

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude par une méthode de double marquage in vivo de l'effet inhibiteur de la néplanocine A sur la méthylation de l'ARN de la levure *saccharomyces cerevisiae*

Henryon, Bénédicte

Award date:
1986

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.

1986



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

ETUDE PAR UNE METHODE DE DOUBLE MARQUAGE
IN VIVO DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA
NEPLANOCINE A SUR LA METHYLATION DE
L'ARN DE LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

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

Bénédicte HENRYON

Ce mémoire n'a pu être réalisé qu'avec le concours d'un certain nombre de personnes auxquelles j'exprime ma reconnaissance.

Je tiens toutefois à remercier particulièrement

le professeur J. Delcour, qui m'a accueilli dans son laboratoire,

le Docteur J. Van Den Haute, qui a bien voulu assurer la direction de mon mémoire,

tous les membres du laboratoire,

Mesdames M. Dewez, R.M. Wilmet, C. Dernoncourt et M. Libion, Mesdemoiselles G. Renauld, C. Bierneaux, Monsieur F. Dessy, pour l'aide et les encouragements qu'ils m'ont apportés,

Madame M.F. Ronveaux, Messieurs A. Bauchau, E. Depierreux, F. Mainferme, J. Van Den Haute qui ont accepté de lire ce mémoire,

le Docteur et Madame Beuloye qui nous ont ouvert leur foyer pour permettre le traitement informatique de ce mémoire et qui nous ont accueilli de nombreuses soirées avec beaucoup d'amitié,

mon mari, enfin, qui a partagé mes joies et mes difficultés, et qui m'a fait part de son expérience tout au long de l'année.

* LISTE DES ABREVIATIONS.*

a.a. : acide aminé.
ARNm : ARN messenger.
ARNr : ARN ribosomique.
ARNt : ARN de transfert.
CPM : coups par minute.
DO : densité optique.
DPM : désintégrations par minute.
E : 10 exposant (par exemple 1 E-06 = 1 x 10⁻⁶).
m₂₆A = m₂A = Adénine comprenant deux méthyles en position 6.
NPCA : néplanocine A.
nts : spacer non transcrit.
RPM : rotations par minute.
r-DNA : ADN codant pour de l'ARNr.
r-protéine : protéine ribosomique.
SAH : S Adénosyl Homocystéine.
SAM : S Adénosyl Méthionine.
ts : spacer transcrit.
U : Uridine.
U.R. : unité de répétition.
U.T. : unité de transcription.

 TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION.

P.

9. 1. DE L'ADN A LA PROTEINE: RECOURS A LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTEIQUE.
10. 2. LE RIBOSOME.
10. 2.1. Constitution du ribosome.
12. 2.2. Biosynthèse du ribosome.
14. 2.3. Fonctions des constituants ribosomiques.
16. 3. DESCRIPTION DE L'ARN RIBOSOMIQUE.
16. 3.1. Structure de l'ARN ribosomique.
16. 3.1.1. Structure primaire de l'ARNr.
17. 3.1.2. Structures secondaires et tertiaires de l'ARNr.
20. 3.1.3. Structure tridimensionnelle de l'ARNr.
21. 3.2. Biosynthèse des ARNr.
21. 3.2.1. Organisation générale des gènes d'ARNr.
24. 3.2.2. Maturation des ARNr.
24. A. Clivage et émondage de la molécule précurseur.
28. B. Bref aperçu des autres modifications post-transcriptionnelles.
31. 4. LA METHYLATION, EVENEMENT IMPORTANT DANS LA MATURATION DES ARNr.
31. 4.1. Introduction.
33. 4.2. Classification des méthylations.
35. 4.3. Fréquences relatives et répartition des différents groupes méthyles sur les molécules d'ARN.
35. 4.3.1. Molécules d'ARNr majeur.
35. A. Fréquence relative des divers groupes méthyles présents sur l'ARN de différentes espèces.
36. B. Répartition générale des différents groupes méthyles sur les molécules d'ARN.

37. C. Localisation précise des groupes méthyles sur l'ARNr 18S de l'homme et du Xénope.
39. 4.3.2. Méthylation des ARNr mineurs.
40. 4.4. Processus de méthylation: recours à des enzymes spécifiques.
42. 4.5. La méthylation: son importance et ses fonctions.
43. 1. Rôle de la méthylation dans le processus de maturation de l'ARN.
43. A. Cas des procaryotes.
44. B. Cas des eucaryotes.
44. 2. Rôle de la méthylation dans l'assemblage du ribosome.
45. 3. Implication des méthylations dans le fonctionnement du ribosome.
46. 5. ETUDE DE LA METHYLATION DES ARNr EUCARYOTIQUES.
46. 5.1. L'organisme utilisé: Saccharomyces cerevisiae.
47. 5.2. Etude de la méthylation chez les eucaryotes: approche génétique et approche pharmaceutique.
48. 5.3. Un cas d'application des drogues: la NPCA.
48. 5.3.1. Caractéristiques générales de la NPCA.
49. 5.3.2. Effets de la NPCA.
49. A. Effet sur la croissance.
51. B. Effet sur la méthylation de l'ARNr.
51. 5.3.3. Mode d'action de la NPCA.
53. 5.3.4. Etude de l'influence de la NPCA sur cellules de levures: principe du double marquage.

MATERIEL ET METHODES.

55. 1. SOUCHE UTILISEE.
55. 2. METHODES GENERALES.

- 55. 2.1. Préparation des milieux de culture.
- 55. 2.2. Préparation des tampons.
- 56. 2.3. Mise en culture des cellules.
- 56. 2.4. Courbe de croissance de la souche F1100.

- 57. 3. METHODES D'ETUDE DES ARN.
- 57. 3.1. Conditions de croissance et marquage de l'ARN.
- 57. 3.2. Extraction de l'ARN.
 - 57. 3.2.1. Sédimentation et lavage des cellules.
 - 57. 3.2.2. Broyage et extraction phénolique.
 - 58. 3.2.3. Précipitation des ARN à l'éthanol.
 - 58. 3.2.4. Mesure des quantités d'ARN récoltées.
- 59. 3.3. Méthode d'analyse des ARN marqués.
 - 59. 3.3.1. Réalisation d'une courbe d'efficacité du comptage du 3-H et du 14-C en fonction du RSE.
 - 59. 3.3.2. Mesure de la radioactivité incorporée sur les molécules d'ARN.

RESULTATS ET DISCUSSION.

- 62. 1. CARACTERISATION DE LA SOUCHE F1100: COURBE DE CROISSANCE.

- 63. 2. DETERMINATION DU VOLUME MINIMAL DE CULTURE PERMETTANT UNE EXTRACTION D'ARN SUFFISANTE.
 - 65. A. Quantité de milieu utilisée.
 - 65. B. Spectre U.V. de l'ARN de levure.

- 66. 3. MISE AU POINT DES CONDITIONS POUR REALISER UNE MESURE INDEPENDANTE DE L'INCORPORATION DES PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES ET DES METHYLS DE L'ARN SYNTHETISE.

66. 3.1. Réalisation des conditions relatives au comptage.
66. 3.1.1. Principes généraux du double marquage.
68. 3.1.2. Détermination de l'ouverture des fenêtres de comptage.
70. 3.1.3. Réalisation de la courbe d'étalonnage: efficacité du comptage en fonction du RSE.
72. 3.2. Réalisation des conditions relatives au marquage.
72. 3.2.1. Considérations générales.
73. 3.2.2. Simple marquage de l'ARN.
73. 3.2.3. Double marquage de l'ARN.
75. 4. ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA NPCA SUR CELLULES DE LEVURE.
75. 4.1. Caractérisation de la NPCA: réalisation d'un spectre d'absorption.
76. 4.2. Influence de la NPCA sur la croissance des cellules.
78. 4.3. Etude de l'effet inhibiteur de la NPCA sur la méthylation des cellules de levure. Marquage pendant toute la durée de la croissance.
78. 4.3.1. Réalisation d'un contrôle = 100 % de méthylation.
78. A. Mesure de la variabilité incontrôlée des valeurs 3-H et 14-C. Répétition d'une expérience type.
79. B. Les conditions de culture et/ou d'extraction peuvent-elles être cause de la variabilité expérimentale observée?
81. 4.3.2. Influence de la NPCA sur la méthylation.
83. 4.3.3. Le rapport 3-H / 14-C varie-t-il en fonction de la densité de la culture?
85. 4.4. Marquages à durée limitée.
85. 4.4.1. Réalisation d'un test contrôle équivalent à 100% de méthylation.
87. 4.4.2. Etude de l'influence de la dose de la NPCA sur l'inhibition de la méthylation chez Saccharomyces cerevisiae. Marquage à durée limitée.
87. A. Marquage pendant 1h30'.
88. B. Marquage pendant 3 heures.

89. 4.4.3. Marquage à durée limitée. Extractions répétées à intervalles de temps déterminés.
89. A. Evolution du rapport spécifique de méthylation chez un témoin.
91. B. Recherche de l'effet inhibiteur de la NPCA par extractions répétées au cours de la culture.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

98. 1. EVOLUTION DU RAPPORT 3-H / 14-C AU COURS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE.
98. 2. INFLUENCE DE LA NPCA SUR LA METHYLATION SPECIFIQUE DE L'ARN DE LEVURE.

INTRODUCTION

1. DE L'ADN A LA PROTEINE: RECOURS A LA MACHINERIE DE SYNTHÈSE PROTEIQUE.

La cellule est l'unité fondamentale constituant tous les êtres vivants. Elle est capable de croître, se multiplier, synthétiser de nombreuses molécules et transmettre ses caractéristiques à sa descendance. Ceci est possible car elle possède l'information nécessaire et les moyens pour l'exprimer. Chez les eucaryotes, cette information se trouve stockée dans un organite particulier, le noyau. Elle s'y trouve sous forme de longues molécules d'acide désoxyribonucléique ou ADN.

Toutefois, si l'ADN est le support de l'information cellulaire, toutes les fonctions sont, directement ou indirectement, réalisées grâce au concours des protéines. Faut-il rappeler que les protéines sont les plus abondantes des molécules organiques des cellules, représentant 50 % et même plus de leur poids sec?! Parmi celles-ci, les enzymes, qui interviennent dans de nombreuses réactions cellulaires, certaines hormones, des protéines de structure, des produits de stockage de la cellule (par exemple la caséine, l'ovalbumine...), des éléments contractiles (myosine...). Elles peuvent également permettre le transport de molécules comme l'oxygène, assurer la protection de l'organisme (par les anticorps...). Bref, elles assurent des fonctions très diverses et sont indispensables à la vie de l'organisme (1).

Mais comment ce passage de l'ADN-information vers la protéine - fonction peut-il s'opérer?

Il faut savoir que l'ADN est constitué d'un enchaînement de nucléotides. Chacun de ceux-ci est constitué d'une base purique ou pyrimidique, d'un désoxyribose et d'un groupement phosphate. On distingue quatre types de nucléotides suivant la nature de la base. De façon imagée, la séquence de nucléotides forme une sorte de phrase dont l'alphabet est constitué par les quatre types de nucléotides.

La protéine, quant à elle, est formée d'un enchaînement d'acides aminés. L'information contenue dans un acide aminé est codée par un mot particulier de trois nucléotides: un codon. Ainsi, à la séquence de codons de l'ADN correspond une séquence d'acides aminés.

Cependant, pour garder intacte dans le noyau la molécule informative et pour amplifier le phénomène d'expression de l'information de l'ADN en protéine, la cellule utilise un intermédiaire: l'ARN messager (=ARNm). Les ARNm sont des molécules d'acide ribonucléique également composées de nucléotides, constituant des copies conformes de l'ADN. Ce sont en fait ces ARNm qui serviront de modèles lors de l'élaboration de la protéine.

Pour synthétiser une protéine à partir d'ARNm, la cellule doit faire appel à un système complexe que l'on appelle la machinerie de synthèse protéique et dont l'élément principal est le ribosome. Celui-ci vient se fixer sur l'ARNm et, avec l'aide de plusieurs facteurs, va "lire" le message d'un bout à l'autre de la molécule et permettre l'enchaînement progressif des acides aminés correspondants.

Il contient à cet effet un site d'interactions avec une petite molécule d'ARN: l'ARN de transfert(=ARNt). Celle-ci reconnaît spécifiquement un codon par une de ses extrémités et se charge de l'acide aminé correspondant. C'est elle qui permet en fait de convertir le message de nucléotides en acides aminés. Cet ARNt chargé va venir se loger dans le ribosome et va reconnaître un codon de l'ARNm.

Grâce à un système d'interactions entre les différents constituants du complexe ainsi formé, le ribosome va permettre la formation de liens peptidiques entre l'acide aminé apporté et la chaîne protéique naissante. Il accueillera ensuite l'ARNt correspondant au codon suivant, et ainsi de suite jusqu'à l'élaboration complète de la protéine (2).

Nous constatons donc que le ribosome joue un rôle central dans le processus de synthèse protéique. Voyons plus en détails comment il se présente.

2. LE RIBOSOME.

2.1. Constitution du ribosome.

Le ribosome est un organite subcellulaire subsphérique de forme à peu près semblable tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (si ce n'est que le ribosome eucaryotique est légèrement plus grand) (3).

Chez les eucaryotes, le ribosome a un poids moléculaire approximatif de $4,5 \times 10^6$ daltons. Mais en général, on préfère le caractériser par son coefficient de sédimentation qui est de 80S environ. Ce ribosome est constitué de deux sous-unités asymétriques: une grande (60S) et une petite (40S). Chacune

* LISTE DES ABBREVIATIONS.*

a.a. : acide aminé.
ARNm : ARN messenger.
ARNr : ARN ribosomique.
ARNt : ARN de transfert.
CPM : coups par minute.
DO : densité optique.
DPM : désintégrations par minute.
E : 10 exposant (par exemple 1 E-06 = 1×10^{-6}).
m₂⁶A = m₂⁶ A = Adénine comprenant deux méthyles en position 6.
NPCA : néplanocine A.
nts : spacer non transcrit.
RPM : rotations par minute.
r-DNA : ADN codant pour de l'ARNr.
r-protéine : protéine ribosomique.
SAH : S Adénosyl Homocystéine.
SAM : S Adénosyl Méthionine.
ts : spacer transcrit.
U : Uridine.
U.R. : unité de répétition.
U.T. : unité de transcription.

d'elles est composée d'ARN et de protéines s'assemblant pour former finalement le ribosome.

La petite sous-unité comprend une molécule d'ARNr 18S et environ 30 protéines (ce nombre de protéines pourrait varier légèrement suivant l'espèce considérée). La grande sous-unité contient trois molécules d'ARNr différentes (28S; 5,8S; 18S). Le nombre de protéines généralement admis est de 49 (il peut y avoir des différences dans la détermination de ce nombre car certaines protéines s'assemblent très tardivement dans le cytoplasme).

On appelle couramment les ARNr 18S et 28S, les ARNr majeurs par opposition aux ARNr mineurs 5,8S et 5S.

Voici la composition du ribosome cytoplasmique du foie de rat (5):

	RIBOSOME	PETITE SOUS-UNITE	GRANDE SOUS-UNITE
COEFFICIENT DE SEDIMENTATION	80S	40S	60S
MASSE(daltons)	4420000	1400000	2820000
<u>RNA</u>		18S = 1900 b.	28S = 4700 b. 5,8S = 160 b. 5S = 120 b.
MASSE DU RNA	2520000	700000	1820000
PROPORTION PAR RAPPORT A LA MASSE	60 %	50 %	65 %
<u>PROTEINES</u>			
NOMBRE	82	33	49
MASSE	170000	700000	1000000
PROPORTION	40 %	50 %	35 %

Tableau 1. Composition du ribosome cytoplasmique du foie de rat (b = bases) (d'après 6).

Il faut remarquer qu'en ce qui concerne les ARNr majeurs des eucaryotes inférieurs, des désignations légèrement différentes

sont souvent adoptées (respectivement 25S et 17S pour 28S et 18S chez les eucaryotes supérieurs). La taille des sous-unités procaryotiques diffère légèrement. Les deux sous-unités ribosomiques sont plus petites. Elles sont désignées par les coefficients de sédimentation 50S et 30S.

Un schéma volontairement simpliste représentant les ARNr procaryotiques et eucaryotiques nous montre les corrélations existant entre les différents ARNr.

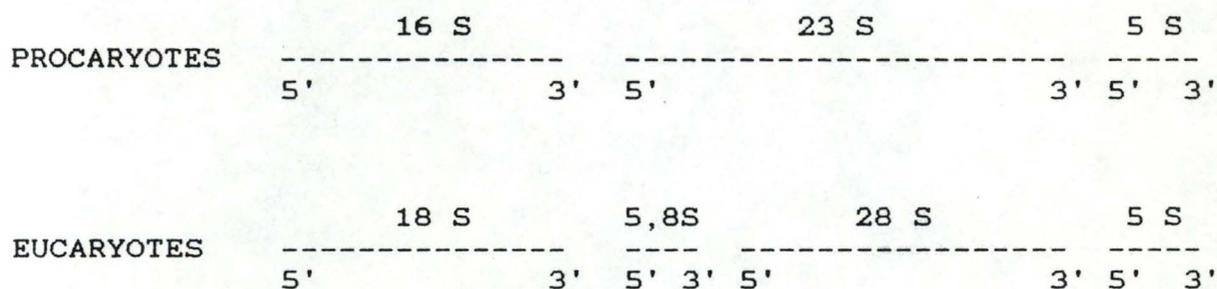


Fig. 1. Comparaison des ARNr procaryotiques et eucaryotiques (d'après 8).

dm A l'ARNr 18S de la petite sous-unité correspond l'ARNr 16S eucaryotique. Aux ARNr 5,8S et 28S eucaryotiques correspond l'ARNr 23S procaryotique. Il n'y a pas d'ARNr 5,8S chez les procaryotes mais il existe une séquence homologue à l'extrémité 5' de l'ARNr 23S.

Le nombre de protéines est de 34 dans la sous-unité 50S et de 21 dans la sous-unité 30S (8).

Suite à cette brève énumération des molécules constitutives du ribosome, nous pouvons à présent examiner comment s'agencent ces molécules entre elles pour en former la structure tridimensionnelle.

2.2. Biosynthèse du ribosome.

Dans le monde vivant qui nous entoure, la structure est toujours génératrice de la fonction. Autrement dit, à une fonction particulière correspond une structure déterminée. Aussi, pour pouvoir réaliser la synthèse protéique, la cellule doit-elle fabriquer des ribosomes ayant une structure bien définie. Cette structure est déterminée, c'est-à-dire mise en place et maintenue, par un jeu d'interactions entre différents constituants ribosomiques. L'ARNr constitue en fait la charpente

du ribosome où viennent s'imbriquer les différentes protéines selon une séquence temporelle définie et conduisant à une organisation spatiale particulière.

L'association des premières protéines avec l'ARNr engendre un changement de configuration de ce dernier. Ceci permet dès lors la fixation des protéines suivantes à l'ensemble. Celui-ci se modifie au fur et à mesure de l'assemblage, permettant l'association progressive de toutes les protéines pour former finalement le ribosome possédant une configuration spatiale déterminée.

L'assemblage du ribosome se fait en différentes étapes qui se passent dans différents compartiments cellulaires.

Les moments principaux ont été identifiés chez différents eucaryotes depuis la levure jusqu'aux mammifères et sont similaires. Les ARNr 5,8S, 18S, 28S proviennent en fait de la maturation d'une molécule précurseur unique. La transcription, la maturation et les modifications chimiques de l'ARNr se passent pour la plupart dans le nucléole et dans le nucléoplasme (ceci sera vu plus en détail au chapitre suivant).

Les protéines ribosomiques (r-protéines), elles, sont synthétisées dans le cytoplasme. Elles migreront pour la plupart à l'intérieur du nucléole où elles sont nécessaires pour une maturation correcte des différents ARNr et pour la formation des particules préribosomales. L'ARNr 5S, synthétisé à un autre endroit dans le noyau, vient s'incorporer à la grande sous-unité. Lorsque les protéines et les ARNr sont associés, les sous-unités ribosomiques presque complètes vont migrer dans le cytoplasme où viennent s'ajouter les dernières protéines. Les deux sous-unités sont dès lors constituées. Elles devront s'assembler avec l'ARNm pour permettre la synthèse protéique (3,9).

La forme du ribosome ainsi constitué est telle que nous le montre la figure 2.

Le ribosome eucaryotique est un peu plus grand que le ribosome procaryotique. Il est constitué de deux sous-unités asymétriques. La grande possède une protubérance centrale et deux périphériques en forme de doigt. La petite sous-unité est constituée d'une tête (environ le tiers de l'ensemble), d'une base et d'une plate-forme. Une fissure entre la tête et la plate-forme permet l'accellement avec la grande sous-unité. La protubérance centrale vient juste se loger à ce niveau (10).

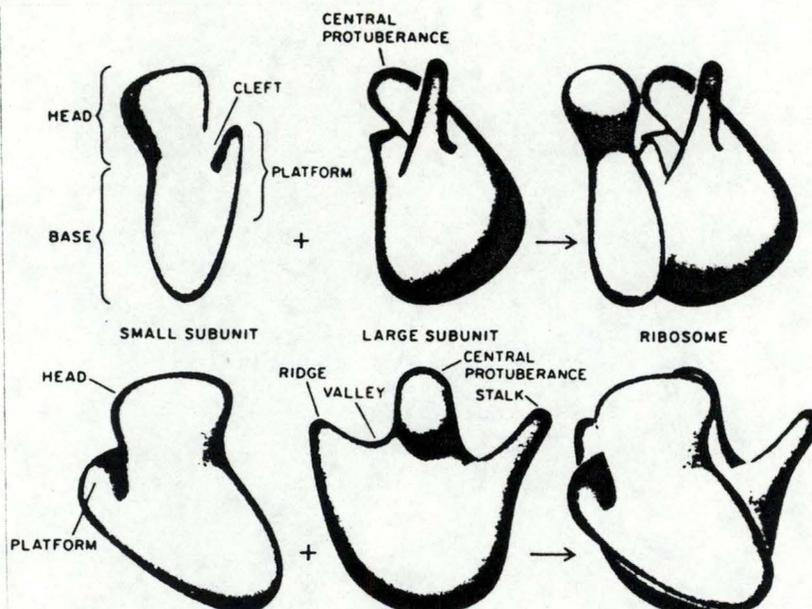


Fig. 2. :Modèle consensus tridimensionnel du ribosome.
Deux orientations sont ici décrites (10).

Il nous reste à nous poser la question du rôle de chacun des constituants ribosomiques.

2.3.Fonctions des constituants ribosomiques.

Le ribosome est un organite multicomposé et multifonctionnel. Il contient des protéines à fonctions enzymatiques diverses. On peut le qualifier en quelque sorte de "superenzyme" qui permet finalement l'assemblage des divers acides aminés à la suite les uns des autres selon un mode spécifique pour former la protéine.

Mais ceci ne se fait pas de façon magique. Il faut assurer au ribosome une structure permettant aux différentes enzymes impliquées d'exercer leur action. Nous avons déjà parlé à ce propos de l'effet de coopération lors de la biogenèse du ribosome (voir chapitre 2.2): les interactions des protéines avec les ARNr et les protéines entre elles lors de l'assemblage entraînent un changement de structure dans l'espace de l'ensemble et permettent la formation du ribosome.

Ces interactions qui assurent l'assemblage du ribosome sont sans doute aussi des interactions qui permettent le maintien de la structure adéquate au fonctionnement.

A ce propos, la figure 3. nous montre différentes interactions existant au niveau de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli*. La structure

tertiaire de l'ARNr 16S est ici représentée (cfr. le chapitre 3.1.3 concernant la structure tertiaire de l'ARNr). Les différentes flèches représentent les différentes interactions existantes. Il existe des interactions entre différentes parties de l'ARNr 16S, entre ARNt et ARNr, entre protéines et ARNr (16). Les interactions sont, au cours des différentes étapes du fonctionnement du ribosome, probablement des interactions changeantes (structure fluide).

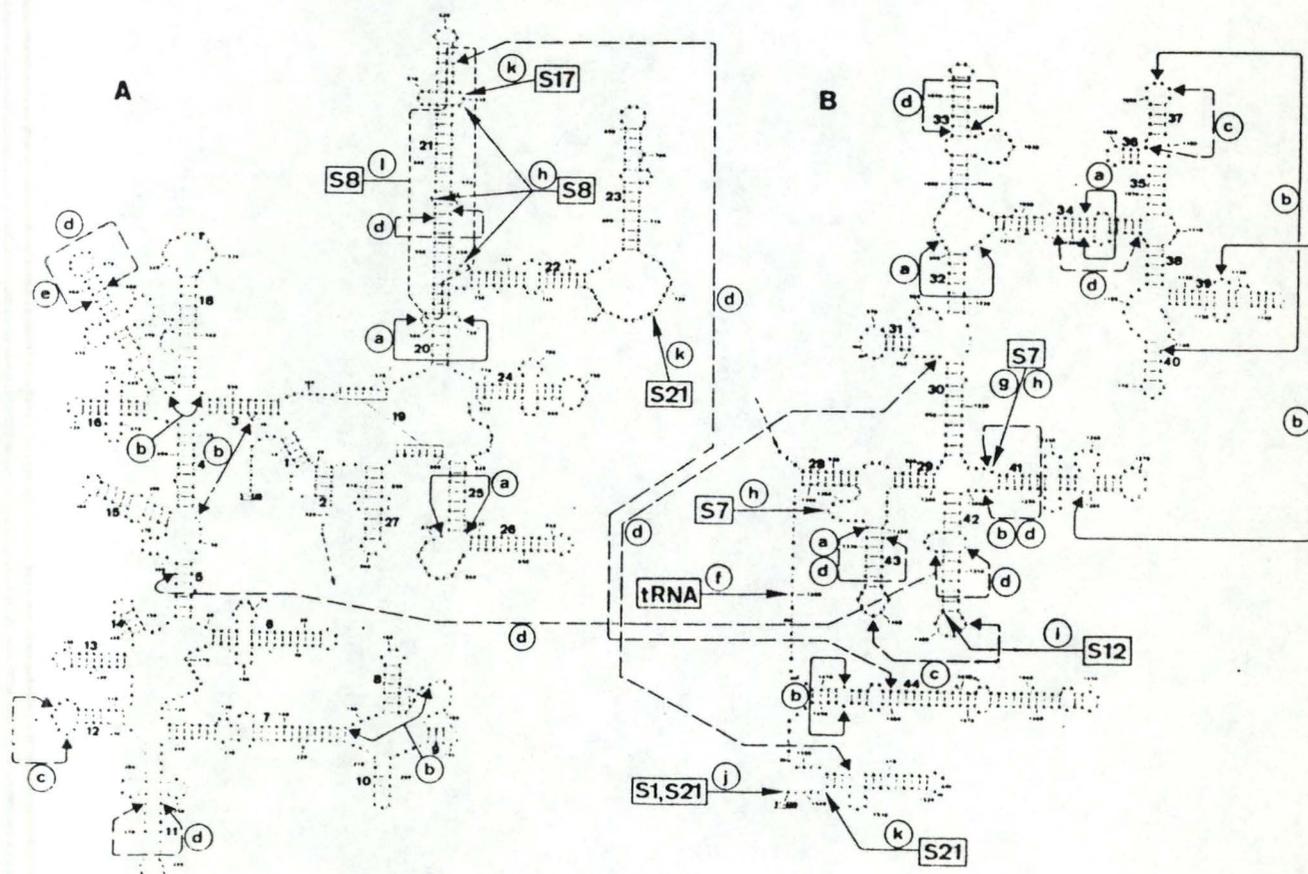


Fig. 3. Structure tertiaire de l'ARNr 16S de *Escherichia coli* montrant les différentes interactions existant à ce niveau. Pour plus de clarté, l'ARNr a été "coupé" en deux parties A et B. Les différentes flèches indiquent les différentes interactions existantes (les flèches brisées témoignent d'une incertitude à ce niveau. Il existe des interactions entre ARNr et ARNt, entre ARNr et protéines. Ces dernières sont indiquées par un chiffre entouré et précédé de la lettre S (pour Small Ribosome Subunit).

La compréhension de la structure de l'ARNr nous paraît fondamentale pour étudier le fonctionnement du ribosome (8). On comprendra aisément que toute modification de l'ARNr peut avoir de lourdes conséquences au niveau du fonctionnement du ribosome.

3. DESCRIPTION DE L'ARN RIBOSOMIQUE.

l'ARNr est caractérisé par une structure et un processus de maturation qui lui sont propres. Ces deux aspects seront évoqués successivement dans les pages qui suivent.

3.1. Structure de l'ARN ribosomique.

3.1.1. Structure primaire de l'ARNr.

Chaque molécule d'ARNr est constituée d'une séquence de nucléotides comprenant chacun un ribose, un groupement phosphate en position 5' du ribose et une base en position 1'. Quatre bases différentes sont insérées tout au long de la molécule d'ARNr: l'adénine, la cytosine, la guanine et l'uracile. Chaque nucléotide est relié au suivant par un pont 3'-phosphate. On peut distinguer deux sens opposés le long d'une chaîne polynucléotidique: le sens 5'-3' ou le sens 3'-5'.

On a pu constater de manière générale que les séquences de nucléotides de l'ARNr sont hautement conservées au cours de l'évolution. On a pu comparer, entre autres, la séquence des bases de l'extrémité 3' de l'ARNr de trois espèces fort éloignées phylogéniquement: un procaryote, Escherichia coli et deux eucaryotes, la levure Saccharomyces cerevisiae (eucaryote inférieur) et Bombyx mori (un insecte évolué) (14) (Fig. 4).

Plus de la moitié des nucléotides sont conservés simultanément chez les trois espèces (14).

On peut observer une grande conservation dans la séquence des bases au cours de l'évolution. Cette conservation que l'on peut déjà observer dans la structure primaire va se confirmer dans les structures secondaire et tertiaires des molécules d'ARNr.

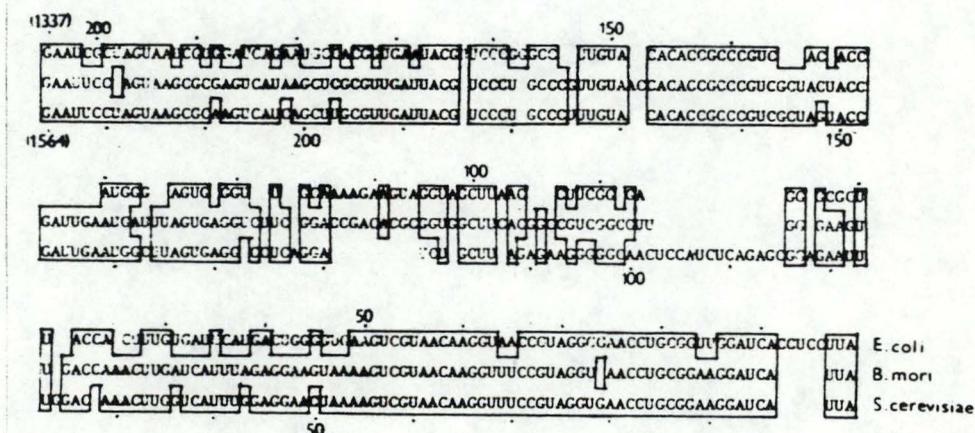


Fig. 4. Séquences homologues à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S-18S chez *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Bombyx mori*. Les séquences homologues sont entourées.

3.1.2. Structures secondaires et tertiaires de l'ARNr.

La structure primaire de l'ARNr est donc constituée d'un enchaînement de nucléotides. Certaines de ces bases peuvent s'apparier localement en double hélice et former ainsi la structure secondaire de la molécule. Ces appariements ne se forment qu'entre bases complémentaires, à savoir entre l'adénine et l'uracile, et entre la cytosine et la guanine. Il se forme respectivement deux et trois ponts hydrogène entre ces résidus.

La figure 5. nous montre un modèle simplifié de la structure secondaire de l'ARNr. On appelle ces structures des structures en épingle à cheveux ou "hairpin".

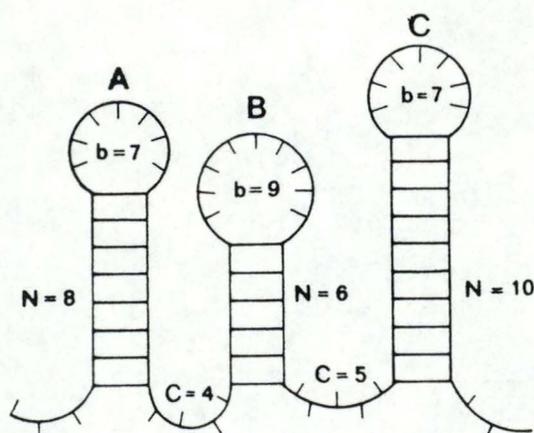


Fig. 5. Modèle simplifié montrant les caractéristiques de la structure secondaire de l'ARNr (52).

N = nombre d'appariements de bases par hairpin (= la tige);

b = nombre de résidus non appariés par hairpin (= la boucle);

c = nombre de résidus entre les hairpin.

La molécule d'ARNr présente des appariements locaux entre bases, donnant lieu à des "structures en épingle à cheveux" entrecoupées par des régions non appariées.

Ces structures secondaires ont été fort étudiées par différentes techniques comme l'analyse de l'absorption des ultraviolets, la diffraction des rayons X, la dispersion rotatoire optique, la viscosité... et on a proposé divers modèles possibles (6) différant parfois légèrement les uns des autres (8).

Les structures secondaires proposées sont les structures thermodynamiquement les plus stables.

Un argument de poids en faveur de l'existence des structures secondaires proposées est le suivant. On constate qu'au cours de l'évolution, il y a ^{parfois} substitution d'une base par une autre. Si une telle substitution est observée sur un bras d'un hairpin supposé, on constate que la base qui lui fait face sur l'autre bras de la structure en épingle à cheveux est également remplacée de manière à garder une même structure secondaire.

La figure 16 (cfr. chapitre 4.2.1.) nous donne un bel exemple de hairpin conservé au cours de l'évolution (46).

La structure secondaire de l'ARNr 5S a également été comparée chez divers organismes parmi les procaryotes et les eucaryotes. Il ressort de ces études qu'il existe une structure secondaire commune à tous ces organismes. La figure suivante représente ces structures secondaires communes chez procaryotes et eucaryotes (18).

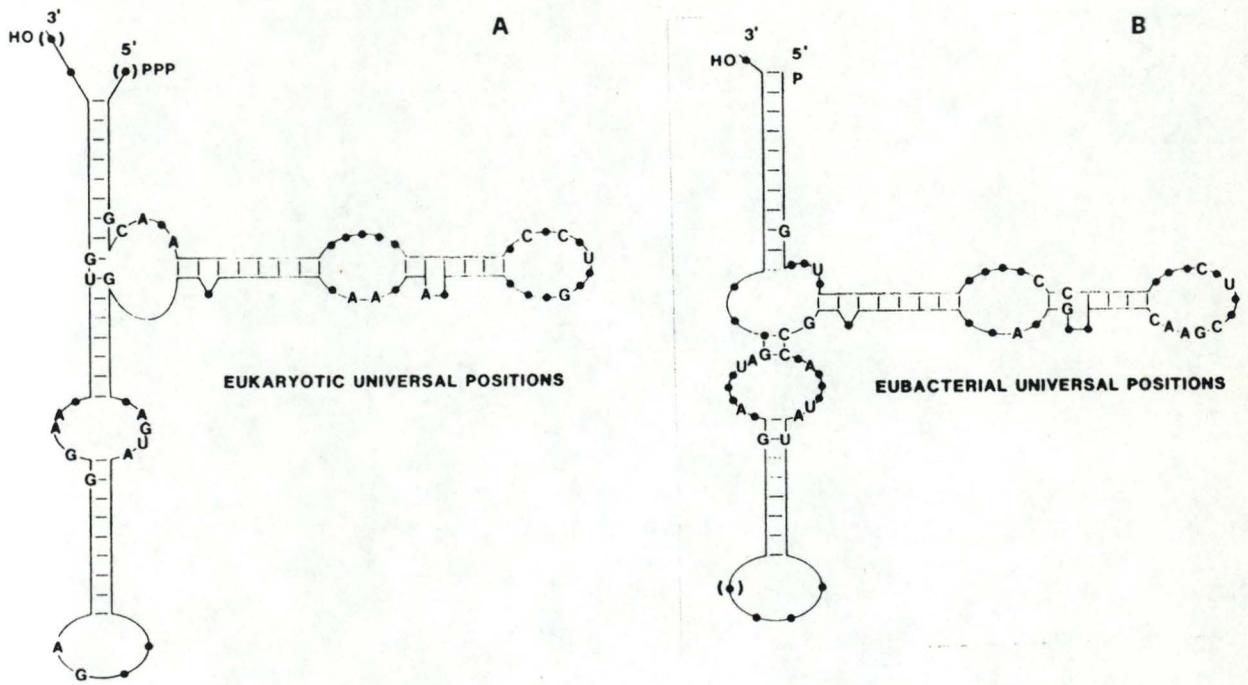


Fig. 6. Structures secondaires de l'ARNr 5S communes :

- a) aux procaryotes (*Eubacteria*)
 b) aux eucaryotes.

Les nucléotides universels sont indiqués explicitement. Les autres sont représentés par des points (lorsque non appariement) ou par des traits (lorsque appariement) (18).

On peut observer que la majorité des bases dites universelles sont celles qui se trouvent au niveau des séquences monobrin. De plus, la structure secondaire eucaryotique ressemble étrangement à celle des procaryotes.

D'autres équipes ont également proposé une structure secondaire similaire pour Escherichia coli (8).

Au niveau des ARNr majeurs, ces mêmes homologues existent dans la structure secondaire. Il existe de plus des appariements entre régions plus éloignées de la molécule d'ARNr: ces appariements forment la structure tertiaire de l'ARNr.

La figure 7. nous montre la structure tertiaire de l'extrémité 3' de l'ARNr 18S de Saccharomyces cerevisiae comparée avec celle de Xenopus laevis. Les structures différant entre ces deux organismes sont entourées (17).

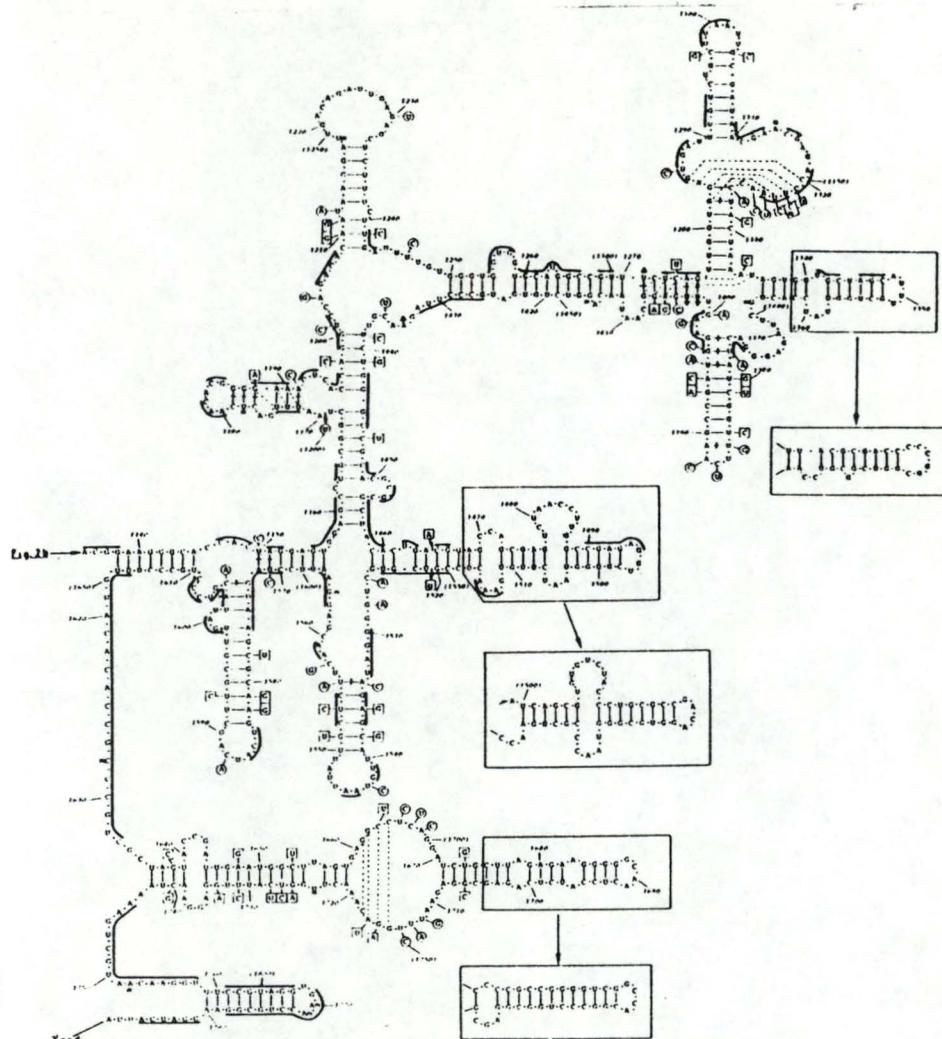


Fig. 7. Structures tertiaires de l'extrémité 3' des ARNr 18S de Saccharomyces cerevisiae et de Xenopus laevis. La séquence écrite entièrement est celle de Saccharomyces cerevisiae. Les séquences de Xenopus laevis différant de Saccharomyces cerevisiae seules sont représentées (17).

Les mêmes auteurs ont également comparé les structures des régions 5' et centrales de ces mêmes organismes ainsi que les ARNr 12S mitochondriaux d'homme et de souris. Des résultats semblables ont été observés.

3.1.3. Structure tridimensionnelle de l'ARNr.

La structure tridimensionnelle est en général encore assez mal connue. Il semblerait, de façon générale, que la molécule s'organise en courtes séquences en doubles hélices qui sont orientées perpendiculairement à son grand axe. Les forces

impliquées dans cette orientation des hélices sont principalement les répulsions électrostatiques et/ou les liaisons métalliques et les ponts hydrogène (6).

Cette structure tridimensionnelle de l'ARNr sera encore modifiée par l'association avec les autres molécules du ribosome et par les forces de compaction exercées. On parle alors de structure quaternaire du ribosome.

On sait donc peu de choses à propos de la structure tridimensionnelle des ARNr. Mais on sait par contre que malgré les différences parfois importantes dans la séquence des acides aminés des protéines et la séquence des nucléotides des différents ARNr, il existe une grande similitude dans la structure secondaire ribonucléique. On sait également que la forme générale du ribosome est semblable chez tous les organismes étudiés. On peut gager que la structure tridimensionnelle est également conservée au cours de l'évolution !

3.2. Biosynthèse des ARNr.

Les différentes molécules d'ARNr ne sont pas synthétisées tout de suite sous leur forme définitive. Elles sont d'abord transcrites sous forme de précurseurs qui subiront ensuite diverses modifications avant de donner les molécules 5S, 5,8S, 18S et 28S chez les eucaryotes (5S, 16S, 23S chez les procaryotes).

3.2.1. Organisation générale des gènes d'ARNr.

Les gènes d'ARNr sont présents en plusieurs exemplaires dans le génome. On y trouve ainsi plusieurs séquences répétées contenant les gènes d'ARNr. Ces séquences sont les unités de répétition (U.R.). Le nombre d'unités de répétition varie en fonction de l'espèce considérée: 5 à 10 copies environ chez les bactéries, 100 à 200 copies chez les eucaryotes inférieurs et plusieurs centaines (parfois plus de 1000) chez les eucaryotes supérieurs (cfr. tableau 2.) (6).

Organism	High molecular weight rRNA	5SrRNA	4SrRNA	Size of haploid genome (daltons)
<i>Escherichia coli</i>	5-6	11	50	2.8×10^9
<i>Bacillus subtilis</i>	9-10	4-5	42	3.9×10^9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140		320-400	1.25×10^{10}
<i>Neurospora crassa</i>	125			2.4×10^{10}
Pea	cyt 4500			3×10^{12}
Tobacco	cyt 3450			3×10^{12}
<i>Drosophila melanogaster</i>	130		860	1.2×10^{11}
<i>Xenopus laevis</i>	450	>25,000	1150	1.8×10^{12}
Chick	100			7.2×10^{11}
HeLa cells	280	2000	1260	3.1×10^{12}

Tableau 2. nombre de sites au niveau de l'ADN codant pour l'ARNr chez divers organismes (par génome haploïde) (6).

Les U.R. peuvent être arrangées les unes à la suite des autres ou bien dispersées dans le génome. Elles contiennent chacune une ou plusieurs unités de transcription (U.T.) séparées par des séquences nucléotidiques non transcrites, les "spacers non transcrits" (n.t.s.) (18).

La figure 8. nous montre quelques modes d'organisation des U.R.

Les unités de transcription sont des segments contenant un ou plusieurs gènes d'ARNr séparés par des séquences de nucléotides transcrits en même temps que ces gènes, formant ainsi une molécule d'ARNr précurseur. Toutefois, ces séquences seront amenées à disparaître lors de la maturation de cette molécule précurseur. Ces séquences sont appelées "spacers transcrits" (t.s.) externes (t.s.e.) ou internes (t.s.i.) suivant qu'elles se situent à une extrémité de l'U.T. ou qu'elles séparent les différents gènes ribosomiques. La figure 8. nous montre l'arrangement de ces différentes séquences dans une unité de répétition chez eucaryotes et procaryotes.

Chez les eucaryotes, il existe deux types d'unités de transcription différentes. Une première U.T., la plus grande, est constituée des gènes codant pour les ARNr 18S, 5,8S, 28S séparés par des spacers transcrits. La deuxième U.T. comprend un seul gène codant pour l'ARNr 5S et une courte séquence de spacers transcrits.

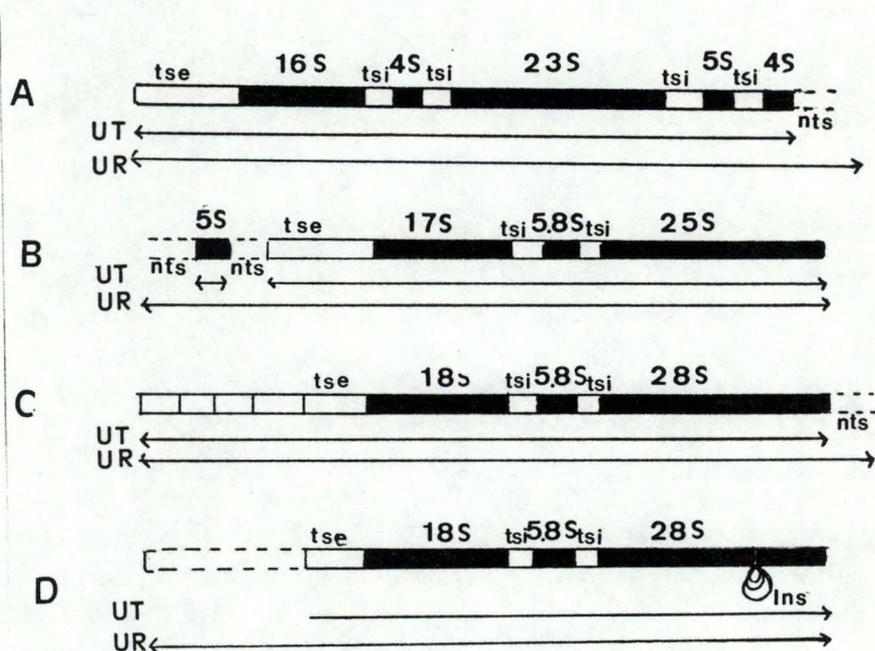


Fig. 8. Organisation des unités de répétition de l'ARNr chez:

- Escherichia coli*;
- Saccharomyces cerevisiae*;
- Xenopus*;
- Drosophila*.

nts = régions spacers non transcrits;

ts = régions spacers transcrits externes (tse) ou internes (tsi);

Ins = insertion d'ADN non ribosomique dans l'ARNr 28S.

Chez certains eucaryotes inférieurs, dont la levure, ces deux U.T. sont adjacentes et forment une unité de répétition.

Chez les autres eucaryotes, l'unité de répétition est constituée d'une seule U.T. bordée par des spacers non transcrits. Seules sont arrangées en tandem les U.R. renfermant les grandes U.T. Les autres U.T. (qui codent pour l'ARNr 5S) sont nucléolaires et dispersées dans le génome (19,56).

Chez les procaryotes, l'ARNr 5S fait partie de la même U.T. que

les autres gènes ribosomiques. De plus l'U.T. contient également deux séquences codant pour des ARNt (= ARN 4S).

Chez les eucaryotes, il y aura formation de deux molécules précurseurs différentes: une grande comprenant les ARNr 18S, 5,8S, 28S, souvent désignée par 45S et une petite contenant l'ARNr 5S. Les molécules devront subir diverses modifications avant de donner naissance aux différents ARNr précités. On parle de la maturation des ARNr.

3.2.2. Maturation des ARNr.

A. Clivage et émondage de la molécule précurseur.

Les molécules précurseurs devront être clivées en divers endroits pour éliminer les séquences d'ARNr correspondant aux "spacers transcrits". Ce clivage s'effectuera en différentes étapes successives pour donner finalement les différentes molécules d'ARNr matures.

Deux types d'enzymes participent à ce processus:

1. les endonucléases qui reconnaissent une séquence spécifique dans le précurseur et la clivent en deux;
2. les exonucléases qui réalisent l'émondage proprement dit, c'est à dire qui ôtent les nucléotides en trop à l'extrémité clivée précédemment.

La reconnaissance des sites adéquats de clivage par les endonucléases n'est pas encore bien comprise. Elle ferait intervenir les zones bihélicoidales de l'ARNr ainsi que la présence de groupes méthyles (25). La séquence temporelle d'addition des protéines au précurseur interviendrait également pour spécifier la séquence de clivage (26).

Au niveau du pré-ARNr 45S, il existe divers sites de clivage. Chez les eucaryotes, on dénombre quatre sites endonucléolytiques majeurs sur le précurseur primaire. La figure 9 nous montre ces différents sites de clivage dans l'ordre chronologique.

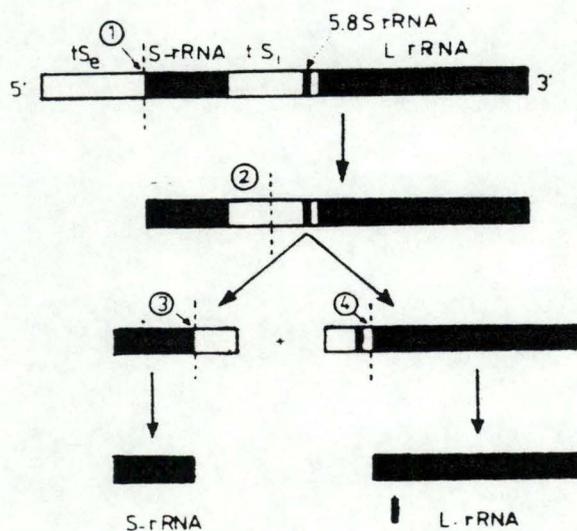


Fig. 9. Schéma général de la maturation du pré-ARNr chez les eucaryotes. Les sites des attaques endonucléolytiques majeurs sont numérotés de 1 à 4 (18).

$ts(e,i)$: région spacer transcrit (externe, interne);

S-rRNA: ARNr majeur de la petite sous-unité ribosomique;

L-rRNA: ARNr majeur de la grande sous-unité ribosomique.

Il semble de manière générale qu'au cours de l'évolution, la position relative des sites de clivage soit hautement conservée.

Par contre, l'ordre dans lequel se déroulent les différentes étapes de clivage peut varier légèrement suivant l'espèce considérée. Il y aurait également certaines variabilités dans le processus d'émondage en rapport avec les situations physiologiques ou encore selon le type cellulaire (23,27,28).

La taille du précurseur primaire de la grande U.T. augmente au fur et à mesure de l'évolution, son poids moléculaire variant entre $1,9 E6$ et $4,7 E6$ daltons chez les eucaryotes (cfr. tableau 3.) (24).

Espèces	PM(10^{-6})
Algues	2,1 - 3,5
Levures	2,5 - 2,8
Plantes sup.	2,3 - 2,9
Echinodermes	2,5
Insectes	2,5 - 3,8
Poissons	2,6 - 2,7
Amphibiens	2,5 - 2,8
Reptiles	2,7 - 2,8
Oiseaux	3,7 - 3,9
Mammifères	4,1 - 4,7

Tableau 3. Poids moléculaire des grands ARNr précurseurs chez différents eucaryotes (24).

Ces intermédiaires sont désignés par leur coefficient de sédimentation approximatif. Chez la levure Saccharomyces cerevisiae, on a pu suivre l'évolution de la grande molécule - précurseur primaire en ARNr 5,8S, 17S, 25S. La figure 10 nous indique les coefficients de sédimentation de ces intermédiaires chez Saccharomyces cerevisiae.

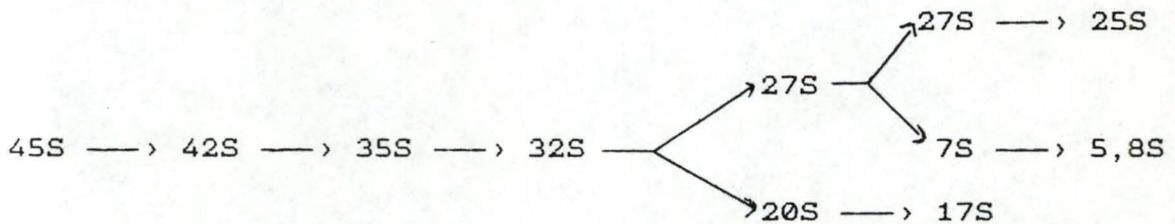


Fig. 10. Coefficients de sédimentation caractérisant les divers intermédiaires entre la molécule précurseur primaire 45S et les différents ARNr matures. La molécule 5,8S est liée par ponts hydrogène à l'ARNr 25S.

La maturation de l'ARNr se fait dans les différents compartiments cellulaires. Elle débute dans le nucléole et se poursuit dans le nucléoplasme tandis que l'assemblage final du ribosome se produit dans le cytoplasme (29,53).

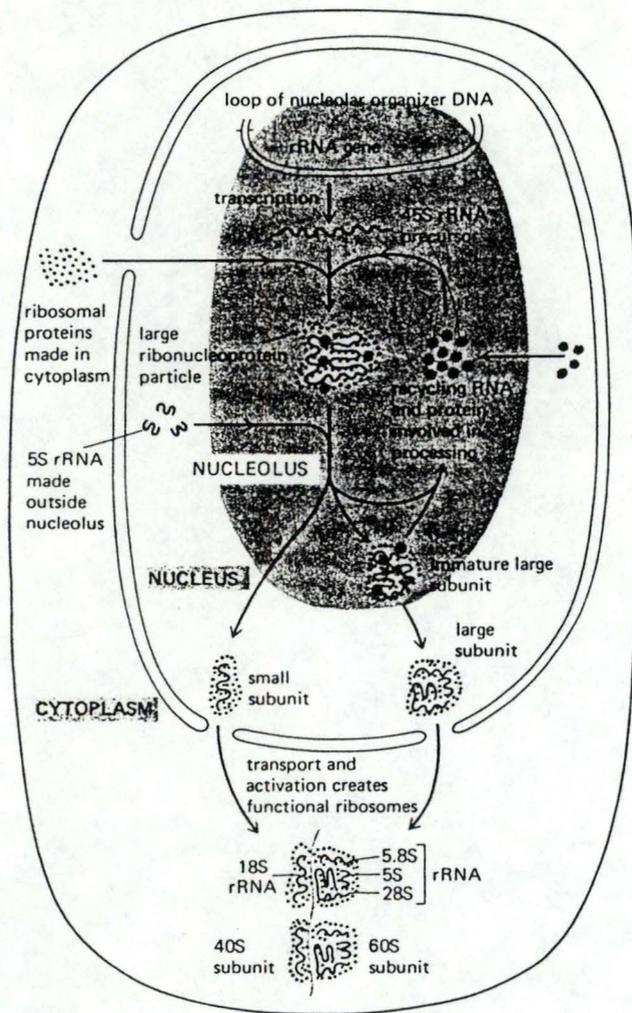


Fig. 11. Représentation schématique d'une cellule où sont indiquées les différentes étapes conduisant à la formation du ribosome. (53)

L'ARNr correspondant à la petite U.T. subit elle aussi certains clivages pour donner rapidement naissance à l'ARNr 5S (24). Il faut noter toutefois qu'il existe chez certains organismes une certaine proportion de rDNA contenant des séquences supplémentaires, les introns, qui seront également supprimées lors de la maturation par un processus différent de l'émondage précédemment décrit. Ces séquences existent à l'intérieur même du gène codant pour l'ARNr. Un exemple de ceci est décrit à la figure 8d au niveau de l'ARN 28S de la drosophile. Un intron est inséré dans les deux tiers de ce DNA codant pour l'ARN 28S. Il y aura d'abord clivage de l'ARNr au niveau des deux extrémités de l'intron par des enzymes qui reconnaissent spécifiquement ce site, puis ressoudage des deux parties codant pour l'ARNr 28S: il s'agit de l'épissage. La séquence intronique est ainsi supprimée sans qu'il y ait séparation en deux du précurseur. Dans ce cas-ci, vu qu'il existe un tiers des gènes interrompus et que les

gènes possédant des introns ne semblent pas être utilisés pour la synthèse d'ARNr, il est vraisemblable qu'il s'agit de gènes non fonctionnels (83).

Cependant, la maturation des ARNr ne consiste pas seulement en une série de clivages, émondages, épissages: lorsqu'on observe de plus près la séquence des nucléotides des ARNr et qu'on la compare avec celle du précurseur primaire, on peut observer des différences assez importantes.

B. Bref aperçu des autres modifications post-transcriptionnelles.

On a pu mettre en évidence que certains nucléosides étaient modifiés par l'adjonction de groupements méthyles le plus souvent, mais aussi par addition d'autres groupements parfois complexes (on parle alors de nucléosides hypermodifiés).

Examinons tout d'abord le cas des nucléosides hypermodifiés. Une première constatation est qu'aucun des procaryotes étudiés jusqu'à présent ne présente de nucléosides hypermodifiés. Et chez les eucaryotes, seuls les nucléosides de type cytidine ou uridine subissent ce genre de modifications (30).

Les divers types de nucléosides hypermodifiés formés à partir de l'uridine sont principalement la pseudouridine (ψ), la 2'-O-méthylpseudouridine (ψ^m) et la 3-(3-amino-3-carboxylpropyl)-1-méthyl pseudouridine ($am\psi$). La cytidine engendre la N4-acétylcytidine ($ac4C$). Celle-ci n'a été identifiée que dans l'ARNr 18S des hépatocytes de rat (30) (fig. 12.).

La fréquence d'apparition de ces nucléosides hypermodifiés dans la séquence des ARNr varie selon les espèces. La plupart des eucaryotes n'en possèdent qu'un petit nombre. Chez la levure et les hépatocytes de rat par contre, on en dénombre bien d'avantage (30) (cfr. tableau 4.).

Les ARNr 5,8S et 5S possèdent en général un ou deux nucléosides hypermodifiés en uridine (31, 32).

Mod nucl	RNA from small subunit								rRNA from large subunit							
	16S			17S			18S		Rat liver	23S			26S		28S	
	Ec	Mc	Al	Sc	Ap	Xl	HeLa	Ec		Mc	Al	Sc	Ap	Xl	HeLa	
m ¹ A												2	2	1		
M ¹ A	2				1	1	1(mA)	1	2.5	0.4	0.5			1	2(mA)	
m ² A	2	2.2	2.0	2	2	2	2	2								
m ¹ G									0.8	0.4	0.5					
m ² G	2		2.8						2.4							
m ² G		1.2														
m ¹ G	1	1.0	1.4	1	1	1	1	1	0.8							
m ¹ C	2	1.4			0-1				1.3		1.4	2	3		2(mC)	
m ¹ Cm	1	1.0	1.0													
m ¹ U			1.2							0.5		2	2	1		
m ¹ U			0.5						3.0		6.3				1(mU)	
Am				8	15	12	13	12				12	23	17.5	19-20	
Gm	1			5	7	7	6-7	8	0.9	2.8	1.8	10	22	20-21	21-22	
Cm				3	6	5	7	8	0.7	1.2	2.7	7	19	15	15	
Um				2	12	9	12-13	9	1.0			8	20	8	8	
ψ				12-14				38				24-25				
ψm					1										1	
amψ				1	1	1	1									
ac ¹ C								1								

Tableau 4. Proportion de nucléosides modifiés dans les ARNr de différents organismes (mol./mol.ARNr) (30).

Ec: Escherichia coli;
 Mc: Mycoplasma capicolum;
 Sc: Saccharomyces carlsbergensis;
 Ap: Acer pseudoplatanus;
 Xl: Xenopus laevis;
 HeLa: cellules HeLa.

De telles modifications qui se produisent et se conservent tout au long l'évolution, doivent certainement jouer un rôle très important à certains niveaux.

Malheureusement, on connaît encore bien peu de choses à ce sujet. Dans les pages qui vont suivre, nous ferons le point des connaissances actuelles à ce sujet en nous limitant l'étude de la méthylation qui nous intéresse davantage.

4. LA METHYLATION, EVENEMENT IMPORTANT DANS LA MATURATION DES ARNr.

4.1. Introduction.

Il existe donc un certain pourcentage de groupes méthyles sur les différentes molécules d'ARNr

Nous étudierons ce phénomène par la suite mais il faut savoir que la méthylation est un processus existant au niveau de bien d'autres molécules. C'est le cas des protéines, de polysaccharides, de phospholipides qui acceptent divers groupes méthyles. On se pose encore bien des questions à ce sujet (48).

Mais un cas certainement mieux connu est le cas de "restriction-modification" au sein de l'ADN bactérien.

Pour se protéger contre l'introduction de génome étranger, les bactéries possèdent des endonucléases de restriction qui reconnaissent de courtes séquences spécifiques d'ADN et les clivent. Mais il faut protéger leur propre génome de l'action de ces endonucléases. Aussi ajoutent-elles systématiquement un groupement méthyle sur ces séquences. Ceci se fait grâce au concours d'enzymes particulières, les méthylases, qui reconnaissent donc les mêmes séquences que les endonucléases, mais pour les méthyler. Ce groupe méthyle empêche ainsi la reconnaissance de ces séquences bactériennes par les endonucléases et l'ADN bactérien est protégé de l'action de ses propres endonucléases. Tout ADN étranger, par contre, sera clivé au niveau de ces séquences reconnues, car non méthylées (34).

On voit ici l'importance que peuvent revêtir ces groupes méthyles dans la protection contre l'introduction de génomes étrangers dans la bactérie.

La méthylation du DNA est également suspectée d'avoir un rôle important dans l'expression des gènes. L'absence de groupes méthyles faciliterait la lecture du gène. Il existe par ailleurs un contrôle des changements du degré de méthylation des gènes en fonction par exemple de la différenciation et un contrôle également de la perpétuation des méthylations spécifiques (43).

Il s'agit maintenant de découvrir le rôle joué par les groupes méthyles au niveau d'autres molécules.

En ce qui concerne l'ARNr, on commence à connaître la localisation de ces groupements modifiés, les processus de méthylation et les diverses enzymes impliquées. On connaît par contre encore peu de choses sur le rôle exact de ces groupements, surtout chez les eucaryotes. Ce sont ces aspects que nous allons évoquer par la suite.

Il faut toutefois remarquer que les ARNt et les ARNm ont également leurs propres séquences méthylées.

En ce qui concerne les ARNt, la figure 13 indique la position des différents nucléosides modifiés. Ceux-ci se situent principalement au niveau des régions non appariées (33).

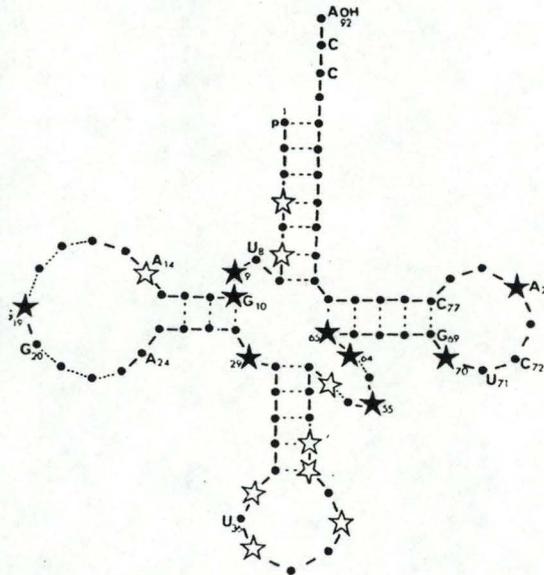


Fig. 13. Représentation d'un ARNt et des divers sites de méthylation communs à de nombreuses espèces.

-les étoiles noires représentent les nucléosides qui sont méthylés d'une seule façon;

-les étoiles blanches représentent les nucléosides qui peuvent être modifiés de différentes manières.

Les bases indiquées sont celles qui sont en général communes à tous les ARN (34).

Quant aux ARNm, ils peuvent être éventuellement méthylés tout au long de la séquence, mais dans une proportion beaucoup moindre que les ARNr (1 nucléotide pour 1000 environ) (54).

Un autre site de méthylation très étudié au laboratoire de génétique moléculaire est la coiffe à l'extrémité 5' terminale de l'ARNm (Fig. 14.).

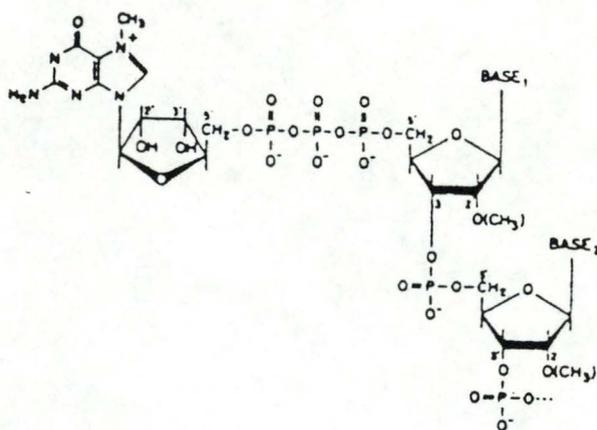


Fig. 14. Structure de la coiffe d'après Shatkin (55).

Il existe différents types de coiffes d'après le nombre et la position des groupes méthyles dans cette région (55).

4.2. Classification des méthylation.

Les nucléosides peuvent être méthylés de deux manières différentes sur l'ARNr (comme sur les ARNm et les ARNt d'ailleurs). En effet, le groupe méthyle peut être localisé sur le ribose ou bien s'attacher à la base du nucléoside.

1. Sur le ribose, le groupe méthyle est en position 2'-O. On parle d'une 2'-O méthylation (cfr. figure 15).

La base insérée sur le ribose peut être aussi bien l'adénine que l'uridine, la cytosine ou la guanine. Les symboles utilisés sont respectivement Am, Um, Cm, Gm.

Ces méthylation sont dites immédiates car elles se font pour la plupart très tôt dans le processus de maturation, sur le grand ARNr précurseur 45S ou peu après sa transcription (6, 35, 36).

2. Les méthylation des bases représentent le deuxième type de méthylation rencontrées. Les quatre sortes de bases peuvent être méthylées en des positions diverses. On peut rencontrer un ou plusieurs groupes méthyles par base modifiée. Aussi le symbole utilisé indique-t-il la base sur laquelle se trouve le groupement méthyle et la position sur laquelle il vient se fixer. Par exemple m7G signifie qu'il y a un groupe méthyle en position 7 de la guanine; m26A signifie qu'il y a deux groupes méthyles en position 6 de l'adénine etc...

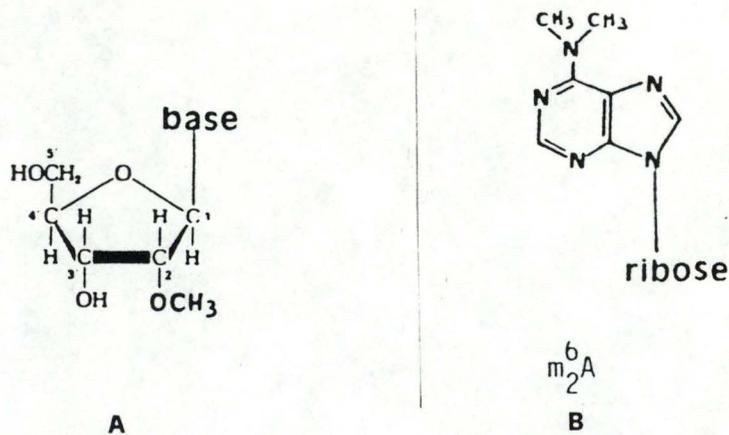


Fig. 15. Exemples de nucléosides méthylés.

A. Au niveau du ribose;

B. Au niveau de la base.

Ces méthylations sont souvent appelées "additionnelles" car elles n'ont lieu qu'à la fin du processus de maturation, parfois même dans le cytoplasme (6, 35, 36).

La proportion entre méthylations de bases et méthylations de sucres est fort différente chez les procaryotes et les eucaryotes.

Chez les procaryotes, les ARNr 16S et 23S contiennent un petit nombre de résidus méthylés en position 2' (37), tandis que la majorité des groupes méthyles (plus de 80%) sont situés sur des bases (20, 38). La méthylation surviendra donc essentiellement à la fin du processus de maturation.

Chez les eucaryotes par contre, la situation est inversée puisque 80 à 90% des nucléosides méthylés des ARNr 18S et 28S sont modifiés au niveau du ribose alors que quelques bases seulement sont modifiées (39, 40). La majorité des groupes méthyles seront donc présents déjà sur l'ARNr 45S.

Les procaryotes étant donc essentiellement méthylés au niveau des bases et les eucaryotes au niveau des riboses, certains auteurs suggèrent même que la méthylation des bases pourrait être un processus ancestral largement conservé chez les procaryotes tandis que la méthylation des riboses pourrait représenter un processus moins primitif qui est apparu essentiellement chez les eucaryotes pendant l'évolution (41).

La fréquence et la répartition spatiale de ces différents groupes méthyles dans les molécules d'ARNr est envisagée ci-dessous.

4.3. Fréquences relatives et répartition des différents groupes méthyles sur les différentes molécules d'ARNr.

4.3.1. Molécules d'ARNr majeur.

A. Fréquences relatives des divers groupes méthyles présents dans l'ARN de différentes espèces.

Code No.	Compound	Percentage of total radioactivity recovered ^a								
		a HeLa			b Yeast			c E. coli		
		4 S ^b	18 S	28 S	4 S	16 S	25 S	4 S	16 S	23 S
1	1-Methylguanine	21.1	7.2	2.3	22.9	5.4	1.2	43.6	5.9	9.7
2	+ 7-Methylguanine									
3	1-Methyladenine	19.9	1.4	11.1	12.5	3.6	18.4			
4	N ² -Methylguanine	11.9	+	+	16.7	+	+		21.5	22.2
5	N ² -Dimethylguanine	17.5			24.9					
6	1-Methylhypoxanthine	3.1			1.1					
7	5-Methylcytosine	16.5	2.8	3.4	7.8	0.8	3.4		3.5	1.8
8	5-Methyluridine ^c (ribothymidine)	10.0	+	+	14.1	+	+		14.7	9.0
8a	5-Methyluridine							36.5		
9	2-Methyladenine							19.8		+
10	N ⁶ -Methyladenine		8.2	10.5					1.0	29.1 ^d
11	N ⁶ -Dimethyladenine		23.9	2.4		51.2	4.1		37.3	6.4 ^e
12	Unidentified	+			+					
13	Thymine ^f	+	1.2	1.2	+					
14	Unidentified	+	+	1.5	+		1.2	+	1.6	0.9
15	3-Methyluridine			6.8			8.9		6.7	2.1
16	2-O-Methyluridine ^g	+	5.6 ^h	19.4 ^h	+	5.8 ^h	12.8 ^h			9.9
17	2-O-Methylribose ^g	+	38.6	30.6	+	21.0	36.5			5.4
18	Unidentified ⁱ		10.7	11.1	+	11.9	12.8		+	+
19	Unidentified ^j								7.3	2.8

Tableau 5. Fréquence d'apparition de chaque sorte de nucléoside méthylé dans les ARN 4S (= ARNt), 18S et 28S par rapport au nombre total de nucléosides méthylés chez trois espèces différentes.

- a. cellules Hela;
 b. cellules de levure;
 c. cellules d'Escherichia coli.

Lorsqu'on étudie les fréquences d'apparition de chaque sorte de nucléoside méthylé dans les ARNr de différentes espèces, on peut observer:

1. que chez une même espèce, ces fréquences sont différentes suivant le type d'ARNr étudié.
2. qu'au niveau d'un même ARNr, ces fréquences sont sensiblement semblables lorsqu'on compare différentes espèces soit procaryotiques soit eucaryotiques.

Par contre, on observe de grosses différences entre procaryotes et eucaryotes.

Ces différences sont aussi bien qualitatives (présence ou non d'une sorte de nucléoside modifié sur une molécule d'ARNr) que quantitatives (nombre d'apparitions du nucléoside modifié dans la séquence) (42).

Tout ceci est illustré dans le tableau 5.

B. Répartition générale des différents groupes méthyles sur les molécules d'ARN.

Nous savons en outre que la méthylation de l'ARNr se passe parfois très tôt au cours du processus de maturation. Les séquences du pré-ARNr qui seront par la suite éliminées sont-elles également méthylées? Il a été établi que ces régions "spacers transcrits" ne reçoivent aucun groupe méthyle. Les groupes méthyles se placent généralement à des stades précoces chez les eucaryotes (entre le stade 45S et 32S chez la levure), plus tard chez les procaryotes, et sont conservés dans leur entièreté dans la séquence d'ARNr mature (6, 20).

La méthylation apparaît donc comme un processus spécifique: certaines régions sont méthylées de préférence à d'autres. Chez Saccharomyces cerevisiae, on sait que les groupement méthyles se trouvent concentrés dans des régions bien déterminées. L'ARNr 18S contient 24 groupes méthyles dont 6 sont liés à des bases. Il s'agit des nucléosides suivants: m7G, mC, m62A (deux fois). Tous ces groupements méthyles se trouvent concentrés dans les régions 5' et 3' terminales principalement (44, 45). L'ARNr 28S du même organisme contient 43 groupes méthyles dont 6 sont des méthylations de bases. Ce sont les nucléosides m3U, m5C, m1A en deux exemplaires chacun. Ces groupes méthyles sont situés principalement dans la partie 3' terminale de la molécule mais il en existe aussi dans la partie médiane et un peu dans la partie 5' terminale (44, 45).

Mais revenons-en à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S/18S. Elle nous donne un exemple frappant de la conservation des groupes méthyles tout au long de l'évolution.

Cette séquence contient en effet une série de deux nucléotides diméthylés m26Am26A qui existe chez quasi tous les organismes étudiés jusqu'à présent: bactéries, champignons, animaux, plantes et même jusque dans les chloroplastes et mitochondries (excepté celles de levure) (46).

Non seulement les deux nucléosides existent chez tous ces organismes mais de plus la séquence de nucléotides est conservée aux alentours de ces groupes méthyles. Cette séquence est telle qu'on peut supposer qu'il existe de part et d'autre de ces deux adénines deux brins antiparallèles d'une hairpin. Ceci est d'autant plus vraisemblable qu'une modification de base sur un brin s'accompagne de la modification de la base appariée sur l'autre brin (cfr. chapitre 3.1.2.) (46).

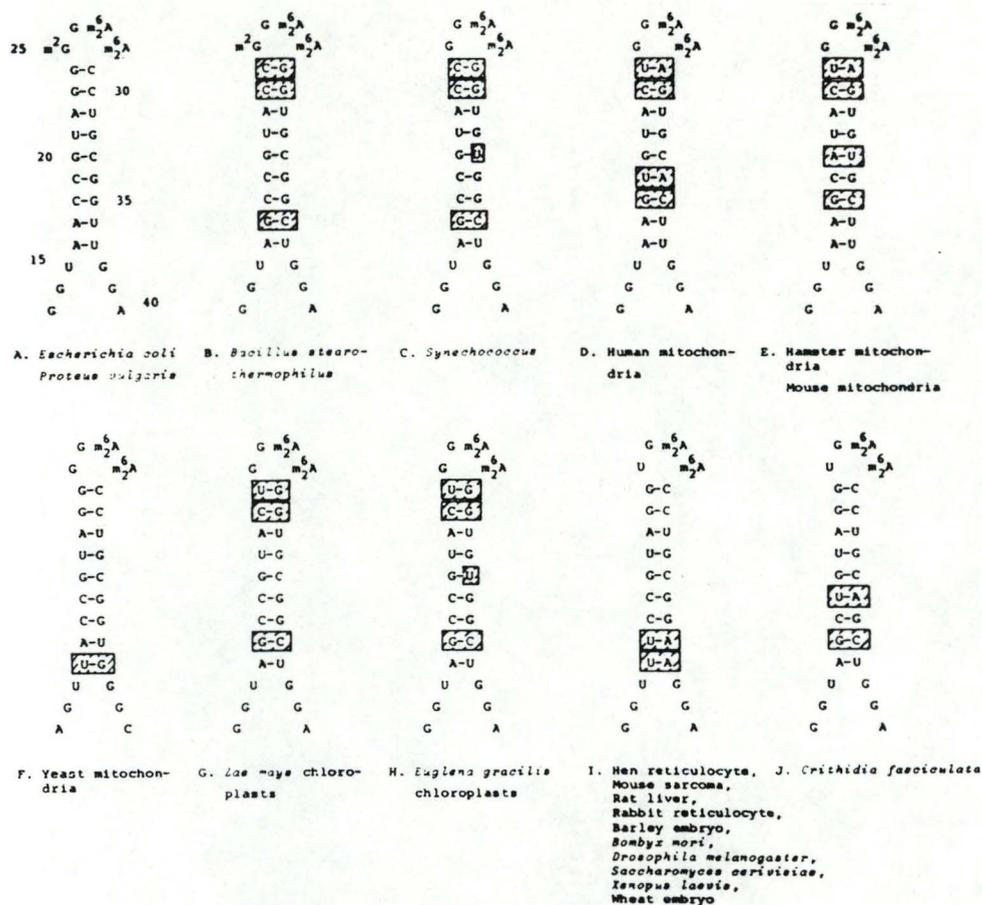


Fig. 16. Structures en épingle à cheveux de la séquence contenant les m26Am26A formées par appariement de bases des deux régions environnant les deux adénines. Divers organismes et organites ont été comparés. Les altérations de la séquence des nucléotides par rapport à celle de *Escherichia coli* ont été hachurées (46).

La conservation d'autres groupes méthyles tout au long de l'évolution a également été démontrée dans d'autres cas.

C. Localisation précise des groupes méthyles sur l'ARNr 18S de l'homme et du Xénope.

Tout récemment, on a pu localiser précisément les divers groupes méthyles au niveau de l'ARNr 18S de l'homme et du xénope (batracien).

	AGUACGCACG	CCCGGUACAG	UGAAACUGCG	AAUGGCUCAU	UAAAUACAGUU	AUGGUUCCUU	120
	UGGUCGCUCG	CUCUCUCC	ACUUGGAUAA	CUGUGGUAU	UCUACGCCUA	AUACAGUCCG	180
	A	-- A	GUU				177
	ACGGGCGCUG	ACCCCUUCCG	CGGGGGGAU	CGUGCAUUU	AUCAGUCAA	AACCAACCCG	240
	A	----	A		C	U	229
	GUCAGCCCUU	CUCGCGCC	GGCCGGGGG	CGGCGCCGG	CGCCUUUGGU	GACUCUAGAU	300
	--G	C	-----		C		266
	AACCUCGGG	CGAUCGCACG	CCCCCGUGG	CGGCGACGAC	CCAUCGAA	GUCUGCCUA	360
		U	- A	U	A	G U	325
	UCAACUUUG	AUGGUAGUC	CCGUCCUAC	CAUGGUGACC	ACGGUGACC	GGGAUCAGG	420
		C UU	U C		A		385
	GUUCGAUCC	GGAGAAGAG	CCUGAGAAAC	GCCUACCACA	UCCAAGGAA	GCAGCAGCG	480
							445
	CGCAAAUAC	CCACUCCGA	CCCGGGAGC	UAGUGAGAA	AAAUACAUA	ACAGGACUCU	540
			G				505
	UUCGAGCC	UGUAAUUGA	AUGAGUCCAC	UUUAAAUCCU	UUAACGAGGA	UCCAUUGGAG	600
			A		U		565
	CGCAAGUCUG	GUGCCAGCAG	CCGCGGAAU	UCCAGCUCCA	AUAGCGUAU	UUAAAGUUGC	660
							625
X.1.	UGCAGUUMA	AAGCUCGUAG	UUGCAUCUUG	GGAGCGGGC	GGCGGCCGC	CGCGAGCGGA	720
X.b.				U A U		G	685
	GCCACCGCC	GUCCCGCC	CUUGCCUC	GGCGCCCU	CGAUGCUCU	AGCUGAGUGU	780
	U	U	A	U C		GA	744
	CCCGCGGGC	CCGAAGGOU	UACUUUGAAA	AAAUUAGAGU	GUUCAAGCA	GGCCCGAGCC	840
					C	- C U	802
	CCUGGUAUC	CGCAGCUAGG	AAUAUUGAA	UAGGACCGC	GUUCUAAUUU	GUUGGUUUU	900
	UU			UC			862
	GGAAUCGAGG	CCAUGAUUA	GAGGACCGC	CGGGGCAU	CGUUAUGCC	CCUAGAGGU	960
	G				U		922
	GAAAUUCUUG	GACCGCGCA	AGACGGACCA	GACCGAAAGC	AUUUGCCAAG	AAUGUUUCA	1020
			A	A			982
	UUAUACAAGA	CGAAAGUCG	GAGGUUCGAA	GACGAUCAGA	UACCGUCGUA	GUUCCGACCA	1080
							1042
	UAAACGAUGC	CGACGGCGCA	UGCGGGCGC	UUUAUCCCAU	GACCGCGCG	GCAGCUUCCG	1140
		UA	C		A		1102
	GGAAACCAA	GUCUUUGGU	UCCGGGGGA	GUUUGGUUC	AAAGCUGAAA	CUUAAAGGAA	1200
							1162
	UUGACGGAAG	GGCACCACCA	GGAGUGGAGC	CUGCGCUUA	AUUUGACCA	ACACGGGAAA	1260
							1222
	CCUACCCGG	CCCGGACAG	GACAGGAGUG	ACAGAUUGAU	AGCUCUUUCU	CGAUUCCGUG	1320
			A		U		1282
	GGUGGUGUG	CAUGGCCGUU	CUUAGUUGGU	GGAGCGAUUU	GUCUGGUUAA	UUCCGAUAC	1380
							1342
	GAAAGAGACU	GUGCAUGCU	AACUAGUAC	GGGACCCCG	AGCGGUGCG	GUCGCCCAAC	1440
		CUC				---	1398
	UUCUAGAGG	GACAAGUGG	GUUCAGCCAC	CCGAGAUUGA	GCAAUAACAG	GUCUGUGAUG	1500
			A	C			1458
	CCCUVAGAU	UCCGGGGCUG	CACGGCGGU	ACACUGACUG	CCUCAGCGUG	UGCCAUCCCU	1560
				AC	A	U	1518
	ACGCCGGCAG	GGCGGGUAA	CCCGUUGAAC	CCCAUUCGUC	AUGGGGAUCG	GGGAUUGCAA	1620
	G	U	C	C	A		1578
	UUUUUCCCCA	UGAACGAGGA	AUUCCAGUA	AGUCCGGGUC	AUAAGCUUGC	GUUGAUUAA	1680
	U				C		1638
	UCCUGCCCU	UUGUACACAC	CGCCGUGCG	UACUACCGAU	UGGAUGGUUU	AGUGAGGCCU	1740
					U		1698
X.1.	UCCGAUCCG	CCCGCCGGG	UCGGCCACG	GCCUUGCCG	AGCCUGAGA	AGACGUCCA	1800
X.b.			C-		C	A A	1757
	ACUACAUU	CUAGAGGAAG	UAAAGUCCU	AACAAGGUUU	CCGUAGGUGA	ACCCGCGGAA	1860
			A				1817
	GGAUCAUUA						1869
							1826

Fig. 17. Séquence nucléotidique de l'ARNr 18S humain comparée à celle de Xenopus borealis (X.b.) et Xenopus laevis (X.1.).

La séquence écrite entièrement est celle de l'homme. Les bases écrites sous cette séquence sont celles qui diffèrent de la séquence humaine et qui appartiennent à Xenopus laevis ou à Xenopus borealis (47).

Les lettres "m" symbolisent les groupements méthyles placés sur le ribose.

Les lettres "M" symbolisent les bases méthylées.

Les numéros à droite indiquent la position du dernier nucléotide de la ligne correspondante.

Les séquences d'ARNr humain n'ayant pas leur équivalent chez Xenopus laevis et Xenopus borealis sont symbolisés par des tirets chez ces derniers.

Les groupes méthyles qui n'existent pas chez Xenopus sont marqués d'une astérisque chez l'homme.

Une première constatation est que la séquence des nucléotides est extrêmement conservée entre le xénope et l'homme (cfr. chapitre 3.1.). On peut également observer que les riboses méthylés sont largement majoritaires par rapport au nombre de bases méthylées (cfr. chapitre 4.1.).

Ce qui nous frappe davantage, c'est la conservation de ces groupes méthyles au niveau d'espèces relativement éloignées phylogéniquement: l'homme (mammifère) et le xénope (batracien).

En fait, on peut classer ces nucléotides méthylés en trois catégories:

1. Nucléotides méthylés chez l'homme et le xénope avec une séquence de bases avoisinante identique. Il s'agit ici de la plupart des nucléotides méthylés.
2. Nucléotides méthylés chez l'homme et le xénope avec une séquence de bases environnante différant légèrement chez les deux organismes (quatre en tout).
3. Cinq groupes méthyles existant chez les mammifères et n'existant pas chez le xénope.

Tous ceci nous indique que la méthylation est un processus hautement spécifique, hautement conservé au cours de l'évolution.

De plus, toutes les variations dans les modèles de méthylation chez le xénope et l'homme affectent les méthylations de riboses. Les bases méthylées sont identiques chez l'homme et le xénope (et aussi chez la plupart des eucaryotes inférieurs (49): cfr. exemple précédent des deux adénosines diméthylées). Ceci signifierait que la méthylation des bases, qui serait un phénomène plus ancestral et qui se passe plus tard lors de la maturation des ribosomes est souvent mieux conservée dans ses caractéristiques structurales que celle des riboses (qui se passe directement après la transcription du pré-ARNr).

En conclusion: spécificité de la méthylation, conservation des groupes méthyles au cours de la maturation et conservation au cours de l'évolution. Cependant, la proportion des bases et des riboses méthylés est différente chez les procaryotes et les eucaryotes.

4.3.2. Méthylation des ARNr mineurs.

L'ARNr 5S ne contient pas de groupes méthyles.

L'ARNr 5,8S eucaryotique de mammifères contient en général deux groupes méthyles (type 2'-O-méthylation): Gm en position 77 et Um en position 14. En fait, toutes les molécules d'ARNr 5S sont méthylées en position 77 mais les molécules d'ARN de cellules

cancéreuses sont largement sous-méthylées en position 14 (20% de méthylation seulement). La guanine est méthylée fort tôt dans le processus de maturation dans le nucléole alors que l'uridine le serait beaucoup plus tard dans le cytoplasme (6, 50, 51).

4.4. Processus de méthylation: recours à des enzymes spécifiques.

Les enzymes responsables de la méthylation sont appelées méthyltransférases. Leur action est la suivante: elles prélèvent un groupe méthyle se trouvant sur un donneur de groupe méthyle qui est la S-AdénosylMéthionine (= SAM) et le disposent sur les molécules à méthyler (ADN, ARN, protéines, ...) (57).

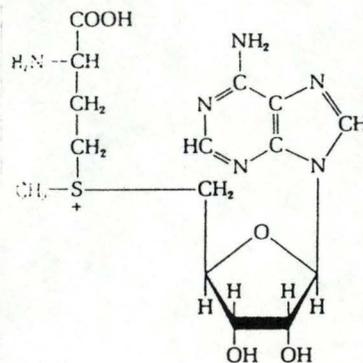


Fig. 18. Structure de la S-AdénosylMéthionine.

Il existe tout un cycle de formation et de recyclage de la SAM (Cfr. fig. 19). L'homocystéine s'adjoint d'un groupe méthyle pour former la méthionine. Celle-ci réagit avec l'ATP pour former la SAM. La SAM cède son groupe méthyl au substrat à méthyler par l'intermédiaire d'une méthyltransférase. Après avoir perdu son groupe méthyl, la SAM devient la S-Adénosyl-Homocystéine (= SAH). Celui-ci sera rapidement dégradé pour reformer les précurseurs nécessaires à la formation de la SAM. Deux voies sont possibles.

La première serait utilisée par des procaryotes. La SAH sous l'action de la S-Adénosyl-Homocystéine nucléosidase ^{selon Kramon} en adénine et en S-Ribosyl-Homocystéine qui lui-même donnera naissance aux molécules de ribose et d'homocystéine (on observe que le précurseur nécessaire à la formation de la SAM est reformé).

La deuxième voie est principalement eucaryotique: la SAH se décompose directement en homocystéine et en adénosine grâce à une enzyme: la S-Adénosyl-Homocystéine Hydrolase. Certains procaryotes comme Pseudomonas, Streptomyces, ... possèdent également cette enzyme et peuvent dès lors utiliser la deuxième voie de dégradation de la SAH (57).

La réaction $SAH \rightleftharpoons Homocystéine + Adénosine$ est réversible.

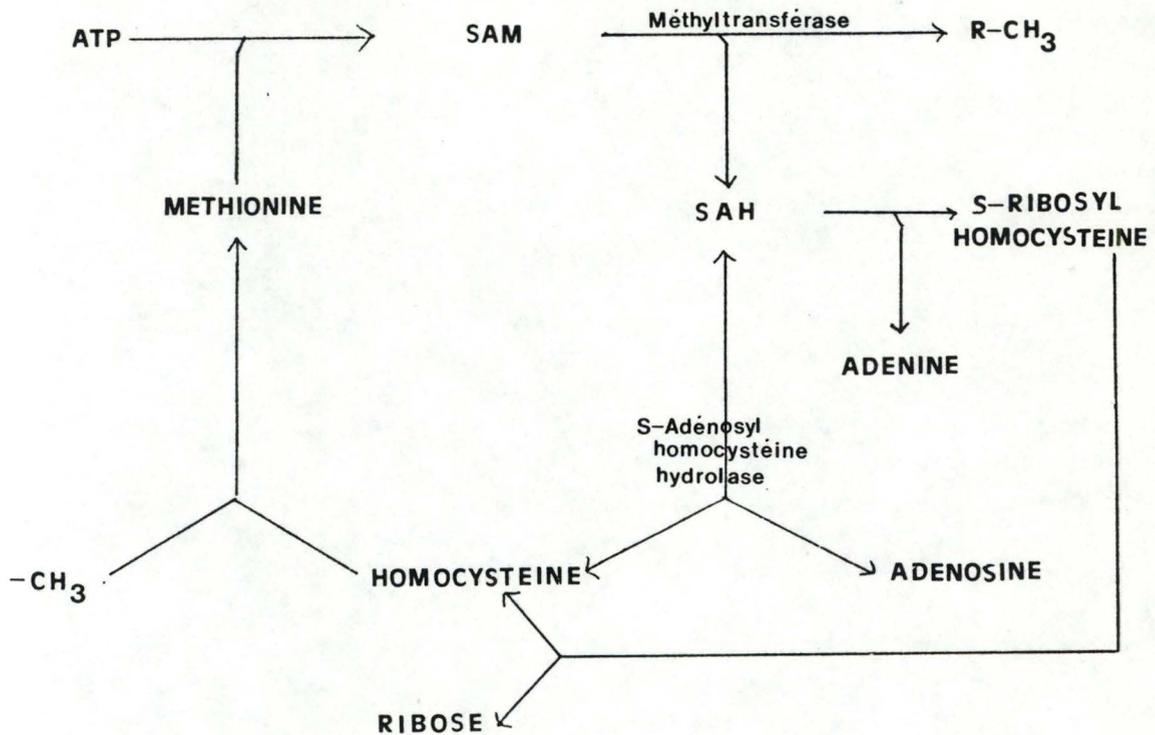
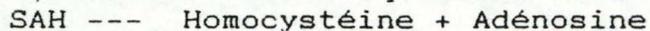


Fig. 19. Cycle de formation et de dégradation de la SAM (d'après 57).

Il faut remarquer que la SAH est un puissant inhibiteur de certaines transméthylases. Elle devra donc être métabolisée d'une façon efficace, pour permettre des fonctions cellulaires normales. En fait, la constante d'équilibre de la réaction



favorise la synthèse de SAH. En réalité dans la cellule, la formation de SAM à partir d'homocystéine (cfr. fig. 19) entraîne un déplacement vers la droite. Il n'y a par conséquent pas d'accumulation de SAH dans la cellule (20, 28).

Les méthyltransférases sont nombreuses et spécifiques du substrat à méthyler. Celles qui méthylient l'ARNt semblent mieux connues.

Il semblerait qu'il existe au moins une sorte d'enzyme par sorte de nucléoside méthylé. Par exemple, deux guanine-1-méthylases distinctes ont été purifiées concernant l'ARNt de levure. Elles méthylient probablement des résidus guanosine à deux endroits différents de la séquence de l'ARNt (59).

En ce qui concerne l'ARNr, quelques méthyltransférases ont été purifiées et partiellement caractérisées (60).

Récemment, on a pu purifier une ARNr-méthyltransférase produisant uniquement la S-méthylcytidine dans l'ARNr des cellules tumorales de souris (61).

4.5. La méthylation: son importance et ses fonctions.

Les ARNr possèdent un certain nombre de résidus méthylés dans leur séquence. Une question qui se pose est la suivante: quel est le rôle joué par ces groupes méthyles?

Cette question n'a encore trouvé qu'un début de réponse. Bien des inconnues demeurent encore, particulièrement chez les eucaryotes.

Tout d'abord, on peut se poser la question de savoir si ces groupements méthyles ont réellement de l'importance. A cela on peut, à priori, répondre oui. Les arguments, circonstanciels, sont les suivants.

Premièrement, la cellule a mis au point toute une enzymologie pour permettre ces méthylations. Il existe de nombreuses méthylases distinctes, spécifiques du résidu à méthyler, méthylant chacune un nucléoside de manière particulière. De plus, il existe toute une série d'enzymes intervenant dans la synthèse et le recyclage de la SAM, dans le contrôle du niveau de méthylation... (voir Chap. 4.4.). Tout ceci représente une dépense énergétique importante pour la cellule: pour synthétiser les enzymes, pour former les groupes méthyles (consommation d'ATP, SAM, ...) (20).

De plus on a pu remarquer que les modèles de méthylation aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes présentent un grand degré de conservation au cours de l'évolution avec une légère augmentation de la proportion de groupes méthyles au cours de l'évolution (cfr. Chap. 4.3.). Les pressions évolutives auraient sans doute éliminé des systèmes aussi élaborés s'ils ne conféraient pas des avantages sélectifs certains.

Enfin, ces groupements méthyles, insérés pour la plupart très tôt lors du processus de maturation de l'ARNr, ne sont pas distribués au hasard tout au long de la molécule: ils se situent dans des régions préservées lors de l'émondage (cfr. Chap. 4.2.).

En résumé, on peut dire que la méthylation requiert beaucoup d'énergie et est conservée au cours de l'évolution et de la maturation de la molécule. Tout ceci peut raisonnablement nous laisser penser que les groupes méthyles ne sont pas superflus mais réalisent des fonctions importantes.

Différentes études ont été faites à ce sujet, principalement chez les procaryotes. Sans éliminer la possibilité d'autres fonctions non connues encore jusqu'à ce jour, différents domaines d'action des groupes méthyles sont envisagés: au niveau de la maturation de l'ARN précurseur, au niveau de l'assemblage des constituants ribosomiques et également du fonctionnement du ribosome par modification de la structure tridimensionnelle.

4.5.1. Rôle de la méthylation dans le processus de maturation de l'ARN.

Il faut distinguer ici le cas des procaryotes de celui des eucaryotes.

A. Cas des procaryotes.

Il faut se rappeler que les groupements méthyles se trouvent principalement sur des bases, lesquelles sont méthylées tardivement (cfr. Chap. 4.1.). On envisage dès lors difficilement un rôle dans la maturation de la molécule. Les faits suivants nous l'indiquent:

1. on constate qu'un mutant de Escherichia coli ne possédant pas le résidu m1G présent normalement dans l'ARN 23S n'est pas affecté dans la formation et la fonction du ribosome (des effets subtils, non décelés, ne sont toutefois pas à exclure). Ceci indique que ce groupement méthyl n'est en tout cas pas indispensable à la vie de l'organisme (62).

2. une autre expérience a été réalisée sur une souche méthionine-dépendante de Escherichia coli (64). Celle-ci a été inoculée dans un milieu où la méthionine est remplacée par de l'éthionine. Les ARNr extraits de cette culture ne sont ni méthylés ni éthylés car l'enzyme intervenant dans la synthèse de la SAM n'accepte pas l'éthionine. Les extrémités 5' et 3' de ces ARNr extraits sont comparables à ceux de la souche sauvage, ce qui indique que les sites de clivage sont restés les mêmes lors de l'émondage

En conclusion, chez Escherichia coli, la méthylation ne semble pas indispensable à la maturation des ARNr. Comme nous allons le voir, il n'en va pas de même chez les eucaryotes.

B. Cas des eucaryotes.

Chez les eucaryotes, la méthylation semble jouer un rôle dans la maturation de l'ARNr.

Chez les cellules eucaryotiques traitées à l'éthionine, il y a synthèse de S-Adénosyl-Ethionine qui est un inhibiteur de la méthylation. Ceci conduit à la sous-méthylation de l'ARN nucléaire et cytoplasmique. Cet effet est apparemment la cause de l'inhibition de la maturation du pré-ARNr 45S en ARNr cytoplasmique. Toutefois, le processus de maturation n'est pas bloqué dans son entièreté puisque les étapes du clivage plus précoces (45S ---> 32S) sont effectuées. Pas ou très peu d'ARNr mature est obtenu (6, 25).

Une autre expérience a été réalisée sur des cellules ovariennes de hamster chinois par usage de cycloleucine, inhibiteur spécifique et réversible des méthylations d'acides nucléiques. Il a été montré que la maturation des ARNr n'était pas modifiée qualitativement (les mêmes précurseurs étaient obtenus) mais bien quantitativement en cas de sous-méthylation: le taux d'apparition de l'ARNr 28S dans le cytoplasme était affecté sévèrement (80 à 90 % d'inhibition). Ceci serait dû au fait que

l'absence des 2'-O-méthylations pourrait altérer les sites de maturation et donc interférer avec certaines étapes du processus (66).

En conclusion, les étapes initiales de maturation sembleraient moins affectées par l'absence de méthylations que les suivantes. Ceci amènerait à penser que la méthylation ne jouerait pas de rôle dans l'initiation même du processus de maturation mais bien dans la continuation de ce processus. Le mécanisme d'action est encore mal compris: il s'agirait sans doute de modifications tridimensionnelles de l'ARNr.

4.5.2. Intervention de la méthylation dans l'assemblage du ribosome.

Les groupes méthyles joueraient également un rôle dans l'assemblage fonctionnel du ribosome.

Un cas a été plus particulièrement étudié: c'est la fonction des quatre groupes méthyles se trouvant dans la séquence m26Am26A présente à l'extrémité 3' des ARNr 16S et 18S procaryotique et eucaryotique (cfr. Fig. 16.).

L'existence chez *Escherichia coli* d'une souche mutante déficiente pour ces deux diméthylations a permis l'étude de leur fonction. Le dépistage de ces mutants est facilité par leur résistance à la kasugamycine, contrairement aux souches sauvages qui y sont sensibles.

On a pu constater que, si ces quatre groupes méthyles n'influencent pas la maturation de l'ARNr 16S (résultats similaires à ceux exposés dans le chapitre 4.4.1.A.), elles influencent par contre la formation du ribosome fonctionnel.

En effet, ces groupes méthyles influencent la conformation de l'ARNr au niveau de sa structure secondaire: la double diméthylation déstabilise la structure en épingle à cheveux afin de faciliter les interactions intermoléculaires entre constituants ribosomiques lors de l'initiation de synthèse protéique. On constate que la constante d'équilibre de la réaction $70S \rightleftharpoons 50S + 30S$ dépend de la présence de groupes méthyles: chez les mutants (ne possédant pas les quatre groupes méthyles), l'association des particules 30S et 50S donne un composé moins stable que chez l'organisme sauvage.

Au niveau des constituants ribosomiques, cette modification semble accélérer le lien entre deux protéines ribosomiques, S9 et S14 et la petite sous-unité. Or ces deux protéines elles-mêmes stimulent la liaison d'une autre protéine, S1, avec la petite sous-unité. On sait par ailleurs que le complexe S1-sous-unité 30S active l'initiation à la synthèse protéique (69).

La double diméthylation, en facilitant les interactions entre constituants, intervient donc dans l'assemblage du ribosome. Ceci se passe chez les procaryotes mais la grande conservation de

cette modification chez les eucaryotes laisse penser que la fonction des deux nucléosides modifiés m26Am26A serait semblable chez les eucaryotes. La mise en évidence de tels mutants chez les eucaryotes permettrait de progresser dans ce domaine.

4.5.3. Implications des méthylations dans le fonctionnement du ribosome.

En favorisant l'assemblage adéquat du ribosome, la méthylation joue, ne fût-ce qu'indirectement, un rôle dans le fonctionnement du ribosome. Ainsi la séquence m26Am26A permet-elle l'initiation de la synthèse protéique puisque l'association des protéines S9 et S14 à la sous-unité (favorisée par la présence des groupes méthyles) stimule la liaison de la protéine S1 à la sous-unité, le complexe S1-sous-unité permettant l'initiation de la synthèse protéique.

La méthylation est également impliquée dans le fonctionnement du ribosome dans un cas particulier: le phénomène de résistance aux antibiotiques.

Il existe chez les procaryotes toute une série d'espèces connues pour leur résistance à certains antibiotiques. Cette résistance est liée à la présence de groupes méthyles dans la séquence de l'ARNr.

C'est le cas de Streptomyces erythraeus. Celui-ci produit un antibiotique, l'érythromycine. L'organisme lui-même est protégé de l'effet de l'antibiotique car il possède une méthylase qui diméthyle spécifiquement un résidu adénine présent dans la séquence de l'ARNr 23S en position 2056. C'est cette m26A qui confère l'autoimmunité chez Streptomyces erythraeus. De plus, grâce à ce résidu méthylé, l'organisme est résistant aux antibiotiques du groupe des Macrolides (auquel appartient l'érythromycine) - Lincosamides - Streptogramines B (=MLS). Si on clone le gène responsable de la méthylase de Streptomyces erythraeus dans Streptomyces lividans (sensible à l'érythromycine), ce dernier devient également résistant aux antibiotiques de type MLS. Ceci prouve bien que la diméthylation d'un simple résidu adénine suffit pour rendre les ribosomes résistants aux antibiotiques de type MLS (70).

D'autres cas sont connus: Streptomyces azureus est un producteur naturel de thiostrepton. Une 2'-O-méthylation en position 1067 à l'extrémité 3' de l'ARNr 23S est responsable de son autoimmunité. Chez les autres procaryotes, le thiostrepton inhibe la synthèse protéique en s'associant à la sous-unité 50S. Plus précisément, il s'associe à un complexe formé par l'ARNr 23S et la protéine L11. La présence de ce groupe méthyle chez Streptomyces azureus empêche la liaison de l'antibiotique avec le ribosome qui devient dès lors insensible à son action (71).

La méthylation semble modifier le site de reconnaissance de l'antibiotique au niveau du ribosome. Elle permet ainsi son fonctionnement même en présence de l'antibiotique.

En conclusion, nous pouvons dire que la méthylation intervient dans les mécanismes de maturation de l'ARNr (chez les eucaryotes), dans l'assemblage du ribosome et de son fonctionnement. D'autres fonctions non décelées jusqu'à ce jour ne sont pas exclues. Le mode d'action de ces groupes méthyles est sans doute dû à une modification de la structure tridimensionnelle de l'ARNr entraînant des modifications au niveau des interactions avec d'autres partenaires. Le cas des eucaryotes est moins bien connu. Sans doute la mise en évidence de mutants déficients dans le processus de méthylations aiderait-elle à la compréhension de ce processus chez les eucaryotes.

5. ETUDE DE LA METHYLATION DES ARNr EUCARYOTIQUES.

Il serait intéressant d'étudier la méthylation des ARNr chez les eucaryotes, particulièrement chez les eucaryotes inférieurs, organismes moins complexes et donc plus faciles à étudier.

L'organisme utilisé est ici Saccharomyces cerevisiae. Quelques-uns des avantages à utiliser cet organisme sont décrits dans les lignes qui suivent.

5.1. L'organisme utilisé: Saccharomyces cerevisiae.

La levure de brasserie ou de boulangerie, Saccharomyces cerevisiae, est un champignon unicellulaire Eumycète Endomycétale de la famille des Saccharomycétacées. De par ses caractères, ce champignon constitue un matériel de choix pour la génétique.

- C'est un eucaryote simple.
- C'est un organisme unicellulaire non différencié.
- Sa carte génétique est de mieux en mieux connue.
- Son utilisation en laboratoire est pratique:
 - organisme de petite taille et non mobile;
 - temps de génération relativement court (1h30' à 4h en fonction de la souche utilisée);
 - croissance rapide sur milieu défini en conditions d'aérobiose et donc non limitation du nombre d'individus observés;
 - culture aisée en milieux solides et liquides.

5.2. Etude de la méthylation chez les eucaryotes: approche

 génétique et approche pharmaceutique.

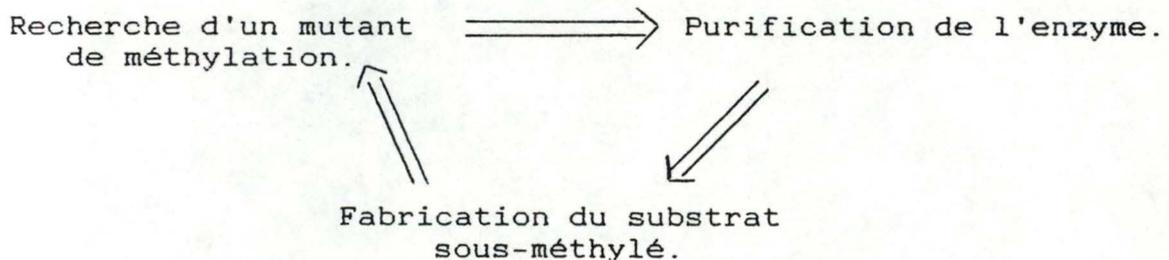
Lorsqu'on veut étudier la fonction de la méthylation par approche génétique chez les eucaryotes, on se heurte rapidement à des difficultés.

En effet, pour pouvoir étudier les fonctions de la méthylation, l'idéal est d'obtenir un mutant de méthylation afin de pouvoir comparer in vivo les souches mutante et sauvage.

Cependant, pour pouvoir reconnaître ce mutant, il faut avoir purifié l'enzyme de méthylation correspondant à la mutation: cette enzyme, incubée avec des précurseurs radioactifs (CH₃) et l'ARN sous-méthylé extrait de la souche mutante, va méthyler cet ARN qui sera dès lors radioactif. La présence ou non de radioactivité sur l'ARN permettra ainsi de reconnaître le mutant.

Or, pour suivre la purification de l'enzyme, il faut du substrat sous-méthylé. En effet, on ne peut savoir qu'une enzyme de méthylation est purifiée que si elle méthyle correctement un substrat sous-méthylé. Et la meilleure manière d'obtenir un substrat sous-méthylé est de posséder un mutant de méthylation qui produira cet ARN sous-méthylé nécessaire.

En résumé, nous nous trouvons engagés dans une voie circulaire.



Un moyen utilisé pour rompre ce cercle est la fabrication du substrat sous-méthylé en grandes quantités non grâce à une souche mutante mais par l'emploi de drogues inhibant le processus de méthylation. Cet ARNr sous-méthylé pourrait dès lors servir à la purification des enzymes nécessaires à la caractérisation de mutants de méthylation.

A ce propos, nous avons vu précédemment (44) que certaines drogues étaient utilisées in vivo pour inhiber la méthylation de l'ARN. Ainsi l'usage de la cycloleucine ou de l'éthionine entraîne une réduction du taux de méthylation des ARNr. Cependant, ces drogues entraînent également chez les eucaryotes des déficiences dans leur synthèse ou du moins dans leur

maturation. Ceci convient donc mal pour la fabrication du substrat sous-méthylé.

Il existe cependant d'autres drogues qui sous-méthylent également l'ARNr. Ce sont souvent des analogues de l'Adénosine. Ainsi la cordycepine, la xylosyladénine sous-méthylent l'ARN nucléaire des cellules L1210 dans une plus grande mesure qu'elles n'inhibent la synthèse de l'ARN de ces cellules. Ces drogues sont souvent utilisées à des fins chimiothérapeutiques (73).

La Néplanocine A sous-méthyle également l'ARNr de mammifères dans une proportion appréciable mais présente l'avantage supplémentaire qu'elle n'inhibe pas (ou presque pas) la synthèse d'ARNr. Cette drogue, testée sur des cellules cancéreuses de souris et d'homme n'a encore jamais été essayée sur des cellules de levure. C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier son effet sur de telles cellules.

5.3. Un cas d'application des drogues: la Néplanocine A.

5.3.1. Caractéristiques générales de la Néplanocine A.

La Néplanocine A (= NPCA) est un antibiotique produit à l'origine par le champignon Actinomycète *Ampullariella regularis*. Celui-ci synthétise également quatre autres substances (NPCB, NPCC, NPCD, NPCE) qui sont voisines de la première mais qui possèdent une activité plus faible (75). Actuellement, il est possible de synthétiser la NPCA.

La NPCA est un analogue de l'adénosine qui contient un cyclopentène au lieu du ribose de l'adénosine. Voici sa structure comparée à celle de l'adénosine.

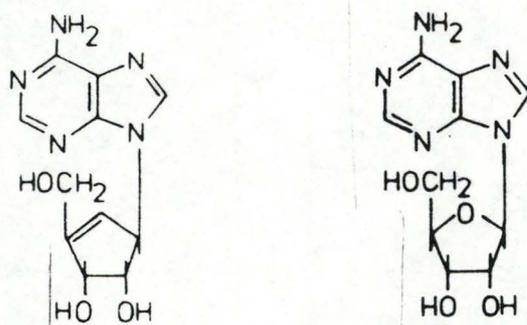


Fig. 20. Structure de la NPCA (à gauche) comparée à celle de l'adénosine (à droite) (57).

Quelques caractéristiques chimiques sont données dans la figure 21. La NPCA est stable à pH acide ou basique, aisément solubilisée dans l'eau mais par contre insoluble dans la plupart des solvants organiques. Le spectre en U.V. est fort semblable à celui de l'adénosine et montre un maximum d'absorbance à 262 nm. dans l'eau.

Physicochemical properties of
neplanocin A.

Melting point	220~222°C
Analysis	Calcd: C 50.19 H 4.98 N 26.60
	Found: C 49.96 H 5.00 N 26.43
Formula	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃
Mol. weight	263
[α] _D ²³	-157° (c 0.5, H ₂ O)
UV maxima	in H ₂ O: 262 nm (E _{1cm} ^{1%} 602) ←
	in 0.1N HCl: 260 nm (E _{1cm} ^{1%} 566)
	in 0.1N NaOH: 262 nm
	(E _{1cm} ^{1%} 595)

Fig. 4. UV spectrum of neplanocin A in H₂O.

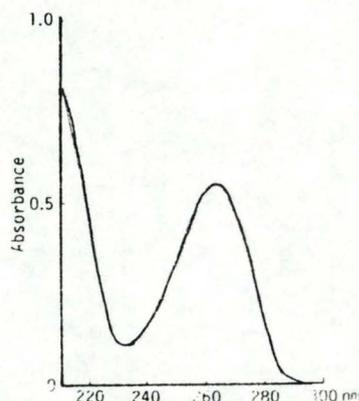


Fig. 21. Quelques caractéristiques de la NPCA.
Spectre en U.V. de la NPCA dans l'eau (76).

5.3.2. Effets de la NPCA.

Cette drogue est utilisée dans le cadre des recherches contre le cancer. En effet, elle possède une activité antitumorale significative vis-à-vis de diverses cellules de mammifères dont les cellules L1210 leucémiques de souris (76). La question est de savoir sur quoi agit la NPCA.

A. Effets sur la croissance.

Un premier effet observé sur cellules de carcinôme de colon humain (HT-29) est que la viabilité de ces cellules est réduite en présence de la drogue (74). La NPCA est modérément toxique à des concentrations 1 E-5M et 1 E-4M. A 1 E-4M, le nombre de cellules est d'environ 50 % de celui du contrôle sans NPCA.

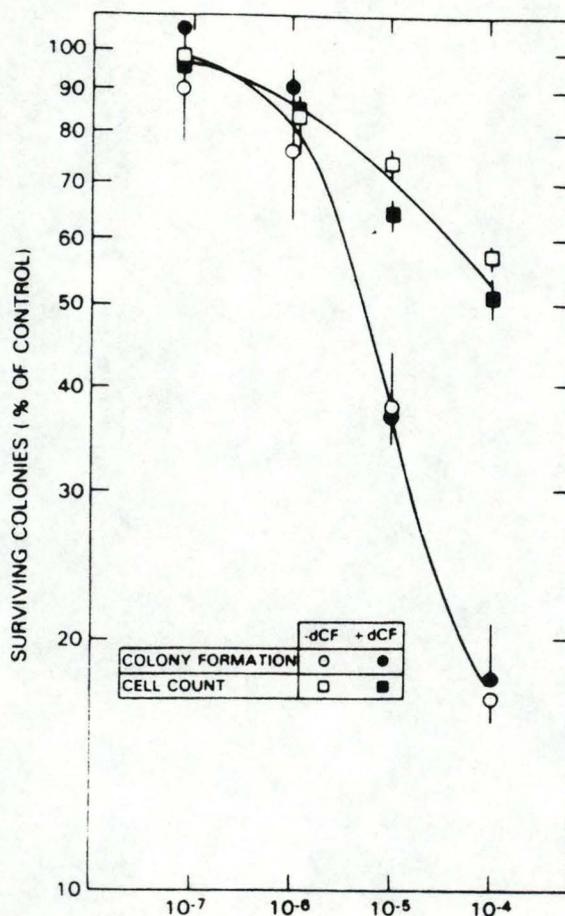


Fig. 22. Viabilité de cellules HT-29 après traitement de 24 heures à des doses croissantes de NPCA. Celle-ci est exprimée en % par rapport au contrôle.

Deux courbes sont représentées :

- la première (□) représente le nombre de cellules par colonie formée comparée à celui du contrôle.
- la deuxième (○) représente le nombre de colonies formées par rapport au contrôle (74).

La NPCA n'est pas très cytotoxique si on la compare à d'autres analogues de l'adénosine (74).

De plus, il a été montré que la NPCA est un puissant inhibiteur de la multiplication des virus de la vaccine dans des cultures de cellules L de souris (76).

B. Effet de la NPCA sur la méthylation de l'ARNr.

La NPCA possède en fait une remarquable spécificité à inhiber la méthylation des ARNr de mammifères tout en produisant peu d'effet sur la synthèse ou la maturation des ARNr (cfr. tableau 6). Cette action se distingue de celle d'autres analogues de l'adénosine tels que la cordycepine ou la xylosyladénosine qui affectent aussi bien la méthylation que la transcription de l'ARN.

La sous-méthylation est proportionnelle à la concentration en NPCA introduite dans le milieu de culture. La méthylation est autant affectée au niveau des bases que des riboses. Le tableau 6 nous indique le pourcentage de méthylation et de synthèse d'ARNr traité à différentes concentrations en NPCA par rapport à un contrôle non traité. Ceci est mesuré en pourcentage de la radioactivité présente sur la molécule d'ARN et due à l'incorporation de précurseurs radioactifs (3-H Méthionine est une mesure du pourcentage de groupes méthyles et 14-C est une mesure de la synthèse d'ARNr). Ce principe sera expliqué plus en détail dans la suite de l'exposé.

Drug treatment	RNA	
	[³ H]Met incorporation	[¹⁴ C]Urd incorporation
dCF	30,000 ± 1,600	49,700 ± 4,850
	dpm/A ₂₆₀	
	% control	
NPC		
10 ⁻⁶ M + dCF	81 ± 7	114 ± 10
10 ⁻⁶ M + dCF	55 ± 4	115 ± 4
10 ⁻⁴ M + dCF	31 ± 3	89 ± 8

Tableau 6. Méthylation et synthèse de l'ARNr à différentes doses de NPCA.

5.3.3. Mode d'action de la NPCA.

Puisque la NPCA est un analogue de l'adénosine, on pourrait se poser la question de savoir si la NPCA est incorporée dans l'ARNr.

A concentrations 1 E-5M et 1 E-4M, seulement 2 et 30 pmoles/A260 respectivement sont incorporés dans l'ARN, soit 0,001 % de la quantité totale de drogue présente dans le milieu (dont 15 % dans l'ARNt et 85 % dans l'ARNr). Cette incorporation est très faible, surtout en comparaison avec d'autres analogues de la SAM utilisés à des concentrations semblables. Il est donc peu probable que la cytotoxicité de la NPCA soit en relation avec son incorporation dans l'ARNr (74).

D'autres mécanismes sont proposés.

Tout d'abord, il est montré que la NPCA possède une activité inhibitrice importante sur la S-AdénosylHomocystéine hydrolase

(77). Ceci pourrait entraîner une augmentation considérable de la quantité de SAH dans le milieu (cfr. Fig. 19) qui est lui-même un puissant inhibiteur de la méthylation.

Ceci expliquerait l'effet inhibiteur de la NPCA sur la multiplication des virus de la vaccine dans une culture de cellules L de souris. En effet, on sait que la structure 5' terminale de la coiffe de l'ARNm du virus de la vaccine, qui comporte un groupe méthyle, est nécessaire pour une traduction efficiente des protéines virales et donc pour la réplication du virus. D'autre part, il a été démontré que les enzymes virales responsables de cette modification sont inhibées par la SAH (tout comme d'autres méthyltransférases d'ailleurs). L'inhibition de la SAH hydrolase entraînerait donc l'accumulation de SAH dans la cellule, qui inhiberait les méthyltransférases spécifiques au virus (ainsi que d'autres méthyltransférases cellulaires). La coiffe non méthylée du virus empêcherait donc sa multiplication (77).

Il pourrait également y avoir inhibition de la méthylation par inhibition directe des méthyltransférases. En effet, il peut se former un analogue de la S-AdénosylMéthionine, la S-Néplanocyl-L-Méthionine. Ce dérivé semble être un faible donneur de groupes méthyles (ceci a été mis en évidence par l'analyse de la quantité de S-Néplanocyl Homocystéine formée). La S-néplanocyl-L-Méthionine pourrait se combiner avec l'enzyme libre et entrer ainsi en compétition avec la SAM au niveau du site actif (74, 78).

Une autre possibilité serait que la NPCA inhiberait la synthèse de SAM à partir de l'ATP et de la méthionine, ce qui aurait pour conséquence de réduire considérablement la concentration intracellulaire de SAM (79).

En conclusion, quels que soient les mécanismes d'action de la NPCA, celle-ci possède une activité antitumorale en relation avec une activité inhibitrice de la méthylation. Il serait intéressant de mettre à profit cette propriété dans un autre domaine: l'étude du rôle de la méthylation chez les eucaryotes. La fabrication de substrat sous-méthylé en grande quantité faciliterait la purification des enzymes de méthylation et permettrait donc une approche génétique du problème.

Par conséquent, on s'attachera à étudier l'effet de la NPCA sur cellules eucaryotiques les plus simples possibles: celles de la levure Saccharomyces cerevisiae. Une technique de double marquage sera utilisée. Le principe est décrit ci-après.

5.3.4. Etude de l'influence de la NPCA sur cellules de
levure: principe du double-marquage.

Si la NPCA a l'effet attendu sur les cellules de levure, on doit s'attendre à ce que la quantité de groupes méthyles incorporés sur l'ARNr en présence de la drogue diminue par rapport à un contrôle non traité.

Pour mettre en évidence cette différence, une technique de double marquage sera utilisée.

On incube une culture avec des précurseurs donneurs de méthyles radioactifs marqués au 3-H (= SAM) et également avec de l'uridine marquée au 14-C. Les cellules utiliseront ces précurseurs marqués comme d'autres précurseurs non marqués présents dans le milieu. Le résultat est un ARN marqué au tritium (groupes méthyles) et au 14-C (uridine). La quantité de 14-C sur l'ARN sert à quantifier la synthèse d'ARN pendant le temps de marquage et la quantité de 3-H sur l'ARN est une mesure de la méthylation de cet ARN.

Le rapport 3-H/14-C permet donc d'estimer le degré de méthylation spécifique: autant de groupes méthyles radioactifs se sont incorporés par unité d'ARN. Toute diminution du degré de méthylation spécifique de l'ARN synthétisé durant l'intervalle considéré se manifestera par une réduction concomitante du rapport 3-H/14-C.

Il s'agira pour nous d'étudier les variations de ce rapport de méthylation en fonction de la quantité d'inhibiteur présent dans le milieu.

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. SOUCHE UTILISEE.

La souche utilisée est la souche Saccharomyces cerevisiae F1100 (a), offerte par le Dr. F. Lacroute, laboratoire de génétique - physiologie, Strasbourg, Paris.

2. METHODES GENERALES.

2.1. Préparation des milieux de culture.

Le milieu utilisé est un milieu complet: YPD.

Les proportions sont données en poids par volume d'eau distillée:

Bacto Yeast extract (Difco) : 1% ;
Peptone de caséine (Merck) : 2% ;
D + Glucose (monohydraté) (Merck) : 2% ;

Après ajustement des proportions indiquées ci-dessus et ajustement à pH 4,8 à l'aide d'HCl, le milieu est stérilisé dans une casserole à pression pendant 15 minutes à 120 degrés C dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau.

Pour les milieux solides, 2% de Bacto Agar (Difco) sont ajoutés. Après stérilisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri et mis à sécher deux jours à température ambiante avant utilisation.

2.2. Préparation des tampons.

Les volumes des tampons décrits ci-dessous sont ajustés à l'aide d'eau bidistillée. Les pH sont ajustés à l'aide de HCl ou de NaOH.

A. Tampon TEN.

Tris-HCl 0,1 M pH9 ;
EDTA 1 mM ;
NaCl 0,1 M .

B. Tampon NaAc.

NaAc 3 M pH5,5.

C. Tampon Tris.

Tris 10 mM pH7,5.

D. Néplanocine A.

Solution stock 0,006 M diluée dans de l'eau distillée stérile.

La NPCA a été gracieusement offerte par le Docteur Glazer, N.I.H. (Bethesda).

2.3. Mise en culture des cellules.

La souche FL100 est conservée à 4 degrés C sur boîtes de Petri contenant du milieu YPD solide.

Afin que les expériences soient reproductibles, il est indispensable de connaître avec précision la quantité de cellules inoculées au départ de chaque culture. A cette intention, on prépare une préculture (milieu liquide) qui sera placée à 30 degrés C jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance.

2.3.1. Préparation de la préculture.

Une colonie de levures est prélevée depuis une boîte à l'aide d'une aiguille montée stérilisée à la flamme et inoculée dans une petite bouteille contenant 5 ml de milieu stérile. La bouteille est alors placée à 30 degrés C sous une agitation constante pendant un jour. La croissance de la préculture est contrôlée par mesure de l'absorbance à 650 nm au spectrophotomètre (principe de turbidimétrie). Lorsque la densité optique est de 6 à 7 D.O. par ml, le milieu de culture peut être ensemencé.

2.3.2. Préparation de la culture.

La quantité de préculture requise est inoculée stérilement dans le milieu de culture. Celui-ci sera placé en chambre chaude (30 degrés C) sous agitation constante le temps requis pour la croissance.

2.4. Courbe de croissance de la souche FL100.

Une préculture est réalisée comme décrit ci-dessus et laissée un jour à 30 degrés C. On inocule ensuite le milieu de culture avec la préculture de manière à obtenir une valeur de départ d'environ 0,1 D.O./ml.

A partir du temps 0 (= le moment de l'ensemencement), la croissance de la culture est suivie régulièrement par lecture de

la D.O. au spectrophotomètre jusqu'au moment où la culture atteint la phase stationnaire.

3. METHODES D'ETUDE DES ARN.

3.1. Conditions de croissance et marquage de l'ARN.

Les cultures sont incubées dans des erlenmeyers de contenu variant selon l'expérience réalisée et/ou dans des tubes en verre pouvant être utilisés pour la centrifugation, contenant 2 ml de milieu chacun.

Pour effectuer le double marquage in vivo de l'ARN, deux précurseurs radioactifs sont ajoutés au milieu de culture:

1. S-Adénosyl-L-(méthyl-3H)-méthionine (AMERSHAM, TRK-S81, 75-78 Ci/mmoles).
2. ¹⁴C-Uridine (AMERSHAM, CFB-51 , 453 mCi/mmoles), à raison de 0,05 Ci/ml de milieu de culture.

La durée du marquage varie selon le type d'expérience réalisée et sera précisée par la suite.

Lorsque la culture atteint 4 D.O./ml , elle est stoppée par refroidissement dans la glace.

3.2. Extraction de l'ARN.

Lorsque la croissance est arrêtée par refroidissement dans la glace, une rapide vérification de l'état de la culture est réalisée au microscope optique afin de déceler la présence d'éventuels contaminants. L'extraction d'ARN se fait dans des tubes convenant pour la centrifugation et contenant en général 2 ml de culture.

3.2.1. Sédimentation et lavage des cellules.

La culture est centrifugée à 5000 RPM. (rotor Sorvall type GSA) pendant 5 minutes dans une centrifugeuse thermostatée à 0 degrés C. (centrifugeuse Sorvall RC-2-B). Le culot sera conservé: il sera suspendu dans un volume de tampon TEN et recentrifugé. On pratique habituellement deux lavages des cellules.

3.2.2. Broyage et extraction phénolique.

Après lavage, on resuspend le culot dans 200 µl de tampon TEN, 200 µl de phénol redistillé et saturé en tampon TEN . 120 mg de billes de verre de 0,45 mm de diamètre sont ajoutées.

Le tout est broyé pendant 2 X 30 secondes au broyeur (Braun Cell Homogeniser-MSK). Entre les deux broyages, les tubes sont refroidis 1 minute dans la glace.

L' homogénat est placé dans des eppendorfs stériles au moyen d'une pipette. Il sera centrifugé à 10000 RPM. (rotor Sorvall type SC-14827) pendant 10 minutes dans la centrifugeuse Sorvall thermostatisée à 0 degré C.

Le surnageant est aspiré avec une pipette et placé dans un eppendorf. En raison du faible volume d'extraction (environ 200 μ l) et de la difficulté à aspirer tout le surnageant sans prélever la phase phénolique, 50 μ l de phénol redistillé et saturé en TEN sont ajoutés au surnageant prélevé, vortexés et une deuxième extraction phénolique recommence: centrifugation à 10000 RPM. pendant 10 minutes, aspiration du surnageant que l'on place dans un troisième eppendorf.

3.2.3. Précipitation des ARN à l'éthanol.

Les ARN contenus dans le surnageant seront précipités à l'éthanol.

Dans chaque eppendorf contenant le surnageant sont ajoutés:

20 μ l de NaAc 3M pH 5,5;
500 μ l d'éthanol à -20 degrés C.

Après l'avoir vortexée, la solution est placée une nuit à -20 degrés C., le temps de la précipitation.

Elle est ensuite centrifugée à 15000 RPM. pendant 10 minutes et à 0 degré C. dans le rotor Sorvall type SC-14827.

Deux lavages à l'éthanol sont effectués, suivis de deux lavages à l'éther. Ces lavages débutent par une mise en suspension au vortex afin de décoller et de disperser le culot. Ces suspensions sont alors centrifugées chaque fois à 15000 RPM. (rotor Sorvall type SC-14827) pendant 10 minutes à 0 degré C.

Les lavages terminés, l'ARN est séché sous vide pendant 20 minutes. Le culot est ensuite redissout dans 50 μ l de tampon TRIS.

3.2.4. Mesures des quantités d'ARN récoltées.

Les quantités d'ARN récoltées sont déterminées par mesure de l'absorbance des solutions correspondantes à 260 nm. selon la valeur suivante:

$$1 A_{260} = 40 \mu \text{ gr/ml d'ARN.}$$

Le degré de purification de l'ARN récolté est mesuré en comparant l'absorbance à 260 nm. (ARN) et l'absorbance à 280 nm. (protéines).

Si le résultat A260/A280 est supérieur à 1,5, le degré de purification est déjà suffisant.

3.3. Méthode d'analyse des ARN marqués.

3.3.1. Réalisation d'une courbe d'efficacité du comptage du 3H et du 14C en fonction du Rapport des Standards Externes (RSE).

Il s'agit de connaître l'efficacité du comptage pour le tritium et pour le Carbone 14.

A cet effet, deux séries de fioles sont préparées contenant chacune:

- 10 ml de scintillant Aqualuma;
- une quantité connue de D.P.M. (désintégrations par minutes) de 3H dans la première série de fioles (176000 D.P.M.) de 14C dans la deuxième série de fioles (44000 D.P.M.)
- une quantité croissante d'agent quenchant (CCl₄) dans les fioles d'une même série (0 μ l , 5 μ l , 10 μ l , 15 μ l , 20 μ l , 25 μ l , 30 μ l , 40 μ l , 50 μ l , 60 μ l).

Chacune de ces séries est comptée au compteur à scintillation Beckman avec des ouvertures de fenêtres de 0,1 à 1,80 (première et deuxième séries) et de 3,20 à 10 (deuxième série).

3.3.2. Mesure de la radioactivité incorporée sur les molécules d'ARN.

On compte le rapport 3H/14C (groupes méthyles/uridine) au compteur à scintillations Beckman de la façon suivante:

dans chaque fiole sont ajoutés:

- 10 ml de scintillant Aqualuma;
- de l'ARN dilué dans du tampon TRIS correspondant à 1 ou 2 D.O. par mesure de l'absorbance à 260 nm.

Chaque fiole est vortexée, essuyée et mise à compter dans le compteur à radioactivité, 10 minutes dans deux canaux différents.

- L'ouverture des fenêtres du premier canal est de 0,1 à 1,80. Cette fenêtre donne une mesure de la quantité de 3H se trouvant incorporée dans l'ARN par comparaison avec la courbe d'efficacité réalisée auparavant.

- L'ouverture des fenêtres du second canal est de 3,20 à 10. Cette fenêtre donne une mesure de la quantité de 14C incorporée dans l'ARN également par comparaison avec la courbe d'efficacité du comptage en fonction du R.S.E. avec cette ouverture de fenêtre.

N.B. Les comptages ont toujours été effectués après que les fioles aient été entreposées pendant au moins deux heures à température ambiante. En effet, cette précaution s'est révélée indispensable pour éviter les artéfacts dus à la chémo- et photo-luminescence.

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

1. CARACTERISATION DE LA SOUCHE F1100: COURBE DE CROISSANCE.

Lorsqu'on suit l'évolution d'une culture de Saccharomyces cerevisiae au spectrophotomètre, on peut distinguer différentes phases de croissance. Une courbe de croissance typique présente trois phases distinctes.

1. Une phase de latence, où le taux de croissance est quasi nul, puis augmente progressivement: le microorganisme s'adapte aux conditions du milieu. Cette phase sera d'autant plus longue que l'organisme est en état de dormance (par exemple s'il sort du frigo) ou si l'organisme provient d'un milieu différent: il lui faut plus de temps pour adapter son métabolisme aux conditions du milieu. C'est pourquoi on réalise d'abord une préculture avant la culture proprement dite afin de réduire au maximum le temps de latence.

2. Une phase exponentielle où le taux de croissance est maximal et constant: l'organisme est adapté au milieu, il se reproduit à un vitesse constante, ce qui permet de définir un temps de génération caractéristique de la souche étudiée.

3. Une phase de ralentissement de la croissance suivi d'une phase stationnaire où le taux de croissance diminue progressivement pour s'annuler finalement à cause de la disparition des éléments nutritifs et de l'accumulation des déchets métaboliques.

La figure 22 représente la courbe de croissance de la souche F1100 réalisée en milieu YPD. Les différentes phases de croissance sont bien visibles. Après une phase de latence réduite, la culture est en phase exponentielle jusqu'aux environs de 5 DO. Ensuite on observe une phase de ralentissement de la croissance (la pente s'infléchit). Le plateau se situe à 10 DO environ. Le temps de génération de cette souche est de 1h30' environ. Ceci nous permettra par la suite de prévoir la croissance d'une culture pendant un temps déterminé.

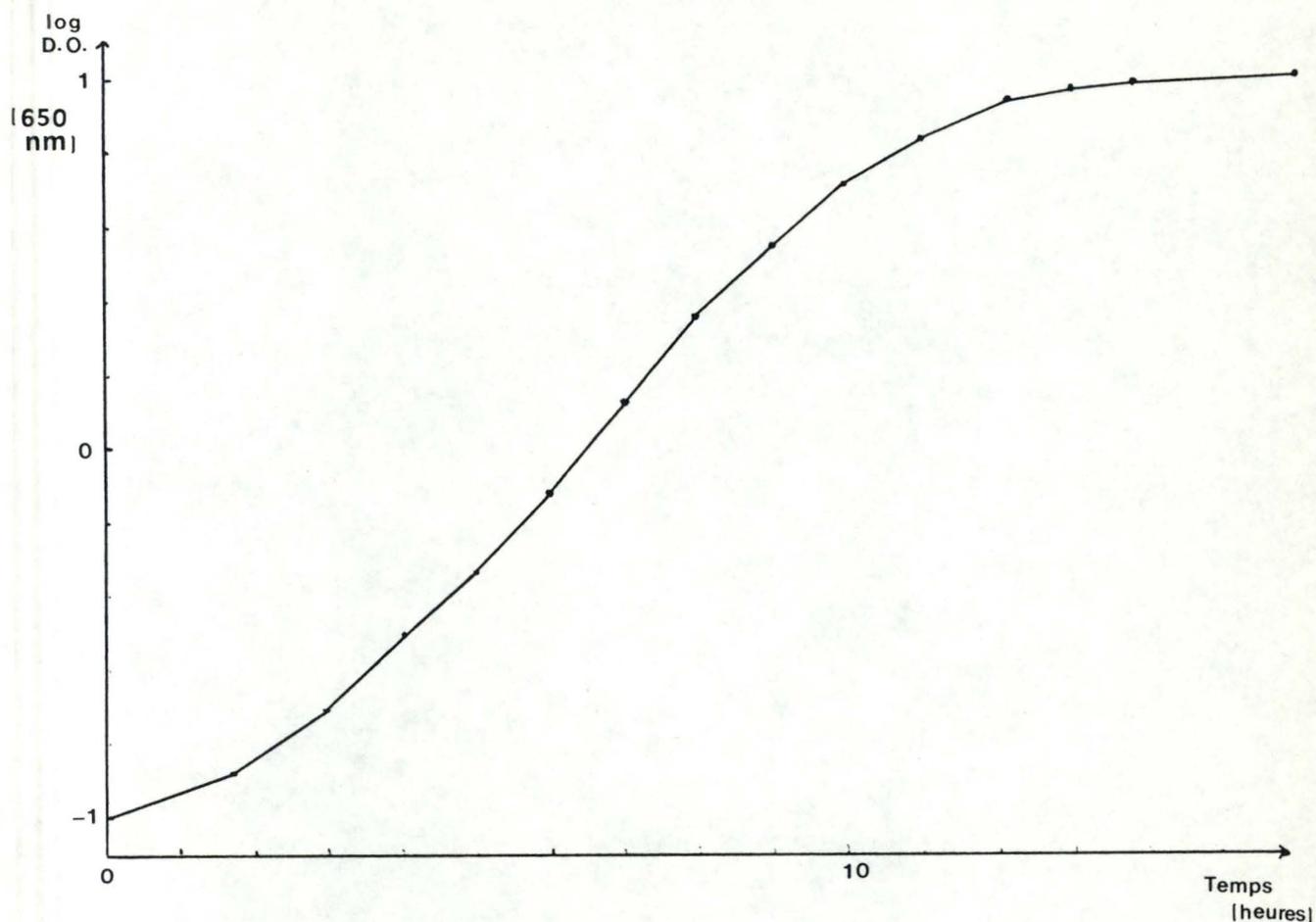


Fig. 22. Courbe de croissance de la souche F1100 réalisée en milieu YPD.

2. DETERMINATION DU VOLUME MINIMAL DE CULTURE PERMETTANT UNE EXTRACTION D'ARN SUFFISANTE.

A. Quantité de milieu de culture utilisé.

Pour réaliser un double marquage in vivo ainsi que pour étudier l'influence de la Néplanocine A (qui nous a été offerte en quantités limitées), il était nécessaire de réaliser les cultures les plus petites possibles.

Dans un premier temps, pour étudier la méthylation des ARNr, l'extraction d'ARN total semblait suffisante. Chez la levure en effet, les ARNm ne possèdent qu'un seul groupe méthyle sur la coiffe et les ARNt sont en proportion pondérale peu importante par rapport à la quantité d'ARNr 28S et 18S.

Différents essais ont été effectués à partir de 3ml, 2ml, et 1ml de culture.

Les quantités d'ARN extraites sont les suivantes (en sachant qu'une A(260) = 40 μ g d'ARN).

QUANTITE DE MILIEU	QUANTITE D'ARN RECOLTE μ	RENDEMENT MOYEN	RENDEMENT / ML. DE CULTURE
3 ml	246	246	82
	247		
2 ml	137	126	63
	114		
1 ml	60	49	49
	39		

Une première constatation est que le rendement de l'extraction par ml de culture diminue lorsque la quantité de milieu diminue. Ceci se comprend aisément puisque la perte d'ARN au cours de l'extraction sur les parois des tubes est proportionnellement beaucoup plus importante lorsqu'on a affaire à de plus petites quantités. De plus, l'étape d'extraction phénolique est particulièrement délicate lorsqu'on utilise de petites quantités.

Après centrifugation de l'homogénat, il est difficile d'aspirer le surnageant contenant les ARN sans prélever également un peu de la phase inférieure qui contient des protéines dénaturées. Cette difficulté augmente considérablement lorsqu'il s'agit d'extraire l'ARN correspondant à un ml de culture.

Pour remédier à cela, nous prélevons le maximum de surnageant avec le moins possible de phase phénolique (contenant les protéines) et une deuxième extraction est recommencée dans un nouvel eppendorf contenant le surnageant prélevé précédemment et 50 μ l de phénol redistillé et saturé en TEN. Le surnageant extrait sera débarrassé cette fois des impuretés contenues dans la phase phénolique.

Par la suite, un volume de 2 ml de culture a été choisi pour les extractions ultérieures. La quantité d'ARN extraite était suffisante (70 à 100 μ g suffisent en fait pour l'analyse ultérieure de l'ARN). De plus, l'étape d'extraction phénolique étant plus facile avec 2ml de culture, les risques de contamination par des protéines est moindre qu'avec 1 ml de culture.

B. Spectre en U.V. de l'ARN de levure.

Après extraction, l'ARN obtenu est relativement pur. Ceci se vérifie en réalisant le spectre en U.V. du produit obtenu.

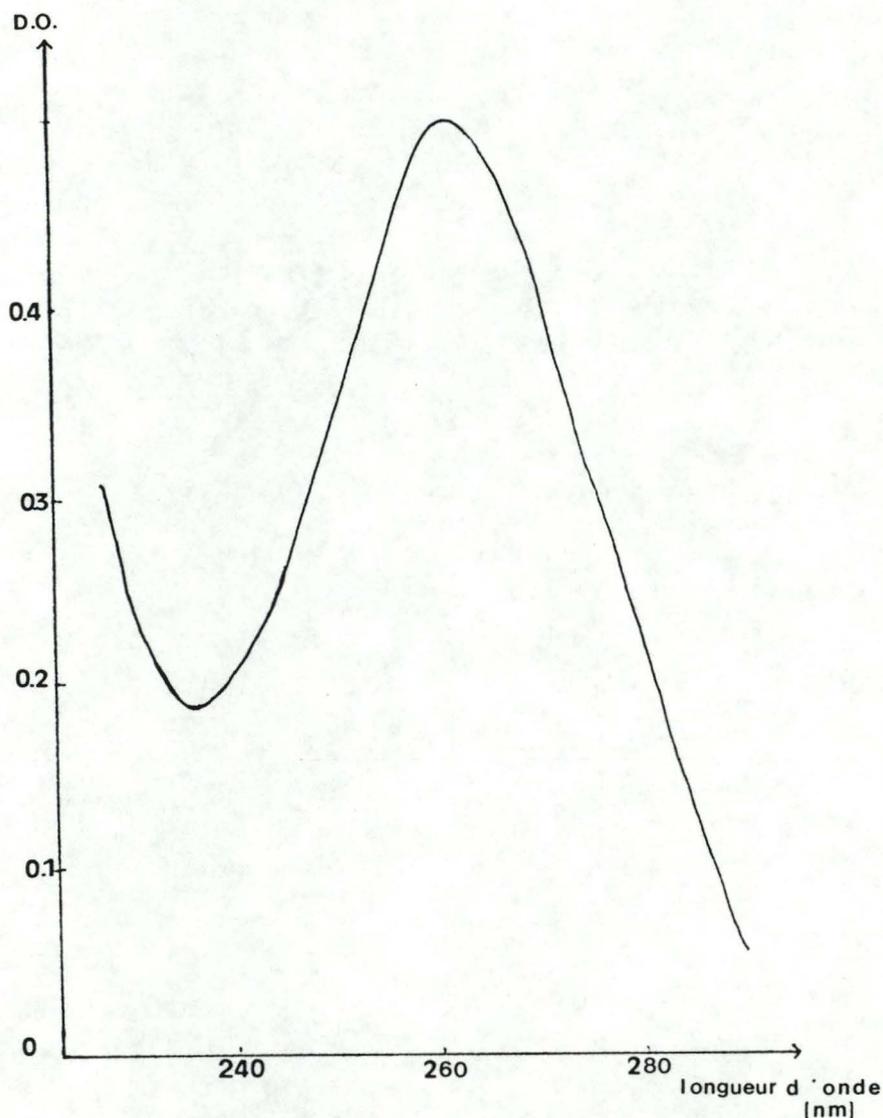


Fig. 23. Spectre de l'ARN total de levure.

Ce spectre correspond bien à celui de l'ARN, avec un maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm.

Pour estimer le degré de purification de l'ARN, on effectue généralement le rapport A_{260}/A_{280} . L'ARN a un maximum d'absorbance à 260 nm. mais il absorbe également à 280 nm. Les protéines, elles, ont un maximum d'absorbance à 280 nm. Il a été

établi que des préparations pures d'ARN possèdent un rapport A260/A280 égal à deux. S'il y a contamination par des protéines, ce rapport diminue significativement (80).

En pratique, il faut un rapport supérieur à 1,5 pour obtenir une purification suffisante. Les rapports A260/A280 que nous avons obtenus tout au long de nos expériences se situent entre 1,9 et 2,1.

3. MISE AU POINT DES CONDITIONS POUR REALISER UNE MESURE

 INDEPENDANTE DE L'INCORPORATION DES PRECURSEURS NUCLEOTIDIQUES

 ET DES METHYLS DANS L'ARN SYNTHETISE.

Avant d'effectuer un double marquage, il est nécessaire de réaliser certaines conditions relatives au comptage et au marquage de manière à pouvoir effectuer une mesure indépendante de l'incorporation des précurseurs nucléotidiques et des méthyls marqués incorporés dans l'ARN synthétisé.

3.1. Réalisation des conditions relatives au comptage.

Avant d'exposer nos résultats, quelques explications sur les principes théoriques qui nous servent de base pour le réglage du compteur à scintillation en régime de comptage double (3-H et 14-C) nous paraissent nécessaires.

3.1.1. Principes généraux du double marquage.

Le 3-H et le 14-C émettent des rayons β qui possèdent des énergies maximales de désintégration propres ($0,018 \text{ E}06 \text{ MeV}$ environ pour le 3-H; $0,155 \text{ E}06 \text{ MeV}$ environ pour le 14-C). Chaque isotope est caractérisé par un spectre particulier de distribution des énergies (E) (cfr. Fig. 23).

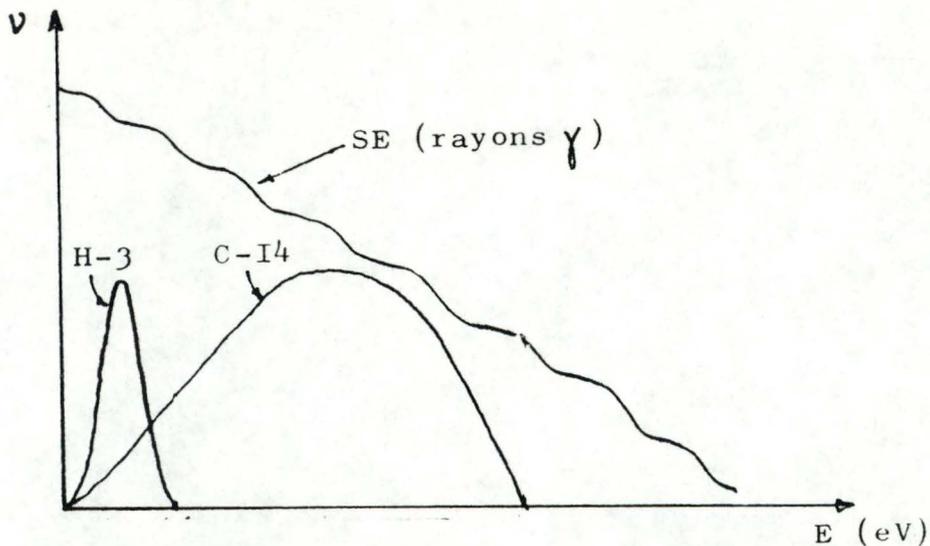


Fig. 24. Spectre de distribution des énergies exprimant la fréquence de désintégration en fonction du niveau énergétique.

Le liquide scintillant se trouvant dans la fiole avec l'isotope radioactif émet, sous l'impact des rayons β , une gerbe de photons possédant une énergie proportionnelle à celle du rayon incident. Le compteur dispose de tubes photomultiplicateurs qui vont transformer en impulsion électrique et multiplier l'énergie des photons. L'énergie électrique sera enregistrée sous forme de coups que le compteur exprime en coups par minute (= CPM). Le nombre de CPM est donc proportionnel au nombre de désintégrations par minute (= DPM): le facteur de proportionnalité définit l'efficacité du comptage (E).

$$E = \text{CPM} / \text{DPM}.$$

Cependant, l'efficacité du comptage peut varier en fonction de la présence de certains agents dits "quenchant" définis comme étant tout agent réduisant (parfois considérablement) l'efficacité du comptage. Il est donc important de connaître l'efficacité de chaque comptage. Pour cela, il faut connaître le nombre de CPM comptés ainsi que le nombre de DPM se trouvant réellement dans la fiole. Or, c'est cela précisément que l'on cherche! Il faut donc avoir recours à un standard.

Dans le cas présent, on recourt à la méthode du "standard externe". Celui-ci est fourni par la machine: elle possède une source de rayonnement γ de très haute énergie (qui n'interfère pas avec les rayonnements β que l'on désire compter) avec un spectre caractéristique, en conditions non quenchées, tenu en mémoire. Ce rayonnement irradie chaque fiole à compter. Le nombre de CPM mesurés après passage à travers la fiole comparé à la valeur connue de DPM en l'absence de quench fournit un "rapport du standard externe" (= RSE).

Ce rapport évolue en fonction du quenching. Il ne reste plus qu'à faire compter une série de fioles avec une quantité connue de DPM et une quantité croissante d'agent quenchant. On obtiendra ainsi

une courbe d'étalonnage exprimant l'efficacité du comptage calculée (CPM / DPM) en fonction du RSE fourni à chaque comptage.

Par la suite, connaissant le nombre de CPM mesurés et le RSE, il sera possible de calculer le nombre de DPM présents dans l'échantillon grâce à cette courbe.

Il faut remarquer cependant que l'efficacité du comptage dépend également de l'ouverture des fenêtres de comptage pour le 3-H et le 14-C: il est possible de mesurer les CPM correspondants à tout le spectre d'énergie ou seulement de mesurer les CPM correspondants à une partie de ce spectre. La partie du spectre mesurée est déterminée grâce à ce qu'on appelle des "fenêtres de comptage", graduées de 0,00 à 10,00 (l'ouverture maximale "0 à 10" correspond à la totalité du spectre de distribution des énergies).

L'intérêt d'utiliser seulement une partie du spectre est le suivant.

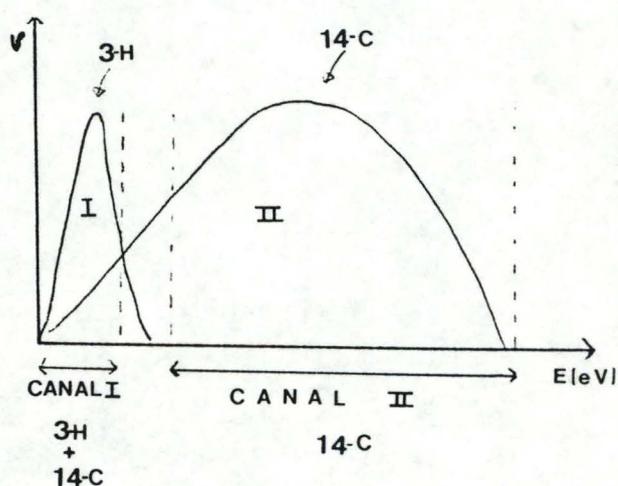
Il faut se rappeler que les spectres de distribution des énergies du 3-H et du 14-C se chevauchent partiellement (Fig. 24).

Il s'agit pourtant de pouvoir déterminer séparément le nombre de CPM dus au comptage du 3-H et du 14-C. A cet effet, deux canaux comprenant des fenêtres d'ouverture différentes seront utilisés.

3.1.2. Détermination de l'ouverture des fenêtres de comptage.

Avant d'établir une courbe du comptage en fonction du RSE, il est nécessaire de déterminer l'ouverture des fenêtres des deux canaux utilisés. La fenêtre du canal 1. servira à estimer le nombre de DPM de 3-H. Elle sera réglée selon le compromis suivant: il s'agit d'obtenir une efficacité de comptage du 3-H la plus élevée possible tandis que le nombre de CPM dus au 14-C dans cette fenêtre ne peut être proportionnellement trop élevé (10 à 15 % au maximum). La fenêtre du canal 2. sera réglée de manière à ne compter que les CPM dus au 14-C.

SCHEMATIQUEMENT:



Pour délimiter l'ouverture des fenêtres, deux fioles sont préparées contenant chacune une quantité connue de DPM soit de 3-H, soit de 14-C. L'efficacité du comptage étant très bonne pour le 14-C (environ 90 % avec ouverture maximale des fenêtres), on utilisera une quantité de DPM de 3-H beaucoup plus importante que la quantité de DPM de 14-C: 176000 DPM de 3-H et 44000 DPM de 14-C. C'est cette même quantité de DPM qui sera utilisée lors de la réalisation de la courbe d'efficacité.

Pour déterminer les limites de la fenêtre 2. (14-C), il suffit de faire compter la fiole contenant du 3-H avec une ouverture maximale (0 à 10) et d'élever progressivement la limite inférieure, ceci jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de CPM enregistrés (excepté le background qui comprend une cinquantaine de CPM). Le comptage de la fiole contenant du 14-C permet de connaître approximativement l'efficacité du comptage du 14-C à cette ouverture (elle varie cependant en fonction du RSE).

C A N A L N U M E R O 2				
OUVERTURE	3-H (176000 DPM)		14-C (44000 DPM)	
	CPM	EFFICIENCE (%)	CPM	EFFICIENCE (%)

3,20 à 10	45	/	31400	70 %

Désormais, la fenêtre 2. sera réglée de 3,20 à 10,00.

En ce qui concerne la fenêtre 1., la limite inférieure est placée à 0,1 (ceci afin de ne pas comptabiliser la radioactivité parasite de basse énergie plus importante entre 0 et 0,1); la limite supérieure est déterminée en faisant compter les fioles 1. et 2. tout en réduisant progressivement cette limite. Les comptages sont effectués jusqu'à obtenir une ouverture où le nombre de CPM dus au 14-C atteint environ 10 %.

C A N A L N U M E R O 1				
OUVERTURE	3-H (176000 DPM)		14-C (44000 DPM)	
	CPM	EFFICIENCE (%)	CPM	EFFICIENCE (%)

0,1 à 1,80	16750	9,5 %	1951	4,5 %

L'efficience du comptage du 3-H est assez faible. On compensera cette efficience faible en jouant sur les proportions 3-H / 14-C qu'on élève en conséquence pendant le marquage in vivo.

3.1.3. Réalisation de la courbe d'étalonnage: efficience du comptage en fonction du RSE.

Afin de réaliser la courbe d'étalonnage, deux séries de fioles ont été mises à compter avec une quantité croissante d'agent quenchant (CCl₄) dans les fioles de chaque série. Les fioles de la première série contiennent 176000 DPM de 3-H, celles de la deuxième série contiennent 44000 DPM de 14-C.

$$\text{L'efficience } E = \frac{\text{CPM mesurés} - \text{CPM (background)}}{\text{DPM}}$$

Trois courbes seront réalisées (cfr. fig. 25.):

- a. efficience de comptage du 14-C dans le canal 2;
- b. efficience du comptage du 3-H dans le canal 1;
- c. efficience du comptage du 14-C dans le canal 1.

En effet, dans le canal 1. sont comptés des CPM dus au 3-H en majorité mais il existe également des CPM dus au 14-C. Il faudra en déterminer la proportion.

Désormais, pour pouvoir déterminer le nombre de DPM dus au 3-H et au 14-C dans un échantillon, on fait référence à cette courbe. Connaissant les CPM mesurés dans le canal 2. et l'efficience du comptage, il est possible de déterminer le nombre de DPM de 14-C. Connaissant le nombre de DPM de 14-C existant dans l'échantillon et l'efficience de comptage du 14-C dans le canal 1., il est possible de déterminer le nombre de CPM dus au 14-C dans le canal 1. En soustrayant cette quantité du nombre total de CPM mesurés dans le canal 1., on obtient la quantité de CPM dus au 3-H dans le canal 1. et donc le nombre de DPM de 3-H contenus dans l'échantillon.

Mathématiquement, cela donne:

$$\text{DPM (14-C)} = \text{CPM (II)} / E (14-C; I)$$

$$\text{DPM (3-H)} = \frac{\text{CPM (I)} - (\text{DPM (14-C)} \times E (14-C; I))}{E (3-H; I)}$$

avec E = efficience
les chiffres entre parenthèses indiquent le canal (I ou II) et/ou l'isotope dont il s'agit.

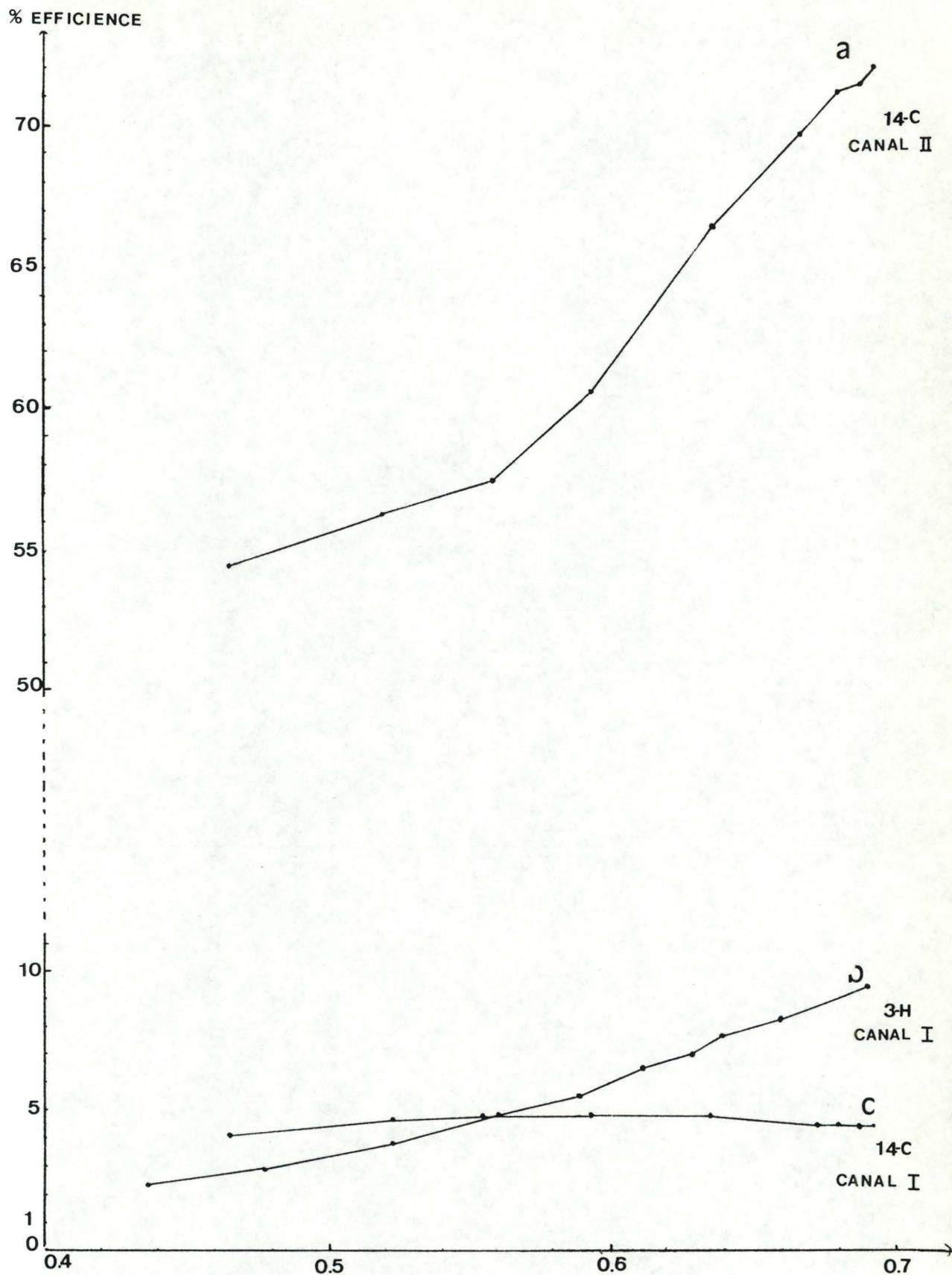


Fig. 25. Courbes d'étalonnage exprimant l'efficacité calculée du comptage en fonction du RSE dans les canaux I (14-C et 3-H) et II (14-C).

3.2. Réalisation des conditions relatives au marquage.

3.2.1. Considérations générales.

Le marquage des cellules à la S-Adénosyl (méthyl 3-H)-méthionine requiert certaines conditions afin d'obtenir une incorporation optimale du marqueur (81). En effet, l'entrée de la SAM est un transport actif qui se réalise grâce à une perméase. Ce système de transport est dépendant de la température et du pH. Il atteint son optimum d'activité pour des valeurs de pH et de températures égales à 4,8 et 35 degrés C. Les milieux de culture utilisés sont à pH 4,8 et les cultures sont incubées à 30 degrés C., température pour laquelle le système de transport se trouve presque à son optimum d'activité. L'entrée de l'uridine, quant à elle, semble moins dépendante de conditions particulières.

En plus des propriétés propres au système de transport, d'autres facteurs influencent le marquage de l'ARN. Parmi ceux-ci se trouve la composition du milieu de culture: le milieu YPD utilisé contient déjà de la SAM non radioactive. Ceci entraîne une dilution du marqueur dans le milieu.

Il s'agira d'obtenir au niveau de l'ARN extrait une quantité de CPM de 3-H et de 14-C suffisante pour être comptée avec précision sans toutefois être excessive (compte tenu du coût élevé des précurseurs marqués): ceci veut dire approximativement entre 5000 et 50000 CPM. De plus, pour obtenir une précision suffisante dans le comptage du tritium dans le canal 1., il faut que la proportion de CPM dus au 14-C dans ce même canal soit la moins importante possible. Plus le nombre de CPM comptés dans le canal 1. sera importante par rapport au nombre de CPM mesurés dans le canal 2., plus la proportion de 14-C dans le canal 1. sera faible.

Une première approximation du nombre de μCi ($1\mu\text{Ci} = 2,2 \text{ E}06 \text{ DPM}$) à inoculer dans le milieu de culture peut être réalisée par simple marquage.

3.2.2. Simple marquage de l'ARN.

Des études précédentes (82) avaient déjà réalisé un simple marquage in vivo à la SAM. Entre 3 et $10\mu\text{Ci}$ par ml de milieu étaient utilisés. D'autre part, un article récent de Glazer (74) utilisant une technique de double marquage sur mammifère signalait la proportion SAM(3-H) / Uridine(14-C) = 200.

Nous avons donc réalisé des simples marquages d'une part avec 5 μCi , 10 μCi , 15 μCi de SAM/ml et d'autre part avec 0,05 et 0,1 μCi d'Uridine/ml. 40 μgr d'ARN extrait à partir de ces différentes cultures ont été comptés.

L'efficience du comptage tel qu'il est réalisé est d'environ 10 %

pour le 3-H et de 70 % pour le 14-C (ceci est valable pour toutes les expériences ultérieures).

S A M (C P M)			U R I D I N E (C P M)	
5 μ Ci/ml	10 μ Ci/ml	15 μ Ci/ml	0,05 μ Ci/ml	0,1 μ Ci/ml
18127	32615	42833	8623	20868

La quantité de CPM recueillis dans chaque expérience semble suffisante. Il suffit dès lors d'essayer ces proportions en double marquage.

3.2.3. Double marquage de l'ARN.

Différentes proportions de précurseurs marqués (SAM / Uridine) ont été essayées. Les résultats sont les suivants.

PROPORTION SAM / URIDINE	CPM 3-H CANAL 1.	CPM 14-C CANAL 2.	CPM 14-C CANAL 1.	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H/ 14-C
5 μ Ci SAM 0,05 μ Ci U	17119	7404	462	182504	10384	18
10 μ Ci SAM 0,05 μ Ci U	29792	7263	451	314928	10144	31
10 μ Ci SAM 0,07 μ Ci U	37958	13500	846	400845	19014	21
10 μ Ci SAM 0,1 μ Ci U	31766	15457	959	334384	21558	16
15 μ Ci SAM 0,1 μ Ci U	34902	15409	960	372086	21581	17

Les quantités de précurseurs radioactifs sont données dans le tableau en μ Ci par ml de culture.

Il apparaît à la lumière de ces résultats que 5 μ Ci de SAM / ml et 0,05 μ Ci d'Uridine / ml donnent une bonne proportion. En effet, le nombre de CPM relevés est suffisant pour permettre un comptage précis et le pourcentage de CPM dus au 14-C dans le canal 1. est largement en dessous de 10 %.

Désormais, lors des expériences ultérieures de double marquage, $0,05 \mu\text{Ci}$ d'Uridine / ml et $5 \mu\text{Ci}$ de SAM / ml seront utilisées.

3.2.4. Incorporation réelle des précurseurs marqués sur l'ARN.

A ce stade, une vérification nous paraissait nécessaire. Le nombre de CPM relevé est-il dû à une incorporation dans la molécule d'ARN ou bien à un phénomène d'adsorption non spécifique de précurseurs radioactifs sur des molécules froides?

A cet effet, deux cultures de deux ml ont été réalisées mais sans adjonction de précurseurs radioactifs. A la fin de la période de croissance (4DO), la croissance des cultures est stoppée par refroidissement dans la glace. Dans la première culture, rien n'est ajouté: celle-ci servira à mesurer le bruit de fond lors du comptage de la radioactivité présente sur l'ARN. Dans la deuxième culture, $5 \mu\text{Ci}$ de SAM / ml et $0,05 \mu\text{Ci}$ d'Uridine / ml sont ajoutés avant l'extraction. Les cellules n'incorporeront donc quasi pas de précurseurs radioactifs puisque leur croissance est stoppée à ce moment. La radioactivité présente sera donc due à un phénomène d'adsorption des précurseurs radioactifs sur l'ARN lors de l'extraction plutôt qu'à un phénomène d'incorporation véritable.

$40 \mu\text{g}$ d'ARN sont mis à compter. Les CPM existant réellement au niveau de l'ARN de la deuxième culture sont les CPM mesurés dans la culture 2. soustraits de la quantité de CPM mesurés dans la première culture (= bruit de fond). Le nombre de CPM existant au niveau de l'ARN peut être comparé à la valeur attendue de CPM si la culture avait grandi en présence de précurseurs radioactifs (ces derniers chiffres sont repris de l'expérience précédente).

	C P M M E S U R E S		C P M R E E L S	%
	CULTURE 1	CULTURE 2		
Canal 1.	28 (20%)	106 (10%)	78	0,5%
Canal 2.	11 (>20%)	58 (15%)	47	0,6%

La colonne "%" contient les valeurs en pourcentage des CPM réels comparés aux CPM obtenus en cas de marquage pendant la période de croissance (expériences précédentes).

On peut observer que la quantité de CPM mesurés dans ce cas-ci est négligeable par rapport au nombre de CPM mesurés dans l'expérience précédente.

Ceci indique qu'il y a très peu d'adsorption des précurseurs radioactifs sur l'ARN extrait. Les mesures faites auparavant correspondent donc bien à une incorporation des précurseurs radioactifs dans les molécules d'ARN plutôt qu'à leur adsorption.

4. ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA NPCA SUR LES CELLULES DE LEVURE.

4.1. Caractérisation de la NPCA: réalisation d'un spectre d'absorption.

Pour connaître la concentration exacte de notre solution stock ainsi que pour estimer la pureté de la NPCA, nous avons réalisé un spectre en U.V. de l'échantillon reçu.

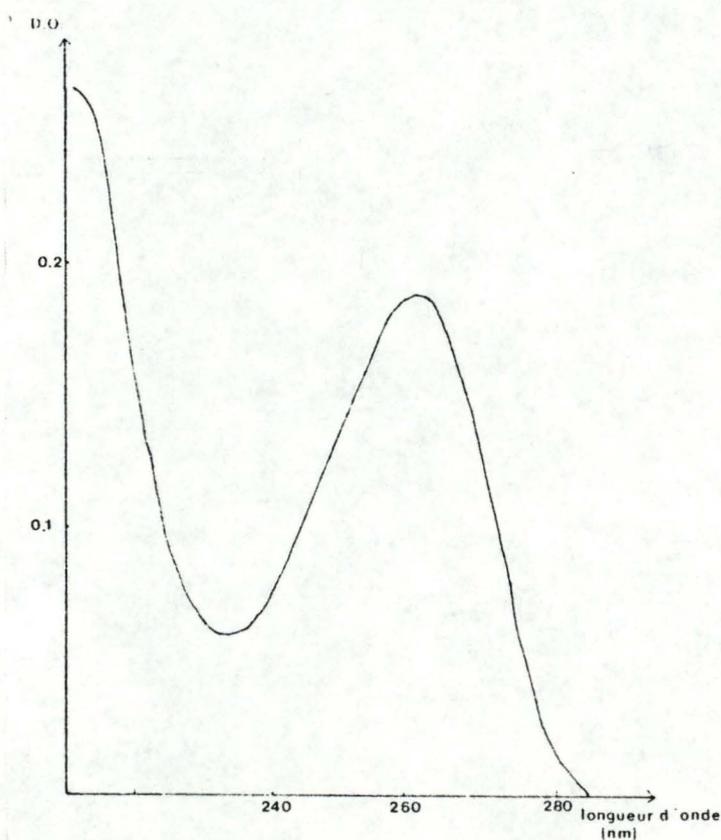


Fig. 26. Spectre en U.V. de la NPCA dans l'eau.

Ce spectre correspond bien à celui de la NPCA, avec un maximum d'absorbance vers 260-262 nm (cfr. fig. 21).

Sachant que $\log I_0 / I = \epsilon \cdot C \cdot d$,

avec $\log I_0 / I =$ Densité optique;

$\epsilon =$ coefficient d'extinction molaire = $1,42 \text{ E}4$;

$C =$ concentration de l'échantillon;

$d =$ distance parcourue par le rayon dans la solution (= 1 cm).

connaissant ϵ et d et en mesurant la DO de l'échantillon, il est possible de connaître sa concentration.

Celle-ci est de $0,0059 \text{ M}$.

4.2. Influence de la NPCA sur la croissance des cellules.

Puisque la NPCA agit sur les cellules de mammifère en réduisant leur viabilité, il serait intéressant de savoir à quel point la NPCA affecte la croissance des cellules de levure et si son effet est comparable à l'inhibition produite sur cellules de mammifères.

Afin d'étudier ceci, nous avons effectué quatre courbes de croissance (fig. 27). La première est effectuée à partir d'un milieu sans NPCA: elle servira de témoin. Les trois autres sont réalisées à partir de milieux contenant une concentration de NPCA $1\text{E}-7\text{M}$, $1\text{E}-6\text{M}$ et $1\text{E}-5\text{M}$ (nous avons choisi ces concentrations en nous référant à l'étude faite par Glazer sur cellules cancéreuses humaines (74)).

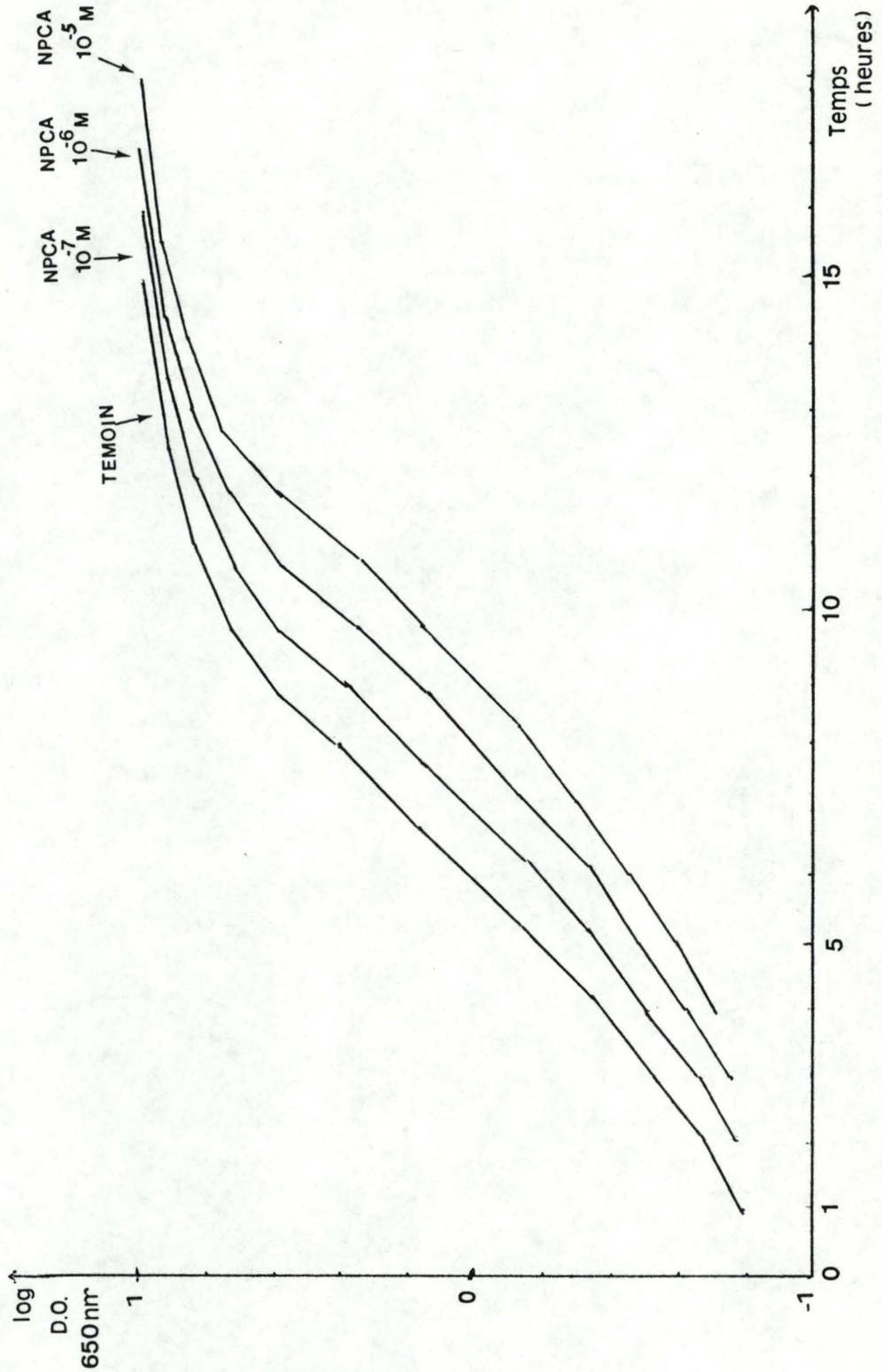


Fig. 27. Courbes de croissance de cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae*, souche F1100 à différentes concentrations en NPCA ($10E-7$ M, $10E-6$ M et $10E-5$ M) comparées à celle d'une culture témoin (sans NPCA).

Pour plus de clarté du graphique, nous avons préféré décaler les différentes courbes de croissance entre elles. Les pentes des courbes en phase exponentielle sont identiques et la valeur de la DO au plateau est la même pour toutes les cultures. Apparemment, il n'y a donc pas d'effet marqué de la NPCA sur la croissance des cellules: celles-ci se répliquent à la même vitesse (pente identique) et arrêtent leur croissance à une DO identique.

Cet effet se distingue donc de celui de la même drogue sur cellules HT-29. Nous avons vu précédemment qu'à ces concentrations, la NPCA était modérément cytotoxique pour ces cellules. De tels effets n'ont pas été décelés ici. Peut-être la NPCA affecte-t-elle la méthylation dans une mesure supportable pour la cellule sans influencer la croissance. Peut-être aussi n'affecte-t-elle pas du tout la méthylation chez la levure. Ceci sera envisagé par la suite. Cependant, pour pouvoir connaître le pourcentage de méthylation atteint sur l'ARN des cellules cultivées en présence de NPCA, il est nécessaire de pouvoir faire référence à un contrôle fiable équivalent à 100 % de méthylation.

4.3. Etude de l'effet inhibiteur de la NPCA sur la méthylation

 des cellules de levure marquées pendant toute la durée de la

 croissance.

4.3.1. Réalisation d'un contrôle équivalent à 100 % de méthylation.

Comme il a été vu précédemment, le rapport 3-H / 14-C obtenu lors d'un double marquage est une mesure du degré de méthylation spécifique de l'ARN. Si la NPCA a l'effet attendu, ce rapport 3-H / 14-C doit diminuer sensiblement lorsque la culture est soumise à l'action de la drogue. En comparant ce dernier rapport avec le rapport-contrôle, il est possible de détecter l'influence de différentes concentrations en NPCA sur la méthylation.

Mesure de la variabilité incontrôlée des valeurs 3-H / 14-C. Répétition d'une expérience type.

Une première expérience a été réalisée comme suit pour savoir si la valeur contrôle était stable.

Le marquage a été effectué pendant toute la durée de la croissance. Nous espérons ainsi voir s'amplifier au cours des générations cellulaires le phénomène de la sous-méthylation par action de la NPCA, chaque génération produisant de l'ARN sous-méthylé. Dix tubes contenant 2 ml de milieu ont été préparés, contenant chacun $10 \mu\text{Ci}$ de SAM et $0,1 \mu\text{Ci}$ d'Uridine. La mesure du rapport 3-H / 14-C devrait fournir la valeur de référence stable correspondant à 100 % de méthylation dans le contrôle.

DPM 3-H (40 μ gr ARN)	DPM 14-C (40 μ gr ARN)	RAPPORT 3-H / 14-C
181272	11431	15,9
219517	18004	12,2
165640	8806	18,8
171696	16324	10,5
209932	13759	15,3
185615	18136	10,2
191873	18990	10,1
198974	16966	11,7
157733	18701	8,4
226188	20908	10,8

La moyenne des différents rapports de méthylation est de 12,4 et l'estimation de la variance = 10,5.

On observe une variation dans les rapports de méthylation fort importante (8,4 à 18,8): plus que du simple au double! Six mesures sur dix sont cependant plus rapprochées (10,1 - 10,2 - 10,5 - 10,8 - 11,7 - 12,2). Il est évident qu'une sous-méthylation, même importante, serait difficile à détecter dans de telles conditions. Il s'agit tout d'abord de comprendre d'où provient cette hétérogénéité. Des variations surviennent-elles pendant le temps de culture? Est-ce dû à des artefacts pendant l'extraction de l'ARN (prélèvement préférentiel d'un type d'ARN particulier lors de l'extraction phénolique, précipitation préférentielle d'un type d'ARN, contamination par des protéines...) ou encore pendant le comptage de la radioactivité présente sur l'ARN?

Les conditions de culture et/ou d'extraction peuvent-elles être cause de la variabilité expérimentale observée?

Pour tester ces différentes hypothèses, nous avons réalisé l'expérience suivante.

Nous avons mis en culture six tubes de deux ml exactement comme précédemment. Mais à la fin de la culture, juste avant l'extraction, nous avons mélangé les contenus des tubes deux à deux puis reséparé en six tubes. Nous avons ainsi trois séries de deux tubes ayant un même contenu.

Les résultats sont les suivants:

	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C
SERIE 1	264301	17901	14,76
	265087	18196	14,57
SERIE 2	249772	16219	15,40
	301196	18837	15,99
SERIE 3	303491	17746	17,10
	299633	17960	16,68

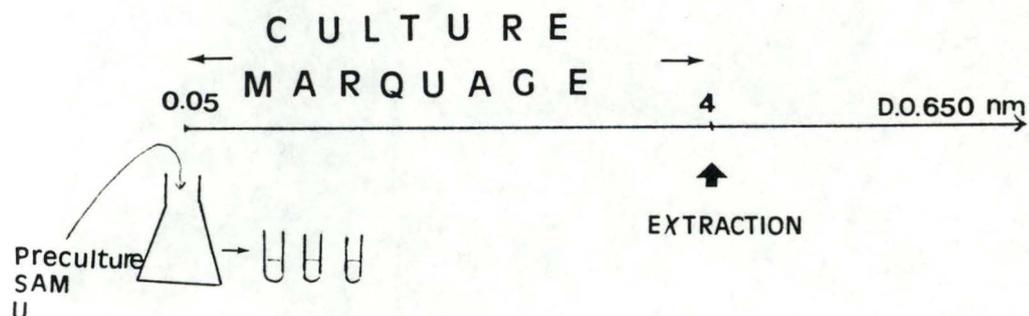
On peut observer qu'il existe peu de variations entre tubes d'une même série alors qu'il existe des variations plus importantes entre séries différentes. Ceci indiquerait que la variation décrite précédemment serait due aux conditions de culture et non à l'extraction elle-même ou au comptage de la radioactivité, ultérieurs au mélange des tubes deux à deux.

En quoi les conditions de culture pourraient-elles influencer le rapport de méthylation spécifique à ce point ? Il faut se rendre compte que l'on travaille avec des petites quantités de milieu (2 ml). Il faut donc très peu d'Uridine (2 μ l) et de SAM (10 μ l) marquées. La moindre erreur de pipetage peut causer des variations relativement importantes dans la quantité de SAM et d'Uridine présentes mais aussi dans leurs proportions. De plus, la quantité de préculture prélevée pour inoculer le milieu au temps 0 était minime (5 à 6 μ l). Une différence minime dans les concentrations cellulaires de départ pourra aboutir au bout de quelques générations en des densités cellulaires sensiblement différentes. C'est effectivement ce qu'on observe: à partir d'une DO identique théoriquement au départ ("même" volume de préculture inoculée), les différentes cultures présentent au moment où l'on stoppe la croissance (juste avant l'extraction) des DO différentes.

Procédé visant à obtenir des densités cellulaires et des concentrations en précurseurs identiques dans chaque tube témoin.

Pour éviter cette variabilité, on recommence un nouveau test contrôle légèrement différent. Afin de réduire les variabilités entre cultures, on utilise un erlenmeyer commun contenant du milieu stérile et dans lequel on inocule la quantité de préculture requise et la quantité de précurseurs radioactifs nécessaire. On homogénéise et ensuite seulement on sépare en tubes de deux ml. Ces tubes seront mis à incuber pendant la même durée qu'auparavant.

SCHEMATIQUEMENT :



Les résultats obtenus sont les suivants:

DPM 3-H	DPM 14-C	RAPPORT DPM 3-H / DPM 14-C
192757	13354	14,4
150863	11314	13,3
293951	16294	18,0
198630	13418	14,8
188894	12802	14,8
195134	13785	14,2
208413	14155	14,7

La moyenne du rapport DPM 3-H / DPM 14-C est égale à 14,9. L'estimation de la variance est de 2,11. Excepté une valeur (18,0) sensiblement différente, les autres valeurs sont comparables. La variabilité entre mesures semble donc avoir sensiblement diminué.

4.3.2. Influence de la NPCA sur la méthylation.

Etant donné que l'influence de la NPCA sur les cellules cancéreuses humaines est importante (74) (cfr. introduction), nous pouvons dès à présent tester l'inhibition produite par la NPCA sur cellules de levure.

Aussi a-t-on préparé de la même manière dix tubes de deux ml de culture: deux tubes sans NPCA (contrôles), trois tubes avec NPCA 1 E-07 M, trois tubes avec NPCA 1 E-06 M et deux tubes avec NPCA 1 E-05 M.

	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C	MOYENNE DU RAPPORT
TEMOIN	274257	15152	18,1	16,5
	207454	13793	15,0	
NPCA	167819	12340	13,6	14,0
1 E-07M	192587	13956	13,8	
	195273	13284	14,7	
NPCA	175984	12307	14,3	15,8
1 E-06M	237511	13195	18,0	
	199210	13281	15,0	
NPCA	247744	15881	15,6	15,6
1 E-05M	234721	15143	15,5	

Les différences entre moyennes étant peu importantes (beaucoup moins importantes que prévu, nous effectuerons un test statistique pour voir si oui ou non ces différences sont significatives.

Le test ANOVA I ne révèle pas de différences significatives entre les valeurs correspondantes aux différentes concentrations de NPCA (pour le traitement statistique, cfr. annexe numéro 1.).

Une expérience semblable à été recommencée cette fois en ne testant que la concentration 1 E-07 M.: trois tubes à concentration 1 E-07 M. de NPCA et trois tubes témoins (sans NPCA).

	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C	MOYENNE DU RAPPORT
TEMOIN	250391	16909	14,8	13,8
	280387	19103	14,7	
	277243	23068	12,0	
NPCA	283448	17583	16,1	14,0
1 E-07M	235886	19371	12,2	
	294111	21369	13,8	

Ici également, le test ANOVA I montre que les différences de rapport sont non significatives (pour traitement statistique, cfr.annexe numéro 2.).

Apparemment, si différence il y a au niveau de la méthylation entre les cellules traitées à la NPCA et les cultures témoins, cette différence semble peu importante, par comparaison aux

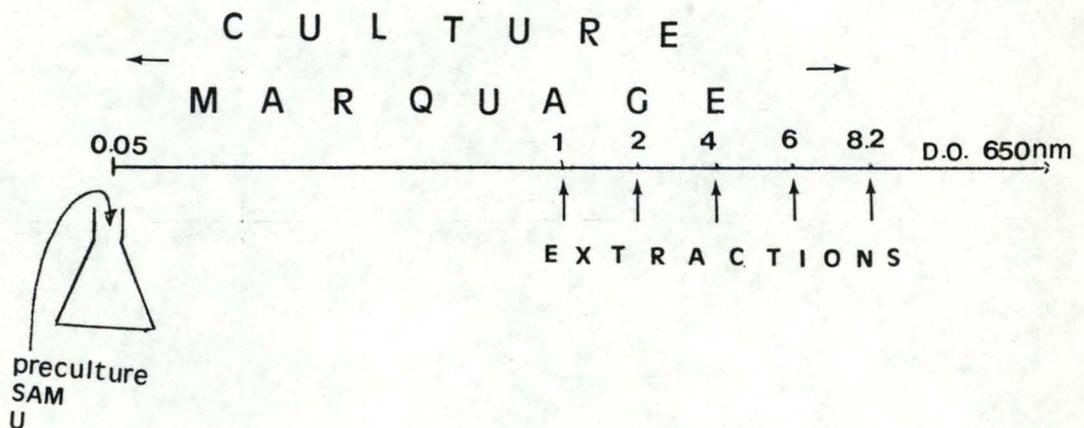
différences existant au niveau des cellules du carcinome du colon chez l'homme. De toute façon, pour savoir si la NPCA a réellement un effet inhibiteur sur la méthylation des ARN, il faudrait pouvoir réduire encore la variabilité existant entre les résultats.

4.3.3. Le rapport 3-H / 14-C varie-t-il en fonction de la densité de la culture?

Une hypothèse à envisager serait que le rapport de méthylation spécifique varie en fonction de la DO de la culture. Si tel était le cas, ceci pourrait expliquer, en partie du moins, la variabilité observée précédemment.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une culture comme précédemment et effectué différentes extractions à partir de cette même culture mais à des DO différentes (entre 2 et 5 ml de culture sont prélevés pour chaque extraction, en fonction de la DO de la culture à ce moment).

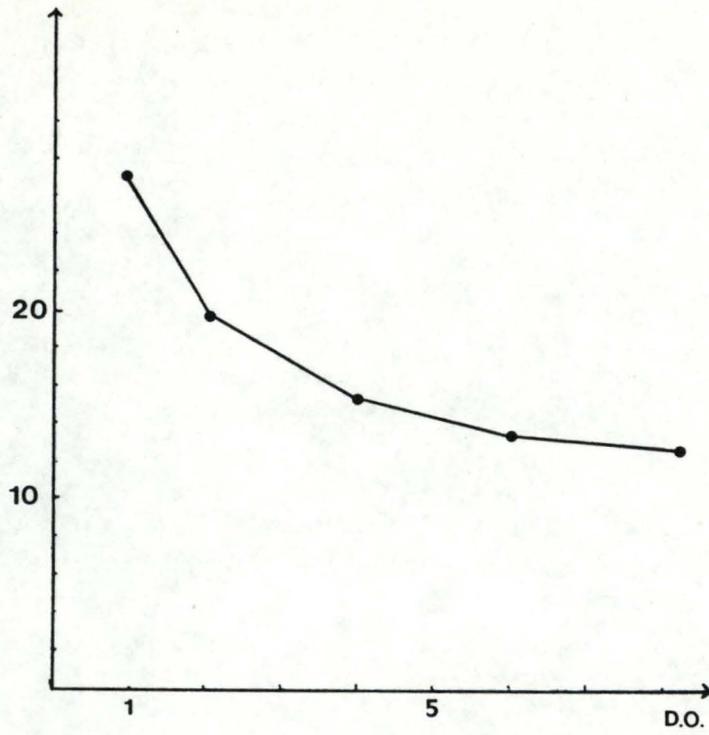
SCHEMATIQUEMENT :



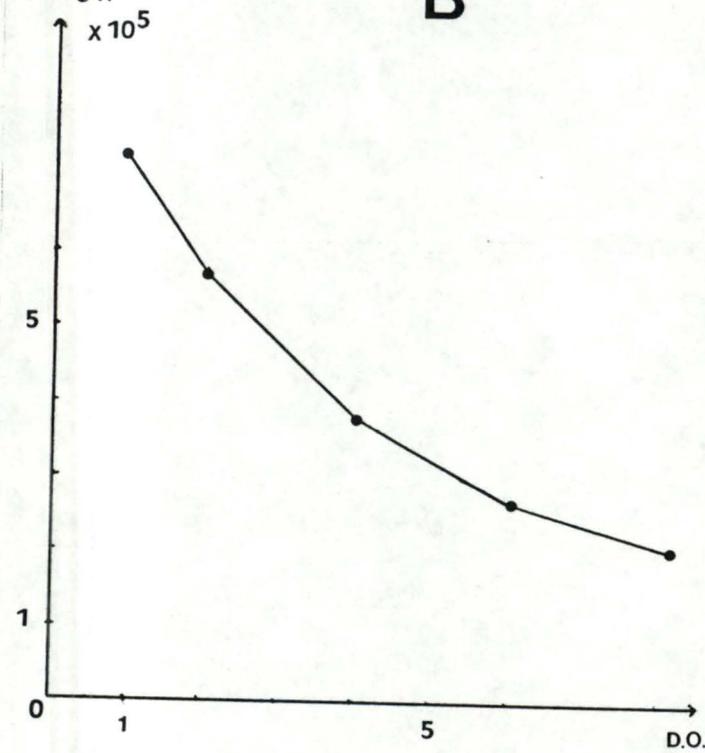
La figure 28 nous montre l'évolution du rapport DPM 3-H / DPM 14-C en fonction de la DO ainsi que nombre de DPM de 3-H et de 14-C se trouvant dans 40 μ gr d'ARN, en fonction de la DO d'extraction.

DPM 3H/
DPM 14C

A

DPM 3H
 $\times 10^5$

B

DPM 14C
 $\times 10^4$

C

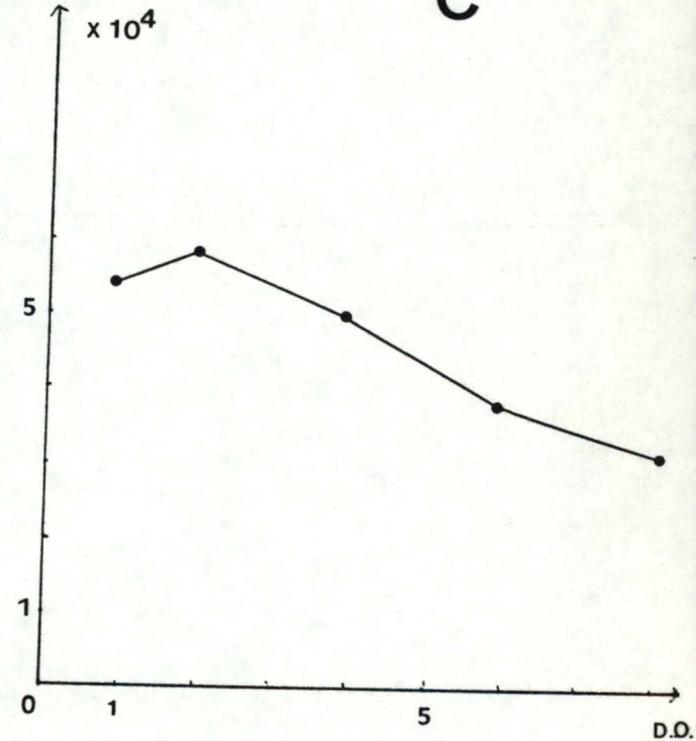


Fig. 28. Représentation en fonction de la DO de la culture:

- du rapport de méthylation spécifique;
- du nombre de DPM de 3-H dans $40 \mu\text{gr}$ d'ARN;
- du nombre de DPM de 14-C dans $40 \mu\text{gr}$ d'ARN.

On peut tirer différentes conclusions de ces résultats.

On peut observer que le degré de méthylation spécifique, estimé par le rapport DPM 3-H / DPM 14-C, évolue nettement en fonction de la densité de la culture au moment de l'extraction. Cette diminution est due à une baisse de la quantité de DPM 3-H / μ gr d'ARN relativement plus forte que la diminution de la quantité de DPM 14-C / μ gr d'ARN.

Cette diminution de la concentration des marqueurs peut être due à différents facteurs. Il peut s'agir d'un changement physiologique de la culture: rentrée plus lente de certains précurseurs en fin de culture, accumulation d'ARN non mature (donc non méthylé) ... Il peut s'agir également tout simplement d'une dilution des marqueurs au cours de la culture: par synthèse de précurseurs froids, par utilisation de ces marqueurs entraînant une diminution de la quantité disponible de marqueurs, par dégradation et recyclage des molécules radioactives... On sait d'ailleurs que la levure est un grand synthétiseur de SAM. On pourrait ainsi supposer que la proportion de molécules de SAM marquées diminue au cours de la croissance du fait de la synthèse de SAM non marquée par les cellules. On constate par ailleurs un parallélisme entre la DO(650 nm) à laquelle les cellules commencent à ralentir leur croissance (environ 5 DO) et donc vraisemblablement leur synthèse de SAM et le moment où le nombre de DPM 3-H / μ gr d'ARN cesse de diminuer aussi fortement.

Ces différentes hypothèses seront envisagées plus en détail lors d'une expérience ultérieure.

Concrètement pour la suite des expériences, nous pouvons espérer diminuer la variabilité des résultats lors d'un marquage en réalisant une seule culture qui sera divisée en sous-cultures le temps d'un marquage bref. Le contenu de chaque sous-culture (quantité de précurseurs marqués et non marqués, état physiologique des cellules) sera ainsi identique au départ. Nous pouvons ainsi espérer que les différentes sous-cultures évolueront de façon beaucoup plus parallèle lors d'un marquage bref que lorsque le marquage s'effectue toute la durée de la croissance.

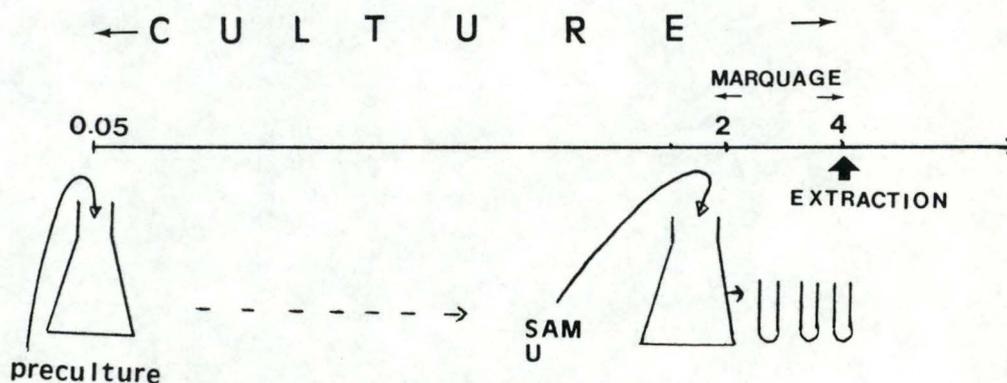
4.4. Marquages à durée limitée.

4.4.1. Réalisation d'un test contrôle équivalent à 100 % de méthylation.

Si nous réalisons une culture commune sans marquage de l'ARN au départ et que nous la séparons en différentes sous-cultures en fin de croissance, juste le temps du marquage, nous espérons réduire de cette manière la variabilité entre les différentes sous-cultures.

Voici comment nous procédons: une culture commune sera réalisée dans un erlenmeyer jusqu'à atteindre une valeur de deux DO. A ce moment, les précurseurs radioactifs sont inoculés dans le milieu. Après homogénéisation, la culture est divisée en petites sous-cultures de deux ml (dans des tubes en verre). La NPCA est ajoutée si nécessaire. Ces tubes seront incubés à 30 degrés C pendant 1H30'. Ensuite la croissance de la culture sera arrêtée dans la glace et l'extraction de l'ARN pourra commencer.

SCHEMATIQUEMENT:



DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C
168309	12633	13,3
153010	12048	12,7
171680	13629	12,6
157703	12596	12,5
157126	12513	12,6
175210	12643	13,9
173258	13084	13,2

La moyenne du rapport DPM 3-H / DPM 14-C est 13,0. L'estimation de la variance est 0,266. On peut observer que la variabilité entre les différents résultats a sensiblement diminué. Nous pouvons à présent étudier l'effet de la NPCA sur l'inhibition de la méthylation.

4.4.2. Etude de l'influence de la dose de NPCA sur l'inhibition de la méthylation chez Saccharomyces cerevisiae. Marquage à durée limitée.

A. Marquage pendant 1h30'.

Un premier marquage a été réalisé comme précédemment pendant 1h30' dans 20 tubes de 2 ml provenant d'une même culture: cinq tubes-témoins (sans NPCA) qui permettront d'établir le rapport de méthylation spécifique égal à 100 % de méthylation, cinq tubes à concentration de NPCA $10E-7$ M, cinq tubes à concentration de NPCA $1 E-06$ M et cinq tubes à concentration de NPCA $1 E-05$ M.

Les données obtenues sont exposées dans le tableau suivant.

	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C	MOYENNE DU RAPPORT	
TEMOIN	102998	8055	12,7	11,9	
	90929	7337	11,9		
	85417	7559	11,3		
	88829	7641	11,6		
	99463	8133	12,2		
NPCA	94627	7713	12,3	11,8	
	99694	8136	12,2		
	92681	8033	11,5		
	1 E-07	81460	7430		11,0
	109467	8828	12,4		
NPCA	109017	8584	12,7	11,9	
	101158	9032	11,2		
	109518	9032	12,1		
	1 E-06	88200	7875		11,2
	101490	8176	12,4		
NPCA	105666	8005	13,2	12,1	
	82818	7329	11,3		
	88500	7611	11,7		
	1 E-05	96608	7759		12,4
	96606	7984	12,1		

Les différentes moyennes calculées sont peu différentes les unes des autres. Le test ANOVA I montre que ces différences ne sont pas significatives (cfr. annexe 3. pour le traitement statistique). Ceci ne veut pas nécessairement dire que le traitement à la NPCA n'a pas d'effet mais plutôt que, s'il y a effectivement un effet, celui-ci est trop faible pour pouvoir être décelé.

Il est possible cependant que la NPCA n'ait pas agi tout simplement parce qu'elle n'a pas eu le temps de rentrer dans les cellules. Aussi une nouvelle expérience sera-t-elle réalisée en augmentant le temps de marquage et donc le temps de mise en présence des cellules avec la NPCA.

B. Marquage pendant 3 heures.

Le temps de marquage sera de trois heures. Une seule concentration en NPCA sera testée (1 E-05 M).

	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C	MOYENNE DU RAPPORT
TEMOIN	249904	14955	16,71	17,23
	280965	16518	17,01	
	268070	15077	17,78	
	229674	13177	17,43	
NPCA	266659	15769	16,91	16,67
	238744	14102	16,93	
1 E-05	205344	12529	16,39	
	244800	14872	16,46	

Ici également le test ANOVA I ne révèle pas de différence significative entre les rapports de méthylation du témoin et des tubes à concentration en NPCA 1 E-05 M (pour le traitement statistique, cfr. annexe numéro 4.).

Une dose plus massive de NPCA a été utilisée suivant le même procédé expérimental. Une concentration de 1 E-03 M a été employée ici.

	DPM 3-H	DPM 14-C	DPM 3-H / DPM 14-C	MOYENNE DU RAPPORT
TEMOIN	313194	19524	16,04	15,87
	370906	22998	16,13	
	319197	20661	15,45	
NPCA	314067	21849	14,37	13,65
	304831	21243	14,35	
1 E-03	293833	22984	12,78	
	306244	23410	13,08	

Ici, le test ANOVA I s'est révélé significatif avec une probabilité $(1 - \alpha) = 0,99$ et non significatif avec une probabilité $(1 - \alpha) = 0,995$ (pour le traitement statistique, cfr. annexe 5.).

La probabilité de se tromper en affirmant que la NPCA agit sur la méthylation est faible (< 1 %). Mais cet effet serait minime: il correspondrait à 86 % de méthylation par rapport au contrôle. Une dose semblable de NPCA utilisée sur les cellules HT-29 entraîne en effet une sous-méthylation beaucoup plus importante (environ 30 % de méthylation seulement).

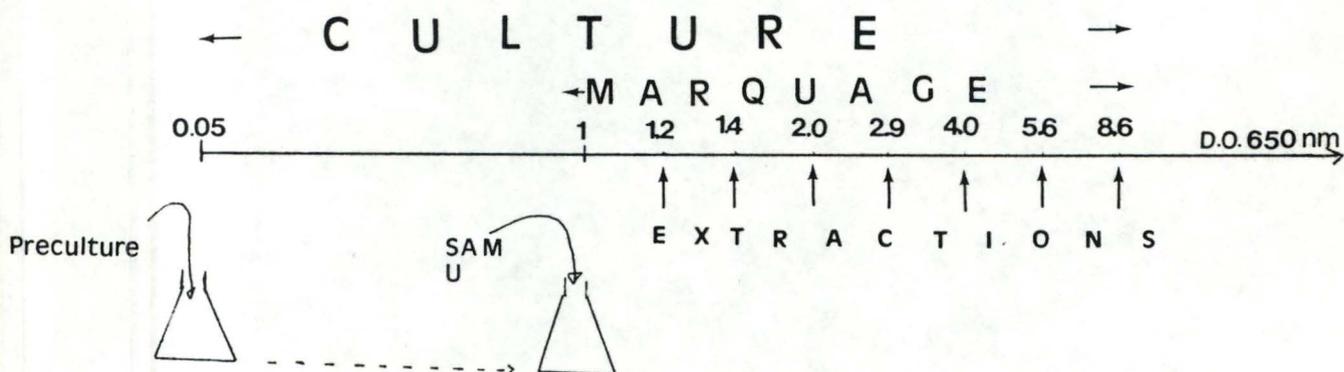
Cependant, il se peut que l'effet de la NPCA soit plus important à un moment ou à un autre de la culture au cours du marquage (par exemple synthèse plus grande d'ARN...). Nous avons vu précédemment que le rapport de méthylation spécifique variait en fonction de la DO d'extraction lorsqu'il s'agissait d'un marquage couvrant toute la durée de la croissance. Il est donc intéressant de chercher à savoir si au cours du marquage bref on observe un rapport de méthylation relativement stable et si une phase de croissance est particulièrement sensible à la NPCA.

4.4.3. Marquage à durée limitée: extractions répétées à intervalles de temps déterminés.

A. Evolution du rapport spécifique de méthylation en cours de croissance chez un témoin.

Une culture unique est réalisée. Lorsque la culture atteint la valeur de 1 DO, on ajoute les précurseurs radioactifs. Puis, très rapidement, une succession d'extractions à des DO différentes sont réalisées: à 1,2 DO (après 15 minutes), à 1,4 DO (après 45 minutes), à 2,0 DO (après 1H20'), à 2,9 DO (après 2H05'), à 4 DO (après 2H45'), à 5,4 DO (après 3H30') et à 8,6 DO (après 5H15').

SCHEMATIQUEMENT:



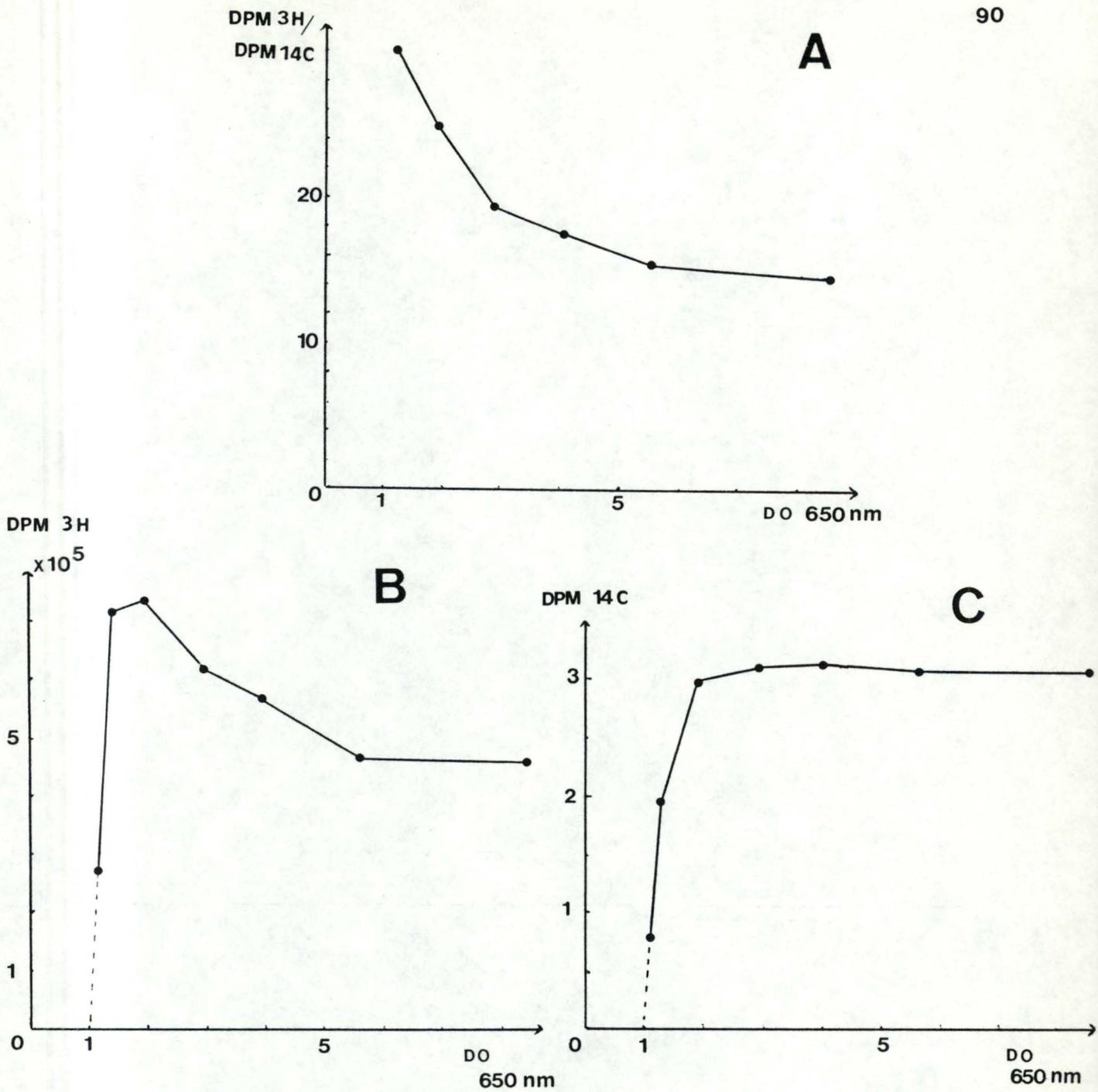


Fig. 29. Représentation en fonction de la DO de la culture:

- A. du rapport de méthylation spécifique;
- B. du nombre de DPM de 3-H dans 40 μ g d'ARN;
- C. du nombre de DPM de 14-C dans 40 μ g d'ARN.

Les traits en pointillé représentent la portion de la courbe entre le temps 0 du marquage (0 DPM de 14-C et de 3-H) et la première valeur mesurée (à 1.2 DO).

La comparaison de l'évolution du rapport 3-H / 14-C lors d'un marquage couvrant toute la durée de la croissance (fig. 28) et lors d'un marquage bref (fig. 29) montre une certaine similitude: on observe une diminution de type exponentiel de ce rapport au cours de la culture.

L'évolution du nombre de DPM de 3-H et de 14-C par unité d'ARN est différente que précédemment. On observe tout d'abord une augmentation assez forte, linéaire, du nombre de DPM par unité d'ARN suivant la densité de la culture. Ceci correspond au fait qu'il faut un certain laps de temps avant que les précurseurs marqués puissent entrer dans les cellules et être incorporés dans l'ARN. Cette phase n'est pas détectée au cours du marquage à longue durée puisque la première extraction d'ARN se fait 9 heures après l'introduction des précurseurs radioactifs. Apparemment, l'uridine radioactive reste incorporée en proportion constante par la suite (vers 2 à 3 DO, 650 nm). La diminution du rapport DPM 3-H / DPM 14-C serait donc plutôt due à la diminution de la quantité de DPM de 3-H par unité d'ARN. Cette baisse du nombre de DPM de 3-H au cours de la croissance est fort semblable à celle observée dans un marquage pendant toute la durée de la croissance.

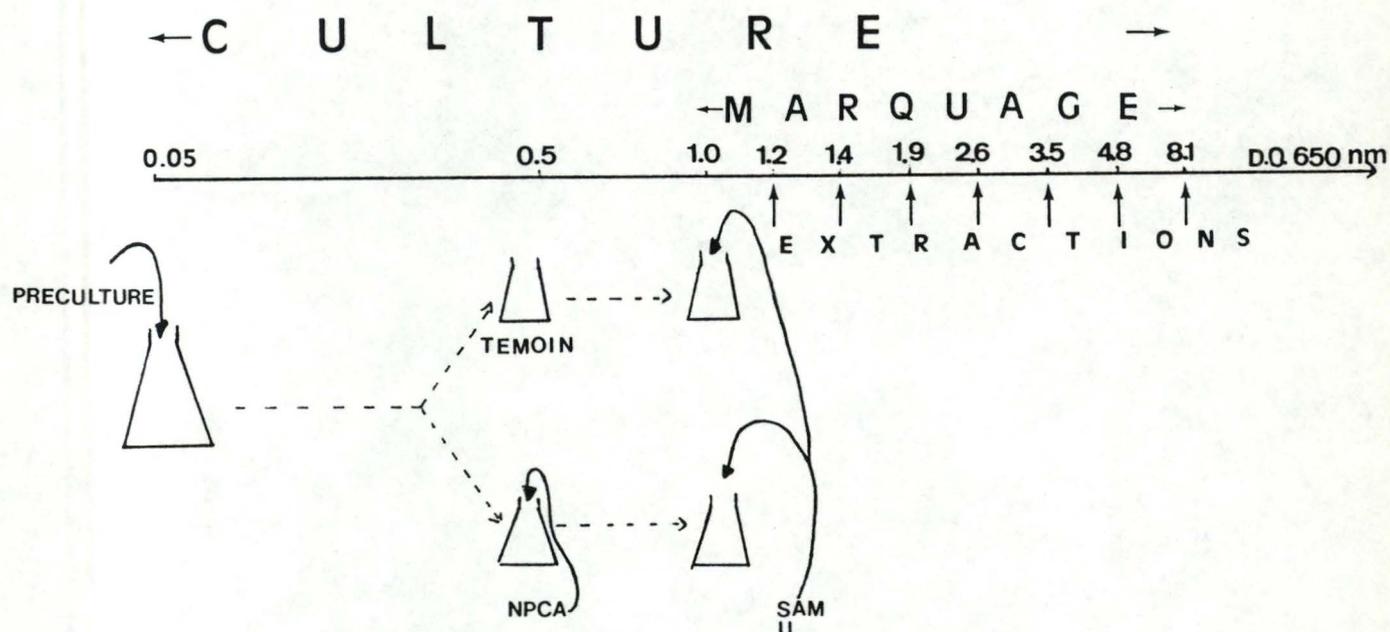
Concrètement, cela signifie que, puisque le rapport de méthylation spécifique lors d'un marquage bref varie également en fonction de la DO, il se pourrait qu'à un moment ou à un autre de la culture, une différence au niveau de la méthylation pourrait se marquer plus fortement entre le témoin et la culture traitée à la NPCA. Nous pensons plus particulièrement au moment où le rapport de méthylation spécifique est le plus élevé: le nombre de résidus méthyles marqués sera proportionnellement plus important sur l'ARN, la synthèse d'ARN est également plus importante pendant cette période. Une déficience au niveau de la méthylation sera peut-être plus perceptible.

B. Recherche de l'effet inhibiteur de la NPCA par extractions répétées au cours de la culture.

Une culture est réalisée sans addition de précurseurs marqués jusqu'à la valeur de 0,5 DO. A ce moment, la culture est séparée en deux moitiés. La première moitié servira de contrôle tandis que dans la seconde moitié est ajoutée de la NPCA pour obtenir une concentration de $1E-04$ M. Ces cultures croîtront pendant 1H30' (jusqu'à DO = 1). Ceci permettra éventuellement à la NPCA de pouvoir rentrer et agir sur les cellules en présence.

C'est seulement lorsque la culture atteint une densité optique de 1 DO (650 nm) que commence le marquage: les précurseurs sont ajoutés dans chaque culture. Ensuite, différentes extractions d'ARN se succéderont rapidement dans ces deux cultures: à 1,2 DO, à 1,4 DO, à 1,9 DO, à 2,7 DO, à 3,5 DO, à 4,8 DO, à 8,1 DO.

SCHEMATIQUEMENT :



Les résultats sont exposés dans la figure 30.

Ce qui frappe au premier abord, c'est la similitude dans l'allure générale des différentes courbes réalisées dans cette expérience et dans l'expérience précédente. On observe comme dans les expériences précédentes une diminution de type exponentiel de ce rapport au cours de la culture. En ce qui concerne le nombre de DPM de 3-H par unité d'ARN, on peut observer tout au long de la culture d'abord une augmentation extrêmement rapide du nombre de DPM 3-H par unité d'ARN, ensuite brusquement une décroissance de type exponentiel. Le nombre de DPM de 14-C par unité d'ARN augmente également très rapidement au début du marquage, puis se stabilise progressivement.

En ce qui concerne l'influence de la NPCA sur la méthylation, on peut observer que le rapport DPM 3-H / DPM 14-C évolue de façon fort semblable dans la culture témoin et dans la culture traitée à la NPCA à concentration $1 \text{ E-}04$. A aucun moment de la culture, on ne peut observer de différence marquée.

Cependant, la diminution du rapport 3-H / 14-C au cours de la croissance nous intriguait. Aussi avons nous réalisé en parallèle avec cette expérience une mesure de la radioactivité présente dans le milieu de culture aux différents moments de l'extraction d'ARN (fig. 31).

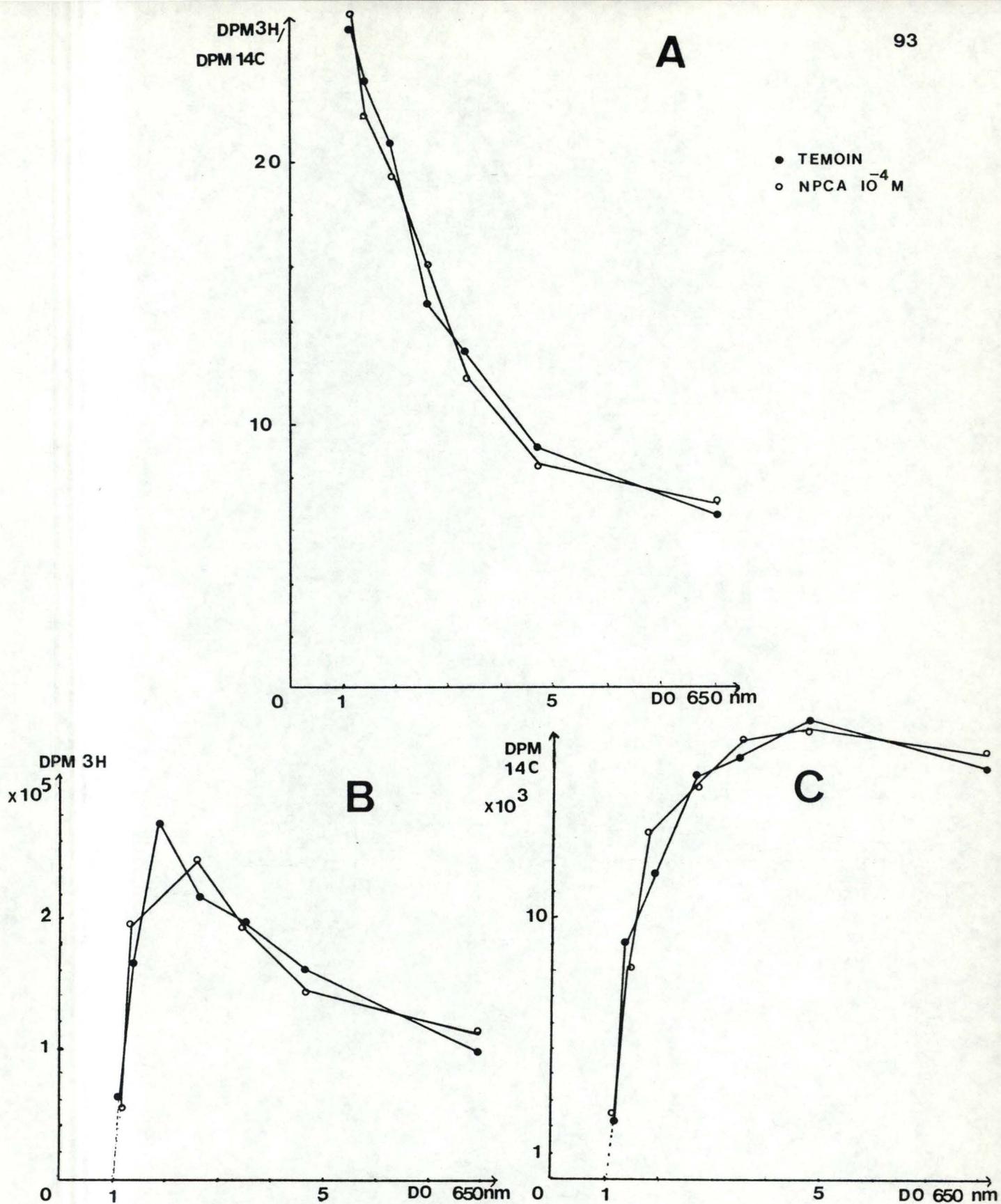


Fig. 30. Représentation en fonction de la densité de la culture:

- A. du rapport de méthylation spécifique;
 B. du nombre de DPM de 3-H dans $40 \mu\text{g}$ d'ARN;
 C. du nombre de DPM de 14-C dans $40 \mu\text{g}$ d'ARN.

Les traits en pointillé représentent la portion de courbe entre le temps 0 du marquage (0 DPM de 14-C et de 3-H) et la première valeur mesurée (à 1,2 DO).

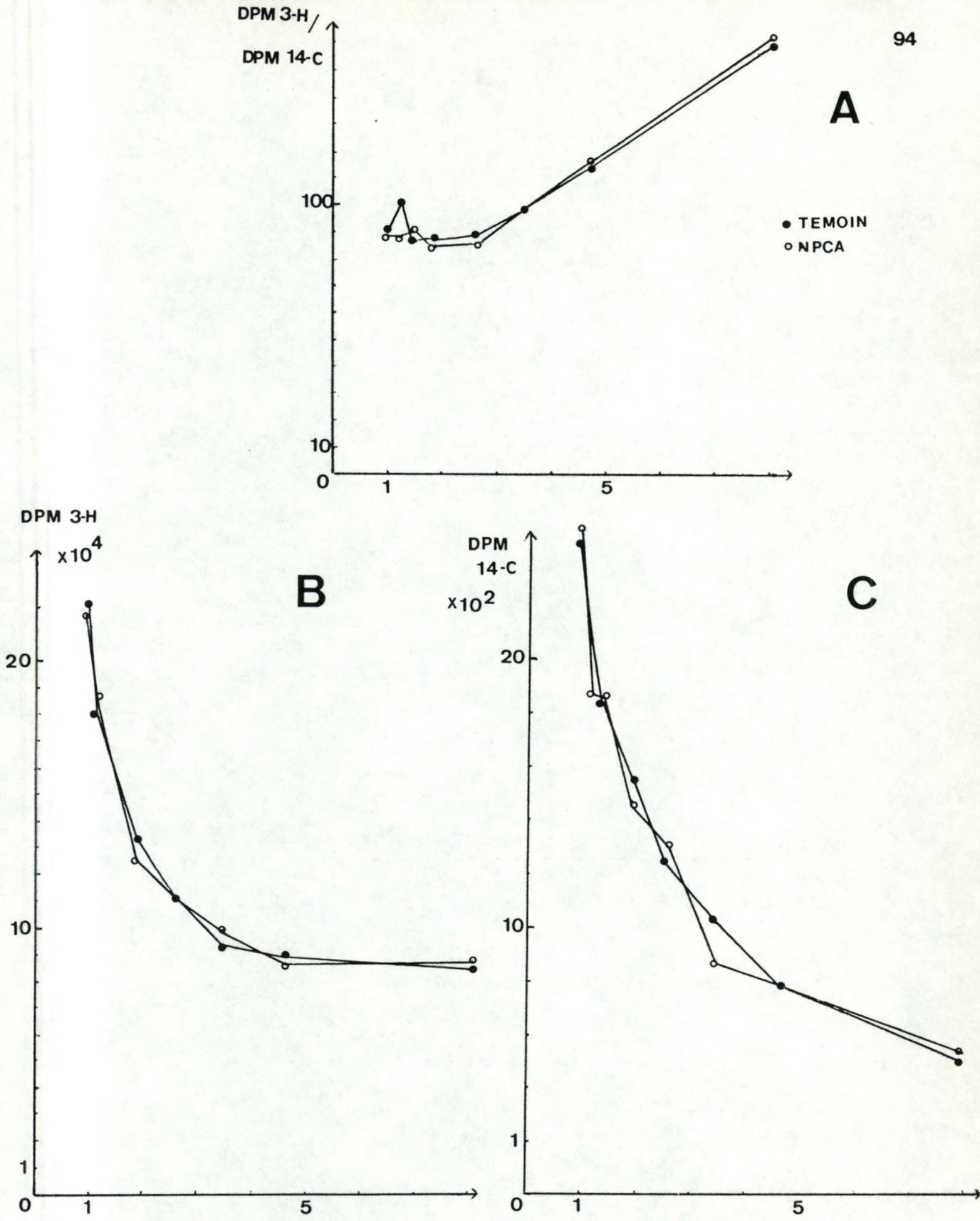


Fig. 31. Représentation

- A. du rapport DPM 3-H / DPM 14-C;
- B. du nombre de DPM 3-H;
- C. du nombre de DPM 14-C

présents dans 20 μ l de surnageant de milieu de culture en fonction de la DO de la culture.

La radioactivité due au 3-H et au 14-C présente dans le surnageant diminue de façon exponentielle. Cependant, le nombre de DPM de 3-H présents dans le surnageant diminue moins rapidement en fin de culture et semble même se stabiliser tandis que le nombre de DPM de 14-C diminue davantage. Il en résulte un rapport DPM 3-H / DPM 14-C dans le surnageant qui, après une courte période de stabilité relative, augmente assez fortement. On peut observer une grande corrélation dans les mesures faites à partir de la culture témoin et celles effectuées à partir de la culture traitée.

On peut interpréter ces résultats de différentes manières.

Dès que les précurseurs radioactifs sont inoculés dans le milieu, ils rentrent progressivement dans les cellules: ils disparaissent ainsi du surnageant et sont incorporés de façon croissante au cours du temps. Mais on peut observer que la SAM disparaît moins rapidement du surnageant lorsque la culture dépasse deux DO (650 nm) (cfr. rapport DPM 3-H / DPM 14-C qui augmente dans le surnageant au cours du marquage). Elle semble rester en quantité constante dans le surnageant aux environs de 5 DO. Or c'est à ce moment que la vitesse de croissance d'une culture diminue fortement pour s'annuler en phase stationnaire. Ceci expliquerait que le rapport 3-H / 14-C diminuerait au niveau de l'ARN. La SAM rentrerait moins vite dans les cellules parce que celles-ci ne nécessitent plus autant de SAM pour leurs synthèses. On peut ainsi imaginer qu'il y a davantage d'accumulation d'ARN non méthylé en fin de culture. Il ne faut pas oublier cependant que la SAM est un donneur universel de groupes méthyles. Il se peut donc que la diminution de la rentrée de la SAM soit due à une baisse de méthylation de l'ADN, des protéines... par exemple plutôt qu'à une diminution de méthylation des ARN.

La diminution du rapport DPM 3-H / DPM 14-C au niveau de l'ARN peut être également expliqué par un phénomène de "dilution" de la SAM radioactive. Les cellules de levure sont en effet de grandes synthétiseuses de SAM. Si la quantité de SAM (radioactive ou non) est en quantité limitée dans le milieu, il y aura synthèse progressive de SAM par les levures, d'autant plus forte que la quantité de SAM vient à manquer. On observe effectivement que la quantité de DPM de 3-H dans le surnageant fait plus que diminuer de moitié pendant le marquage. Or les molécules de SAM marquées sont normalement utilisées de la même manière que les molécules de SAM non radioactive présentes dans le milieu de culture. Ceci signifierait que la quantité de SAM (radioactive ou non) disponible dans le milieu diminuerait très fortement au cours de la croissance. D'où nécessité pour la levure de produire ses propres précurseurs, ceux-ci étant non marqués.

De plus, on peut imaginer un processus de dégradation et de recyclage de la SAM. Si la cellule utilise de la SAM radioactive, elle forme automatiquement de la SAH. Or ceci est un puissant inhibiteur de la méthylation. Il faut donc recycler celui-ci. Il va y avoir dégradation de la SAH en Adénosine et homocystéine. Ce dernier s'adjoindra d'un groupe méthyle qui sera quasi toujours

non radioactif et formera finalement une molécule de SAM non marquée. Or de nombreuses molécules autres que l'ARN sont méthylées (protéines, ADN,...). De plus, suivant le besoin de la cellule, il peut y avoir dégradation de la SAM (comme de l'Uridine d'ailleurs) en tel ou tel précurseur nécessaire pour d'autres voies métaboliques.

En conclusion, nous n'avons pas pu observer d'effet de la NPCA sur la méthylation de l'ARN. Par contre, nous avons pu observer que le rapport 3-H / 14-C variait au cours de la culture. Différents mécanismes peuvent être invoqués. Il pourrait y avoir accumulation d'inhibiteur en fin de culture (SAH), entraînant la formation d'ARN non méthylé. Il pourrait y avoir dilution de la SAM radioactive par synthèse ou par recyclage. Il faut remarquer que ces différentes hypothèses ne sont absolument pas exclusives. Il est d'ailleurs vraisemblable que c'est la combinaison d'une partie ou de tous ces mécanismes qui permet d'expliquer la diminution du rapport 3-H / 14-C au cours de la culture.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

1. EVOLUTION DU RAPPORT 3-H / 14-C AU COURS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE.

La mesure du rapport 3-H / 14-C constitue en principe un matériel de choix pour suivre l'évolution de la méthylation spécifique de l'ARN in vivo. Appliquée à la levure, elle a permis de montrer que ce rapport évoluait avec la croissance de la culture. Différentes hypothèses ont été envisagées.

Il peut s'agir d'une baisse du taux de méthylation en phase finale. Il est également possible que cette baisse du rapport 3-H / 14-C soit due, non à une modification de la synthèse, mais plutôt à un phénomène de dilution des précurseurs marqués. La mesure de la radioactivité présente dans les surnageants des milieux de cultures indique effectivement que la quantité des précurseurs marqués dans le pool intercellulaire diminue fortement au cours de la croissance. La néosynthèse de SAM entraînant une dilution du pool intracellulaire, la dégradation et le recyclage de la SAM peuvent intervenir dans le phénomène de dilution envisagé.

Il faut remarquer que ce type de problématique rencontrée dans ce travail se prêterait à une approche par modélisation de l'entrée des précurseurs dans les différents pools cellulaires.

2. INFLUENCE DE LA NPCA SUR LA METHYLATION SPECIFIQUE DE L'ARNr DE LEVURE.

La parfaite reproductibilité des mesures réalisées au cours de la croissance cellulaire nous autorise à espérer que toute modification du degré spécifique de méthylation se traduirait par une différence significative au niveau du rapport 3-H / 14-C.

Différents types d'expériences ont été réalisés.

Nous avons tout d'abord testé l'influence de la NPCA sur la méthylation spécifique des ARN, en réalisant un marquage couvrant toute la durée de la croissance. Nous espérons ainsi voir s'amplifier le phénomène de sous-méthylation au cours des générations. Ensuite des marquages brefs ont été réalisés, afin de réduire les variabilités inhérentes aux cultures et mieux cerner ainsi le phénomène des sous-méthylations.

Enfin des extractions répétées en cours de culture avec et sans NPCA ont été effectuées afin de mettre en évidence une sous-méthylation éventuelle liée à une phase de croissance particulière.

Il apparaît d'après les résultats obtenus que la NPCA n'agit pas sur les cellules de levure, ou du moins de façon insignifiante. Le but de notre travail était de mettre au point les conditions d'utilisation de la NPCA et des précurseurs radioactifs afin de pouvoir exploiter l'ARN sous-méthylé obtenu dans des tests de méthylation *in vitro* et dans la purification d'enzymes de méthylation. Les résultats s'avérant négatifs, il n'était donc pas intéressant de poursuivre notre recherche.

On pourrait cependant imaginer diverses hypothèses (et différents tests permettant de confirmer ou d'infirmer celles-ci) visant à expliquer pourquoi cette drogue, extrêmement efficace sur cellules de mammifères (déjà inhibitrice à concentrations $1 \text{ E-}07 \text{ M}$) ne l'est pas sur cellules de levures.

On peut émettre deux grandes hypothèses. Soit la NPCA n'agit pas sur la méthylation, soit elle ne rentre pas dans les cellules.

Si la NPCA n'agit pas, on peut envisager diverses possibilités. Une première possibilité impliquerait des sites de reconnaissance de la NPCA avec une enzyme, qui seraient apparus au cours de l'évolution. Ayant modifié sa structure, la protéine qui peut-être au départ n'était pas sensible à l'action de la NPCA, permet une reconnaissance de la drogue et entraîne une inactivation de l'enzyme. Nous avons évoqué dans l'introduction divers mécanismes possibles d'inhibition de la méthylation par la NPCA impliquant diverses enzymes.

Une autre possibilité est l'existence chez la levure d'un mécanisme visant à se protéger de l'effet de la NPCA. Il faut se rappeler que la NPCA est produite par un champignon (*Ampullariella regularis*). Or celui-ci doit se prémunir de l'action de ses propres synthèses. Il pourrait s'agir d'un mécanisme existant également chez la levure (entraînant une modification de la NPCA, ou des enzymes impliquées).

Cependant si la NPCA n'agit pas, c'est peut-être tout simplement parce qu'elle ne rentre pas dans les cellules. La levure possède en effet une paroi extrêmement dure et résistante. On sait que l'Adénosine (dont la NPCA est un analogue) rentre dans les cellules de levure. La SAM, qui est une molécule de taille importante, rentre également dans la levure. On pouvait donc raisonnablement supposer que la NPCA, plus petite que la SAM, et de structure analogue à celle de l'Adénosine, puisse traverser les parois cellulaires.

Cependant, la NPCA possède une structure plus hydrophobe que l'Adénosine: l'oxygène du ribose est remplacé par un carbone. Cette hypothèse impliquerait que les mécanismes de transport de l'Adénosine requièrent la présence de l'oxygène plutôt que d'un carbone, plus hydrophobe.

Il serait possible de tester ces hypothèses de différentes manières.

On pourrait par exemple tester en présence de NPCA une souche particulière de levures osmosensibles (souche VY1160). On pourrait espérer ainsi favoriser la rentrée de la NPCA dans les cellules. Si on observe une sous-méthylation, cela signifie que, dans les expériences réalisées précédemment, la NPCA ne rentrait pas dans la cellule.

On pourrait également mettre de la NPCA radioactive dans le milieu de culture et suivre le déplacement de la radioactivité dans les différents pools cellulaires.

Il est également possible de tester la formation de S-Néplanocyl-Méthionine. Si un tel dérivé est synthétisé, cela signifie que la NPCA est rentrée dans les cellules. Dans le cas contraire, on ne peut tirer aucune conclusion: peut-être la NPCA est-elle rentrée sans qu'il y ait formation de S-Néplanocyl-méthionine.

Après n'avoir pu mettre en évidence une action de la NPCA sur cellules de levures, il pourrait être intéressant de comprendre le pourquoi de cette différence par rapport aux cellules de mammifères. Nous n'avons pu qu'émettre des hypothèses. Un travail ultérieur permettrait peut-être d'apporter des éclaircissements à ce sujet.

 ANNEXE: TRAITEMENT STATISTIQUE ANOVA I.

L'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA I) a pour but la comparaison des moyennes de k populations, à partir d'échantillons aléatoires et indépendants prélevés dans chacune d'elles. Ces populations comparées sont généralement des variantes (ou niveaux) d'un facteur contrôlé de variation.

Il s'agit dans ce cas-ci d'un modèle fixe: les populations expérimentales résultent d'un choix non aléatoire. Le facteur contrôlé est la dose de NPCA administrée.

Le principe qui est à la base de l'analyse de la variance est le suivant: l'égalité des moyennes des différentes populations sera mise en doute si la dispersion des moyennes expérimentales est grande comparativement à la dispersion des observations de chaque échantillon.

Il est possible de résumer dans un tableau les différents résultats obtenus dans ANOVA I.

ECART	S C E	d l	C M	F
TOTAL	SCE_T	$N - 1$		
FACTORIEL	SCE_F	$k - 1$	CM_F	CM_F / CM_R
RESIDUEL	SCE_R	$N - k$	CM_R	

avec $SCE_T = \sum_i \sum_j X_{ij}^2 - C$

$$SCE_F = \sum_i \left(\frac{T_i^2}{n_i} \right) - C$$

$$SCE_R = \sum_i (n_i - 1) S_i^2$$

$$C = \frac{T_{..}^2}{N}$$

$$CM_F = SCE_F / k - 1$$

$$CM_R = SCE_R / N - k$$

F observé est critique

si $F_{obs} > F(1-\alpha)$ avec $k-1$ et $N-k$ d.l.

où $F(1-\alpha)$ est défini par $p(F < F(1-\alpha)) = 1-\alpha$

et est donné dans les tables.

ANNEXE I.

ECART	S C E	d.l.	C M	F
TOTAL	21,902	9		
FACTORIEL	8,68	3	2,89	1,3
RESIDUEL	13,222	6	2,2	

Fobs = 1,31

$F(1-\alpha)$ avec 3 et 6 d.l. = 4,76 si $\alpha = 0,05$.

LE TEST EST NON SIGNIFICATIF.

ANNEXE II.

ECART	S C E	d.l.	C M	F
TOTAL	250,860	5		
FACTORIEL	0,06	1	0,0597	0,00095
RESIDUEL	250,8	4	62,7	
RESIDUEL	250,8	4	62,7	

$F(1-\alpha)$ avec 3 et 6 d.l. = 7,71 si $\alpha = 0,05$.

LE TEST EST NON SIGNIFICATIF.

ANNEXE III.

ECART	S C E	d.l.	C M	F
TOTAL	6,802	19		
FACTORIEL	0,202	3	0,067	0,162
RESIDUEL	6,64	16	0,415	

$F(1-\alpha)$ avec 3 et 16 d.l. = 3,24 si $\alpha = 0,05$.

LE TEST EST NON SIGNIFICATIF.

ANNEXE IV.

ECART	S C E	d.l.	C M	F
TOTAL	1,540	7		
FACTORIEL	0,625	1	0,625	4,1
RESIDUEL	0,915	6	0,153	

$F(1-\alpha)$ avec 1 et 6 d.l. = 5,99 si $\alpha = 0,05$

LE TEST EST NON SIGNIFICATIF.

ANNEXE V.

ECART	S C E	d.l.	C M	F
TOTAL	10,875	6		
FACTORIEL	8,512	1	8,512	18,00
RESIDUEL	2,363	5	0,473	

$F(1-\alpha)$ avec 1 et 5 d.l. = 6,61 si $\alpha = 0,05$;
 = 16,3 si $\alpha = 0,01$;
 = 22,8 si $\alpha = 0,05$.

LE TEST EST SIGNIFICATIF.

* BIBLIOGRAPHIE *

1. LEHNINGER, A.L.: Biochimie - Flammarion Médecine-Sciences, Seconde édition 1977, Chapitre 3. Les protéines et leurs fonctions biologiques.
2. LEWIN, B.: Genes, John Willey and sons (1983), Chapitre 5. From gene to protein.
3. WOOL, I.G. (1979): Ann. Rev. Biochem., 48, 719-754.
4. WOOL, L.J. (1980) in Ribosomes: Structures, Functions and Genetics (eds. G. CHAMBLISS, G.R. CRAVEN, J. DAVIES, K. DAVIS, L. KAHAN and M. NOMURA, University park press Baltimore), pp. 787-824.
5. LEWIN, B. (1983): Genes, John Willey and sons, Chapitre 8. The ribosome translation factory.
6. ATTARDI, G., AMALDI, F. (1970): Ann. Rev. Biochem., 39, 183-226.
7. KALTSCHMIDT, E., WITTMANN, H. G. (1970): Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 78, 6652.
8. LILJAS, A. (1982): Structural Studies of Ribosomes, in "Progress in Biophysics and Molecular Biology", 40, numéro 3 (Pergamon Press Oxford New York).
9. PICARD-BENNOUN, N., BEGUERET, J. (1981): Trends in Biochemical Sciences, 2, 272-274.
10. LAKE, J.A. (1985): Ann. Rev. Biochem., 54, 507-530.
11. UDEM, S.A., WARNER, J. R. (1972): J. Mol. Biol., 65, 227-242.
12. KLOOTWIJK, J., PLANTA, R.J. (1973): Eur. J. Biochem., 39, 325-333.
13. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1983): Molecular Biology of the cell, Part I, Chapter 2., Garland Publishing, New York and London.
14. RUBTSOF, P.M., MUSAKHANOV, M.M., ZAKHARYEV, V.M., KRAYEV, A.S., SKRYABIN, K.G., BAYEV, A.A. (1980): Nucleic Acids Research, 8, 5779-5794.
15. NELLES, L., FANG, B.L., VOLCKAERT, G., VANDENBERGHE, A., DE WACHTER, R. (1984): Nucleic Acids Research, 12, 8749-8768.
16. BRIMACOMBE, R., STIEGE, W. (1985): Biochem. J., 229, 1-17.

17. ZWIEB, C., GLOTZ, C., BRIMACOMBE, R. (1981): *Nucleic Acids Research*, 9, 3621-3640.
18. FOX, G.E. (1985): *The Bacteria*, 8, 257-310.
19. BELL, G.I., DEGENNARS, L.J., GELFAND, D.H., BISCHOP, R.J., VALENZUELA, P., RUTTER, W.H. (1977): *J. Biol. Chem.*, 252, 8118.
20. ALIX, J.H., HAYES, D. (1983): *Biol. Cell.*, 47, 139-160.
21. VAN DEN BOS, R.C., PLANTA, R.J. (1973): *Biochimica et Biophysica Acta*, 294, 464-471.
22. BOLLON, A.P. (1982): *The Cell Nucleus*, 10, 67-125.
23. APIRION, D. (1984): *Genetic and Biochemical Studies of RNA Processing in Yeast* in "Processing of RNA", CRC Press.
24. BIELKA, H., WELFLE, H., STAHL, J., BOMMER, V.A., NOLL, F., WESTERMANN, P. (1982): in *The Eucaryotic Ribosome*, edited by Bielka, H., chap. 6., 85.
25. BOGDANOV, A.A., KOPYLOV, A.M., SHATSKY, I.N. (1980): in *Subcellular Biochemistry*, Roodyn D.B. (Ed.), Plenum Press, New York, 7, 81-116.
26. KURLAND, C.G. (1977): *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 173-200.
27. WINICOW, I. (1976): *J. Mol. Biol.*, 100, 141-155.
28. BOWMAN, L.H., RABIN, B., SCHLESSINGER, D. (1981): *Nucleic Acids Research*, 9, 4951-4966.
29. DALGARNO, L., SHINE, J. (????): in *Subcellular Biochemistry*, Roodyn D.B. (Ed.), Plenum Press, New York, 7, Chap. 1.
30. BJORK, R. (1984): in *Processing of RNA*, CRC Press, Chap. 11.
31. GARRET, R.A., OLESEN, S.O. (1982): *Biochemistry-USA*, 21, 4828.
32. LIU, W., LO, A.G., NAZAR, R.N. (1983): *J. Mol. Biol.*, 171, 217.
33. NAU, F. (1976): *Biochimie*, 58, 629-645.
34. YUAN, R. (1981): *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 285-315.
35. BRAND, R.C., KLOOTWIJK, J., VAN STEENBERGEN, T.J.M., DEKOK, A.J., PLANTA, R.J. (1977): *Eur. J. Biochem.*, 75, 311.
36. RETEL, J., VAN DEN BOS, R.C., PLANTA, R.J. (1969): *Biochim. Biophys. Acta*, 195, 370-380.
37. NICHOLS, J.L., LANE, B.G. (1967): *J. Mol. Biol.*, 30, 477-489.

38. FELLNER, P., SANGER, F. (1968): *Nature*, 219, 236-238.
39. SINGH, H., LANE, B.G. (1964): *Can. J. Biochem.*, 42, 1011-1021.
40. ISAKSSON, L.A., PHILLIPS, J.H. (1968): *Biochim. Biophys. Acta*, 155, 63-71.
41. PERRY, R.P. (1976): *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 605-629.
42. KLAGSBRUN, M. (1973): *J. Biol. Chem.*, 248, numéro 7, 2512-2620.
43. LEWIN, B. (1983): *Genes*, John Willey and sons, Chapitre 30. Nucleosomes in active chromatin.
44. KLOOTWIJK, J., PLANTA, R. (1973): *Eur. J. Biochem.*, 39, 325-333.
45. MADEN, B.E.H. (1980): *Nature*, 288, 293-296.
46. VAN CHARLDORP, R., VAN KNIPPENBERG, P.H. (1982): *Nucleic Acids Research*, 10, 1149-1159.
47. MAC CALLUM, F.S., MADEN, B.E.H. (1985): *Biochem. J.*, 232, 725-733.
48. ALIX, J.H., HAYES, D. (1983): *Biol. Cell.*, 47, 139-160.
49. BRAND, R.C., KLOOTWIJK, J., PLANTA, R.J., MADEN, B.E.H. (1978): *Biochem. J.*, 169, 71-77.
50. RYAN, S.G., SITZ, T.O. (1978): *The Virginia Journal of Science*, 29, 82.
51. Letter to the editor (1980): *J. Mol. Biol.*, 142, 117-121.
52. STEWART, P.R., LETHAM, D.S. (1977): *The ribonucleic acids*, Springer-Verlag, New-York, seconde édition.
53. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1983): *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York and London, Chap. 8., 424-425.
54. DARNELL, J. E. (1979): *P. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.*, 22, 327-353.
55. SHATKIN, A.J. (1976): *Cell*, 9, 645-653.
56. HADJILOV, A.A. (1980): in *Subcellular Biochemistry*, Roodyn D.B. (Ed.), Plenum Press, New York, 7.
57. SHIMIZU, S., YAMADA, H. (1984): *Trends in biotechnology*, 2, 137-141.

58. USDIN, E., BORCHARDT, R.T., CREVELING, G.R. (1982): *Biochemistry of Adenosyl methionine and Related Compounds*, Mac Millian Press.
59. SMOLLAR, N., HELLMAN, U., SVENSSON, I. (1975): *Nucleic Acids Research*, 2, 993-1004.
60. ANDERSSON, O.S., DAVIES, J.E. (1980): *Mol. Gen. Genet.*, 179, 217.
61. OBARA, M., HIGASHI, K., KUSHINO, Y. (1982): *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 104, 241-246.
62. BJORK, G.R., ISAKSSON, L.A. (1970): *J. Mol. Biol.*, 51, 83-100.
63. HELSER, T.L., DAVIES, J.E., DAHLBERG, J.E. (1971): *Nature New Biol.*, 233, 12-14.
64. ALIX, J.H. (1982): *Microbiological reviews*, 46, 281-295.
65. WOLF, S.E., SCHLESSINGER, D. (1977): *Biochemistry*, 16, 2783-2791.
66. CABOCHE, M., BACHELLERIE, J.P. (1974): *Eur. J. Biochem.*, 74, 19-29.
67. POLDERMANS, B., BAKKER, H., VAN KNIPPENBERG, H. (1980): *Nucleic Acids Research*, 8, 143-151.
68. VAN CHARLDORP, R., HEUS, H.A., VAN KNIPPENBERG, H. (1981): *Nucleic Acids Research*, 9, 4413-4422.
69. IGUARASHI, K., KISHIDA, K., KASHIWAGI, K., TATOKORO, I., KAKEGAWA, T., HIROSE, S. (1981): *Eur. J. Biochem.*, 113, 587-593.
70. SKINNER, R.H., CUNDCLIFFE, E. (1982): *Journal of General Microbiology*, 128, 2411-2416.
71. THOMPSON, J., SCHMIDT, F., CUNDLIFFE, E. (1982): *J. Biol. Chem.*, 257, 7915-7917.
72. POLDERMANS, B., GOOSEN, N., VAN KNIPPENBERG, H. (1979): *J. Biol. Chem.*, 254, 9085-9089.
73. GLAZER, R.I., PEALE, A.L. (1978): *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 81, 521-526.
74. GLAZER, R.I., KNODE, M.C. (1984): *J. Biol. Chem.*, 259, 12964-12969.
75. TSUJINO, M., YAGINUMA, S., FUJI, T., HAYANO, K., MATSUDA, T., WATANABE, T., ABE, J. (1980): Reprinted from *Current Chemotherapy and Infectious Disease. Producing of the 11th ICC and the 19th ICAAC American Society of Microbiology.*

76. YAGINUMA, S., MUTO, N., TSUJINO, M., SUDATE, Y., HAYASHI, M., OTANI, M. (1981): *J. Antibiotics*, 34, 359-366.
77. BORDCHARDT, R.T., KELLER, B.T., PATEL-THOMBRE, U. (1984): *J. Biol. Chem.*, 259, 4353-4358.
78. KELLER, B.T., BORDCHARDT, R.T. (1984): *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 120, 131-137.
79. LIAU, M.C., LIN, G.W. (1976), *J. Cell Biol.*, 70 (part 2), 423a.
80. MANIATIS, T., FUTSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1982): in *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratories.
81. MURPHY, J.T., SPENCE, K.D. (1972): *J. of Bacter.*, 109, 499-504.
82. LAMBERT, S. (1984): Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques, FNDP.
83. LEWIN, B. (1983): *Genes*, John Willey and sons, Chapitre 20. Structural genes: internal organisation.