

**Biologie  
moléculaire****Les méthylations sur le ribose  
des ARN ribosomiques :  
une modification  
post-transcriptionnelle  
guidée par de petits ARN  
nucléolaires antisens**

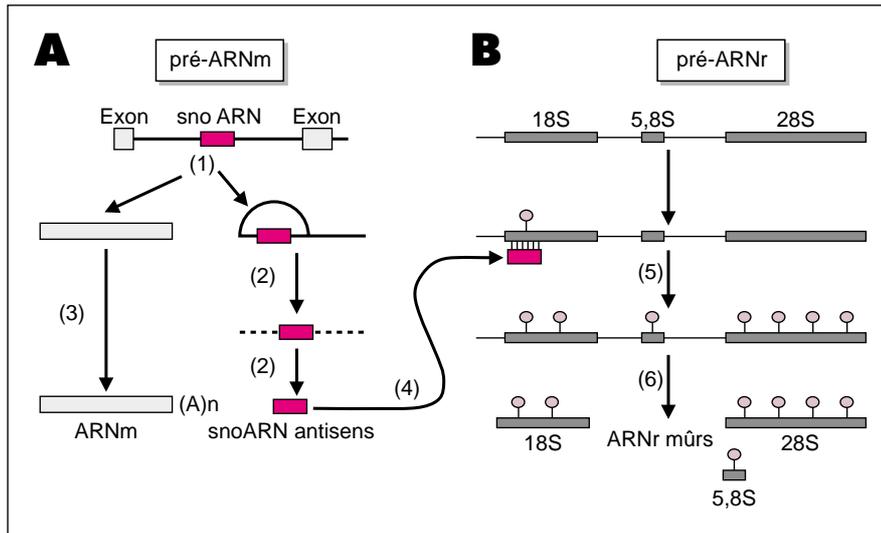
**A** la différence de l'ADN, la plupart des molécules d'ARN (ribosomiques, de transfert, messagers et petits ARN nucléaires) contiennent une grande variété de nucléosides modifiés. En 1957, la découverte du 5-ribosyl-uracile (ou pseudouridine,  $\Psi$ ) avait fait dire à leurs auteurs que l'ARN contenait un « cinquième nucléotide » [1]. Aujourd'hui on ne connaît pas moins de 93 modifications différentes, en grande majorité identifiées dans les ARNt. Le rôle de ces modifications, introduites post-transcriptionnellement sur les chaînes polynucléotidiques d'ARN nouvellement synthétisées, reste le plus souvent mal compris. La méthylation sur le ribose, en position 2'-O-, est une modification relativement répandue dans les ARN de cellules eucaryotes, capable d'affecter le repliement tertiaire de la molécule d'ARN et ses interactions avec différents ligands. Les ARNr (ARN ribosomiques) des eucaryotes contiennent un profil complexe de méthylations sur le ribose dont la fonction est complètement inconnue. La biogenèse des ribosomes eucaryotes se déroule dans un sous-compartiment nucléaire, le nucléole. Les gènes ribosomiques sont activement transcrits par l'ARN polymérase I (Pol I) sous forme d'un long précurseur qui contient les séquences des ARNr mûrs de 18S, 5, 8S et 28S (tandis que l'ARNr 5S est transcrit par l'ARN pol III dans le nucléoplasme). Avant de subir la série de coupures endo- et exonu-

cléolytiques qui libèrent les ARNr mûrs, le pré-ARNr est l'objet d'un ensemble de modifications post-transcriptionnelles, essentiellement de deux types : des conversions d'uridines en pseudo-uridines et des méthylations (en très grande majorité sur le ribose, quelques-unes sur les bases). Les méthylations sur le ribose sont ajoutées en des positions bien précises des séquences ARNr mûres, sur le pré-ARNr en cours d'élongation [2]. Elles se localisent exclusivement dans les domaines universellement conservés des ARNr, qui doivent avoir un rôle fondamental dans le fonctionnement du ribosome au cours de la synthèse des protéines. Le profil des méthylations sur ribose des molécules d'ARNr est assez fortement conservé chez les eucaryotes. La quasi-totalité des  $10^6$  nucléotides méthylés sur le ribose dans les ARNr humains le sont aussi dans les ARNr d'un amphibien. Si les ARNr de levure ont nettement moins de riboses méthylés, leur profil est cependant très apparenté à celui des vertébrés, avec une trentaine de sites communs [2]. En revanche, les ARNr d'un procaryote, *E. coli*, ne portent que quatre méthylations sur ribose, dont trois à des positions identiques à celles des eucaryotes. L'assemblage des protéines ribosomiques sur l'ARNr démarre dans le nucléole, avant même que la transcription de l'ARN précurseur ne soit terminée. Le pré-ARNr naissant se lie aussi, transitoirement, à de nombreux petits ARN nucléolaires (*small nucleole*

*lar* ARN, snoARN), beaucoup plus nombreux qu'on ne l'imaginait il y a 2-3 ans [3]. Cette mini-synthèse fait le point sur la découverte d'une nouvelle famille de petits ARN nucléolaires très intrigants, d'abord parce qu'ils sont d'origine intronique, et aussi parce qu'ils contiennent de longues séquences complémentaires avec celles des ARNr (d'où leur nom de snoARN antisens). L'étude de cette famille complexe vient de permettre une percée importante dans la compréhension des mécanismes de la méthylation en 2'-O-ribose de l'ARNr [4-8], plus précisément quant à la façon dont les nucléotides à modifier sont sélectionnés dans la séquence de l'ARNr. Ce progrès devrait ouvrir la voie à l'élucidation du rôle encore mystérieux de ces modifications de nucléotides dans la biogenèse ou la fonction des ribosomes.

**Des snoARN hébergés  
dans des introns**

Au cours des dernières années, un nombre de plus en plus important de nouveaux snoARN a été identifié, tant chez les vertébrés que chez la levure [3]. La plupart de ces nouveaux ARN ont une organisation génique et un mode de formation tout à fait particuliers, mis en évidence pour la première fois pour U14 chez les vertébrés [9]. Non seulement ils sont codés dans des introns, mais ils ne sont pas transcrits à partir de leur propre promoteur :



**Figure 1. Les snoARN antisens introniques: production et association à l'ARN préribosomique.** **A:** Biosynthèse du snoARN par maturation d'un ARN prémessager: après épissage des exons (1), le snoARN est produit par dégradation exonucléolytique du reste de l'ARN intronique après débranchement du lasso (2), tandis que l'ARN messenger est finalement mûri et traduit. **B:** Maturation de l'ARN préribosomique. Le petit ARN intronique mûr est transporté dans le nucléole où il s'associe transitoirement au transcrit primaire des gènes ARNr, en formant un double brin au niveau d'un site à méthyler dans le pré-ARNr (4). Une centaine de snoARN antisens différents, chacun spécifiant un site particulier de méthylation (désigné par un rond bistre clair) dans le pré-ARNr, s'associent transitoirement au pré-ARNr des vertébrés (5). Le pré-ARNr méthylyé subit divers découpages qui libèrent les ARNr mûrs porteurs du patron complet de méthylation (6).

ils sont formés par un nouveau type de maturation de l'ARN intronique du prémessager de leur gène-hôte (figure 1A). Autre observation troublante, les snoARN introniques sont généralement hébergés dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogenèse ou le fonctionnement des ribosomes, suggérant que cet emboîtement de gènes peut être à la base d'une coordination de l'expression de deux produits fonctionnellement liés [9, 10]. Une majorité des snoARN introniques ont des structures apparentées [11]: ils contiennent 2 courts motifs de séquence, dits boîte C (purineUGAUGA) et boîte D (CUGA), intégrés dans une structure terminale 5'-3' caractéristique, et ils possèdent aussi de longs segments (de 10 à 21 nucléotides) de parfaite complémentarité vis-à-vis de l'ARNr (figure 2A).

### 1... 2... 3... 4... 5... méthylation !

La comparaison des premiers snoARN antisens identifiés il y a près de deux ans avait révélé que leurs complémentarités vis-à-vis de l'ARNr chevauchaient des sites de méthylation en 2'-O-ribose dans la séquence des ARNr [11]. Au cours des derniers mois, la caractérisation d'un nombre très important de nouveaux snoARN antisens a confirmé cette corrélation de façon spectaculaire [4, 5]. De plus, chaque double brin snoARN:ARNr présente invariablement le même trait de structure (figure 2C): dans tous les cas la position méthylyée dans l'ARNr est systématiquement apparée au 5<sup>e</sup> nucléotide en amont du motif boîte D [4, 5]. C'était une observation capitale, car les quelque cent sites de méthylation en 2'-O-ribose des ARNr de vertébrés montrent une grande diversité en struc-

ture primaire ou secondaire, qui a longtemps constitué une énigme quant à leur reconnaissance spécifique par la machinerie de modification [2]. La position invariante du nucléotide modifié dans le double brin suggérait donc que c'était le snoARN qui apportait en *trans*-l'information nécessaire pour sélectionner le nucléotide à modifier, à chaque site de méthylation étant associé un snoARN porteur de la séquence antisens correspondante (figure 1B). Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement au laboratoire. Il a d'abord pu être montré que l'inactivation du gène codant pour le snoARN U24 chez *S. cerevisiae* provoquait la disparition spécifique des méthylation sur ribose situées au niveau des deux appariements avec l'ARNr que peut former ce snoARN (U24 appartient à un sous-groupe de snoARN antisens ayant 2 séquences complémentaires de celles de l'ARNr, comme montré sur la figure 2A) tandis que les autres méthylation sur ribose dans l'ARNr restaient inchangées [4]. De plus, la modification était sélectivement restaurée par expression ectopique d'un snoARN U24. Enfin, le nucléotide à modifier dans le double brin est bien spécifié par sa distance au motif boîte D du snoARN puisque la délétion d'un nucléotide suffit à décaler d'autant le site de méthylation [4], montrant bien que le snoARN U24 est impliqué dans le guidage de l'activité méthyl-transférase sur le nucléotide-cible.

### Le double brin snoARN:ARNr est le seul déterminant du site de méthylation

On pouvait se demander si la structure canonique en double brin snoARN:ARNr contenait bien toute l'information nécessaire à la sélection du nucléotide à modifier. Pour répondre à cette question, nous avons exploité la possibilité d'exprimer, par transfection transitoire dans des cellules murines en culture, des formes modifiées du snoARN intronique antisens U20 (figure 3). Nous avons précédemment montré que la structure terminale tige 5'-3'/boîtes C et D (figure 2B) commune aux

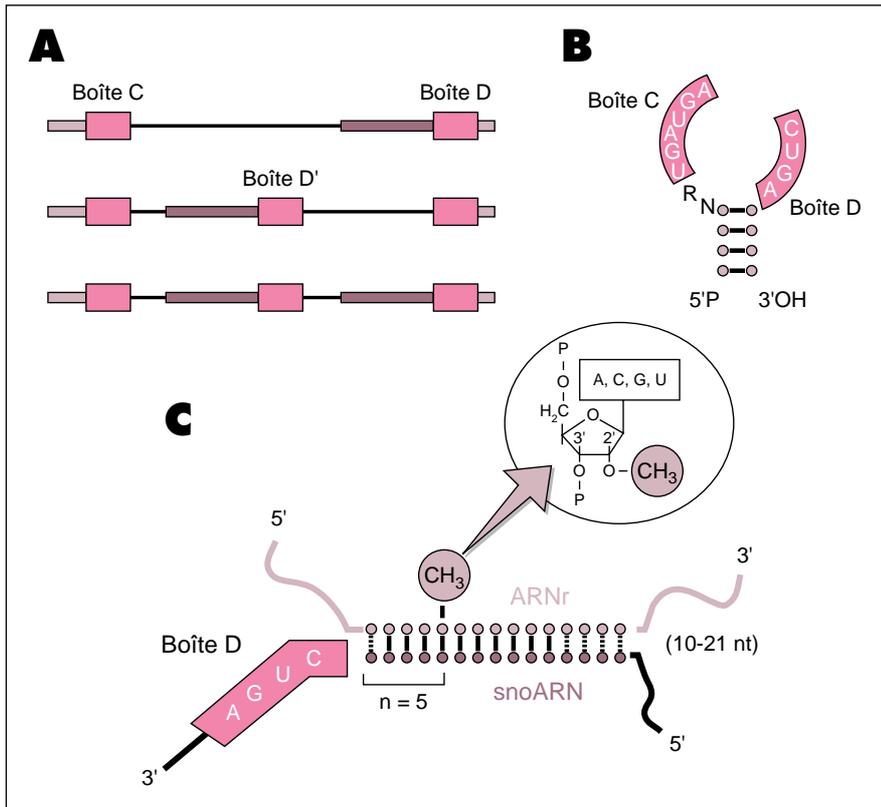


Figure 2. **Structure générique des snoARN antisens et du double brin guide de méthylation.** **A:** Différents types de snoARN antisens, selon la position de l'élément antisens (en bistre foncé). Un petit nombre de snoARN de cette famille contiennent deux éléments antisens, chacun suivi immédiatement d'un motif CUGA (boîte D ou D'). **B:** Structure terminale consensus des snoARN antisens (les nucléotides terminaux appariés sont schématisés par des ronds pleins). **C:** Double brin canonique entre le snoARN et l'ARNr au niveau d'un site de méthylation sur le ribose.

snoARN de cette famille suffisait pour déterminer la maturation correcte de l'ARN intronique et que la séquence antisens n'était pas requise pour la biosynthèse du snoARN [12]. Nous avons donc pu remplacer le segment antisens naturel de U20 par d'autres séquences, complémentaires de régions de l'ARNr endogène exemptes de toute méthylation naturelle (figure 3). Nous avons pu alors observer que l'expression du snoARN, guide artificiel, induisait l'apparition d'une nouvelle méthylation dans l'ARNr endogène, à la position exacte prédite, démontrant que la formation d'un double brin canonique snoARN:ARNr adjacent à une boîte D suffit bien pour spécifier un site de méthylation dans l'ARNr [7]. Cette approche expérimentale nous

a aussi permis de disséquer les caractéristiques du double brin qui sont essentielles au ciblage de la réaction : taille minimale et régularité de la structure bicaténaire, intégrité du motif CUGA dont la position détermine strictement le choix du nucléotide modifié dans le double brin [7]. Nous avons pu aussi démontrer, par une approche expérimentale qui est en quelque sorte la réciproque de la précédente, que les nucléotides de l'ARNr qui participent au double brin suffisent en *cis* pour diriger efficacement la méthylation et que la réaction ne dépend pas d'une structuration ribonucléoprotéique complexe du substrat, le pré-ARNr endogène. Un court segment (20 nt) de séquence d'ARNr qui contient un site de méthylation naturelle dans

l'ARNr endogène a été exprimé *in vivo*, par transfection à l'aide de minigènes ribosomiques. Ce substrat minimal est efficacement méthylé, à la même position que l'ARNr endogène, pourvu qu'il contienne toute la séquence de complémentarité vis-à-vis du snoARN antisens associé à ce site de méthylation de l'ARNr [7]. Comme prévu, la méthylation de ce fragment d'ARNr est abolie par des mutations qui altèrent la complémentarité vis-à-vis du snoARN endogène et elle est rétablie par co-expression d'un snoARN guide artificiel, porteur des mutations compensatoires dans son segment antisens.

### Pourquoi des guides introniques ?

La signification de l'organisation génomique particulière observée surtout pour les snoARN guides des vertébrés reste mystérieuse (chez la levure, plusieurs d'entre eux ne sont pas introniques). L'hypothèse que la localisation intronique pourrait être à la base d'une coordination de leur expression avec celle de leur gène-hôte [9, 10] reste à tester. Ces snoARN sont généralement très stables, beaucoup plus que les ARNm de leurs gènes-hôtes. De plus, quand on considère la collection élargie maintenant disponible, la relation du produit du gène-hôte avec l'assemblage ou le fonctionnement des ribosomes est parfois loin d'être directe, même s'ils sont en majorité situés dans des gènes de protéines ribosomiques [3, 5]. En fait, les séquences des snoARN mûrs apparaissent comme des éléments génétiques relativement mobiles qui peuvent changer de gène-hôte au cours de l'évolution des eucaryotes [3, 13], probablement parce que leur expression ne dépend pas de leur contexte intronique. L'important pour ces « parasites transcriptionnels » pourrait donc être simplement leur hébergement dans des gènes activement transcrits à expression ubiquitaire. Cet ensemble de résultats révèle une parenté inattendue entre les mécanismes utilisés pour la modification d'un ARN « structural » (l'ARNr) et pour la « correction sur épreuves » (*editing*) d'un pré-ARNm (*m/s n° 7, vol. 8, p. 764*). L'insertion ou la délétion

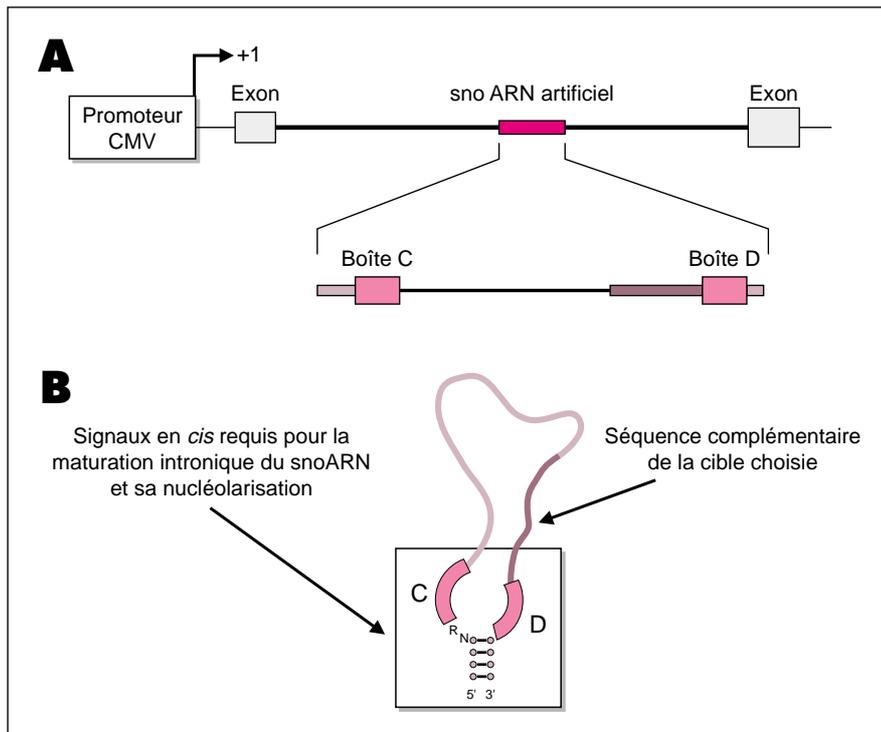


Figure 3. **Expression d'un snoARN guide de méthylation artificielle.** **A:** Schéma de la construction utilisée pour la transfection. **B:** Structure bipartite du snoARN artificiel mûri à partir de l'ARN intronique.

tion de certains nucléotides dans les pré-ARNm des kinétoplastes de flagellés implique aussi de petits ARN guides intervenant en *trans*, par appariement au niveau du site à modifier dans le pré-ARNm [5]. Un autre cas très apparenté est celui de la conversion d'adénosine en inosine dans le pré-ARNm du récepteur du glutamate, elle aussi guidée, de façon spécifique de site, par la formation d'une structure ARN bicaténaire impliquant un ARN intronique (*m/s n° 2, vol. 12, p. 262*) [14, 15]. Dans ce processus d'*editing* toutefois, le guide intronique intervient en *cis*- et non en *trans*- comme les snoARN guides de méthylation des ARNr.

### Un nouvel outil pour inactiver sélectivement l'expression des gènes *in vivo*?

Le groupe 2'-OH sur le ribose, qui différencie un ARN d'un ADN, peut intervenir comme donneur ou accepteur dans des liaisons hydrogène avec de nombreux ligands (protéines, ions divalents). Sa grande réactivité

confère à l'ARN ses propriétés catalytiques, notamment dans le cas des attaques nucléophiles lors des réactions de trans-estérification. On dispose de nombreux autres exemples montrant *in vitro* le rôle essentiel de groupes 2'-OH des riboses dans le fonctionnement d'un ARN, qu'il s'agisse de l'épissage des introns des pré-messagers [16, 17], de la polyadénylation [18] ou d'interactions protéine/ARN [19]. Aussi l'observation qu'il est possible de diriger une méthylation en 2'-O-ribose sur un ARN cellulaire autre que l'ARNr endogène à l'aide d'un snoARN guide approprié [7] pourrait-elle ouvrir la voie à l'utilisation de la méthylation ciblée pour altérer sélectivement l'expression des gènes *in vivo*, au même titre qu'avec des oligonucléotides antisens ou des ribozymes. Ces guides ont plusieurs avantages : (1) ils sont naturellement stables *in vivo* ; (2) ils ont une grande spécificité de reconnaissance, en raison de la longueur de leur séquence antisens ; (3) ils constituent des « molécules-cassettes », à structure

bimodulaire (structure terminale 5'-3', nécessaire et suffisante pour leur maturation, et segment antisens, déterminant l'activité de guide de méthylation), dans lesquelles on peut aisément introduire la séquence complémentaire du site que l'on désire méthyler dans l'ARN-cible. Cependant, ces snoARN-guides sont bien moins efficaces sur des ARN nucléaires non nucléolaires que sur des ARN nucléolaires [7], vraisemblablement en raison d'une faible probabilité de rencontre entre le substrat et l'ARN-guide nucléolaire ectopique (et peut-être aussi avec l'activité 2'-O-ribose méthyl-transférase). Ce problème de compartimentation des partenaires, inhérent à toute approche *in vivo* [20] reste à l'heure actuelle la limite majeure pour le ciblage de méthylation sur des pré-ARNm.

### Conclusion

La démonstration par notre laboratoire que des snoARN en s'appariant à l'ARNr sélectionnent des sites de modification de l'ARNr élargit notre vision du champ des réactions enzymatiques que peuvent diriger des ARN. Elle ouvre aussi de multiples domaines d'investigation concernant la biosynthèse et la fonction des nucléotides méthylés sur le ribose dans l'ARNr. De nombreuses questions fondamentales restent à ce jour sans réponse : quelle est l'identité et la structure de l'activité 2'-O-ribose méthyltransférase spécifique des double brin snoARN:ARNr ? Est-ce une protéine constitutive de la snoRNP ou un « facteur diffusible » qui reconnaît la structure canonique du double brin snoARN:ARNr ? Est-ce que d'autres protéines nucléolaires participent à la reconnaissance du nucléotide à modifier dans le double brin (protéines accessoires) ? Quelle est la cinétique de l'association/dissociation des nombreux doubles brins snoARN:ARNr qui se forment sur le pré-ARNr et quel peut être le rôle d'hélicases à ARN dans ce processus ? Enfin, quelles sont les fonctions biologiques de ces méthylations ? Sont-elles impliquées dans le repliement de l'ARNr en cours d'élongation et capables de moduler

l'assemblage des préribosomes? Participant-elles directement à la fonction des ribosomes cytoplasmiques, lors de la traduction de l'information génétique? Répondre à ces questions est un sérieux défi pour les années à venir... ■

**Jérôme Cavaillé**  
**Jean-Pierre Bachelierie**

Laboratoire de biologie moléculaire eucaryote du Cnrs, Université Paul-Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France.

## RÉFÉRENCES

1. Davis FF, Allen FW. Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *J Biol Chem* 1957; 227: 907-15.
2. Maden BEH. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990; 39: 241-301.
3. Maxwell ES, Fournier MJ. The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* 1995; 35: 897-934.
4. Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachelierie J-P, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 1996; 85: 1077-88.
5. Nicoloso M, Qu L-H, Michot B, Bachelierie JP. Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J Mol Biol* 1996; 260: 178-95.
6. Tollervey D. Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. *Science* 1996; 273: 1056-7.
7. Cavaillé J, Nicoloso M, Bachelierie JP. Targeted ribose methylation of RNA *in vivo* directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 1996; 383: 732-5.
8. Maden BEH. Click here for methylation. *Nature* 1996; 383: 675-6.
9. Leverette RD, Andrews MT, Maxwell ES. Mouse U14 snRNA is a processed intron of the cognate hsc70 heat-shock pre-messenger RNA. *Cell* 1992; 71: 1215-21.
10. Sollner-Webb B. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell* 1993; 75: 403-5.
11. Bachelierie JP, Michot B, Nicoloso M, Balakin A, Ni J, Fournier MJ. Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 261-4.
12. Cavaillé J, Bachelierie JP. Processing of fibrillarin-associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochimie* 1996; 78: 443-56.
13. Bachelierie JP, Nicoloso M, Qu LH, Michot B, Caizergues-Ferrer M, Cavaillé J, Renalier MH. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs with long sequence complementarities to mature rRNAs involved in ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol* 1995; 73: 835-43.
14. Cattaneo R. RNA duplexes guide base conversions. *Current Biol* 1994; 4: 134-6.
15. Auxilien S, Grosjean H. Édition des ARN d'eucaryotes et viraux par désamination enzymatique d'adénosines en inosines. *Med/Sci* 1995; 11: 1089-98.
16. Moore MJ, Sharp PA. Site-specific methylation of pre-mRNA: the 2'-hydroxyl groups at the splice sites. *Science* 1992; 256: 992-7.
17. Query CC, Moore M, Sharp PA. Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. *Genes Dev* 1994; 8: 587-97.
18. Bardwell VJ, Wickens M, Bienroth S, Keller W, Sproat BS, Lamond AI. Site-directed ribose methylation identifies 2'-OH groups in polyadenylation substrate critical for AAUAAA recognition and poly(A) addition. *Cell* 1991; 65: 125-33.
19. Baidya N, Uhlenbeck OC. The role of 2'-O-hydroxyl groups in an RNA-protein interaction. *Biochemistry* 1995; 34: 12363-8.
20. Sullenger BA, Cech T. Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 1993; 262: 1566-9.

## TIRÉS À PART

J.P. Bachelierie.

## Proposition d'accueil d'équipes de recherche dans le domaine biomédical

La Faculté de Médecine de Créteil et l'Institut Mondor de Médecine Moléculaire (IM3) proposent des locaux de recherche pour 320 m<sup>2</sup> (extensibles à 650 m<sup>2</sup> dans les 3 ans) pour accueillir une ou deux équipes de qualité, sur le site de l'Hôpital Henri-Mondor, avec accès à tous les services communs de l'Institut, et possibilité éventuelle de soutien à l'installation.

Les candidatures s'adressent à :

- de jeunes équipes en voie de structuration
- des équipes soutenues par un organisme de recherche
- de jeunes équipes à vocation hospitalo-universitaire

Les dossiers de candidature sont à adresser au Secrétariat du Doyen

Faculté de Médecine de Créteil

8, rue du Général-Sarrail, 94010 Créteil, France – Tél: 01.49.81.36.12 – Fax: 01.49.81.36.81