



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la méthylation de l'ARN de levure par marquage in vivo au moyen de S-Adenosyl-Methionine radioactive

Lambert, Sylvie

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

1984



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

*Etude de la méthylation de l'ARN de levure
par marquage in vivo au moyen de
S-Adenosyl-Methionine radioactive.*

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

*Sylvie LAMBERT
1983-84*

Je remercie Monsieur le professeur J. Delcour pour avoir aimablement accepté d'être le promoteur de ce mémoire et pour ses nombreux conseils.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous les membres du laboratoire de génétique moléculaire des FNDP qui m'ont gentiment accueillie et sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé.

Enfin, j'adresse mes remerciements à ceux qui me sont proches et qui m'ont encouragée dans la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. Structures et fonctions des ARN ribosomiques -----	p 2
I.1 structures des ARNr -----	p 3
I.2 fonctions des ARNr -----	p 7
II. Biosynthèse des ARN ribosomiques matures -----	p 8
II.1 organisation générale des gènes d'ARNr -----	p 8
II.2 transcription et émondage des ANRr -----	p 11
II.3 autres modifications postranscriptionnelles ---	p 16
II.3.1 les nucléosides hypermodifiés -----	p 16
II.3.2 la méthylation -----	p 20
III But du travail -----	p 35

MATERIEL ET METHODES

A. Méthodes générales -----	p 41
I. préparation des milieux de culture -----	p 41
II. préparation des tampons -----	p 41
III. préparation des tampons de sucrose -----	p 42
IV. comptage des cellules -----	p 43
V. mise en culture -----	p 44
B. Méthodes d'étude des ARN -----	p 46
I. conditions de croissance et marquage -----	p 46
II. méthode d'extraction de l'ARN -----	p 47
III. méthode de séparation des ARN -----	p 48

C.Méthodes d'analyse de la distribution des groupements	
méthyls -----	p 49
I.hydrolyse des ARN -----	p 49
II.chromatographie échangeuse d'ions en présence	
d'urée -----	p 50

RESULTATS

I.Caractérisation de la souche F1100 -----	p 52
I.1 courbes de croissance -----	p 52
II.Extraction de l'ARN -----	p 55
II.1 spectre UV de l'ARN total de levure -----	p 55
II.2 rendement de l'extraction -----	p 56
III.Marquage <u>in vivo</u> à la [méthyl- ³ H] S-Ado.Met ----	p 57
III.1 marquage avec 3 μ ci de [méthyl- ³ H] S-Ado.Met	
par ml de milieu -----	p 58
III.2 marquage avec 10 μ ci de [méthyl- ³ H] S-Ado.Met	
par ml de milieu -----	p 59
IV.Séparation des ARN -----	p 60
V.Analyse de la distribution de la radioactivité sur	
les sites de méthylation -----	p 64
V.1 analyse de l'ARN total -----	p 65
V.2 analyse des différentes classes d'ARN -----	p 69
V.3 expériences complémentaires -----	p 74
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES -----	p 77
BIBLIOGRAPHIE -----	p 84

ABREVIATIONS

A = Adénine

C = Cytosine

cpm = coups par minute

D.O. = densité optique

EDTA = Ethylène Diamine Tétracétate

G = Guanine

nts = spacer non transcrit

S-Ado.Met = S-Adenosyl-Methionine

T = Thymine

ts = spacer transcrit

UT = Unité de Transcription

UV = Ultra Violet

Introduction

INTRODUCTION

Les ARN occupent une place essentielle dans la vie des organismes vivants.

En effet ils interviennent dans le processus complexe de la synthèse des protéines (fig. 1).

Parmi les 3 ARN majeurs, à savoir les ARN messagers (ARNm), les ARN de transfert (ARNt), les ARN ribosomiques (ARNr) nous avons choisi d'étudier les derniers. Ceux-ci sont situés au niveau des deux sous-unités ribosomiques et sont les plus nombreux au point de vue masse

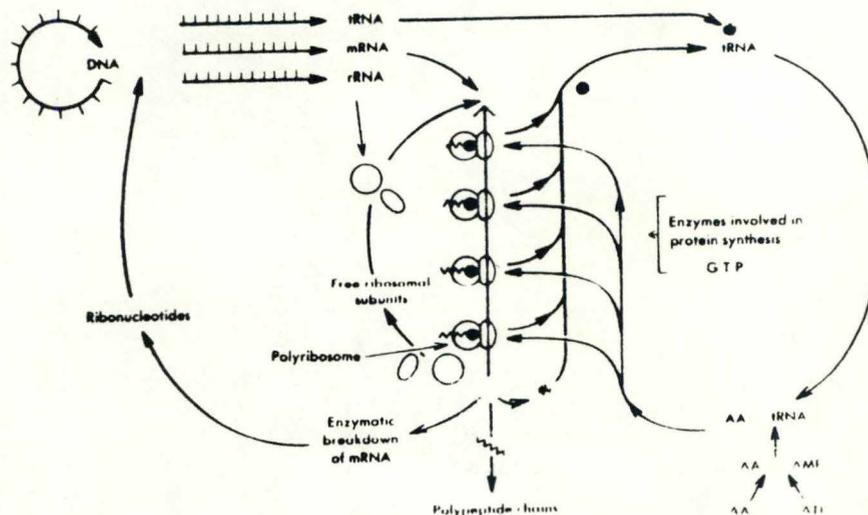


fig. 1 : Description schématique du rôle des ARN dans la synthèse protéique.

Leur intervention au niveau de la synthèse protéique est étudiée en référence à leur structure dans l'espace et leur localisation dans le ribosome.

Etant donné l'importance de la structure primaire sur la conformation tridimensionnelle de la molécule, une connaissance approfondie de cette structure paraît indispensable. L'étude des modifications de la structure primaire comme par exemple la méthylation des nucléotides s'inscrit parfaitement dans cette démarche.

I. STRUCTURES ET FONCTIONS DES ARN RIBOSOMIQUES

Les ribosomes sont constitués de 2 sous-unités de taille inégale, elles-mêmes formées de différents types d'ARN et de protéines ribosomiques (1).

Certaines différences existent entre les ribosomes des différents organismes mais ils présentent une organisation générale semblable selon qu'ils appartiennent à des cellules eucaryotiques ou procaryotiques (fig. 2).

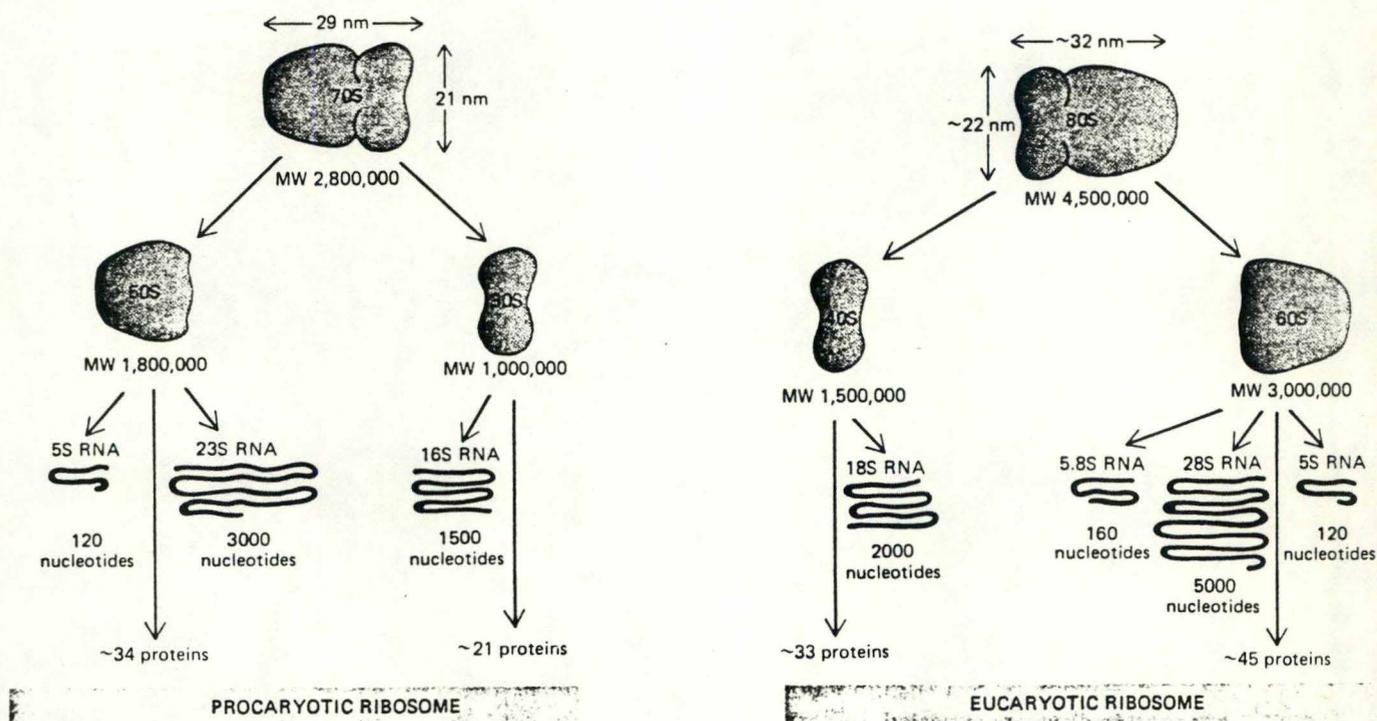


fig. 2 : Comparaison de l'organisation des ribosomes eucaryotiques et procaryotiques.

Certaines structures subcellulaires renferment également des ribosomes.

Dans les chloroplastes, les ribosomes sont semblables aux ribosomes procaryotiques, cependant on trouve 3 molécules d'ARNr dans la grande sous-unité.

La troisième molécule, l'ARNr 4,5 S est de structure primaire homologue de l'extrémité 3' de l'ARN 23 S procaryotique (2).

Les mitochondries possèdent des ribosomes de type procaryotique mais dont les ARNr sont plus petits (3).

I.1. Structures des ARNr

Nous désignerons sous le nom d'ARNr 16 S - 18 S, l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique des eucaryotes et des procaryotes et par ARNr 23 S - 28 S le grand ARNr de la grande sous-unité ribosomique.

L'ARN 16 S - 18 S est constitué d'environ 1.500 à 2.000 nucléotides (la levure en possède 2.000).

La séquence est établie chez certains procaryotes (4) et eucaryotes (5,3) et malgré quelques différences au niveau de cette séquence, une grande conservation de la structure est observée. Certaines régions peuvent réaliser des ponts hydrogènes entre elles; c'est en fonction de ces régions que la structure tertiaire a été établie dans différentes espèces (6,7).

La molécule est divisée en 4 "domaines", chacun d'eux possédant des boucles multiples (8) (fig. 3).

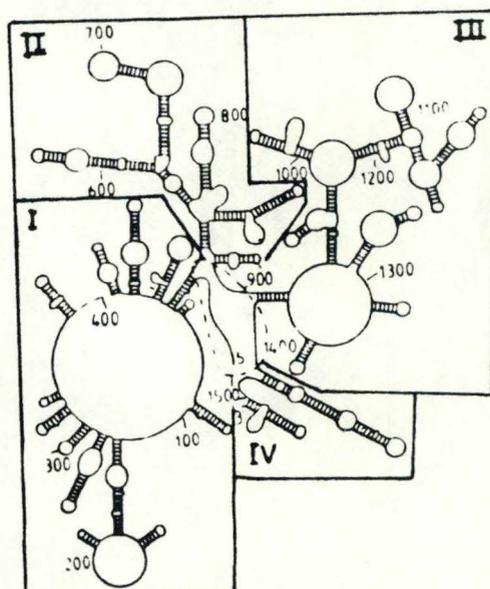


fig. 3 : Structure en domaines de l'ARNr 16 S chez E. coli.

Ces 4 domaines occupent une place bien définie dans le ribosome (fig. 4b).

Les extrémités 5' et 3' ainsi qu'une modification importante de l'ARNr 16 S - 18 S, la double diméthyladénosine ont également été localisées sur la petite unité ribosomique par des techniques de microscopie électronique, diffusion neutronique, fluorescence et autres (1) (fig. 4a).

Noller et Zimmermann ont décrit la localisation des sites de liaison des protéines ribosomiques sur l'ARNr 16 S - 18 S (9, 10) (fig. 4c).

Certaines protéines s'associent à un domaine, d'autres à plusieurs, ce qui peut provoquer une stabilisation de l'orientation des différents domaines (1).

a.

b.

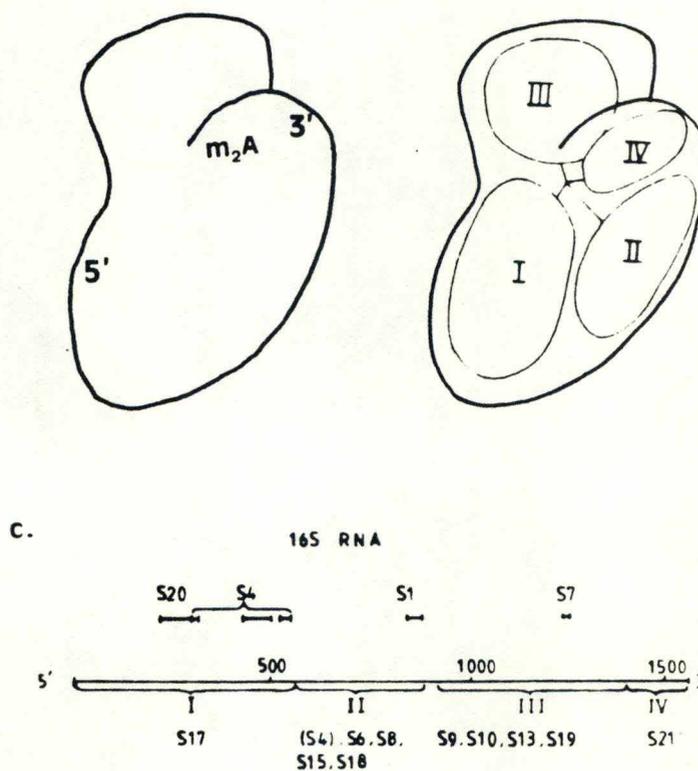


fig. 4 a. : Localisation des extrémités 5' et 3' de l'ARN 16 S - 18 S dans la petite sous-unité ribosomique.
 b. : Localisation des 4 domaines de l'ARNr 16 S - 18 S dans la petite sous-unité ribosomique.
 c. : Association des protéines avec certaines régions de l'ARNr 16 S.

L'ARNr 23 S - 28 S possède de 1.900 nucléotides chez les procaryotes à 5.000 nucléotides chez les eucaryotes supérieurs (3.500 chez la levure). La séquence ou des parties de séquence sont connues dans différents organismes (11, 12, 13).

La structure secondaire a été déterminée après clivage de la molécule par des nucléases en 2 grands fragments. Chacun des fragments est composé de 3 domaines (6) (fig. 5).

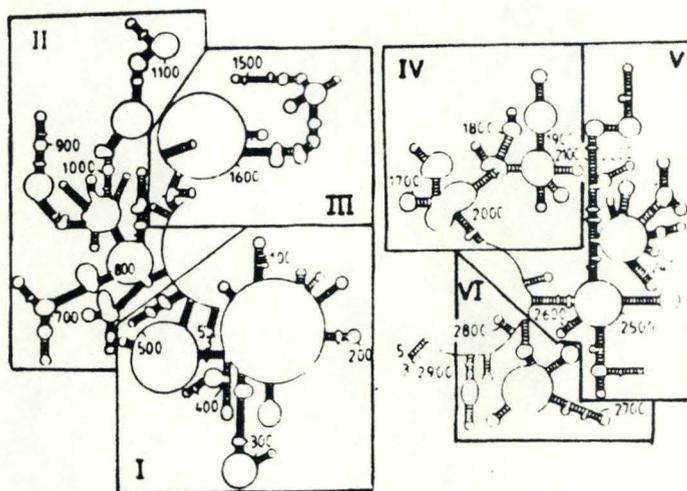


fig. 5 : Organisation en domaines de l'ARNr 23 S d'E. coli.

L'extrémité 3' de la molécule et certains sites d'interaction avec des protéines ribosomiques ont été localisés, ce qui ne permet cependant pas de construire un modèle de l'arrangement des différents domaines sur le ribosome (10, 14) (fig. 6).

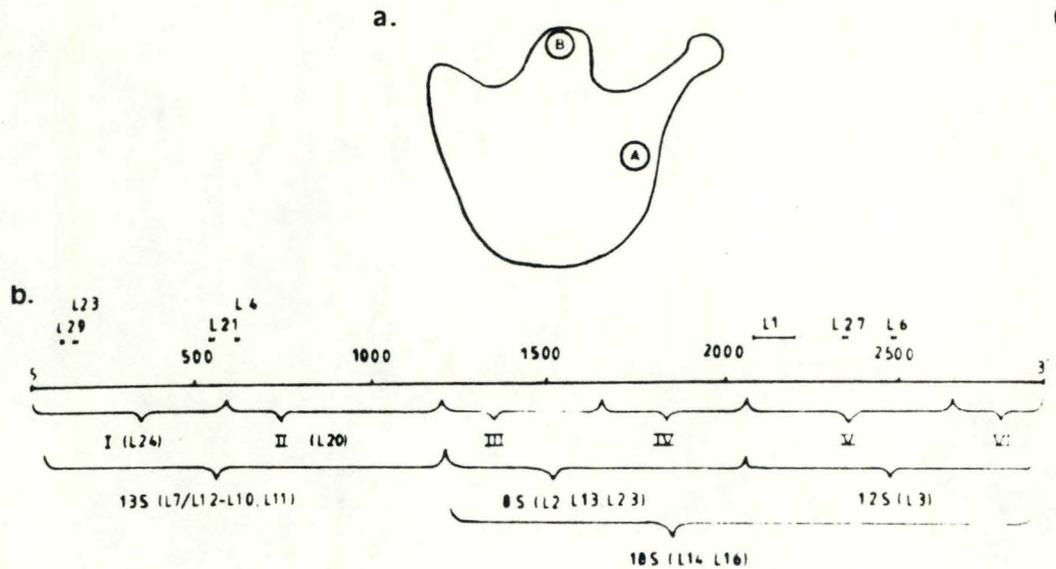


fig. 6a : Localisation de l'extrémité 3' de l'ARN 23 S - 28 S (A) et de l'ARN 5 S (B) dans la grande sous-unité ribosomique.

b : Associations de protéines avec certaines régions de l'ARN 28 S.

L'ARN 5 S constitué d'environ 120 nucléotides a été séquencé dans plusieurs espèces (9). La structure secondaire étudiée par Fox (15) et par Garrett (16) prend la forme d'un "Y" (fig. 7). Les extrémités 3' et 5' sont situées au même endroit sur le ribosome. Certaines protéines ribosomiques sont étroitement associées à l'ARNr 5 S et le protègent des éventuels clivages enzymatiques et des modifications chimiques (16) (fig. 7).

D'après les travaux de Röhl, des interactions de paires de bases entre l'ARNr 5 S et l'ARNr 16 S sont envisageables (17).

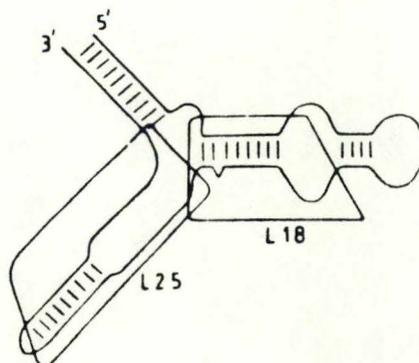


fig. 7 : Structure en "Y" de l'ARNr 5 S et sites d'interaction avec les protéines ribosomiques L18 et L25.

La séquence nucléotidique de l'ARNr 5,8 S existant uniquement chez les eucaryotes a été déterminée actuellement dans 28 espèces (18, 19) (fig. 8).

Un grand nombre de modèles de structures secondaires est proposé, cependant il existe encore beaucoup de controverses à ce sujet. Il existe des interactions entre l'ARNr 5,8 S et l'ARNr 28 S qui provoquent des changements conformationnels significatifs (19).

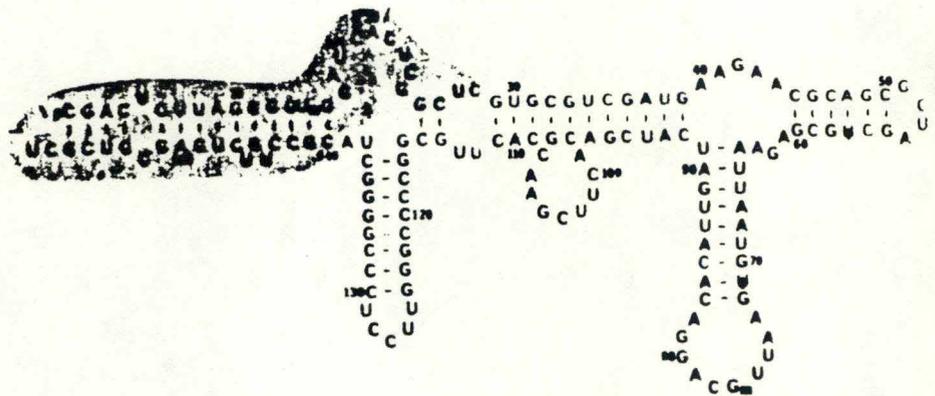


fig. 8 : Séquence et structure secondaire de l'ARNr 5,8 S.
En foncé : site possible d'interaction avec l'ARNr 28 S.

I.2. Fonctions des ARNr

La synthèse protéique se fait suivant un certain nombre d'étapes que l'on peut résumer en 3 niveaux : l'initiation, l'élongation et la termination.

L'implication des ARNr dans ce processus est encore en de nombreux points obscure (1).

L'extrémité 3' de l'ARNr 16 S - 18 S intervient dans l'initiation au niveau de l'ARNm (20).

Auparavant le ribosome se dissocie en ses sous-unités.

L'extrémité 3' n'est probablement pas accessible sur le ribosome entier (21).

La fonction des ARNt est d'apporter les acides aminés au niveau du ribosome. Il existe sur celui-ci différents sites de fixation pour les ARNt dont les mieux connus sont le site A (aminoacyl-tRNA) et le site P (peptidyl-tRNA). On a démontré qu'un nucléotide, la cytosine-1400 de l'ARN 16 S interagit avec la boucle de l'anticodon de l'ARNt au niveau du site P (22) et que l'ARNr 23 réagit avec l'extrémité aminoacyl de l'ARNt (22). Les ARNr 5 S et 5,8 S seraient également en interaction avec certaines régions conservées de l'ARNt (1).

II. BIOSYNTHESE DES ARN RIBOSOMIQUES MATURES

Nous nous attachons dans ce chapitre plus spécialement aux cellules eucaryotiques dont la levure fait partie. Les procaryotes sont cités à titre de comparaison.

II.1. Organisation générale des gènes d'ARNr

Chez les eucaryotes, les gènes d'ARNr sont organisés en unités de transcription (UT). Ce sont des segments d'ADN contenant un ou plusieurs gènes transcrits en une seule molécule d'ARN précurseur. On trouve 2 UT différentes chez les eucaryotes : une grande UT est constituée des gènes codant pour les ARNr 28 S, 18 S et 5,8 S; son produit primaire de transcription est un grand ARNr précurseur des 3 ARNr matures.

Les gènes de cette UT sont séparés par des "spacers transcrits" (ts), séquences codées dans l'ARNr précurseur et supprimées dans les ARNr matures (fig. 9).

La seconde UT est constituée d'un seul gène codant pour l'ARNr 5 S (24, 25, 26). Chez certains eucaryotes inférieurs dont la levure, ces deux UT sont adjacentes et constituent une unité de répétition (fig. 9 b).

Plusieurs unités de répétition sont arrangées les unes à la suite des autres (en tandem) et séparées par des séquences nucléotidiques non transcrites ou "spacers non transcrits" (nts) (24, 26).

Chez les autres eucaryotes les unités de répétition sont constituées d'une seule UT bordée par des nts.

Seules sont arrangées en tandem les unités de répétition renfermant la grande UT (fig. 9c). Les autres (qui codent pour les ARNr 5 S) sont dispersées dans le génome (24, 26).

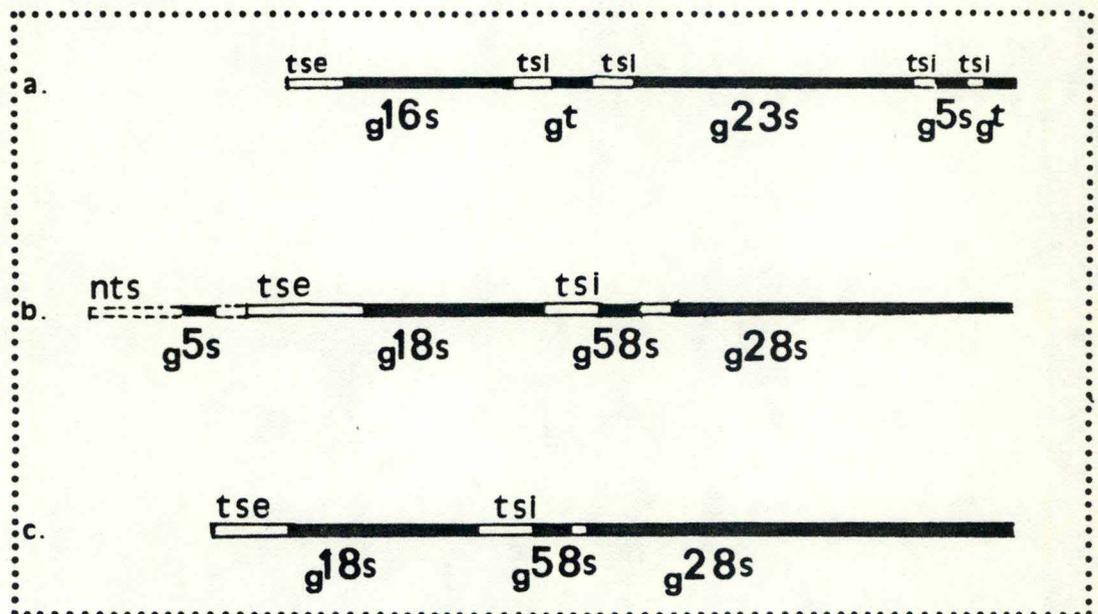


fig. 9 : Description schématique des UT
 a. chez les procaryotes
 b. chez certains eucaryotes inférieurs (levure).
 c. chez les autres eucaryotes.
 tse-i = spacer transcrit externe-interne
 nts = spacer non transcrit
 gt = gène d'ARNt - gn = gène n.

Les gènes d'ARNr sont présents dans le génome à un nombre de copie qui varie d'une espèce à l'autre (27) (Table I.).

A l'interphase, les gènes ribosomiques se trouvent dans le nucléole, excepté ceux d'ARNr 5 S faisant partie d'une unité de répétition indépendante.

Tissue or cell type	Multiplicity per genome
Hela	1100 (heteroploid)
Rat liver	750 (ploidy not determined)
<i>Xenopus</i>	900 (diploid)
<i>Xenopus</i>	1600 (diploid)
<i>Drosophila melanogaster</i>	260 (diploid)
Tobacco leaves^a	1500-2000 (diploid)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140 (haploid)
<i>Escherichia coli</i>	5-6
<i>Bacillus subtilis</i>	9-10
<i>Bacillus megaterium</i>	35-45

Table I : Multiplicité des gènes d'ARNr 23 S - 28 S et 16 S - 18 S dans différents organismes.

On trouve également des gènes d'ARNr extrachromosomiques chez certains organismes (26). Ils sont soit constitutifs (levure), soit résultant d'un phénomène d'amplification de gènes ayant lieu à une époque où la cellule a besoin d'une quantité plus importante de ribosome (amphibiens, insectes) (25, 27, 28).

Certaines séquences de gènes d'ARNr ou des parties de séquence sont actuellement connues dans plusieurs espèces (29, 30, 31, 32). On sait grâce à cela que les séquences extrêmes des UT sont bien conservées dans l'évolution et qu'elles pourraient intervenir comme signaux de contrôle de la transcription (de type promoteur ou terminateur) (26). Actuellement de nombreuses études sont menées afin de déterminer les séquences et les sites exactes d'interaction de l'enzyme de transcription (ARN polymérase) avec ces signaux de contrôle (29, 33).

Malgré une organisation commune chez tous les eucaryotes, la grande UT présente des variabilités d'une espèce à l'autre. C'est ainsi que des introns ont été décrits dans le gène d'ARNr 28 S chez certaines espèces (Drosophile) (26). Les régions géniques les mieux conservées codent pour des séquences d'ARNr ayant des fonctions très importantes dans la synthèse protéique (30).

La fréquence des bases G.C augmente avec l'évolution; ces bases ont été introduites dans le génome ribosomique soit par insertion soit par transition des bases A.T en G.C (30).

Contrairement à ce que l'on a longtemps admis, des études récentes ont montré qu'il existe un précurseur d'ARNr 5 S. Sa taille diffère de celle de l'ARNr 5 S mature de quelques nucléotides seulement à l'extrémité 3' (34).

Chez les eucaryotes supérieurs, 2 types de gènes codant pour l'ARNr 5 S sont décrits. Le premier appartient aux cellules somatiques et l'autre aux cellules oocytaires. Ils diffèrent par quelques nucléotides, ce qui suggère qu'ils ont évolué indépendamment (26, 34).

La localisation des gènes ribosomiques chez les procaryotes suit généralement une distribution bimodale. Ils se trouvent de part et d'autre de l'origine de répllication du chromosome (25, 35). Le génome contient 5 à 10 copies de l'UT (27) (Table I). Celle-ci a une organisation différente de celle des eucaryotes. Ici l'ARNr 5 S fait partie de la même UT que les autres ARNr. L'UT renferme aussi des gènes d'ARNt (fig. 9 a).

II.2. Transcription et émondage des ARNr

La transcription est le passage de l'information génétique de l'ADN vers l'ARN. Elle fait intervenir des enzymes capables de lire la séquence génique et de synthétiser les molécules d'ARN. Ces enzymes sont des ARN polymérases

ADN dépendantes. Chez les eucaryotes, il en existe 3 classes différentes. Les polymérase I transcrivent les grandes UT d'ARNr, les polymérase II transcrivent tous les grands gènes nucléoplasmiques et les polymérase III transcrivent les gènes de faible poids moléculaire tels que les gènes d'ARNr 5 s et les gènes d'ARNt (26, 36). Plusieurs polymérase effectuent en même temps la transcription d'une même UT. Il peut y avoir jusqu'à 50 polymérase I par μm de brin d'ADN sur la grande UT (26). L'UT recouverte de polymérase et entourée de molécules d'ARNr naissant forme un ensemble caractéristique appelé "image en arbre de Noël" (fig. 10) (28). Entre les UT on ne trouve ni polymérase, ni ARNr naissant (27).

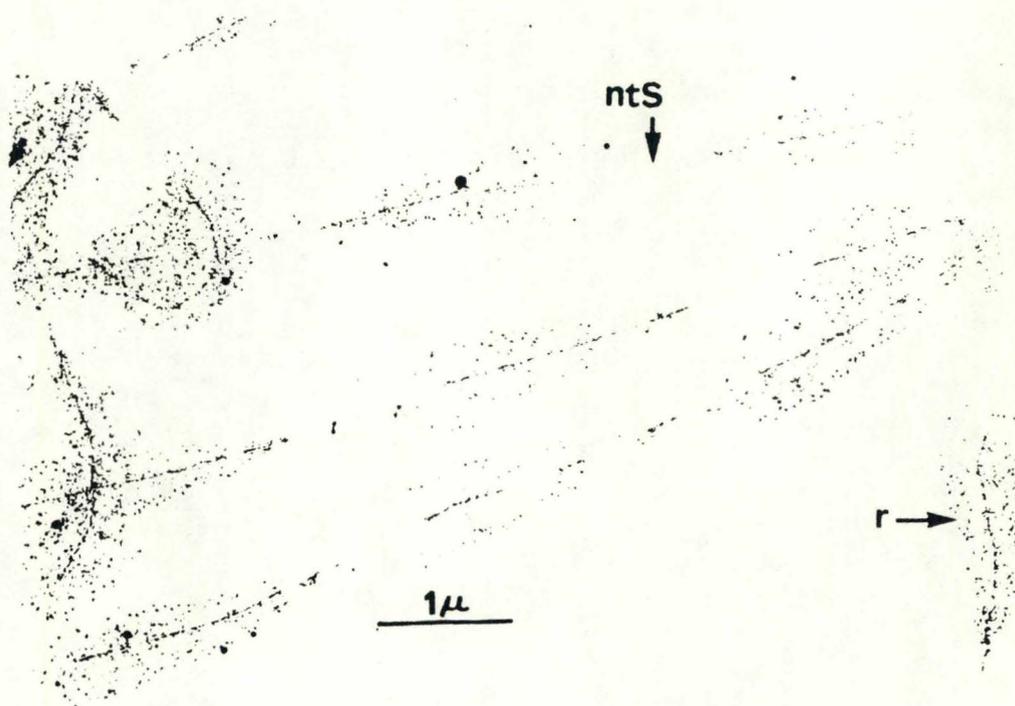


fig. 10 : Transcription de l'ADNr : image classique de l'arbre de Noël.

nts = spacer non transcrit.
R = ARNr

Comme indiqué plus haut, la grande unité de transcription code pour une première molécule, le précurseur primaire. La taille du précurseur primaire augmente avec l'évolution, son poids moléculaire allant de $1,9$ à $4,7 \cdot 10^6$ (34) (Table II, fig. 11).

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

Table II : PM ($\cdot 10^{-6}$) des grands ARNr précurseurs chez différents eucaryotes.

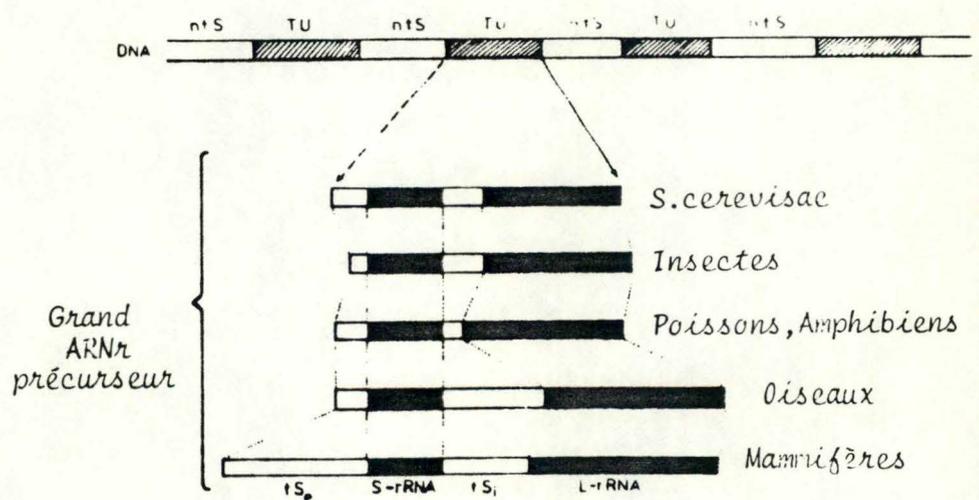


fig. 11 : Arrangement et taille des séquences du grand ARNr précurseur chez différents eucaryotes.
 TU = unité de transcription - S - rRNA = ARNr 18 S - L-rRNA = ARNr 28 S.

Le schéma général d'organisation du grand ARNr précurseur est semblable chez tous les eucaryotes (26) (fig. 11). Au fur et à mesure de sa synthèse, il est recouvert de protéines ribosomiques (1,27). Directement après sa transcription, il est converti en intermédiaires plus stables selon des étapes de clivages successifs (fig. 12). Ce processus est appelé "émondage" de l'ARNr.

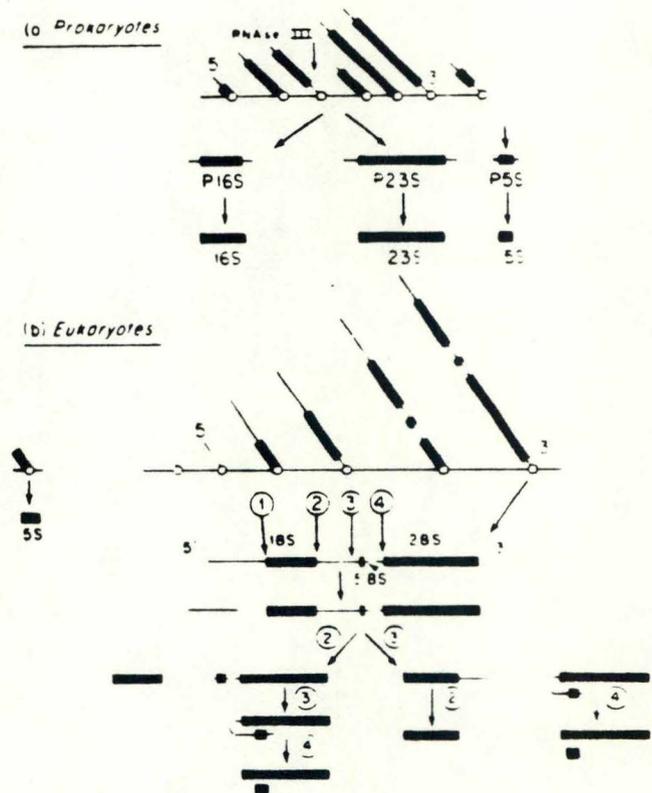


fig. 12 : Transcription et émondage des ARNr chez les procaryotes et les eucaryotes. Les chiffres entourés d'un cercle représentent les endonucléases.

L'émondage résulte de l'action d'enzymes appelées "endonucléases" au niveau de sites spécifiques de la séquence du précurseur. Rien n'est encore connu quant au

mécanisme exacte de reconnaissance de ces sites. Les étapes successives de l'émondage débutent dans le nucléole et s'achèvent dans le nucléoplasme (fig. 13) (27).

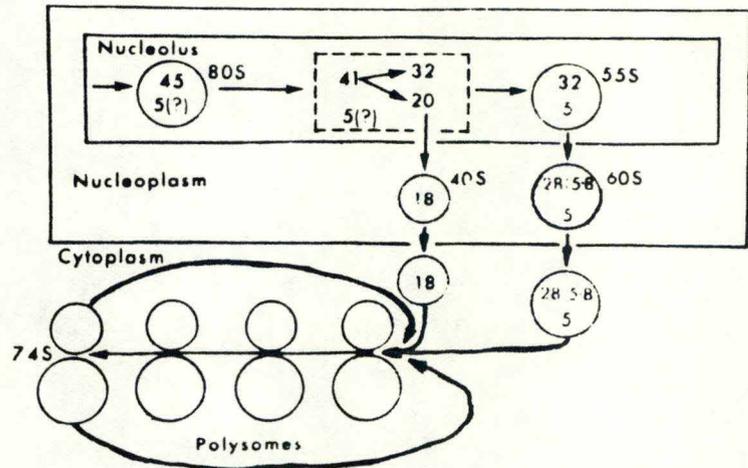


fig. 13 : Représentation schématique de la formation des ribosomes dans les cellules HELA. L'émondage des ARNr a lieu dans le nucléole et le nucléoplasme.

La durée du processus dépend du temps de génération de la cellule : chez la levure (temps de génération est de 2 à 4 heures) il est 5 fois plus rapide que dans les cellules de mammifères (temps de génération est de 12 à 24 heures) (34).

La petite UT code pour le précurseur de l'ARNr 5 S. Ce précurseur est rapidement émondé et donne l'ARNr 5 S. Son temps de demi-vie est de l'ordre de la minute (34). Une seule ARN polymérase est responsable de la transcription des différents ARN chez les procaryotes.

C'est chez *E. coli* que cette enzyme a été le mieux caractérisée. Sa structure en sous-unités est similaire chez toutes les bactéries étudiées (36).

L'UT d'ARNr des procaryotes code pour une ARNr précurseur. Une endonucléase le clive au fur et à mesure de sa synthèse, par conséquent ce précurseur primaire n'est jamais détecté (fig. 12) (37). Cette endonucléase, la RNase III, a été identifiée chez E. coli grâce à des souches mutantes, déficientes dans l'émondage de l'ARNr (38).

II.3. Autres modifications postranscriptionnelles

Outre l'émondage, les ARNr subissent d'autres modifications postranscriptionnelles. Celles-ci sont de deux types : les méthylations et l'hypermodification des nucléosides (40, 41).

II.3.1. Les nucléosides hypermodifiés

Aucun des procaryotes étudiés ne présente de nucléoside hypermodifié dans ses ARNr (40). Chez les eucaryotes, seuls les nucléosides de type uridine et cytidine subissent des hypermodifications dans les ARNr (Table III).

Les divers types de nucléosides hypermodifiés formés à partir de l'uridine sont : la pseudouridine (ψ), la 2'-O-méthylpseudouridine (ψm) et la 3-(3-amino-3-carboxyl propyl)-1-méthyl pseudouridine ($am\psi$) (fig. 14). La cytidine donne la N⁴-acéthylcytidine (ac^4C). Celle-ci n'a été identifiée que dans l'ARNr 18 S des hépatocytes de rat (fig. 14) (40).

La fréquence des nucléosides hypermodifiés en uridine dans les ARNr 18 S et 28 S varie selon les espèces mais la plupart des eucaryotes étudiés n'en possèdent qu'un seul ou même aucun. C'est dans les ARNr 18 S et 28 S de levure et de foie de rat qu'on en trouve le plus (Table III).

Les ARNr 5,8 S et 5 S possèdent un ou deux nucléosides hypermodifiés en uridine (19, 42).

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 ⁶ 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 ³ G		1,2														
m ⁷ G	1	1,0	1,4	1	1	1	1	1	0,8							
m ⁵ C	2	1,4			0-1				1,3		1,4	2	3		2(mC)	
m ⁴ Cm	1	1,0	1,0													
m ¹ U			1,2							0,5		2	2	1		
m ⁵ 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 ⁴ C								1								

Table III Nucléosides modifiés dans les ARNr de différents organismes
(Mol/Mol ARN)

(Ec, Escherichia coli; Mc, Mycoplasma capricolum; Al, Acholeplasma laidlawii;
Sc, Sacharomyces carlsbergensis; Ap, Acer pseudoplatanus; Xl, Xenopus laevis;
HeLa, cellules Hela)

Les nucléosides hypermodifiés des ARNr

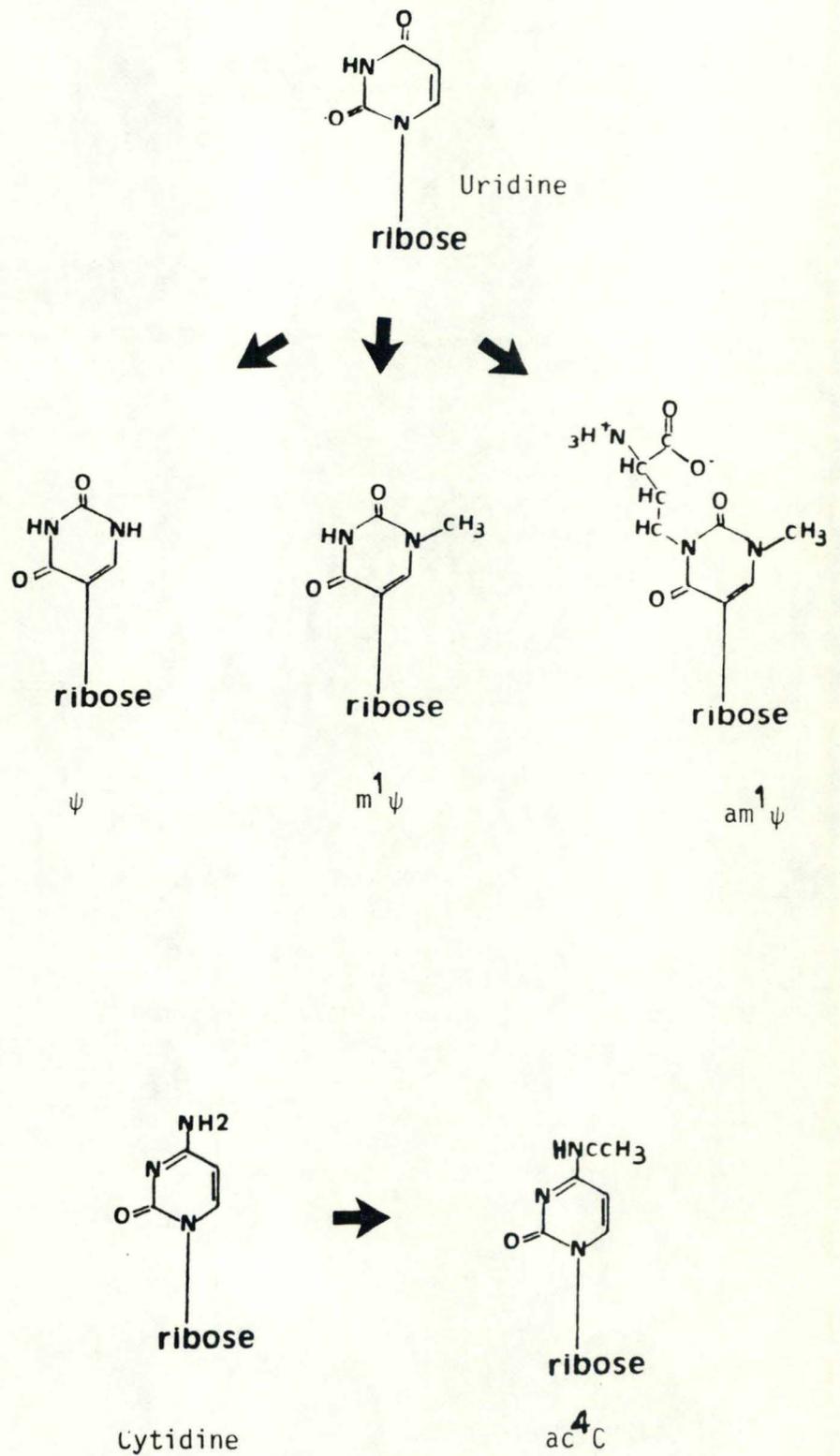


Figure 14

La ψ et sa méthylation sont formées très tôt et probablement durant la transcription du grand ARNr précurseur (43). L'am ψ se réalise en plusieurs étapes.

La formation du 1-méthyl pseudouridine a lieu au niveau du grand précurseur, dans le noyau, et l'addition du groupement 3-amino-3-carboxyl a lieu sur l'ARNr 18 S, dans le cytoplasme (44).

II.3.2. La méthylation

a. Classification des méthylations

Les méthylations des ARNr des eucaryotes et des procaryotes ont été comparées. Certaines d'entre elles persistent à travers l'évolution, mais la plupart des méthylations des procaryotes diffèrent de celles des eucaryotes, aussi bien quantitativement que qualitativement (40, 45) (Table III). On distingue 2 types de méthylations (46) :

- 1°) Les méthylations des riboses des nucléosides appelées 2'-O-méthylations (fig. 15).

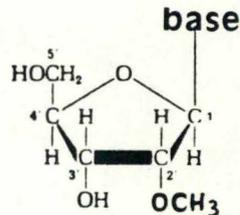


fig. 15 : méthylation au niveau d'un ribose de nucléoside.

Ces méthylations sont dites immédiates car elles se font pour la plupart sur le grand ARNr précurseur, durant sa transcription (47).

Leur fréquence augmente considérablement au cours de l'évolution. D'après certains auteurs, on passerait de 20 à 30% (de méthylations de ribose par rapport aux méthylations totales) chez les procaryotes à 80 à 90% chez les eucaryotes (48, 49).

Chez les eucaryotes les 4 nucléosides peuvent porter des 2'-O-méthyls aussi bien dans l'ARNr 18 S que dans l'ARNr 28 S. Ces nucléosides modifiés s'écrivent :

"Gm, Am, Cm, Um".

Certaines séquences modifiées se retrouvent chez tous les eucaryotes; c'est le cas de la séquence "Um Gm ψ " de l'ARNr 28 S (50).

2°) Les méthylations des bases des nucléotides représentent le 2ème type de méthylations (fig. 16). Elles sont souvent appelées "additionnelles" car elles n'ont lieu qu'à la fin de la transcription, durant ou en fin d'émondage. Sur l'ARNr 18 S certaines ont même lieu très tard dans le cytoplasme (47). A l'inverse des 2'-O-méthylations, les méthylations des bases diminuent avec l'évolution (50). Il en existe différents types, présents soit dans l'ARNr 16 S - 18 S, soit dans l'ARNr 23 S - 28 S ou dans les deux. Quelques exemples de méthylations de base fréquemment rencontrées sont repris en fig. 16.

Certaines méthylations sont hautement conservées et se retrouvent chez tous les eucaryotes. Elles sont même déjà présentes chez les procaryotes; c'est le cas des deux 6-diméthyladénosines adjacentes ($2m_2^6A$) et de la 7-méthyl-guanosine (m^7G) de l'ARNr 16 S - 18 S (50).

La localisation des nucléotides modifiés sur la molécule est spécifique du type d'ARNr (51). Ils se situent toujours en des endroits de l'ARNr préservés lors de l'émondage (40). Les ts ne sont pas méthylés (48).

Il existe encore de nombreuses controverses quant au nombre exacte de groupement méthyl sur les molécules d'ARNr 18 S et 28 S des espèces étudiées. La table III nous montre la répartition des nucléosides modifiés dans les ARNr de différents organismes, mais certains auteurs sont en désaccord avec ces résultats (45). J. Klootwijk a décrit 43 et 24 nucléosides modifiés respectivement sur l'ARNr 28 S et 18 S de levure (50).

Les mitochondries de levure possèdent des ARNr très peu méthylés. Il semblerait que l'ARNr 21 S en possède 2 et l'ARNr 15 S n'en possède pas (80).

En réalité le nombre exacte et la localisation des groupements méthyls ne sont connus que pour l'ARNr 18 S de *Xenopus laevis* (fig. 17) (81). Cet ARNr 18 S compte 40 groupements méthyls qui sont en majorité des 2'-O-méthylations. Dans cette molécule, toutes les méthylations de base sont à l'extrémité 3' et la majorité des 2'-O-méthylations sont à l'extrémité 5' dans des structures secondaires stables.

Aucune méthylation n'a été mise en évidence sur l'ARNr 5 S et l'ARNr 5,8 S en possède 1 ou 2 selon l'espèce.

b. Méthylases et réactions de méthylation

Les enzymes intervenant dans les réactions de méthylation des ARNr sont appelées les méthylases ou méthyltransférases d'ARNr. Le donneur de groupement méthyl est la S-adenosyl-L-méthionine (S-AdoMet). La méthionine et l'ATP réagissent pour donner la S-AdoMet. Celle-ci libère son groupement méthyl et se transforme en S-adenosyl-homocystéine. Le groupement méthyl est récupéré par un accepteur de type ARN, protéine etc... Cette suite de réactions s'inscrit dans le cycle biochimique de synthèse de méthionine (52) (fig. 18).

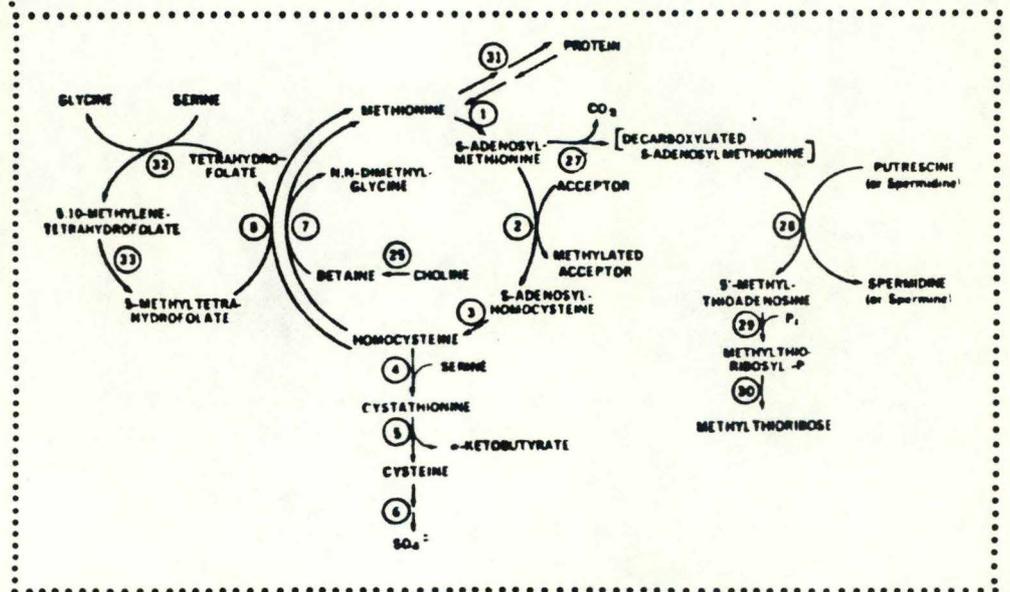


fig. 18 : Cycle biochimique du métabolisme de la méthionine. Les chiffres entourés d'un cercle représentent les enzymes catalysant les différentes réactions. L'enzyme 2 représente une méthyltransférase.

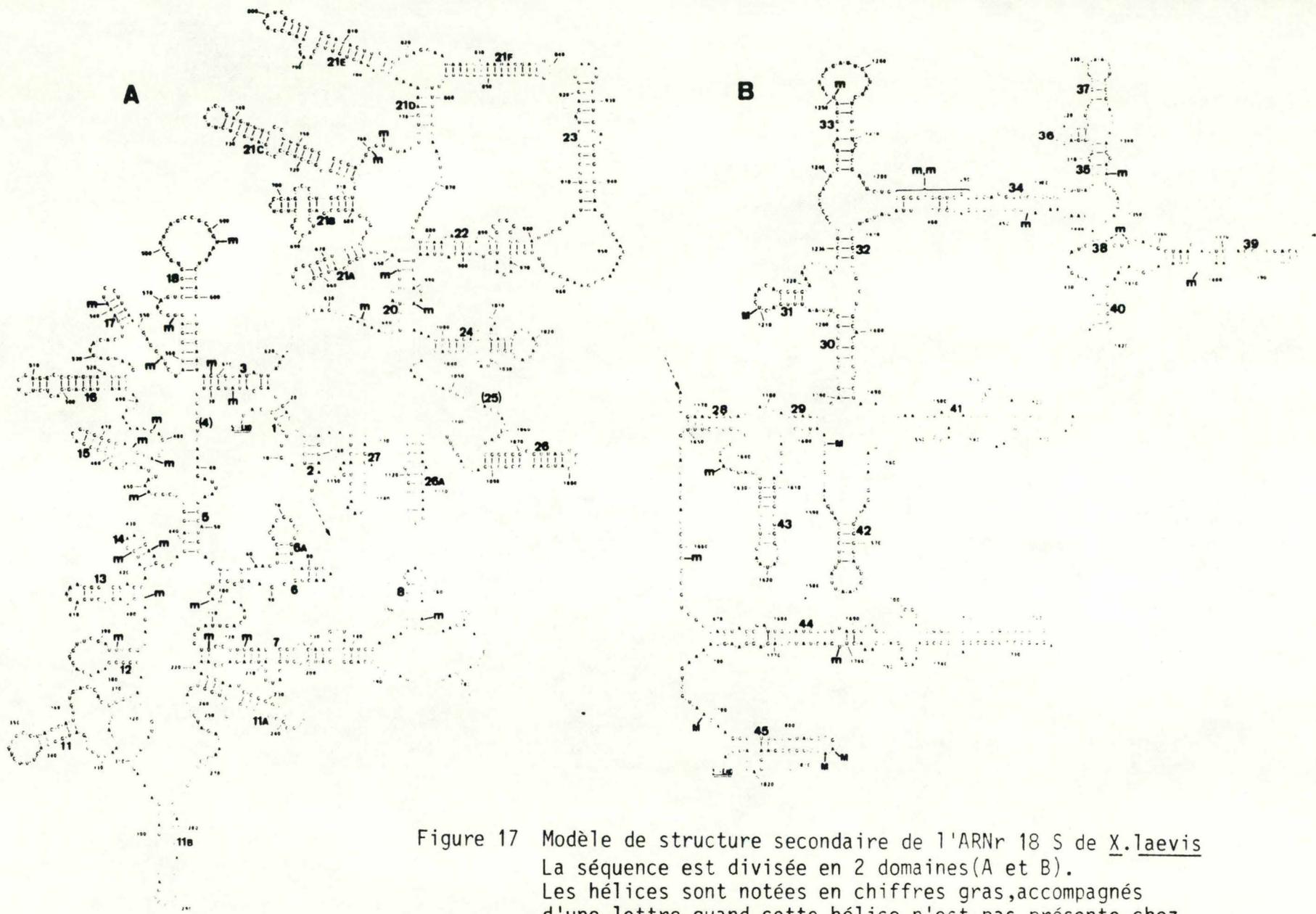


Figure 17 Modèle de structure secondaire de l'ARNr 18 S de *X.laevis*
 La séquence est divisée en 2 domaines(A et B).
 Les hélices sont notées en chiffres gras,accompagnés
 d'une lettre quand cette hélice n'est pas présente chez
E.coli.Les groupements méthyls sont notés par "m" s'il
 s'agit d'une 2'-O-méthylation,et par "M" si c'est une
 méthylation de base.

L'ARNr des mutants déficients dans l'une ou l'autre méthylation est utilisé comme substrat pour l'étude des méthyltransférases (53, 54).

Jusqu'à présent quelques unes d'entre elles ont été purifiées et partiellement caractérisées (55, 56, 57) (Table IV). Cependant en dehors d'*E. coli*, aucun mutant déficient dans la modification des ARNr n'a jusqu'ici été caractérisé (40).

CARACTERISTIQUES DES METHYLASES D'ARNr

rRNA methyl-transferase	Source	Substrates	Mr ^a (10 ⁻³)	Divalent ^b ions	Monovalent ions ^a	Poly-amines ^b	Protein influencing activity	Km (nM)	Km (AdoMet)	Mutants available
m ₂ A	<i>E. coli</i>	30S	30(D)	Mg(+)	K(+) NH ₄ (+)		S21(-) IF3(-)			Yes (ksgA)
m ¹ G	<i>E. coli</i>	23S, rRNA 50S, 70S		Mg(-)	K(+) NH ₄ ⁺ (±)	Sperm(-) Purtr(±)	Fact Al(-) B(+)	53(23SrRNA)	4.6	Yes (rmAl)
m ² G	<i>E. coli</i>	23S rRNA		Mg(±)	—	—	A2(-)			Yes
m ⁶ A	<i>E. coli</i>	23S rRNA, DAPR ^c	31.6(N)	Mg(+)	K(+)					No
m ₅ A	Plasmid bom	50S	29(D)							Yes

Table IV : a) PM en présence (D) ou absence (N) d'agents dénaturant.

b) + indique l'activation, - indique l'inhibition.

c) DAPR = β-9-riboxyl-2-6-diaminopurine, un analogue de l'adénosine.

La facilité avec laquelle certaines méthylases agissent sur la petite sous-unité ribosomique sous-méthylée indique que ces méthylation sont relativement bien exposées sur le ribosome (40).

Chez les eucaryotes le noyau renferme les méthylases agissant juste après la transcription et pendant l'émondage (c'est le cas de la plupart des 2'-O-méthylases et de certaines bases-méthylases) et le cytoplasme, celles qui

agissent plus tard, sur les ARNr matures (c'est le cas de la méthylase de la double diméthyladénosine de l'ARNr 18 S) (40).

c. Fonctions des méthylations

De nombreuses études sont réalisées au sujet de l'implication des méthylations dans des fonctions cellulaires importantes parmi lesquelles se trouvent la synthèse protéique, la maturation des ARNr et du ribosome et la résistance aux antibiotiques.

1°) Intervention des méthylations au niveau de la maturation

La méthylation n'est pas indispensable pour la maturation de l'ARNr chez les procaryotes (40). Cette conclusion est tirée d'un travail réalisé par M.K. Chelbi-Alix et ses collaborateurs sur une souche d'E. coli méthionine-dépendant (58). Cette souche est inoculée dans un milieu où la méthionine est remplacée par de l'éthionine. Les ARNr extraits de cette culture ne sont pas méthylés, ni éthylés car l'enzyme intervenant dans la synthèse de S-AdoMet n'accepte pas l'éthionine. Les extrémités 5' et 3' des différents ARNr sont comparables à celles de la souche sauvage, ce qui indique que les sites de clivage sont restés les mêmes lors de l'émondage. De plus la conformation des différents ARNr n'est pas modifiée. Le taux de maturation des ARNr méthylés et sous-méthylés est également le même. Au contraire des procaryotes, la méthylation semble être essentielle à la maturation des ARNr des eucaryotes (58). M. Caboche et J.P. Bachellerie ont étudié l'effet de la cycloleucine, inhibiteur spécifique de la méthylation, sur la maturation des ARNr. Ils ont montrés que la maturation des ARNr n'est pas modifiée qualitative-ment (les mêmes précurseurs sont obtenus) mais bien quantitativement en cas de sous-méthylation (59).

La sous-méthylation a pour effet d'inhiber partiellement différentes étapes de la maturation. Dans le noyau, le temps de demi-vie de certains intermédiaires sous-méthylés augmente considérablement et on détecte par des méthodes de marquage une accumulation significative de ces formes intermédiaires (59).

Le taux d'ARNr 28 S cytoplasmique est très sévèrement affecté (on détecte une inhibition de 85 à 90%).

Ceci serait dû au fait que l'absence de 2'-O-méthylations pourrait altérer la conformation des sites de maturation et donc interférer avec certaines étapes du processus (58).

La méthylation joue également un rôle au niveau de la formation du ribosome : l'assemblage de la grande sous-unité ne peut se réaliser dans des conditions de sous-méthylation (58, 60). Au contraire la méthylation n'est pas nécessaire pour l'assemblage de la petite sous-unité (58).

2°) Intervention des méthylations au niveau de la synthèse protéique.

L'ARNr 16 S - 18 S possède 2 diméthyladénosines adjacentes à l'extrémité 3' situées dans la boucle d'une épingle à cheveux. Cette modification est présente chez tous les procaryotes et eucaryotes (61) (fig. 19).

L'existence chez E. coli d'une souche mutante déficiente pour ces 2 méthylations a permis l'étude de leur fonction. Le dépistage des mutants est facilité par leur résistance à la kasugamycine (antibiotique) contrairement aux souches sauvages qui y sont sensibles (62).

La double diméthylation interviendrait au moins de deux manières dans l'initiation à la synthèse protéique. D'une part elle influence la conformation de l'ARNr au niveau de sa structure secondaire (63). Cela a été

confirmé par l'étude de l'effet de la température sur la déstabilisation de la structure secondaire à l'extrémité 3' de l'ARNr 16 S d'*E. coli* sauvage et mutée (64). Il en ressort que la double diméthylation est plus antagoniste de la formation de l'épingle à cheveux que la séquence sous-méthylée; sa fonction serait alors de déstabiliser la structure secondaire de l'épingle à cheveux afin de faciliter les interactions moléculaires lors de l'initiation à la traduction (64).

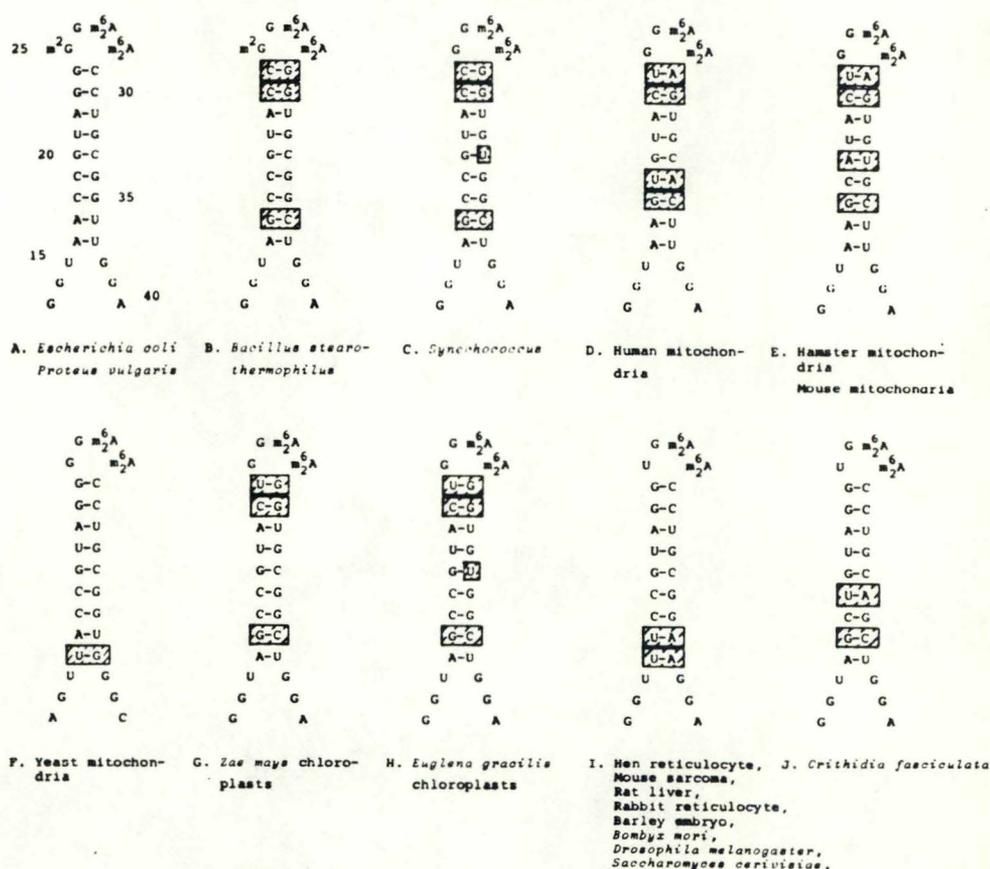


fig. 19 : Extrémité 3' de l'ARNr 16 S - 18 S : la double 6-diméthyl-adénosine incluse dans une structure en épingle à cheveux est conservée au cours de l'évolution.

D'autre part, cette modification semble accélérer le lien entre 2 protéines ribosomiques, S9 et S14 et la petite sous-unité. Or ces 2 protéines stimulent elles-mêmes le lien d'une autre protéine, S1 avec la petite

sous-unité. On sait par ailleurs que le complexe S1 - sous-unité active l'initiation à la synthèse protéique (65, 66, 67) (fig. 20).

Ces études ont été réalisées sur des mutants d'E. coli polyamines dépendants. Les polyamines stimulent la synthèse protéique de différentes manières et notamment en stabilisant la petite sous-unité sous-méthylée et facilitant l'action de la diméthyladénosine transférase (67).

L'étude des mutants résistants à la kasugamycine (67) et des mutants polyamines dépendants (68) permet de démontrer la déficience de leur petite sous-unité en protéines S9, S14 et S1 par rapport aux souches sauvages d'E. coli (fig. 21).

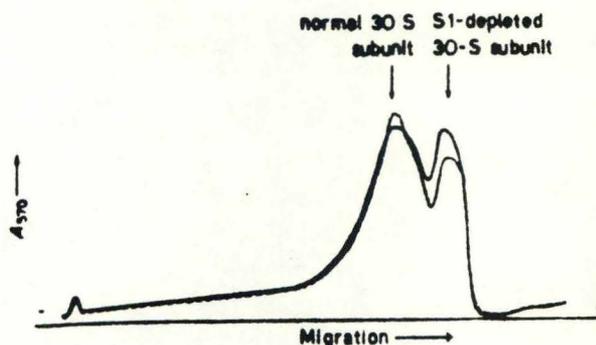


fig. 20 : Electrophorèse sur gel mixte (agarose/polyacrylamide) de sous-unités 30 S provenant d'une culture d'E. coli polyamine dépendante mise en présence (---) ou pas (—) de polyamines.

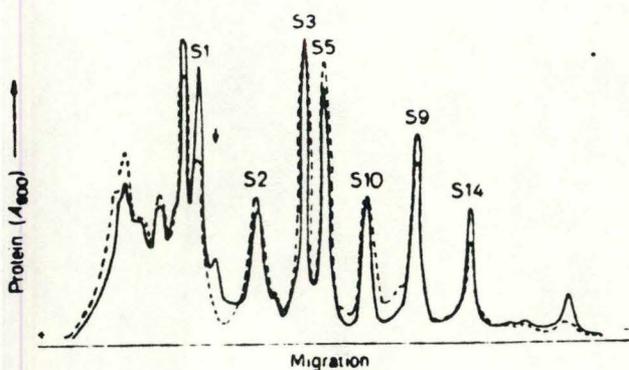


fig. 21 : Comparaison du contenu protéinique de la sous-unité 30 S de souches sensibles et résistante à la kasugamycine par électrophorèse sur gel d'acrylamide — protéines de la souche sensible --- protéines de la souche résistante.

On tire la conclusion que la double diméthylation intervient dans la synthèse protéique mais la nature exacte de cette intervention est difficile à mettre en évidence (69).

Une sous-méthylation à cet endroit n'entraîne cependant pas de conséquences vitales chez les procaryotes puisque les souches résistantes à la kasugamycine croissent normalement (70).

La grande conservation de cette modification laisse croire à un parallélisme avec les eucaryotes au niveau de sa fonction. La mise en évidence de tels mutants chez les eucaryotes permettrait de progresser dans ce domaine.

Parmi les méthylations de l'ARNr 23 S - 28 S, la séquence méthylée "UmGmU" se retrouve dans la boucle d'une structure en épingle à cheveux. Elle est conservée chez les procaryotes (où la séquence "UmGU" domine) et chez les eucaryotes (où la séquence "UmGm" domine) et est située à l'extrémité 3' de la molécule (fig. 22).

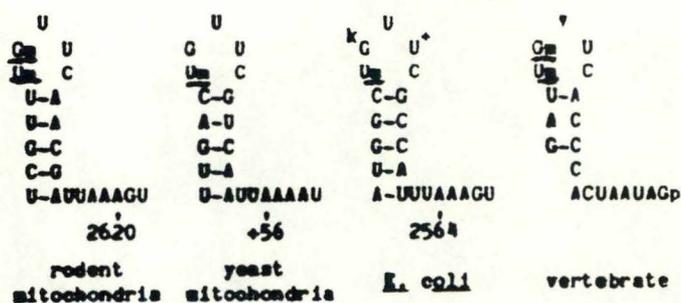


fig. 22 : Structure en épingle à cheveux de l'extrémité 3' de l'ARNr 23 S - 28 S renferme la séquence "UmGmU" dans sa boucle.

Cette séquence jouerait également un rôle dans la synthèse protéique mais la nature exacte de sa fonction est encore loin d'être claire (71).

3°) Implication des méthylations dans la résistance aux antibiotiques (AB).

La sous méthylation de l'ARNr 16 S d'E. coli au niveau des 2 adénosines 3' terminales va de paire avec une résistance à la kasugamycine.

Dans les souches sauvages d'E. coli, la kasugamycine bloque l'initiation à la traduction en inhibant le lien entre la formyl-méthionyl tRNA (Fmet-tRNA) et la petite sous-unité 30 S. Mais l'altération de la sous-unité 30 S mutée empêche l'action de la kasugamycine et les souches mutantes y sont résistantes. Cependant in vitro cette résistance ne s'exprime que lorsque la sous-unité 30 S mutée est en présence de l'unité 50 S (62) (c'est à dire que le lien Fmet-tRNA et sous-unité 30 S se réalise même en présence de kasugamycine).

Les auteurs nous rapportent que d'une part, la kasugamycine agit aussi bien sur la 30 S mutée et sur la 30 S sauvage mais elle n'est pas active lorsque la 30 S est associée à la grande sous-unité 50 S. D'autre part la méthylase de la diméthyladénosine empêche l'interaction de la 30 S sous-méthylée avec la 50 S; elle la méthyle puis l'interaction se fait.

Nous pensons donc que la kasugamycine peut agir sur la 30 S sauvage avant sa méthylation, lorsque celle-ci n'est pas encore associée à la 50 S.

Chez le mutant (où il n'y a pas de diméthyladénosine transférase) l'interaction de la 30 S avec la 50 S peut se faire et la kasugamycine n'agit pas (62, 72).

L'ARNr 23 S de Streptomyces azureus, producteur naturel de thiostrepton, porte une 2'-O-méthylation sur le résidu 1067 à l'extrémité 3'. Cette méthylation est responsable de son autoimmunité (73).

Les autres procaryotes sont sensibles au thiostrepton. Celui-ci inhibe la traduction en se fixant à la protéine L11 recouvrant une partie de l'ARNr 23 S (74) (fig. 23).

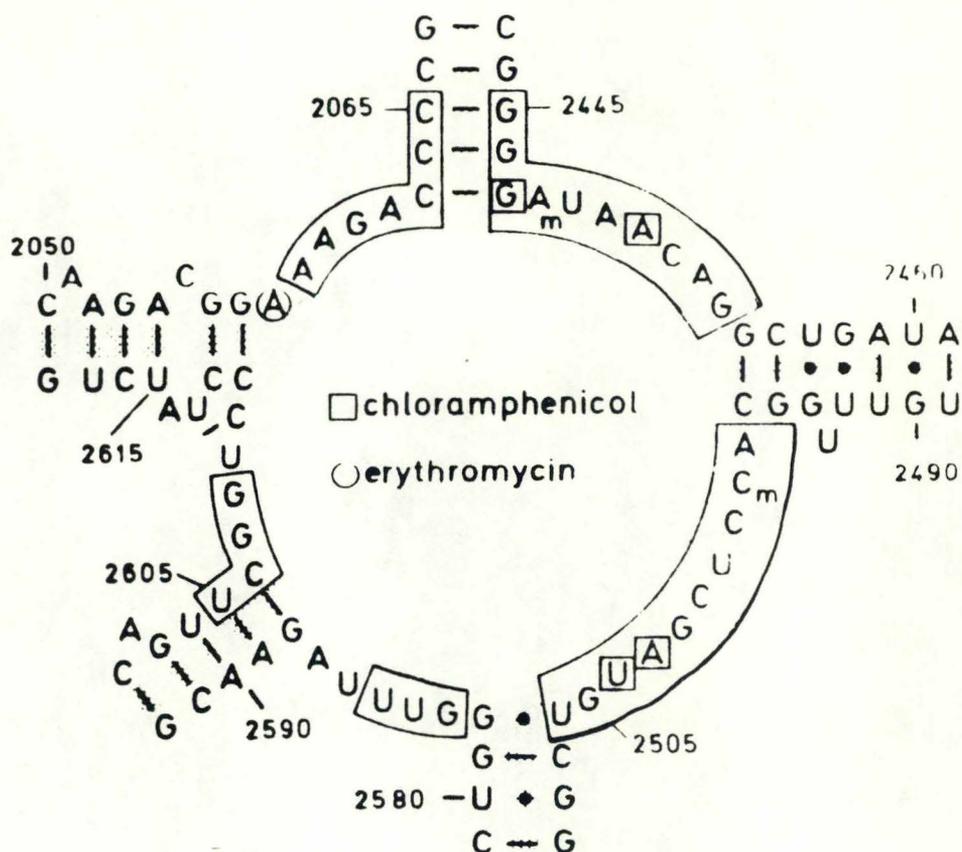


fig. 24 : Fragment de l'ARNr 23 S d'E. coli montrant les positions de modifications du nucléotide causant les résistances au chloramphénicol et à l'érythromycine. Les nucléotides modifiés ont été identifiés chez la levure et les mitochondries de mammifères et ont été transférés sur les positions correspondantes chez E. coli.

La méthylase de l'adénosine 2056 de l'ARNr 23 S, codée par le gène ermC du plasmide pE194 de Staphylococcus aureus donne une résistance aux antibiotiques du groupe des macrolides-lincosamides-streptogramine B (MLS) (76). Sa synthèse est induite par de faibles concentrations en érythromycine (77, 78).

Des résistances au chloramphénicol et à la micrococcine dues à des méthylations de l'ARNr 23 S ont également été observées (fig. 23 et 24).

Il existe des mutants de levure et de mitochondrie de mammifères résistants au chloramphénicol où l'on détecte

2 méthylations dans la molécule d'ARNr 28 S (74) correspondant à des régions hautement conservées chez les bactéries. Les bactéries sensibles au chloramphénicol, ne possèdent pas ces modifications.

4°) Méthylation de l'ARNr 5,8 S

L'ARNr 5,8 S possède 1 ou 2 2'-O-méthylations (79) (fig. 9). La 2'-O-uridine située à l'extrémité 5' de la molécule, influence sa conformation en la déstabilisant. Contrairement à la double diméthylation de l'ARNr 16 S - 18 S, cette déstabilisation semble minimiser les interactions moléculaires de l'ARNr 5,8 S avec l'ARNr 28 S. Cependant rien n'est encore sûr quant à la nature de ces interactions (79).

III. BUT DU TRAVAIL

La distribution et l'identification des nucléotides méthylés, le processus par lequel ils sont méthylés et la fonction des groupements méthyles sont des questions qui font appel à des démarches expérimentales différentes que l'on classe en 2 types : les approches in vitro et les approches in vivo de la méthylation.

Il existe des mutants de méthylation dont les ribosomes ou les ARN servent de substrat aux méthylases dans des expériences in vitro (40). Ce genre d'approche est intéressant dans le cas d'une caractérisation d'enzyme et de la séquence qu'il méthyle (53). G.R. Bjork et L.A. Isaksson ont isolé les premiers mutants déficients dans la modification de l'ARNr d'E. coli (57). L'ARNr 23 S d'un de ces mutants manque complètement de 1-méthylguanine alors qu'un autre mutant est partiellement déficient en 2-méthylguanine sur l'ARNr 23 S (40).

La résistance à la Kasugamycine de certains mutants d'E. coli est également due à un manque complet de la double diméthyladénosine à l'extrémité 3' de l'ARNr 16 S (82, 83). Ces mutants servent également de témoins phénotypiques des modifications existant sur les ARN. On peut, par exemple, comparer leur croissance dans différents milieux de culture avec celle des souches sauvages.

Cependant, jusqu'à présent de tels mutants, déficients dans la modification de l'ARNr, n'ont été caractérisés que chez E. coli (40).

Les expériences in vitro, surtout polarisées sur une modification bien précise d'un ARNr sont donc limitées par le manque de mutants de méthylation chez les eucaryotes et les procaryotes.

Une étude de la distribution des groupements méthyls peut se réaliser par des marquages in vivo.

Ceux-ci permettent une analyse à la fois quantitative et qualitative des différents groupements méthyls.

De tels marquages s'effectuent aussi aisément sur les bactéries (surtout pratiqués chez E. coli (48)) que sur les cellules d'eucaryotes (particulièrement sur les levures (48, 46) mais également sur les cellules de Drosophile (49), Hela (60) et bien d'autres.

Les donneurs de groupements méthyls radioactifs utilisés par les différents laboratoires sont la [méthyl-³H] méthionine ou la [méthyl-¹⁴C] méthionine (45).

Cet acide aminé intervient dans la synthèse de la S-AdoMet, principal donneur de groupements méthyls. Celui-ci cède son groupement méthyl notamment aux différents ARN.

Cependant la méthionine intervient également dans la biosynthèse des purines. Une partie de la radioactivité de l'ARN est due aux noyaux puriques marqués et non pas aux groupements méthyls marqués. Afin d'amoindrir ce phénomène, les chercheurs ajoutent certaines quantités d'adénosine et de guanosine non radioactive dans le milieu de culture et effectuent un marquage bref (pendant 1 ou 2 générations) (41, 46, 60).

En regard de ces démarches, nous voulons dans ce travail de mémoire, étudier le problème de la méthylation des ARN suivant une approche différente et originale.

Le marqueur que nous utilisons dans nos expériences de marquage in vivo est la [méthyl-³H] S-AdoMet.

Ce choix, nous donne plusieurs avantages par rapport à la méthionine radioactive. L'utilisation de la S-AdoMet triciée nous permet de sauter une étape dans le processus de marquage, celle de la synthèse de S-AdoMet elle-même. De plus, le marquage des ARN à la [méthyl-³H] S-AdoMet nous évite des problèmes de déviation de radioactivité dans les purines constituant les ARN.

Cela nous permet de prolonger la durée du marquage; elle équivaut dans nos expériences à la durée de l'inoculation soit 8 à 10 générations.

En augmentant le temps de marquage, nous augmentons la proportion d'ARN néosynthétisé en présence de marqueur. Nous pensons que dans ces conditions, les résultats obtenus après marquage sont plus représentatifs de la méthylation qui a lieu in vivo.

La méthylation des ARN est un mécanisme complexe qui s'effectue sur plusieurs molécules d'ARN différentes. Dans l'introduction, nous avons invoqué exclusivement la méthylation des ARNr car les recherches effectuées ici sont essentiellement tournées vers ce type d'ARN. Cependant, nous serons amenés dans la présentation des résultats à parler des ARN de transfert qui eux aussi sont méthylés. La méthylation a lieu sur 2 sites différents de la molécule d'ARN, à savoir sur les bases et sur les riboses des nucléotides (cf Introduction p.20). Enfin, la méthylation a lieu au niveau de 3 structures subcellulaires différentes, à savoir le cytoplasme, le nucléoplasme et le nucléole qui renferment chacun les enzymes spécifiques de certaines méthylations. Il existe un pool plus ou moins grand de S-AdoMet localisé dans chacune de ces trois structures subcellulaires et ces pools interagissent entre eux. L'introduction de [méthyl-³H] S-AdoMet dans les cellules entraîne une modification de la grandeur et de la radioactivité spécifique de chaque pool endogène de S-AdoMet. Nous pensons que cette modification pourrait être plus ou moins importante selon la structure subcellulaire dans laquelle se trouve le pool, selon la durée du marquage, selon la concentration du marqueur dans le milieu de culture etc... Il serait donc possible que certaines molécules d'ARN ou certains sites de méthylation soient, selon leur localisation subcellulaire, préférentiellement marqués. La figure 25 représente le modèle de marquage des ARN par la [méthyl-³H] S-AdoMet.

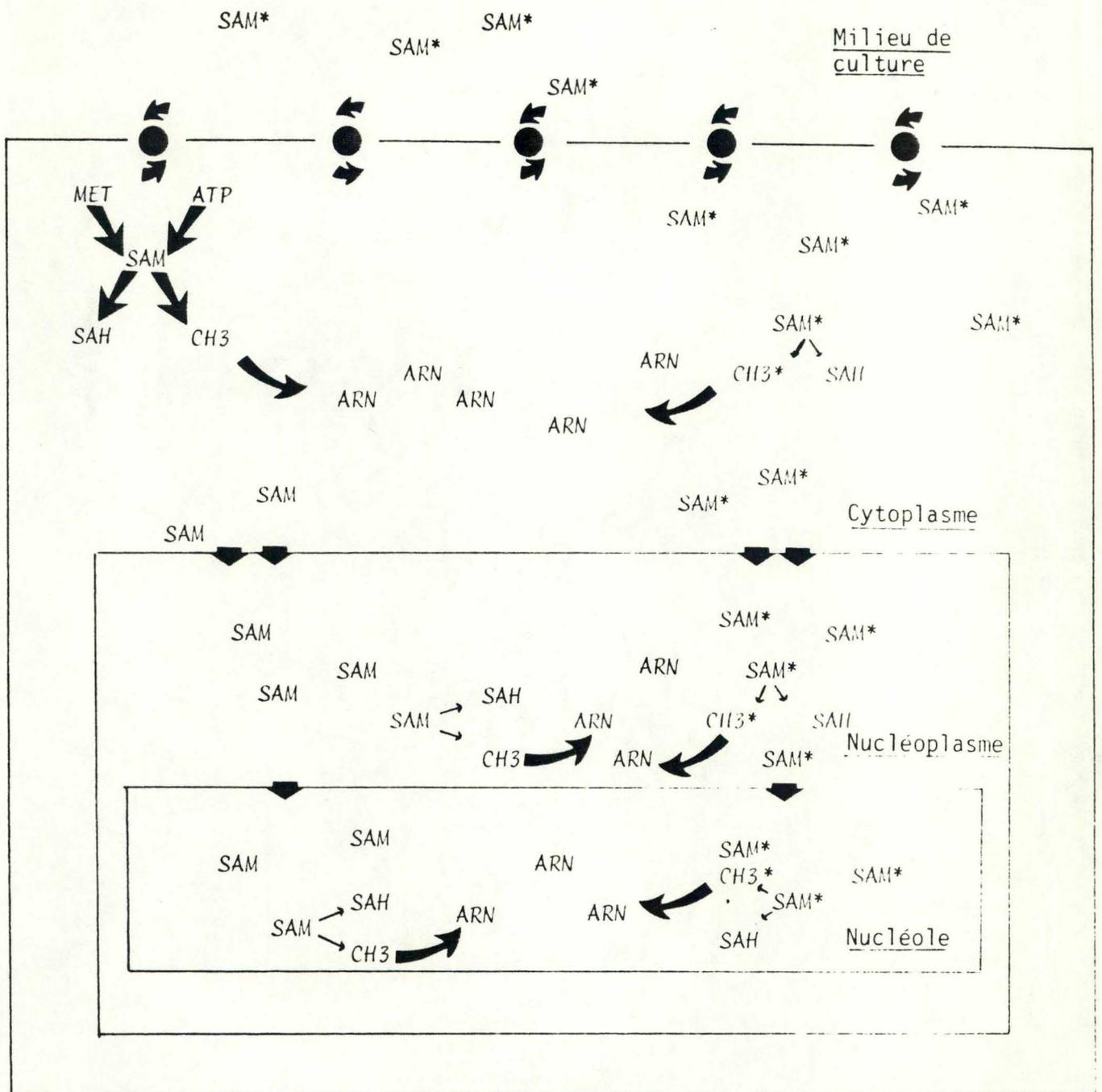


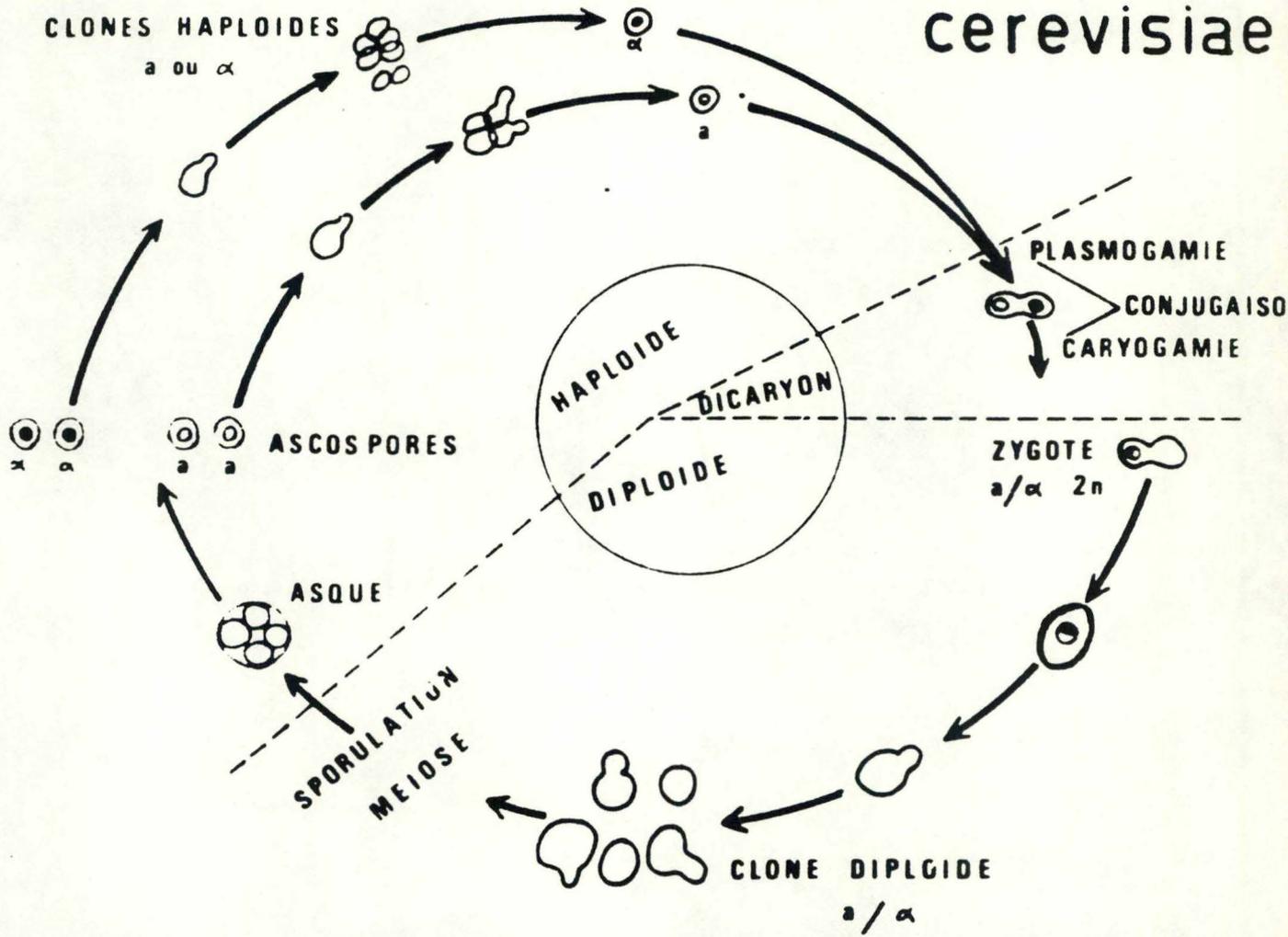
Figure 25 Modèle de marquage des ARN avec la [méthyl-³H] S-Ado.Met
(SAM, S-Ado.Met; SAM*, S-Ado.Met radioactive; MET, Methionine;
SAH, S-Ado.Homocysteine)

Sur la base de ce modèle, nous essayerons de vérifier par des expériences appropriées, l'existence ou l'absence d'un marquage préférentiel d'un ou plusieurs types d'ARN ou d'un type de site de méthylation.

Nous avons choisi pour réaliser ce travail un organisme unicellulaire simple qui est la levure Saccharomyces cerevisiae. Le choix de cet organisme est basé sur les avantages suivants : la levure est un eucaryote facile à manipuler au laboratoire, qui incorpore la S-AdoMet et le travail biochimique se réalise aisément sur des quantités suffisamment importantes grâce entre autre à un temps de génération relativement court.

De plus la levure se prête bien a une approche génétique de la méthylation et il sera possible dans des travaux à venir de toucher spécifiquement par mutation les gènes correspondants aux méthyltransférases d'ARNr. Cette approche génétique est d'autant plus facilitée que le cycle de vie de la levure renferme une phase haploïde et une phase diploïde stables (fig. 26) (84).

- Cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae*



CELLULES HAPLOIDES RONDES TENDANT A S'AGGREGER, DE DIAMETRE ENVIRON MOITIE DES CELLULES DIPLOIDES QUI NE S'AGGREGENT PAS ET SONT OVALES.

Figure 26

Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

A. Méthodes générales

I. Préparation des milieux de culture

Nous utilisons les milieux liquides pour réaliser les cultures de la souche F1100 (a) de Sacaromyces cerevisiae offerte par le Dr F. Lacroute du laboratoire de génétique-physiologie, IBMC du CNRS, Strasbourg, France.

Tous les milieux sont autoclavés avant inoculation pendant 15 minutes à 120° C et 2 atmosphères.

I.1. Milieu complet (YPD)

Ce milieu contient en poids, par volume d'eau distillée, 1% Yeast Extract (Difco), 2% Bacto Peptone (Merck) et 2% de glucose (Merck). Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'HCl 1 M ou de NaOH 1 M.

I.2. Milieu minimum (SD)

Ce milieu contient en poids, par volume d'eau distillée, 0,67% Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco) et 2% glucose (Merck).

Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'HCl 1 M ou de NaOH 1 M.

II. Préparation des tampons

Les volumes des tampons décrits ci-dessous sont ajustés à l'aide d'eau distillée.

II.1. Tampon A

Tris-HCl	10 mM	pH 7
EDTA	1 mM	
NaCl	100 mM	

Le tampon A est autoclavé comme décrit ci-dessus.

II.2. Tampon TEN

Tris-HCl	100 mM	pH 9
EDTA	1 mM	
NaCl	100 mM	

II.3. Tampon TUN 50 mM

Tris-HCl	50 mM	pH 7,8
Urée	7 M	
NaCl	50 mM	

II.4. Tampon TUN 300 mM

Tris-HCl	50 mM	pH 7,8
Urée	7 M	
NaCl	300 mM	

II.5. Tampon TUN 500 mM

Tris-HCl	50 mM	pH 7,8
Urée	7 M	
NaCl	500 mM	

III. Préparation des tampons de sucrose

Une solution stock de sucrose 66% (poids/poids) est conservée au frigo après avoir été traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEP - Fluka) à 1%.

Le D.E.P. est rapidement hydrolysé, au bout de deux à trois heures.

Les volumes des tampons décrits ci-dessous sont ajustés avec de l'eau distillée.

III.1. Tampon sucrose 15% à 25° C

Pour 100 ml de solution finale :

19,78 ml sucrose 66%
0,5 ml Tris-HCl 2 M pH 7
0,5 ml EDTA 0,2 M
4,0 ml NaCl 2,5 M

Ajuster le pourcentage de glucose au moyen de tampon A ou de sucrose 66% après lecture au réfractomètre.

III.2. Tampon sucrose 30% à 25° C

Pour 100 ml de solution finale :

42,51 ml sucrose 66%
0,5 ml Tris-HCl 2 M pH 7
0,5 ml EDTA 0,2 M
4,0 ml NaCl 2,5 M

IV. Comptage des cellules

IV.1. Turbidimétrie

On peut mesurer l'effectif d'une population de levures par la densité optique (D.O.) de la suspension. Cette mesure s'effectue au moyen d'un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 650 nm.

IV.2. Cellule de Thoma

Les cellules en suspension peuvent être comptées au microscope optique à l'aide d'une cellule de Thoma. Une relation mathématique relie le nombre de cellules comptées et le nombre de cellules

contenues dans 1 ml de suspension :

$$N/ml = \frac{X}{16} \cdot 2,5 \cdot 10^5 \cdot 10^a$$

où N/ml représente le nombre de cellules par ml de suspension, X représente le nombre de cellules comptées et a représente le facteur de dilution.

Nous avons réalisé une droite d'étalonnage permettant de connaître le nombre de cellules correspondant à la D.O. d'un ml de suspension (figure 1).

Le comptage des cellules et la mesure de la D.O. sont pratiqués toutes les 2 heures sur une culture en croissance.

Cette relation est linéaire au moins jusqu'à une D.O. de 6 et ce pour autant que les lectures des D.O. au spectrophotomètre restent entre 0,1 et 0,8 afin de ne pas sortir des limites de résolutions de l'appareil. C'est dans ce but que des dilutions appropriées d'échantillons de culture sont effectuées avant chaque mesure.

Nous obtenons pour la souche Fl 100 un nombre d'environ 3×10^7 cellules par D.O.

V. Mise en culture

Afin que les expériences soient répétitives, il est indispensable de connaître avec précision la quantité de cellules inoculées au départ de chaque culture.

A cette intention, on prépare une préculture qui sera placée en chambre chaude jusqu'à sa phase stationnaire de croissance.

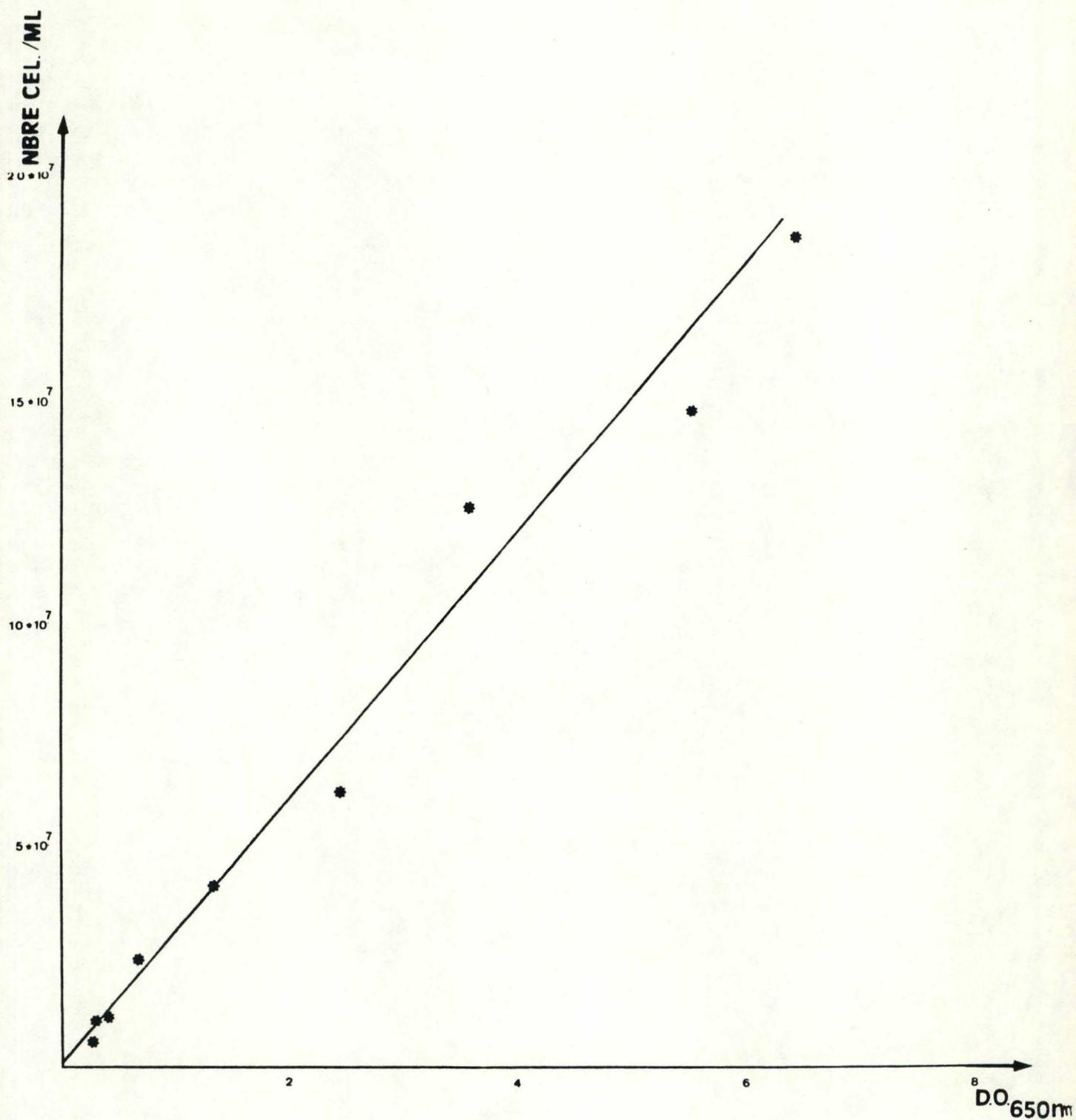


Figure 1 Droite d'étalonnage permettant de connaître le nombre de cellules correspondant à la d.o. d'un ml de suspension.

V.1. Préparation de la préculture

Une colonie de levures est prélevée depuis une boîte stock à l'aide d'une aiguille montée stérilisée à la flamme. La colonie est inoculée dans un erlenmeyer contenant au maximum 1/3 de son volume de milieu liquide.

L'erlenmeyer est alors placé en chambre chaude à 30° C sous une agitation constante pendant 2 jours. L'arrivée en phase stationnaire est contrôlée par turbidimétrie. Le but est atteint lorsque l'on mesure une D.O. de 6 à 7.

V.2. Préparation de la culture

La culture est inoculée à partir de la préculture avec un facteur de dilution tel que la D.O. s'établisse environ à 0,05.

Une courbe de croissance de la souche Fl 100 (a) peut être réalisée à partir d'une telle culture.

Des échantillons sont alors prélevés toutes les 2 heures et leur D.O. est mesurée.

B. Méthodes d'étude des ARN

I. Conditions de croissance et marquage

Les cultures sont incubées à 30° C dans des milieux complet ou minimum. Nous utilisons des cultures de 1 litre si il n'y a pas marquage et de 1 à 4 ml si il y a marquage des cellules.

Le marquage se réalise par la (méthyl-3H) S-AdoMet (Amersham, TRK 2361, 15 ci/mmoles) à raison de 3 μ ci ou 10 μ ci par ml de milieu de culture.

La durée du marquage équivaut à celle de la croissance de la culture. Celle-ci est stoppée lorsque la D.O. atteint 4 à 5.

II. Méthode d'extraction des ARN

Lorsque la croissance est arrêtée par refroidissement dans la glace, une rapide vérification de la contamination de la culture est réalisée au microscope optique.

II.1. Sédimentation et lavage des cellules

Cette culture est centrifugée à 5.000 rpm (rotor Sorvall type G5A) pendant 5 minutes dans une centrifugeuse thermostatée à 0° C (centrifugeuse Sorvall RC2-B). Le culot est suspendu dans un volume de tampon TEN et recentrifugé. On pratique habituellement 2 lavages des cellules.

II.2. Broyage et extraction phénolique

Après lavage, le culot est pesé. On le resuspend dans un volume de NaAc 10 mM pH 5,2 correspondant à 2,5 fois le poids du culot. La suspension est transvasée dans un tube en verre fermé, de 5 ml, adaptable au broyeur (Braun Cell Homogenizer-MSK).

Des billes de verre de 0,45 mm de diamètre (à raison de 1,5 fois le poids du culot) et du phénol redistillé, saturé en tampon TEN (à raison de 2,5 fois le poids du culot) y sont ajoutés.

Le tout est broyé pendant 2 fois 30 secondes à température ambiante.

Le lysat est ensuite centrifugé à 10.000 rpm (rotor Sorvall pendant 10 minutes dans la centrifugeuse Sorvall Type G5A) thermostatée à 0° C.

Le surnageant est aspiré avec une pipette pasteur stérile et placé dans un corex 15 également stérile.

II.3. Précipitation des ARN à l'éthanol

Les ARN contenus dans ce surnageant sont débarrassés des traces de phénol par précipitation à l'éthanol.

Par volume de surnageant sont ajoutés :

0,1 volume NaAc 3 M pH 5,5

2,5 volumes Ethanol -20° C

Après l'avoir passée au vortex, la solution est placée une nuit à -20° C. Elle est ensuite centrifugée à 15.000 rpm pendant 10 minutes et à 0° C.

Deux lavages à l'éthanol -20° C sont effectués, suivis de deux lavages à l'éther. Ces lavages débutent par une mise en suspension au vortex afin de décoller et disperser le culot. Les suspensions sont alors chaque fois centrifugées à 15.000 rpm (rotor Sorvall type G5A) pendant 10 minutes et à 0° C.

Les lavages terminés, l'ARN est séché pendant 20 minutes sous vide.

II.4. Mesure des quantités d'ARN

Les quantités d'ARN utilisées dans nos expériences sont mesurées par l'absorbance des solutions correspondantes en admettant : $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$.

III. Méthode de séparation des ARN

La centrifugation zonale permet de séparer les différents ARN suivant leur coefficient de sédimentation.

Des gradients linéaires 15-30% sucrose sont préparés le jour même de l'extraction. Les solutions de sucrose sont décrites dans la partie "Méthodes générales".

L'appareil utilisé pour la fabrication des gradients, les tubes SW 60 contenant les gradients ainsi que tout le matériel qui sera en contact avec la solution d'ARN doivent être soigneusement traités par une solution 1% DEP.

III.1. Séparation analytique

Un échantillon de 100 μl contenant environ 25 μg d'ARN mis en solution dans le tampon A, est disposé sur le

gradient en évitant de le troubler.

Les gradients sont centrifugés pendant 3 heures à 60.000 rpm (rotor SW 60 class G et H) et à 15° C dans l'ultracentrifugeuse (Beckman L8-70).

Le contenu des gradients est analysé lors du passage devant une cellule photoélectrique et l'absorbance est mesurée en continu à 254 nm au moyen d'un système de récolte ISCO connecté à un moniteur VA5.

Le gradient est recueilli dans des fioles à scintillation, à raison de 100 µl par fiole. Après ajout de 4 ml de liquide de scintillation (Aqualuma) par fiole, celles-ci sont passées au vortex et comptées pendant 1 minute dans un compteur Beckman (LS-3150T).

III.2. Séparation préparative

Un échantillon de 100 µl contenant 100 à 300 µg d'ARN est déposé sur le gradient. La suite des opérations est la même que pour la séparation analytique excepté pour la récolte des gradients. Ici les différents ARN sont recueillis successivement dans des tubes corex 15 stériles. Ils sont ensuite précipités à l'éthanol tel que décrit précédemment.

C. Méthodes d'analyse de la distribution des groupements méthyls

I. Hydrolyse des ARN

I.1. Hydrolyse alcaline totale

L'hydrolyse totale d'un échantillon d'ARN marqué (environ 15.000 à 30.000 cpm) s'effectue dans 1 ml NaOH 0,1 M à 37° C pendant 18 heures ou 40 heures selon l'expérience.

I.2. Hydrolyse alcaline partielle

Cette hydrolyse est réalisée sur du poly A commercial (Boehringer) afin d'étalonner la colonne de chromatographie.

A 2 mg de poly A est ajouté 1 ml NaOH 0,1 M. L'hydrolyse se réalise en 1 heure à 37° C.

I.3. Hydrolyse enzymatique à la T₂

L'ARN est dissout dans 0,5 ml 10 mM NaAc pH 4,5 et incubé avec 10 unités d'ARN en T₂ (Sigma, München) pendant 18 h. à 37° C.

II. Chromatographie échangeuse d'ions en présence d'urée

II.1. Préparation de la colonne de DEAE-cellulose

A 100 gr de cellulose (DE 52 Whatman) sont ajoutés 600 ml Tris HCl 5 mM pH 7.0. Laisser gonfler la cellulose pendant une heure en mélangeant de temps en temps.

Après avoir laissé sédimenter la cellulose, aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette reliée à une trompe à eau. Remettre la cellulose en suspension dans un volume de Tris HCl 5 mM, pH 7.0.

La colonne a une hauteur d'environ 12 cm et un diamètre de 0,75 cm soit un volume de 18,55 cm³. Elle sera lavée par 50 ml de tampon TUN 500 mM et équilibrée par 50 ml tampon TUN 50 mM.

II.2. Chromatographie et récolte des fractions

L'hydrolysate d'ARN marqué est disposé sur la colonne en même temps qu'un DO_{260 nm} d'AMP commercial servant de marqueur. Un lavage par 20 ml de tampon TUN 50 mM est effectué. On fait ensuite passer un gradient continu tampon TUN 50 mM (70 ml) - tampon TUN 300 mM (70 ml).

A ce moment, la colonne est reliée au collecteur de fraction (vetrorac-LKB) réglé sur 20 gouttes par tube. La DO de chaque fraction est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm afin de localiser le pic AMP, puis la radioactivité est comptée au compteur Beckman pendant 1 minute après avoir ajouté 10 ml de liquide de scintillation (Aqualuma) dans chaque fiole.

Résultats et Discussions

RESULTATS

I. CARACTERISATION DE LA SOUCHE F1100

Sur la base du modèle de marquage à la [méthyl-³H] S-Ado.Met (cf. But du travail, fig. 25.) nous pensons que le milieu de culture peut influencer la modalité du marquage.

C'est pourquoi, nous étudions la souche F1100 dans plusieurs conditions de croissance différentes.

Cette souche ne présentait pas d'auxotrophie, sa croissance peut se réaliser en milieu complet (YPD) et en milieu minimum (SD). Elle sera caractérisée dans ces 2 milieux.

I.1. Courbes de croissance

La croissance des cultures de levures, comme celle de tous les micro-organismes unicellulaires, passe par 4 phases successives (85) : une phase de latence qui varie en fonction de différents paramètres (âge et quantité de l'inoculat, nature du milieu etc...); une phase exponentielle qui correspond à la période d'accroissement en progression géométrique du nombre de cellules. Le taux de croissance y est maximum avec un taux de mortalité faible et toutes les cellules y ont un temps de dédoublement minimal.

Nous caractérisons la souche en mesurant son temps de génération durant cette phase. La troisième phase est la phase de ralentissement qui correspond au moment où le rythme des divisions ralentit à cause d'un appauvrissement du milieu en aliments et d'une accumulation des déchets du métabolisme; la phase stationnaire est un arrêt de la croissance (taux de croissance nul). Ces 4 phases sont représentées dans les figures 1 et 2.

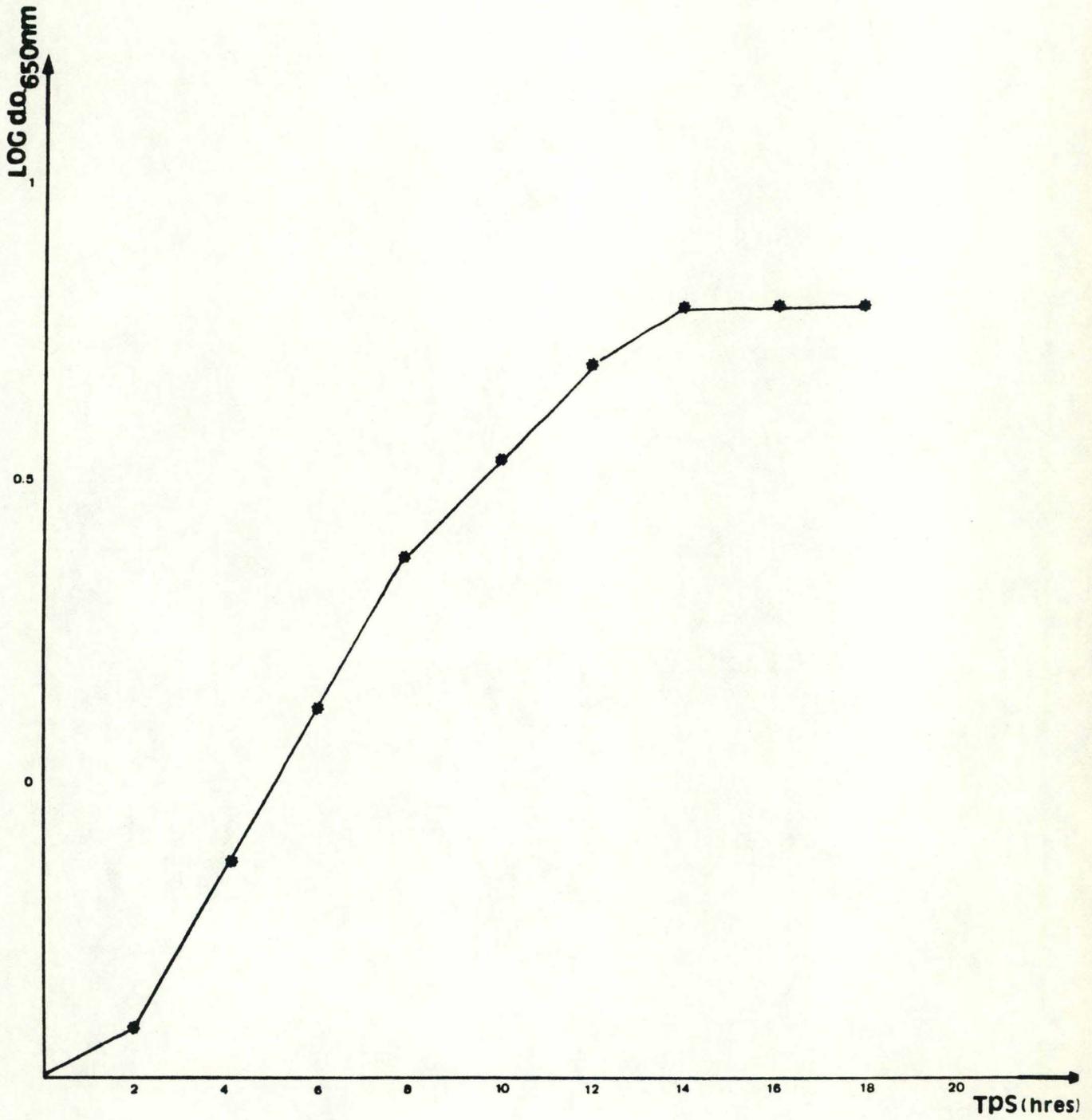


fig. 1 : Courbe de croissance de la souche F1100 à partir d'une culture inoculée dans un milieu minimum.

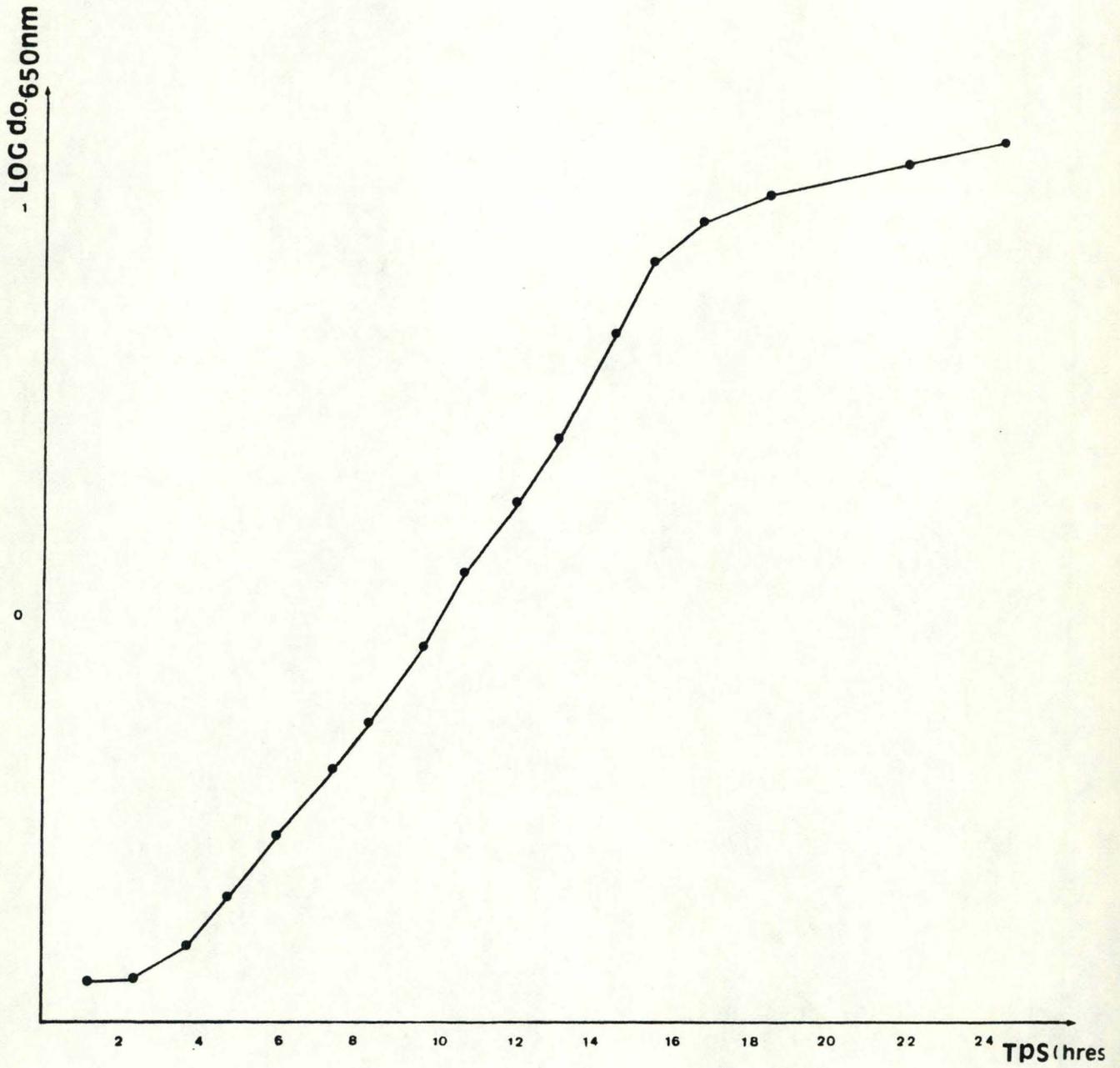


fig. 2 : Courbe de croissance de la souche F1100 à partir d'une culture inoculée dans un milieu complet.

Nous avons réalisé les courbes de croissance de la souche F1100 à partir de cultures inoculées dans les milieux SD (fig. 1) et YPD (fig. 2).

La souche montre une croissance plus rapide en milieu complet avec un temps de génération d'environ 90 minutes contre environ 130 minutes en milieu minimum.

On peut aisément estimer à chaque moment de la croissance le nombre de cellules présentes par ml de milieu, grâce à la droite d'étalonnage décrite dans "matériel et méthodes".

II. EXTRACTION DE L'ARN

Bjork et Kjellin ont démontré chez E. coli que les quantités d'ARN total diminuent alors que celles d'ARNt augmentent lorsqu'on extrait l'ARN d'une culture en phase stationnaire de croissance (86).

Il y a accumulation préférentielle d'ARNt. Par analogie, nous travaillons exclusivement en phase exponentielle de croissance.

II.1. Spectre UV de l'ARN total de levure

Après l'extraction phénolique de l'ARN (cf. Matériel et méthodes), celui-ci est relativement pur. Cela se vérifie en réalisant le spectre en UV du produit obtenu. Ce spectre correspond bien à celui de l'ARN avec un maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm (fig. 3).

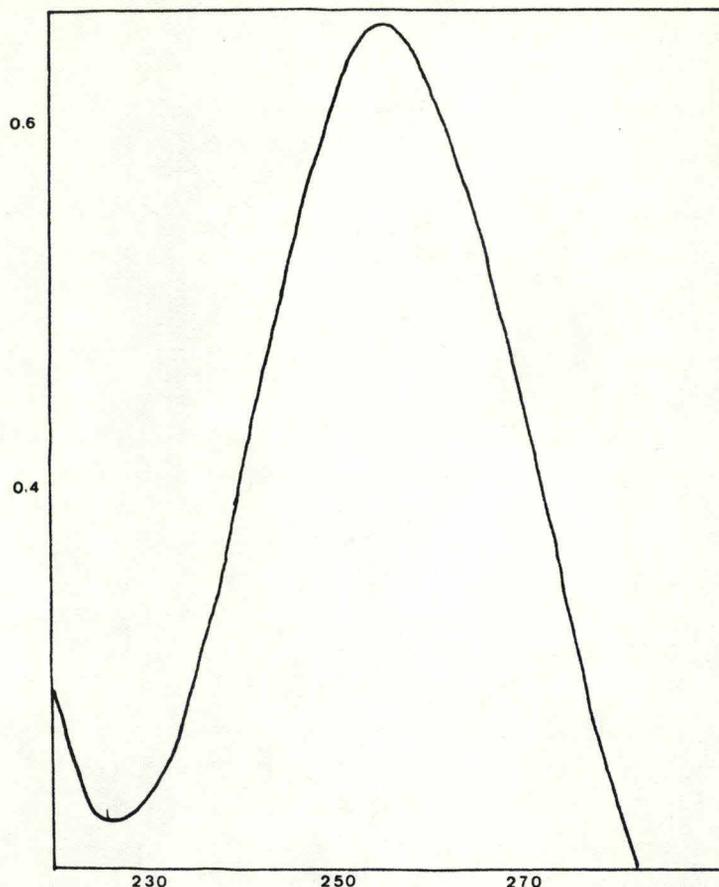


fig. 3 : Spectre UV de l'ARN total de levure

II.2. Rendement de l'extraction

Les quantités d'ARN extrait des cultures inoculées en milieu SD et YPD sont comparées. 5 cultures de 1 ml sont réalisées dans chacun des milieux. L'ARN est extrait dans la phase exponentielle de croissance, à une DO égale à 5.

Les quantités d'ARN extrait (en μg) sont reprises à la table I.

Table I.

milieu	quantité d'ARN extrait (μg) dans les cultures n°					moyennes
	1	2	3	4	5	
YPD <i>ypd</i>	90	100	100	130	110	106
SD <i>sd</i>	20	40	20	10	20	22

Les erreurs de mesure peuvent expliquer les variations des quantités d'ARN extrait dans les différentes cultures d'une même expérience.

Nous obtenons une nette différence entre les quantités d'ARN provenant des 2 types de culture. Le rendement est meilleur lorsque les cellules sont inoculées dans un milieu complet. Cela est probablement dû à l'état physiologique des cellules, qui diffère selon le milieu de culture.

Nous pensons qu'une des conséquences de la pauvreté du milieu SD peut être une synthèse moins active d'ARN.

III. MARQUAGE IN VIVO A LA [METHYL-³H] S-Ado.Met

Le marquage des cellules à la [méthyl-³H] S-Ado.Met requiert certaines conditions afin d'obtenir une incorporation optimale de marqueur. Ces conditions ont été étudiées par J.T. Murphy et K.D. Spence (87) chez la levure S. Cerevisiae.

L'entrée de la S-Ado.Met 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 température égales à 4,8 et 35° C.

Les milieux de culture que nous avons utilisés sont à pH 4,8 et les cultures poussent à 30° C, température pour laquelle le système de transport se trouve presque à son optimum d'activité (87).

Outre les propriétés propres au système de transport, d'autres facteurs influencent probablement le marquage de l'ARN.

Parmi ceux-ci se trouve la composition du milieu de culture; le milieu complet contient déjà de la S-Ado.Met non radioactive, ce qui conduit à une dilution du marqueur dans le milieu. Cette dilution n'a pas lieu dans un milieu minimum où il y a absence de S-Ado.Met non radioactive.

En comparant le marquage dans les 2 milieux nous essayons de montrer la répercussion de cette différence au niveau de la radioactivité spécifique (Rs) de l'ARN.

Par ailleurs, en nous basant sur le processus de marquage décrit dans le but du travail (cf. p. 38 fig. 25) nous pensons que la concentration du marqueur pourrait influencer le marquage des ARN au niveau quantitatif (c'est-à-dire augmenter la Rs des ARN en augmentant la concentration de [méthyl-³H] S-Ado.Met dans le milieu) et peut-être aussi qualitatif (c'est-à-dire par marquage préférentiel d'un type d'ARN ou d'un type de site de méthylation, localisé dans une des trois structures subcellulaires décrites précédemment).

En effet, l'incorporation de [méthyl-³H] S-Ado.Met modifie la Rs et la grandeur des trois pools subcellulaires de S-Ado.Met. Ces modifications sont peut-être différentes selon la localisation du pool et selon la concentration en marqueur et de ce fait influenceraient le marquage des ARN.

Afin d'éclaircir ce problème, nous effectuons les marquages dans 2 concentrations de [méthyl-³H] S-Ado.Met, à savoir 3 μ ci et 10 μ ci de marqueur par ml de milieu.

III.1. Marquages avec 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met par ml de milieu.

Une série de 5 cultures de 1 ml, marquées avec 3 μ ci de S-Ado.Met radioactive est réalisée en milieu complet (YPD) et minimum (SD). Les ARN sont extraits et leur Rs est mesurée (table II).

Table II

milieu de culture	Rs (cpm/ μ g) des cultures					
	1	2	3	4	5	moyenne
SD	814	1.023	1.750	765	2.616	1.394
YPD	463	457	811	569	628	586

Nous pensons que la variabilité des résultats dans une même expérience est due aux erreurs de mesure.

En effet, les quantités d'ARN que nous extrayons sont faibles et nous n'en prélevons qu'une partie pour faire nos mesures au spectrophotomètre. Il nous arrive donc de nous trouver au-delà des limites de résolution de l'appareil (cf. Matériel et méthodes p. 44.).

Les erreurs de prélèvement à la micropipette sont également à considérer. Une différence apparaît néanmoins clairement entre les ARN provenant des 2 milieux, le rapport de Rs (SD/YPD) est de 2,4 environ.

La dilution isotopique ayant lieu lorsque les cellules sont incubées en milieu YPD, exerce une influence défavorable sur le marquage en diminuant son intensité.

III.2. Marquage avec 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met par ml de milieu.

Dans cette expérience, nous réalisons des cultures de 2 ml marquées au moyen de 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado. Met par ml. Nous avons augmenté le volume des cultures afin, nous l'espérons, de diminuer les erreurs dues aux mesures. Deux cultures sont incubées dans chacun des milieux et les résultats obtenus après extraction de l'ARN sont repris en table III.

Table III.

Milieu	Rs (cpm/ μ g) des cultures n°		
	1	2	moyennes
SD	3.624	3.828	3.726
YPD	3.198	2.956	3.077

La différence de Rs entre les 2 milieux existe toujours mais elle est moindre que dans la première expérience, avec un rapport de Rs (SD/YPD) d'environ 1,2.

*rapport
Rapport $\frac{SD}{YPD} = 5,2$*

La S-Ado.Met non radioactive du milieu YPD et la [méthyl-³H] S-Ado.Met sont 2 molécules de structure identique utilisant le même système de transport actif. Seule, la concentration relative des 2 molécules dans le même milieu détermine l'efficacité de leur entrée. A 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met, contrairement à 3 μ ci, la concentration du marqueur doit probablement être très supérieure à celle de S-Ado.Met non radioactive car les résultats obtenus dans les 2 milieux sont presque semblables. Il est probable qu'à des concentrations très élevées en marqueur, les résultats obtenus dans les 2 milieux seraient encore plus proches car la quantité de S-Ado.Met non radioactive qui entrerait dans la cellule serait très faible.

Le passage de 3 μ ci à 10 μ ci de marqueur conduit à une augmentation de la Rs de l'ARN total quelque soit le milieu utilisé. Nous expliquons cela par une augmentation de la concentration de [méthyl-³H] S-Ado.Met dans les pools de S-Ado.Met endogènes et donc une diminution de la méthylation des ARN par la S-Ado.Met non radioactive. L'hypothèse d'une influence quantitative de la concentration de marqueur sur le marquage des ARN se vérifie. Afin de vérifier l'hypothèse d'une influence qualitative de la concentration de marqueur, nous allons séparer l'ARN total en ses 3 classes de taille et ce après l'avoir marqué avec 3 μ ci et 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met. Nous pourrons ainsi comparer le marquage des différents types d'ARN; après quoi nous analyserons le marquage des 2 types de site de méthylation sur une même molécule d'ARN.

IV. SEPARATION DES ARN

La centrifugation de zone permet de séparer l'ARN total en 3 classes de tailles différentes : la première classe,

4 à 5 S, renferme en majorité des ARNt, mais aussi des ARNr 5 S et 5,8 S et d'autres petits ARN.

La seconde classe renferme les ARNr 18 S et la dernière classe, les ARNr 28 S.

Une séparation nette des 3 pics peut être obtenue dans un gradient linéaire de sucrose 15%-30%.

Une séparation est réalisée à partir d'ARN total provenant de 2 cultures différentes, l'une contenant 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met par ml et l'autre en contenant 3 μ ci. Ces cultures sont inoculées en milieu complet. Nous obtenons bien les 3 pics représentant chacune des classes d'ARN (fig. 4)

Une mesure de la quantité d'ARN (μ g) recueillie pour chaque pic ainsi qu'une mesure de la radioactivité (cpm) sont réalisées. La Rs est mesurée pour chaque pic et dans les 2 conditions de culture, et rapportée à la table IV.

Celle-ci nous montre également les rapports de Rs entre les 2 expériences (10 μ ci/3 μ ci).

Table IV

[méthyl- ³ H]S-Ado.Met par ml de milieu (μ ci)	Rs (cpm/ μ g) des fractions		
	4-5 S	18 S	28 S
3	1.655	314	298
10	6.990	1.448	1.263
10/3	4,22	4,61	4,24

Nous remarquons que la Rs de la fraction 4-5 S est beaucoup plus élevée que celle des autres fractions et cela quelque soit la concentration en marqueur. Cela s'explique par le fait que les ARNt qui constituent cette fraction sont beaucoup plus méthylés (en Mol/Mol ARN) que les ARNr (40).

Rs 10 μ ci / 3 μ ci = 5,2

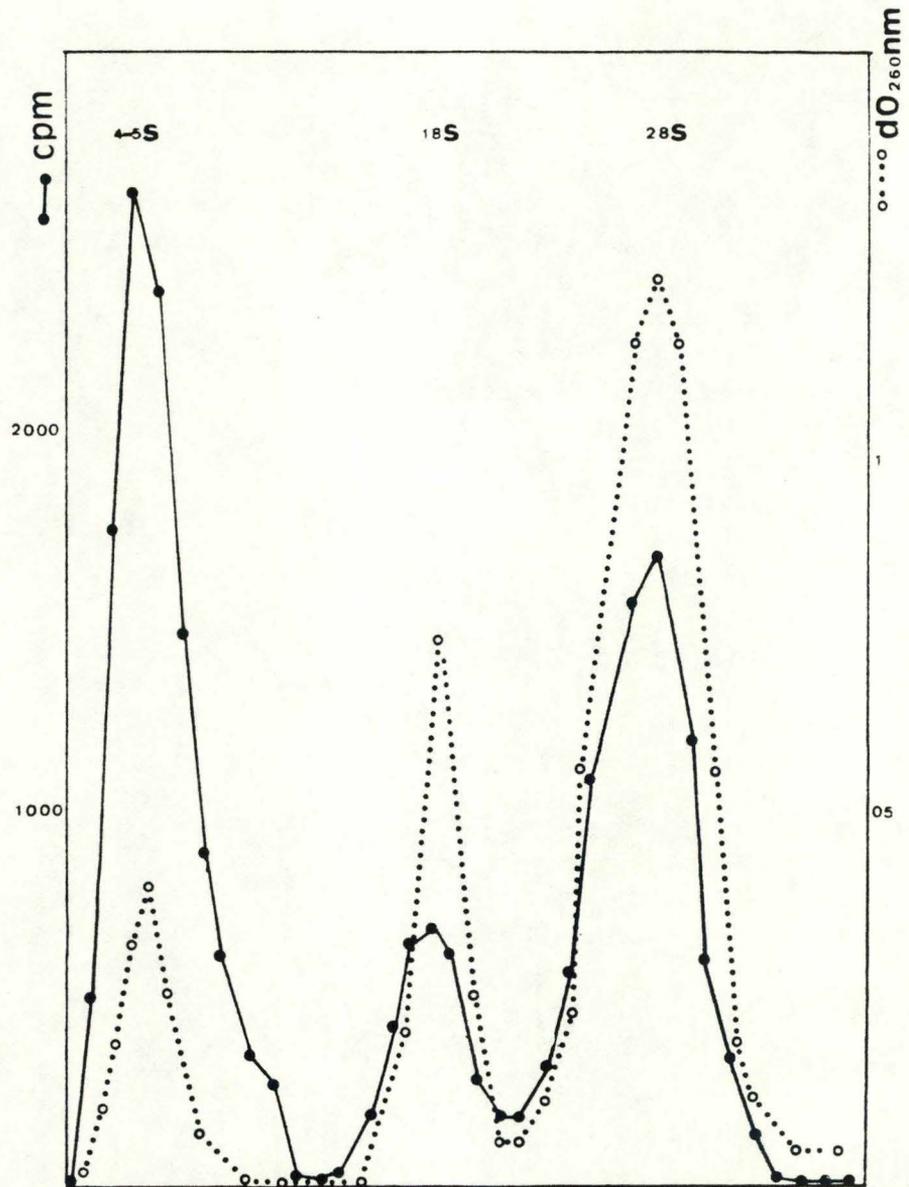


fig. 4 : Séparation de l'ARN total en ses 3 classes de tailles par gradient linéaire de sucrose 15% - 30%.

La part de la fraction 4-5 S représentée par les ARNr 5 S et 5,8 S n'intervient pratiquement pas dans les données car ces ARNr sont très peu ou pas méthylés (cf. Introduction p. 23).

Les résultats de la table IV nous montrent également que l'augmentation de la concentration en marqueur conduit à une augmentation générale et pratiquement identique de la Rs des 3 fractions.

Les erreurs de mesures (et particulièrement la mesure des quantités d'ARN dans chaque fraction) sont probablement la source des différences légères obtenues entre les rapports de Rs. Il apparaît donc que, dans ces conditions, la concentration du marqueur n'influence pas la qualité du marquage au niveau des différentes classes d'ARN (cf. Résultats p. 58) puisque le passage de 3 à 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met conduit à une augmentation de la Rs d'un facteur environ égal à 4,5 dans chaque fraction.

Nous analyserons ultérieurement l'influence de la concentration du marqueur sur le marquage des deux types de site de méthylation d'une même molécule d'ARN. Une séparation d'ARN total provenant d'une culture contenant 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met, inoculée dans un milieu minimum a également été réalisée. Nous y avons mesuré la Rs se rapportant à chaque fraction. Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus après marquage par 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met dans un milieu complet. Les rapports de Rs (SD/YPD) montrent une augmentation de la Rs de chaque fraction d'un facteur de 1,4 environ lors du passage d'un milieu complet à un milieu minimum. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment (p. 59).

V. ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE SUR LES
SITES DE METHYLATION.

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, les ARN sont méthylés sur 2 sites différents, à savoir sur les bases ou en 2'-O-ribose des nucléotides.

Il est possible d'analyser la distribution des groupements méthyls au niveau de chacun de ces deux sites par les techniques suivantes :

D'abord, l'ARN subit une hydrolyse alcaline au niveau des liaisons 5' phosphate.

Le groupement 2'-hydroxyle libre est alors impliqué dans la formation d'un intermédiaire de phosphate cyclique qui forme finalement un mélange de 2'- ou 3'- nucléotides (88) (fig. 5)

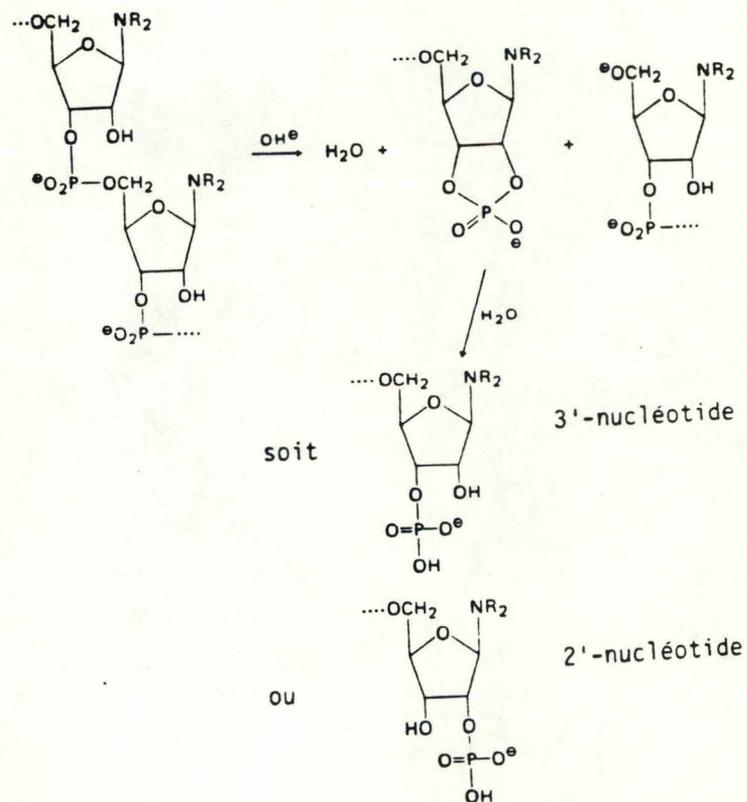


fig. 5 : L'hydrolyse alcaline de l'ARN conduit à la formation d'un intermédiaire cyclique qui forme finalement un mélange 2' ou 3'-nucléotides.

Une méthylation en 2'-O-ribose confère cependant aux ARN une stabilité contre cette hydrolyse alcaline en bloquant la position 2' du ribose et en empêchant la formation de l'intermédiaire cyclique.

Ce traitement alcalin clive donc l'ARN en mononucléotides (c'est-à-dire les nucléotides méthylés sur leur base ou non méthylés), en dinucléotides (si un nucléotide est méthylé en 2'-O-ribose), en trinucléotides (si 2 nucléotides adjacents sont méthylés en 2'-O-ribose).

Après l'hydrolyse alcaline, les oligonucléotides sont séparés par passage sur une colonne de chromatographie échangeuse d'ions en présence d'urée.

Ce procédé dépend uniquement des interactions ioniques entre les oligonucléotides et l'échangeur.

En effet, les forces d'interaction de type hydrophobes ou ponts hydrogènes sont éliminées par l'urée 7 M.

La séparation est donc fonction de la charge nette de l'oligonucléotide (88).

V.1. Analyse de l'ARN total

Les expériences suivantes visent à étudier l'influence de la concentration du marqueur sur le marquage des deux sites de méthylation, à savoir les bases et les riboses des nucléotides.

Une hydrolyse alcaline totale est réalisée sur une solution d'ARN total provenant d'une culture inoculée dans un milieu minimum contenant 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met par ml de milieu.

Avant passage de l'hydrolysate sur colonne, on vérifie le bon fonctionnement de celle-ci à l'aide d'un échantillon de poly A commercial hydrolysé partiellement (fig. 6).

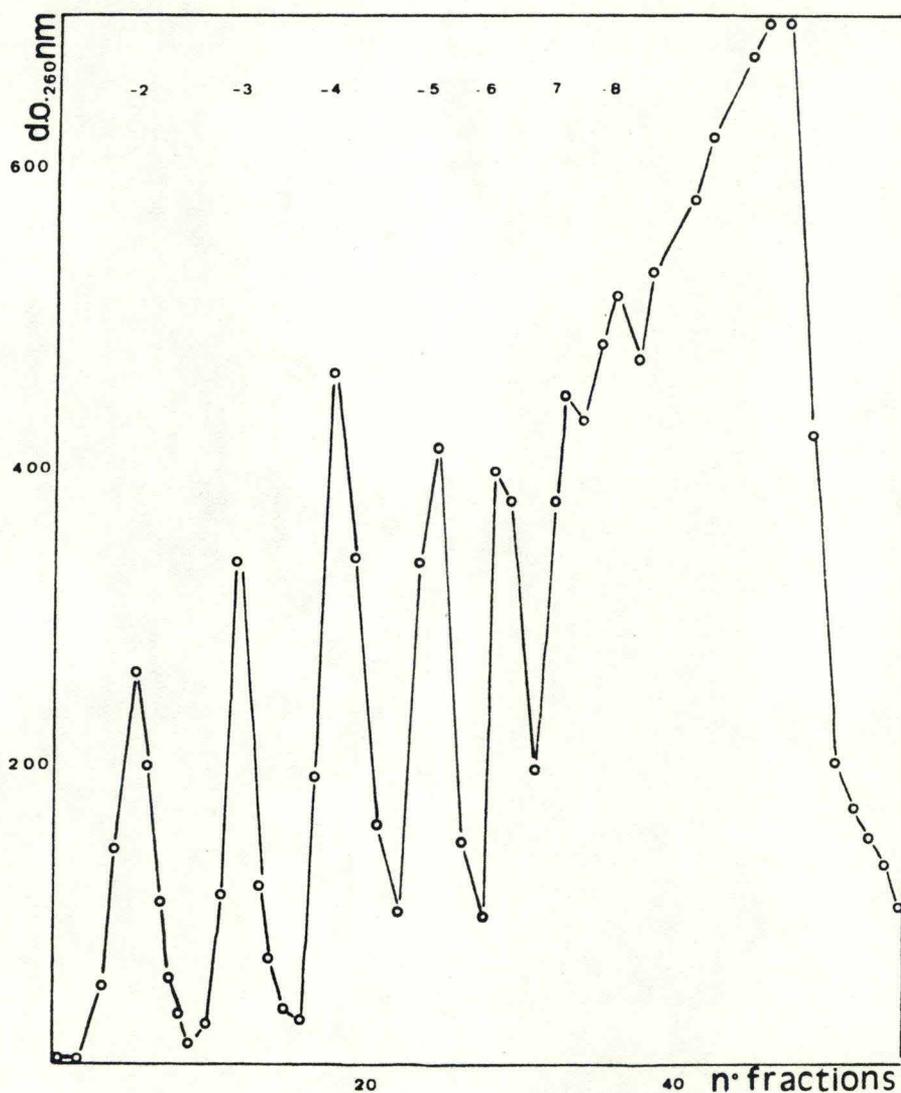


fig. 6 : Chromatographie d'un hydrolysat de poly A commercial; les n° -2 à -8 correspondent aux charges des différents oligonucléotides.

Nous obtenons une série de pics correspondant à des oligonucléotides de charges différentes : le premier pic est formé de mononucléotides (2^-), le second est formé de dinucléotides (3^-) etc...

L'hydrolysate d'ARN total est déposé sur la colonne en même temps qu'un marqueur de mononucléotides (AMP). La chromatographie est réalisée comme décrit dans la partie "Matériel et méthodes" (p. 50). La même expérience est réalisée avec de l'ARN total provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 10 μ ci de [méthyl- 3 H] S-Ado.Met par ml de milieu. La figure 7 a et b nous montre la distribution de la radioactivité après comptage des fractions dans les 2 expériences. Le positionnement du marqueur de mononucléotides, après mesure de la D.O. des fractions à une longueur d'onde de 260 nm, y est indiqué par une flèche.

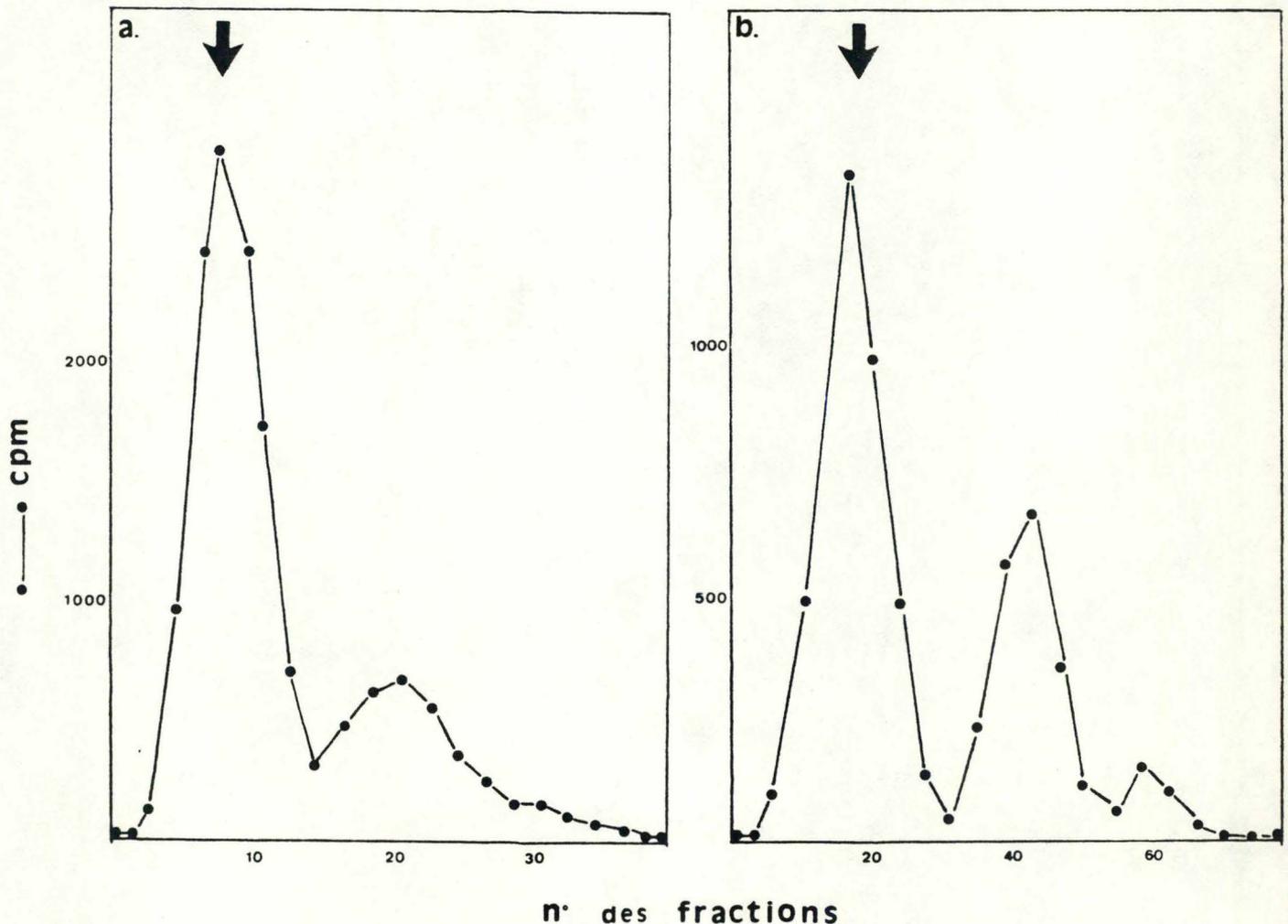


fig. 7 : Chromatographie d'un hydrolysate d'ARN total
 a. provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 3 μ ci de [méthyl- 3 H] S-Ado.Met par ml.
 b. provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 10 μ ci de [méthyl- 3 H] S-Ado.Met par ml.

La radioactivité se distribue en 2 pics. Le premier pic, plus important, correspond aux mononucléotides marqués sur leur base.

Le second pic correspond aux dinucléotides dont l'un est marqué en 2'-O-ribose.

On sait que l'ARNr 28 S est constitué d'une faible quantité de doubles 2'-O-méthylations (47). Cela devrait apparaître ici sous la forme d'un 3ème pic.

Celui-ci à peine visible dans la première expérience (3 μ ci marqueur) est mieux discerné dans la seconde expérience (10 μ ci marqueur) comme nous le montre la figure 7.

Nous avons calculé les pourcentages de radioactivité recueillis au niveau de chaque pic dans les 2 expériences (Table V).

Table V.	[méthyl- ³ H] S-Ado.Met (μ ci)	radioactivité (%)		
		pic I	pic II	pic III
	3	73	27	--
	10	58,5	35	6,5

Nous obtenons une diminution du marquage des bases d'environ 15% au profit du marquage des riboses lors de l'utilisation de 10 μ ci de [méthyl-³H]S-Ado.Met au lieu de 3 μ ci.

Les conditions de faible concentration en [méthyl-³H] S-Ado. Met entraînent-elles vraiment une préférence de marquage sur les bases par rapport au marquage sur les sucres dans les 3 classes d'ARN ?

Nous résolvons ce problème en analysant la distribution de la radioactivité (base-sucres) au niveau de chaque classe d'ARN, et ce dans les 2 conditions de marquage.

V.2. Analyse des différentes classes d'ARN

a. Analyse de la fraction 4-5 S

Nous avons hydrolysé et chromatographié les fractions 4-5 S provenant de cultures inoculées dans un milieu minimum contenant 10 μ ci ou 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado. Met par ml. Les résultats de ces expériences sont représentés à la figure 8 a et b.

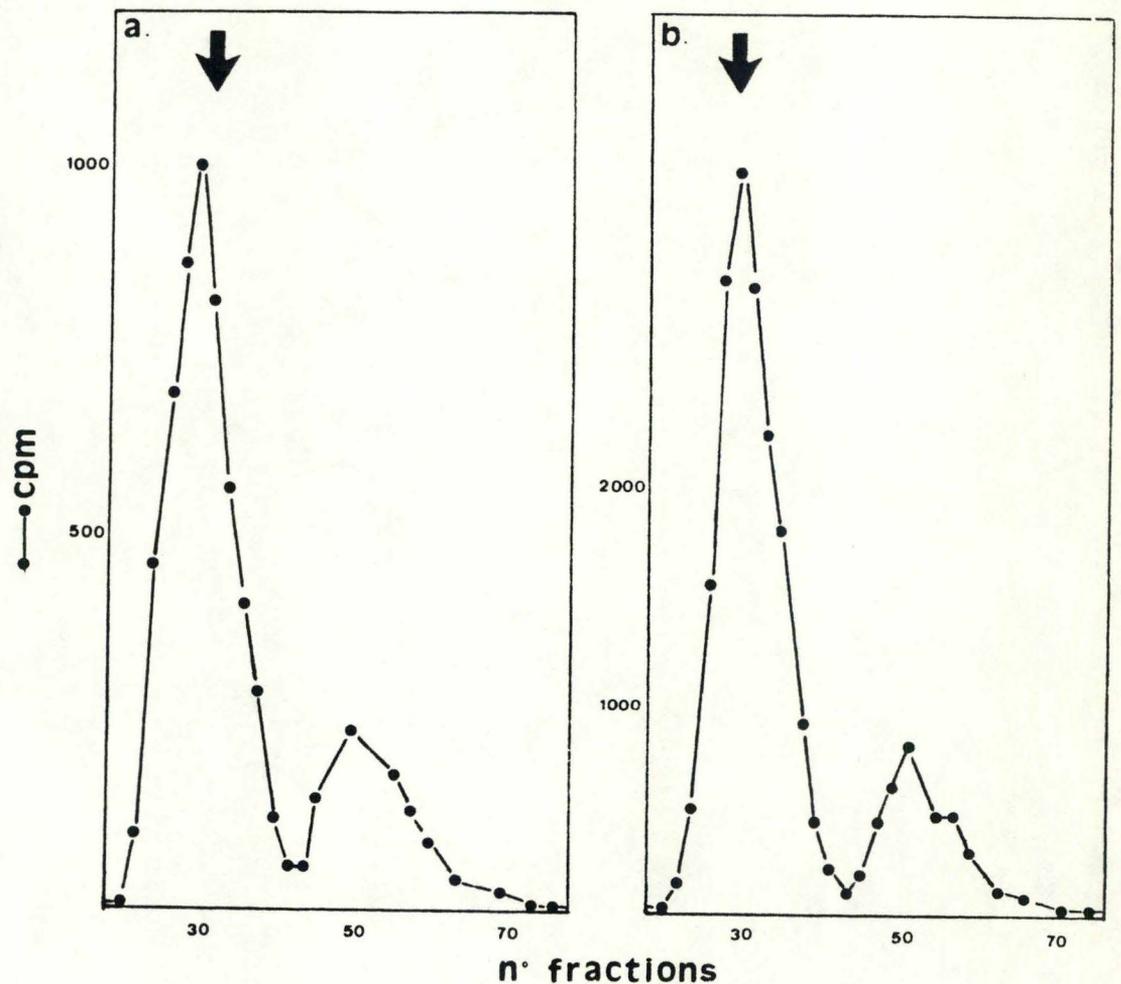


fig. 8 : Chromatographie d'un hydrolysate d'une fraction 4-5 S

- provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado. Met par ml.
- provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 10 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado. Met par ml.

La radioactivité se distribue en 2 pics. Le premier correspond aux mononucléotides marqués et le second aux dinucléotides marqués.

Les rapports de radioactivité (en %) sont calculés dans les 2 expériences (Table VI).

Table VI

[méthyl- ³ H] S-Ado.Met (μ ci)	Radioactivité (%)	
	pic I	pic II
3	75	25
10	74,8	25,2

Cette distribution se répète dans toutes nos expériences. Nous concluons que la concentration du marqueur n'influence pas le marquage de la fraction 4-5 S au niveau du rapport "base-sucre".

b. Analyse de la fraction 18 S

L'ARN 18 S, après centrifugation de zone d'une solution d'ARN total, se retrouve entre les fractions 4-5 S et 28 S dans le gradient de sucrose 15%-30%. Cet ARNr 18 S extrait de cultures inoculées en milieu minimum en présence de 10 μ ci ou 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met, est hydrolysé et chromatographié. La figure 9 a et b nous montre que la radioactivité se distribue en 2 pics; le premier correspondant aux nucléotides méthylés sur les bases, le second, aux nucléotides en 2'-O-ribose.

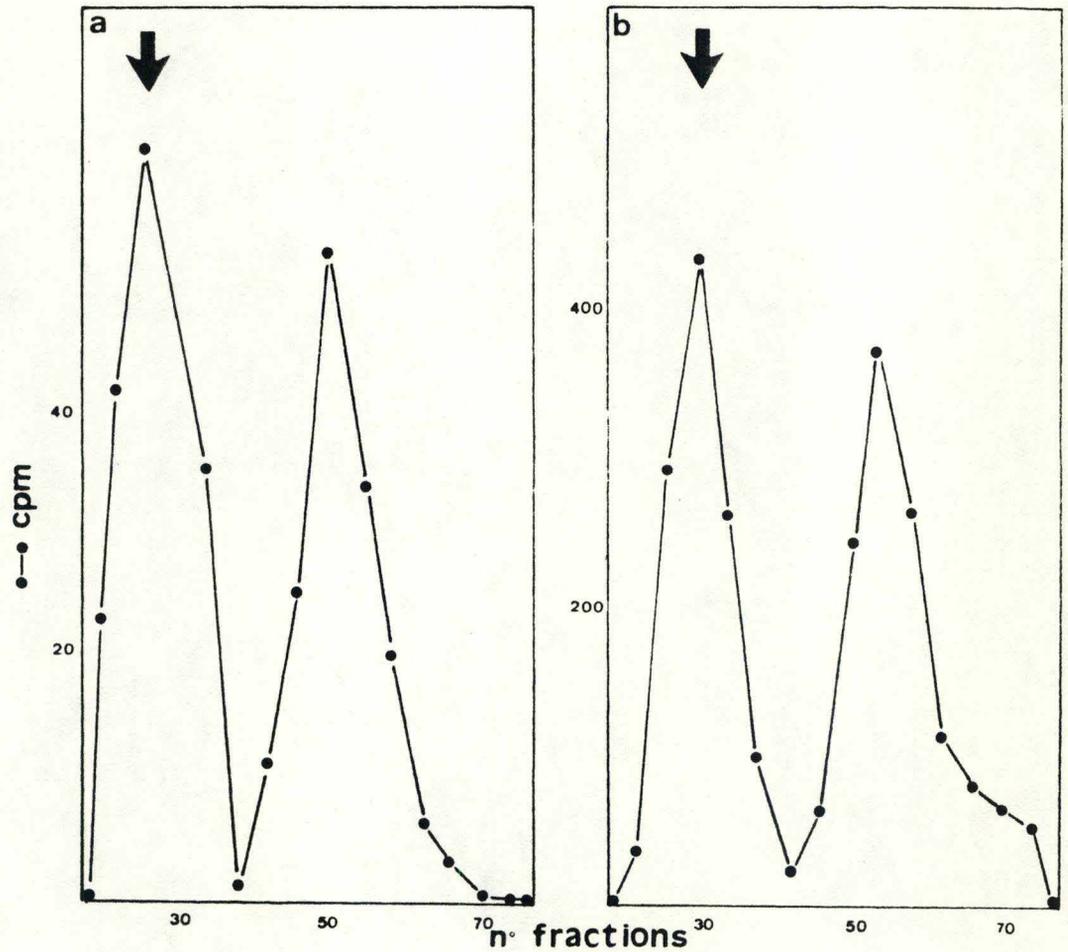


fig. 9 : Chromatographie d'un hydrolysate d'une fraction 18 S

- a. provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 3 μ ci de [méthyl-³H]S-Ado.Met par ml.
- b. provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 10 μ ci de [méthyl-³H]S-Ado.Met par ml.

Les rapports de radioactivité sont calculés dans les 2 expériences (table VII).

Table VII

[méthyl- ³ H] S-Ado.Met (μ ci)	Radioactivité (%)	
	pic I	pic II
3	42	58
10	46	54

Nous récoltons entre 40 et 45% de radioactivité au niveau du premier pic et entre 55 et 60% de radioactivité au niveau du 2ème pic.

Cette distribution se répète dans toutes nos expériences. Nous concluons que la concentration du marqueur n'influence pas le marquage de la fraction 18 S au niveau du rapport "base-sucré".

Nous comparerons ultérieurement ces résultats avec ceux obtenus par d'autres laboratoires après marquage à la méthionine radioactive (cf. Discussion p. 77).

c. Analyse de la fraction 28 S.

La fraction 28 S provenant de cultures inoculées en milieu minimum en présence de 10 μ ci ou 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met est également hydrolysée et chromatographiée. Les résultats obtenus nous montrent une distribution de la radioactivité au niveau de 3 pics bien distincts (fig. 10 a et b).

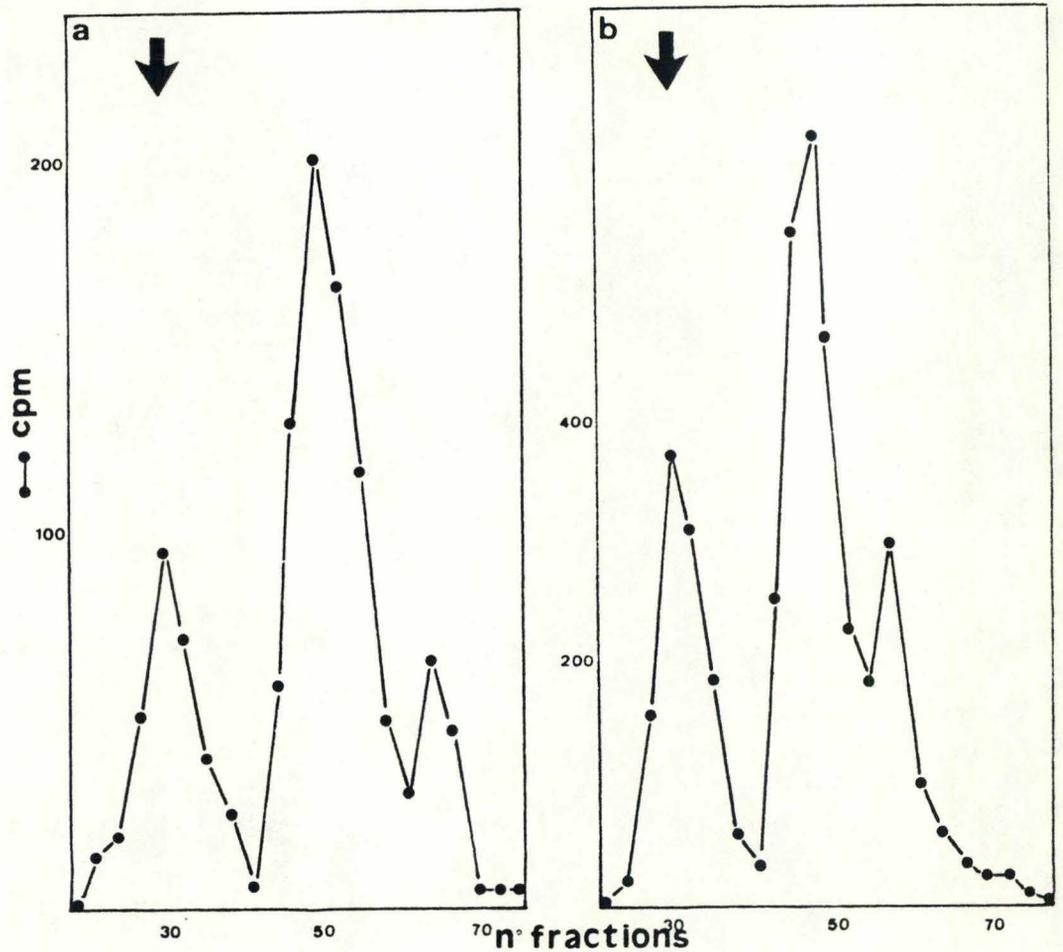


fig. 10 : Chromatographie d'un hydrolysate d'une fraction 28 S
 a. provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 3 µci de [méthyl-³H]S-Ado.Met par ml.
 b. provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 10 µci de [méthyl-³H]S-Ado.Met par ml.

Le premier pic, localisé au niveau du marqueur de mono-nucléotides, correspond bien aux nucléotides méthylés sur leur base. Le second pic correspond aux nucléotides méthylés en 2'-O-ribose. Le troisième pic est constitué de trinucleotides et correspond aux 2'-O-méthylations

adjacentes.

Les rapports de radioactivité sont calculés dans les 2 types d'expérience. (table VIII).

Table VIII

[méthyl- ³ H] S-Ado.Met (µci)	Radioactivité (%)		
	pic I	pic II	pic III
3	26,2	51,3	17,6
10	27,8	55	12,7

Nous obtenons environ 30% de radioactivité au niveau des méthylations de base et 70% au niveau des 2'-O-méthylations. Ces résultats se répètent dans toutes nos expériences.

Nous concluons que la concentration du marqueur n'influence pas le marquage de la fraction 28 S au niveau du rapport "base-sucre".

Nous comparerons ultérieurement cette distribution avec les résultats obtenus par d'autres laboratoires après marquage à la méthionine radioactive (cf. discussion p. 77).

V.3. Expériences complémentaires

L'analyse de l'ARN total montre qu'une diminution du marquage des bases (d'environ 15%) se produit lorsqu'on utilise 10 µci au lieu de 3 µci de marqueur (cf. résultats V.1. p. 68). Ce sont les seuls résultats en faveur d'une influence "qualitative" de la concentration de [méthyl-³H] S-Ado.Met sur le marquage des ARN.

Il nous paraît dès lors intéressant de confirmer la valeur de ces résultats au moyen d'autres expériences. Un calcul simple permet de vérifier les résultats obtenus après hydrolyse et chromatographie de l'ARN total provenant d'une culture inoculée dans un milieu

minimum avec 10 μ ci de ³²P parqueur par ml : d'une part, nous connaissons la distribution de la radioactivité au niveau de chaque fraction grâce à la séparation de cet ARN total (cf. Résultats p. 63); nous obtenons 55,5% de radioactivité pour la fraction 4-5 S, 13,6% pour la fraction 18 S et 30,9% pour la fraction 28 S. D'autre part nous connaissons le rapport de radioactivité "base-sucre" dans chaque fraction (cf. Résultat V.2. p. 69).

Nous pouvons donc connaître le rapport de radioactivité "base-sucre" dans l'ARN total et comparer ce rapport à celui obtenu par la mesure directe (Table IX).

Table IX

Mesure	Radioactivité (%)	
	base	sucre
directe	58,5	41,5
indirecte	57	43

Nous concluons que la mesure indirecte confirme la mesure directe ainsi que la juste valeur de ces résultats.

Nous ne pouvons pas suivre la même démarche pour l'ARN total provenant d'une culture inoculée en milieu minimum avec 3 μ ci de marqueur par ml.

En effet cet ARN n'a pas été séparé en ses classes de différentes tailles.

Afin néanmoins de vérifier les résultats obtenus après hydrolyse et chromatographie de cet ARN, nous avons utilisé une autre méthode d'hydrolyse, à savoir l'hydrolyse enzymatique. Celle-ci est réalisée par une ribonucléase, la T2, qui clive également les liaisons 5'-phosphates et forme un intermédiaire de phosphate cyclique.

Les résultats obtenus après une telle hydrolyse doivent donc être identiques à ceux obtenus après hydrolyse alcaline. Après hydrolyse enzymatique et chromatographie de l'ARN extrait d'une culture inoculée en présence de 3 μ ci de marqueur, nous avons analysé la répartition de la radioactivité au niveau de chaque pic. Nous obtenons 73% de radioactivité au niveau du premier pic et 23% au niveau du second pic, soit des valeurs identiques à celles obtenues après hydrolyse alcaline (cf. Résultats, table V. p. 68). Nous obtenons également les mêmes résultats lorsque l'hydrolyse alcaline est réalisée pendant 40 heures au lieu de 18 heures.

Bien que les 2 hydrolyses alcalines et l'hydrolyse enzymatique nous donnent les mêmes résultats, ces méthodes ne confirment pas de manière absolue la juste valeur de nos résultats. C'est pourquoi, nous tiendrons compte de cette incertitude par la suite (cf. Discussion).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous approchons dans ce mémoire l'étude de la méthylation des ARN par une démarche originale qui est le marquage in vivo à la [méthyl-³H] S-Ado.Met.

L'existence d'un système de transport actif de S-Ado.Met dans les cellules de levure rend ce marquage possible (87). Les expériences réalisées mettent en évidence le marquage de 3 classes d'ARN et des 2 sites de méthylation (base-ribose). D'autres laboratoires ont réalisé cette étude en utilisant la méthionine radioactive comme marqueur.

Nous sommes intrigués par les résultats qu'ils obtiennent. Nous pouvons résumer ces résultats en nous référant aux travaux réalisés par deux groupes de chercheurs.

Il s'agit du groupe de J. Klootwijk qui travaille sur la levure S.Carlsbergensis (50) et de M. Klagsbrun qui travaille sur la levure S.cerevisiae (45).

Ils extraient les ARNr 18 S et 28 S à partir de cultures marquées à la [méthyl-¹⁴C] méthionine, les hydrolysent et les chromatographient.

Les rapports de radioactivité "base-sucre" qu'ils obtiennent sont repris à la table I.

Table I :

site de méthylation	groupe J. Klootwijk radioactivité (%)		groupe M. Klagsbrun radioactivité (%)	
	18 S	28 S	18 S	28 S
base	25	14	61,8	36
ribose	75	86	26,8	49,3

Les résultats obtenus par les 2 groupes ne concordent pas. Ceux obtenus par le groupe de J. Klootwijk sont en accord avec les résultats de la plupart des laboratoires.

La tendance qu'ils dessinent est l'existence d'une majorité de 2'-O-méthylations (environ 80%) par rapport à une faible quantité de méthylation de base (environ 20%) dans les ARNr 18 S et 28 S.

Cependant d'autres laboratoires dont celui de M. Klagsbrun ont des résultats en faveur d'un pourcentage moins élevé de 2'-O-méthylations, soit environ 50% dans l'ARNr 28 S et 20% dans l'ARNr 18 S.

Tous les scientifiques sont néanmoins d'accord sur le fait que les 2'-O-méthylations ont fortement augmenté au cours de l'évolution.

Une approche différente de la méthylation des ARNr par un marquage à la [méthyl-³H] S-Ado.Met peut peut-être aider à comprendre le pourquoi de ces divergences.

L'utilisation de la S-Ado.Met radioactive montre certains avantages que nous avons décrits précédemment (cf. But du travail p. 36).

L'efficacité d'un tel marquage in vivo dépend de différents facteurs parmi lesquels se trouvent la composition du milieu de culture, la concentration du marqueur dans ce milieu, sa pénétration dans la cellule, la grandeur et l'activité spécifique des pools subcellulaires de S-Ado.Met, l'affinité des différents enzymes intervenant dans le processus etc... Ces facteurs, loin d'être constants, sont fonction des conditions expérimentales et du type cellulaire. Dans notre cas, le type cellulaire ne varie pas; nous utilisons la même souche de levure S. cerevisiae dans toutes nos expériences.

Nous avons comparé dans ce travail l'efficacité du marquage dans différentes conditions expérimentales.

La plupart des résultats ont été discutés précédemment, cependant nous devons encore éclaircir les résultats obtenus après hydrolyse et chromatographie de l'ARN total (cf. Résultats V.1. p. 65 et V.3. p. 74).

Ils nous montrent une diminution de marquage des bases de 15% lors de l'utilisation de 10 μ ci au lieu de 3 μ ci de marqueur. Comme nous l'avons montré par la suite, cette diminution n'est pas due à un marquage préférentiel des bases à 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met (cf. Résultats V.2. p. 69). En effet, le rapport de radioactivité "base-sucre" dans chaque classe d'ARN est identique quelque soit la concentration en marqueur utilisée.

En réalité, nous pouvons expliquer ces résultats de 2 manières : l'augmentation de la concentration en marqueur dans un milieu minimum pourrait affecter différemment le marquage des 3 classes d'ARN (contrairement au milieu complet où la concentration du marqueur n'exerce aucune influence à ce niveau, cf. Résultats IV p.63); il est possible qu'un marquage préférentiel des ARNt se produise à faible concentration en marqueur et que étant donné la proportion très importante de méthylation de base, cette préférence ne se perçoive clairement qu'au niveau du pic de mononucléotides.

La plupart des méthylations d'ARNr ont lieu sur la molécule précurseur, au niveau du noyau et même dans le nucléole. Dans le cas de l'ARNt, les méthylations semblent être plus tardives; le précurseur d'ARNt n'est jamais méthylé (89). Cette longue molécule est d'abord émondée et ce n'est que lorsque sa structure tridimensionnelle est bien établie que les méthylases agissent (40). La majorité des méthylations a donc probablement lieu dans le cytoplasme.

Bien que le marquage dure plusieurs générations, nous pensons que ces localisations nucléaires et cytoplasmiques des sites de méthylation pourraient influencer le marquage en faveur des ARNt dans des conditions de faibles concentrations en marqueur.

La seconde explication est beaucoup plus simple. N'ayant pas pu confirmer de manière absolue les résultats obtenus après hydrolyse de l'ARN total extrait d'une culture inoculée en milieu minimum avec 3 μ ci de [méthyl-³H] S-Ado.Met par

ml, il est possible que ces résultats surestiment le pourcentage de radioactivité obtenu au niveau du pic de mononucléotides. Il serait intéressant de vérifier la valeur de ces résultats en séparant l'ARN_r en ses 3 classes de taille (cf. Résultats VI.3. p.74).

Nous avons étudié la distribution de la radioactivité au niveau des pics de mono, di, trinucleotides. Les résultats que nous obtenons ne confirment pas les données de la littérature. Nous avons un rapport de 70% de 2'-O-méthyls pour 30% de méthylations de base dans l'ARN_r 28 S et un rapport de 55 à 60% de 2'-O-méthyls pour 40-45% de méthylations de base dans l'ARN_r 18 S. En nous référant aux données de la table I, nous nous situons entre les 2 tendances.

Nous pouvons peut-être éclaircir le pourquoi de ces divergences en comparant nos expériences à celles réalisées par les 2 autres groupes.

- Le choix de l'organisme ne peut pas être considéré ici comme étant la cause de ces divergences. Les 2 espèces de levures (S. cerevisiae et S. carlsbergensis qui sont comparées sont des organismes trop proches ~~que~~ pour montrer des divergences évolutives aussi importantes.
- Le choix du marqueur pourrait être une des raisons de l'existence de différences entre nos résultats et ceux donnés par la littérature. La durée du marquage diffère dans les trois groupes : nous marquons pendant 8 à 10 générations, le groupe de J. Klotwijck marque pendant 1 ou 2 générations, le groupe de M. Klagsbrun pendant seulement une génération.

Après une ou deux générations, la quantité d'ARN néoformé en présence de marqueur est faible. La radioactivité des

ARN provenant de ces cultures ne reflète peut-être pas la réalité. Il est possible également qu'en une génération, la radioactivité ne se distribue pas correctement dans tous les pools subcellulaires de S-Ado.Met, ce qui défavoriserait le marquage de certains ARN ou de certains sites de méthylation.

- La fraction 18 S se trouve entre les fractions 4-5 S et 28 S dans le gradient de sucrose. Cette localisation pourrait induire une contamination de la fraction 18 S par la fraction 4-5 S. Dans ce cas, même une très faible quantité de 4-5 S, très riche en méthylations de base, pourrait moduler les résultats obtenus après hydrolyse et chromatographie de l'ARNr supposé 18 S. Cette hypothèse de contamination s'applique à nos expériences mais également aux expériences réalisées par les 2 autres groupes qui ont aussi utilisé cette technique pour séparer leurs ARN.

Néanmoins une expérience simple permettrait de tester la valeur des résultats : il suffirait de supprimer la fraction 4-5 S et cela par isolement des ribosomes et extraction des ARNr 28 S et 18 S.

Après la séparation des ARN, nous les avons hydrolysés et chromatographiés sur colonne de DEAE-cellulose en présence d'urée. Cela nous a permis de connaître la distribution globale des groupements méthyls.

Les groupes de J. Klootwijk et M. Klagsbrun ont affiné leurs résultats en réalisant une chromatographie en 2 dimensions sur papier de l'hydrolysate d'ARN.

Cela leur a permis de voir quels nucléotides sont méthylés, et de quel type de méthylation il s'agit. Ils ont déterminé cela en localisant chaque tache de radioactivité par rapport à des nucléotides standards. En recueillant et en comptant la radioactivité des taches, ils ont pu déterminer

le nombre de chaque type de nucléotides méthylés par molécule d'ARN. Les résultats obtenus par les 2 types de chromatographie concordent parfaitement.

Nous citons à titre d'exemple les résultats obtenus par le groupe de J. Klotwijk (Table II)

Table II :

Nucléosides	ARNr 28 S		ARNr 18 S	
	[¹⁴ C] méthyls chromato %	[¹⁴ C] méthyls papier chromat DEAE %	[¹⁴ C] méthyls chromato %	[¹⁴ C] méthyls papier Chromato DEAE %
Am	27,1		32,9	
Gm	23,5		21,2	
Cm	16,7		12,2	
Um	18,1		9,2	
TOTAL	85,4	86	75,5	75
m ⁵ C	5,0			
m ³ U	5,1			
m ² A + m ⁶ A	4,5			
m ⁶ A	---		15,9	
m ⁷ G	---		3,9	
mC	---		3,7	
TOTAL	14,6	25	23,5	25

Cependant les résultats obtenus dans les 2 groupes par la chromatographie sur papier ne concordent pas.

Néanmoins nous pensons qu'il serait intéressant de réaliser cette expérience après marquage à la S-Ado.Met afin de localiser plus précisément les groupements méthyls et de comparer ces résultats à ceux obtenus par les autres laboratoires.

Nos résultats sont basés sur une extraction d'ARN total de levure. Celui-ci renferme donc une certaine quantité d'ARN mitochondrial. Comme nous l'avons vu, les ARNr mitochondriaux sont très peu méthylés (cf. Introduction p. 21). L'ARNr 21 S possède seulement 2 groupements méthyles sur sa molécule et l'ARNr 15 S n'en possède pas (80). Nous pensons donc qu'une telle contamination ne peut influencer nos résultats excepté peut-être dans les mesures nettes de Rs. C'est pourquoi il serait intéressant de réaliser les expériences suivantes, afin de rectifier nos valeurs de Rs : certaines souches de levure sont déficientes dans la synthèse d'ARN mitochondrial (souche Rh^o). On pourrait donc en extraire les ARN et les analyser afin de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus à partir de souches sauvages.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

1. Liljas, A. (1982) *Biophys. Mol. Biol.*, 40, 160.
2. Schwarz, Z., & Kössel, H. (1980) *Nature*, 283, 739.
3. Eperon, I.C., Anderson, G., & Nierlich, D.P. (1980) *Nature*, 286, 460.
4. Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B., & Ebel J.P. (1978) *Febs Lett.*, 94, 399.
5. Salim, M., & Maden, B.E.H. (1981) *Nature*, 291, 205.
6. Noller, H.F., & Woex, C.R. (1981) *Science*, 212, 403.
7. Perry, R.P. (1976) *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 605.
8. Stiegler, P., Carbon, P., Ebel, J.P., & Ehresmann, C. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 120, 487.
9. Noller, H.F., in *Ribosomes : structures, fonctions and genetics*, edited by Chamblin, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahem, L., & Nomura, M. (1980) p. 3.
10. Zimmermann, R.A., in *Ribosomes : structures, fonctions and genetics*, edited by Chamblin, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., & Nomura, M. (1980) p. 135.
11. Brosius, J., Dull, T.J., & Noller, H.F. (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 77, 201.
12. Edwards, K., & Kössel, H. (1981) *Nucl. Acid. Res.*, 9, 2.853.
13. Branlant, C., Krol, A., Machatt, M.A., Pouget, J., & Ebel, J.P. (1981) *Nucl. Acid. Res.*, 9, 4303.
14. Brimacombe, R., Stöffler, G., Wittmann, H.G. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 217.
15. Fox, G.E., & Woex, C.R. (1975) *Nature*, 256, 505.
16. Garrett, R.A., Douthwaite, S., & Noller, H.F. (1981) *Trends Biochem. Sci.*, 6, 137.
17. Rhöl, R. (1982) *Biochem. Int.*, 5, 7.
18. Ursi, D., Vandenbergh, A., & Dewachter, R. (1983) *Nucl. Acid. Res.*, 11, 8111.

19. Liu, W., Lo, A.G., & Nazar, R.N. (1983) *J. Mol. Biol.*, 171, 217.
20. Shine, J., & Dalgarno, L. (1975) *Nature*, 254, 34.
21. Steitz, J.A., (1980) *Ribosomes : structures, functions and genetics*, edited by Chamblin, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., & Nomura, M. 479.
22. Ofengand, J., Gornicki, P., Chakraborty, K., & Nune, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 80, 137.
23. Cundliffe, E. (1980) in *Ribosomes : structures, functions and genetics*, edited by Chamblin, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., & Nomura, M. 555.
24. Bell, G.I., Degennaro, L.J., Gelfand, D.H., Bishop, R.J., Valurzuela, P., & Rutter, W.H. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 8118.
25. Sirlin, J.L. (1972) *Biology of RNA*, 4, 188. Academic Press.
26. Hadjiolov, A.A. (1980) *Subcellular Biochemistry*, edited by Roodyn D.B., 7, chap. 1, 1.
27. Dalgarns, L., & Shine J. *The ribonucleic Acids*, edited by Stewart, P.R., & Lethan, D.S. 6 107.
28. Lewin, B. (1983) in *Genes*, edited by Wiley, chap. 23, 365.
29. Valenzuela, P., Bell, G.L., Venegas, A., Sewell, E.T., Masiarz, F.K., Degennaro, L.J., Weinberg, F., & Rutter, W.J. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 8126.
30. Torczynski, R., Bollon, A.P., & Fuke, M. (1983) *Nucl. Acid. Res.*, 11, 4879.
31. Rubtov, P.M., Musakhanov, M.M., Zakhargev, V.M., Kragev, A.S., Skryabin, K.G., & Bayev A.A. (1980) *Nucl. Acid. Res.*, 8, 5779.
32. Torczynski, R., Bollon, A.P., & Fuke, M. (1983) *Mol. Gen. Genet.*, 191, 427.
33. Sor, F., & Fukuhara, H. (1983) *Nucl. Acid. Res.*, 11, 339.
34. Bielka, H., Welfle, H., Stahl, J., Bommer, V.A., Noll, F., Westermann, P. (1982) in *The eukaryotic ribosome*, edited by Bielka, H., chap. 6, 85.
35. Nomura, M., & Post, L.E. (1980) in *Ribosomes : structures, functions and genetics*, edited by Chamblin, G., Graven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., & Nomura, M., 671.

36. Lewin, B. (1983) in *Genes*, edited by Wiley, chap. 10, 165.
37. Perry, R.P. (1976) in *Processing of RNA*, edited by Meister and Pate, 605.
38. Steitz, J.A., Ginsburg, D., Garwin, J.L., & Goldberg, D.A. (1975) in *Control of ribosomes synthesis*, Academic Press (New York), chap. 4, 173.
39. Nomura, M. (1984) *Sci. Amer.*, 250, 72.
40. Bjork, R. (1984) in *Processing of RNA* edited by Apirion, chap. 11, 292.
41. Levis, R., & Penman, S. (1978) *J. Mol. Biol.*, 121, 219.
42. Garrett, R.A., & Olesen, S.O. (1982) *Biochemistry - USA*, 21, 4823.
43. Brand, R.C., Klootwijk, J., Sibun, C.P., & Planta, R.J. (1979) *Nucl. Acid. Res.*, 7, 121.
44. Brand, R.C., Klootwijk, J., Planta, R.J., & Maden, B.E.H. (1978) *Biochem. J.*, 169, 71.
45. Klagsbrun, M. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2512.
46. Retel, J., Van Den Bos, R.C., & Planta, R.J. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, 195, 370.
47. Brand, R.C., Klootwijk, J., Van Steenberg, T.J.M., Dekok, A.J., & Planta, R.J. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 75, 311.
48. Isaksson, L.A., & Phillips, J.M. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, 155, 63.
49. Maden, B.E.H., & Salim, M. (1974) *J. Mol. Biol.*, 88, 133.
50. Klootwijk, J., & Planta, R.J. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 39, 325.
51. Maden, B.E.H. (1980) *Nature*, 288, 293.
52. Vancharldorp, R., Van Knippenberg, P.H. (1982) *Nucl. Acid. Res.*, 10, 1149.
53. Isaksson, L.A. (1973) *Biochem. Biophys. Acta*, 312, 122.
54. Isaksson, L.A. (1973) *Biochem. Biophys. Acta*, 312, 134.
55. Andresson, O.S., & Davies, J.E. (1980) *Mol. Gen. Genet.*, 179, 217.

56. Isaksson, L.A. (1973) *Biochem. Biophys. Acta*, 312, 140.
57. Bjork, G.R., & Isaksson, L.A. (1970) *J. Mol. Biol.*, 51, 83.
58. Chelbi-Alix, M.K., Expert-Bezançon, A., Hayes, F. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 115, 627.
59. Caboche, M., & Bachellerie, J.R. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 74, 19.
60. Vaughan, M.H., Soliro, R., Warner, J.R., & Darnell, J.E. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 58, 1527.
61. Van Charldorp, R., Van Kimmenade, A.M.A., & Van Knippenberg, P.H. (1981) *Nucl. Acid. Res.*, 9, 4909.
62. Poldermans, B., Goosen, N., Van Knippenberg, P.H. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 9085.
63. Van Charldorp, R., Van Knippenberg, P.H. (1981) *Nucl. Acid. Res.*, 9, 266.
64. Van Charldorp, R., Hens, H.A., & Van Knippenberg, P.H. (1981) *Nucl. Acid. Res.*, 9, 4422.
65. Igaraski, K., Kashiwagi, K., Kishida, K., Watanabe, Y, Kogo, A., Hirox, S. (1979) *Eur. J. Biochem.*, 93, 345.
66. Igarashi, K., Kishida, K., Hirox, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96, 678.
67. Igarashi, K., Kishida, K., Hirox, S., Kashiwagi, K., Tatokero, I., Kakegawa, T. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 113, 587.
68. Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kishida, K., Kakegawa, T., Hirox, S. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 114, 127.
69. Poldermans, B., Van Buul, C., & Van Knippenberg, P.H. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 9090.
70. Garrett, R. (1983) *Trends Biochem. Sci.*, 8, 75.
71. Baer, R.J., & Dubin, D.T. (1981) *Nucl. Acid. Res.*, 9, 323.
72. Poldermans, B., Roza, L., & Van Knippenberg, P.H. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 9094.
73. Thompson, J., Schmidt, F., & Cundliffe, E. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 7915.

74. Garrett, R., & Woolley, P. (1982) Trends Biochem. Sci., 11, 189.
75. Skinner, R., Cundliffe, E., & Schmidt, F.J. (1983) J. Biol. Chem., 258, 12702.
76. Shivakumar, A.G., & Dubnau, D. (1981) Nucl. Acid. Res., 9, 2649.
77. Shivakumar, A.G., Hahn, J., Grandi, G., Korlov, Y., & Dubnau, D. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. US, 77, 3903.
78. Lai, C.J., & Weisblum, B. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. US, 68, 856.
79. Nazar, R.N., Lo, A.C., & Wilderman, A.G. (1982) Nucl. Acid. Res., 11, 5989.
80. Klootwijk, J., Klein, I., & Grivell, L.A. (1975) J. Mol. Biol., 97, 337.
81. Maden, B.E.H. (1984) Nucl. Acid. Res., 12, 2649.
82. Helser, T.L., Davis, J.E., & Dahlberg, J.E. (1971) Nature New Biol., 233, 12.
83. Helser, T.L., Davis, J.E., & Dahlberg, J.E. (1972) Nature New Biol., 235, 6.
84. Sherman, F., & Lawrence, C.W. (1974) Handbook of Genetics edited by King, R.C., 1, chap. 24.
85. Depelchin, A. (1980) Microbiologie générale (FNNDP), 2, chap. 5.
86. Bjork, G.R., & Kjellin, K. (1978) J. Bacteriol., 133, 499.
87. Murphy, J.T., & Spence, K.D. (1972) J. Bacteriol., 109, 499.
88. Parish, J.H. (1972) Principles and practice of experiments with nucleic acids, eds. Longman.
89. Lehninger, (1982) Biochimie, Eds. Flammarion, chap. 32, 883.