

Le contrôle de l'initiation chez les eucaryotes

par G. PÉTRISSANT

Laboratoire de Physiologie de la Lactation, I.N.R.A.
78350 Jouy en Josas, France

Summary. *Control of the initiation step in eukaryotic cells.*

This article presents some arguments in favor of post-transcriptional regulation of protein synthesis. The macromolecules inducing initiation have been described. The control mechanisms of initiation have been studied in reticulocytes and cells treated with interferon. The two systems are highly analogous. The discussion tries to estimate the true importance, efficiency and generality of the mechanisms studied.

Introduction.

Les mécanismes de transcription et de maturation permettent à la cellule de disposer à tout instant d'un assortiment d'ARNs messagers dont le nombre, la spécificité et la répartition déterminent la nature, la quantité et les proportions relatives des protéines qu'elle est apte à synthétiser.

Ces informations doivent-elles être considérées comme un programme définitif qui sera nécessairement réalisé ou comme un schéma directeur qui définit seulement l'orientation générale des synthèses ? Peuvent-elles être sélectionnées ou modulées pour que soient assurés à tout instant l'équilibre et la survie de la cellule malgré les altérations éventuelles de son métabolisme et les agressions dont elle peut être l'objet ? La réponse à ces deux questions devrait découler de l'analyse des nombreuses observations relevées dans la littérature. Cependant cette étude permet de constater que le poids des déductions auxquelles elle conduit est très variable en raison de l'hétérogénéité du matériel utilisé et des conditions de l'approche expérimentale. Aussi ai-je sélectionné, puisqu'il paraît raisonnable de leur accorder le meilleur crédit, les résultats obtenus *in vivo*, sur des organismes entiers ou des cellules vivant dans leur milieu naturel ou dans des milieux artificiels parfaitement équilibrés. Les exemples qui suivent ont été choisis selon ces critères.

Arguments en faveur d'une régulation post-transcriptionnelle de la synthèse protéique

Inhibition globale. — Les cellules d'ascite d'Ehrlich répondent à la suppression d'un acide aminé dans le milieu de culture par un blocage de l'initiation des chaînes

polypeptidiques qui se traduit par la désagrégation des polysomes (Pain et Henshaw, 1975). Les messagers s'accumulent sous la forme de particules ribonucléiques libres qui peuvent être réassociées aux polysomes lorsque l'acide aminé est réintroduit dans le milieu. Ces phénomènes se produisent en l'absence de toute synthèse d'ARN.

Inhibition sélective. — La dégradation sélective des messagers peut parfois être observée. Ainsi en est-il des ARNs messagers des histones lors de l'inhibition de la replication de l'ADN par le cytosine-arabinozide chez les cellules HeLa (Borun *et al.*, 1975). Dans ce cas, bien que la durée de vie habituelle de ces molécules soit de plusieurs heures, il n'existe plus de messenger histone traductible une demi-heure après l'introduction de l'inhibiteur.

Un autre exemple est fourni par les cellules infectées par le poliovirus. On observe dans ce cas une chute rapide de la synthèse des protéines de l'hôte alors que les messagers viraux sont activement traduits (Rose *et al.*, 1978). Cependant les messagers de l'hôte une fois extraits, peuvent être traduits dans des systèmes acellulaires aussi efficacement que ceux des cellules non infectées.

Stimulation globale. — Chez l'oursin, deux phénomènes plaident en faveur du contrôle cytoplasmique de la synthèse protéique. D'une part, dans les deux heures qui suivent la fertilisation, celle-ci est activée de manière importante sans qu'il y ait synthèse d'ARN messenger (Hille et Albers, 1979). Le nombre des ribosomes est multiplié par 25. D'autre part la vitesse globale de synthèse augmente de plus de 100 fois entre l'éclosion et la gastrulation. L'accroissement de la vitesse d'élongation est en partie responsable de ce phénomène.

De même, l'addition d'hémine à une suspension de réticulocytes intacts provoque une augmentation de la synthèse de globine (Ochoa et de Haro, 1979) bien que ces cellules ne puissent synthétiser d'ARN. On observe simultanément une augmentation de la taille et de la quantité des polysomes.

Modulation sélective. — La moisissure *Dictyostelium discoideum* fournit un exemple rigoureusement analysé de la modulation de la synthèse protéique (Alton et Lodish, 1977). Chez cet organisme la différenciation peut être déclenchée par le jeûne. En quelques minutes, la synthèse de 5 protéines est totalement arrêtée alors que celle d'autres protéines est ralentie. Le nombre des ribosomes libres s'accroît ; la taille moyenne des polysomes est diminuée. La distribution des messagers est altérée ; 30 p. 100 des molécules ne sont plus attachées aux ribosomes. Cependant la quantité de messagers traductibles *in vitro* n'est pas modifiée. En particulier, les protéines non synthétisées *in vivo* peuvent être synthétisées dans un milieu acellulaire. Tous ces phénomènes sont réversibles et il n'y a pas de dégradation particulièrement élevée ou sélective des ARNs messagers.

Stockage des ARNs messagers. — Le stockage des messagers dans un état non traductible est un fait bien établi, couramment observé dans les organismes quiescents. Un bon exemple en est donné par les cystes d'*Artemia salina* (Grosfeld et Littauer, 1975 ; Sierra, Filipowicz et Ochoa, 1976) qui avant hydratation ne synthétisent pas de protéines et renferment au sein de particules ribonucléoprotéiques des ARNs messagers qui, en cet état, ne dirigent pas la synthèse protéique *in vitro* mais deviennent parfaite-

ment actifs lorsqu'ils ont été débarrassés des protéines qui les accompagnent. Il semble que le spectre des protéines synthétisées dans ces conditions diffère de celui observé lorsque le système est programmé avec du messenger polysomal. Des formes de stockage analogues ont été rencontrées chez de nombreuses cellules végétales (Ihle et Dure III, 1969) et animales (Civelli *et al.*, 1976 ; Buckingham *et al.*, 1974).

Puisque ces résultats, obtenus dans des systèmes biologiques intacts, sans mettre en œuvre de manipulations biochimiques dénaturantes, montrent de manière univoque qu'il peut y avoir un écart sensible, temporaire ou permanent, entre la nature, la quantité et les proportions des protéines réellement élaborées et celles des protéines potentiellement inscrites dans les séquences des ARNs messagers présents dans le cytoplasme, je conclurai que la cellule peut, grâce à la souplesse d'utilisation de son appareil de traduction, interpréter les messages qui lui sont transmis et en tempérer l'urgence et la rigueur.

L'analyse bibliographique montre que, des trois étapes qui conduisent à l'élaboration des chaînes polypeptidiques : initiation, élongation et terminaison, c'est la première qui a été le plus souvent invoquée pour expliquer les modifications observées dans le rythme et l'orientation de la synthèse protéique. Il convient donc de définir l'« initiation », de caractériser les macromolécules qui y participent et d'analyser leur contribution aux différentes étapes de ce processus.

On entend par « initiation » l'ensemble des mécanismes qui associent le tARN initiateur acylé par la méthionine, l'ARN messenger et les deux sous-unités ribosomales (40 S et 60 S), en un complexe dans lequel les rapports des différents composants sont rigoureusement déterminés par la reconnaissance réciproque de sites structuraux spécifiques. Ces associations sont réalisées grâce à l'intervention de facteurs protéiques multiples, agissant de manière catalytique. Ces mécanismes nécessitent un apport d'énergie sous la forme d'ATP et de GTP.

Macromolécules protéiques impliquées dans l'« initiation »

Les facteurs d'initiation constituent une famille de protéines obtenues par extraction saline des ribosomes. Ces préparations brutes ont été décomposées en 7 constituants, pour la plupart purifiés, dont certaines caractéristiques moléculaires ont été établies (Schreier, Erni et Staehelin, 1977), et dont les propriétés fonctionnelles spécifiques ont été déterminées en mesurant l'effet de l'addition de chacun d'eux à des milieux acellulaires minutieusement reconstitués (Trachsel *et al.*, 1977). La nomenclature la plus récente utilise l'abréviation générale eIF (eucaryotic initiation factor) suivie d'un numéro et éventuellement d'une lettre pour désigner les différents facteurs d'initiation et leurs sous-groupes.

Le facteur eIF-2 se compose de 3 sous-unités dont les poids moléculaires approximatifs sont respectivement 38 000 (sous-unité α), 48 000 et 52 000 daltons. Sa présence est indispensable pour associer le tARN initiateur acylé, la particule 40 S et le GTP. Le facteur eIF-3 qui a un coefficient de sédimentation de 15 S a une structure particulièrement complexe et comprend au moins 9 sous-unités dont les poids moléculaires s'échelonnent entre 35 000 et 160 000 daltons. Les facteurs eIF-4 A, eIF-4 B et eIF-4 C sont monomériques. Leurs poids moléculaires respectifs sont de 50 000, 82 000 et

19 000 daltons. eIF-3, eIF-4 A, eIF-4 B et eIF-4 C permettent, en présence d'ATP, l'union de l'ARN messager au complexe [Met-tARN initiateur . 40 S . GTP]. L'association de ce dernier à la particule 60 S est catalysée par le facteur eIF-5 constitué par une seule chaîne protéique de poids moléculaire 160 000 daltons. Elle s'accompagne de l'hydrolyse du GTP ; le complexe fonctionnel final est donc constitué par l'association [80 S . Met-tARN i . 40 S . GTP]. Ces données qui fournissent une image simplifiée de l'initiation dans son ensemble nous laissent cependant ignorants de la nature des signaux reconnus par les différentes molécules et des contacts qui s'établissent entre elles.

Macromolécules nucléiques impliquées dans l'« initiation »

ARN messenger.

Après leur passage dans le cytoplasme les ARNs messagers eucaryotiques qui ont subi leur maturation dans le noyau se présentent comme une séquence nucléotidique de longueur variable que l'on peut diviser artificiellement en divers fragments, échelonnés de l'extrémité 5' à l'extrémité 3'. L'extrémité 5' est caractérisée par la présence d'une structure particulière dénommée « cap » dont la forme générale est $m^7Gppp X^m-Y^m-Z_p$ (Shatkin, 1976), et dont les particularités sont les suivantes :

- Le résidu 7-méthyl guanylique terminal et l'avant-dernier nucléotide sont unis par leurs groupes 5'-hydroxyl, par l'intermédiaire d'un pont triphosphate.
- La méthylation de la guanosine en position 7 a pour conséquence l'acquisition d'une charge positive qui neutralise partiellement les groupements phosphate.
- Les résidus X et Y peuvent être méthylés sur le ribose. Cette modification stabilise les liaisons 3'-5'. Les bases X et Y peuvent être une quelconque des 4 bases classiques. De plus X peut être représenté par la 6-méthyladénine.

On distingue trois types de « cap » : le « cap 0 » ne possède pas d'autre méthylation que celle du résidu guanylique terminal ; le « cap 1 » a une méthylation supplémentaire sur le ribose de l'avant-dernier nucléotide ; le « cap 2 » est encore plus modifié puisqu'il présente une méthylation additionnelle sur le ribose de l'antépénultième nucléotide.

Faisant suite au « cap » se trouve une séquence dite « leader » dont la longueur peut varier entre approximativement 20 et 120 nucléotides et qui s'étend jusqu'au premier triplet AUG. Cette séquence ne sera pas traduite.

On trouve ensuite la séquence significative, traduite, débutant par le triplet AUG et limitée à son extrémité 3' par un ou plusieurs signaux de terminaison.

Enfin, en aval des signaux de terminaison, s'étend à nouveau une séquence non traduite, de longueur variable, prolongée par un segment polyadénylique terminal constitué de 50 à 100 résidus. Quelques exceptions sont rencontrées : certains messagers viraux sont dépourvus de « cap » (Nomoto, Lee et Wimmer, 1976). Les messagers des histones n'ont pas de poly A (Wilson et Melli, 1977).

Il semble exister une différence essentielle entre les procaryotes et les eucaryotes (Grunberg-Manago et Gros, 1977) en ce qui concerne le mécanisme de l'initiation. Chez les premiers, l'association du messenger au complexe ternaire [fac-

teur. GTP. Met-tARN f] précéderait la fixation de la particule 30 S. Le messenger disposerait donc déjà d'un point d'ancrage précis constitué par l'appariement d'un triplet AUG avec l'anticodon du tARN initiateur. La particule 30 S pourrait alors se mettre en place par rapport à ce point de repère. Chez les eucaryotes, au contraire, la particule 40 S s'associe au complexe ternaire avant la fixation du messenger. L'association de l'ARN messenger à ce complexe débiterait par la reconnaissance du cap et la particule 40 S migrerait ensuite le long du messenger (Kozak, 1978) jusqu'à ce que l'anticodon du tARN initiateur vienne s'emboîter dans le premier codon AUG rencontré. Cet appariement verrouillerait définitivement le complexe et permettrait la fixation de la particule 60 S.

Il semble donc que les particularités structurales du messenger susceptibles d'intervenir dans la régulation de l'initiation doivent être principalement recherchées dans les séquences comprises entre l'extrémité 5' et le codon initiateur. Les modifications observées dans la nature du « cap » peuvent moduler son affinité pour la particule 40 S ou plutôt pour la protéine dite « cap binding protein » (24 000 daltons) qui gouverne l'association de ces deux composants (Sonenberg *et al.*, 1978).

Les diverses situations évoquées plus haut, quant à la nature des nucléotides X et Y et à l'étendue des méthylations rencontrées au niveau du « cap » montrent qu'il existe là des possibilités de modulation de l'affinité. En fait, chez certains virus synthétisés dans des cellules traitées par l'interféron, qui contiennent un inhibiteur de la méthylation, les formes hypométhylées de l'ARN viral sont moins efficacement traduites (Baglioni, 1979).

Le fragment « leader », chez les eucaryotes, ne présente pas de particularités structurales précises et à la différence de ce qui est observé chez les procaryotes (Steitz et Jakes, 1975) les appariements entre la séquence nucléotidique qui précède le codon initiateur et l'extrémité 3' de l'ARN ribosomal 18 S sont fortuits et imparfaits. Les ARNs messagers qui bénéficient de tels appariements peuvent cependant être favorisés par rapport à leurs congénères. Par contre, si le mécanisme proposé ci-dessus est exact, après avoir reconnu le « cap », la particule 40 S parcourra sur toute sa longueur la séquence « leader » et pourra n'être pas indifférente aux séquences qu'elle rencontre, certaines pouvant stimuler sa migration et d'autres provoquer son détachement.

tARN initiateur.

Cette molécule ne semble pas, du moins par ses particularités structurales, susceptible de moduler le processus de l'initiation, puisque la quasi-universalité de sa structure paraît établie dans le règne animal (Singhal et Fallis, 1979). Tout au plus, peut-on constater en consultant les séquences connues des ARNs messagers, que l'association de son anticodon avec le codon AUG est très souvent renforcée par un appariement G-C contigu.

Il est bien certain qu'il ne nous est permis de raisonner pour l'instant que sur des phénomènes immédiatement apparents comme la complémentarité des séquences nucléiques, ignorant tout des associations protéines-acides nucléiques, cependant essentielles, puisqu'elles interviennent dans la reconnaissance des messagers et du tARN initiateur par les différents facteurs et les protéines ribosomales. Dans ce

domaine, de grands progrès ont été réalisés chez les procaryotes au cours des cinq dernières années grâce à l'utilisation de techniques hautement résolutive (Cantor, 1979 ; Lake, 1979 ; Schulman, 1979). Il nous faudra cependant attendre de longues années pour atteindre chez les eucaryotes le même niveau de connaissance.

« *Translational control RNA* ».

J'ai évoqué plus haut l'existence de particules ribonucléiques messagères dans lesquelles l'ARN messager semble stocké sous une forme intraductible mais potentiellement active. L'intervention d'oligonucléotides (Lee-Huang *et al.*, 1977) ou d'acides nucléiques de petite taille (Bester, Kennedy et Heywood, 1975) a été invoquée pour expliquer ce phénomène. Le modèle le plus élaboré a été proposé par ces derniers auteurs sous le nom de tcRNA (translational control RNA). Au cours de sa maturation dans le noyau, la fragmentation du messager donnerait naissance à une molécule qui posséderait à la fois une séquence polyuridylique et des structures de reconnaissance complémentaires de l'extrémité 5' du messager dont elle est issue. Ces doubles possibilités d'appariement lui permettraient d'inhiber spécifiquement la traduction de l'ARN messager en le circularisant. Bien que l'existence du tcRNA soit encore insuffisamment étayée et que le mécanisme présenté soit hypothétique, l'établissement d'un lien entre la structure du précurseur d'un ARN messager et le contrôle cytoplasmique de son expression permettrait de comprendre des stimulations et des inhibitions apparemment sélectives de la synthèse protéique et jusqu'ici inexplicées.

Mécanismes généraux impliqués dans le contrôle de l'initiation

J'ai volontairement exclu de ce chapitre l'analyse détaillée de tous les cas particuliers recensés dans la littérature. Je pense qu'il est nécessaire d'interpréter ces données hétérogènes à la lumière des résultats obtenus au cours de l'étude approfondie de quelques systèmes favorables qui a permis de mettre en évidence un nombre limité de mécanismes biologiques de portée générale. Je décrirai donc la régulation de la synthèse protéique dans les lysats de réticulocytes et dans les cellules animales traitées par l'interféron. Je m'efforcerai de montrer que les résultats acquis dans ces deux systèmes sont susceptibles de généralisation.

Lysats de réticulocytes.

Les lysats de réticulocytes incubés à 30 °C en présence d'hémine (l'hémine est le groupement prosthétique de l'hémoglobine, protoporphyrine IX associée au fer III) synthétisent activement la globine à vitesse constante pendant plus d'une heure. En absence d'hémine, la vitesse de synthèse décroît rapidement après quelques minutes, puis se maintient à un niveau correspondant à 10 p. 100 de la vitesse initiale (London *et al.*, 1976). L'addition d'hémine, dans les minutes qui suivent le début de l'incubation, permet de maintenir sensiblement le régime maximal. Mais si cette addition est différée 5 min, la récupération est toujours incomplète. Ces résultats ont été interprétés comme témoignant de l'existence, dans les lysats, d'un proinhibiteur qui, en absence d'hémine, est transformé, d'abord réversiblement puis irréversiblement, en inhibiteur activé (HCI = haemin controled inhibitor) (Farrell *et al.*, 1977).

L'inhibition de la synthèse de globine s'accompagne de la désagrégation des polysomes, de la libération des chaînes protéiques naissantes et de la disparition du complexe ternaire [GTP . Met-tARN i . 40 S]. L'addition, au lysat dépourvu d'hémine, du facteur d'initiation eIF-2 restaure au moins partiellement la synthèse de globine (Clemens, 1976). Le proinhibiteur est une protéine qui a été purifiée (Ranu et London, 1976). Il peut être activé par incubation à 37 °C et par traitement avec les réactifs des groupements thiol (Gross et Rabinovitz, 1972). L'inhibiteur activé, introduit dans un lysat, reproduit, même en présence d'hémine, les perturbations signalées plus haut et le facteur eIF-2 peut ici encore contrecarrer ses effets. L'action de l'inhibiteur dépend de la présence d'ATP. Cette protéine possède une activité protéine-kinasique et phosphoryle la sous-unité α de eIF-2 (Das *et al.*, 1979). Il semble que cette phosphorylation interdise sinon la formation du complexe d'initiation, du moins le recyclage du facteur qui n'est donc utilisé qu'une seule fois et devient rapidement limitant (Cherbas et London, 1976).

Selon de Haro, Datta et Ochoa (1978) le facteur phosphorylé ne pourrait être reconnu par une protéine dite ESP (eIF-2 stimulating protein) qui intervient lors de la formation du complexe binaire [GTP . eIF-2]. L'activation de l'inhibiteur et la phosphorylation de eIF-2 s'accompagnent de l'apparition d'une protéine phosphorylée qui peut bien être l'inhibiteur activé lui-même (Farrell *et al.*, 1977). Le mécanisme du contrôle de l'inhibition est expliqué par Datta *et al.* (1977) de la manière suivante :

— La transformation du proinhibiteur en inhibiteur activé est réalisée par l'intermédiaire d'une protéine kinase cyclique AMP dépendante.

— L'hémine, qui a une grande affinité pour la sous-unité régulatrice de cette enzyme, entre en compétition avec le cAMP et bloque son fonctionnement. Il n'y a donc pas activation de l'inhibiteur en présence d'hémine.

— La globine, lorsqu'elle est synthétisée, se fixe à l'hémine et la détache de la kinase. En absence d'hémine, la kinase activée par le cAMP peut phosphoryler et donc activer le proinhibiteur.

— Dans les conditions physiologiques, une activité phosphatasique latente serait suffisante pour déphosphoryler l'inhibiteur activé et le facteur eIF-2 (Safer et Jagus, 1979).

Cellules incubées en présence d'interféron.

Les interférons sont des glycoprotéines synthétisées par les cellules animales après infection virale ou après induction par de multiples substances parmi lesquelles les ARN double-brin (ds ARN = double-strandel RNA) naturels ou synthétiques. Ces protéines déclenchent dans la cellule un état antiviral et diffusent vers d'autres cellules qui deviennent alors incapables d'assurer la multiplication des virus en raison d'une inhibition relativement sélective de la traduction des messagers viraux (Baglioni, 1979). Dans les extraits de cellules traitées par l'interféron pendant quelques heures, l'addition de très faibles quantités de ds ARN (≈ 20 ng/ml) provoque une inhibition de la synthèse des protéines virales comme de celles de l'hôte. Les symptômes biochimiques observés sont, comme dans le cas des lysats de réticulocytes, la réduction importante du complexe d'initiation [GTP . eIF-2 . 40 S . Met-tRNA i] et la phosphorylation de la sous-unité α du facteur eIF-2 (Lebleu *et al.*, 1976). On constate de plus une dégrada-

tion des ARNs messagers et une inhibition du mécanisme d'élongation. Ces phénomènes peuvent être expliqués ainsi :

— L'interféron induit dans la cellule la synthèse de deux protéines enzymatiques. L'une est une protéine kinase cAMP indépendante (DAI = double stranded activated inhibitor) (Kimchi *et al.*, 1979b), l'autre est une oligoisoadénylate synthétase (Minks *et al.*, 1979).

— L'activité enzymatique de ces deux protéines ne peut s'exprimer qu'après activation préalable par le ds ARN et l'ATP, vraisemblablement par l'intermédiaire de protéine kinases ds ARN dépendantes (Ochoa *et de Haro*, 1979). Dans ces conditions la protéine kinase DAI peut phosphoryler le facteur d'initiation eIF-2 avec les conséquences que l'on sait et l'oligoisoadénylate synthétase, en présence d'ATP, catalyse la synthèse d'un polymère de l'AMP, comprenant 4 à 7 résidus, atypique par les liaisons 2'-5' phosphodiester qu'il renferme et de ce fait résistant aux ribonucléases. Cet oligonucléotide est activateur d'une endonucléase préexistante dans la cellule, dite ribonucléase F, qui dégrade essentiellement les ARNs messagers (Slattery *et al.*, 1979).

— La phosphorylation du facteur d'initiation et la dégradation des ARNs messagers sont en permanence contrebalancées d'une part par l'action d'une protéine phosphatase (Kimchi *et al.*, 1979a) et d'autre part par l'action d'une phosphodiesterase spécifique qui, dégradant l'oligoisoadénylate, désactive la ribonucléase F (Schmidt *et al.*, 1979). Par contre, une action parasite de cette phosphodiesterase aboutit à l'amputation de l'extrémité acceptrice des ARNs de transfert, équilibrée par l'action réparatrice de la CCAase (ATP (CTP) : tRNA nucléotidyltransférase). Cette dégradation aspécifique pénalise les tARNs les moins abondants et a pu faire croire à une disparition sélective de certains tARNs isoaccepteurs.

En résumé, dans les deux systèmes étudiés, l'inhibition de la traduction résulte, en premier lieu, de l'inactivation par phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2. Cette phosphorylation est assurée par deux protéines kinases cAMP indépendantes, différentes, l'une constitutive chez les réticulocytes, l'autre induite dans les cellules traitées par l'interféron. Ces deux enzymes sont elles-mêmes activées, chez les réticulocytes, par une kinase cAMP dépendante et chez les cellules traitées par l'interféron, par une kinase ds ARN dépendante. Par contre, la régulation est apparemment plus complète dans le système « interféron » puisque l'action inhibitrice se manifeste également au niveau des messagers polysomiaux et du tARN. Elle est également mieux modulée puisque ces actions lytiques sont enzymatiquement contrôlées.

Ces différences s'atténuent et les mécanismes qui ont été décrits apparaissent susceptibles de généralisation si l'on considère les faits expérimentaux suivants :

— Dans les lysats de réticulocytes, même en présence d'hémine, l'addition de faibles quantités de ds ARN naturel ou synthétique permet l'activation d'un proinhibiteur qui acquiert ainsi une activité protéine kinase et phosphoryle la sous-unité α de eIF-2 (Levin, Petryshyn *et London*, 1980). A nouveau, l'inhibition qui en résulte peut être levée par addition de ce facteur. Bien que, dans les réticulocytes, les inhibiteurs, activés en absence d'hémine et en présence de ds ARN aient la même action, ce sont deux protéines différentes (Ochoa *et de Haro*, 1979).

— Il existe dans de nombreuses cellules : hépatocytes de rat (Delaunay *et al.*, 1977), cellules d'ascites d'Ehrlich (Clemens *et al.*, 1976), cellules leucémiques de Friend (Pin-

phanichakarn, Kramer et Hardesty, 1977), des inhibiteurs semblables à l'inhibiteur contrôlé par l'hémine. Tous phosphorylent la même sous-unité α de eIF-2 sur le même résidu sérine comme le font également les inhibiteurs activés par le ds ARN (Ranu, 1980).

— Chez les réticulocytes, même en présence d'hémine, il existe un faible niveau de phosphorylation de eIF-2 (Ernst *et al.*, 1980). Ces cellules contiennent également une protéine phosphatase capable de déphosphoryler ce facteur (Safer et Jagus, 1979).

— L'oligoisoadénylate synthétase est largement distribuée dans les cellules de mamifères et l'oligoisoadénylate n'est pas l'apanage des cellules traitées par l'interféron. Les quantités synthétisées par heure varient considérablement suivant l'origine de la cellule, son état physiologique et les traitements qu'elle a subis. Il apparaît que les tissus en involution (glande mammaire pendant le sevrage, oviducte après suppression de la stimulation œstrogénique) contiennent des quantités importantes de cet inhibiteur (Stark *et al.*, 1979).

Discussion.

Nous avons mis en lumière quelques mécanismes généraux qui permettent à la cellule de suspendre la synthèse de protéines indésirables, d'utiliser, de stocker ou de détruire suivant ses besoins les messages qu'elle reçoit et de neutraliser par l'auto-régulation de leurs activités antagonistes les armes dont elle dispose. L'appareil de traduction étant à peu près universel chez les eucaryotes comme en témoigne la possibilité de faire synthétiser de la caséine de brebis par le germe de blé (Gaye *et al.*, 1977) ou de la globine de lapin par l'oocyte de xénope (Gurdon, Woodland et Lingrel, 1974), il ne faut pas s'étonner qu'un nombre limité de moyens identiques, sans doute sélectionnés pour leur efficacité, soient mis à la disposition de toutes les cellules, qu'il s'agisse pour elles de lutter contre les agressions virales, d'assurer la production coordonnée et équilibrée des protéines qu'elles synthétisent, ou de réagir à une modification soudaine de leur milieu nutritif. Cette uniformité est rassurante car elle signifie que la mesure d'un nombre limité d'activités enzymatiques permet d'apprécier la réaction de toute cellule à des sollicitations apparemment différentes. Dans le cas des protéines kinases, la similitude rigoureuse de leur cible (Ranu, 1980) semble indiquer que la phosphorylation de la sous-unité α de eIF-2 est bien le but recherché et non un épiphénomène qui masque des altérations plus essentielles mais non encore décelées du système de traduction. L'équilibre réalisé par l'action opposée des protéines kinases et des protéines phosphatases rappelle les mécanismes d'activation et d'inactivation utilisés dans la synthèse et la dégradation du glycogène (Villar-Palasi et Larner, 1970 ; Hers, 1976). Peut-être l'activation d'une nucléase par l'oligoisoadénylate ne diffère-t-elle pas fondamentalement de l'activation d'une protéine kinase par l'AMP cyclique. On peut par ailleurs s'étonner de l'ubiquité de l'oligoisoadénylate synthétase (Stark *et al.*, 1979), une enzyme qui paraissait être spécifiquement induite par l'interféron et de son niveau particulièrement élevé, en tant que protéine constitutive, dans les réticulocytes. Par contre son absence chez le xénope pourrait expliquer en partie la grande stabilité des messagers injectés dans les oocytes de cet animal.

La solidité des mécanismes biochimiques que j'ai détaillés semble assurée par la concordance des résultats obtenus dans de nombreux laboratoires. Pourtant ceux-ci

aboutissent apparemment au court-circuitage ou à la destruction d'éléments nécessaires à la traduction plutôt qu'à la régulation fine de cell-ci. On peut cependant penser que les phénomènes observés en milieu acellulaire représentent les effets de réactions enzymatiques dont les vitesses respectives sont imparfaitement contrôlées et que dans les organismes intacts ces effets sont constamment atténués par un juste équilibre entre des réactions antagonistes. Les vitesses d'initiation varieraient *in vivo* dans des plages relativement limitées et ces variations pourraient engendrer une véritable modulation de la traduction comme le suggère la théorie proposée par Lodish (1976).

Cette théorie prévoit que dans tout système où la vitesse d'initiation est modifiée sans que soit altérée la vitesse d'élongation et de terminaison, les proportions relatives des protéines traduites peuvent être bouleversées. La différence d'affinité des divers messagers pour les ribosomes fait que tout événement qui modifie la vitesse d'initiation, dans le cas d'une stimulation, favorise la traduction des messagers à faible affinité et dans le cas d'une inhibition, pénalise la traduction des mêmes molécules. Ceci explique les variations des rapports respectifs entre les diverses protéines synthétisées. Ainsi la stimulation apparemment sélective de la synthèse de certaines protéines ne serait que la manifestation d'une stimulation globale dans un système peu actif. La théorie de Lodish qui permet d'envisager de manière relativement simple la possibilité d'une régulation de la traduction est appuyée sur des faits expérimentaux précis et explique bien, en particulier, les variations des quantités respectives des globines α et β qui ont souvent été observées. Par contre elle se montre parfois défailante. Elle ne peut expliquer, par exemple, la compétition entre les messagers de l'hôte et du virus dans l'infection par le virus de l'encéphalo-myocardite. Golini *et al.* (1976), utilisant les équations de Lodish calculent que dans ce cas, la réduction aspécifique de la vitesse d'initiation ne peut rendre compte que d'une faible variation du rapport protéines virales sur protéines cellulaires, alors que les résultats expérimentaux montrent que ce rapport est multiplié par 5. Cette anomalie peut toutefois s'expliquer par le fait que le messenger du virus de l'encéphalo-myocardite ne possède pas de « cap ». Si l'infection virale a pour conséquence l'inactivation de la « cap binding protein » (Sonenberg *et al.*, 1978), il s'ensuit que les messagers de l'hôte ne peuvent plus s'exprimer et que la théorie de Lodish ne peut s'appliquer puisqu'il n'y a plus ici de compétition réelle entre ces derniers et le messenger viral. Les résultats de Sonenberg *et al.* (1980) semblent confirmer cette interprétation.

Bien que l'hypothèse d'une régulation de la traduction basée sur les seuls processus que j'ai évoqués paraisse simplificatrice et insuffisante, l'intervention d'un mécanisme conduisant à une modification simple et réversible d'un élément catalytique indispensable au déclenchement de la synthèse protéique peut être envisagée avec intérêt. Il faut toutefois que soient dissipées les incertitudes relatives à l'inactivation réelle de eIF-2, consécutive à la phosphorylation (Revel et Groner, 1978), et que soit (ent) identifiée(s) la (ou les) molécule(s) qui dans les conditions physiologiques, interviennent, à l'image de l'hémine ou de l'interféron, dans l'induction ou la stimulation des activités enzymatiques impliquées dans le contrôle de la traduction.

References

- ALTON T. H., LODISH H. F., 1977. Translational control of protein synthesis during the early stages of differentiation of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Cell*, **12**, 301-310.
- BAGLIONI C., 1979. Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antiviral state. *Cell*, **17**, 255-264.
- BESTER A. J., KENNEDY D. S., HEYWOOD S. M., 1975. Two classes of translational control RNA : their role in the regulation of protein synthesis. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1523-1527.
- BORUN T. W., GABRIELLI F., AJIRO K., ZWEIDLER A., BAGLIONI C., 1975. Further evidence of transcriptional and translational control of histone messenger RNA during the HeLa S3 cycle. *Cell*, **4**, 59-67.
- BUCKINGHAM M. E., COHEN A., CAPUT D., WHALEN R. G., GROS F., 1974. The synthesis and stability of cytoplasmic messenger RNA during myoblast differentiation in culture. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1466-1470.
- CANTOR C. R., 1979. tRNA-ribosome interactions, 363-392. In P. R. SCHIMMEL *et al.* *Transfer RNA : Structure, Properties and Recognition*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- CIVELLI O., VINCENT A., BURI J. F., SCHERRER K., 1976. Evidence for a translational inhibitor linked to globin mRNA in untranslated free cytoplasmic messenger ribonucleoprotein complexes. *FEBS Letters*, **72**, 71-76.
- CHERBAS L., LONDON I. M., 1976. On the mechanism of delayed inhibition of protein synthesis in heme-deficient rabbit reticulocyte lysates. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3506-3510.
- CLEMENS M. J., 1976. Functional relationships between a reticulocyte polypeptide-chain-initiation factor (IF-MP) and the translational inhibitor involved in regulation of protein synthesis by haemin. *Eur. J. Biochem.*, **66**, 413-422.
- CLEMENS M. J., PAIN V. M., HENSHAW E. C., LONDON I. M., 1976. Characterization of a macromolecular inhibitor of polypeptide chain initiation from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **72**, 768-775.
- DAS A., RALSTON R. O., GRACE M., ROY R., GHOSH-DASTIDAR P., DAS H. K., YAGHMAI B., PALMIERI S., GUPTA N. K., 1979. Protein synthesis in rabbit reticulocytes : mechanism of protein synthesis inhibition by heme-regulated inhibitor. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5076-5079.
- DATTA A., de HARO C., SIERRA J. M., OCHOA S., 1977. Mechanism of translational control by hemin reticulocyte lysates. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3326-3329.
- DELAUNAY J., RANU R. S., LEVIN D. H., ERNST V., LONDON I. M., 1977. Characterization of a rat liver factor that inhibits initiation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2264-2268.
- ERNST V., LEVIN D. H., LEROUX A., LONDON I. M., 1980. Site-specific phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor eIF-2 by the heme-regulated and double-stranded-RNA-activated eIF-2 α kinases from rabbit reticulocyte lysates. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 1286-1290.
- FARRELL P. J., BALKOW K., HUNT T., JACKSON R. J., 1977. Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell*, **11**, 187-200.
- GAYE P., GAUTRON J. P., MERCIER J. C., HAZE G., 1977. Amino terminal sequences of the precursors of ovine caseins. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **79**, 903-911.
- GOLINI F., THACH S. S., BIRGE C. H., SAFER B., MERRICK W. C., THACH R. E., 1976. Competition between cellular and viral mRNAs *in vitro* is regulated by a messenger discriminatory initiation factor. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3040-3044.
- GROSFELD H., LITTAUER U. Z., 1975. Cryptic form of mRNA in dormant *Artemia salina* cysts. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **67**, 176-181.
- GROSS M., RABINOVITZ M., 1972. Control of globin synthesis by hemin : factors influencing formation of an inhibitor of globin chain initiation in reticulocyte lysates. *Biochim. biophys. Acta*, **287**, 340-352.
- GRUNBERG-MANAGO M., GROS F., 1977. Initiation mechanisms of protein synthesis. In *Progr. nucl. Ac. Res. mol. Biol.*, **20**, 209-284. Acad. Press, New York, San Francisco. London.

- GURDON J. B., WOODLAND H. R., LINGREL J. B., 1974. The translation of mammalian globin mRNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Develop. Biol.*, **39**, 125-133.
- HARO (de) V. C., DATTA A., OCHOA S., 1978. Mode of action of the hemin-controlled inhibitor of protein synthesis. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 243-247.
- HERS H. G., 1976. The control of glycogen metabolism in the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 167-189.
- HILLE M. B., ALBERS A. A., 1979. Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature*, **278**, 469-471.
- IHLE J. N., DURE III L., 1969. Synthesis of a protease in germinating cotton cotyledons catalyzed by mRNA synthesized during embryogenesis. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **36**, 705-710.
- KIMCHI A., SHULMAN L., SCHMIDT A., CHERNAJOVSKY Y., FRADIN A., REVEL M., 1979a. Kinetics of the induction of three translation-regulatory enzymes by interferon. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3208-3212.
- KIMCHI A., ZILBERSTEIN A., SCHMIDT A., SHULMAN L., REVEL M., 1979b. The interferon-induced protein kinase PK-i from mouse L cells. *J. biol. Chem.*, **254**, 9846-9853.
- KOZAK M., 1978. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, **15**, 1109-1123.
- LAKE J. A., 1979. Ribosome structure and tRNA binding sites, 393-411. In P. R. SCHIMMEL *et al.* *Transfer RNA : Structure, Properties and Recognition*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- LEBLEU B., SEN G. C., SHAILA S., CABRER B., LENGYEL P., 1976. Interferon, double-stranded RNA and protein phosphorylation. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3107-3111.
- LEE-HUANG S., SIERRA J. M., NARANJO R., FILIPOWICZ W., OCHOA S., 1977. Eucaryotic oligonucleotides affecting mRNA translation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 276-287.
- LEVIN D. H., PETRYSHYN R., LONDON I. M., 1980. Characterization of double-stranded-RNA-activated kinase that phosphorylates α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 α) in reticulocyte lysates. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 832-836.
- LODISH H. F., 1976. Translational control of protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 39-72.
- LONDON I. M., CLEMENS M. J., RANU R. S., LEVIN D. H., CHERBAS L. F., ERNST V., 1976. The role of hemin in the regulation of protein synthesis in erythroid cells. *Fed. Proc.*, **35**, 2218-2222.
- MINKS M. A., BENVIN S., MARONEY P. A., BAGLIONI C., 1979. Synthesis of 2'-5'-oligo (A) in extracts of interferon treated HeLa cells. *J. biol. Chem.*, **254**, 5058-5064.
- NOMOTO A., LEE Y. F., WIMMER E., 1976. The 5' end of poliovirus mRNA is not capped with m⁷G, (5') ppp (5') Np. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 375-380.
- OCHOA S., de HARO C., 1979. Regulation of protein synthesis in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 549-580.
- PAIN V. M., HENSHAW E. C., 1975. Initiation of protein synthesis in Ehrlich ascites tumour cells. *Eur. J. Biochem.*, **57**, 335-342.
- PINPHANICHAKARN P., KRAMER G., HARDESTY B., 1977. Partial purification and characterization of a translational inhibitor from Friend leukemia cells. *J. biol. Chem.*, **252**, 2106-2112.
- RANU R. S., 1980. Regulation of protein synthesis in eukaryotes by the protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *FEBS Letters*, **112**, 211-215.
- RANU R. S., LONDON I. M., 1976. Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates : Purification and initial characterization of the cyclic 3' : 5'-AMP independent protein kinase of the heme-regulated translational inhibitor. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 4349-4353.
- REVEL M., GRONER Y., 1978. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 1079-1126.
- ROSE J. K., TRACHSEL H., LEONG K., BALTIMORE D., 1978. Inhibition of translation by poliovirus : inactivation of a specific initiation factor. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 2732-2736.
- SAFER B., JAGUS R., 1979. Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysates. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1094-1098.
- SCHMIDT A., CHERNAJOVSKY Y., SHULMAN L., FEDERMAN P., BERISSI H., REVEL M., 1979. An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2'-5') oligoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4788-4792.
- SCHREIER M. H., ERNI B., STAEHELIN T., 1977. Initiation of mammalian protein synthesis. *J. mol. Biol.*, **116**, 727-753.

- SCHULMAN L. D., 1979. Chemical approaches to the study of protein-tRNA recognition, 311-324. In P. R. SCHIMMEL *et al.*, *Transfer RNA : Structure, Properties and Recognition*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- SHATKIN A. J., 1976. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*, **9**, 645-653.
- SIERRA J. M., FILIPOWICZ W., OCHOA S., 1976. Messenger RNA in undeveloped and developing *Artemia salina* embryos. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **69**, 181-189.
- SINGHAL R. P., FALLIS A. M., 1979. Structure, function, and evolution of transfer RNAs. In *Progr. nucl. Ac. Res. mol. Biol.*, **23**, 228-275. Acad. Press, New York, San Francisco, London.
- SLATTERY E., GHOSH N., SAMANTA H., LENGYEL P., 1979. Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation : activation of an endonuclease by (2'-5') A_n. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4778-4782.
- SONENBERG N., MORGAN M. A., MERRICK W. C., SHATKIN A. J., 1978. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 4843-4847.
- SONENBERG N., TRACHSEL H., HECHT S., SHATKIN A. J., 1980. Differential stimulation of capped mRNA translation *in vitro* by cap binding protein. *Nature*, **285**, 331-333.
- STARK G. R., DOWER W. J., SCHIMKE R. T., BROWN R. E., KERR I. M., 1979. 2-5 A synthetase : assay, distribution and variation with growth or hormone status. *Nature*, **278**, 471-473.
- STEITZ J. A., JAKES K., 1976. How ribosomes select initiator regions in mRNA : base pair formation between the 3' terminus of 16 S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4734-4738.
- TRACHSEL H., ERNI B., SCHREIER M. H., STAEHELIN T., 1977. Initiation of mammalian protein synthesis. *J. mol. Biol.*, **116**, 755-767.
- VILLAR-PALASI C., LARNER J., 1970. Glycogen metabolism and glycolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 639-672.
- WILSON M. C., MELLI M., 1977. Determination of the number of histone genes in human DNA. *J. mol. Biol.*, **110**, 511-535.
-