

METHYLATION DU tRNA DANS DES CULTURES DE GONADES DE *CARCINUS MAENAS*: INHIBITION PAR UN EXTRAIT PURIFIÉ DES GLANDES ANDROGENES

Ali TEKITEK, Josette BERREUR-BONNENFANT, Margarita ROJAS, Jean-Pierre FEREZOU,
Michel BARBIER et Edgar LEDERER

*Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif sur Yvette, France et Laboratoire de Biologie
et de Génétique Evolutive, CNRS, 91190 Gif sur Yvette France*

Received 20 May 1977

SUMMARY

Subcultures of ovaries and testis of the crab *Carcinus maenas* have been performed in the presence of L-[Me-¹⁴C]methionine. Introduction in the medium of a chromatographically-purified liposoluble fraction from the androgenic glands of the same animal inhibits the biological methylation of the tRNA of the ovaries by 62%. The inhibition of methylation of five individual bases varies from 45% to 84%. No inhibition of tRNA methylation is observed under the same conditions with testis subcultures.

1. Introduction

On sait que la glande androgène des Crustacés induit la spermatogénèse chez les mâles. Elle produit le même effet chez les femelles auxquelles on l'a implantée et inhibe la vitellogénèse dans leurs ovaires [1]. Dans un précédent travail [2] nous avons montré qu'une fraction éthérosoluble purifiée des glandes androgènes du Crabe *Carcinus maenas* inhibait in vitro la méthylation d'un tRNA de *E. coli* B, en utilisant la S-adénosylméthionine comme donneur de groupes méthyles et comme source de méthylases, une préparation enzymatique brute provenant aussi bien des ovaires que des testicules du même animal. Cette observation est inattendue car on aurait dû retrouver in vitro une action différente des produits de la glande androgène sur les enzymes des ovaires d'une part et des testicules d'autre part. Pour étudier ce phénomène, nous avons réalisé des essais sur des cultures d'organes; nous rapportons ici les résultats obtenus en incubant des cultures d'ovaires ou de testicules de Crabes avec la fraction purifiée obtenue des glandes androgènes.

2. Matériels et méthodes

Le milieu de culture a la composition suivante; eau de mer filtrée 1 ml, glucose 1 mg, L-[Me-¹⁴C]méthionine 2,5 µCi (53 mCi/mmol) pénicilline 100 UI. Pour chaque organe, ovaires ou testicules, deux lots sont comparés; l'un est soumis à l'action de l'extrait des glandes androgènes [3] 40 µg d'extrait purifié (correspondant à 40 glandes) dans 10 µl d'éthanol, sont ajoutés par ml de milieu; l'autre sert de culture témoin; on y ajoute 10 µl d'éthanol par ml. Les ovaires ou les testicules sont fragmentés et répartis dans 40 salières contenant chacune 1 ml de milieu et incubés pendant 6 heures à 20°C.

Après incubation, les tissus sont lavés par l'eau de mer puis broyés dans 5 volumes d'une solution 1 M NaCl 0,005 M EDTA dans 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5). On précipite par un volume égal de phénol saturé d'eau. La phase aqueuse séparée par centrifugation est extraite une deuxième fois par le même volume de phénol [4]. Les RNA sont ensuite précipités à partir de la phase aqueuse par addition de 2,5 volumes d'éthanol à 95% contenant 2% d'acétate de potassium.

Après une nuit à -20°C , le précipité est récupéré par centrifugation, amené à sec, repris par une solution 1 M NaCl dans 0,1 M Tris-HCl (pH 7,8) [5]. Les tRNA et des traces de DNA sont précipités de la solution par l'éthanol comme ci-dessus. On reprend après la centrifugation par 1 M Tris-HCl (pH 9) afin de libérer les tRNA des amino-acides (une heure à 23°C).

On précipite de nouveau par l'éthanol-acétate de potassium. Une précipitation fractionnée par l'iso-propanol fournit les tRNA purifiés [6]; ils sont dosés spectrophotométriquement à 260 nm en utilisant une gamme de tRNA de *E. coli* comme référence.

Pour l'hydrolyse, les tRNA sont repris par une solution de HCl 1 N, à laquelle on ajoute des composés méthylés standard : 1-méthyl adénine, N_2 -méthyl-guanosine, N_2^2 -diméthylguanosine, on porte à 100°C en tube scellé une heure. L'hydrolysate amené à sec sous vide est dissous dans le minimum d'eau puis analysé par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose (Eastman-Kodak). Le système *n*-BuOH/ H_2O / NH_4OH , 86:10:4 est utilisé pour le premier développement et le système iPROH/HCl conc./ H_2O , 67:17:16 pour le deuxième [7]. Les bases sont visualisées en lumière ultra-violette et récupérées avec la cellulose par grattage. On compte les radioactivités sur les poudres mises en suspension

dans le toluène scintillant. Un blanc est réalisé avec une zone de la couche mince n'ayant pas d'absorption en lumière ultra-violette. Les radioactivités sont mesurées sur un appareil Intertechnique SL 30 et les valeurs présentées sont corrigées.

3. Résultats et conclusions

Après les incubations, le poids des ovaires était de 1,5 g (poids frais) pour les témoins et 1,6 g pour l'essai avec l'extrait des glandes androgènes. Les tRNA isolés à partir de ce matériel contenaient une radioactivité de $1,18 \cdot 10^4$ dpm/mg pour les témoins et $4,5 \cdot 10^3$ dpm/mg pour l'essai, soit une inhibition de 62%. Après hydrolyse et chromatographie, cinq dérivés méthylés ont été isolés; le tableau présente leur radioactivité. L'inhibition moyenne de la méthylation est ici de 66%.

Des essais parallèles réalisés dans les mêmes conditions sur des testicules de Crabe (soit 1,6 g pour les essais et 1,7 g pour les témoins) montrent qu'il n'y a pas d'action inhibitrice de l'extrait des glandes androgènes. Les tRNA isolés à partir des testicules possédaient une radioactivité de $3,9 \cdot 10^3$ dpm/mg pour le témoin et $4,1 \cdot 10^3$ dpm/mg pour l'essai; la répartition des radioactivités dans les produits méthylés isolés figure au tableau 1.

Tableau 1

Dérivés méthylés	Ovaires			Testicules	
	Témoin	Essai	Inhibitions %	Témoin	Essai
5-Méthyluridine phosphate	700	382	45	230	235
5-Méthylcytidine phosphate	1570	442	72	480	540
1-Méthyladénine	1160	277	76	65	115
N_2 -Méthylguanine	1150	495	57	280	290
N_2^2 -Diméthyl-guanine	330	52	84	245	165
Inhibition moyenne des méthylations			66		

Incorporations (dpm) de la radioactivité du groupe [$\text{Mé-}^{14}\text{C}$]méthionine dans les dérivés méthylés du tRNA isolé d'ovaires et de testicules de crabes *Carcinus maenas* incubés en absence ou en présence d'extraits de glandes androgènes (valeurs correspondant pour chaque substance à 1 mg de tRNA). L'erreur expérimentale sur ces mesures est d'environ $\pm 10-15\%$ (dpm).

Ces résultats montrent que la fraction éthéro-soluble purifiée isolée des glandes androgènes inhibe la méthylation des bases du tRNA d'ovaires de crabes maintenus en culture; elle ne modifie pas la méthylation des bases du tRNA des testicules. Nous avons établi d'autre part que le même extrait (ou des broyats de glandes androgènes) inhibe l'incorporation de leucine dans les ovaires d'*Orchestia gammarellus* (crustacé amphipode) et inhibe la vitellogénèse chez ces animaux. Au contraire, les broyats de glandes androgènes n'altèrent pas l'incorporation de la leucine dans les testicules d'*Orchestia gammarellus* [8]. L'action des glandes androgènes sur l'ovaire se manifeste donc par une inhibition, que l'on considère l'incorporation d'un acide aminé dans les protéines ou celle d'un groupe méthylé dans les bases du tRNA. Il est vraisemblable que ces deux phénomènes sont liés à l'élaboration des réserves protéiques dans l'ovaire. L'action hormonale inhibitrice de la vitellogénèse concernerait alors directement ou indirectement les transméthylations. Des études actuellement en cours pourraient nous permettre de préciser cette action.

Remerciements

Nous remercions le Professeur H. Charniaux-Cotton pour son intérêt, Mme M. C. Fried-Montaufer et M. C. Carré-Lécuyer pour leur aide et le Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, pour une allocation ayant facilité l'achat des molécules isotopiques.

Références

- [1] Charniaux-Cotton, H. (1965) Hormonal control of sex differentiation in Organogenesis. R. de Haan et H. Ursprung; Holt, Rinehart et Winton, Editeurs, New York.
- [2] Tekitek, A., Berreur-Bonnenfant, J., Ferezou, J. P., Meusy, J. J., Barbier, M. et Lederer, E. (1976) *Biochimie* 58, 1355–1358.
- [3] Berreur-Bonnenfant, J., Meusy, J. J., Ferezou, J. P., Devys, M., Quesneau-Thierry, A. et Barbier, M. (1973) *C. R. Acad. Sci., Paris* 277, Ser. D., 971–974.
- [4] Brunngraber, E. F. (1962) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 8, 1–3.
- [5] Sharma, O. K. et Borek, E. (1970) *Biochemistry* 9, 2507–2513.
- [6] Zubay, G. (1962) *J. Mol. Biol.* 4, 347–356.
- [7] Björk, G. R. et Svensson, I. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 138, 430–432.
- [8] Berreur-Bonnenfant, J. et Meusy, J. J. (1972) *C. R. Acad. Sci. Paris* 275, Ser. D., 1641–1644.