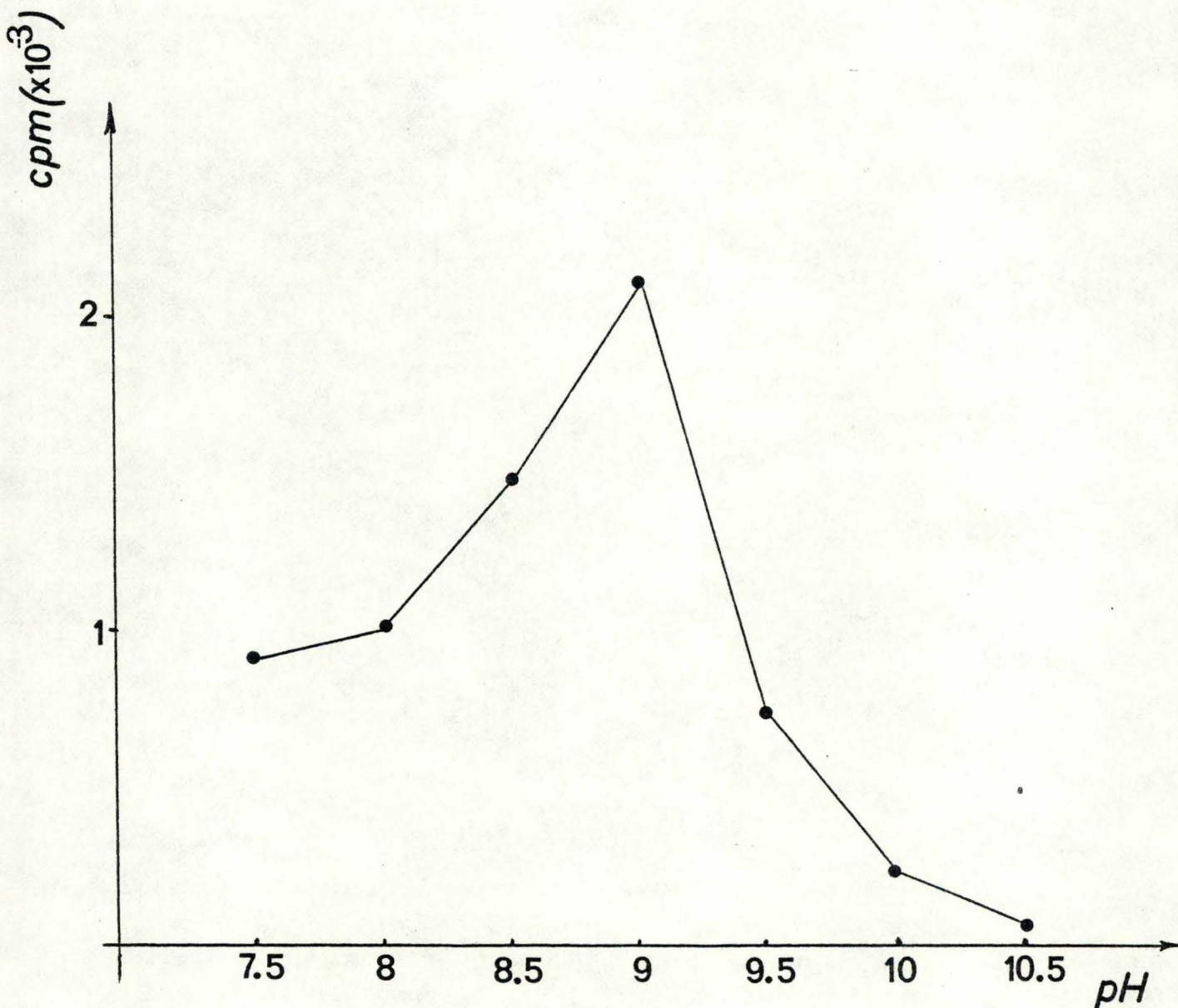


Fig. 33 : Evolution de l'activité enzymatique en fonction du pH. Le tampon glycine (0,1 M glycine; 0,1 N NaCl) est ajusté avec 0,1 N HCl aux valeurs suivantes : 8,5, 9, 9,5, 10 et 10,5. Le tampon phosphate (0,1 M acide phosphorique) est ajusté avec NaOH 0,1 N aux valeurs 7,5 et 8. Ces tampons remplacent le Tris-HCl dans le test de méthylation *in vitro* décrit dans "Matériel et Méthodes".

de l'ARN poly(A)⁺ en fonction du pH. Le pH optimum est de 9. Au delà de ce pH, l'incorporation de méthyles tritiés décroît très rapidement pour être à peu près nulle à pH 10,5. Cette décroissance de l'incorporation de méthyles radioactifs ne peut pas être simplement expliquée par une

inactivation de l'enzyme aux pH supérieurs à 9 car la SAdoMet est particulièrement in stable aux pH basiques. Il faudrait plutôt interpréter cette diminution rapide de l'activité comme un compromis entre l'instabilité de la SAdoMet et l'inactivation probable de l'enzyme aux pH très alcalins.

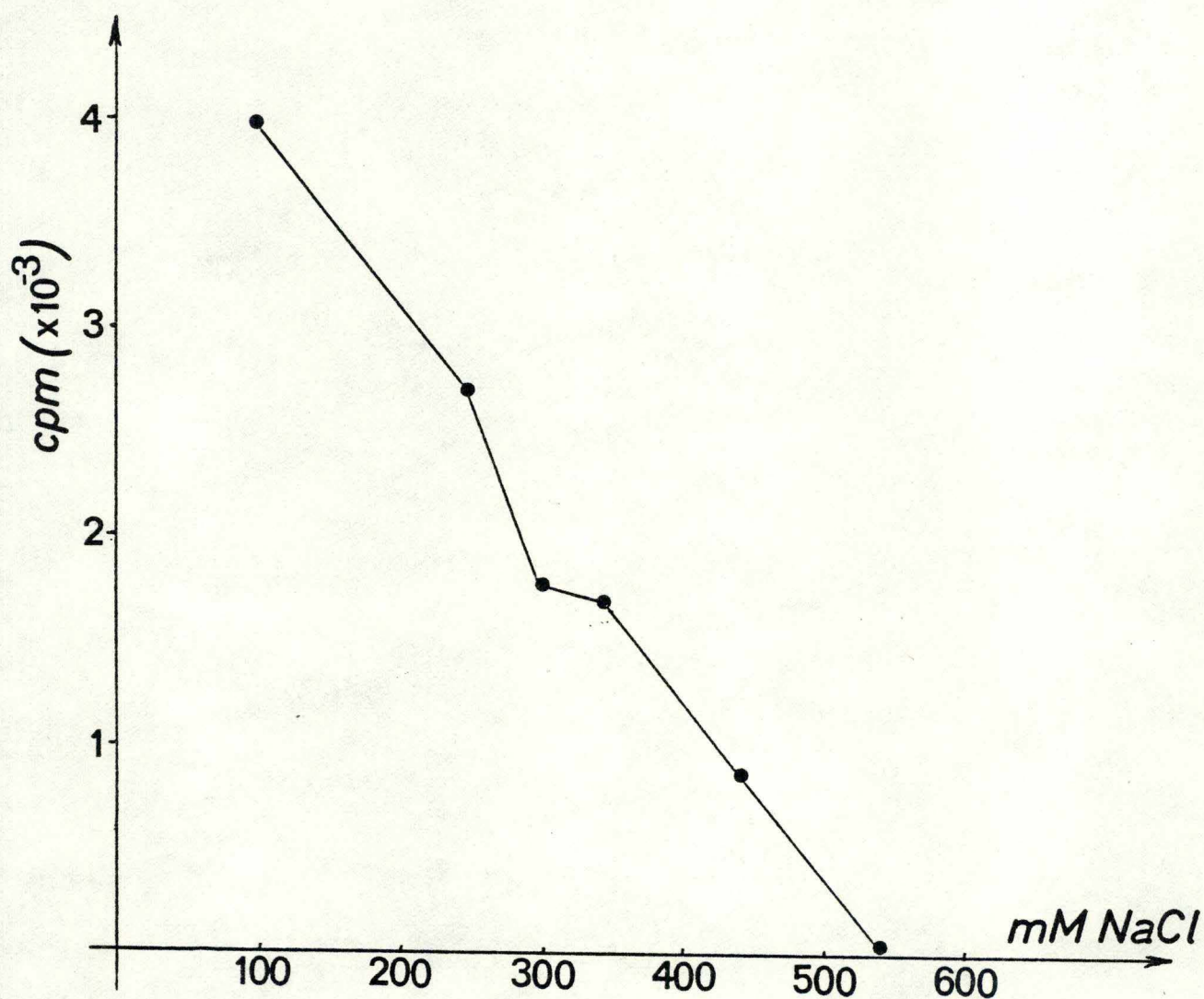


Fig. 34 : Influence de la concentration en NaCl sur l'activité de méthylation de l'ARN poly(A)⁺.

4.2. Influence du NaCl.

La force ionique est un paramètre important dans toute réaction enzymatique. La figure 34 montre la relation entre l'augmentation de la concentration en NaCl et l'activité enzymatique. Le maximum d'activité est obtenu pour une concentration de 100 mM qui représente la concentration en NaCl après élution de l'activité enzymatique de la colonne de DEAE-cellulose.

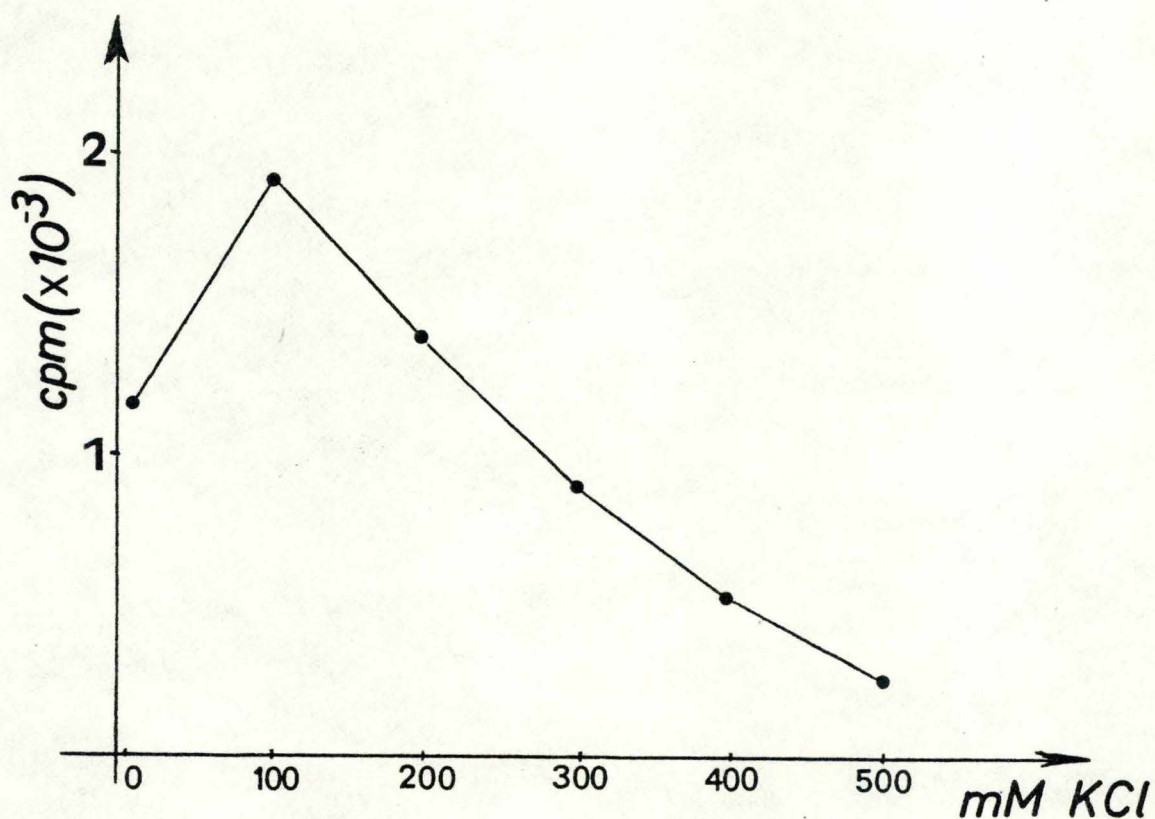


Fig. 35 : Influence de la concentration en KCl sur l'activité de méthylation de l'ARN poly(A)⁺. La présence de 100 mM KCl stimule la réaction de plus de 60 %.

Comme la réponse dans le test de méthylation *in vitro* est suffisante pour pouvoir s'intéresser à la nature du résidu méthylé, nous n'avons pas tenté de connaître le comportement de l'enzyme à une concentration en NaCl inférieure à 100 mM. Cette information pourrait être obtenue en dialysant en chambre froide la fraction protéique obtenue après élution de la chromatographie DEAE-cellulose ou en tentant d'éluer l'enzyme avec un tampon TEDG dont la concentration en NaCl est inférieure à 100 mM.

4.3. Influence du KCl.

La figure 35 indique la relation entre l'augmentation de la concentration en KCl et l'activité de méthylation *in vitro*.

L'optimum d'activité se situe à 100 mM KCl. Au-delà de cette concentration, l'évolution de l'activité est sensiblement comparable à celle observée pour le NaCl. Les effets du K^+ et du Na^+ sur cette méthyltransférase sont donc très semblables dès que la force ionique est supérieure à 100 mM.

4.4. Effet du Mg^{++} .

Beaucoup d'enzymes, notamment des méthyltransférases (135), ont une activité qui nécessite la présence de l'ion Mg^{++} . C'est la raison pour laquelle nous testons l'influence de cet ion sur la méthylation de l'ARN poly(A)⁺ *in vitro*. La figure 36 montre que l'activité optimale de méthylation est observée pour une concentration en Mg^{++} d'au moins 4 mM. Au delà de cette valeur, l'activité enzymatique n'est plus stimulée par l'augmentation de la concentration en Mg^{++} .

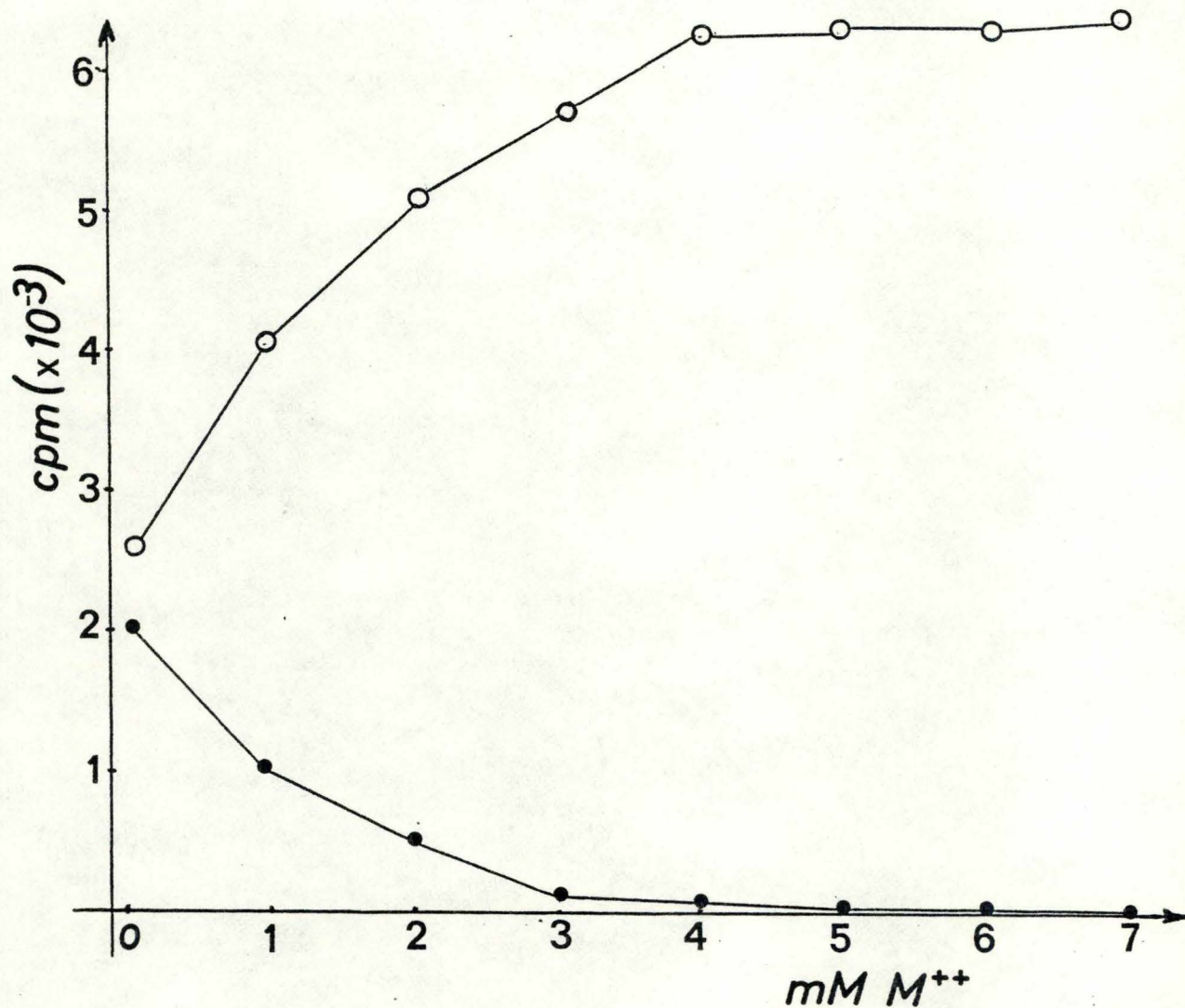


Fig. 36 : Influence du Mg^{++} (○—○) et du Ca^{++} (●—●) sur l'activité de méthylation de l'ARN poly(A)⁺ de levure.

4.5. Inhibition de la méthylation par le Ca^{++} .

L'hypothèse selon laquelle le Ca^{++} puisse inhiber l'activité de méthylation doit être maintenant directement testée. La courbe d'inhibition est reprise à la figure 36. Nous observons qu'une concentration de 3 mM Ca^{++} inhibe à plus de 90 % l'activité de méthylation. Cette observation explique probablement pourquoi aucune activité n'est décelable lorsque les noyaux de foie sont préparés avec des solutions contenant 1,5 mM $CaCl_2$ comme nous le faisons avant de remplacer ce sel

par la spermidine. A 1,5 mM Ca^{++} , l'activité enzymatique est en effet inhibée à plus de 75 %.

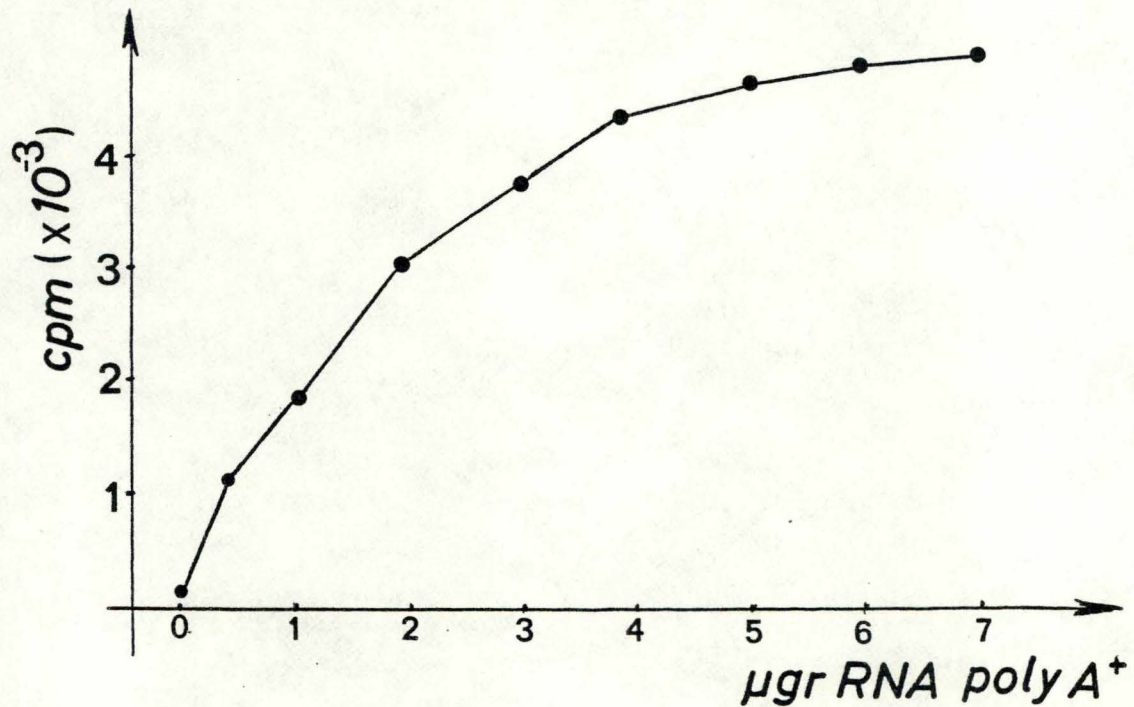


Fig. 37 : Influence de la concentration en ARN poly(A)⁺ sur l'incorporation de méthyles tritiés dans le test de méthylation *in vitro*.

4.6. Influence de la concentration en ARN poly(A)⁺.

Dans le souci d'utiliser un minimum d'ARN poly(A)⁺ par test, il est important de connaître la concentration minimale qui nous permette d'atteindre la "valeur plateau" de la cinétique de méthylation. La figure 37 montre l'influence de la concentration en ARN poly(A)⁺ sur l'incorporation de méthyles tritiés dans le test de méthylation. Jusqu'à 2 µg, l'incorporation de radioactivité est plus ou moins linéaire, ensuite,

elle s'infléchit pour atteindre le plateau de la cinétique à partir de 6 μg .

5. ANALYSE DE(S) RESIDU(S) METHYLE(S) PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS

ET CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE SUR PAPIER.

Disposant d'un test de méthylation *in vitro* qui est partiellement optimisé, nous pouvons nous intéresser à la nature du ou des résidus méthylés sur l'ARN poly(A)⁺. De manière à disposer de plus ou moins 20 000 cpm (ce qui représente le minimum de marquage qui permette de détecter nettement la nature du résidu méthylé), nous multiplions le volume du test *in vitro* par un facteur 5. Après incubation l'ARN poly(A)⁺ est soumis à une hydrolyse alcaline dont le mécanisme est décrit dans l'introduction de ce travail. Cet hydrolysate alcalin de l'ARN poly(A)⁺ est ensuite déposé sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans le tampon TUN contenant de l'urée.

La séparation d'un mélange d'oligonucléotides par chromatographie échangeuse d'ions est un procédé qui ne dépend pas seulement des interactions ioniques entre les oligonucléotides et la matrice DEAE-cellulose, mais aussi des forces d'interactions secondaires telles les interactions hydrophobes et ponts hydrogènes. L'importance de ces forces secondaires dépend essentiellement de la composition en bases des oligonucléotides. La présence d'urée 7 M dans le tampon d'élution permet de diminuer très considérablement ces forces secondaires et la séparation est alors presque exclusivement fonction de la charge nette de l'oligonucléotides (60).

La figure 38 montre le profil d'élution sur DEAE-cellulose de l'hydrolysate alcalin de l'ARN poly(A)⁺ à l'aide d'un gradient continu

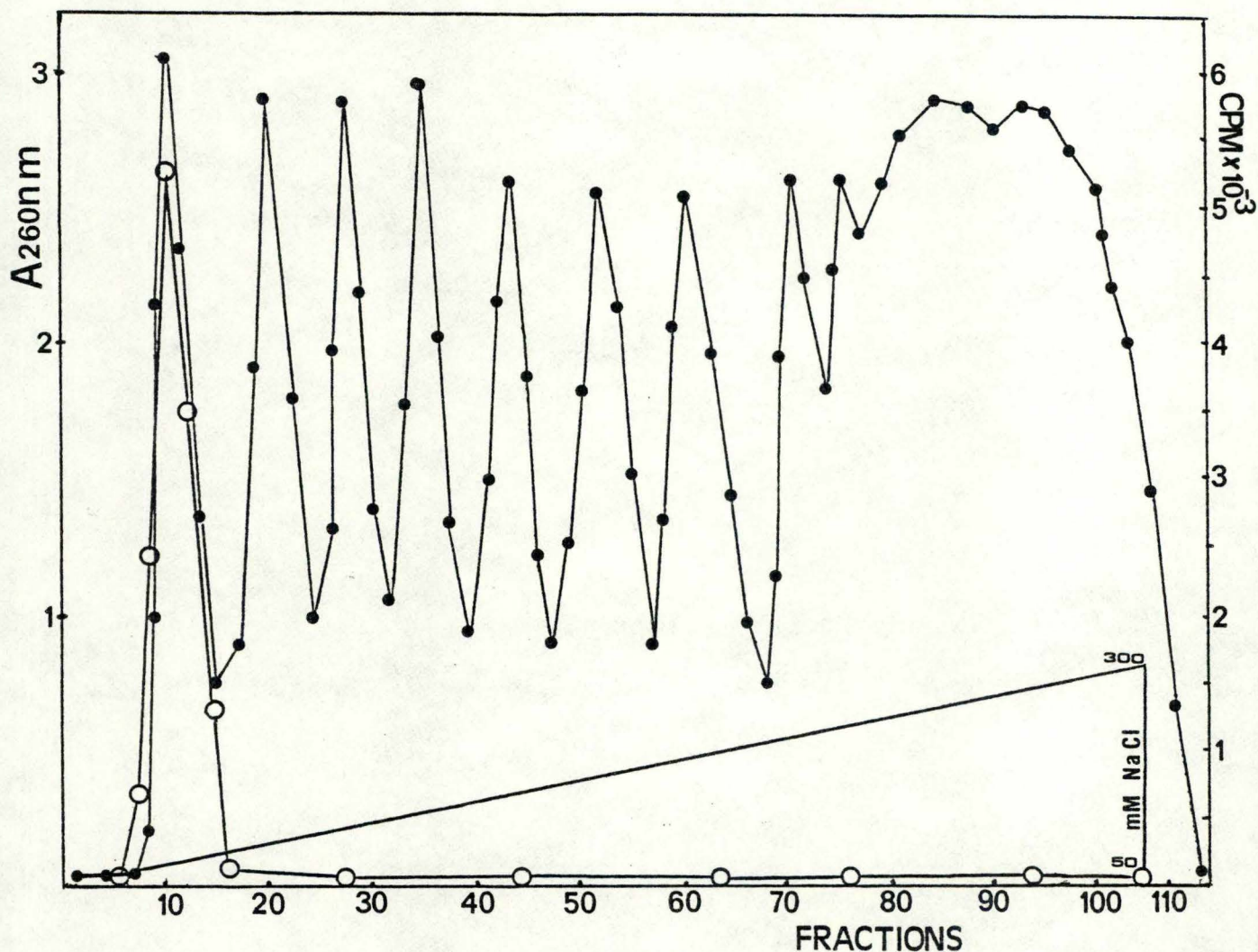


Fig. 38 : Profil d'éluion sur colonne de DEAE-cellulose de l'hydrolysate alcalin de l'ARN poly(A)⁺ méthylé *in vitro*. 350 µg d'acide polyadénylique partiellement hydrolysé par traitement alcalin sert de marqueur intrinsèque pour positionner les différents pics lors de l'éluion avec un gradient continu en NaCl qui s'étale entre 50 et 300 mM. La densité optique (●—●) est mesurée à 260 nm et la radioactivité (○—○) est comptée comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

en NaCl. Le premier pic éluant à 60 mM NaCl correspond aux mononucléotides dont la charge globale est de -2 (Fig. 39a). Les pics ultérieurs correspondent aux charges -3, -4, etc. Nous nous apercevons que la résolution de la colonne demeure satisfaisante jusqu'à une charge globale de -9.

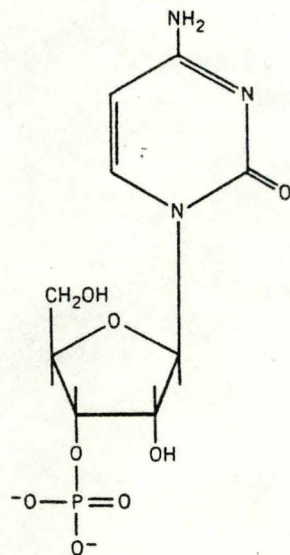


Fig. 39a : Structure d'un mononucléotide typique (acide cytidylique) dont la charge globale est de -2.

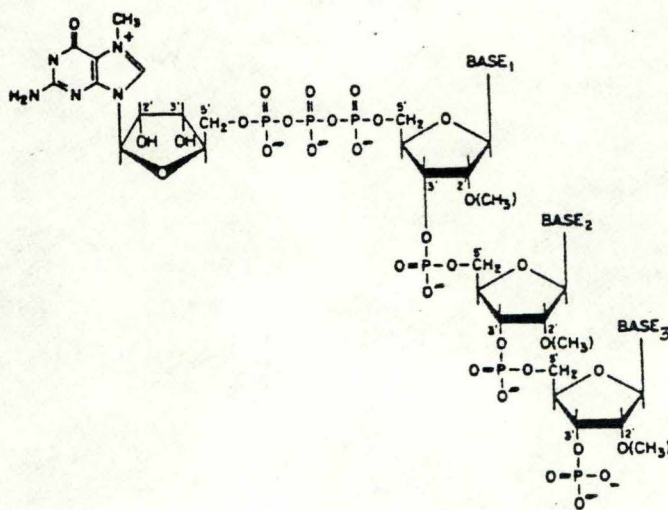


Fig. 39b : Extrémité 5'-terminale d'ARNm eucaryote obtenu après hydrolyse alcaline totale lorsque ce messager porte une coiffe de type 2. La charge globale d'un tel polynucléotide est de $-6,5$. Si l'ARNm porte une coiffe de type 1 alors la charge de l'oligonucléotide est d'environ $-5,5$

Nous remarquons que toute la radioactivité après hydrolyse totale de l'ARN poly(A)⁺ méthylé *in vitro*, est portée par des mononucléotides. Cette observation est particulièrement intéressante dans la mesure où elle permet d'exclure directement certaines méthylations.

ok.

Si on avait la présence d'une coiffe de type 1, 1', ou 2 sur l'ARN poly(A)⁺ après méthylation *in vitro*, l'hydrolyse alcaline ne pourrait pas se réaliser dans le trinucleotide (pour la coiffe de type 1 ou 1') ou le tétranucleotide (pour la coiffe de type 2), car les groupements méthyles en 2'-O sur les riboses des pénultième et antépénultième nucléotides empêchent la réalisation de l'intermédiaire cyclique indispensable dans la réaction d'hydrolyse alcaline. Dans ce cas, la radioactivité serait éluee après hydrolyse alcaline aux environs des charges -5,5 à -7 (fig. 39b), car le noyau imidazole peut s'ouvrir à pH alcalin et la charge positive de l'azote 7 est perdue (cfr. introduction). La charge positive de l'azote 7 qui résulte du lien covalent avec le groupement méthyle est particulièrement instable. C'est la raison pour laquelle on la considère comme une charge partielle (+ 1/2).

A partir du moment où les méthylations de coiffe sont exclues, quel type de méthylation peut-on envisager pour expliquer le fait que la radioactivité est portée par les mononucléotides ? En fait, tout résidu interne d'ARNm méthylé *in vitro* sur la base donnera après hydrolyse alcaline, un mononucléotide marqué radioactivement. Il est très probable que la méthylation effectuée *in vitro* soit portée par une base d'un résidu interne et la question qui se pose maintenant est de connaître la nature du nucléotide méthylé. A l'heure actuelle, deux méthylations internes d'ARNm ont été mises en évidence (Tableau II). Il s'agit de la 5-méthylcytosine (m⁵C) et de la N-6-méthyladénosine (m⁶-NA). La question que nous nous posons est de savoir si la méthylation que nous effectuons *in vitro* sur l'ARN poly(A)⁺ est une de ces deux méthylations. Cette information peut être obtenue par chromatographie descendante sur papier des nucléotides provenant du produit de la méthylation et qui sont obtenus après hydrolyse alcaline et traitement à la phosphatase P1 qui

en enlevant le phosphate 3' des nucléotides résultant de l'hydrolyse alcaline les transforme en nucléosides.

Le volume du test de méthylation est multiplié d'un facteur 5, après incubation d'une heure à 38 °C et hydrolyse alcaline classique, nous déposons l'hydrolysats sur une petite colonne de DEAE-cellulose et le matériel radioactif est élué avec 100 mM LiCl. Ce matériel marqué est ensuite hydrolysé à la phosphatase P1 qui clive les liaisons 3'-phospho-esters en libérant des mononucléotides 5'-phosphates, même si la liaison contient un nucléotide méthylé en 2'-O.

Environ 60 % du matériel radioactif est déposé sur papier de chromatographie et la migration descendante est effectuée dans une solution d'acide isobutyrique. Dans ce solvant, le nucléoside ^5C a une R_f théorique de 0,8. La figure 40 montre l'analyse par chromatographie descendante sur papier de l'ARN poly(A)⁺ méthylé *in vitro* et hydrolysé par traitement alcalin et par la nucléase P1. Cette figure révèle la présence de deux pics de radioactivité qui migrent respectivement à plus ou moins 18 et 32 cm de l'origine. Le pic de radioactivité centré à 32 cm représente un peu moins de 70 % de la radioactivité totale alors qu le pic centré à environ 18 cm n'en représente qu 18 % (rapport 1 à 2,4).

Ces deux pics peuvent s'expliquer par la présence de deux méthylations sur des nucléosides différents ou tout simplement par le fait que l'hydrolyse à la P1 est incomplète. Pour tester cette seconde hypothèse, nous disposons de 40 % du matériel hydrolysé à la P1 que nous déposons sur une colonne de DEAE-cellulose dans les mêmes conditions que celles décrites à la figure 38. Si la réaction de digestion à la P1 est complète tous les nucléotides sont transformés en nucléosides qui ne possèdent donc plus de charge globale négative et qui par conséquent ne s'attachent plus à la matrice de DEAE-cellulose. Tous les nucléosides se retrouveraient donc dans le "flow-through" de la colonne.

La figure 41 montre le profil d'élution de l'hydrolysât alcalin de l'ARN poly(A)⁺ traité à la phosphatase P1. Nous nous apercevons que 73 % de la radioactivité totale se retrouve dans le "flow-through" de la colonne et que 25 % de cette radioactivité s'élue avec les mononucléotides (rapport 1 à 2,9). Cette observation montre que l'hydrolyse à la P1 est incomplète (environ 73 % des nucléotides sont transformés en nucléosides).

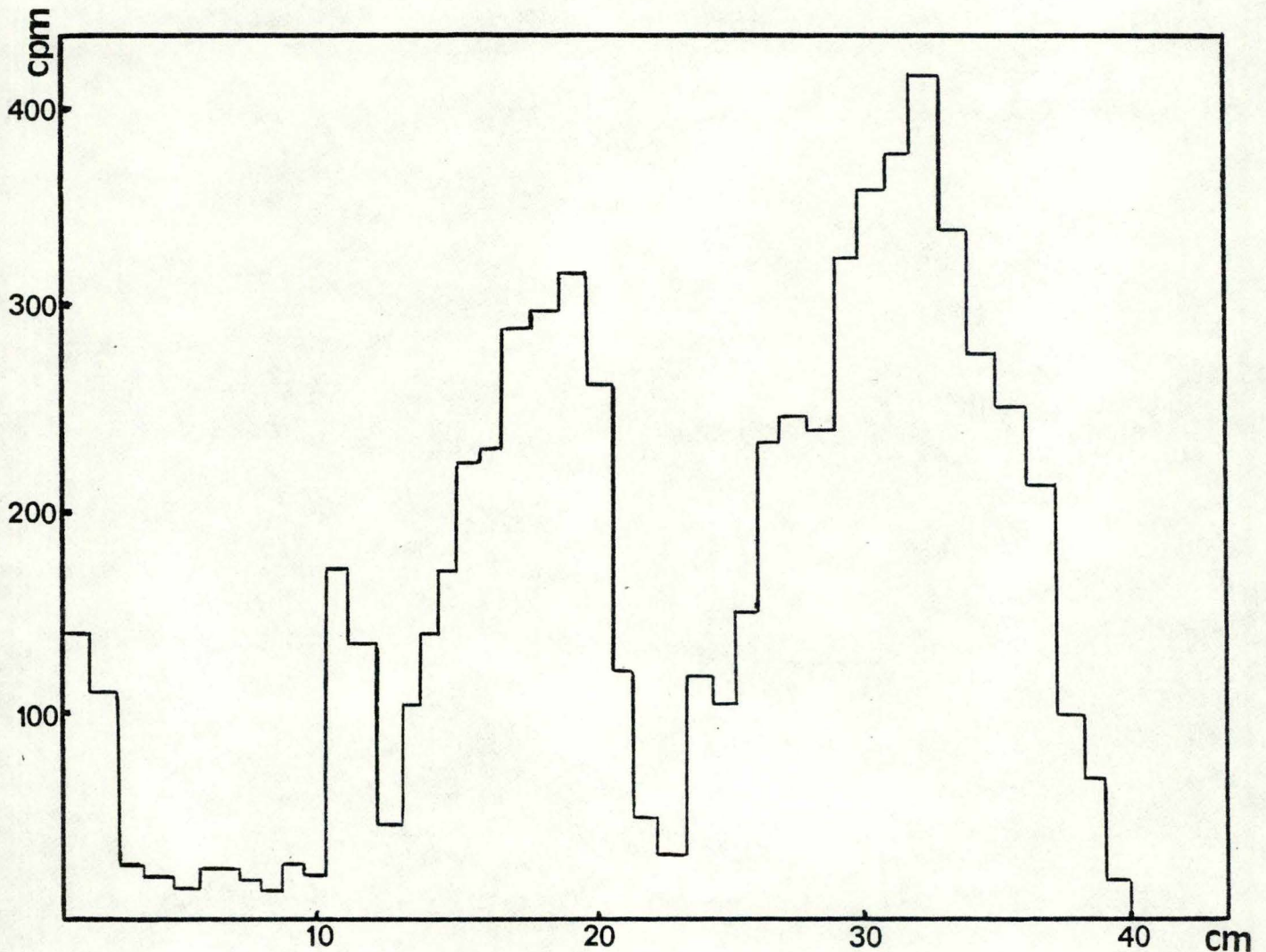


Fig. 40 : Identification par chromatographie sur papier du résidu méthylé après méthylation *in vitro* de l'ARN poly(A)⁺ de levure.

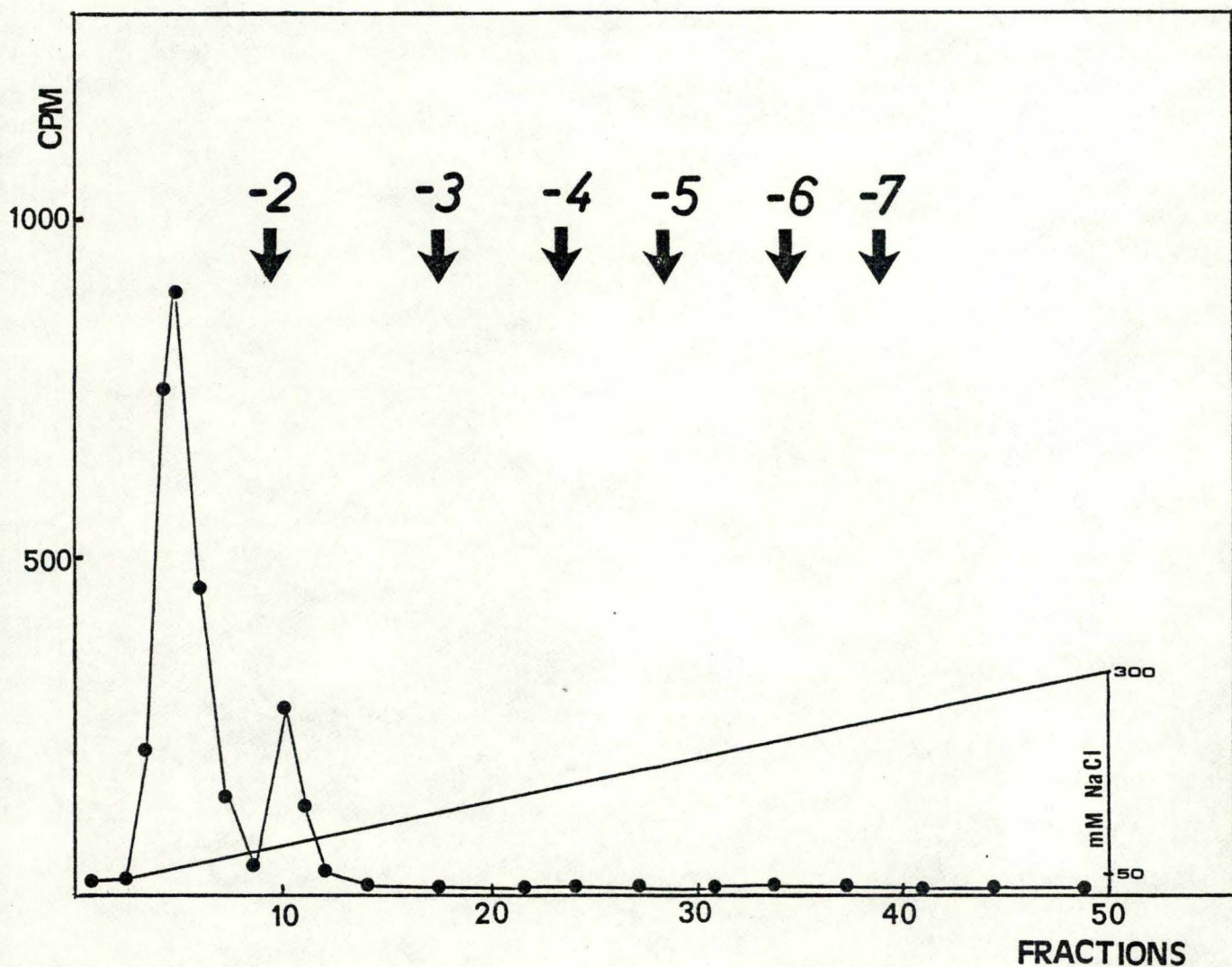


Fig. 41 : Profil d'élution sur DEAE-cellulose en présence d'urée de l'hydrolysats alcalin de l'ARN poly(A)⁺ traité à la nucléase P1. 350 µg d'acide polyadénylique partiellement hydrolysé par traitement alcalin sert de marqueur intrinsèque pour positionner les différents pics lors de l'élution avec un gradient en NaCl qui s'étale entre 50 mM et 300 mM (cfr. fig. 38). La position relative des pics est indiquée par une flèche surmontée de la valeur correspondant à la charge globale de l'oligonucléotide. Les mononucléotides correspondent à la charge -2.

La proportion des nucléotides par rapport aux nucléosides est très comparable au rapport des deux pics de radioactivité obtenus lors de l'analyse par chromatographie descendante du nucléoside méthylé *in vitro*.

En effet, le pic de radioactivité centrée à environ 32 cm de l'origine représente 70 % de la radioactivité totale détectée après migration (Fig. 40), alors que le pic centré à environ 18 cm n'en représente que 24 %. Cette comparaison suggère que les deux pics de radioactivité observés à la figure 40 représentent la méthylation d'un même résidu qui est sous la forme de nucléotide (pic à 18 cm) et sous la forme de nucléoside (pic à 32 cm). Le résidu méthylé *in vitro* pourrait être la m^5C dont le nucléoside a un R_f de 0,8 dans le solvant utilisé pour la chromatographie descendante se qui correspond à une migration d'environ 32 cm dans les conditions adoptées.

La présence d'une très forte concentration en sel (LiCl) et une éventuelle mauvaise neutralisation de la solution après hydrolyse alcaline et avant réaction à la nucléase sont peut-être à l'origine de la réaction incomplète de la digestion à la P1. L'hypothèse de la trop forte concentration en sel expliquerait aussi en partie pourquoi les pics de radioactivité obtenus après migration descendante sur papier sont si fortement étalés (Fig. 40).

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

Le but de ce mémoire est de mettre en évidence une enzyme de foie de rat capable de méthyler *in vitro* l'ARN messager de *Saccharomyces cerevisiae* qui devrait être un bon substrat dans la mesure où il ne porte qu'un seul groupement méthyle sur la guanine de la coiffe et possède donc des sites méthylables par les enzymes de foie de rat, comme les 2'-O-méthyltransférases qui génèrent des coiffes de type 1 et 2, la (N-6-méthyladénosine)méthyltransférase qui forme une coiffe de type 1', ou encore les méthyltransférases méthylant des résidus internes.

Au stade d'avancement où en est ce travail, nous avons montré que l'ARN poly(A)⁺ de levure est méthylable par des enzymes de noyaux de foie de rat. Dans cet organe au moins quatre activités enzymatiques différentes peuvent potentiellement méthyler l'ARNm de levure, ce sont les (nucléoside-2'-O-)-méthyltransférases de coiffe 1 et 2, les (adénine-N-6-)-méthyltransférases et peut-être une (cytosine-5-)-méthyltransférase. L'analyse par chromatographie DEAE-cellulose en présence d'urée et par chromatographie descendante sur papier, suggère que le résidu méthylé *in vitro* par l'extrait de foie de rat soit la 5-méthylcytosine (m⁵C) en position interne.

En effet, si la méthylation affectait l'extrémité 5' au niveau de la coiffe, l'élution de la radioactivité sur DEAE-cellulose après hydrolyse alcaline s'effectuerait aux environs des charges -5 à -7 et ce n'est pas ce que nous observons. D'autre part, côté 3'-terminal, nous n'avons sur les messagers que des adénines qui nous permettent d'ailleurs d'isoler les ARN messagers sur oligo(dT). Il est donc probable que l'activité que nous avons mise en évidence soit une (cytosine-5-)-méthyltransférase. Il faut cependant demeurer très prudent dans la mesure où la chromatographie sur papier n'a pas été effectuée en présence du marqueur authentique (la m⁵C) qui en comigrant avec le résidu méthylé *in vitro*, nous aurait apporté un argument expérimental nous permettant de suggérer qu'il s'agit bien de la m⁵C. D'autre part, des chromatographies effectuées dans d'autres solvants et des chromatographies en deux dimensions devront compléter l'identification du résidu méthylé.

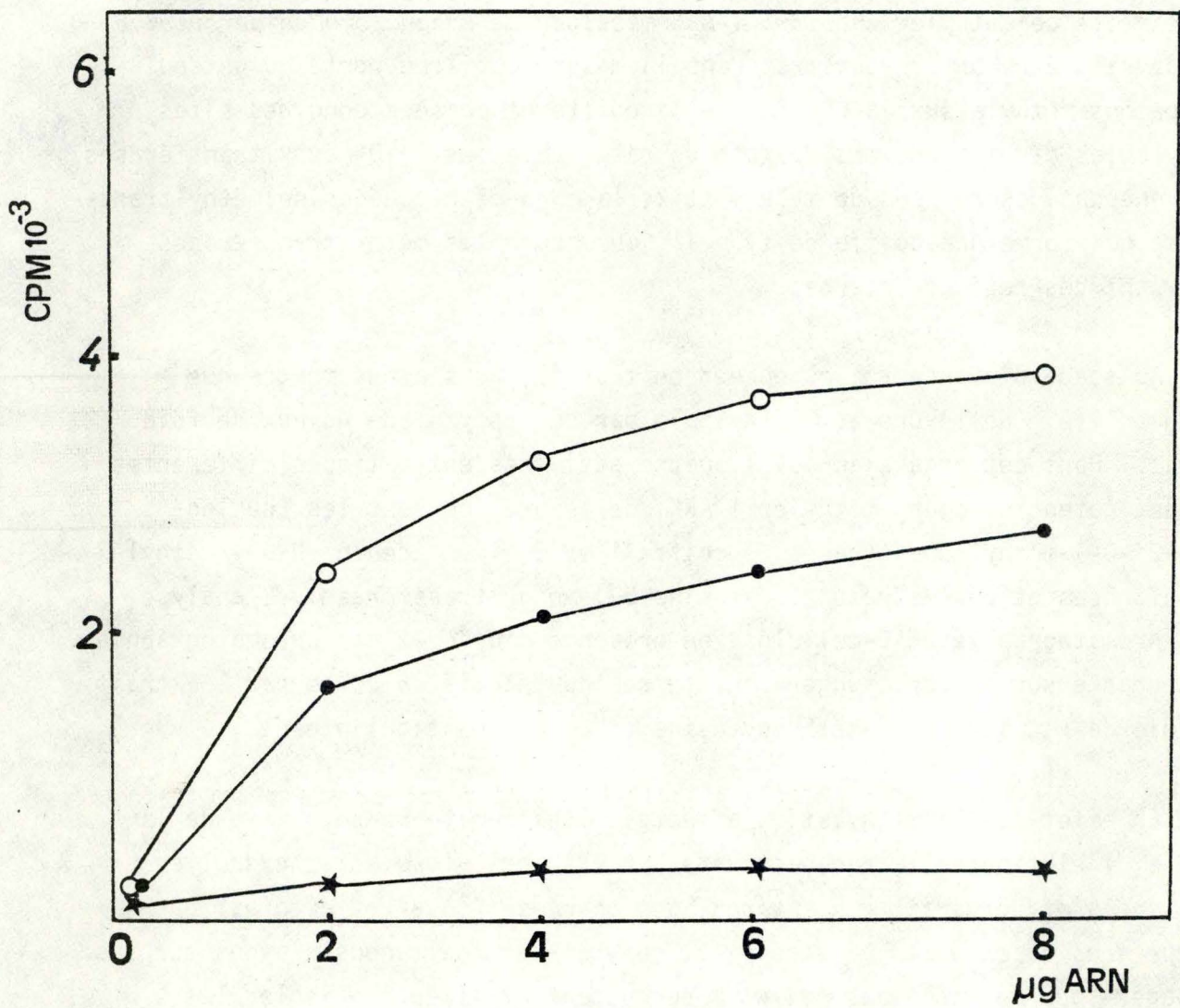


Fig. 40: Incorporation de méthyles tritiés dans le test de méthylation *in vitro* utilisant différents substrats (○—○): ARN poly(A⁺), (●—●): ARN poly(A⁻), (★—★): acide polyadénylique.

Les tableaux I et II (introduction) montrent que nous ne disposons que de peu d'information concernant les méthylations internes d'ARNm. Cependant la N-6-méthyladénosine est beaucoup plus fréquente que la 5-méthylcytosine comme nucléotide interne méthylé dans les ARN messagers cellulaires ou viraux.

Il est intéressant de signaler que la plupart des 5-méthylcytosines internes sont observées sur les ARNm de cellules tumorales (tumeur des cellules ascites de souris) (153). Si les investigations ultérieures confirmaient cette observation, cela pourrait peut-être signifier que cette méthylation joue un rôle fonctionnel dans la différenciation cellulaire.

D'autre part, aucune purification même partielle d'ARNm (cytosine-5-)-méthyltransférase n'est signalée dans la littérature. La question que nous devons nous poser est de savoir si l'enzyme que nous avons mise en évidence est bien une ARNm (cytosine-5-)-méthyltransférase de foie de rat. Le substrat que nous utilisons dans le test de méthylation *in vitro* est de l'ARN poly(A)⁺ de levure. La présence d'une queue de poly(A) à l'extrémité 3' de la majorité des messagers est utilisée pour enrichir après passage sur oligo(dT)-cellulose une fraction d'ARN en messagers. On peut estimer à 50 % la proportion d'ARNm contenue dans une fraction d'ARN poly(A)⁺ obtenue par chromatographie sur oligo(dT)-cellulose, le reste est composé en concentration variable difficilement mesurable, d'ARN de transfert, d'ARN ribosomal, d'ARNsn et de fragments d'ARN divers hydrolysés (154). Il est donc possible que la réaction de méthylation effectuée *in vitro* utilise comme substrat un autre type d'ARN que le messenger comme par exemple l'ARN ribosomal ou l'ARN de transfert qui porte de nombreux résidus méthylés dont un m⁵C (155).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué un test de méthylation *in vitro* utilisant comme substrat de l'ARN poly(A)⁻. La figure 40 montre que l'ARN poly(A)⁻ est aussi méthylable par l'extrait de foie de rat bien qu'il semble constituer un substrat moins performant que le poly(A)⁺. Nous ne pouvons pas à l'analyse de ce

résultat; conclure que ce n'est pas l'ARNm qui est méthylé par les enzymes de foie de rat car la fraction poly(A)⁻ contient aussi en concentration plus faible, de l'ARNm mais aussi de l'ARNhn, des ARNm sans poly(A) qui peuvent probablement être méthylés. La méthylation observée en incubant de l'ARN poly(A)⁻ avec l'extrait de foie peut correspondre à la méthylation de ces molécules. Comme la fraction enzymatique que nous utilisons n'est pas pure, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'extrait contient plusieurs activités de méthylation d'ARN. La question à laquelle il va falloir apporter une réponse est de savoir si l'extrait de foie méthyle l'ARNm de levure. Une première indication pourrait être obtenue en enrichissant la fraction poly(A)⁺ en ARNm en faisant passer plusieurs fois une même fraction d'ARN total sur oligo(dT)-cellulose. Si la réponse dans le test de méthylation *in vitro* augmente au fur et à mesure que l'enrichissement en messager se poursuit, on pourra suggérer sans pour autant l'affirmer que c'est l'ARNm qui est méthylé, car en purifiant l'ARNm, nous pouvons copurifier un contaminant qui est effectivement méthylé par l'extrait de foie. Il se peut aussi que la réponse *in vitro* ne change pas ou même diminue à cause d'une dégradation de l'ARNm au cours des différentes manipulations. Un test de traduction acellulaire pourra montrer si l'intégrité structurale de l'ARNm est conservée. S'il en est bien ainsi et si la méthyltransférase mise en évidence a besoin d'un substrat intact nous pourrions légitimement affirmer que ce n'est pas l'ARNm de levure qui est méthylé par l'extrait de foie de rat.

Si nous arrivons à cette conclusion, nousdevrons examiner tous les substrats potentiellement méthylables par les enzymes de foie. A la lumière des recherches actuelles trois ARN : l'ARNt et les ARNr 18 et 28 S (156, 157) semblent être des substrats possibles car tous possèdent des m⁵C qui ont été mises en évidence. Ces trois types moléculaires peuvent être aisément séparés sur gradient de sucrose, il sera donc possible de tester ces molécules séparément dans le test de méthylation *in vitro*. Il est possible que l'activité que nous avons détectée soit une ARNt (cytosine-5-)-méthyltransférase. Déjà en 1977, Rodeh *et al.* (158) ont mis en évidence une activité de cytosine-5-méthyltransférase dans le foie rat, Gambaryon *et al.* (159) ont démontré que cette activité est une

ARNt (cytosine-5-)-méthyltransférase. Keith *et al.* (156) ont purifié l'ARNt (cytosine-5-)-méthyltransférase de cytoplasme de cellules HeLa. Cette enzyme montre une grande activité envers l'ARNt^{Phe} d'*E. coli* et de *Saccharomyces cerevisiae*. L'ARNm du virus de la vaccine, naturellement dépourvu de m⁵C, peut aussi servir de substrat. Cette observation montre que cette enzyme est relativement peu spécifique. Le messenger que nous utilisons dans le test de méthylation *in vitro* pourrait peut-être servir de substrat à l'ARNt (cytosine-5-)-méthyltransférase si c'est cette enzyme que nous avons mise en évidence. L'utilisation d'ARNt sous-méthylé provenant d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* strictement auxotrophe pour la SAdoMet dont la croissance est réalisée en milieu pauvre en SAdoMet, permettra de vérifier si l'enzyme mise en évidence est bien spécifique de l'ARNt.

La caractérisation de la méthylation de l'ARN poly(A)⁺ de levure par l'extrait de foie de rat nécessite aussi la connaissance de la stoechiométrie de la réaction effectuée *in vitro*. Les calculs qui suivent supposent que c'est l'ARNm qui est méthylé. L'activité spécifique de la SAdoMet tritiée utilisée est de 15 Ci/mmole ou de 15 µCi/nmole et 1 µCi correspond à plus ou moins 2 200 10³ désintégrations par minute (dpm). L'efficacité du comptage ($E = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \times 100 \%$) est estimée à environ 30 %, la nmole de SAdoMet équivaut donc à 2 200.10³.30.15/100 = 9,9.10⁶ cpm, valeur qui peut être approximée à 10⁷ cpm; 1 000 cpm correspondent donc à 0,1 pmole de méthyles tritiés. D'autre part, la taille moyenne d'un ARN messenger non dégradé peut être estimée à 2 000 nucléotides dont le poids moléculaire moyen est environ égal à 350 dalton (Fig. 11). La mole moyenne d'ARNm pèse donc 700 000 grammes. En se référant à la figure 37, on observe qu'une quantité de 2 µg d'ARN poly(A)⁺ (2,8 pmoles) permet l'incorporation de 3 000 cpm ou 0,3 pmole de méthyles tritiés dans les conditions du test adoptées.

Pour réaliser le comptage, nous ne prélevons que 20 µl du mélange réactionnel qui en compte au total 50, les 2,8 pmoles d'ARN poly(A)⁺ incorporent en fait donc 0,75 pmole de méthyles tritiés. La proportion

de molécules méthylées de la réaction est donc de $0,75 \cdot 100 / 2,8 =$ environ 25 %. Cependant comme on estime à 50 % la proportion d'ARNm dans la fraction poly(A)⁺, le rendement double et s'élève théoriquement à plus ou moins 50 %. Si tous les messagers étaient de même taille et si la méthylation était uniforme, ce rendement signifierait qu'une molécule d'ARNm sur deux est théoriquement méthylée.

Pratiquement, la situation est autre, car l'architecture moléculaire des messagers des différents gènes est variable de ce fait, certains résidus méthylables sont plus ou moins exposés aux enzymes de l'extrait de foie. Il est donc très probable que certains messagers portent plus de méthylations que d'autres. Il serait aussi intéressant de savoir si l'augmentation de la concentration en enzyme favorise le rendement de la réaction.

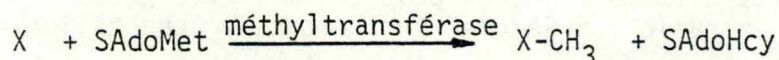
L'interprétation des résultats suggère qu'il semble possible que l'activité de méthylation détectée ne soit pas une méthyltransférase spécifique d'ARNm.

Au cours de ce travail nous n'avons pas, par manque de temps, exploité toutes les observations que nous avons effectuées. En effet, deux activités de méthylation d'ARN poly(A)⁺ ont été détectées dans les noyaux de foie de rat. L'activité s'éluant à 50 mM NaCl sur DEAE-cellulose n'a pas été étudiée dans le cadre de ce travail dans la mesure où une assez grande instabilité caractérise cette enzyme dans les conditions d'extraction adoptées. L'activité "50 mM" peut être due à une ARNm méthyltransférase comme les 2'-O-méthyltransférases de coiffe de type 1 ou 2 ou la (N-6-méthyladénosine-)-méthyltransférase. L'étude aisée de cette activité passe par une stabilisation de l'enzyme. L'instabilité observée peut être due à la présence de protéases, à une oxydation de l'enzyme ou tout simplement aux conditions d'extraction qui ne conviennent pas à la conservation de l'activité enzymatique (présence de certains ions, pH,...) Si l'instabilité est due uniquement à l'action de protéases, on peut espérer réduire sensiblement l'impact de cette protéolyse enzymatique en

préparant le plus rapidement possible une fraction de méthyltransférase plus purifiée.

La modification du pH du tampon de chromatographie, car le pH optimum d'activité enzymatique ne correspond pas nécessairement au pH optimum de stabilité, la présence d'une plus ou moins forte concentration d'antioxydant (le tampon utilisé contient 1 mM DTT) et de divers agents chélatant (comme l'EGTA) peuvent aussi contribuer à stabiliser l'activité "50 mM". D'autre part, la présence du substrat peut aussi "réconforter" une enzyme lors de longues périodes de conservation. Toutes ces hypothèses devront être testées afin d'obtenir une fraction enzymatique qui puisse être étudiée plus aisément. Une fois obtenue, cette fraction sera soumise aux mêmes tests que ceux développés pour l'étude de l'activité s'éluant à 100 mM NaCl de la colonne de DEAE-cellulose.

Au cours de ce travail, nous avons aussi mis en évidence un inhibiteur de méthylation qui inhibe aussi bien les ARN méthyltransférases s'éluant à 50 et 100 mM NaCl de la DEAE-cellulose que les méthylation endogènes de germes de blé et de foie de rat. Cet inhibiteur est une petite molécule qui est éliminable par filtration sur Séphadex G-25 et qui ne s'accroche pas à la DEAE-cellulose. Il ne serait donc pas de charge globale négative. Locht *et al.* (84) ont mis en évidence dans la levure un inhibiteur de méthylation très puissant qui possède ces mêmes caractéristiques : il est non spécifique, de petite taille et non négatif. Il serait très intéressant d'isoler et de caractériser cet inhibiteur. L'inhibiteur connu qui inhibe la plupart des méthyltransférases décrites, est la S-adénosyl-L-homocystéine (SAdoHcy), le produit des réactions de transméthylation SAdoMet dépendantes.



La SAdoHcy est une molécule relativement petite ($P_M = 384$) qui devrait pouvoir être éliminée par une dialyse ou une filtration sur Séphadex G-25. Le fait d'être de petite taille ne prouve pas que la SAdoHcy soit l'inhi-

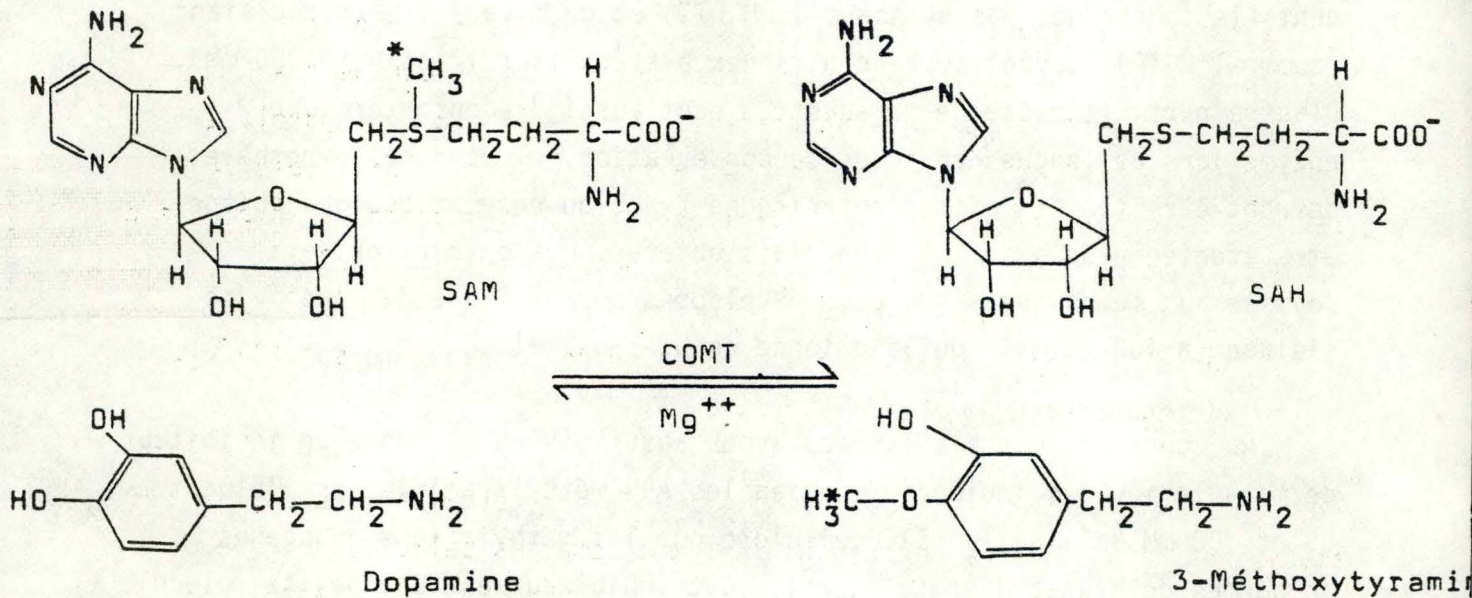


Fig. 41: Le dosage de la SAdoMet est basé sur la réaction biochimique suivante: la dopamine se convertit en 3-méthoxytyramine en présence de SAdoMet comme donneur de groupes méthyles, de catéchol-O-méthyltransférase et d'ions Mg^{++} . Le dosage repose sur un double marquage, la dopamine est tritiée et la SAdoMet est marquée au ^{14}C sur le groupement méthyle qui est transféré. Après réaction, la 3-méthoxytyramine est marquée au ^{14}C et 3H . Au fur et à mesure que la concentration en SAdoMet froide augmente, la compétition contre la SAdoMet(^{14}C) s'accroît et le rapport $^3H/^{14}C$ sur la 3-méthoxytyramine augmente. En établissant une droite d'étalonnage, on peut estimer avec grande précision la concentration en SAdoMet froide dans l'échantillon à doser. (162)

biteur de méthylation observé. En effet, la SAdoMet intracellulaire également de poids moléculaire relativement faible ($P_M = 398$) et éliminable aussi par dialyse ou filtration, pourrait si elle est présente à forte concentration relative dans l'extrait de foie, diluer la SAdoMet tritée et empêcher le transfert de groupements méthyles radioactifs sur le substrat à méthyler, qui seraient remplacés par des groupements méthyles non marqués. Dans ce cas, il s'agit d'une dilution isotopique plutôt que d'une inhibition proprement dite. La première hypothèse peut être testée en incubant la fraction enzymatique avec de la SAdoHcy hydrolase qui hydrolyse la SAdoHcy en adénosine et en homocystéine. Si l'absence apparente d'activité *in vitro* est due à une dilution isotopique, un dosage de la SAdoMet permettra de tester cette hypothèse (Fig. 41) (162).

L'inhibiteur peut aussi être une autre molécule comme un sel (Ca^{++} ,...) qui serait également aisément dialysable.

Ce travail a permis de mettre en évidence une méthylation endogène aussi bien dans les noyaux que dans le cytoplasme des cellules de foie de rat, il serait intéressant de savoir si ces méthylations affectent l'ADN, l'ARN, les protéines ou d'autres types moléculaires, comme des lipides. Les perspectives qu'offre ce genre de travail sont extrêmement larges et diversifiées dans la mesure où elles allient les méthodes biochimiques et génétiques aussi bien classiques que moléculaires.

L'enzymologie de la méthylation des acides ribonucléiques permet de décrire les mécanismes moléculaires de ces réactions. Cette description doit être prolongée par l'étude aussi bien *in vitro* qu'*in ovo* du rôle fonctionnel possible de ces méthylations.

La méthylation de l'ARN messager peut affecter entr'autres facteurs la traductibilité et la stabilité de ces molécules. L'étude du comportement en milieu acellulaire de traduction de messagers méthylés *in vitro* permet de quantifier à l'aide de paramètres bien maîtrisés (concentration en ARNt, force ionique,...), la traductibilité de ces molécules en compa-

raison avec des messagers naturels. Cette étude en milieu acellulaire est ensuite prolongée par le même type d'investigation *in ovo* (oocytes de Xénope). L'influence de la méthylation sur la stabilité des messagers est approchée par l'étude des demi-vies des molécules méthylées *in vitro* en comparaison avec des messagers naturels ou encore sous-méthylés provenant par exemple de la souche de levure auxotrophe pour la SAdoMet. Cette étude doit aussi avoir lieu *in ovo* après injection des messagers dans des oocytes de Xénope.

Ces approches "classiques" du rôle fonctionnel de la méthylation des ARNm demeurent générales et ne permettent pas de préciser l'incidence d'une méthylation spécifique. Une approche "rétrogénétique" basée sur le génie génétique rend aujourd'hui possible ce type d'étude. L'outil du génie génétique (construction de vecteurs d'expression, mutagenèse *in vitro*,...) permet en effet par sa puissance et sa finesse d'investigation de préciser le rôle fonctionnel d'une méthyltransférase bien spécifique. Cette approche rétrogénétique nécessitant une fraction enzymatique purifiée consiste à étudier des mutants où la méthylase qui modifie l'ARNm en un site très précis est absente ou inactive (160,161). La lésion phénotypique est ensuite étudiée par comparaison avec un témoin isogénique. Ce type d'étude est en de nombreux points très prometteur et c'est sans doute par ce biais relayé par les méthodes biochimiques et génétiques classiques que le rôle fonctionnel de la méthylation des acides ribonucléiques sera élucidé.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Griffith F., 1928, *J. Hyg., Cambridge, Eng.*, 27, 113.
- (2) Dawson M.H., Sia R.H.P., 1931, *J. Exp. Med.*, 54, 681.
- (3) Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M.D., 1944, *J. Exp. Med.*, 79, 137-158.
- (4) Dickerson R., 1983, *Scient. Am.*, 249, 86-102.
- (5) Ptashne M., Johnson A.D., Pabo C.O., 1982, *Scient. Am.*, 247, 106-120.
- (6) Volkin E., Astrachan L., 1956, *Virology*, 2, 433-437.
- (7) Jacob F., Monod J., 1961, *J. Mol. Biol.*, 3, 318-356.
- (8) Warner J.R., Rich A., Hall G.E., 1962, *Science*, 138, 1399-1403.
- (9) Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., Isenrentant D., Merregaert J., Minjou W., Molemans F., Raemaekers A., Vandenberghe A., Volckaert G., Ysebaert M., 1976, *Nature*, 260, 500-507.
- (10) Minjou W., Fiers W., 1978, in *Biochemistry of Nucleic Acids 2*, Int. Rev. Biochem., 17, Clark, B.F.C., (Ed.), Un. Park Press, Baltimore, 75.
- (11) Faure A., Morel C., Scherrer K., 1975, *Eur. J. Biochem.*, 57, 147-157.
- (12) Efstradiatis A., Kafatos F.C., Maniatis T., 1977, *Cell*, 10, 571-585.
- (13) Sundquist B., Persson T., Lindberg U., 1977, *Nucl. Acids Res.*, 4, 899-916.
- (14) Busch H., 1976, *Persp. Biol. Med.*, 19, 549-567.
- (15) Patzelt E., Blaas D., Kuechler E., 1983, *Nucl. Acids Res.*, 11, 5821-5835.
- (16) Revel M., Groner Y., 1978, *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 1079-1126.
- (17) Lerner M.R., Steitz J.A., 1981, *Cell*, 25, 298-300.
- (18) Chambon P., 1975, *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 613-638.
- (19) Jackson D.A., McCready S.J., Cook P.R., 1981, *Nature*, 292, 552-555.
- (20) Goldberg M., 1978, Thesis, Stanford University, USA.
- (21) Corden M., 1981, *Science*, 209, 1406-1414.
- (22) Zaret K., Sherman F., 1982, *Cell*, 28, 563-573.
- (23) Marbaix G., Huez G., Soreq H., 1977, *TIBS*, 2, 106-107.
- (24) Marbaix G., 1978, *Les ARNm de l'hémoglobine, isolement, traduction de leur information génétique, rôle de leur segment polyadénylique.*
Travail présenté en vue de l'obtention du titre d'Agrégé de l'enseignement supérieur.

- (25) Boone R.F., Moss B., 1977, *Virology*, 79, 67.
- (26) Reddy R., Ro-Choi T., Henning D., Busch H., 1974, *J. Biol. Chem.*, 249, 6486-6494.
- (27) Banerjee A.K., 1980, *Microbiol. Rev.*, 44, 175-205.
- (28) Langberg S.R., Moss B., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256, 10054-10060.
- (29) Kastern W., Berry S.J., 1976, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1, 37-44.
- (30) Brawerman G., 1974, *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 621-642.
- (31) Sawicki S.G., Jelinick W., Darnell J.E., 1977, *J. Mol. Biol.*, 113, 219-235.
- (32) Brawerman G., 1976, *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, 17, 118-148.
- (33) Nakazato H., Venkatesan S., Edmons M., 1975, *Nature*, 256, 144-146.
- (34) Ohta N., Sanders M., Newton A., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2343-2346.
- (35) Huez G., Marbaix G., Gallwitz D., Weinberg E., Devos R., Hubert E., Cleuter Y., 1978, *Nature*, 271, 572-573.
- (36) Marbaix G., Huez G., Soreq H., Gallwitz D., Weinberg E., Devos R., Hubert E., Cleuter Y., 1979, *FEBS 12th Meeting, Dresden, 1978*, 51, Gene function, Rosenthal et al. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, 427-438.
- (37) Huez G., Marbaix G., Hubert E., Leclercq M., Nudel V., Soreq H., Salomonson R., Lebleu B., Revel M., Littauer U.Z., 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3134-3146.
- (38) Hieter P.A., Legendre S.M., Levy C.C., 1976, *J. Biol. Chem.*, 251, 3287-3293.
- (39) Muller W.E., Arender J., Zahn R.K., Schroder H.C., 1977, *Eur. J. Biochem.*, 86, 283-290.
- (40) Slonimski P.P., Claisse M.L., Foucher M., Jacq C., Kochko A., Lamouroux A., Pajot P., Perrodin G., Spyridakis A., Wambier-Kuppel M.L., 1979, in *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Bacila M., Horecker B.L., Stoppani A.O.M., (Eds.), Academic Press, New York.
- (41) Dawid I.B., Botchan P., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4233-4237.
- (42) Melton D.A., De Robertis E.M., Cortes R., 1980, *Nature*, 284, 143-148.
- (43) Kourilsky P., Chambon P., 1978, *TIBS*, 3, 244-247.
- (44) Royal A., Garapin A., Cami B., Perrin F., Mandel J.L., Lemeur M., Bregegegre F., Gannon F., Lepennec J.P., Chambon P., Kourilsky P., *Nature*, 279, 125-132.

- (45) Brack C., Tonegawa S., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5652.
- (46) Flavell R.A., Glover D.M., Jeffreys A.J., 1978, TIBS, 3, 241-244.
- (47) Breathnach R., Benoist C., O'Hare K., Gannon F., Chambon P., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4853-4857.
- (48) Perry R.P., Kelly D.E., 1974, Cell, 1, 37-42.
- (49) Desrosiers R., Friderici K., Rottman F., 1974, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3971-3975.
- (50) Kühne T., Wieringa B., Reiser J., Weissmann C., 1983, EMBO J., 2, 727-733.
- (51) Sharp P.A., 1981, Cell, 23, 643-646.
- (52) Locht C., 1984, Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, Méthylation in vitro de la coiffe 5'-terminale de l'ARNm de la levure Saccharomyces cerevisiae au moyen d'enzymes extraites de germes de blé et de levure, Université Catholique de Louvain.
- (53) Kim C.H., Sarma R.H., 1977, Nature, 270, 223-227.
- (54) Lawley P.D., 1966, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 5, 89-131.
- (55) Lawley P.D., Brookes P., 1961, Nature, 192, 1081-1082.
- (56) Hains J., Reese C., Todd A., 1967, J. Chem. Soc., 1962, 5281-5288.
- (57) Randerath C.T., Randerath K., 1972, Anal. Biochem., 48, 172-198.
- (58) Furuichi Y., La Fiandra A., Shatkin A.J., 1977, Nature, 266, 235-239.
- (59) Lockard R.E., Rajbhandary U.L., 1976, Cell, 9, 747-760.
- (60) Parish J.H., 1972, Principles and Practice of Experiments with Nucleic Acids, (Longman Eds.).
- (61) Barnard E.A., 1969, Ann. Rev. Biochem., 38, 677-732.
- (62) Miura K.I., Watanabe K., Sugiura M., 1974, J. Mol. Biol., 86, 31-48.
- (63) Sherman F., Fink G.F., Hicks J., 1979, Laboratory Manual for Methods in Yeast Genetics, (C.S.H., N.Y.).
- (64) Wei C., Moss B., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 318-322.
- (65) Munns T., Oberst R., Sims H., Liszewski M., 1979, J. Biol. Chem., 254, 4327-4330.
- (66) Munns T., Morrow C., Hunsley J., Oberst R., Liszewski M., 1979, Biochemistry, 18, 3804-3810.
- (67) Tutas D., Paoletti E., 1977, J. Biol. Chem., 252, 3092-3098.
- (68) Yagi Y., Mizumoto K., Kaziro Y., 1983, EMBO J., 2, 611-615.

- (69) Itoh N., Mizumoto K., Kaziro Y., 1983, FEBS Lett., 155, 161-166.
- (70) Venkatesan S., Moss B., 1980, J. Biol. Chem., 255, 2835-2842.
- (71) Martin S., Paoletti E., Moss B., 1975, J. Biol. Chem., 250, 9322-9329.
- (72) Martin S., Moss B., 1976, J. Biol. Chem., 251, 7313-7321.
- (73) Shuman S., Surks M., Furneaux H., Hurwitz J., 1980, J. Biol. Chem., 255, 11588-11598.
- (74) Shuman S., Hurwitz J., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 187-191.
- (75) Mizumoto K., Lipmann F., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4961-4965.
- (76) Venkatesan S., Gershowitz A., Moss B., 1980, J. Biol. Chem., 255, 2824-2834.
- (77) Nishikawa Y., Chambon P., 1982, EMBO J., 1, 485-492.
- (78) Keith J.M., Venkatesan S., Gershowitz A., Moss B., 1982, Biochemistry, 21, 327-333.
- (79) Toyama R., Mizumoto K., Nakahara Y., Tatsuno T., Kaziro Y., 1983, EMBO J., 2, 2195-2201.
- (80) Cantoni G.L., 1975, Ann. Rev. Biochem., 44, 435-451.
- (81) Martin S., Moss B., 1975, J. Biol. Chem., 250, 9330-9335.
- (82) Ensinger M.J., Moss B., 1976, J. Biol. Chem., 251, 5283-5291.
- (83) Lane B.G., 1981, Can. J. Biochem., 59, 868-870.
- (84) Locht C., Beaudart J.L., Delcour J., 1983, Eur. J. Biochem., 134, 117-121.
- (85) Barbosa E., Moss B., 1978, J. Biol. Chem., 253, 7692-7697.
- (86) Barbosa E., Moss B., 1978, J. Biol. Chem., 253, 7698-7702.
- (87) Langberg S.R., Moss B., 1981, J. Biol. Chem., 256, 10054-10060.
- (88) Keith J.M., Ensinger M.J., Moss B., 1978, J. Biol. Chem., 253, 5033-5041.
- (89) Bajszar G., Szabo G., Simoncsits A., Molnar J., 1978, Molec. Biol. Rep., 4, 93-96.
- (90) Salditt-Georgieff M., Harpold M., Chen-Kiang S., Darnell J.E., 1980, Cell, 19, 69-78.
- (91) Stevens A., 1981, Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 1150-1155.
- (92) Darnell J.E., 1979, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 22, 327-353.
- (93) Banerjee A.K., Abraham G., Colonna R.J., 1977, J. Gen. Virol., 34, 1-8.

- (94) Rose J., Lodish H., Brock M., 1977, *J. Virol.*, 21, 683-693.
- (95) Plotch S.J., Bouloy M., Ulmanen J., Krug R.M., 1981, *Cell*, 23, 847-858.
- (96) Furuichi Y., 1974, *Nucl. Acids Res.*, 1, 809-822.
- (97) Furuichi Y., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1086-1090.
- (98) Furuichi Y., Shatkin A.J., 1979, in *Transmethylation*, 351-360, (Udsin, R.T., Borchardt R.T., Creveling C.R., Eds.), Elsevier, North-Holland, N.Y.
- (99) Coppola J.A., Field A.S., Luse D.S., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1251-1255.
- (100) Schwartz T., Craig E., Kennell D., 1970, *J. Mol. Biol.*, 54, 299-311.
- (101) Lodish H.F., Rose J.K., 1977, *J. Biol. Chem.*, 252, 1181-1189.
- (102) Shimotohno K., Kodama Y., Hashimoto J., Miura K., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2734-2738.
- (103) Lockard R.E., Lane C., 1978, *Nucl. Acids Res.*, 5, 3237-3247.
- (104) Rose J.K., Trachsel H., Leong K., Baltimore D., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2731-2736.
- (105) Both G., Banerjee A.K., Shatkin A.J., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1189-1193.
- (106) Muthukrishnan S., Both G., Furuichi Y., Shatkin A.J., 1975, *Nature*, 255, 31-37.
- (107) Rose J.K., 1975, *J. Biol. Chem.*, 250, 8094-8104.
- (108) Furuichi Y., Morgan M., Shatkin A.J., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 6732-6738.
- (109) Asselbergs F.A., Peters W.H., Van Venrooij W.J., Bloemendal H., 1978, *Biochem. Biophys. Acta*, 520, 577-587.
- (110) Wodnar-Filipowicz A., Szczesna E., Zan-Kawalczewska M., Muthukrishnan S., Szybiak U., Legocki A.B., Filipowicz W., 1978, *Eur. J. Biochem.*, 92, 69-80.
- (111) Hickey E.D., Weber L.A., Baglioni C., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 19-23.
- (112) Seal S., Schmidt A., Tamaszewski M., Marcus A., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82, 553-559.

- (113) Adams B.L., Morgan M., Muthukrishnan S., Hecht S.M., Shatkin A.J., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253, 2589-2595.
- (114) Both G.W., Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A.J., 1976, *J. Mol. Biol.*, 104, 637-658.
- (115) Kozak M., 1979, *Nature*, 280, 82-85.
- (116) Rosenberg M., Paterson B.M., 1979, *Nature*, 279, 696-701.
- (117) Rosenberg M., Paterson B.M., 1979, *Nature*, 279, 692-696.
- (118) Schafritz D.A., Weinstein J.A., Safer B., Merrick W.C., Weber L.M., Hickey E.D., Baglioni C., 1976, *Nature*, 261, 291-294.
- (119) Sonenberg N., Morgan M.A., Merrick W., Shatkin A.J., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4843-4847.
- (120) Rupprecht K.M., Sonenberg N., Shatkin A.J., Hecht S.M., 1981, *Biochemistry*, 20, 6570-6577.
- (121) Sonenberg N., Rupprecht K.M., Hecht S., Shatkin A.J., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4345-4349.
- (122) Sonenberg N., Guertin D., Cleveland D., Trachsel H., 1981, *Cell*, 27, 563-572.
- (123) Sonenberg N., Skup D., Trachsel H., Millward S., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256, 4138-4141.
- (124) Trachsel H., Sonenberg N., Shatkin A.J., Rose J.K., Leong K., Bergmann J.E., Gordon J., Baltimore D., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 770-774.
- (125) Kozak M., 1983, *Microbiol. Rev.*, 47, 1-45.
- (126) Kozak M., 1981, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 93, 81-123.
- (127) Vogeli G., Ohkubo H., Sobel M.E., Yamadai Y., Pastan I., De Crombrughe B., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5334-5338.
- (128) Kozak M., 1981, *Nucl. Acids Res.*, 9, 5233-5252.
- (129) Sonenberg N., Morgan M., Testa D., Colonna R.J., Shatkin A.J., 1979, *Nucl. Acids Res.*, 7, 15-29.
- (130) Maggio R., Siekevitz P., Palade G.E., 1963, *J. Cell Biol.*, 18, 267-293.
- (131) Sadowski P.P., Steiner J.W., 1968, *J. Cell Biol.*, 37, 147-161.

- (132) Bradford M.M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- (133) Keith J.M., Venkatesan S., Gershowitz A., Moss B., 1982, *Biochemistry*, 21, 327-333.
- (134) Roeder R.G., Rutter W.J., 1970, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65, 675-682.
- (135) Keith J.M., 1983, in *Enzymes of Nucleic Acids Synthesis and Modification*, vol. II, RNA Enzymes, 111-134, Samson T., Jacob ed.), CRC Boca Raton.
- (136) Vandenhoute J., 1981, Thèse doctorale annexe, Fac. N-D de la Paix.
- (137) Moldave K., Easior E., 1983, in *Methods in Enzymology*, 101, 644-650.
- (138) Jongstra J., Reudelhuber T.L., Oudet P., Benoist C., Chae C.B., Jeltsch J.M., Mathis D.J., Chambon P., 1984, *Nature*, 307, 708-714.
- (139) Proudfoot N., Brownlee G., 1976, *Nature*, 263, 211.
- (140) Higgs D.R., 1983, *Nature*, 306, 398.
- (141) Birchmeier C., Grosschedl R., Birnstiel M., 1982, *Cell*, 28, 739-745.
- (142) Montell C., Fischer E.F., Caruthers M., Berk A.J., 1983, *Nature*, 305, 600-605.
- (143) Tener G.M., 1967, in *Methods in Enzymology*, vol. XVII A, 398-404.
- (144) Gross H., Kroath H., Janda H.G., Jungwirth D., 1978, *Molec. Biol. Rep.*, 4, 105-110.
- (145) Albers R., Goffin B., Rottman F.M., 1981, *Anal. Biochem.*, 113, 118-123.
- (146) Langford C., Gallwitz D., 1983, *Cell*, 33, 519.
- (147) Wieringa B., Meyer F., Reiser J., Weissman C., 1983, *Nature*, 301, 38-43.
- (148) Gang G., Lavers G.C., 1979, *Molec. Biol. Rep.*, 6, 35-38.
- (149) Shinshi J., Mina M., Kato K., Noguchi M., Matsushiura T., Sugimura T., 1976, *Biochemistry*, 15, 2185-2190.
- (150) Nuss D., Furuichi Y., 1977, *J. Biol. Chem.*, 252, 2815-2821.
- (151) Sherman F., Stewart J.W., 1982, in *Molecular Biology of Yeast Saccharomyces*, Metabolism and Gene Expression, 301-333, (Strathern, Jones, Broach eds), C.S.H., New York.
- (152) Liu C.C., Simonsen C., Levinson A., 1984, *Nature*, 309, 82-85.
- (153) Obara M., Hirano H., Higashi K., 1982, *Biochemistry*, 21, 1374-1380.
- (154) Lewin B., 1983, *Genes*, John Wiley ed, New York.
- (155) Kim S.H., Quigley G.J., Suddath F.L., Mc Pherson D., Kim J.J., Weinzier J., Rich A., 1973, *Science*, 179, 285-288.
- (156) Keith J.M., Winters E.M., Moss B., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255, 4636-4644.
- (157) Klotwijk J., Planta R.J., 1973, *Eur. J. Biochem.*, 39, 325-333.

- (158) Rodeh R., Feldman M., Littauer V., 1967, *Biochemistry*, 6, 451-460.
- (159) Gambarayan A.S., Venkstern T.V., Baev A.A., 1976, *Mol. Biol.*, 10, 846.
- (160) Young R., Davis R., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1194-1198.
- (161) Young R., Davis R., 1983, *Science*, 222, 778-782.
- (162) Locht C., 1979, Mémoire en vue de l'obtention du grade de Licencié en Sciences Zoologiques, U.C.L.
- (163) Berkaloff P., Lacroix J.C., Favard N., Favard P., 1981, *Biologie et Physiologie Cellulaires*, Herman ed, Paris.
- (164) Nomura M., 1984, *Scient. Am.*, 250, 72-83.
- (165) Flint J., 1983, in *Processing of RNA*, Apirion D. ed, CRC, Boca Raton.

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION

1. Le concept de messenger	1
2. L'ARN messenger eucaryote	3
2.1. Architecture moléculaire	3
2.2. Transcription du pré-ARNm	6
2.3. La maturation posttranscriptionnelle	8
2.3.1. Le coiffage 5'-terminal	9
2.3.2. La polyadénylation 3'-terminale	10
2.3.3. Excision et épissage	11
2.3.4. Les méthylations internes	13
3. La coiffe 5'-terminale	14
3.1. Distribution phylogénique	14
3.2. Propriétés de la coiffe	15
3.2.1. Propriétés stériques	15
3.2.2. Propriétés chimiques	15
3.2.3. Propriétés enzymologiques	17
3.2.4. Propriétés immunologiques	17
3.3. Les enzymes de coiffage et de méthylation de l'ARNm eucaryote	18
3.3.1. L'ARNm 5'-triphosphatase	18
3.3.2. L'ARNm guanylyltransférase	19
3.3.3. L'ARNm (guanine-7-)-méthyltransférase	21
3.3.4. L'ARNm (nucléoside-2'-)-méthyltransférase	22
3.3.5. L'ARNm (2'-O-méthyladénosine-N-6-)-méthyltransférase	23
3.3.6. Le complexe multienzymatique de coiffage et de méthylation	24
3.3.7. Les enzymes de décoiffage	25
4. Les rôles fonctionnels de la coiffe de l'ARNm	25
4.1. La biogenèse de l'ARNm	25
4.2. La stabilité de l'ARNm	27
4.3. La synthèse protéique	28
4.3.1. La traduction d'ARNm non coiffés et/ou sous-méthylés	28
4.3.2. L'inhibition de la traduction par des analogues de coiffe	29
4.3.3. La liaison ribosome-coiffe	30
4.3.4. La protéine fixatrice de la coiffe (PFC)	30
4.3.5. Le modèle d'initiation de la traduction	31
5. But du travail	33

MATERIEL ET METHODES

1. Souche de levure, milieu de culture et croissance	35
2. Extraction de l'ARN total de levure	35
3. Purification de l'ARN poly(A) ⁺ de levure par chromatographie d'affinité	36

4. Préparation de noyaux de cellules de foie de rat	37
5. Extraction des enzymes de méthylation	38
5.1. Chromatographie de filtration sur Séphadex G-25	39
5.2. Chromatographie échangeuse d'ions	39
6. Dosage des protéines	39
7. Test de méthylation de l'ARN poly(A) ⁺ <i>in vitro</i>	40
8. Test de méthylation endogène de germe de blé	41
9. Analyse de(s) résidu(s) méthylé(s)	42
9.1. Analyse par chromatographie échangeuse d'ions	42
9.2. Analyse par chromatographie descendante sur papier	43

RESULTATS

1. Mise en évidence d'un inhibiteur nucléaire de méthylation	44
2. Possibilité d'un effet inhibiteur des ions Ca ⁺⁺ sur les méthyl- transférases	52
3. Isolement de l'activité enzymatique par chromatographies sur Séphadex G-25 et DEAE-cellulose	54
4. Optimisation du test de méthylation <i>in vitro</i>	59
4.1. Influence du pH	59
4.2. Influence du NaCl	62
4.3. Influence du KCl	63
4.4. Effet du Mg (Ac) ₂	63
4.5. Inhibition de la méthylation par le Ca ⁺⁺	64
4.6. Influence de la concentration en ARN poly(A) ⁺	65
5. Analyse de(s) résidu(s) méthylé(s) par chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie descendante sur papier	66

<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	74
------------------------------------	----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	82
----------------------	----

<u>TABLE DES MATIERES</u>	90
---------------------------	----