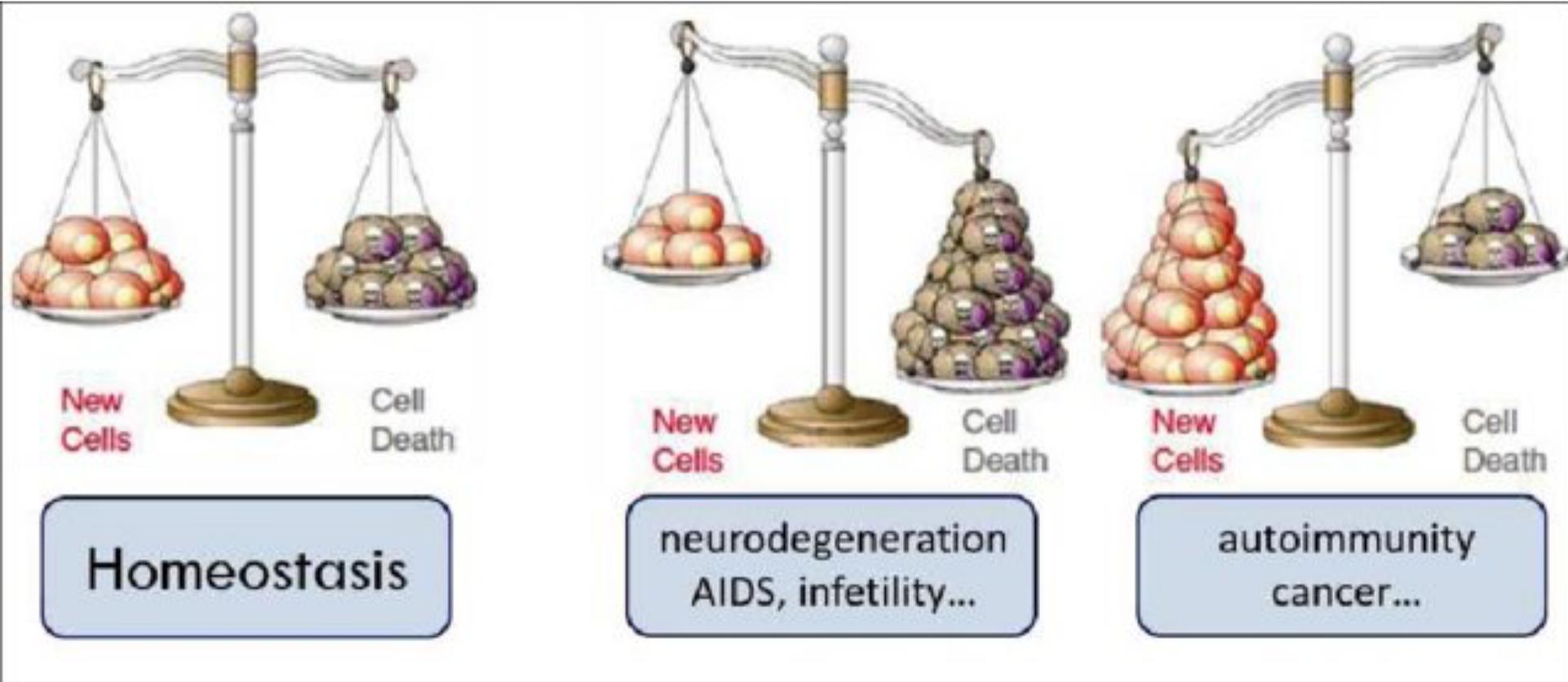


Techniques d'Analyse Moléculaire

Dr AMIROUCHE A.
Licence Biochimie (2020/2021)



Demi-vie ARNm



II-A- Définition de la demi-vie d'un ARNm

Les ARNm des cellules eucaryotes sont synthétisés et dégradés par des machineries indépendantes qui sont localisées dans différents compartiments cellulaires.

Les ARNm fonctionnels sont localisés **dans le cytoplasme** où se trouvent les ribosomes permettant la traduction subséquente des transcrits.

La synthèse des ARNm s'effectue exclusivement par **l'ARN polymérase II** et sa machinerie transcriptionnelle dans **le noyau** (Vannini & Cramer, 2012).

les ARNm cytoplasmiques seront dégradés par divers mécanismes suivant un taux de dégradation (DR) dépendant de la concentration d'ARNm durant un période de temps définie.

Cette cinétique de dégradation est considérée comme étant une cinétique de premier ordre, c'est-à-dire que la vitesse de dégradation sera proportionnelle à la concentration d'un seul réactif, soit l'ARNm (Ross, 1995).

Équation 2. Taux de dégradation de l'ARNm

$$DR = \frac{d[ARNm]}{dt} = k_{decay}[ARNm]$$

La variable **kdecay** représente la constante de dégradation d'un ARNm donné. Cette valeur nous permet ensuite d'obtenir la mesure de la demi-vie pour un ARNm. En effet, la variable **kdecay** est généralement transformée en demi-vie,

La demi-vie d'un ARNm est définie par le temps requis pour réduire la concentration d'ARNm de la moitié de sa valeur d'origine. La résolution de l'équation 2 par un calcul intégral nous permet donc d'obtenir l'équation 3 définissant la demi-vie ($T_{1/2}$).

Équation 3. Demi-vie d'un ARNm

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{decay}}$$

La concentration d'un ARNm est mesurée après différents temps d'incubation en présence de l'inhibiteur de la transcription pour déterminer le profil et le taux de dégradation de l'ARNm dans le temps. Théoriquement, suite à l'inhibition de la transcription, seule la machinerie de dégradation de l'ARNm est fonctionnelle. L'expression de l'ARNm à l'équilibre est brisée et la concentration d'ARNm diminue progressivement à une vitesse directement dépendante de la constante **kdecay** (Équation 2) ce qui nous permet d'estimer la demi-vie en utilisant l'équation 3. L'avantage de cette approche par rapport à la technique précédente, est la possibilité d'estimer directement la demi-vie et de comparer comment des traitements différents pourraient affecter la stabilité d'un transcrit. L'inconvénient principal de cette technique est que les inhibiteurs de la transcription peuvent avoir un impact négatif important sur la physiologie de la cellule (Ljungman, 2007). En effet, les drogues utilisées pour cette technique pourraient affecter la synthèse de microARNs (miARNs) ou même la synthèse de protéines modulant la stabilité des ARNm ce qui va affecter la courbe de dégradation des transcrits.

E-1-a Inhibiteurs de la transcription

L'utilisation d'inhibiteurs de la transcription est une technique relativement simple pour mesurer la cinétique de dégradation d'un ARNm.

Globalement, un inhibiteur de la transcription est ajouté aux cellules. L'actinomycine D (Act. D), l' α -amanitine et le 5,6-dichloro-1 β -1-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) sont les inhibiteurs de la transcription généralement utilisés dans le cadre de cette technique.

L'actinomycine D affecte les trois types d'ARN polymérase avec une sélectivité variable (Bensaude, 2011). Cette molécule interfère avec la transcription en s'intercalant dans l'ADN, préférentiellement au sein des séquences riches en GC (Trask & Muller, 1988).

L' α -amanitine présente une haute spécificité et une haute affinité pour l'ARN polymérase II. L' α -amanitine se fixe près du site catalytique de l'ARN polymérase prévenant ainsi l'incorporation nucléotidique et la translocation des transcrits (Brueckner & Cramer, 2008).

Quant au DRB, celui-ci agit en interagissant directement avec l'appareil transcriptionnel de l'ARN polymérase II, soit la kinase CDK9 (Bensaude, 2011).

Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics

Adel Amirouche, Helina Tadesse, John A. Lunde, Guy Bélanger, Jocelyn Côté and Bernard J. Jasmin*

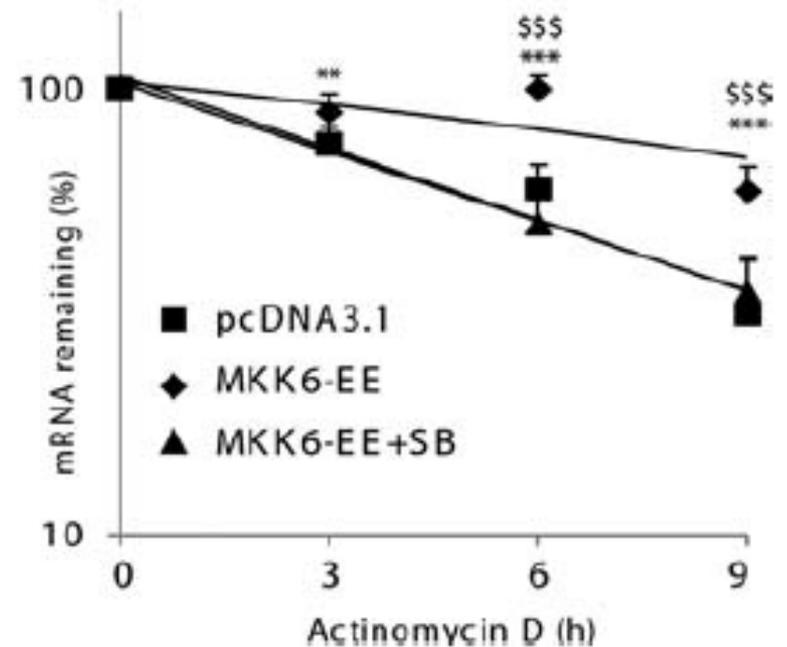
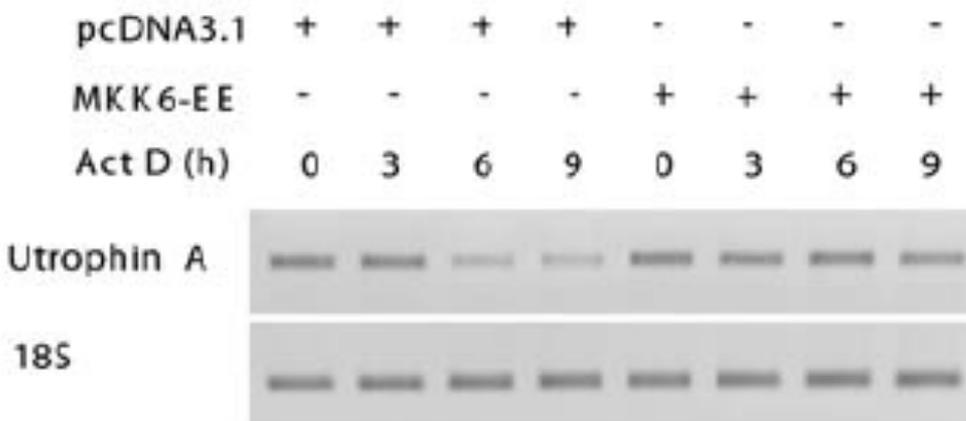


Tableau 1 Estimation de la demi-vie de l'ARNm α ENaC.

Auteur	Méthode	Origine	T_{1/2} (h)	Référence
Zentner, MD	Act. D 5µg/mL	Cellules parotides	~ 8 h	(Zentner et al., 1998)
Otulakowski, G	Act. D 5µg/mL	Cellules épithéliales pulmonaires fœtales distales	22 h	(Otulakowski et al., 1999)
Mick, VE	Act. D 1µM	Cellules MDCK-C7	14 h	(Mick et al., 2001)
Itani, OA	Act. D 1µM	Cellules MDCK-C7	~ 9 h	(Itani et al., 2003)
Dagenais, A	Act. D 5µg/mL	Cellules épithéliales alvéolaires	15 h	(Dagenais et al., 2004)
Mustafa, SB	Act. D 1µM	Cellules SMG-C6 Glande submandibulaire	17 h	(Mustafa et al., 2008)

Rôle de la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm

L'ARNm d'un gène codant pour une protéine possède une structure complexe. La coiffe 7mGpppN en 5' protège l'ARNm de la dégradation par les ribonucléases et permet l'initiation de la traduction. La séquence non traduite en 5' précède la séquence codante pour une protéine et peut jouer un rôle dans la stabilité et la traduction du messager. La séquence non traduite en 3' suit la séquence codante et précède la queue polyadénylée essentielle à la stabilité et la traduction du messager.

Le niveau d'expression d'un gène dans la cellule est contrôlé par différents mécanismes allant de la transcription, aux modifications post-transcriptionnelles et à la traduction. La modulation post-transcriptionnelle des ARNm est probablement la méthode la plus efficace pour moduler rapidement l'expression génique d'un transcrit. La modulation post-transcriptionnelle de l'expression génique implique la stabilité des transcrits, l'efficacité de la traduction ainsi que la localisation des messagers.

Le 3'UTR de l'ARNm joue un rôle important dans ces mécanismes de modulation. Une étude récente a démontré que contrairement au 5'UTR, il existe une corrélation exponentielle entre la longueur du 3'UTR et la complexité cellulaire et la morphologie d'un organisme. Cette corrélation suggère que le 3'UTR à l'instar des régions codantes du messager, a été soumis à la sélection naturelle pour permettre une modulation post-transcriptionnelle de plus en plus complexe tout au cours de l'évolution. Le 3'UTR comporte plusieurs sites de liaison pour des protéines et des miARNs qui vont affecter directement la stabilité ou la traduction du transcrit.

Modulation de la stabilité

La régulation de la stabilité de l'ARNm est une étape importante dans le contrôle de l'expression génique. Un changement dans la stabilité d'un transcrit se reflète généralement sur la concentration de la protéine codée dans la cellule. La stabilité du transcrit est dictée par des séquences cis dans le 3'UTR qui favorisent la stabilité ou la dégradation de l'ARNm

1. miARNs

La majorité des motifs retrouvés dans le 3'UTR sont généralement constitués d'une séquence de 8 nucléotides et environ la moitié d'entre eux sont complémentaires à la séquence reconnue par des miARNs (Xie et al., 2005). Les miARNs sont des agents de modulation posttranscriptionnelle très importants dans la cellule. Bien que les sites d'attachement des miARNs puissent se retrouver dans la séquence codante (ORF) ainsi que dans le 5'UTR, on retrouve ces sites de liaisons préférentiellement dans le 3'UTR.

Cette préférence démontre l'importance de cette région dans les processus de modulation posttranscriptionnelle (Barrett, Fletcher, & Wilton, 2012). Les miARNs sont des ARN composés de 21 à 26 nucléotides et sont produits à partir de transcrits qui forment des structures en tige-boucle. Les structures en tiges-boucle (hairpin) [Figure 11] font partie des structures secondaires essentielles de l'ARN. Celles-ci peuvent jouer plusieurs rôles dans le métabolisme des ARN tels que le repliement de l'ARN, les interactions avec les ribozymes, la modulation par les miARNs, la reconnaissance d'ARN par les protéines, etc.

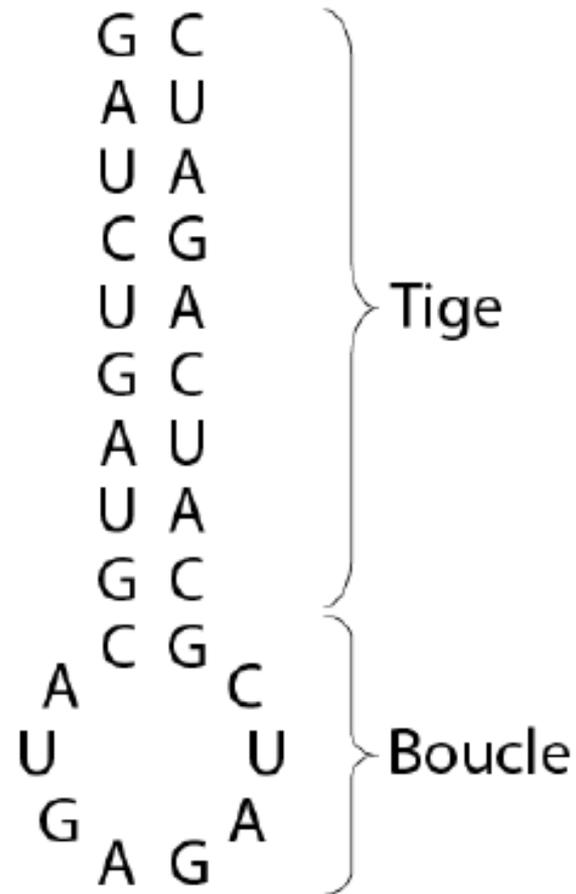


Figure 11. Structure en tige-boucle

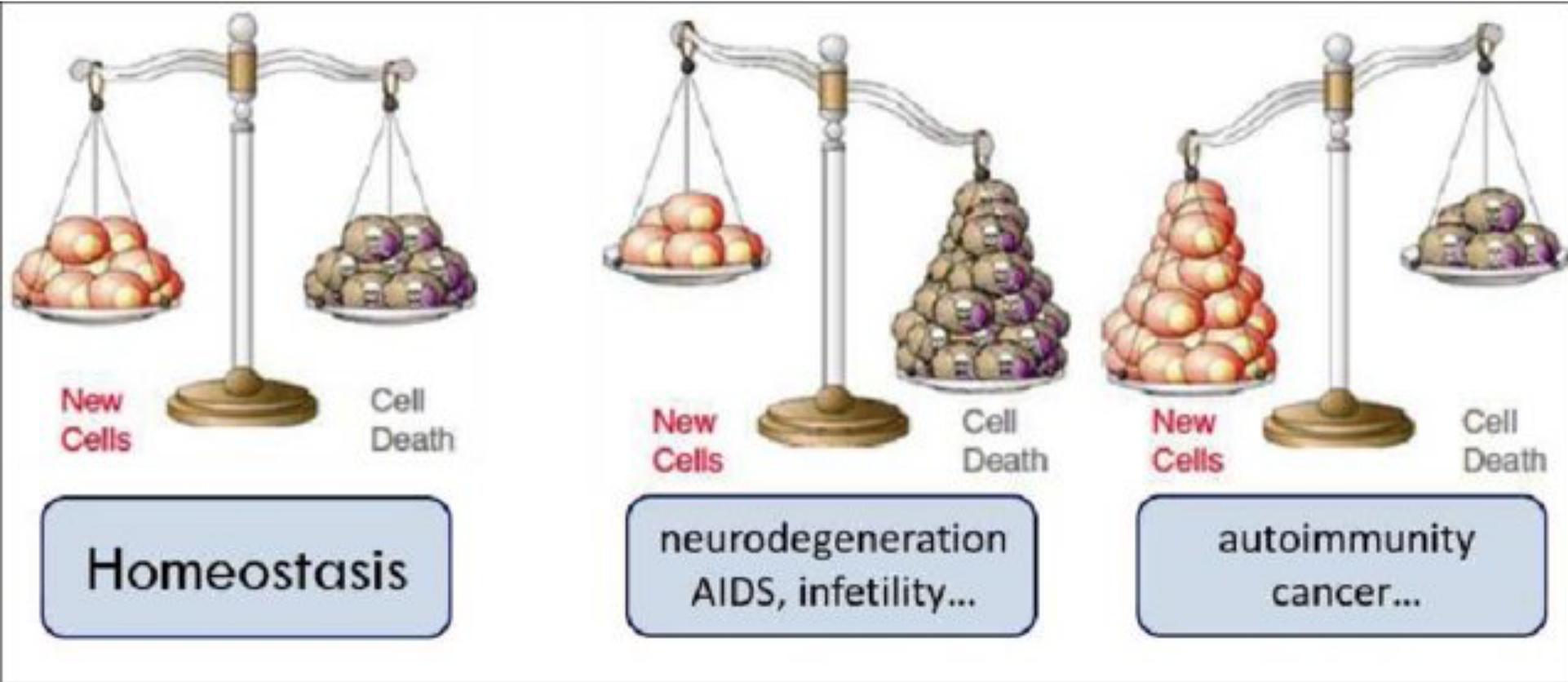
Exemple de structure en tige-boucle (créée à partir de RNAfold Webserver)

Séquences cis – ARE

Il existe également des séquences cis dans le 3'UTR qui sont reconnues par des protéines liant l'ARN (RBPs – RNA-binding proteins). Les séquences cis les plus connues sont les séquences riches en adénosines et en uridines nommées « AU-rich element » (ARE). Environ 8% de la totalité des transcrits possèdent des éléments « AU-riches » et plusieurs d'entre eux codent pour des cytokines impliquées dans l'inflammation (TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-10, etc.). Les séquences ARE correspondent à des motifs AUUUA de 50 à 150pb qui se regroupent en trois classes. La classe I représente des pentamères AUUUA regroupés près de séquences riches en uridines. La classe II représente des nonamères UUAUUUAU également regroupés dans une région « U-riche ». La classe III se distingue des classes I et II puisqu'elle correspond à des régions « U-riches » sans pentamères précis. Les motifs ARE fonctionnels existent sous la forme structurée en tige-boucle, mais peuvent également exister sous une forme linéaire dont la séquence nucléotidique devient très importante. Ceci suggère que le motif ARE aurait un effet déstabilisateur par défaut sur l'ARNm. Les RBP associées aux ARE favorisent la dégradation de l'ARNm à partir de son extrémité 3' par des exonucléases contrairement aux miARNs qui impliquent les endonucléases. Les séquences ARE de classes I et III induisent une déadénylation cytoplasmique synchrone. Tous les ARNm seront déadénylés à la même vitesse jusqu'à l'obtention d'une queue polyadénylée d'une longueur de 30-60 nucléotides provoquant la dégradation des transcrits. À l'inverse, les séquences ARE de classe II génèrent des ARNm intermédiaires sans queue polyA via une déadénylation cytoplasmique asynchrone.

Les motifs ARE peuvent également avoir une fonction stabilisatrice sur l'ARNm selon la nature des protéines RBP qui vont s'y lier. Par exemple, les protéines RBP de la famille ELAV (HuR, HuB, HuC et HuD) sont connues pour stabiliser le transcrit, alors que la AU-rich binding factor-1 (AUF1) et la tristétraproline (TTP) ont un rôle déstabilisateur.

Demi-vie Protéine

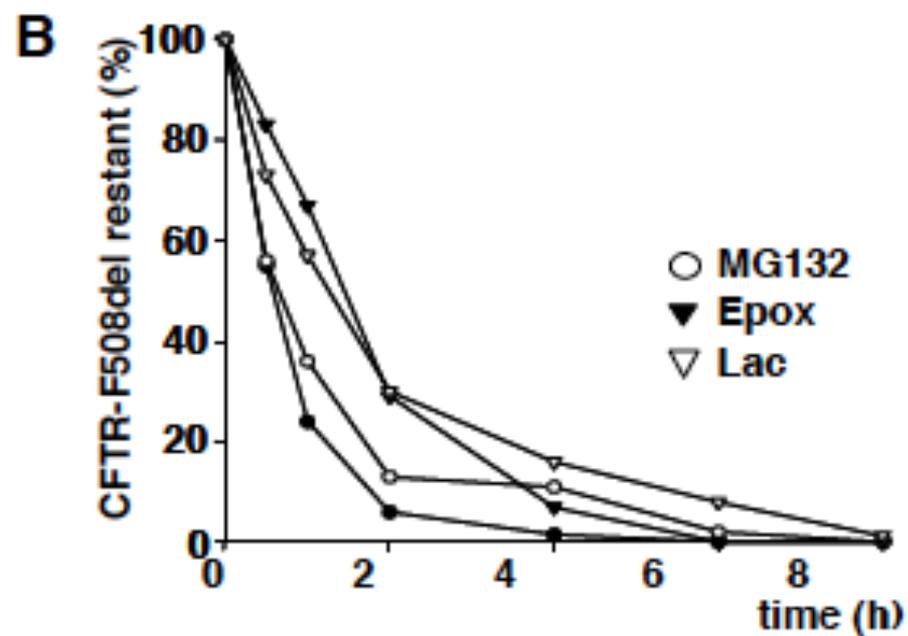
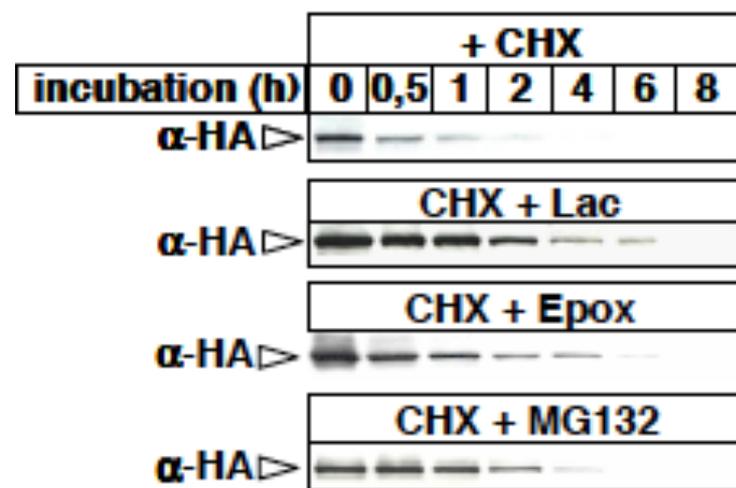


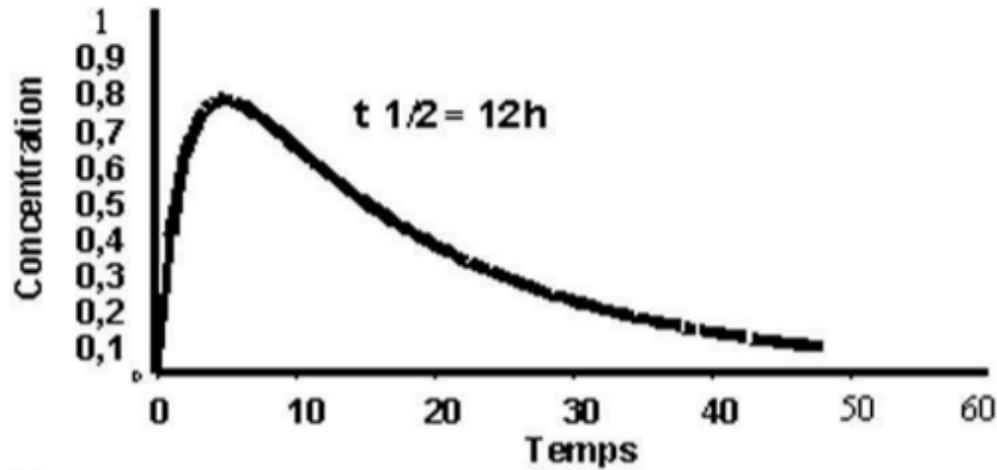
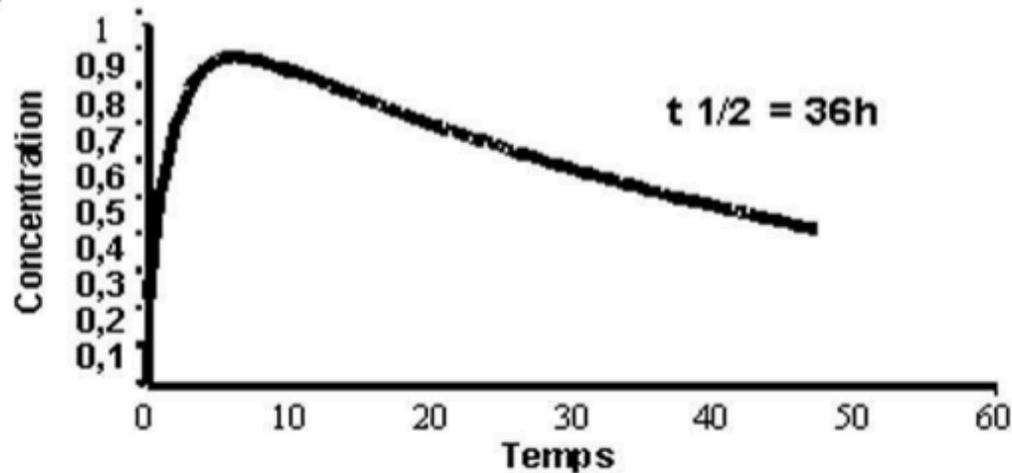
II-B Détermination de la demi-vie d'une protéine

Afin de calculer la demi-vie de la protéine, nous utilisons la cycloheximide (CHX, 4-[(2R)-2-[(1S,3S,5S)-3,5-diméthyl-2-oxocyclohexyl]-2hydroxyéthyl]- 2,6-piperidinedione), un inhibiteur de la synthèse protéique (Curtis **et al.**, 1986).

Cet antibiotique bactérien, isolé de **Streptomyces griseus**, inhibe l'activité peptidyl transférase de la sous unité ribosomale 60S des eucaryotes.

Il nous permet de suivre le devenir d'un pool de protéines nouvellement synthétisées en présence de différents traitements.



A**B**

Impact de la fonction rénale sur la demi-vie d'un médicament : évolution des concentrations suite à l'administration orale d'une même dose à un groupe de sujets normaux (A) et à un groupe de sujets insuffisants rénaux (B) avec une demi-vie 3 fois plus longue.