HAL
open science

Analyse fonctionnelle de la traduction dépendante de la coiffe m GTP en réponse à la fécondation et au cours du cycle cellulaire de l'embryon d'oursin

Nathalie Oulhen

▶ **To cite this version:**

Nathalie Oulhen. Analyse fonctionnelle de la traduction dépendante de la coiffe m GTP en réponse à la fécondation et au cours du cycle cellulaire de l'embryon d'oursin. Biologie cellulaire. Rennes 1, 2008. Français. NNT : . tel-01111009

HAL Id: tel-01111009

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01111009v1

Submitted on 29 Jan 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° ORDRE : **3760**
de la thèse

UNIVERSITÉ EUROPÉENNE DE BRETAGNE

UNIVERSITE DE RENNES 1

THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : ***DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1***

Mention : Biologie

PAR

OULHEN Nathalie

Equipe d'accueil : Cycle Cellulaire et Développement, UMR 7150, Unité Mer et Santé

Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé

Composante universitaire : UFR 937, Centre de Biologie et Océanographie Marine de Roscoff

TITRE DE LA THESE :

Analyse fonctionnelle de la traduction dépendante de la coiffe m^7GTP en réponse à la fécondation et au cours du cycle cellulaire de l'embryon d'oursin

SOUTENUE LE 30 OCTOBRE 2008 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY

Dr Christian SARDET	**DR CNRS Villefranche-sur-mer**	**rapporteur**
Dr Gary WESSEL	**PR Brown University, USA**	**rapporteur**
Dr Georges BAFFET	**DR INSERM Rennes**	**examinateur**
Dr Claude PRIGENT	**DR CNRS Rennes**	**examinateur**
Dr Patrick CORMIER	**PR UPMC**	**directeur de thèse**

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à la Station Biologique de Roscoff, au sein de l'équipe Cycle Cellulaire et Développement sous la direction du Dr Patrick Cormier. Elle a été financée par le Ministère de la Recherche.

Je remercie **Bernard Kloareg** pour m'avoir accueillie au sein de la Station Biologique de Roscoff. Je remercie aussi **Serge Thomas** de m'avoir permis d'intégrer l'UMR 7150, Mer et Santé. Et je remercie les membres du jury d'avoir accepté de venir aujourd'hui.

Je remercie le Professeur **Patrick Cormier** pour m'avoir encadrée depuis mon Master 2, pour ses encouragements, sa disponibilité et sa patience. Tu as toujours été là pour discuter et pour me guider dans cette initiation à la recherche, et cela malgré ton emploi du temps surchargé. Tes qualités scientifiques et humaines ont permis de faire de l'équipe Cycle cellulaire et Développement une véritable « Dream Team » dans laquelle travailler est un réel plaisir. Enfin, je te remercie surtout pour ton éternel optimisme qui a toujours su remonter le moral des troupes quand cela était nécessaire. Je remercie également les permanents de l'équipe qui ont toujours pris le temps de discuter et de répondre à mes questions. Je remercie **Julia Morales** pour ses conseils mais aussi pour les pots de Nutella qu'elle m'a apportés au bureau !! Merci **Bertrand Cosson** pour le temps que tu m'as consacrée et pour tous tes encouragements. Je remercie également le Docteur **Odile Mulner Lorillon** et le Professeur **Robert Bellé**. Merci à vous deux pour vos précieux conseils et votre gentillesse. Merci Croc-Odile pour ta patience, même dans la chambre froide, ce fut un plaisir de travailler avec toi et Merci Robert, pour ton aide et ta disponibilité mais aussi pour les voyages en Robert-mobile tous les midis et pour tes magnifiques concerts de saxophone.

Je remercie le Professeur **Mirjam Czjeck**, ainsi que **Murielle Jam** et **Justyna Rzonca** pour toute l'aide que vous m'avez apportée sur les productions protéiques et pour toutes les discussions enrichissantes sur la cristallographie.

Je remercie **Sandrine Boulben** pour toute son aide et sa gentillesse. Heureusement que tu étais là pour me rappeler de nettoyer ma paillasse de temps en temps et Merci de ne pas avoir jeté mes tubes, même quand je m'étalais un peu dans les tiroirs !! Plus sérieusement, je

te remercie pour ta patience et ton efficacité et merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions.

Merci à **Isabelle Gauffény**. Merci pour ton écoute et tes conseils. Merci pour toutes les fois où tu m'as invitée chez toi pour me transmettre quelques-uns de tes secrets et je te promets que je ne raterai jamais une crème anglaise. Et Merci sincèrement pour tous les moments inoubliables passés avec toi et tes filles (même si tu as voulu te débarrasser de moi avec ton gâteau chocolat/canard).

Je remercie ensuite tous ceux qui ont séjournés dans la pièce 214, bureau remarquable où il y a toujours de la nourriture à proximité et des personnes agréables avec qui la partager. Je remercie **Virginie Glippa** pour son aide et sa gentillesse, et avec qui travailler devient un réel plaisir.

Je remercie les deux anciens grands thésards du labo, **Frédéric Le Sourd** et **Ronan Le Bouffant**, qui m'ont supportée pendant quelques années. Merci pour votre bonne humeur, votre patience, et vos conseils. J'adresse un Merci spécial à Ronan qui a toujours été là pour sauver mon ordinateur des attaques de virus. Et Merci à tous les deux pour votre humour et pour ces moments exceptionnels passés en votre compagnie. Hey mes amis, je vous remercie non pas une ni deux ni trois, mais 14 fois… pour votre soutien !!!

Je remercie le Dr **Hussam Saad** de m'avoir encouragée depuis que nous avons commencé nos Master 2 puis nos thèses, merci d'avoir supporté NO pendant toutes ses années. Merci de m'avoir appris à couper des jugulaires et Merci pour les expressions comme Taas helou, bade roue baar que je ne suis pas prête d'oublier. Je n'oublierai jamais non plus Flo, Mr Couzon et Mme Badouale. Ce fut génial de travailler en ta compagnie. J'espère que tu te rappelleras toujours de cette petite phrase clé dont toi seul connais la fin: NF, F,… et je te souhaite une grande réussite pour ta thèse.

Merci à **Stefania Bilotto** d'avoir été une super voisine de paillasse. Merci pour les expressions italiennes que tu m'as apprises et pour toutes les fois où l'on a rigolé. Tu as toujours été à mon écoute quand j'en avais besoin et maintenant, tu connais même ma liste de courses par cœur. Merci pour tout, chère Stefania (Stella), qui voit toujours la vie en rose. Et

chaque fois que je serais perdue, je n'oublierai pas de me tourner vers les rayons du soleil et d'aller toujours tout droit !!! Grazie Mille !!

Je remercie **Vlad Costache**, ce fut un plaisir de t'avoir comme collègue de bureau pendant ces derniers mois. Merci d'avoir toujours gardé ton humour malgré les nombreuses nuits passées à travailler à la station. Les longues discussions sur la traduction cap dépendante au milieu de la nuit mais aussi les promenades à vélo dans la métropole, la soirée dans la tempête roscovite, les suppléments qui nous ont bien fait rire resteront graver dans ma mémoire. Je repenserai à ces moments à chaque fois que je mettrai un peu de thé dans mon sucre et grâce à toi, je saurai maintenant où trouver des lardons fumés dans Saint Pol de Léon. C'est coasa ? Merci encore à toi, à **Maria** et à **Rémy** !!

Merci **Magali Le Breton** pour ton énergie et ta bonne humeur. Tu n'as jamais hésité à apporter ton aide au laboratoire. Merci à **Azza**. Même si l'on ne s'est pas vu très longtemps, tu as marqué le laboratoire par ta gentillesse et ton efficacité de travail. Ce fut un plaisir de travailler avec toi, et surtout le samedi soir devant l'ordi… Merci à ma petite **Rania El Akoum**, je te remercie pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton sourire permanent. Je regrette déjà tous ces moments passés avec toi à faire des Western Blot, à boire du thé et surtout à manger tes excellentes crêpes nutella !! Et merci aux anciens stagiaires de l'équipe CCD : **Benoist, Julien, Bertrand, Claire, Pierre-Marie et Océane**. Merci à **Maud Noiret**, toi qui a apporté la mode des chaussettes rayées au labo, pour ton énergie et pour tes encouragements permanents. J'adresse ensuite un merci particulier à **Clément Roeder** qui m'a apporté son aide durant cette thèse. Clément, le spécialiste du vortex, Merci pour avoir compter des œufs d'oursin pendant des heures et pour t'être toujours porté volontaire pour lyser les bactéries à la presse… !!!

Je remercie sincèrement tous les « habitants de GT et YD » qui ont rendu magique la vie à la station. Merci à tous pour les nombreux repas que vous avez préparés et que j'ai adoré bien sûr (gâteau aux carambars, au mars, au kinder,…), mais surtout pour votre bonne humeur permanente. Merci à **Guillaume Margé, Thomas Lamy et Matthieu Oriot**, ce fut un plaisir de courir avec vous sous le soleil de Roscoff (même si vous courez trop vite…). Merci à **Xavier Lecomte**, le spécialiste du billard, et à **El Mahdi Bendif**, l'artiste dessinateur, pour tous ces supers moments passés en votre compagnie. Merci Mahdi pour les méga parties de Rugby.

Je remercie les deux personnes qui ont toujours su me faire sourire et que je ne suis pas prête d'oublier : **Jérémy Pasquier** et **Thomas Lamy**. Grâce à vous deux, votre énergie, votre humour, votre imagination et surtout votre spontanéité, j'ai passé des moments exceptionnels à Roscoff. Merci d'avoir toujours été là pour discuter dans les couloirs de la station à tout moment du jour ou de la nuit. Merci pour toutes les inoubliables batailles d'eau, d'algues, de sacs, les parties de base-ball … Vous êtes incroyables et j'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront. Merci à vous et à tous ceux qui ont toujours été présents pour partager des instants majestueux comme se baigner dans l'eau froide de Roscoff, observer les magnifiques couchers de soleil et discuter en admirant les étoiles de Roscoff (sous oublier les météorites et les navettes extraterrestres !!).

Un énorme Merci aux étudiants du bureau écophy (dans lequel il y a aussi toujours de la nourriture), en particulier à **Matthieu Bruneaux, Joana Projecto Garcia** et **Angélique Cocaign** d'avoir été si sympathiques. Votre bureau a toujours été ouvert même au milieu de la nuit et c'était un plaisir de venir vous voir chaque soir pour discuter un peu entre deux paragraphes de thèse. Vous formez une équipe géniale qui travaille en permanence et qui garde toujours le sourire !! Merci pour tous les mails de baignade, toutes les grandes conversations sur la plage, pour les voyages sur siège mobile, pour les cours de Portugais, pour les fous rires à 1H du matin et pour les goûters improvisés. Merci pour tous ces petits moments géniaux que je n'oublierai jamais.

Je me dois aussi de remercier certains membres de l'équipe EGPM qui me supportent depuis longtemps. D'abord, **Sophie Plouviez**, chère ancienne voisine du couloir GT qui passait ses nuits au laboratoire, j'ai toujours pu compter sur toi durant ces 4 dernières années. Merci de m'avoir toujours écoutée. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as apporté. Tu as tenté de m'apprendre à cuisiner et je te remercie pour tes efforts même si je suis un cas désespéré à part pour les gâteaux au chocolat bien sûr !! Et grâce à toi, je connais par cœur, un certain magasin à Morlaix dont la première lettre est un F (Enfin, tu vois de quoi je parle). Merci pour les méga vacances en Italie, pour tous les week-ends à la station et les passages à la boulangerie. Merci pour ta patience après toutes les heures que je t'ai obligé à m'attendre, même le jour de ton anniversaire !!

Ensuite, je remercie la petite Belge, **Daphné Grulois** pour m'avoir toujours fait confiance (et encore désolée pour tes poissons). Merci pour le super cadeau que tu m'as offert pour mes 25 ans, je garderai toujours cette enveloppe qui fait ma réputation. Merci pour les soirées natation du vendredi soir à Saint Pol de Léon et pour la nage en mer devant la station. Merci à toi chère collègue sauveteuse, pour tous ces moments inoubliables. Je te remercie enfin pour les soirées pizzas,… sans pizzas !!

Merci à **Baptiste Faure** de ne m'avoir jamais mis à la porte de son bureau quand je venais l'embêter tous les soirs.

Merci **Sabine Joncour** de m'avoir écouté même quand je faisais mon Caliméro. Merci pour tous les chocolats que tu m'as apportés quand on se croisait dans les couloirs de la station. Merci à **Tous les autres** et en particulier à **Miguel Frada**, **Dianne Baunbeck, Caroline Corbel, Cécile Ribout, Fiona Roche, Yoan Ferandin et Rozenn Thomas** pour leur gentillesse et leur amitié.

Je voudrais aussi remercier le service mer pour tous les oursins, **Morgan Perennou** et **Sarah Romac** pour le séquençage, **Martine Kerirzin** qui a toujours le sourire à la laverie mais aussi les gardiens (en particulier **Sébastien Henry**) et le personnel du Gulf Stream pour leur sympathie. Merci à **Arthur** pour tous les repas que l'on a pris ensemble. Et Merci aux acteurs principaux de cette thèse, les oursins !!!

Je remercie par la suite deux personnes qui me connaissent depuis très, très, très longtemps : Merci à **Yannick** et à **Marianne** pour m'avoir toujours écoutée et soutenue.

Enfin, je vous remercie tous pour votre bonne humeur. Ce fut un plaisir de passer ces années à la station tant du point de vue professionnel que humain. Je remercie chaque personne que j'ai côtoyée. Merci d'avoir ensoleillé la station par vos sourires et merci d'avoir rendu chaque seconde inoubliable.

Sommaire

Sommaire……. 7
Résumé ……..... 10
Liste des abbréviations …… 11
Liste des publications …….. 15
Sommaire des figures …….. 16
Avant propos ……... 18
Introduction ……. 20
1- La synthèse protéique …….. 20
1-1- Régulation de l'expression des gènes …… 20
1-2- Etapes de la synthèse protéique ……. 24
1-2-1- L'initiation ……... 24
1-2-2- L'élongation ……. 31
1-2-3- La terminaison ……. 35
1-3- La régulation du complexe eIF4F ……..…… 38
1-3-1- Le facteur eIF4E …….. 38
1-3-2- Le facteur eIF4G …….. 46
1-3-3- Le facteur eIF4A …….. 52
1-3-4- Le facteur 4E-BP …….. 54
1-4- Importance de la traduction dans différents mécanismes …… 63
1-4-1- La traduction : du cycle cellulaire au cancer ……. 63
1-4-2- Traduction et développement …… 69
1-4-3- Traduction et cycle saisonnier ……... 74
1-4-4- Traduction et système nerveux …….. 74
1-4-5- Intérêt des modèles marins pour étudier la traduction ……76
2- L'oursin, modèle pour la traduction et le cycle cellulaire …….. 77
2-1-Oursin et Cycle cellulaire …….. 78
2-1-1- Régulation de CDK1/cycline B par phosphorylation de CDK1 …….……... 78
2-1-2- Régulation de CDK1/cycline B par changement de localisation …….…….. 79
2-1-3- Régulation de CDK1/cycline B par dégradation de la cycline …….……. 80
2-1-4- Régulation de CDK1/cycline B par des inhibiteurs …….…….. 80
2-1-5- Activité du complexe chez l'oursin …… 81

2-2-Oursin et Synthèse protéique ……. 81
2-2-1- La synthèse protéique après fécondation chez l'oursin …….. 81
2-2-2- Lien entre synthèse protéique et cycle cellulaire chez l'oursin …….. 81
2-2-3- L'initiation de la traduction chez l'oursin *S. granularis* ……..... 82
2-2-4- L'élongation de la traduction chez l'oursin …… 83
3- Fécondation et activation artificielle des ovules d'oursin ……... 84
3-1- La fécondation …….. 84
3-1-1- La vague calcique induite par la fécondation ……. 86
3-1-2- Voies de signalisation induites par le calcium ……..……. 89
3-1-3- Augmentation du pH intracellulaire ……... 90
3-2- Activation artificielle des ovules par modifications du calcium cytoplasmique ou du pH intracellulaire …….……. 90
3-2-1- Modifications de la concentration cytoplasmique de calcium par le calcium ionophore …… …… 90
3-2-2- Modifications du pH intracellulaire par le NH4Cl …….. 91
3-2-3- Effet du calcium ionophore et du NH4Cl sur la synthèse protéique ……... 92
3-2-4- Effet du calcium ionophore et du NH4Cl sur le cycle cellulaire …… 93
Résultats …….. 94
Article 1 …… 94
Article 2 …… 96
Article 3 …… 98
Article 4 …….. 101
Conclusions et perspectives …….. 104
1- Les multiples isoformes d'eIF4G ……...104
1-1- Modifications d'eIF4G au cours du développement embryonnaire …… 104
1-2- Rôle des isoformes d'eIF4G chez l'oursin …….. 105
2- Nouvelle vision sur la régulation de 4E-BP …….. 106
2-1-Expression de 4E-BP ……... 107
2-2- Phosphorylation de 4E-BP …….. 108
3-Partenaires d'eIF4E …… 110
3-1-Recherche des partenaires d'eIF4E ……. 110
3-2-Analyse structurale d'eIF4E et de ses partenaires ……... 110

4-Traduction dépendante de la coiffe et cycle cellulaire …….. 111
Conclusion générale ……... 113
Bibliographie ……. 114

Résumé

Chez l'oursin, la fécondation induit une augmentation de synthèse protéique indispensable à l'entrée et à la poursuite du cycle cellulaire de l'embryon. L'une des étapes limitantes pour la traduction est l'initiation. La protéine eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) se lie à la coiffe m^7GTP des ARNm et régule la synthèse protéique en fonction de ses partenaires 4E-BP et eIF4G.

La fécondation dissocie eIF4E de son répresseur 4E-BP (eIF4E-Binding Protein). Nos résultats montrent que dans les ovules, eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G) se présente sous plusieurs isoformes qui sont modifiées de façons post-traductionnelles en réponse à la fécondation. Ces isoformes s'associent à eIF4E après fécondation. La dissociation eIF4E/4E-BP et l'association eIF4E/eIF4G sont nécessaires à la première division cellulaire. La dissociation eIF4E/4E-BP est classiquement décrite comme dépendante de l'hyperphosphorylation de 4E-BP ; nous montrons que chez l'oursin, 4 sites de phosphorylation sont conservés sur 4E-BP. Les protéines de fusion de 4E-BP, sauvage ou mimant une hyperphosphorylation, s'associent à eIF4E *in vitro* et inhibent la traduction dépendante de la coiffe dans des extraits acellulaires d'oursin. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de 4E-BP induite après fécondation n'est pas suffisante pour libérer eIF4E et met en avant l'importance de la dégradation de 4E-BP dans le contrôle de la synthèse protéique chez l'oursin.

Nous montrons que les facteurs 4E-BP, eIF4G, eIF4E, eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) et eEF2 (eukaryotic Elongation Factor 2) sont modifiés en réponse à la fécondation mais aussi après activation artificielle des ovules d'oursin par le calcium ionophore et le NH4Cl. Ces modifications induites après activation artificielle permettent de synthétiser la cycline B mais sont insuffisantes pour activer le complexe CDK1/cycline B et entraîner la division cellulaire. Enfin, nous montrons que le complexe 4E-BP/eIF4E est aussi régulé au cours de la maturation méiotique de l'étoile de mer. Dans ces conditions physiologiques, la synthèse de la cycline B implique des régulations différentes de celles observées après fécondation chez l'oursin.

Sea urchin eggs fertilization induces a protein synthesis increase required for cell cycle entry and progression in embryo. Translation initiation represents a rate limiting step. eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) is a cap binding protein that regulates protein synthesis according to its partners 4E-BP (eIF4E Binding Protein) and eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G).

Fertilization provokes eIF4E/4E-BP dissociation. Our results indicate that several isoforms of eIF4G are present in unfertilized eggs and post-translationally modified after fertilization. These isoforms associate with eIF4E after fertilization. eIF4E/4E-BP dissociation and eIF4E/eIF4G association are required for the first mitotic division. eIF4E/4E-BP dissociation is classically described as dependent on 4E-BP hyperphosphorylation; we show that in sea urchin, 4 phosphorylation sites are conserved on 4E-BP. Sea urchin 4E-BP fusion proteins, wild type and mutant mimicking hyperphosphorylation, associate with eIF4E *in vitro* and inhibit cap dependent translation in cell free extracts. These results suggest that 4E-BP phosphorylation induced after fertilization is not sufficient to release eIF4E and highlight the role of 4E-BP degradation in protein synthesis regulation in sea urchin.

We show that 4E-BP, eIF4G, eIF4E, eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) and eEF2 (eukaryotic Elongation Factor 2) are modified after sea urchin eggs fertilization but also after artificial activation by calcium ionophore or NH4Cl. These modifications mediated by artificial activation induce cyclin B synthesis but are not sufficient to activate CDK1/cyclin B and cell division. Finally, we show that 4E-BP/eIF4E complex is also regulated during the meiotic maturation in starfish oocytes. In these physiological conditions, cyclin B synthesis involves regulations different from the ones observed after sea urchin eggs fertilization.

Liste des abbréviations

3’ ou 5’UTR	3’ ou 5’ UnTranslated Region
4E-BP	4E Binding Protein
4EGI-1	eIF4E/eIF4G Interaction Inhibitor
4E-SE	eIF4E-Sensitive Element
4E-T	eIF4E Transporter
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Akt	Protéine Kinase isolée du retrovirus AKT8
APC	Anaphase Promoting Complex
AMPK	AMP Activated Protein Kinase
ARE	Adenine/uridine Rich Element
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
cADPR	cyclic Adenosine 5’DiPhosphate Ribose
CAK	CDK Activating Kinase
CBP	Cap Binding Protein
Cdc	Cell Division Control
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CED	CElL Death abnormal
cGMP	cyclic Guanosine MonoPhosphate
CICR	Calcium Induced Calcium Release
Cip/Kip	CDK inhibiting protein
CK2	Casein Kinase 2
CKIs	Cyclin dependent Kinase Inhibitors
CPEB	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein
CRM1	Chromosome Maintenance Region 1
CRS	Cytoplasmic Retention Signal
DAG	Diacylglycerol

DAP5/p97/NAT1	Death Associated Protein 5 / p97 /Novel Apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC) Target no. 1
Dcp1	Decapping protein 1
DEAD	Asp-Glu-Ala-Asp protein
eEF	eukaryotic Elongation Factor
Egr-1	Early growth response protein 1
eIF	eukaryotic Initiation Factor
EJC	Exon Junction Complex
eRF	eukaryotic Release Factor
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FOXO	Forkhead box protein O
FRAP/mTOR	FKBP12 Rapamycin Associated Protein/mammalian Target Of Rapamycin
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
H1K	Histone H1 Kinase
Hex	Hematopoitically expressed homeodomain
HOXA9	Homeobox A9
INK4	INhibiteur de CDK4
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP3R	IP3 Receptor
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ITAF	IRES Transactivating Factor
JNKK	c-jun N-terminal Kinase Kinase
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
m^7GTP	7-methyl Guanosine TriPhosphate
m^7GDP	7-methyl Guanosine DiPhosphate
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDM2	Murine Double Minute 2
MEK	MAP/ERK kinase
MEKK	MEK Kinase
Met	Methionine

miARN	microARN
MKP	MAPK Phosphatase
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
MMS	Methyl Methane Sulfonate
Mnk	MAP Kinase interacting protein Kinase
MRE	miRNA Recognition Element
mRNP	messenger RiboNucleoProtein
MS6K	Multipotential S6 Kinase
Msk1	Mitogen and stress-activated protein kinase 1
mTORC	mTOR Complex
NAADP	Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
NES	Nuclear Export Signal
NMD	Non sense Mediated Decay
NO	Nitric oxid
ODC	Ornithine decarboxylase
p70S6K	p70 S6 Kinase
p90RSK1	p90 Ribosomal S6 Kinase1
PABP	PolyA Binding Protein
PAIP	PABP-interacting protein
PAK2	p21 Activated protein Kinase 2
P-Bodies	cytoplasmic Processing Bodies
Pdcd4	Programmed cell death protein 4
PDK1	3'Phosphoinositide Dependent Kinase 1
Pi	Phosphoinositol
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP2	Phosphatidyl Inositol 4,5 biphosphate
PIP3	Phosphatidyl Inositol 3,4,5 trisphosphate
PKA	cAMP dependent Protein Kinase
PKB	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PLCγ	Phospholipase Cγ
Plk	Polo like kinase
PML	Promyelocytic leukemia protein

polyA	Poly Adenine
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRAS40	Proline Rich Akt substrate 40kDa
PRH	Proline Rich Homeodomain
PRR5	Proline Rich Protein 5
RAFT1	Rapamycin and FKBP12 target 1
RAIP	Arg-Ala-Iso-Pro
RAP55	RNA Associated Protein 55
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
Rictor	Rapamycin insensitive companion of mTOR
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RNAi	RiboNucleic Acid interference
RRF	Ribosome Recycling Factor
SAPK4/p38MAPK	Stress Activated Protein Kinase/p38MAPK
SF2/ASF	Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor
SFK	Src Family Kinase
SIN1	Stress-activated protein kinase-Interacting 1
siRNA	small interference RiboNucleic Acid
Sm snRNP	Smith small nuclear RiboNucleoProtein
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TOS	mTOR Signaling
TSC1/TSC2	Tuberous Sclerosis protein
USER	Untranslated Sequence Element for Regulation
U1 snRNP	U1 small nuclear RiboNucleoProtein
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial-Growth Factor
VWM	Vanishing White Matter Disease

Liste des publications

Revue 1 : Oulhen N, Cormier P (2006). eIF4E et étapes décisionnelles du développement embryonnaire. Med Sci (Paris) 22 (5) : 507-13.

Revue 2 : Oulhen N, Morales J, Cosson B, Mulner-Lorillon O, Bellé R et Cormier P (2007). Régulation de l'expression des gènes au niveau de la traduction : intérêt des modèles marins. J Soc Biol. 201(3):297-306.

Article 1 : Oulhen N, Salaun P, Cosson B, Cormier P, Morales J (2007). After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. J Cell Sci. 120:425-34.

Article 2: Oulhen N, Boulben S, Morales J, Cormier P and Cosson B. A mutant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in sea urchin cell-free cap dependent translation system. *Submitted*.

Article 3: Oulhen N, Morales J, Bellé R, Cosson B, Cormier P and Mulner-Lorillon O. Translational factors are modified after sea urchin egg artificial activation, leading to protein synthesis increase and Cyclin B synthesis. *In preparation*.

Article 4: Lapasset L, Pradet-Balade B, Vergé V, Lozano JC, **Oulhen N**, Cormier P and Peaucellier G. (2008). Cyclin B synthesis and rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions. Mol Reprod Dev. 75(11):1617-26.

Sommaire des figures

Figure 1 : Régulation de l'expression des gènes …… 21
Figure 2 : L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe ……. 25
Figure 3 : Le complexe d'initiation eIF4F …….. 26
Figure 4 : L'initiation dépendante de la coiffe, le modèle en boucle ……. 27
Figure 5 : Régulation de l'initiation de la traduction dépendante
de la coiffe par eIF4F et eIF2 ……...…….. 28
Figure 6 : L'initiation de la traduction indépendante de la coiffe …….. 29
Figure 7 : Régulation de l'initiation de la traduction dépendante
des IRES en fonction de la localisation des ITAF(s) et des ARNm ….…….. 31
Figure 8 : L'élongation de la traduction ……. 33
Figure 9 : Régulation de la phosphorylation d'eEF2 …….. 34
Figure 10 : La terminaison de la traduction …… 37
Figure 11 : Interaction des eIF4E représentant les trois classes présentes
chez les mammifères avec eIF4G et 4E-BP …… 39
Figure 12 : Régulation de la transcription d'eIF4E par c-Myc et p53 …… 41
Figure 13 : Localisation nucléaire d'eIF4E ……. 42
Figure 14 : Voies de signalisation régulant la phosphorylation d'eIF4E …… 44
Figure 15 : Inhibition de la traduction dépendante de la coiffe par microARN …….. 45
Figure 16 : Régulation de l'expression des isoformes d'eIF4GI ……. 46
Figure 17 : Localisation des domaines d'interaction d'eIF4G avec ses partenaires …… 48
Figure 18 : Inhibition d'eIF4A par Pdcd4 …… 53
Figure 19 : Sites de phosphorylation sur 4E-BP1 …… 56
Figure 20 : Phosphorylation de 4E-BP par la voie de signalisation
dépendante de la PI3K ……. 61
Figure 21 : Le régulon d'ARNm contrôlé par eIF4E participe à la stimulation
de la voie PI3K/Akt ……. 66
Figure 22 : Boucle de régulation entre c-Myc et eIF4F
reliant transcription et traduction ……. 69
Figure 23 : Détermination des axes embryonnaires par 4E-HP
chez la drosophile ……. 73

Figure 24 : Régulation du complexe CDK1/cycline B
par phosphorylation sur CDK1 ……...…….. 79
Figure 25 : Voies de signalisation induites après fécondation
des ovules d'oursin …… 87
Figure 26 : Régulation de la traduction dépendante de la coiffe
en réponse à la fécondation chez l'oursin …….. 95
Figure 27 : Régulation de 4E-BP en réponse à la fécondation
chez l'oursin ……... 97
Figure 28 : Modifications des facteurs de traduction et analyse du
complexe CDK1/cycline B après fécondation et activation
artificielle des ovules d'oursin …….. 100
Figure 29 : Régulation de la traduction dépendante de la coiffe et
synthèse de cycline B lors de la maturation méiotique
chez l'étoile de mer ……... 103

Avant Propos

La régulation de l'expression des gènes est essentielle à la survie des cellules. Toute perte de contrôle peut entraîner la mort des cellules ou au contraire leur transformation en cellules cancéreuses. Chaque étape doit être finement régulée depuis les gènes jusqu'aux protéines. Les protéines représentent 44% du poids sec humain, elles jouent des rôles divers de structures, de transport, de régulation,… et sont indispensables à la survie cellulaire. Les cellules dépensent beaucoup d'énergie pour contrôler la synthèse protéique. Il est maintenant reconnu que la régulation de la traduction est un moyen efficace et rapide de contrôler l'expression des gènes dans le temps et l'espace.

Les recherches sur la régulation traductionnelle sont en pleine expansion et permettent de se rendre compte de la diversité des contrôles qui interviennent en condition physiologique et physiopathologique. Mon travail de thèse s'est concentré sur la régulation des facteurs d'initiation de la traduction en réponse à la fécondation et leur rôle dans le mécanisme d'entrée en mitose en utilisant comme modèle l'oursin *Sphaerechinus granularis*. L'initiation de la traduction représente une cible majeure de régulation, elle met en jeu le complexe eIF4F. La régulation de ce complexe est liée à celle du cycle cellulaire mais les connections sont encore peu connues. L'identification de ces connections constitue un challenge important pour comprendre le fonctionnement des cellules. Le développement embryonnaire précoce de l'oursin représente un excellent modèle pour étudier les relations entre les régulations traductionnelles et le cycle cellulaire. D'abord, le développement précoce de l'oursin permet de s'affranchir des régulations transcriptionnelles. Les premières divisions cellulaires reposent principalement sur la traduction d'ARNm déjà présents dans l'ovule. Ensuite, l'oursin est aussi une référence pour analyser les mécanismes impliqués dans le cycle cellulaire puisque les divisions sont synchrones. Enfin, le séquençage du génome de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* apporte de nouvelles données pour analyser les acteurs impliqués dans ces régulations.

Dans l'introduction, j'ai tenu à faire le point sur les connaissances actuelles des régulations traductionnelles dans différents processi, témoins d'un contexte de recherche extrêmement actif. J'y ai intégré deux revues que j'ai écrite et qui permettent de mettre

l'emphase sur le rôle des facteurs de traduction dans le développement embryonnaire (revue 1) et l'apport des modèles marins dans l'étude de ces acteurs (revue 2).

La première partie de l'introduction est consacrée à la régulation traductionnelle. Après avoir présenté les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes, nous avons décrit les différentes étapes de la synthèse protéique. Nous avons ensuite mis l'accent sur les différents contrôles qui touchent l'initiation de la traduction en insistant sur le complexe eIF4F (composé d'eIF4E, eIF4G et eIF4A) et sur l'un de ses inhibiteurs majeurs, 4E-BP. Ces facteurs de traduction jouent un rôle essentiel dans le cycle cellulaire, le cancer le développement, l'adaptation physiologique aux changements de température saisonniers, et dans le fonctionnement du système nerveux. L'analyse de différents modèles marins comme l'étoile de mer, l'oursin et l'aplysie permet de mieux comprendre certaines de ces régulations traductionnelles.

La deuxième partie présente l'intérêt du modèle oursin pour étudier les régulations traductionnelles au cours du développement embryonnaire. Nous avons mis l'accent sur les processi identifiés chez l'oursin concernant le cycle cellulaire et la synthèse protéique ainsi que sur les liens qui existent entre ces deux mécanismes.

La troisième partie nous permet de faire le point sur les connaissances actuelles des voies de signalisation stimulées après fécondation des ovules d'oursin ou après leur activation artificielle.

Les nouvelles données expérimentales acquises au cours de cette thèse sont ensuite présentées sous forme de quatre articles. Le premier article présente l'existence d'une régulation post traductionnelle du facteur eIF4G suivant la fécondation chez l'oursin *S. granularis* ainsi que son association à eIF4E. Le deuxième article fournit les premières preuves directes du rôle inhibiteur de 4E-BP dans la traduction dépendante de la coiffe et apporte de nouvelles données sur le rôle de sa phosphorylation, différent du modèle classiquement reconnu. Le troisième article permet d'aborder les modifications des facteurs de traduction affectés par la fécondation et par activation artificielle des ovules, parallèlement à l'analyse des acteurs du cycle cellulaire. Enfin, le dernier article apporte de nouvelles informations sur la régulation de la traduction de la cycline B au cours de la maturation méiotique de l'étoile de mer *Astropecten aranciacus*. L'ensemble de ces résultats originaux apporte une nouvelle vision sur les mécanismes de régulation traductionnelle.

Introduction

1 -La synthèse protéique

1-1-Régulation de l'expression des gènes

La cellule est l'unité de base du vivant. Chez les eucaryotes, elle se compose d'un noyau et d'un cytoplasme entourés par une membrane plasmique. Le noyau renferme l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique), molécule portant l'information génétique. La division cellulaire permet à une cellule mère de donner deux cellules filles et de former chez les Métazoaires, des organismes pluricellulaires à partir d'une cellule œuf unique provenant de la fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde. Par exemple, un humain adulte provient d'une cellule œuf qui s'est divisée pour former un être constitué d'environ dix mille milliards de cellules (Bellé et al, 2007). Toutes les cellules d'un organisme possèdent les mêmes gènes mais ne les expriment pas au même endroit ni au même moment. L'expression des gènes doit être finement régulée à tout moment : au cours du développement, de la croissance et du maintien d'un organisme.

La régulation de l'expression des gènes implique des mécanismes multiples et complexes (**Fig 1**). La transcription permet de réguler le passage de l'ADN à l'ARN. Cette étape est catalysée par des enzymes : les ARN polymérases, et de nombreux acteurs, les facteurs de transcription (Remenyi et al, 2004). Ces derniers reconnaissent spécifiquement des petites séquences sur l'ADN et peuvent interagir avec l'ARN polymérase ou avec d'autres protéines pour réguler la transcription d'un gène. L'ARN transcrit obtenu est modifié, il passe par des étapes de maturation comprenant notamment:

- L'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN : une guanosine méthylée est ajoutée après réactions catalysées par 3 enzymes (ARN triphosphatase, ARN guanylyltransferase, ARN methyltransferase) et se déroulant de manière co-transcriptionnelle (Gu et Lima, 2005).
- L'épissage : élimination des introns (régions non codantes) (Wang et Burge, 2008)
- L'ajout d'une queue polyA à l'extrémité 3' de l'ARN (Gilmartin, 2005)

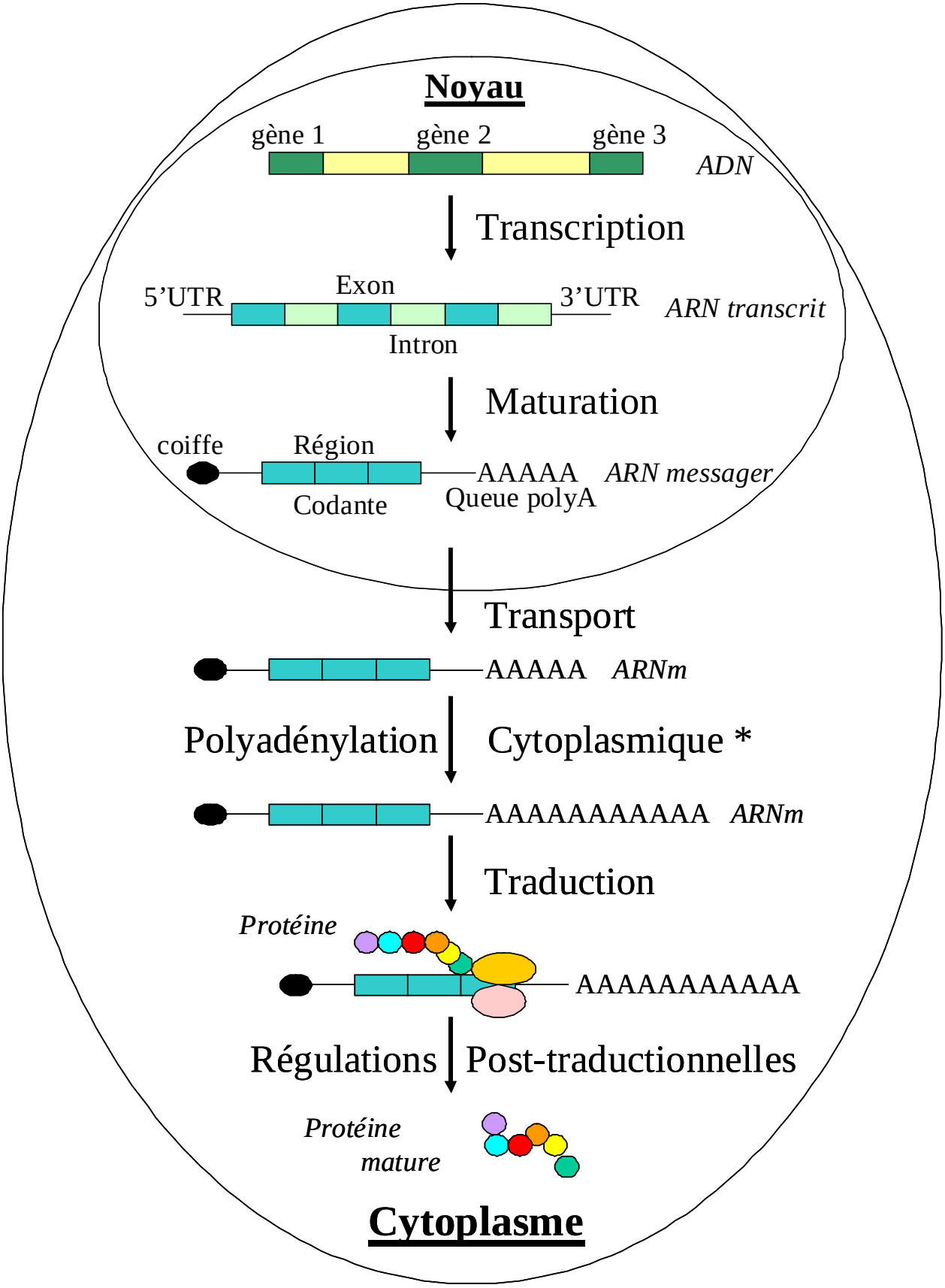

Noyau
gène 1
gène 2
gène 3
ADN
Transcription
5'UTR
Exon
3'UTR
ARN transcrit
Intron
Maturation
coiffe
Région
AAAAA
ARN messager
Codante
Queue polyA
Transport
AAAAA
ARNm
Polyadénylation
Cytoplasmique *
AAAAAAAAAAA
ARNm
Traduction
Protéine
AAAAAAAAAAA
Régulations
Post-traductionnelles
Protéine
mature
Cytoplasme

Figure 1 : Régulation de l'expression des gènes. *Les gènes sont transcrits dans le noyau pour donner un ARN composé de régions codantes (vert foncé) et de régions non codantes (vert clair). Cet ARN subit une maturation (épissage, ajout d'une coiffe et ajout d'une queue polyA) avant de passer dans le cytoplasme. L'ARN messager (ARNm) peut aussi être polyadénylé au sein du cytoplasme avant d'être traduit (* Cette polyadénylation n'est pas systématique et représente un point important de régulation au cours du développement embryonnaire). La protéine produite est ensuite libérée de l'ARNm et peut subir des modifications post traductionnelles.*

L'ARN transcrit comprend deux régions qui ne seront pas traduites en 5' et en 3', ce sont les régions UTR (UnTranslated Region) qui encadrent la région codante pour la protéine. Aux extrémités de l'ARN, on trouve la coiffe en 5'UTR et la queue polyA en 3'UTR qui interviennent dans la régulation de la synthèse protéique. Cet ARNm est transporté dans le cytoplasme et peut subir des modifications telles qu'une polyadénylation (Richter, 1999) pour stimuler la production de protéines lors de la traduction. Cette dernière étape est également finement régulée, elle fait intervenir des facteurs de traduction qui interagissent avec l'ARNm ou avec d'autres protéines pour inhiber ou stimuler la synthèse protéique. La quantité de protéine présente à un instant donné dans la cellule est régulée non seulement par son taux de synthèse mais aussi par sa dégradation. De plus, la protéine produite peut subir des modifications post-traductionnelles qui vont modifier sa conformation, sa localisation, sa stabilité ou son activité : glycosylation (Weerapana et Imperiali, 2006), phosphorylation (Sefton, 2001), ubiquitination (Hershko, 2005), sumoylation (Guo et al, 2007). Les protéines sont des éléments essentiels à la vie. Elles représentent 44% du poids sec d'un corps humain. Elles interviennent dans de nombreux processi avec un rôle de structure, de transport ou de régulation (Mathews et al, 2000). Leur production doit ainsi être bien contrôlée pour assurer la survie cellulaire. La régulation traductionnelle représente un moyen rapide pour contrôler la formation des protéines sans devoir repasser par l'étape de transcription, en utilisant les ARNm déjà présents. Ainsi, le contrôle de la traduction des ARNm est une étape importante de la régulation de l'expression des gènes dans divers mécanismes physiologiques et physiopathologiques incluant le développement embryonnaire (Richter et Sonenberg, 2005), l'apoptose (Morley et al, 2005), la prolifération cellulaire (Mamane et al, 2004) et la pathogenèse du cancer (Holland et al, 2004).

La traduction dépend à la fois de la disponibilité des ARNm et de l'efficacité de la machinerie de traduction. La vie des ARNm produits est influencée par deux paramètres : leur séquence nucléotidique et l'environnement nucléaire dans lequel ils ont été produits (Giorgi et Moore, 2007). En effet, de nombreuses protéines se lient aux ARNm dès leur formation dans le noyau, de manière stable ou transitoire, et déterminent leur destinée dans le cytoplasme (Moore, 2005). On parle de mRNP (messenger RiboNucleoProtein). Les protéines peuvent se lier de manière non spécifique sur des structures communes à beaucoup d'ARNm comme la coiffe, la queue polyA, au niveau des jonctions entre les exons, ou de façon spécifique en reconnaissant des séquences particulières la plupart du temps situées dans les régions non traduites des ARNm. Ces protéines vont d'abord permettre de passer à travers l'enveloppe nucléaire. Après leur export, tous les ARNm ne vont pas être traduits instantanément. Les facteurs associés aux ARNm vont dicter (Moore, 2005) :

- leur dégradation s'ils contiennent des erreurs : c'est par exemple le cas des protéines EJC (Exon Junction Complex) qui se fixent aux ARNm après épissage et qui influencent par la suite la dégradation de ces ARNm
- leur localisation cellulaire en s'associant ou non au cytosquelette : cette localisation est importante dans les ovocytes comme cela a été démontré dans les œufs d'ascidies (Prodon et al, 2008), au cours du développement embryonnaire et dans certains types cellulaires polarisés comme pour les neurones
- leur traduction : en stimulant le recrutement des ARNm dans les polysomes
- leur maintien dans des structures particulières de stockage comme les granules de stress ou les P-Bodies (cytoplasmic Processing Bodies) dans l'attente de leur traduction ou de leur dégradation.

D'autre part, la synthèse protéique peut être régulée en fonction de l'efficacité de la machinerie de traduction. Contrairement aux facteurs de transcription dont le rôle régulateur n'est plus à démontrer, les facteurs de traduction ont longtemps été considérés comme des facteurs généraux de ménage. Ils sont maintenant reconnus comme des régulateurs importants de l'expression des gènes. Ces mécanismes de régulation traductionnelle sont détaillés dans la suite de cette introduction.

1-2- Etapes de la synthèse protéique

La synthèse protéique se déroule en trois grandes étapes. D'abord, l'initiation correspond au recrutement des sous unités ribosomiques 40 et 60S sur l'ARNm à traduire. La sous unité 40S, accompagnée de l'ARNt initiateur et de plusieurs facteurs d'initiation, forment un complexe de pré-initiation qui se fixe sur l'ARNm. Le complexe se déplace jusqu'au codon initiateur AUG où la sous unité 60S vient rejoindre 40S pour constituer un ribosome. Ensuite, l'élongation permet de former une chaîne peptidique. Chaque codon de l'ARNm est reconnu par l'anticodon correspondant d'un ARNt. Ces derniers sont spécifiquement liés à un acide aminé qui s'ajoute à la chaîne peptidique en croissance. Enfin, la terminaison consiste en un relargage des acteurs. La séquence protéique complète est libérée du complexe ribosomique et les sous unités 40 et 60S se dissocient. Chaque étape est complexe et fait intervenir des facteurs spécifiques : eIFs (eukaryotic Initiation Factors), eEFs (eukaryotic Elongation Factors) et eRFs (eukaryotic Release Factors).

1-2-1- L'initiation

La régulation de la traduction se fait majoritairement lors de l'initiation (Gingras et al, 1999). Deux mécanismes d'initiation de la traduction sont aujourd'hui beaucoup étudiés : l'initiation dépendante de la coiffe et l'initiation dépendante des IRES.

Initiation dépendante de la coiffe : description des différentes étapes

La majorité des ARNm eucaryotes sont traduits de façon coiffe-dépendante (Von Der Haar et al, 2004). L'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation eIFs permet de recruter la sous unité 40S en 5'UTR des ARNm (**Fig 2**). Cette étape fait intervenir au moins douze facteurs protéiques dont eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, une cible clé pour contrôler l'initiation de la traduction et dont la régulation sera détaillée dans cette introduction (Gingras et al, 1999 ; Preiss et Hentze, 2003).

Pour commencer l'initiation, il faut d'abord dissocier les deux sous unités ribosomiques 40 et 60S. Cette étape est régulée par eIF6, une protéine liée à la sous unité 60S dans le cytoplasme, elle inhibe l'association des deux sous unités ribosomiques. Pour permettre l'assemblage des ribosomes lors de la synthèse protéique, eIF6 doit être relargué par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC (Protéine Kinase C) (Ceci et al, 2003).

D'un autre côté, la sous unité 40S doit s'associer aux facteurs d'initiation eIF1A, eIF1, eIF2 liée au GTP et à l'ARNt Met, eIF3 et eIF5 pour permettre la synthèse protéique (**Fig 2.1**). eIF1A et eIF1 sont des petites protéines capables de se lier à la sous unité 40S: ces interactions sont responsables d'un changement de conformation de 40S qui facilite la liaison des autres facteurs. De plus, ces protéines maintiennent ouvert le canal par lequel passera l'ARNm pour être scanné jusqu'au codon de départ (Passmore et al, 2007). Ensuite, l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 en GDP + Pi se fait rapidement sous l'influence de l'activité GTPase d'eIF5 avant même la liaison du ribosome sur l'ARNm (**Fig 2.2**) (Algire et al, 2005).

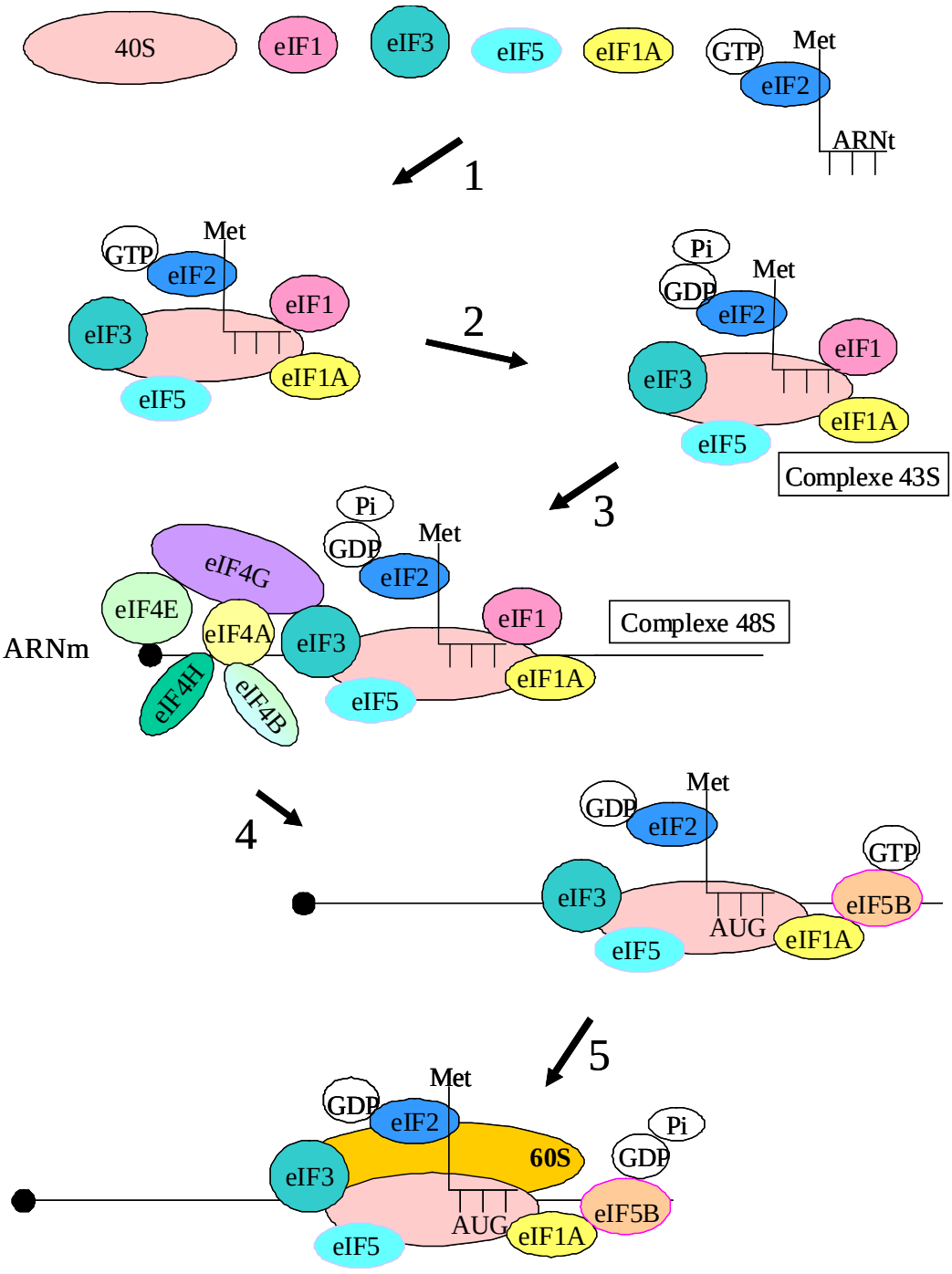


Figure 2 : L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. *(1) La sous unité ribosomique 40S s'associe aux facteurs eIF1, eIF3, eIF5, eIF1A, eIF2-GTP-ARNt Met. (2) Le GTP lié à eIF2 est hydrolysé en GDP+Pi. (3) Ce complexe 43S s'associe à l'ARNm par l'intermédiaire du complexe eIF4F (eIF4E/eIF4G/eIF4A) pour donner le complexe 48S. Les facteurs eIF4B et eIF4H s'associent à eIF4A pour stimuler son activité hélicase. (4) Lors de la reconnaissance de l'AUG, eIF1 ainsi que le Pi lié à eIF2 sont relâchés, eIF5B-GTP est recruté. (5) La sous unité 60S se fixe sur l'ARNm pour former un ribosome. Le GTP lié à eIF5B est hydrolysé.*

Le recrutement du complexe 43S (sous unité 40S associée aux facteurs d'initiation et à l'ARNt Met) sur l'ARNm donne le complexe 48S (**Fig 2.3**), grâce à eIF4F composé de trois protéines : eIF4E, eIF4G et eIF4A (**Fig 3**).

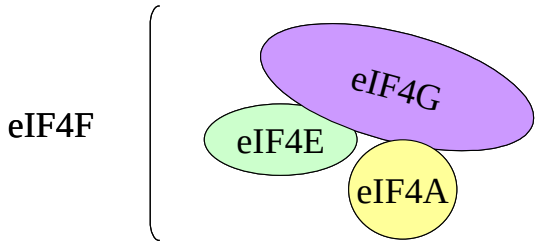


Figure 3 : Le complexe d'initiation eIF4F. *Le complexe eIF4F contient trois protéines (eIF4E, eIF4G et eIF4A). Il intervient dans l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe.*

eIF4E est une protéine capable de se lier à la coiffe des ARNm en 5'UTR (Sonenberg et al, 1978), à d'autres eIFs et à des protéines régulatrices (Richter et Sonenberg, 2005). eIF4G s'associe à eIF4E et par conséquent, appartient à la famille des « 4E-Binding Proteins». eIF4G est une protéine de haut poids moléculaire qui recrute des partenaires tels que eIF4A, eIF3 et PABP (**Fig 4**). eIF4A utilise son activité ARN hélicase pour défaire les structures secondaires en 5'UTR des ARNm et faciliter le déplacement de 40S sur l'ARNm. L'activité ARN hélicase est stimulée par d'autres facteurs comme eIF4B et eIF4H (**Fig 2. 3**) (Rogers et al, 2001). Le facteur eIF3 recrute 40S et permet de faire le lien entre cette petite sous unité ribosomique et l'extrémité 5' de l'ARNm. La protéine PABP (Poly-Adenylated Binding Protein) se lie à la queue polyA des messagers et relie les extrémités 3' et 5'UTR par l'intermédiaire d'eIF4G pour donner le modèle en boucle capable de stimuler la synthèse protéique (Kahvejian et al, 2005).

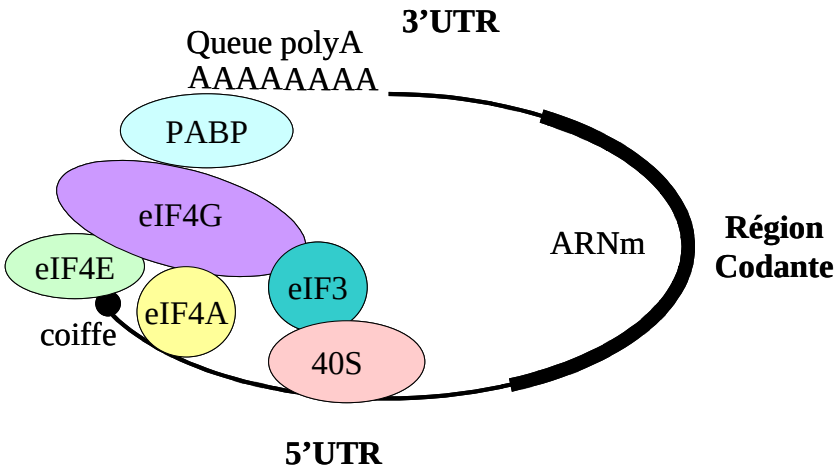


Figure 4 : L'initiation dépendante de la coiffe, le modèle en boucle. *eIF4E est une protéine de liaison à la coiffe qui recrute eIF4G sur l'ARNm. eIF4G est une grosse protéine qui s'associe aux facteurs d'initiation : eIF4A, eIF3 et PABP. eIF4A défait les structures secondaires en 5'UTR (UnTranslated Region) de l'ARNm. eIF3 recrute la sous unité ribosomique 40S sur l'ARNm. eIF4G s'associe également à PABP (Poly-Adenylated Binding Protein) pour stimuler la traduction des ARNm polyadénylés (AAAAAAAA) en 3'UTR.*

Peu de données sont disponibles sur le rôle d'eIF4F dans la lecture de la région 5'UTR par le ribosome et sur la dissociation eIF4F/ARNm (Pestova et al, 2007). Après le passage du ribosome en 5'UTR, eIF1 participe à la reconnaissance du codon d'initiation qui est influencé par les nucléotides environnant. En effet, la séquence GCC(A/G)CCAUGG est optimale chez les eucaryotes (Kozak, 1991). Dans ce contexte nucléotidique, eIF1 est relâché au niveau de l'AUG de départ (**Fig 2.4**) (Cheung et al, 2007; Passmore et al, 2007; Pestova et Kolupaeva, 2002). En parallèle, la reconnaissance de l'AUG entraîne le relargage du Pi lié à eIF2. Tous ces mécanismes arrêtent la sous unité 40S à l'AUG et permettent le recrutement de la sous unité 60S, avec l'aide d'eIF5B, pour constituer un ribosome (**Fig 2.5**) (Algire et al, 2005). eIF5B-GTP se lie au complexe par l'intermédiaire d'eIF1A (Acker et al, 2006) et catalyse l'association de 60S sur 40S suivie par le déplacement des facteurs d'initiation. L'hydrolyse du GTP d'eIF5B catalysée par la sous unité 60S entraîne également sa dissociation de l'ARNm (Allen et Frank, 2007). L'élongation peut commencer.

Initiation dépendante de la coiffe : les étapes de régulation

L'initiation dépendante de la coiffe est principalement régulée à deux niveaux : au niveau du complexe eIF4F et sur eIF2 (**Fig 5**). En effet, la formation d'eIF4F peut être inhibée par une petite protéine 4E-BP (eIF4E-Binding Protein) qui est capable de s'associer à eIF4E. 4E-BP possède le même site consensus qu'eIF4G pour s'associer à eIF4E. 4E-BP entre ainsi en compétition avec eIF4G pour inhiber la formation du complexe eIF4F. Ensuite, l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe peut être régulée en fonction de l'état de phosphorylation du facteur eIF2. Comme eIF2-GDP produit lors de l'initiation ne peut plus fixer l'ARNt initiateur pour le prochain cycle de traduction (**Fig 2**), le GDP doit être échangé par du GTP grâce au facteur d'échange de nucléotide : eIF2B. eIF2 est composé de trois sous unités parmi lesquelles se trouve eIF2α, sa phosphorylation sur la sérine 51 inhibe la traduction en augmentant son affinité avec eIF2B, eIF2 est séquestré sur son facteur d'échange et ne peut plus participer à la synthèse protéique (**Fig 5**).

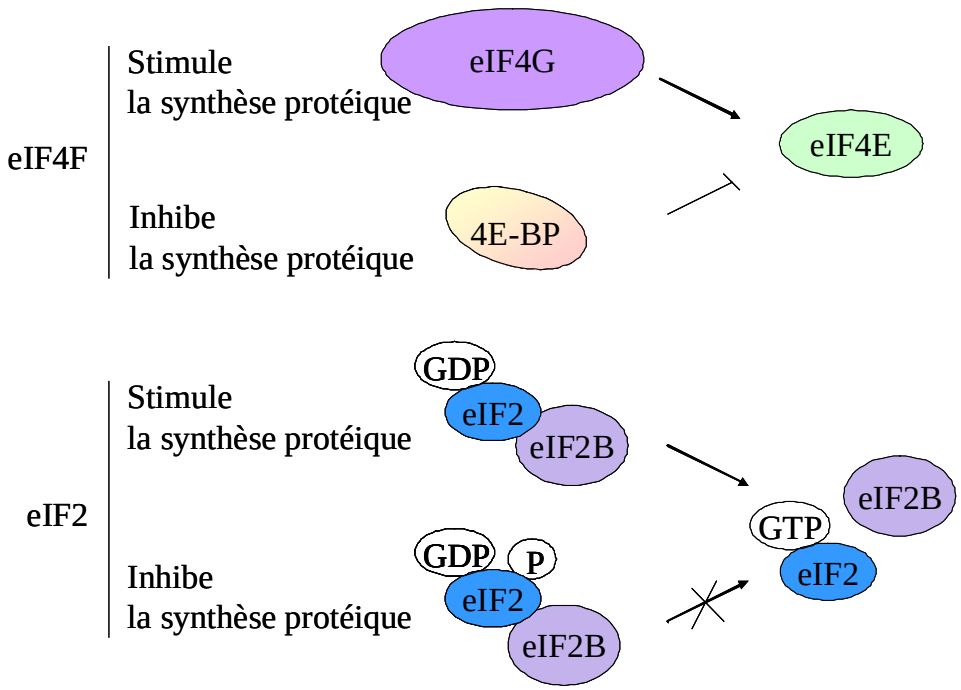


Figure 5 : Régulation de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe par eIF4F et eIF2. *L'interaction entre eIF4E et eIF4G, nécessaire à la synthèse protéique, peut être inhibée par l'association de 4E-BP sur eIF4E. D'un autre côté, eIF2-GDP doit être modifié en eIF2-GTP pour intervenir dans la synthèse protéique grâce au facteur eIF2B. La phosphorylation d'eIF2 (sur la sérine 51 de la sous unité alpha) séquestre eIF2 sur eIF2B et inhibe la synthèse protéique.*

IRES

Certains ARNm sont traduits de façon indépendante de la coiffe en utilisant des structures secondaires présentes en 5'UTR (**Fig 6**). Les ribosomes sont recrutés sur l'ARNm avec l'aide de protéines ITAFs (IRES Trans Acting Factors) et de facteurs d'initiation.

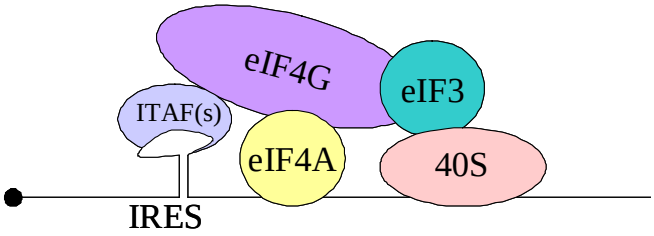


Figure 6 : L'initiation de la traduction indépendante de la coiffe. *Les facteurs d'initiation sont recrutés de façon interne avec l'aide des ITAFs, après reconnaissance d'une séquence IRES en 5'UTR de l'ARNm.*

Les premières séquences IRES ont été décrites dans la région 5'UTR de différents virus (Jang et al, 1988 ; Pelletier et Sonenberg, 1988). En effet, les virus sont capables d'inhiber la synthèse protéique cellulaire mais continuent à produire leurs propres protéines. Lors de l'infection, eIF4G est clivé par des protéases virales et perd son site d'interaction à eIF4E. eIF4G clivé ne peut alors plus participer à l'initiation dépendante de la coiffe mais il est toujours capable d'interagir avec eIF4A et eIF3 pour intervenir dans l'initiation dépendante des IRES. D'autres virus comme les cardiovirus utilisent une autre stratégie, ils stimulent la déphosphorylation de l'inhibiteur de traduction 4E-BP pour inhiber la synthèse protéique cellulaire au profit de la synthèse IRES dépendante (Lopez-Lastra et al, 2005).

Bien qu'ils soient coiffés, les ARNm cellulaires ont eux aussi des IRES : plus de 10% des ARNm seraient capables d'initier la traduction à partir d'un IRES (Stoneley et Willis, 2004). La majorité de ces IRES se trouvent dans des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire ou l'apoptose et dont la synthèse est essentielle en cas de stress (Holcik et Sonenberg, 2005).

Les IRES viraux se caractérisent par une structure secondaire complexe très conservée phylogénétiquement et très importante à leur fonction. Les IRES cellulaires présentent aussi une structure secondaire complexe mais aucune conservation n'est retrouvée (Baird et al,

2006 ; Baird et al, 2007). De plus, des mutations dans les IRES cellulaires n'inhibent pas complètement la traduction, indiquant que les liens structures-fonctions sont moins rigides que dans les virus (Stoneley et Willis, 2004). De nombreux IRES cellulaires sont composés de différents petits modules interagissant pour donner la fonction. L'identification des IRES ne se base donc pas sur les analyses de séquences mais sur leurs fonctions déterminées en utilisant des ARNm bicistroniques (Martinez-Salas, 1999) : deux ARNm sont insérés dans une même construction, le premier est régulé de manière dépendante de la coiffe, le deuxième possède une séquence IRES en amont de sa région codante et est traduit de manière indépendante de la coiffe.

Les IRES sont indépendants de la coiffe, mais tout comme la traduction dépendante de la coiffe, ils interagissent avec des facteurs d'initiation, à l'exception d'eIF4E, pour recruter le ribosome sur l'ARNm (Lopez-Lastra et al, 2005). De plus, en dehors de ceux impliqués dans la traduction dépendante de la coiffe, d'autres facteurs interviennent au niveau des IRES. C'est le cas de DAP5/p97/NAT1, une protéine activée par clivage en apoptose pour permettre la traduction IRES dépendante de protéines intervenant dans l'apoptose. DAP5/p97/NAT1 appartient à la même famille qu'eIF4G : DAP5/p97/NAT1 ne possède pas de site de liaison à eIF4E mais sa région C-terminale ressemble beaucoup à celle d'eIF4GI (Marash et Kimchi, 2005). Enfin, certains facteurs d'initiation pourraient jouer un rôle spécifique dans la traduction IRES dépendante. Par exemple, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris, il est démontré que la phosphorylation d'eIF2α induite par un stress stimule spécifiquement l'activité de quelques IRES (Holcik et Sonenberg, 2005).

Il est suggéré que les ITAFs faciliteraient le recrutement des ribosomes grâce à une activité chaperonne permettant à l'IRES d'adopter une conformation idéale à la traduction (Lopez-Lastra et al, 2005). Certains ITAFs peuvent avoir un effet inhibiteur sur la synthèse protéique dépendante des IRES (Stoneley et Willis, 2004). Les régulations de ces IRES sont encore peu connues mais des résultats récents indiquent que les ITAFs sont des protéines capables de passer du noyau au cytoplasme en réponse à des stimuli extérieurs. Cela suggère que les IRES et les ITAFs seraient régulés en fonction de leur localisation cellulaire (Lewis et Holcik, 2008). Deux modèles sont proposés (**Fig 7**). Dans les deux cas, les ITAFs sont d'abord nucléaires. Dans le premier modèle, ces ITAFs nucléaires séquestrent les ARNm dans le noyau et inhibent ainsi leur traduction. Ce n'est qu'en cas de stress que les complexes ITAFs/ARNm passent dans le cytoplasme pour pouvoir synthétiser les protéines

correspondantes. Dans le deuxième modèle, les ARNm sont dans le cytoplasme, séparés de leurs ITAFs nucléaires. Les stimuli permettent aux ITAFs de s'accumuler dans le cytoplasme.

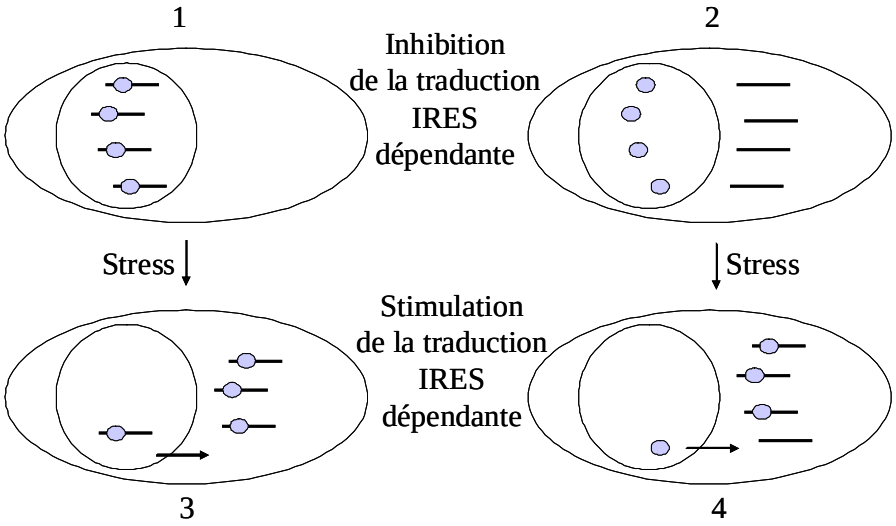


Figure 7 : Régulation de l'initiation de la traduction dépendante des IRES en fonction de la localisation des ITAF(s) et des ARNm. *En condition normale, les ITAFs (représentés par des ronds violets) sont séquestrés dans le noyau. Les ARNm possédant des séquences IRES peuvent être déjà associés à leurs ITAFs dans le noyau (1) ou être séparés dans le cytoplasme (2). En cas de stress, l'ensemble ITAFs/ARNm (3) ou les ITAFs seuls (4) passent dans le cytoplasme pour permettre de recruter les ribosomes sur ces ARNm et produire des protéines.*

1-2-2-L'élongation

L'élongation correspond à l'allongement de la chaîne polypeptidique par ajout d'acides aminés en apportant les aminoacyl ARNt sur l'ARNm en cours de traduction.

Elongation : description des différentes étapes

Cette étape nécessite les acteurs suivants (**Fig 8**) : eEF1A, eEF1B et eEF2. eEF1A lié au GTP s'associe à un aminoacyl-ARNt puis se fixe au niveau du site A du ribosome (**Fig 8.1**). Le GTP est ensuite hydrolysé (**Fig 8.2**), cette réaction permet de contrôler la fidélité de la traduction. eEF1A-GDP est alors libéré (**Fig 8.3**). eEF1B est un facteur d'échange de nucléotides qui permet de recharger eEF1A en GTP pour pouvoir réaliser un nouveau cycle de traduction. Le nouvel acide aminé apporté est rattaché à l'extrémité C terminale de la

chaîne polypeptidique naissante grâce à la formation d'une liaison peptidique médiée par l'activité peptidyl transférase de la sous unité 60S. eEF2, qui hydrolyse lui aussi son GTP, est impliqué dans la translocation du peptidyl ARNt du site A au site P du ribosome (**Fig 8.4** et **8.5**) eEF2-GDP est libéré (Le Sourd et al, 2006a ; Merrick et Nyborg, 2000 ; Browne et Proud, 2002).

Elongation : les étapes de régulation

Il est important de réguler l'élongation pour qu'elle ne devienne pas une étape limitante : par exemple, lorsque l'initiation est stimulée, le nombre de ribosomes recrutés sur un ARNm augmente et cela nécessite de stimuler également l'activité d'élongation. De plus, cette étape d'élongation doit être finement régulée pour éviter les erreurs lors de l'ajout des acides aminés (Browne et Proud, 2002).

L'élongation peut d'abord être régulée par eEF1A et eEF1B qui sont des phosphoprotéines. eEF1B se compose de 3 sous unités : α, β/δ et γ. eEF1Bα est le siège de l'activité d'échange GDP/GTP. Le complexe eEF1B contient également un deuxième facteur d'échange GDP/GTP qui varie en fonction des espèces : eEF1Bβ se retrouve chez les plantes alors que eEF1Bδ est présent chez les animaux. Enfin, eEF1Bγ aurait un rôle dans l'assemblage de eEF1B en assurant au complexe une conformation optimale à l'interaction avec eEF1A-GDP (Browne et Proud, 2002 ; Le Sourd et al, 2006a). Ces protéines possèdent des sites potentiels de phosphorylation par de nombreuses kinases telles que la caséine kinase 2 (CK2), les kinases dépendantes des cyclines (CDK), la multipotential S6 Kinase (MS6K) ou encore la protéine kinase C (PKC). Cependant, le rôle de ces phosphorylations restent à démontrer *in vivo* (Browne et Proud, 2002 ; Le Sourd et al, 2006a).

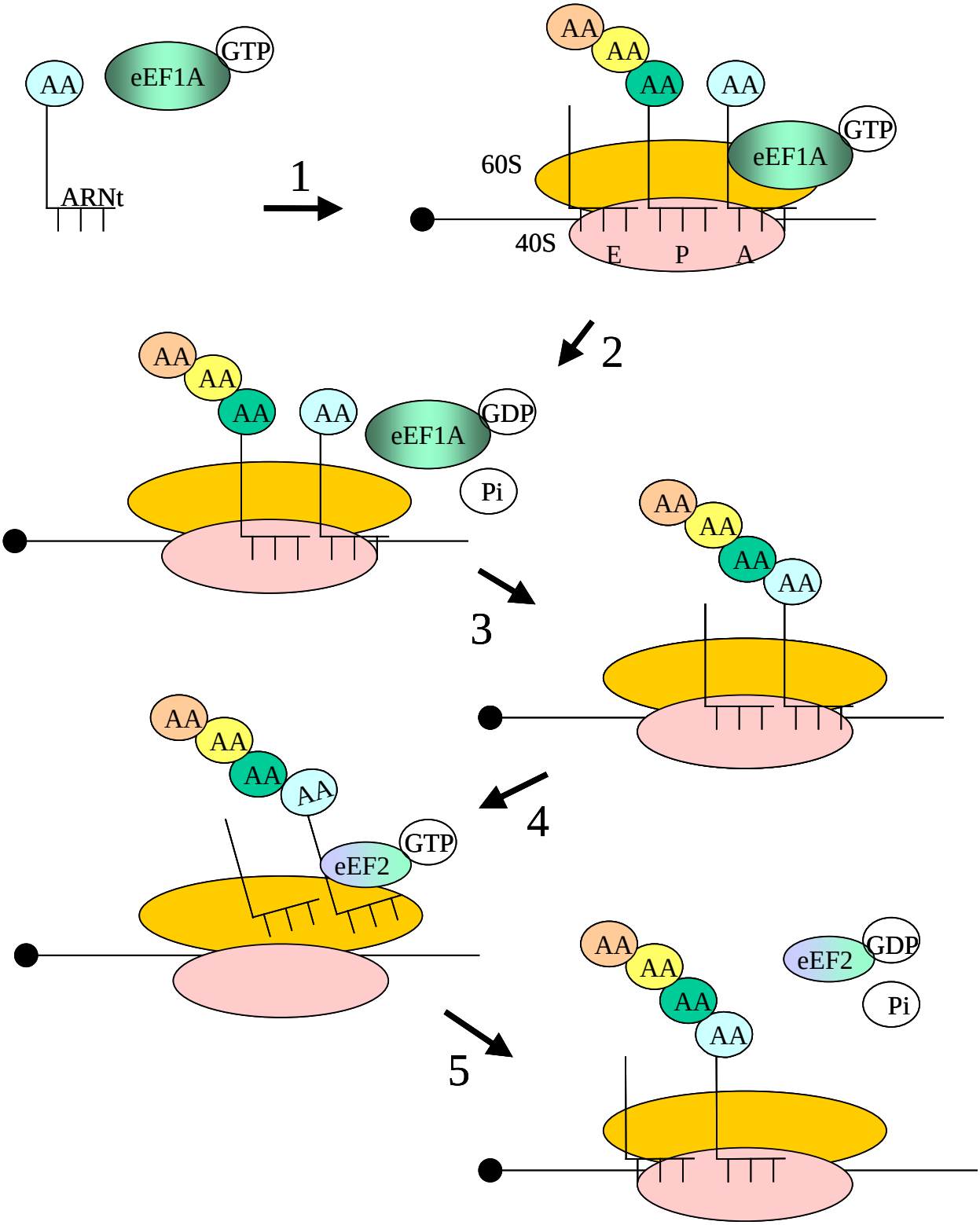


Figure 8 : L'élongation de la traduction. *(1) eEF1A-GTP s'associe à un aminoacyl ARNt puis se fixe sur le ribosome. (2) Le GTP lié à eEF1A est hydrolysé en GDP+Pi. (3) eEF1A-GDP est relâché. Le nouvel acide aminé (AA) est rattaché à la chaîne polypeptidique. (4) eEF2-GTP se fixe sur l'ARNt, le peptidyl ARNt est déplacé au site P du ribosome, cette réaction est catalysée par l'hydrolyse du GTP d'eEF2. (5) eEF2-GDP est libéré.*

Ensuite, la protéine eEF2 est aussi régulée par phosphorylation. La phosphorylation d'eEF2 sur la Thr 56 entraîne son inactivation. Cette phosphorylation inhibitrice stimulée en hypoxie permet d'inhiber la synthèse protéique (Connolly et al, 2006). L'eEF2 Kinase (eEF2K), auparavant nommée Calcium Calmoduline Dependent Protein Kinase III, est capable de phosphoryler eEF2. L'activité d'eEF2K est elle-même régulée par différentes kinases pouvant être inhibitrices ou activatrices en fonction des sites de phosphorylations (**Fig 9**) (Browne et Proud, 2002 ; Proud, 2000).

Par exemple, en fonction des stimuli, eEF2K est inhibée par la p70S6Kinase (p70S6K) dans une voie dépendante de la kinase FRAP/mTOR (FKBP12 Rapamycin Associated Protein/mammalian Target Of Rapamycin : intervient aussi dans la régulation de l'initiation), par la p90RSK1 (p90 Ribosomal S6 Kinase1) dans une voie dépendante des MAPKs et par SAPK4/p38 (Stress Activated Protein Kinase4/p38 MAPKinase). D'autres kinases stimulent l'activité d'eEF2K sur eEF2 et sont donc inhibitrices de la traduction : l'AMPK (AMP Activated Protein Kinase), activée lorsque la quantité d'ATP baisse dans les cellules et la PKA (cAMP dependent protein kinase). La phosphatase responsable de la déphosphorylation d'eEF2 est probablement PP2A (Proud, 2000)

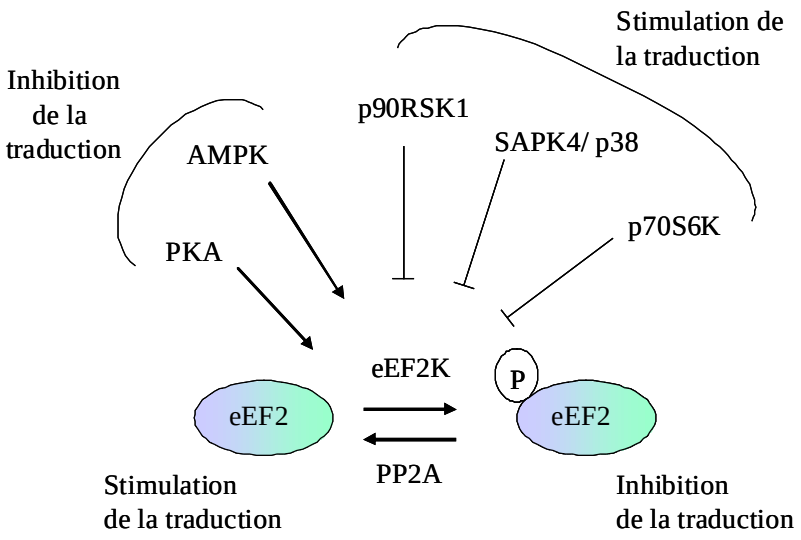


Figure 9 : Régulation de la phosphorylation d'eEF2. *L'activité d'eEF2K est stimulée par les kinases PKA et AMPK et inhibée par p90RSK1, SAPK4/p38 et p70S6K. eEF2K phosphoryle eEF2 pour inhiber la traduction. Cette phosphorylation peut être réversée par PP2A.*

1-2-3- La terminaison

Terminaison : description des différentes étapes

La dernière étape de la synthèse protéique est la terminaison, elle commence lorsque le ribosome arrive sur l'un des trois codons stop (UAA, UAG et UGA). Elle est catalysée par les eRFs (eukaryotic Release Factors) : eRF1 et eRF3 (**Fig 10**). Chez les eucaryotes, eRF1 a trois fonctions : il reconnaît les codons stop, il stimule l'activité GTPase de eRF3 et catalyse l'hydrolyse du pont ester entre le peptide et l'ARNt du dernier peptidyl-ARNt. Le facteur eRF3 permet de réguler l'activité d'eRF1 de façon dépendante du GTP.

La liaison d'eRF3-GTP sur eRF1 entraîne un changement de conformation d'eRF1 qui augmente l'affinité du complexe sur le ribosome au niveau d'un codon stop (**Fig 10.1** et **10.2**) (Fan-Minogue et al, 2008). Cette interaction stable permet à eRF1 de stimuler l'activité GTPase d'eRF3. L'hydrolyse du GTP agit sur la conformation d'eRF1 (**Fig 10.3**) et stimule le relargage de la chaîne polypeptidique (**Fig 10.4**) (Salas-Marco et Bedwell, 2004).

A la fin de la terminaison, les sous unités ribosomiques doivent se dissocier de l'ARNm pour qu'ils puissent être utilisés lors d'un nouveau cycle de traduction (**Fig 10.5**). Contrairement aux bactéries qui font intervenir des protéines spécifiques au cours de cette étape, les eucaryotes ne possèdent pas de gènes codant pour des RRFs (Ribosome Recycling Factors). Ce sont les facteurs d'initiation qui jouent ce rôle : eIF3 avec la sous unité eIF3j, eIF1 et eIF1A sont capables de dissocier les sous unités ribosomiques, l'ARNm et l'ARNt (Pisarev et al, 2007).

Terminaison : les étapes de régulation

La formation des complexes de terminaison est régulée par dégradations protéiques successives. Il existe deux gènes codant pour eRF3 chez les mammifères : eRF3a et eRF3b. Alors qu'eRF3a est exprimé dans tous les types cellulaires testés, eRF3b est restreint au cerveau (Chauvin et al, 2005). Les protéines eRF3a et eRF1 sont stables quand elles interagissent l'une avec l'autre mais après dissociation, eRF3a est dégradée par le protéasome (Chauvin et Jean-Jean, 2008). La déplétion de ce facteur eRF3a dans les cellules en culture entraîne la dégradation d'eRF1 (Chauvin et al, 2005).

eRF3 interagit aussi avec PABP, suggérant un rôle d'eRF3 dans la régulation de l'initiation et dans la régulation de la stabilité des ARNm (Uchida et al, 2002). eRF3a est également impliquée dans la régulation de FRAP/mTOR (Chauvin et al, 2007), une kinase intervenant dans le contrôle des facteurs d'initiation et d'élongation. La déplétion d'eRF3a dans des cellules de cancer du côlon HCT116 induit une baisse du taux de traduction corrélée à une hypophosphorylation de deux substrats de FRAP/mTOR : 4E-BP1 et S6Kinase (Chauvin et al, 2007). Ainsi, la cellule ajusterait l'efficacité de l'initiation et de l'élongation en fonction de la terminaison.

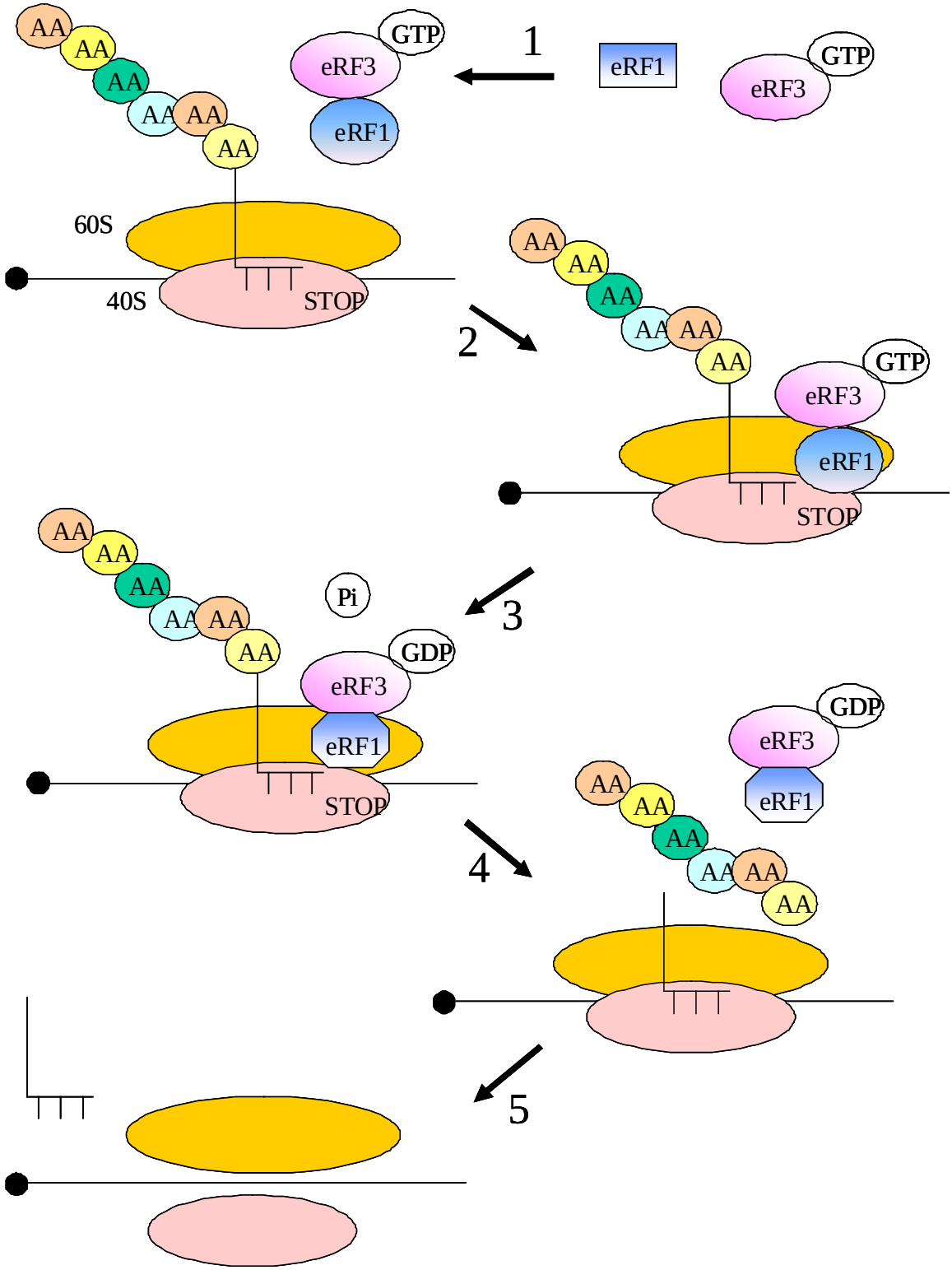


Figure 10 : La terminaison de la traduction. *(1) eRF1 change de conformation après liaison à eRF3-GTP. (2) Le codon STOP est reconnu par eRF1. (3) Le GTP lié à eRF3 est hydrolysé et eRF1 change à nouveau de conformation. (4) La chaîne polypeptidique et les facteurs de terminaison sont libérés. (5) L'ARNt ainsi que les sous unités ribosomiques se dissocient de l'ARNm.*

1-3- La régulation du complexe eIF4F

L'une des étapes limitantes de la traduction se déroule lors de l'initiation de la traduction, lorsque le complexe 43S est recruté sur l'ARNm (Gingras et al, 1999). Cette étape représente un point essentiel dans la régulation de la synthèse protéique, en condition physiologique ou en cas de stress. Comme décrit précédemment (**Fig 2**), le recrutement du ribosome sur l'ARNm dépend du complexe eIF4F (composé des 3 protéines eIF4E, eIF4G, eIF4A) et de son inhibiteur 4E-BP. Ainsi, dans cette partie, nous présenterons la fonction et la régulation de chacune de ces quatre protéines.

1-3-1- Le facteur eIF4E

Il existe plusieurs isoformes d'eIF4E. Trois classes (eIF4E-1, eIF4E-2 et eIF4E-3) ont été identifiées chez les mammifères. La classification se base sur les acides aminés présents en position 43 et 56 d'après la numérotation humaine (Joshi et al, 2005) :

- eIF4E-1 possède un tryptophane en position 43 et 56
- eIF4E-2 n'a pas de tryptophane sur ces deux positions
- eIF4E-3 possède un tryptophane en position 43 seulement

Le tryptophane en position 56 sur eIF4E-1 est l'un des acides aminés qui intervient dans l'interaction d'eIF4E avec la coiffe (Joshi et al, 2005). Les variations d'acides aminés dans cette position en fonction des isoformes d'eIF4E suggèrent une conformation et une interaction particulière de chaque forme par rapport à la coiffe des ARNm.

Les eIF4E des deux premières classes se subdivisent en sous groupes: on trouve principalement eIF4E-1a, eIF4E-1b, eIF4E-2a et eIF4E-2b (Joshi et al, 2005). Ces sous groupes ne sont pas présents chez tous les organismes. Par exemple, l'analyse des génomes humain et murin n'a pas permis de trouver de séquences correspondantes à eIF4E-2b. Chaque forme possède des caractéristiques. Alors que les transcrits d'eIF4E-1a sont exprimés de manière ubiquitaire, ceux d'eIF4E-1b s'expriment seulement au cours du développement embryonnaire puis dans les gonades et dans les muscles chez les poissons. Contrairement à eIF4E-1a, eIF4E-1b n'interagit que faiblement avec la coiffe des ARNm et pas du tout avec eIF4G ou 4E-BP (Joshi et al, 2005 ; Minshall et al, 2007).

eIF4E-1a et eIF4E-2a sont les sous groupes communément appelés eIF4E-1 et eIF4E-2. L'expression des transcrits a été analysée chez la souris. eIF4E-1 et eIF4E-2 sont présents de manière ubiquitaire dans les différents tissus. En revanche, ceux d'eIF4E-3 ne sont présents que dans le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et la râte. (Joshi et al, 2004). Ces trois eIF4E sont capables de se lier à la coiffe m^7GTP des ARNm même si eIF4E-3 semble avoir une spécificité moins forte que les deux autres puisqu'il se fixe aussi au GTP non méthylé. Enfin, ces isoformes présentent des affinités différentes pour les protéines eIF4G et 4E-BP (**Fig 11**). Alors qu'eIF4E-1 est capable de se lier à ces deux partenaires, eIF4E-2 et eIF4E-3 présentent des spécificités (Joshi et al, 2004) :

- eIF4E-2 se lie à 4E-BP mais pas à eIF4G
- eIF4E-3 se lie à eIF4G mais pas à 4E-BP

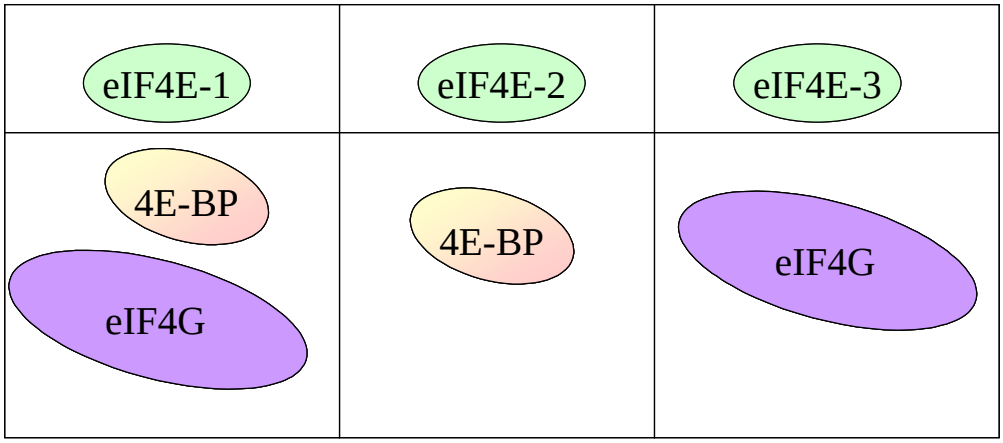


Figure 11 : Interaction des eIF4E représentant les trois classes présentes chez les mammifères avec eIF4G et 4E-BP. *eIF4E-1 peut s'associer à 4E-BP et à eIF4G alors que eIF4E-2 et eIF4E-3 ne s'associent respectivement qu'à 4E-BP et eIF4G.*

Ces particularités suggèrent que chaque isoforme joue un rôle spécifique en fonction de leur expression et de leurs partenaires. Cette hypothèse a été confirmée par les résultats obtenus chez la drosophile (Cho et al, 2005). Sept gènes codant pour huit isoformes d'eIF4E notées d'eIF4E-1 à eIF4E-8, ont été trouvés dans le génome de la drosophile ; un seul gène codant pour eIF4E-1 et eIF4E-2 après épissage alternatif (Hernandez et al, 2005). Par rapport à la classification précédente (Joshi, 2005), eIF4E-1 à eIF4E-7 appartiennent à la classe 1 alors qu'eIF4E-8 est la seule forme qui correspond à la classe 2. Les transcrits de ces huit isoformes sont présents à différents instants du développement et les protéines présentent

différentes affinités pour la coiffe des messagers ainsi que pour eIF4G et 4E-BP. Il semblerait qu'eIF4E-1 soit l'acteur principal dans la traduction dépendante de la coiffe chez la drosophile (Hernandez et al, 2005). De plus, eIF4E-8 joue aussi un rôle important, il interagit avec les protéines Bicoïd et Brain tumor (Brat) pour influencer la détermination des axes embryonnaires chez la drosophile (Cho et al, 2005; Cho et al, 2006). Il existe également de nombreuses isoformes d'eIF4E chez C. elegans : on trouve cinq eIF4E (IFE-1, IFE-2, IFE-3, IFE-4 et IFE-5) (Keiper et al, 2000). Quatre de ces eIF4E font partie de la classe 1 ; IFE-4 appartient à la classe 2. IFE-3 est le plus proche de l'eIF4E-1 de mammifères et ce facteur IFE-3 est le seul indispensable à la survie des embryons. Le rôle des autres isoformes reste encore à déterminer.

eIF4E est un point de contrôle majeur, il a été décrit comme le moins abondant des facteurs d'initiation après quantification par Western blot (Duncan et al, 1987). Ces résultats sont controversés par les données obtenues dans des lysats de réticulocytes (Rau et al, 1996) qui montrent qu'une déplétion de 80 à 90% d'eIF4E ne réduit le taux de synthèse protéique que de 30%. De plus, une nouvelle estimation par Western blot d'eIF4E présent dans ces lysats indique que ce n'est pas un facteur limitant et qu'une grande quantité d'eIF4E n'est pas engagée dans la traduction en condition normale (Rau et al, 1996). Les quantifications obtenues par Western blot chez la levure (von der Haar et McCarthy, 2002) indiquent qu'eIF4G serait le facteur limitant dans la traduction dépendante de la coiffe. En revanche, de nombreux articles montrent qu'eIF4E peut être contrôlé à plusieurs niveaux pour réguler la synthèse protéique : eIF4E est régulé au niveau de la transcription, de la localisation cellulaire, par phosphorylation et par microARNs.

Régulation d'eIF4E au niveau de la transcription

La transcription d'eIF4E est régulée positivement par le proto-oncogène c-Myc et négativement par le suppresseur de tumeur p53. Le promoteur d'eIF4E contient deux motifs « E-box » capable d'interagir avec c-Myc pour activer la transcription d'eIF4E (Jones et al, 1996 ; Schmidt, 2004). D'un autre côté, la surexpression de la protéine p53 entraîne une diminution de la quantité d'ARNm et de protéines eIF4E (Zhu et al, 2005). Cette régulation d'eIF4E par p53 est indirecte, il n'y a pas d'interaction entre p53 et le promoteur d'eIF4E (**Fig 12**). En effet, p53 interagit avec c-Myc et inhibe son interaction avec le promoteur d'eIF4E (Zhu et al, 2005). Il faut noter que p53 est muté dans plus de 50% des cancers. L'induction

d'eIF4E après une perte de p53 représente un nouveau mécanisme impliqué dans la tumorigenèse et la progression cancéreuse.

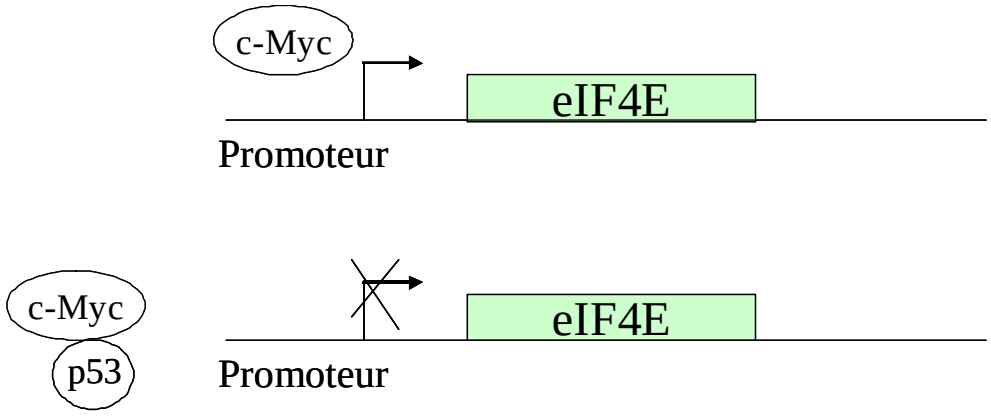


Figure 12 : Régulation de la transcription d'eIF4E par c-Myc et p53. *c-Myc se lie au promoteur d'eIF4E pour stimuler sa transcription. En séquestrant c-Myc, p53 inhibe cette stimulation.*

Régulation d'eIF4E par localisation cellulaire

eIF4E est une protéine cytoplasmique mais une fraction est nucléaire (Lejbkowicz et al. 1992 ; Iborra et al, 2001). Le rôle nucléaire d'eIF4E est étudié depuis peu. La protéine eIF4E est localisée dans tout le nucléoplasme mais elle est enrichie dans certaines régions appelées speckles (zones riches en facteurs d'épissage) dans la lignée de cellules cancéreuses Hela. Ainsi, des expériences d'immunofluorescence indiquent qu'eIF4E colocalise avec Sm et U1 snRNP (Smith et U1 small nuclear RiboNucleoProtein). Cette localisation dans les speckles n'est pas modifiée par un traitement des cellules au cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, et serait donc indépendante de son rôle de facteur de traduction (Dostie et al, 2000a).

eIF4E se localise dans le noyau grâce à son transporteur : 4E-T (Dostie et al, 2000b). En effet, 4E-T interagit avec eIF4E par un motif consensus YxxxxLΦ et passe dans le noyau avec l'aide d'un complexe α/β importine (**Fig 13**).

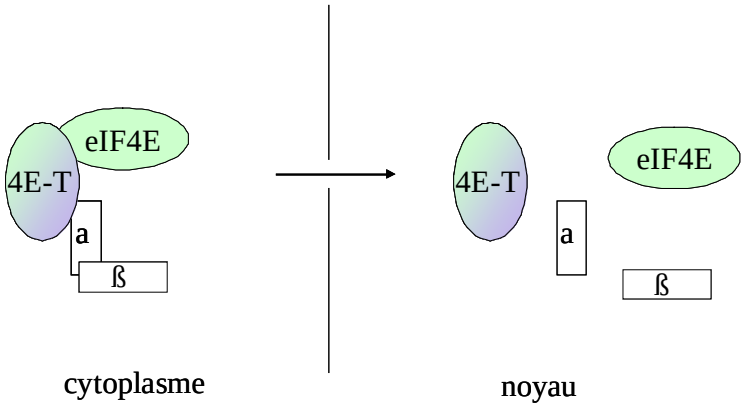


Figure 13 : Localisation nucléaire d'eIF4E. *Dans le cytoplasme, **e**IF4E s'associe à 4E-T ainsi qu'au complexe α/β importine. Ces associations permettent le passage d'eIF4E dans le noyau.*

4E-T est surtout cytoplasmique, il ne reste dans le noyau que transitoirement, puis est ramené dans le cytoplasme par un mécanisme dépendant de CRM1 (Chromosome maintenance region 1) /exportine 1 (Dostie et al, 2000b). En plus de sa fonction de transporteur d'eIF4E dans le noyau, 4E-T joue un rôle important dans le cytoplasme en amenant eIF4E dans des zones connues pour dégrader l'ARNm : les « P-bodies » (Andrei et al, 2005; Ferraiuolo et al, 2005). En effet, 4E-T et eIF4E colocalisent avec les facteurs responsables du décoiffage des ARNm, comme Dcp1 (Decapping protein). De plus, 4E-T est un inhibiteur de traduction et permet de réguler la dégradation des ARNm qui contiennent des séquences ARE (Adenine/uridine Rich Elements) en 3'UTR (Ferraiuolo et al, 2005).

Enfin, la localisation nucléaire d'eIF4E est aussi régulée par 4E-BP1 (Rong et al, 2008). Une fraction de 4E-BP1 se localise dans le noyau dans différents types cellulaires, de manière indépendante de son état de phosphorylation ou de sa capacité à lier eIF4E. En cas de stress, la quantité d'eIF4E nucléaire augmente et cela dépend de la présence de 4E-BP1 dans le noyau. Cette séquestration nucléaire d'eIF4E par 4E-BP1 permettrait d'inhiber la synthèse protéique de manière simple avant l'association d'eIF4E avec eIF4G dans le cytoplasme.

eIF4E est régulé par phosphorylation

eIF4E est phosphorylé sur un seul site, la Sérine 209, après traitement par des facteurs de croissance, des hormones, des mitogènes ou en stress cellulaires (Morley et Traugh, 1989 ;

Wang et al, 1998 ; Flynn et Proud, 1996). Par exemple, le traitement des cellules par les phorbol esters stimule la phosphorylation d'eIF4E par une voie PKC dépendante. La Ser 209 est le site majeur de phosphorylation *in vitro* par PKC et cette phosphorylation est inhibée si eIF4E est associé à 4E-BP1 (Tuazon et al, 1990 ; Whalen et al, 1996 ; Wang et al, 1998). Cette phosphorylation par PKC fait intervenir ERK et p38 (Wang et al, 1998). Cependant, la seule kinase mise en évidence pour phosphoryler eIF4E *in vivo* est Mnk1 (Waskiewicz et al, 1999 ; Pyronnet et al, 1999; Pyronnet, 2000), une kinase qui peut aussi être activée par ERK et p38 (Fukunaga et Hunter, 1997).

Mnk1 ne lie pas eIF4E mais se fixe sur la région C-terminale d'eIF4G pour se rapprocher d'eIF4E et permettre sa phosphorylation. Mnk1 peut aussi se lier à p97 mais le rôle de cette interaction reste inconnu puisque p97 n'interagit pas avec eIF4E. p97 pourrait permettre de séquestrer Mnk1 pour inhiber la phosphorylation d'eIF4E (Pyronnet et al, 1999).

Il existe deux isoformes de Mnk. Mnk1 et Mnk2 régulent différemment eIF4E. Contrairement à Mnk1, Mnk2 possède une activité basale très forte et n'est pas très sensible à l'activation de ERK ou de p38. C'est donc Mnk1 qui joue un rôle essentiel pour phosphoryler eIF4E en réponse à des stimuli extérieurs faisant intervenir la voie des MAPK. Mnk2 est aussi capable de phosphoryler eIF4E mais beaucoup plus faiblement (Ueda et al, 2004). Mnk1 et Mnk2 seraient les seules kinases responsables de la phosphorylation d'eIF4E sur la Ser 209 dans les fibroblastes embryonnaires de souris puisqu'aucune phosphorylation d'eIF4E n'est détectable dans ces cellules chez des souris double KO pour Mnk1 et 2, même après stimulation (Ueda et al, 2004). Cependant, la synthèse protéique globale n'est pas affectée dans ces fibroblastes et ces souris double KO se développent normalement. Ceci indique que la phosphorylation d'eIF4E n'est pas indispensable au cours du développement. De plus, cette Ser 209 n'est pas nécessaire à la synthèse protéique (McKendrick et al, 2001a). En revanche, chez la drosophile, Lk6, l'homologue de Mnk aussi capable de phosphoryler eIF4E *in vivo*, est indispensable au développement (Arquier et al, 2005). Dans ce modèle, la phosphorylation d'eIF4E est importante puisque le développement larvaire est perturbé chez des mutants homozygotes possédant un eIF4E non phosphorylable (Lachance et al, 2002).

La stimulation de la traduction par des facteurs de croissance est corrélée à la phosphorylation d'eIF4E alors que l'inhibition de la synthèse protéique observée en choc thermique, en privation alimentaire, en arrêt du cycle cellulaire et en infection virale est

corrélée à la déphosphorylation d'eIF4E (Gingras et al, 1999). Cependant, le rôle de cette phosphorylation sur la synthèse protéique est controversé (Scheper et Proud, 2002). D'abord, les données structurales indiquent que la phosphorylation d'eIF4E stabiliserait son interaction avec la coiffe. La phosphorylation de la Ser 209 permettrait de former un pont avec la Lys 159 pour stabiliser l'interaction avec la coiffe des ARNm (Marcotrigiano et al, 1997). Ces résultats sont confirmés par l'analyse des interactions entre la coiffe et des mutants d'eIF4E sur la Ser 209 (Shibata et al, 1998). Pourtant, d'autres résultats indiquent le contraire. Des analyses par spectrofluorométrie et par résonance plasmonique de surface (SPR) montrent que la phosphorylation d'eIF4E diminue son affinité avec la coiffe mais n'affecte pas sa liaison avec 4E-BP1 (Scheper et al, 2002).

Cette phosphorylation d'eIF4E est inhibée en situation de stress après activation de PAK2 (p21 Activated protein Kinase 2) (Orton et al, 2004). PAK2 est une protéine kinase impliquée dans le stress et l'apoptose (Roig et Traugh, 2001). Lorsque PAK2 phosphoryle la région N-terminale de Mnk1, cette dernière ne peut plus se fixer sur eIF4G, cela inhibe à la fois la phosphorylation d'eIF4E et celle d'eIF4G.

Enfin, le proto oncogène Ras se trouve en amont de plusieurs voies de signalisation aboutissant à la régulation de Mnk et donc de la phosphorylation d'eIF4E (Mamane et al, 2004) : il stimule à la fois la voie Raf/MEK/MAPK/Mnk et la voie MEKK/JNKK/p38/Mnk (**Fig 14**).

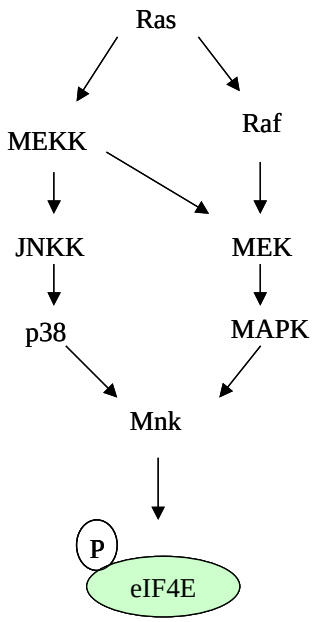


Figure 14 : Voies de signalisation régulant la phosphorylation d'eIF4E. *Ras peut stimuler à la fois Raf et MEKK, deux voies qui mènent à l'activation de Mnk pour phosphoryler eIF4E.*

Régulation par miARNs

Les microARNs (miARNs) sont de petits ARNs d'une vingtaine de nucléotides régulant l'expression des gènes. Chaque miARN reconnait une séquence particulière MRE (miRNA Recognition Element) présente sur les ARNm cibles permettant de réguler spécifiquement leur expression. Lorsque la complémentarité avec leur ARNm cible est imparfaite, les miARNs sont capables d'inhiber l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe sans toucher la dégradation des ARNm. Ils répriment l'initiation dépendante de la coiffe mais pas l'initiation dépendante des IRES (Humphreys et al, 2005 ; Pillai et al, 2005). Cela suggère qu'un microARN peut agir sur l'initiation de la traduction en interférant avec eIF4E.

De plus, pour agir sur leur cible, les microARNs recrutent directement la protéine Argonaute autour de laquelle se forme le complexe RISC (RNA-induced silencing complexes). Une étude récente montre qu'Argonaute est une protéine capable d'interagir avec la coiffe des ARNm (**Fig 15**). Ce mécanisme permet ainsi de limiter l'interaction d'eIF4E sur la coiffe et d'inhiber la traduction des ARNm ciblés par des microARNs (Kiriakidou et al, 2007).

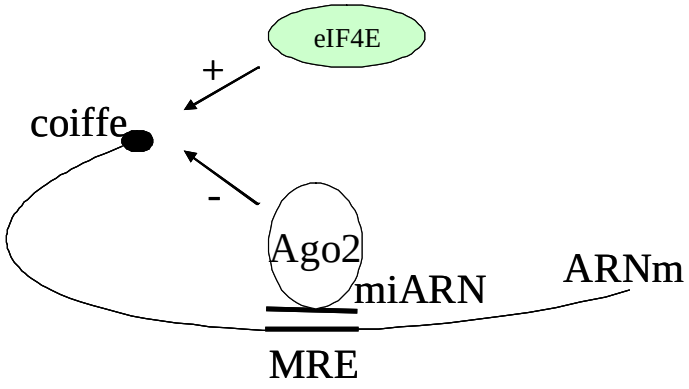


Figure 15 : Inhibition de la traduction dépendante de la coiffe par microARN. *Un microARN reconnaît spécifiquement une séquence MRE (miRNA Recognition Element) sur un ARNm. La protéine Argonaute (Ago2) fixée au miARN, s'associe à la coiffe des ARNm. Elle entre en compétition avec eIF4E et inhibe la synthèse protéique.*

1-3-2- Le facteur eIF4G

Deux isoformes ont été identifiées chez les mammifères : eIF4GI et eIF4GII. Ces deux eIF4G interagissent avec eIF4E et sont décrits comme des homologues fonctionnels (Gradi et al, 1998 ; Imataka et al, 1998). Cependant, ces deux eIF4G jouent des rôles différents dans certains mécanismes tels que la différenciation cellulaire des plaquettes (Caron et al, 2004). Les mégacaryocytes se différencient en plaquettes en réponse à une cytokine, la thrombopoiétine (TPO). TPO stimule la phosphorylation d'eIF4E sur la Ser 209 et recrute sélectivement eIF4GII sur le complexe de la coiffe. Cela pourrait permettre de traduire spécifiquement certains ARNm (Caron et al, 2004).

Les multiples isoformes d'eIF4GI

eIF4GI est la plus étudiée, elle existe elle-même sous plusieurs isoformes qui résultent de divers mécanismes de régulation (**Fig 16**). D'abord, trois promoteurs ont été identifiés (α, β, γ) dans le gène de eIF4GI. Ensuite, il existe un épissage alternatif touchant les 8 premiers exons qui aboutit au moins à 7 ARNm différents. (Byrd et al, 2002; Byrd et al, 2005; Coldwell et Morley, 2006).

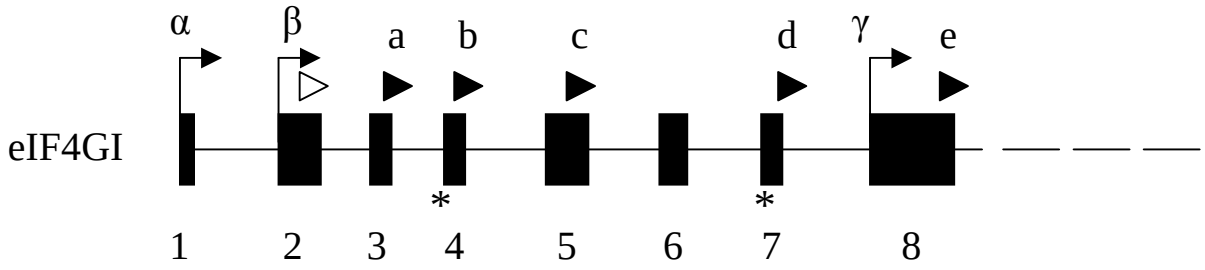


Figure 16 : Régulation de l'expression des isoformes d'eIF4GI. *L'expression des transcrits d'eIF4GI est contrôlée par l'utilisation de promoteurs alternatifs (α, β et γ) et par épissage alternatif concernant les 8 premiers exons (représentés sur cette figure par des rectangles noirs). La synthèse des différentes formes d'eIF4GI est régulée par initiation alternative à partir des cinq AUG présents dans le cadre de lecture (a, b, c, d, e sont représentés par des triangles noirs) et par un uORF (représenté par un triangle blanc). Les deux séquences IRES identifiées sur eIF4GI sont représentées par des astérisques.*

En plus de ces régulations par différents promoteurs et par épissage alternatif, l'expression d'eIF4GI est soumise à une régulation traductionnelle à différents niveaux. Il existe 5 AUGs à l'extrémité 5' de l'ARNm qui peuvent être utilisés comme codons de départ pour donner 5 protéines ayant une région N terminale plus ou moins longue (Byrd et al, 2002). La traduction d'eIF4GI est aussi contrôlée par un uORF (upstream ORF) présent en 5'UTR. En effet, en amont du véritable premier codon d'initiation de certains ARNm, on trouve des codons AUGs qui peuvent être associés à de petits cadres ouverts de lecture et qui influencent l'efficacité de l'initiation de la traduction. La régulation contrôlée par un uORF concerne environ 10% des transcrits chez les eucaryotes (Pallier, 2001). L'uORF inhibe la synthèse d'eIF4GI puisque son codon stop chevauche l'un des véritables codons d'initiation : cette juxtaposition entraîne la perte de ribosomes au niveau du vrai codon AUG et inhibe l'expression d'eIF4GI. Il existe un deuxième uORF mais l'AUG n'est pas dans un bon contexte nucléotidique pour recruter des ribosomes et il serait trop proche de la coiffe pour permettre une traduction efficace (Byrd et al, 2002; Byrd et al, 2005).

Enfin, en utilisant des ARN bicistroniques, deux séquences IRES ont été mises en évidence sur eIF4GI: la première, et celle ayant la plus forte activité, se situe dans l'exon 4 et la deuxième se trouve dans les exons 7 et 8 (Byrd et al, 2005). L'existence d'une traduction IRES dépendante d'eIF4GI est confortée par l'utilisation des protéases virales. La protéase 2A du picornavirus est responsable du clivage d'eIF4GI lors des infections et de l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe. Dans ces conditions, les ARNm d'eIF4GI sont maintenus dans les polysomes et les cinq isoformes sont synthétisées. De façon intéressante et contrairement aux IRES déjà connues, cette activité IRES d'eIF4GI est stimulée lorsque les ARNm sont coiffés par du m^7GTP. Ce mécanisme de contrôle partage les caractéristiques à la fois des IRES et des shunts. Le shunt a été décrit chez les virus comme un mécanisme pour lequel le complexe d'initiation se forme au niveau de la coiffe, commence à balayer l'ARNm mais contourne les structures secondaires présentes en 5'UTR. Cependant, aucune séquence nécessaire au shunt n'a été trouvée en 5'UTR d'eIF4GI (Byrd et al, 2005). Néanmoins, une étude récente montre qu'il existe des sites d'épissage dans plusieurs IRES et ces sites peuvent aboutir à la perte du premier cistron entraînant des faux positifs. C'est le cas de l'IRES d'eIF4G qui ne présente plus d'activité après mutations des sites d'épissage contenus dans l'ARNm bicistronique utilisé (Baranick et al, 2008).

Les rôles des cinq isoformes protéiques d'eIF4GI sont encore inconnus mais l'analyse des séquences suggèrent l'existence de fonctions particulières à chacune puisque, par exemple, la forme la plus courte ne possède plus le domaine de liaison à PABP et pourrait intervenir dans la traduction d'ARNm non polyadénylés. De plus, il a été montré que les isoformes ne restaurent pas identiquement la synthèse protéique dans des cellules épithéliales humaines Hela préalablement déplétées en eIF4GI. Pour comprendre le rôle de ces isoformes, des eIF4GI résistants au siRNA (small interference RNA) ont été exprimées dans des cellules HeLa déplétées en eIF4GI. Bien que la forme la plus longue soit la moins exprimée dans ces cellules HeLa, elle est la plus efficace pour restaurer la synthèse protéique (Coldwell et Morley, 2006).

La déplétion des isoformes eIF4GI par siRNA dans les cellules HeLa montre qu'il existe des co-régulations entre les facteurs d'initiation car les quantités d'eIF4GII et d'eIF4E diminuent également et 4E-BP1 se retrouve hypophosphorylée. De plus, dans ces conditions, le complexe eIF4E/eIF4GI diminue au profit de eIF4E/4E-BP1 (Coldwell et Morley, 2006). Enfin, les cellules déplétées en eIF4GI sont très grandes et multinucléées. Cela indique que les isoformes d'eIF4GI joueraient un rôle dans la cytokinèse.

Partenaires d'eIF4G

eIF4G interagit avec de nombreux facteurs (**Fig 17**). Sa partie N-terminale interagit avec PABP (Imataka et al, 1998) et eIF4E (Lamphear et al, 1995 ; Mader et al, 1995). La région centrale d'eIF4G s'associe à eIF3 et eIF4A (Lamphear et al, 1995 ; Imataka et Sonenberg, 1997). Enfin, sa région C-terminale contient un deuxième site d'association à eIF4A et un site pour Mnk1 (Fukunaga et Hunter, 1997 ; Waskiewicz et al, 1997).

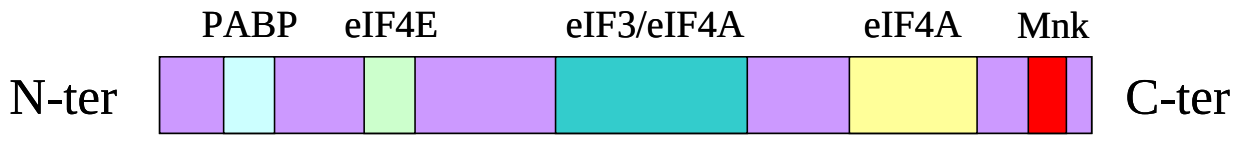


Figure 17 : Localisation des domaines d'interaction d'eIF4G avec ses partenaires. *eIF4G peut interagir avec PABP, eIF4E, eIF3, eIF4A et Mnk.*

eIF4G possède deux sites d'interaction pour eIF4A : un site dans la partie centrale d'eIF4G (eIF4G-m) qui interagit avec la région C-terminale de eIF4A, cette interaction est importante pour la traduction (Morino et al, 2000) et un site en C-terminale d'eIF4G (eIF4G-MA3) qui interagit avec la région N-terminale d'eIF4A : cette interaction joue un rôle régulateur dans la traduction. Certains résultats indiquent qu'eIF4G s'associe à un seul eIF4A (Li et al, 2001) alors que d'autres montrent une association entre deux eIF4A (Korneeva et al, 2001).

L'analyse récente d'eIF4G mutés sur l'un des sites d'interactions avec PABP, eIF3 ou eIF4A montre que ces protéines eIF4G sont toujours capables d'interagir avec eIF4E et de restaurer partiellement la synthèse protéique dans des cellules où l'expression d'eIF4G est altérée par siRNA (Hinton et al, 2007). Cela indique que chaque interaction, prise individuellement, n'est pas essentielle à la synthèse protéique mais joue plutôt un rôle régulateur.

Régulation d'eIF4G par phosphorylation

eIF4G est une phosphoprotéine. Trois sites de phosphorylations en C-terminale d'eIF4GI ont été mis en évidence: les sérines 1108, 1148 et 1192 (Raught et al, 2000). Ces phosphorylations sont sensibles à la rapamycine. La phosphorylation de mutants tronqués en N-terminale et exprimés dans des cellules embryonnaires de rein humain, 293T, traitées à la rapamycine est insensible à cet inhibiteur. Cette région N-terminale modulerait la phosphorylation d'eIF4GI par un mécanisme en deux étapes. Avant stimulation, la région N-terminale empêche la région C-terminale d'être phosphorylée. La stimulation entraîne l'activation de la voie PI3K–FRAP/mTOR qui provoque la phosphorylation de la région N-terminale et/ou des changements de partenaires d'eIF4GI pour rendre la région C-terminale accessible à d'autres kinases (Raught et al, 2000).

Les protéines eIF4GII et p97 ne sont pas phosphorylées par cette voie. Contrairement à eIF4GI, eIF4GII est phosphorylée *in vivo* par la Ca^{2+}/Calmodulin dependent kinase sur la Serine 1156 (Qin et al, 2003). Un autre site de phosphorylation a été identifié sur eIF4GII, la Ser 267, mais la kinase impliquée n'a pas été déterminée (communication personnelle de F. Dedieu). Cela indique qu'eIF4GI et eIF4GII sont régulées par des voies de signalisation

différentes et cela permettrait de répondre à différents stimuli extérieurs pour réguler la synthèse protéique.

L'état de phosphorylation d'eIF4G est lié au taux de synthèse protéique. En effet, la phosphorylation d'eIF4G est corrélée à une augmentation de complexes eIF4F (Bu et al, 1993) et augmente dans des conditions connues pour stimuler la synthèse protéique comme après stimulation des cellules par du serum (Raught et al, 2000).

Régulation d'eIF4G par dégradation

eIF4GI et II sont capables d'interagir avec Plk2 (Polo like kinase 2), une sérine/thréonine kinase impliquée dans la duplication du centriole lors de la transition G1-S (Warnke, 2004). Contrairement à eIF4GI, l'interaction d'eIF4GII avec Plk2 cible eIF4GII pour être dégradé par le protéasome. Plk2 est aussi une cible du protéasome, cette protéine servirait de transporteur pour amener eIF4GII dans la même voie de dégradation (communication personnelle de F. Dedieu).

Autres rôles d'eIF4G

eIF4G est à l'interface entre la traduction et la dégradation des ARNm. Chez la levure, la protéine de décoiffage Dcp1 interagit avec la région N-terminale d'eIF4G et avec PABP *in vivo* (Vilela et al, 2000). Dcp1 peut s'associer à la coiffe mais avec une très faible affinité, elle est incapable de déplacer eIF4E seule. En revanche, Dcp1 en se fixant sur eIF4E/eIF4G/PABP est capable de modifier la conformation du complexe pour relarguer eIF4E par un mécanisme inconnu et prendre sa place sur la coiffe. Le décoiffage permet ensuite de dégrader l'ARNm par des exonucléases.

eIF4GI intervient aussi dans le premier cycle de traduction nécessaire à la surveillance des ARNm. Au cours de l'épissage dans le noyau, l'EJC (Exon Junction Complex) est déposé au niveau des jonctions exon-exon. Ce complexe formé d'au moins 10 protéines reste lié aux transcrits lors de leur passage dans le cytoplasme (Chang et al, 2007). C'est en se basant sur ces complexes présents aux jonctions exon-exon des ARNm épissés que la cellule assure la qualité de l'expression des gènes par NMD (Non sense Mediated Decay) en éliminant les ARNm contenant un codon stop prématuré. Ce contrôle se déroule lors du premier cycle de

traduction (Chiu et al, 2004). Après épissage, les coiffes des ARNm sont liées au complexe nucléaire CBP80/CBP20 (Cap Binding Protein) et leur région 3'UTR se lie à PABP2 (Ishigaki et al, 2001 ; Lejeune et al, 2002). eIF4GI et II sont localisées à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau et sont capables de s'associer à ce complexe nucléaire CBP80/CBP20 (McKendrick et al, 2001b; Lejeune et al, 2004). D'autres protéines co-immunoprécipitent avec CBP80 : PABP1, eIF3, eIF4AI, eIF4A3 et eIF2α. Ce premier cycle de traduction n'est pas inhibé par 4E-BP et se déroule avant l'échange de CBP80/CBP20 contre eIF4E qui permet de synthétiser les protéines. eIF4GI s'associe aux transcrits nouvellement synthétisés avant leur épissage via le complexe CBP et accompagne les ARN dans le cytoplasme, il servirait de lien entre les événements nucléaires et l'initiation de la traduction dans le cytoplasme (McKendrick et al, 2001b).

Protéines de la même famille qu'eIF4G

Certaines protéines présentent de fortes homologies avec eIF4G et interviennent également dans la régulation de la traduction. C'est le cas de p97 et des protéines PAIP.

p97, encore nommée DAP5 (Death Associated Protein 5) ou NAT1 (Novel Apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC) Target no. 1), est homologue à la partie C-terminale d'eIF4G. Cette protéine ne peut pas s'associer à eIF4E et intervient dans la traduction dépendante des IRES, en particulier lors de l'apoptose (Marash et Kimchi, 2005). Cette protéine est aussi essentielle à la survie cellulaire ainsi qu'au développement embryonnaire (Yamanaka et al, 2000; Marash et al, 2008). L'ARNm de p97 comprend aussi un IRES et p97 active sa propre traduction. En effet, p97 est clivée par une caspase pour donner un fragment tronqué en C-terminale, p86, capable de stimuler la traduction dépendante des IRES. Cependant, la protéine p97 non clivée peut aussi agir directement comme activateur de la traduction indépendante de la coiffe et se retrouve associée aux polysomes dans des cellules en l'absence de stress (Nousch et al, 2007; Marash et al, 2008).

PAIP-1 (PABP-interacting protein 1) a été découverte comme nouveau partenaire de PABP dans une analyse par Far Western (Craig et al, 1998). Cette protéine présente des homologies avec la région centrale d'eIF4G, et de plus possède un site d'interaction pour eIF4A. PAIP-1 est capable de stimuler la traduction d'un ARN rapporteur lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules en culture. L'interaction PAIP-1/PABP serait nécessaire à cette

traduction. Au contraire, PAIP-2 inhibe la traduction par deux mécanismes : en dissociant PABP de la queue polyA et en entrant en compétition avec eIF4G pour éviter son interaction avec PABP (Karim et al, 2006).

1-3-3- Le facteur eIF4A

eIF4A est une ARN hélicase qui appartient à la famille des protéines à DEAD box. eIF4A est le plus abondant des facteurs d'initiation (Duncan et al, 1987). Il existe trois gènes qui codent pour eIF4A chez les vertébrés. eIF4AI et eIF4AII participent tous les deux à l'initiation de la traduction et sont fonctionnellement interchangeables alors que eIF4AIII inhibe la traduction dans des lysats de réticulocytes. De plus, contrairement à eIF4AI et II qui ont deux sites d'interaction pour eIF4G, eIF4AIII ne peut s'associer qu'à la partie centrale d'eIF4G (Li et al, 1999). eIF4AI et eIF4AII sont surtout cytoplasmiques alors que eIF4AIII est majoritairement nucléaire. En fait, eIF4AIII participe à la surveillance de la qualité des ARNm en faisant le lien entre les ARNm et les protéines de l'EJC, elle stabilise ces complexes (Shibuya et al, 2004). Comme beaucoup de facteurs de l'EJC, eIF4AIII s'accumule dans le noyau et peut passer dans le cytoplasme (Holzmann et al, 2000).

eIF4A est régulé par ses partenaires

eIF4A n'est pas régulé par phosphorylation mais son activité change en fonction de ses partenaires. Par exemple, l'activité hélicase d'eIF4A augmente après fixation sur eIF4G. Pdcd4 (Programmed cell death protein 4) est une protéine suppresseur de tumeur dont l'expression est stimulée en apoptose et inhibée dans certaines tumeurs. La dégradation de cette protéine est nécessaire à la synthèse protéique. Pdcd4 affecte la traduction en inhibant l'activité hélicase d'eIF4A (Yang et al, 2003). Pdcd4 possède deux domaines MA3 (MA3-c et MA3-m) qui agissent en synergie pour former un complexe très stable autour d'eIF4A. Ces deux domaines entrent en compétition avec eIF4G: eIF4G-MA3 ne peut plus interagir avec la région N-terminale d'eIF4A (Suzuki et al, 2008). Un autre domaine de Pdcd4 peut aussi s'associer directement à la partie centrale d'eIF4G de manière indépendante d'eIF4A (Yang et al, 2003). Ainsi, on aurait un complexe dans lequel eIF4A serait séquestré au centre (**Fig 18**):

- la région N-terminale d'eIF4A s'associe aux deux domaines MA3 de Pdcd4
- la région C-terminale d'eIF4A interagit avec eIF4G-m
- Pdcd4 se fixe aussi directement sur eIF4G-m

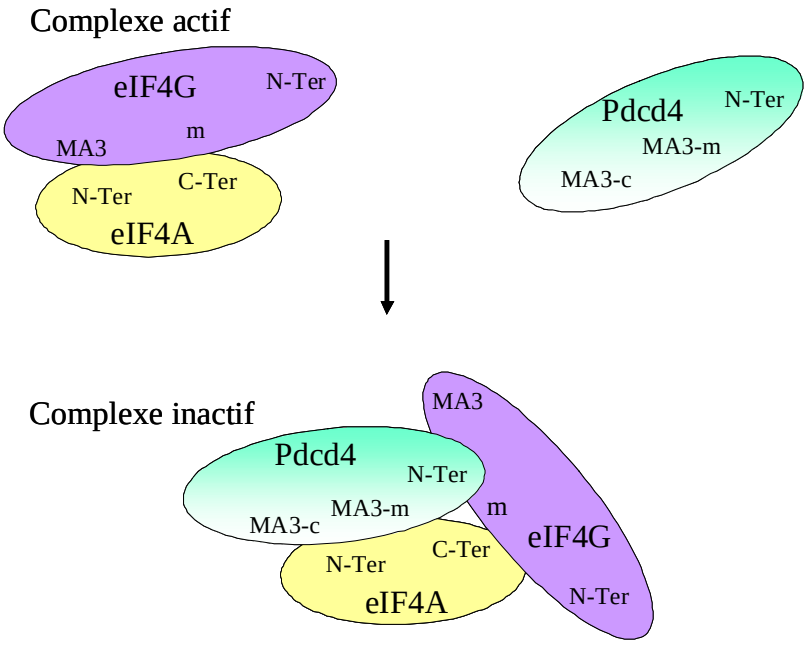


Figure 18 : Inhibition d'eIF4A par Pdcd4. Les deux domaines d'*eIF4G (MA3 et m) interagissent avec les parties N et C-terminale d'eIF4A pour former un complexe actif pour la traduction. La protéine Pdcd4 représentée par ses domaines MA3-c, MA3-m et par sa région N-terminale inhibe l'activité hélicase d'eIF4A en empêchant le domaine MA3 d'eIF4G de se fixer en N-terminale d'eIF4A.*

Molécules pouvant réguler l'activité d'eIF4A : la patéamine et l'hippuristanol

Avant de se fixer sur eIF4G pour former le complexe eIF4F, eIF4A est sous forme libre dans le cytoplasme. Une molécule, la patéamine A, affecte les propriétés de cette forme libre d'eIF4A (Bordeleau et al, 2005). La patéamine A, molécule extraite d'éponges, a été découverte initialement comme un agent antiprolifératif contre une lignée cellulaire tumorale de souris. Cette molécule est capable de s'associer à eIF4A libre dans le cytoplasme et de stimuler ses activités telles que l'hydrolyse d'ATP dépendante de l'ARN, la liaison d'eIF4A sur l'ATP et l'ARNm et l'efficacité de déroulement des structures secondaires. Cependant, la liaison de la patéamine A sur eIF4A inhibe la traduction dépendante de la coiffe: la patéamine A séquestre eIF4A sur les ARNm et interfère avec la formation de complexe eIF4F (Bordeleau et al, 2005). Ces résultats indiquent que l'activité d'eIF4A doit être finement

régulée en permanence, avant même son intervention dans le complexe d'initiation de la traduction.

Il existe une autre molécule d'origine marine capable d'agir sur eIF4A. L'hippuristanol, extraite du corail *Isis hippuris,* est capable d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe. Contrairement à la patéamine qui stimule les activités d'eIF4A libre, l'hippuristanol les inhibe : cette molécule n'affecte pas la liaison d'eIF4A sur l'ATP mais diminue celle d'eIF4A sur l'ARNm, l'hydrolyse de l'ATP et l'activité hélicase d'eIF4A (Bordeleau et al, 2006).

1-3-4- Le facteur 4E-BP

La formation du complexe eIF4F est principalement régulée par 4E-BP, une petite protéine capable de se lier à eIF4E. Elle inhibe ainsi la traduction dépendante de la coiffe. Sa régulation est ainsi déterminante pour contrôler la synthèse protéique.

Trois isoformes de 4E-BP ont été mises en évidence chez les mammifères (Rousseau et al, 1996a ; Pause et al, 1994 ; Poulin et al, 1998). Ces trois formes sont capables de se fixer sur eIF4E et d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe. Les transcrits de trois 4E-BP sont localisés de façon ubiquitaire mais en quantités plus fortes dans certains tissus :

- les ARNm de 4E-BP1 se trouvent concentrés dans le muscle squelettique, le pancréas et le tissu adipeux
- les ARNm de 4E-BP2 sont très présents dans le foie et les reins
- les ARNm de 4E-BP3 sont en grande quantité dans le muscle squelettique, le pancréas, le cœur et les reins (Poulin et al, 1998)

Régulation de 4E-BP au niveau transcriptionnel

4E-BP peut être régulé au niveau transcriptionnel. Chez la drosophile, d4E-BP joue un rôle important dans la survie des embryons en situation de stress. (Tettweiler et al, 2005; Teleman et al, 2005). Un stress oxydatif ou un manque de nourriture entraîne la déphosphorylation du facteur de transcription dFOXO (Forkhead box protein O) pour entrer dans le noyau des cellules et activer la transcription de d4E-BP. La voie FRAP/mTOR étant inhibée, la protéine d4E-BP est alors hypophosphorylée et inhibe l'initiation de la traduction (Tettweiller et al, 2005). En revanche, la transcription de 4E-BP est inhibée par ERK et p38

dans une voie dépendante de Egr1 dans les cellules hématopoiétiques (Rolli-Derkinderen et al, 2003).

Interaction avec eIF4E

4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3 et eIF4G présentent des similitudes de séquences leur permettant d'interagir avec eIF4E. Ils entrent en compétition pour se fixer sur eIF4E et inhiber la traduction en empêchant la sous unité ribosomique 40S de se fixer sur l'ARNm (Haghighat et al, 1995 ; Mader et al, 1995). 4E-BP1 est la forme la plus étudiée. Des mutants de 4E-BP1, mutés sur le site YxxxxLΦ ne sont plus capables d'interagir avec eIF4E, ni d'inhiber la synthèse protéique (Haghighat et al, 1995).

La liaison de 4E-BP1 ou 4E-BP2 sur eIF4E stabilise eIF4E sur la coiffe. Les affinités de 4E-BP1 et 4E-BP2 pour eIF4E sont différentes : les constantes de dissociation de 10^{-8} pour 4E-BP1 et 3.10^{-9} pour 4E-BP2 indiquent que 4E-BP2 a la plus forte affinité pour eIF4E. Cela est déterminé par les 3 acides aminés qui suivent le site consensus : MEC sur 4E-BP1 et LDR sur 4E-BP2 (Ptushkina et al, 1999). L'arginine du LDR sur 4E-BP2 apporte une charge positive supplémentaire et augmente l'interaction avec eIF4E.

Il semble cependant que le site consensus YxxxxLΦ ne soit pas le seul élément de 4E-BP responsable de la liaison à eIF4E. En effet, un composant nommé 4EGI-1 pour eIF4E/eIF4G interaction inhibitor est capable d'inhiber la liaison entre eIF4G et eIF4E au profit d'une augmentation de liaison entre 4E-BP et eIF4E. 4E-BP et eIF4G ayant seulement en commun ce site consensus, il doit exister d'autres sites sur 4E-BP qui permettent de maintenir l'interaction avec eIF4E (Moerke et al, 2007). De plus, la séquence 4E-BP1 entière a plus d'affinité pour eIF4E qu'un peptide 4E-BP (Tomoo et al, 2006).

Il est admis que l'interaction entre 4E-BP et eIF4E dépend de l'état de phosphorylation de 4E-BP : 4E-BP peut se fixer à eIF4E lorsqu'elle est hypophosphorylée. Son hyperphosphorylation est corrélée à la dissociation du complexe (Gingras et al, 2001b). La rapamycine est une drogue immunosuppressive utilisée en médecine pour lutter contre les rejets de greffe. Elle est aussi connue pour bloquer la phosphorylation de 4E-BP. La rapamycine inhibe l'activité de la kinase FRAP/mTOR/RAFT1. Elle bloque le cycle cellulaire en G1. Enfin, l'utilisation d'un ARNm bicistronique montre que la rapamycine inhibe la

synthèse protéique dépendante de la coiffe mais pas la traduction dépendante des IRES (Beretta et al, 1996).

La phosphorylation de 4E-BP1 et 4E-BP2 est stimulée par l'insuline et cela entraîne leur dissociation d'eIF4E dans les adipocytes. Ces modifications sont sensibles à la rapamycine (Lin et Lawrence, 1996). En revanche, la régulation de 4E-BP3 est différente (Kleijn et al, 2002). Dans les cellules rénales embryonnaires humaines, HEK293, cultivées sans sérum, 4E-BP3 se dissocie d'eIF4E alors que les complexes 4E-BP1/eIF4E augmentent. En réponse à l'insuline, 4E-BP3 et eIF4E se réassocient alors que 4E-BP1 et eIF4E se dissocient. Enfin, la rapamycine n'a aucun effet sur l'association entre 4E-BP3 et eIF4E (Kleijn et al, 2002).

Régulation de 4E-BP par phosphorylation

a-Les sites de phosphorylation

Sept sites de phosphorylation ont été déterminés après analyse de 4E-BP1 (**Fig 19**).

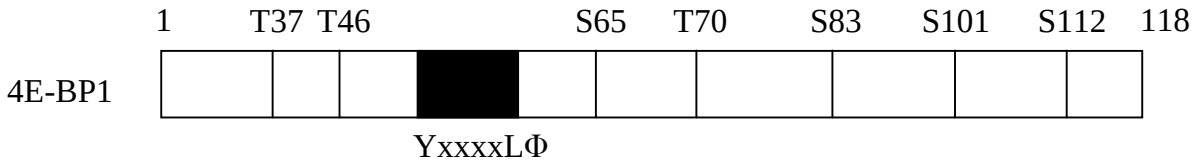


Figure 19 : Sites de phosphorylation sur 4E-BP1. Position des thréonines (T) et sérines (S) décrites comme des sites de phosphorylation sur 4E-BP1. Les nombres indiqués correspondent à la position sur la séquence 4E-BP1 humaine. Le site d'interaction avec eIF4E est représenté par la séquence consensus YxxxxLΦ (où Φ est un acide aminé aliphatique).

Le premier site a été identifié comme la Ser 65 après phosphorylation *in vitro* du 4E-BP1 de souris par la MAPK et digestion enzymatique (Haystead et al, 1994). Quatre autres sites ont ensuite été découverts de la même manière sur le 4E-BP1 de rat: Thr 37, Thr 46, Thr 70, et Ser 83 (Fadden et al, 1997). Le traitement à l'insuline stimule la phosphorylation de quatre de ces sites (Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70) de manière rapamycine dépendante (Fadden et al, 1997). La régulation de la phosphorylation de la Ser 83 est inconnue, elle est insensible à l'insuline et à la rapamycine (Mothe-Satney et al, 2000a).

4E-BP est phosphorylé en plusieurs étapes (Gingras et al, 1999). D'abord, FRAP/mTOR phosphoryle 4E-BP1 complexé à eIF4E sur les Thr 37 et Thr 46 dans les cellules 293 sans sérum. Ces phosphorylations sont insuffisantes pour dissocier le complexe mais sont nécessaires pour les phosphorylations induites par le sérum : la phosphorylation de la Thr 70, elle-même requise pour phosphoryler la Ser 65 (Gingras et al, 1999 ; Gingras et al, 2001a). Le rôle exact de chacune de ces phosphorylations n'est pas encore compris. Il est démontré que la Thr 46 joue un rôle modulateur dans l'interaction 4E-BP1/eIF4E (Burnett et al, 1998 ; Yang et al, 1999). De plus, la seule phosphorylation de la Ser 65 ou de la Ser 65 et de la Thr 70 sont insuffisantes pour dissocier 4E-BP1 d'eIF4E (Gingras et al, 2001a).

Il faut noter que la sensibilité à la rapamycine des sites de phosphorylation sur Thr 37 et Thr 46 est beaucoup plus forte dans des cellules sans sérum qu'après ajout de sérum (Mothe-Satney et al, 2000b ; McMahon et al, 2002). Ce mécanisme est encore incompris. La rapamycine pourrait agir en stimulant une phosphatase et celle-ci serait inhibée par la présence de sérum, ou le sérum pourrait activer une autre kinase insensible à la rapamycine permettant de phosphoryler les sites Thr 37 et Thr 46 (Gingras et al, 2001a).

D'autres sites de phosphorylation ont été mis en évidence sur le 4E-BP1 humain (Wang et al, 2003). La serine 101 est phosphorylée constitutivement *in vivo* et celle-ci est nécessaire à la phosphorylation de la Ser 65. Il existe une autre phosphorylation découverte sur le 4E-BP1 de rat, elle correspond à la Ser 112 humaine. Chez le rat, cette sérine est induite en réponse à l'insuline mais elle est insensible à la rapamycine (Heesom et al, 1998). Elle est phosphorylée par la kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) (Yang et Kastan, 2000) mais cela n'affecte pas les autres sites de phosphorylation de 4E-BP1 ni sa liaison à eIF4E (Ferguson et al, 2003). Cependant, chez l'humain, cette phosphorylation de la Ser 112 est constitutive dans les cellules HEK293 et nécessaire au relargage d'eIF4E (Wang et al, 2003). Tout comme chez le rat, elle n'influence pas la phosphorylation des Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70 (Wang et al, 2003). Les séquences de 4E-BP2 et 3 ne contiennent pas ces deux sites de phosphorylation Ser 101 et Ser 112. Cela pose une question importante sur la régulation de chaque 4E-BP par phosphorylation.

b-RAIP et TOS

Tee et Proud ont montré, en 2002, qu'un peptide 4E-BP1 tronqué en N-terminal et possédant le site de liaison à eIF4E ainsi que les quatre sites de phosphorylation les plus étudiés, n'est phosphorylé que sur la Thr 70 et ne peut pas se dissocier d'eIF4E après une stimulation par l'insuline (Tee et Proud, 2002). Une analyse par mutagenèse leur a permis de définir un motif de 4 acides aminés : arginine, alanine, isoleucine et proline (RAIP) nécessaire à la phosphorylation de 4E-BP1 et à la dissociation d'eIF4E. Ce motif a été retrouvé sur 4E-BP2. En revanche, 4E-BP3, qui ne présente pas ce motif RAIP, est incapable de se dissocier d'eIF4E après stimulation par l'insuline. Des expériences de chimères 4E-BP1 / 4E-BP3 ont montré que ce motif RAIP est essentiel à la régulation de 4E-BP par l'insuline (Tee et Proud, 2002). La même année, un deuxième motif a été mis en évidence à partir d'une étude sur la régulation de la S6Kinase1 (S6K1) par FRAP/mTOR. La région N-terminale de la S6K1 contient 5 acides aminés (FDIDL) qui sont conservés au cours de l'évolution. Différentes mutations sur ces acides aminés et notamment sur la phénylalanine indique que ce motif TOS (mTOR Signaling) est essentiel à l'activité de S6K1 et à sa régulation par FRAP/mTOR (Schalm et Blenis, 2002). De la même façon, les 3 4E-BPs humains possèdent aussi un motif TOS en C-terminal (FEMDI). La mutation de la phénylalanine de ce motif sur 4E-BP1 montre que TOS est essentiel pour la phosphorylation par FRAP/mTOR après traitement à l'insuline (Schalm et Blenis, 2002).

Ces deux motifs RAIP et TOS sont donc importants pour réguler la phosphorylation de 4E-BP1, mais la fonction exacte de chacun est controversée. On sait que la protéine Raptor sert de lien direct entre FRAP/mTOR et 4E-BP1 (Hara et al, 2002) et il est maintenant clair que TOS est essentiel à l'interaction avec Raptor (Beugnet et al, 2003 ; Choi et al, 2003 ; Eguchi et al, 2006) mais les études menées sur RAIP donnent des résultats différents. Le motif RAIP ne semble pas suffisant pour interagir directement avec Raptor puisque les 20 acides aminés en N terminale de 4E-BP1, contenant RAIP, n'en sont pas capables (Beugnet et al, 2003). En revanche, Choi montre que le motif RAIP est essentiel car une mutation de RAIP (RAAA) diminue l'association de 4E-BP1 à Raptor (Choi et al, 2003).

De plus, RAIP et TOS affectent différemment les sites de phosphorylation de 4E-BP1. En effet, les mutants de RAIP (AAAA) inhibent la phosphorylation des 4 sites (Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70) alors que les mutants de TOS (F113A), ont très peu d'effet sur les Thr 37 et 46 ; ils limitent la phosphorylation de la Thr 70 mais inhibent totalement la

phosphorylation de la Ser 65 (Beugnet et al, 2003). Il faut noter que ces phosphorylations résiduelles restent sensibles à la rapamycine dans le mutant TOS. Cela suggère qu'il existe une autre phosphorylation qui pourrait être médiée par RAIP, indépendamment de Raptor (Beugnet et al, 2003).

Un article récent présente les résultats de l'étude détaillée des motifs TOS et RAIP par mutagenèse et aboutit à plusieurs conclusions (Lee et al, 2008). RAIP n'est pas indispensable mais contribue à l'interaction avec Raptor puisque les mutants RAAA sont toujours capables d'interagir avec Raptor mais de manière plus faible que le 4E-BP1 sauvage. C'est l'isoleucine du motif RAIP qui est la plus importante dans la phosphorylation de 4E-BP1 sur les Thr 37 et Thr 46. En revanche, TOS est essentiel à l'interaction avec Raptor mais n'est pas suffisant car une GST suivie du seul motif TOS ne peut se fixer sur Raptor. Les 1er et 3ème résidues (FEMDI) sont les plus importants pour la phosphorylation de 4E-BP1 sur la Ser 65. Enfin, l'analyse de différentes formes tronquées de 4E-BP1 indiquent que d'autres régions de 4E-BP1 seraient impliquées dans l'interaction avec Raptor (Lee et al, 2008).

c-Les Voies menant à la phosphorylation de 4E-BP

FRAP/mTOR (FKBP12 Rapamycin Associated Protein/mammalian Target Of Rapamycin) est une sérine thréonine kinase. Elle est aussi connue sous le nom de RAFT (Rapamycin and FKBP12 target 1). Elle est inhibée par la rapamycine, une drogue immunosuppressive utilisée en médecine contre les rejets de greffe. La rapamycine se lie au récepteur intracellulaire FKBP12 pour former un complexe capable d'inhiber l'activité de FRAP/mTOR. La rapamycine est un inhibiteur spécifique de FRAP/mTOR (Davies et al, 2000).

Cette kinase FRAP/mTOR est impliquée dans deux complexes différents: mTORC1 et mTORC2. mTORC1 était d'abord connu comme la seule cible de la rapamycine mais des résultats récents indiquent que mTORC2 est aussi affecté par cet inhibiteur (Akcakanat et al, 2007).

- mTORC1 est composé de trois protéines : mTOR, mLST8, Raptor (Regulatory associated protein of mTOR). C'est ce complexe qui phosphoryle la S6K et 4E-BP pour réguler la synthèse protéique.

- mTORC2 est composé de quatre protéines : mTOR, mLST8, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) et SIN1 (stress-activated protein kinase-interacting 1) (Yang et al, 2006). Ce complexe active la kinase Akt par phosphorylation. Il intervient dans la régulation du cytosquelette d'actine (Sarbassov et al, 2004).

PRAS40 (Proline Rich Akt Substrate 40kDa) et PRR5 (Proline rich protein 5) ont récemment été identifiées comme de nouveaux partenaires des complexes mTORC1 et mTORC2 respectivement. Ces protéines réguleraient l'apoptose (Thedieck et al, 2007 ; Woo et al, 2007). mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) est une protéine adaptatrice qui stimule l'activité des deux complexes.

Les signaux provenant des récepteurs en surface cellulaire comme ceux de l'insuline ou des facteurs de croissance active mTORC1 en passant par la voie des PI3K (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase) (Corradetti et Guan, 2006). Les PI3K sont des enzymes capables de convertir le phosphatidyl Inositol 4,5 bisphosphate (PIP2) en phosphatidyl Inositol 3,4,5 trisphosphate (PIP3), un second messager lipidique à l'origine du déclenchement de plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Les PI3K sont composées de deux sous unités : une sous-unité régulatrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110). La liaison de l'insuline sur son récepteur entraîne la stimulation de la PI3K qui active une cascade de réactions : PDK1 (3'Phosphoinositide Dependent Kinase 1) stimule Akt encore appelée PKB (Protéine Kinase B). Cette dernière va phosphoryler TSC2 et inactiver le complexe TSC (Tuberous Sclerosis Complex) formée de TSC1 et TSC2 (**Fig 20**).

Rheb (for *R*as *h*omolog *e*nriched in *b*rain) est une GTPase, protéine capable d'hydrolyser le GTP. Lorsque Rheb est liée à du GTP, elle stimule FRAP/mTOR (Inoki et al, 2003). En effet, des résultats récents indiquent qu'une protéine membranaire mitochondriale, FKBP38, est capable de s'associer au complexe mTORC1 dans le cytoplasme pour maintenir FRAP/mTOR inactive. Rheb-GTP se lie à la protéine FKBP38 et inhibe son association à FRAP/mTOR (Bai et al, 2007 ; Proud et al, 2007).

L'hydrolyse du GTP en GDP, qui est favorisée par la protéine TSC2 non phosphorylée, inactive ce système. Après phosphorylation par Akt, TSC2 est inhibée : Rheb peut alors stimuler l'activité de mTORC1. Cette activation de mTORC1 participe ensuite à un rétrocontrôle négatif qui inhibe la phosphorylation de Akt (Huang et al, 2008).

mTORC2 est aussi régulé par TSC1/TSC2 mais par un mécanisme différent de mTORC1. En effet, TSC1/TSC2 peut s'associer directement à mTORC2 et régule mTORC2 de manière indépendante de Rheb. De plus, alors que TSC1/TSC2 inhibe mTORC1, il stimule l'activité de mTORC2 (Huang et al, 2008).

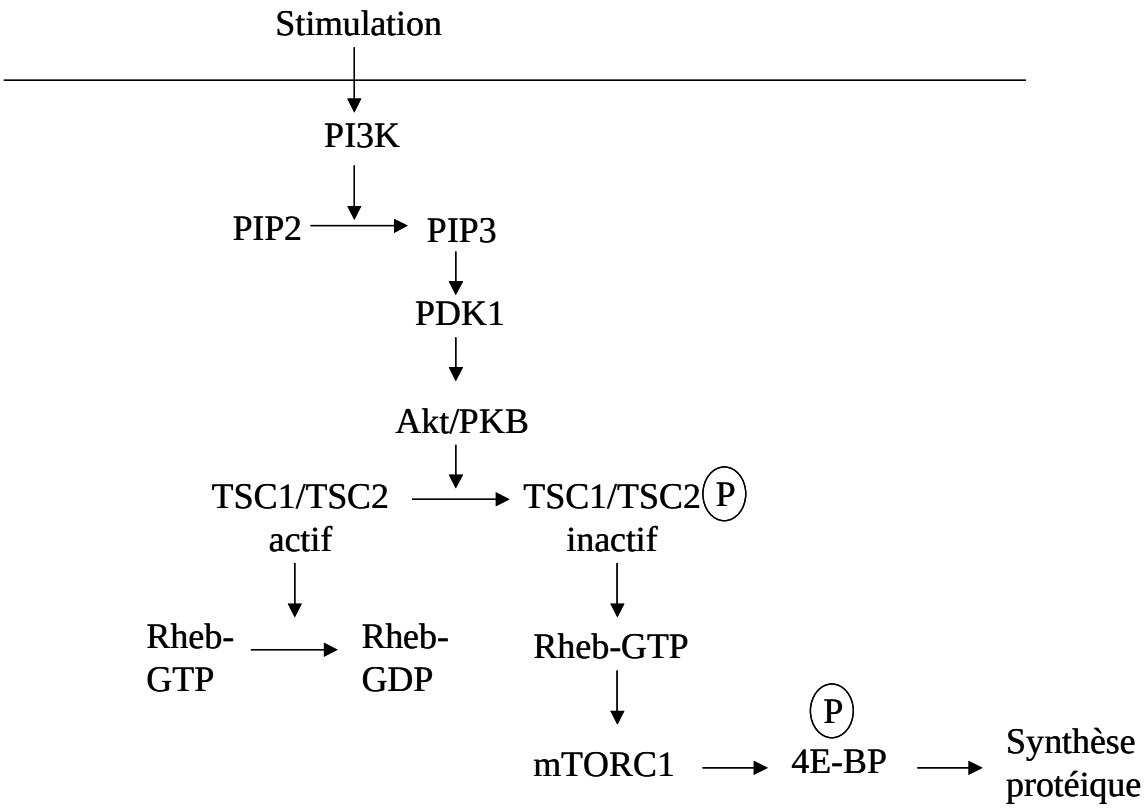


Figure 20 : Phosphorylation de 4E-BP par la voie de signalisation dépendante de la PI3K. *La PI3K stimule la formation de PIP3 qui va entraîner l'activation successive de PDK1 et Akt. Cette dernière phosphoryle TSC2 pour rendre le complexe TSC1/TSC2 inactif. Il y a alors une accumulation de Rheb GTP qui permet d'activer le complexe mTORC1 responsable de la phosphorylation de 4E-BP. Cette voie mène à la stimulation de la synthèse protéique.*

D'autres kinases peuvent intervenir pour activer cette voie de signalisation en fonction des signaux extérieurs. D'abord, c'est le cas de l'AMPK (AMP activated protein kinase) qui intervient lorsque la cellule est en manque d'énergie, en phosphorylant directement TSC2 pour l'activer (Mamane et al, 2004). Ensuite, le proto-oncogène Ras, présenté précédemment dans la voie régulant Mnk, peut aussi intervenir directement sur l'activation de la PI3K pour

contrôler la voie de signalisation se terminant par la phosphorylation de 4E-BP (Mamane et al, 2004). Des résultats récents impliquent aussi le facteur d'épissage SF2/ASF (Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor) dans la stimulation de l'initiation de la traduction en modulant la phosphorylation de 4E-BP1 (Michlewski et al, 2008). En effet, SF2/ASF est capable de s'associer à FRAP/mTOR et à la phosphatase PP2A, il entraîne l'hyperphosphorylation de 4E-BP. Deux hypothèses sont proposées :

- SF2/ASF recruterait FRAP/mTOR sur certains ARNm et stimulerait leur traduction spécifique en permettant l'hyperphosphorylation de 4E-BP
- SF2/ASF recruterait PP2A sur certains ARNm et inhiberait son activité pour permettre l'hyperphosphorylation de 4E-BP

De plus, en cas de stress par une exposition des cellules aux radiations UVB, 4E-BP1 est phosphorylé sur quatre sites (correspondant aux Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70) et se dissocie d'eIF4E. Cette phosphorylation résulte de l'activation de la voie p38/Msk1 (Mitogen and stress-activated protein kinase 1) (Liu et al, 2002).

Régulation de 4E-BP par dégradation

L'hyperphosphorylation de 4E-BP1 stimule sa polyubiquitination (Elia et al, 2008). Dans les cellules de la lignée lymphocytaires T Jurkat, il existe des formes de hauts poids moléculaires de 4E-BP1 qui sont à la fois phosphorylées et polyubiquitinées. L'apparition de ces formes de 4E-BP1 est stimulée par un traitement à la calyculine A, un inhibiteur de phosphatase. Elles sont incapables de s'associer à eIF4E. Le MG132, qui est un inhibiteur de protéasome, affecte légèrement l'accumulation de ces protéines polyubiquitinées, suggérant un rôle du protéasome dans la dégradation de 4E-BP1. Cependant, il est possible que d'autres acteurs interviennent dans la dégradation, comme les lysosomes qui sont également capables de dégrader des protéines polyubiquitinées (Elia et al, 2008). La dégradation de 4E-BP a été mise en évidence pour la première fois chez l'oursin *S. granularis* (voir partie suivante « L'oursin, modèle pour la traduction et le cycle cellulaire »).

Le protéasome est aussi impliqué dans le clivage de 4E-BP1 (Constantinou et al, 2008). L'activation de p53 entraîne le clivage de la partie N-terminale de 4E-BP1 de manière dépendante du protéasome. Cette forme tronquée est hypophosphorylée et s'associe préférentiellement à eIF4E par rapport au 4E-BP1 entier. De plus, cette forme tronquée est

beaucoup plus stable que la protéine entière. Cette forme permettrait d'inhiber efficacement la synthèse protéique. L'état de phosphorylation de 4E-BP1 déterminerait ainsi la destinée de cette protéine en fonctions des conditions :

- La forme hyperphosphorylée de 4E-BP1 est polyubiquitinée et dégradée.
- La forme hypophosphorylée de 4E-BP1 est clivée et stabilisée.

1-4- Importance de la traduction dans différents mécanismes

La régulation traductionnelle joue un rôle important dans de nombreux processi physiologiques. Le contrôle de la synthèse protéique représente un élément essentiel pour le cycle cellulaire et la progression tumorale, le développement, l'adaptation aux saisons, et le système nerveux.

1-4-1- La traduction : du cycle cellulaire au cancer

Traduction et cycle cellulaire

Il existe un lien entre la traduction et le cycle cellulaire (Cormier et al, 2003 ; Oulhen et Cormier, 2006). La synthèse protéique se retrouve à la fois en amont du cycle cellulaire puisqu'elle est indispensable à son déroulement et en aval car elle est modifiée au cours du cycle cellulaire. Les résultats obtenus avec le modèle oursin renforcent les liens entre traduction et cycle cellulaire, ces données sont présentées dans la partie suivante « L'oursin, modèle pour la traduction et le cycle cellulaire ». Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles identiques entre elle et à la cellule dont elles dérivent (Meijer, 2003). Ce cycle se décompose en quatre phases : G1, S, G2 et M (Nurse, 1994). Les phases G1 (gap1), S (synthèse d'ADN), G2 (gap2), qui correspondent à l'interphase, préparent les cellules à la division lors de la mitose (phase M). Ces étapes sont contrôlées par les CDKs (Cyclin Dependent Kinases), des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation de toute division cellulaire en association avec leurs partenaires, les cyclines. La transition G2/M est sous contrôle du MPF (Maturation Promoting Factor) constitué d'une sous unité catalytique CDK1 et d'une sous unité régulatrice, la cycline B (Meijer, 2003). Cette dernière étant dégradée cycliquement, la machinerie de traduction est donc indispensable puisqu'elle constitue un point de régulation sur la synthèse de cycline B.

Parmi les acteurs de la synthèse protéique, les protéines eIF4 permettent de contrôler le cycle cellulaire (Cormier et al, 2003). En effet, eIF4E est une protéine associée directement au contrôle du cycle cellulaire dans la levure, CDC33 (cell division control 33) (Brenner et al, 1988). De plus, le facteur eIF4E joue un rôle primordial dans les mécanismes de prolifération cellulaire (Mamane et al, 2004). eIF4E entraîne une transformation cellulaire en augmentant la synthèse protéique de certains ARNm important pour le cycle cellulaire après avoir faciliter leur export du noyau vers le cytoplasme. La traduction de deux ARNm, celui de la cycline D1 et celui de l'ornithine décarboxylase (ODC), est particulièrement stimulée dans les cellules NIH3T3 surexprimant eIF4E. Ces deux protéines sont synthétisées en corrélation avec le niveau d'expression d'eIF4E dans les cellules (Rousseau et al, 1996b). Après fractionnement cellulaire et analyse par Northern Blot, il est montré que la stimulation de la traduction de la cycline D1 et de l'ODC dépend d'une augmentation du transport nucléo-cytoplasmique des ARNm correspondants (Rousseau et al, 1996b). Il y aurait une centaine d'ARNm qui serait régulés ainsi (Culjkovic et al, 2006).

Le transport de la cycline D1 a été très étudié: eIF4E s'associe spécifiquement avec l'ARNm de la cycline D1 dans des extraits nucléaires. Cette interaction dépend à la fois de la coiffe des ARNm et d'une séquence présente en 3'UTR de la cycline D1 : 4E-SE (eIF4E-Sensitive Element), séquence conservée chez les mammifères et les oiseaux (Culjkovic et al, 2005). Le transport est indépendant du rôle d'eIF4E dans la traduction puisqu'un mutant d'eIF4E (W73A) ne pouvant pas former de complexe actif de traduction, fonctionne toujours pour transporter l'ARNm de la cycline D1 et peut toujours transformer les cellules (Cohen et al, 2001).

Les cellules eucaryotes sont capables de coordonner l'expression des gènes impliqués dans un même processus cellulaire. Pour cela, les ARNm possèdent des séquences particulières dans les régions non traduites, on parle de code USER (Untranslated Sequence Element for Regulation). eIF4E serait à la base d'un régulon d'ARNm pour contrôler la prolifération cellulaire (Culjkovic et al, 2007) : le régulon représente ici un ensemble d'ARNm qui sont régulés de la même façon sous le contrôle d'eIF4E. En effet, la séquence 4E-SE trouvée sur la cycline D1 constitue ce code USER pour réguler l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme. La comparaison des séquences des ARNm dont le transport nucléo-cytoplasmique est régulé par eIF4E ont permis de découvrir une séquence consensus (UX_2UX_2A) mais il semble que ce soit surtout la structure secondaire formée de tige-boucle qui soit importante

dans la sensibilité à eIF4E (Culjkovic et al, 2006). Il faut noter que les rôles d'eIF4E dans l'export d'ARNm et dans la stimulation de la traduction sont découplés. Une fois dans le cytoplasme, les ARNm sont (ODC) ou non (cycline D1) régulés au niveau de la traduction.

La capacité d'eIF4E à transporter les ARNm dépend de ses partenaires. La protéine PML (Promyelocytic leukemia protein) régule la croissance cellulaire et l'apoptose, elle forme des corps nucléaires capables d'inhiber la transformation oncogénique et la croissance. Ces corps contiennent aussi des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN nucléaire, la traduction, l'assemblage des ribosomes. La perturbation de ces corps est responsable de leucémies aiguës promyélocytaires. Bien que PML ne contienne pas le site consensus d'association à eIF4E, ces deux protéines interagissent dans les corps nucléaires. Contrairement à eIF4E, la surexpression de PML dans des cellules NIH3T3 diminue le niveau de protéines cycline D1 en réduisant l'affinité d'eIF4E pour la coiffe, cela limite également le pouvoir transformant d'eIF4E (Cohen et al, 2001; Lai et Borden, 2000).

Le régulon d'ARNm contrôlé par eIF4E intervient par exemple dans le maintien en vie des cellules après un stress comme une déprivation de serum. La surexpression d'eIF4E dans ces cellules inhibe l'apoptose en activant la voie de signalisation passant par Akt. Des résultats récents indiquent qu'eIF4E régule cette voie par deux mécanismes (Culjkovic et al, 2008). D'abord, eIF4E stimule l'export de l'ARNm de NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1) pour être traduit dans le cytoplasme, la protéine NBS1 étant connue comme un activateur de la voie PI3K–Akt. D'autre part, eIF4E stimule l'export d'ARNm dont les protéines sont définies comme cibles de la voie Akt (**Fig 21**).

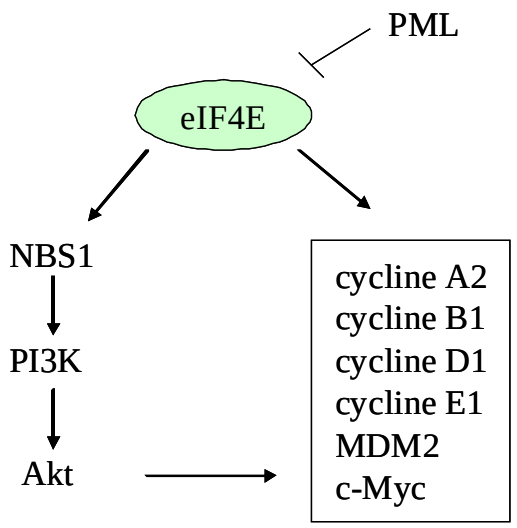


Figure 21 : Le régulon d'ARNm contrôlé par eIF4E participe à la stimulation de la voie PI3K/Akt. *eIF4E stimule la voie Akt en régulant le transport nucléocytoplasmique de l'ARNm NBS1 pour permettre sa traduction et activer la voie Akt mais il contrôle aussi l'export nucléaire des ARNm cycline A2, B1, D1, E1, MDM2 (Murine Double Minute), c-Myc qui sont des cibles de la voie Akt.*

En dehors de son rôle dans l'export des ARNm, la surexpression d'eIF4E dans les cellules NIH3T3 stimule la traduction de certains messagers en activant leur recrutement dans les polysomes (Mamane et al, 2007). Deux éléments importants dans la régulation traductionnelle sont retrouvés dans beaucoup de ces ARNm : une structure secondaire complexe en 5'UTR, on parle de 5'TOP (5'Terminal OligoPyrimidine), ainsi qu'un motif Mos-PRE (Mos-Polyadenylation Response Element) en 3'UTR. Les protéines produites sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes, la prolifération et la survie cellulaire.

Le taux de traduction varie au cours du cycle dans les cellules de mammifères. En mitose, la synthèse protéique baisse, cela est corrélé à la formation de complexes eIF4E/4E-BP (Pyronnet et al, 2001). Cependant, certaines équipes montrent une dissociation des deux protéines en mitose : 4E-BP est phosphorylée par CDK1 puis se sépare d'eIF4E (Heesom et al, 2001). Cela démontre que le cycle cellulaire et la traduction sont étroitement liés mais les mécanismes d'interconnexions sont encore à déterminer. Les résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des approches différentes, dépendantes de la synchronisation des cellules ou des drogues utilisées. Les régulateurs du cycle cellulaire contrôlent aussi la machinerie de traduction. Par exemple, le paclitaxel induit une hyperphosphorylation de 4E-BP1 en G2/M

par un mécanisme dépendant de CDK1 dans des cellules MDA MB 231 (Greenberg et Zimmer, 2005). Le paclitaxel est une drogue utilisée comme traitement contre le cancer des ovaires ou le cancer du sein, il stabilise les microtubules et interfère avec la formation du fuseau mitotique. Il entraîne une activation du complexe CDK1/cycline B.

4E-BP influence aussi le cycle cellulaire. En effet, un 4E-BP1 constitutivement actif, non phosphorylable, arrête le cycle dans des cellules cancéreuses MCF7. Dans ces conditions, l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire, p27, augmente et cela inhibe l'activité de CDK2 (Jiang et al, 2003). La traduction de p27 se ferait de manière indépendante de la coiffe. De plus, FRAP/mTOR, en phosphorylant ces substrats 4E-BP et S6K1, est aussi en position centrale pour réguler le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire (Fingar et al, 2004).

En mitose, le taux de traduction diminue de 25 à 30% par rapport à celui des cellules en interphase (Le Breton et al, 2005). La synthèse protéique dépendante de la coiffe est inhibée au profit de la traduction dépendante des IRES. Cette inhibition fait intervenir la régulation de l'initiation avec les complexes eIF4E/4E-BP, eIF4B/14-3-3σ et eIF2α mais aussi l'élongation avec eEF1B et eEF2 (Le Breton et al, 2005 ; Sivan et Elroy-Stein, 2008). Cela permet la traduction IRES dépendante d'ARNm tels que p58 ^{PITSLRE} kinase qui intervient dans la formation du fuseau, mais aussi de c-Myc et de l'ODC.

Traduction et cancer

Les liens démontrés entre eIF4E et le cycle cellulaire, place cet acteur en position intéressante pour comprendre certains mécanismes de cancérisation.

Bien qu'eIF4E soit essentiel à la survie cellulaire, sa surexpression est responsable de dérégulations de proliférations et de transformations cellulaires. eIF4E est un proto-oncogène (Sonenberg, 2008). La surexpression d'eIF4E dans des cellules NIH3T3 entraîne leur transformation (Lazaris-Karatzas et al, 1990). eIF4E peut aussi transformer des fibroblastes embryonnaires de rat en coopérant avec deux gènes immortalisant comme E1A et v-Myc (Lazaris-Karatzas et Sonenberg, 1992). De plus, l'activité oncogénique d'eIF4E dans les cellules NIH3T3 passe par l'activation de Ras, une protéine importante dans la signalisation cellulaire (Lazaris-Karatzas et al, 1992). En effet, la surexpression d'eIF4E entraîne

l'activation de Ras en augmentant sa liaison au GTP et le phénotype de transformation induit par eIF4E est réversé par la surexpression de GAP (GTPase Activating Protein), un inhibiteur de Ras. eIF4E affecte aussi la transformation cellulaire en augmentant la production de protéines présentées précédemment comme la cycline D1, l'ODC et c-Myc mais en stimulant également la synthèse de VEGF (Vascular Endothelial-Growth Factor) et de FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), des régulateurs de l'angiogenèse impliqués dans la progression tumorale (Clemens, 2004 ; Mamane et al, 2004).

Il suffit d'avoir un excès de 2,5 fois plus d'eIF4E dans les cellules en culture pour les transformer et ce rapport se retrouve souvent dans les cancers (Sonenberg, 2008). eIF4E est surexprimé dans de nombreux cancers, il est devenu un indicateur prognostic. Ce facteur est ainsi devenu une cible potentielle pour lutter contre le cancer. Pour cela, différentes techniques sont testées comme l'inhibition de l'expression d'eIF4E en utilisant un ADN antisens ou l'utilisation d'inhibiteur de l'interaction eIF4E/eIF4G (Sonenberg, 2008).

La phosphorylation d'eIF4E n'affecte pas la localisation cellulaire de ce facteur dans le noyau et le cytoplasme mais elle est nécessaire à la stimulation du transport des ARNm à travers l'enveloppe nucléaire ainsi qu'à la capacité d'eIF4E à transformer les cellules (Topisirovic et al, 2004). En effet, la mutation de la serine 209 empêche la transformation cellulaire. Le fait que cette phosphorylation ne soit pas indispensable au développement chez la souris indique Mnk comme une cible thérapeutique potentielle dans la lutte anti cancéreuse (Silva et Wendel, 2008).

Le phénotype de transformation induit par eIF4E peut être réversé par la surexpression des protéines 4E-BP1 et 4E-BP2 (Rousseau et al, 1996a). 4E-BP est identifié comme un « facteur entonnoir » dans certains types de cancers, c'est-à-dire un facteur sur lequel convergent plusieurs signaux oncogéniques et qui est capable de contrôler le signal de prolifération cellulaire (Armengol et al, 2007). L'état de phosphorylation de 4E-BP est un élément important dans le développement des cancers. En effet, la phosphorylation de 4E-BP1 est associée à la progression de la maladie dans les cancers du sein, des ovaires ou de la prostate, et l'analyse de cette protéine permettrait d'identifier les patients à hauts risques (Armengol et al, 2007; Rojo et al, 2007).

Les deux autres facteurs du complexe eIF4F sont aussi impliqués dans la tumorigenèse. La surexpression d'eIF4G dans des fibroblastes de souris NIH3T3 cause la transformation cellulaire (Fukuchi-Shimogori et al, 1997). De plus, eIF4G et eIF4A sont surexprimés dans différents types de cancers (Mamane et al, 2004).

Enfin, le proto-oncogène c-Myc est capable de stimuler la transcription des facteurs eIF4E, eIF4GI et eIF4AI, et provoque l'augmentation de complexe eIF4F. Ce complexe va lui-même induire la traduction de c-Myc (Lin et al, 2008). Cette régulation en boucle positive reliant transcription et traduction contribuerait à la transformation cellulaire (**Fig 22**).

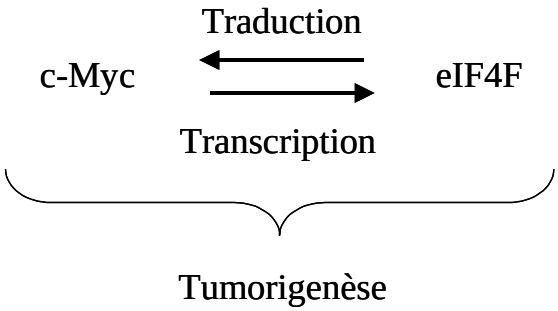


Figure 22 : Boucle de régulation entre c-Myc et eIF4F reliant transcription et traduction. *c-Myc active la transcription d'eIF4F et eIF4F stimule la traduction de c-Myc. Cette boucle qui relie transcription et traduction serait impliquée dans la tumorigenèse.*

1-4-2- Traduction et développement

Le développement nécessite une expression coordonnée de gènes spécifiques à un temps et à un endroit donnés. Cela permet de contrôler par exemple la formation des gamètes, le développement précoce avec notamment la formation des axes embryonnaires ainsi que les différenciations cellulaires. Les régulations traductionnelles interviennent à chacune de ces étapes. Des exemples de ces régulations sont présentés dans la revue 1 (Oulhen et Cormier, 2006).

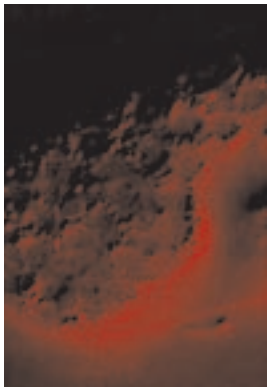
MEDECINE/SCIENCES 2006 ; 22 : 507-13

eIF4E et étapes décisionnelles du développement embryonnaire

Quand la traduction module le développement

Nathalie Oulhen, Patrick Cormier

> La synthèse protéique représente une étape importante de l'expression des gènes. Au cours du développement embryonnaire, la traduction des ARNm n'est pas toujours systématique, et résulte d'un contrôle efficace permettant l'expression de la protéine au bon moment et au bon endroit dans l'embryon. Les facteurs d'initiation (eIF, *eukaryotic initiation factors*) sont des acteurs clés du contrôle de la synthèse protéique. Parmi eux, le facteur eIF4E, par le biais d'associations avec différents partenaires, joue un rôle majeur qui se répercute depuis la gamétogenèse et la fécondation jusqu'à l'établissement des axes embryonnaires. Cet article se concentre sur le rôle d'eIF4E dans le contrôle de la régulation de la synthèse protéique en amont des décisions développementales. Les exemples sélectionnés illustrent l'importance du contrôle traductionnel en général, et au cours du développement embryonnaire en particulier. La découverte de mécanismes, parfois très sophistiqués, qui contrôlent la traduction des ARNm au cours du développement conduit le biologiste à porter un regard nouveau sur cette étape de la régulation de l'expression des gènes. <



Station biologique de Roscoff, Cycle cellulaire et développement, Unité Mer et Santé (UMR 7150), Université Pierre-et-Marie Curie (EI 37), Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut national des sciences de l'univers (INSU), BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France.
cormier@sb-roscoff.fr

La synthèse protéique, qui suit et affine le contrôle exercé lors de la transcription, représente une étape importante de l'expression des gènes [1]. Un contrôle efficace de la traduction des ARNm aboutit à une modulation rapide des quantités de protéines dans un contexte temporel et spatial, à l'échelle de la cellule et des tissus. La traduction se déroule classiquement en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Bien que des contrôles puissent s'appliquer à chacune de ces trois phases, l'initiation de la synthèse protéique est une phase régulatrice primordiale de la synthèse protéique [2]. Parmi la machinerie complexe de la traduction, le facteur eIF4E est une cible majeure de la régulation de l'initiation [3], en réponse à différents stimulus. Ce facteur d'initiation joue également un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire [4, 5], et a été impliqué dans plusieurs mécanismes de l'embryogenèse [6-9].

Après avoir situé le facteur eIF4E dans les étapes précoces de l'initiation de la traduction, nous verrons comment cet acteur moléculaire intervient dans le contrôle général ou spécifique de la synthèse des protéines, au cours de la gamétogenèse, de la fécondation et du développement embryonnaire de différents organismes modèles (drosophile, nématode, oursin et xénope).

Contrôle de la traduction

Chez les organismes eucaryotes, l'extrémité 5' non traduite (5'UTR*) des ARNm est coiffée par une molécule de m^7GTP (où « m » est le groupe méthyle de la guanosine positionnée sur le N^7). Cette coiffe facilite le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme, stabilise les ARNm [10] et, surtout, est essentielle pour la traduction « dépendante de la coiffe » (*cap-depen-*

Article reçu le 4 novembre 2005, accepté le 17 février 2006.

* Le déroulé des abréviations utilisées fait l'objet d'un glossaire (p. 513).

dent) [11]. L'interaction de cette coiffe m^{7}GTP avec les facteurs d'initiation permet de recruter en 5'UTR des ARNm le complexe 43S, composé de la sous-unité 40S du ribosome et du complexe ternaire (eIF2/GTP/ARNt-méthionine) initiateur. L'étape d'initiation fait intervenir au moins onze facteurs protéiques [4], dont eIF4E, eIF4G et eIF4A, qui forment le complexe eIF4F, une cible clé du contrôle de l'initiation de la traduction.

Le facteur eIF4E est une protéine très conservée chez les eucaryotes, qui s'associe à la coiffe m^{7}GTP des ARNm. Pour stimuler la synthèse protéique, eIF4E s'associe à eIF4G, une protéine de haut poids moléculaire jouant le rôle de plateforme pour recruter des partenaires tels qu'eIF4A, une ARN hélicase, et eIF3, qui apporte le complexe 43S sur l'ARNm *(Figure 1)*. Le facteur eIF4G recrute PABP, une protéine qui, liée à la queue poly (A) des messagers, relie ainsi les extrémités 3' et 5'UTR et stabilise les complexes d'initiation [12]. Ce modèle en boucle permet d'expliquer la corrélation existant entre la polyadénylation et l'efficacité du recrutement des ARNm.

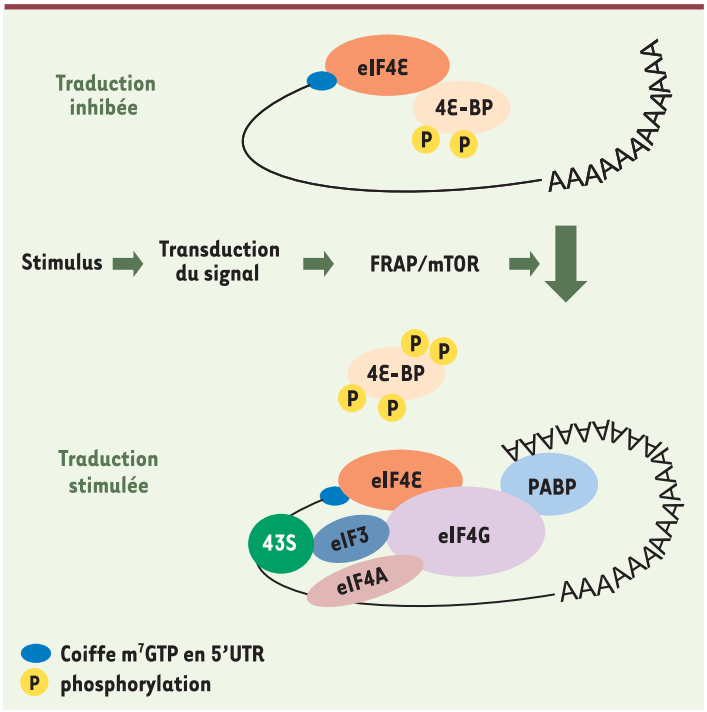


Figure 1. Contrôle de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe dans les cellules de mammifères. Lorsqu'eIF4E est lié à la protéine 4E-BP hypophosphorylée, la synthèse protéique est inhibée. L'addition d'un stimulus (facteurs de croissance ou insuline) aux cellules de mammifères déclenche une cascade de phosphorylations impliquant la phospho-inositide (PI) 3-kinase, la protéine kinase B/Akt et la kinase sensible à la rapamycine FRAP/mTOR, aboutissant à l'hyperphosphorylation de 4E-BP et à sa dissociation d'eIF4E. Celui-ci est alors libre de recruter eIF4G et de stimuler la synthèse protéique. La protéine de pontage eIF4G s'associe à eIF4A, une ARN hélicase, ainsi qu'à eIF3, responsable du recrutement du complexe 43S en 5'UTR de l'ARNm. Le facteur eIF4G est également capable de recruter la protéine PABP, elle-même associée à la queue poly (A) des ARNm, formant ainsi le lien entre les régions 5'- et 3'UTR pour stimuler la traduction.

Bien que majoritaire, la traduction des ARNm dépendante de la coiffe n'est pas l'unique mécanisme de recrutement des ARNm dans les polysomes : certains le sont par un mécanisme alternatif, qui permet l'entrée directe du ribosome en 5'UTR [13]. Ce mécanisme est fondé sur la présence de séquences IRES sur les ARNm [14], séquences qui privilégient leur traduction dans des conditions physiologiques particulières de la cellule, notamment en mitose [15]. De même, au cours du développement embryonnaire de la drosophile, la traduction des ARNm *antennapedia* et *ultrabithorax* est hautement contrôlée par des séquences IRES [16].

Au cours de la régulation de la traduction dépendante de la coiffe, la disponibilité d'eIF4E pour son partenaire eIF4G est un point essentiel. La petite protéine 4E-BP inhibe de manière compétitive l'association entre eIF4E et eIF4G ; chez les mammifères, les trois protéines 4E-BP1, -2 et -3 se lient à eIF4E et sont capables d'inhiber la traduction. En revanche, un seul orthologue a, pour l'instant, été décrit chez les invertébrés comme la drosophile [17] ou l'oursin [8]. Dans les cellules de mammifères en culture, le niveau de phosphorylation des 4E-BP contrôle leur association à eIF4E : le facteur 4E-BP1 hypophosphorylé interagit avec eIF4E, tandis que son hyperphosphorylation provoque sa dissociation d'eIF4E. En réponse à un stimulus hormonal du type insuline ou facteurs de croissance, la phosphorylation de 4E-BP1 est en aval d'une cascade de phosphorylation impliquant la phospho-inositide (PI) 3-kinase, la protéine kinase B/Akt et la kinase sensible à la rapamycine FRAP/mTOR *(Figure 1)*.

L'état de phosphorylation de 4E-BP contrôle finement son association avec eIF4E dans les cellules somatiques de mammifères. Bien que majoritaire dans l'ensemble des systèmes étudiés, ce mécanisme post-traductionnel n'est cependant pas le seul à intervenir dans le contrôle du complexe eIF4E/4E-BP : ainsi, l'analyse des régulations traductionnelles en réponse à la fécondation chez l'oursin a permis d'identifier un mécanisme annexe et efficace pour libérer eIF4E de son répresseur.

Fécondation chez l'oursin

Chez l'oursin, la synthèse protéique qui accompagne les mécanismes d'activation induits par la fécondation est indispensable à l'entrée dans le cycle cellulaire et à la poursuite du développement embryonnaire. L'augmentation de la traduction est indépendante de la transcription, et le contrôle traductionnel s'exerce principalement lors de l'initiation *(Figure 2)*.

La protéine eIF4E et l'inhibiteur 4E-BP sont présents dans les ovules d'oursin [8]. Après la fécondation, 4E-BP, rapidement dissocié d'eIF4E, est dégradé [18] : cette dégradation, qui représente un nouveau mécanisme de régulation de la traduction identifié pour la première fois chez l'oursin, pourrait être impliqué dans des mécanismes cellulaires tels que l'apoptose [19] et la prolifération [20] des cellules de mammifères. La dégradation de 4E-BP induite par la fécondation est sensible à l'inhibiteur de la kinase FRAP/mTOR, la rapamycine, qui inhibe la première division cellulaire. Enfin, la micro-injection de peptides mimant le site d'association entre 4E-BP et eIF4E dans les ovules affecte, de manière similaire aux effets de la rapamycine, la première division mitotique de l'embryon d'oursin [21]. Ce résultat implique que la libération d'eIF4E de son répresseur 4E-BP est un événement nécessaire à l'entrée dans le cycle cellulaire de l'embryon précoce d'oursin.

L'analyse des contrôles traductionnels au cours de la gamétogenèse a permis d'identifier de nouveaux acteurs qui, à l'instar de 4E-BP, sont capables de s'associer à eIF4E et d'inhiber compétitivement son interaction avec la protéine eIF4G. De tels partenaires pourraient influencer la traduction d'une population d'ARNm nécessaires pour la gamétogenèse, comme la formation des spermatozoïdes chez le nématode.

Spermatogenèse chez le nématode

Chez *C. elegans*, la spermatogenèse commence aux derniers stades larvaires : les spermatogonies prolifèrent par mitose, puis entrent en méiose jusqu'au stade pachytène, pour former les spermatocytes primaires. Ces derniers finissent leur première division méiotique pour donner les spermatocytes secondaires, puis poursuivent une deuxième division pour aboutir à des cellules haploïdes, les spermatides. Celles-ci subiront une maturation pour donner les spermatozoïdes.

Chez *C. elegans*, où cinq formes d'eIF4E ont été identifiées, le taux d'eIF4E est élevé lors de la formation de spermatozoïdes [7]. L'une des cinq isoformes d'eIF4E, IFE-1, interagit avec une protéine nommée PGL-1. Cette interaction s'effectue dans les granules P, des structures, riches en ARNm et en protéines, qui seraient déterminantes dans la formation de la lignée germinale. Lorsque l'expression d'IFE-1 est expérimentalement inhibée par interférence par l'ARN, il se produit un retard dans la spermatogenèse, et le sperme obtenu est déficient [7]. PGL-1 possède le site consensus d'association à eIF4E, et l'isoforme IFE-1 d'eIF4E ne peut plus interagir avec eIF4G lorsqu'elle est liée à PGL-1 : l'interaction IFE-1/PGL-1, qui baisse à partir du stade pachytène dans les spermatocytes primaires, permettrait la synthèse, à un instant précis, des ARNm spécifiques nécessaires à la formation des spermatozoïdes. La protéine IFE-1 pourrait également jouer un rôle indépendant de la traduction. Chez plusieurs organismes, eIF4E facilite le passage d'ARNm spécifiques du noyau vers le cytoplasme, après son entrée dans le noyau grâce au transporteur 4E-T [22] : IFE-1 servirait ainsi de navette pour apporter dans le cytoplasme, à un instant donné, des ARNm spécifiques de la spermatogenèse, afin qu'ils puissent y être traduits [7].

L'existence des répresseurs de la protéine eIF4E tels que 4E-BP et PGL-1 ne permet cependant pas d'expliquer comment ce facteur général de la traduction peut contrôler la traduction d'un ARNm spécifique, ou d'une population d'ARNm. En effet, eIF4E ne possède pas d'activité intrinsèque lui permettant de recruter un ARNm donné. L'étude de régions *cis* régulatrices situées en 3'UTR de différents ARNm, ainsi que l'identification de nouveaux partenaires d'eIF4E au cours du développement embryonnaire ont permis d'apporter des éléments de réponse à cette question importante pour la connaissance des mécanismes de la régulation de l'expression des gènes.

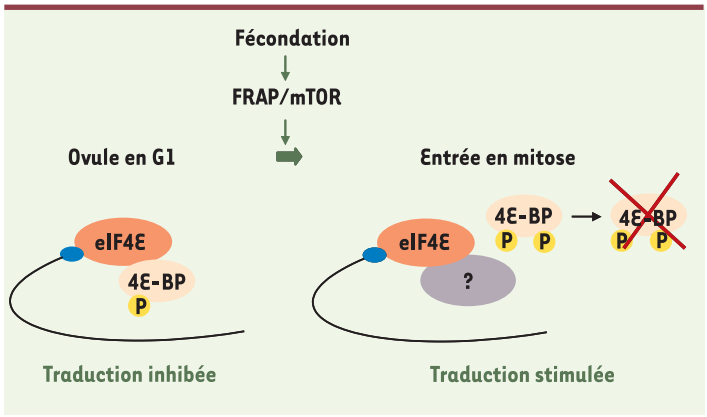


Figure 2. ***Dégradation de 4E-BP en réponse à la fécondation chez l'oursin.*** Chez l'oursin, avant la fécondation, eIF4E est lié à 4E-BP. La fusion des gamètes active la kinase FRAP/mTOR : le répresseur 4E-BP est alors rapidement phosphorylé et dégradé. Après fécondation, eIF4E est disponible pour des partenaires, encore non identifiés, qui permettront de stimuler la synthèse protéique dépendante de la coiffe des ARNm.

Traduction et facteurs *trans/cis* régulateurs

Le lien que forme le complexe eIF4E/eIF4G entre les régions 5' et 3'UTR stimule l'activité de traduction des ARNm. À l'inverse, la fixation d'un facteur protéique *trans*-régulateur négatif sur une région *cis*-régulatrice d'un ARNm affecte sa traductibilité.

Dans l'embryon de drosophile, l'ARNm codant pour la protéine Bicoid est localisé, et sa traduction spatialement contrôlée, dans la région antérieure. Un élément de réponse de la protéine Nanos est présent dans la séquence 3'UTR de *bicoid* et cette région est capable de lier Pumilio [23], suggérant une régulation traductionnelle de *bicoid*. La protéine Bicoid est non seulement un

facteur de transcription à homéodomaine, qui contrôle la transcription de gènes de segmentation, mais aussi un régulateur traductionnel de *caudal* : elle interagit avec la région 3'UTR de *caudal*, et cette interaction est nécessaire à la répression de l'expression de la protéine Caudal dans la partie antérieure, l'ARNm *caudal* étant uniformément réparti dans l'embryon.

Une séquence *cis*-régulatrice similaire à celle présente dans *bicoid* est également trouvée dans la région 3'UTR de l'ARNm codant pour la protéine GLP-1 [24] de *C. elegans*. L'ARNm *glp-1* code pour un récepteur de type Notch, qui intervient dans la voie de transduction en réponse aux interactions entre cellules et permet la spécification des axes dorsoventral et gauche-droite de l'embryon [25]. L'ARNm *glp-1* est soumis à au moins deux niveaux de contrôle traductionnel : un niveau temporel, la traduction de *glp-1* étant inhibée dans les ovocytes et juste après la fécondation, puis activée après la première division, et un niveau spatial, *glp-1* n'étant traduit que dans les blastomères antérieurs (sa traduction est inhibée dans les blastomères postérieurs). La région *cis*-régulatrice similaire à l'élément de réponse de Nanos observé chez la drosophile serait impliquée dans la répression de la traduction de *glp-1* : l'établissement de la polarité embryonnaire pourrait donc comporter des mécanismes de contrôle traductionnel conservés au cours de l'évolution.

Un signal *cis*-régulateur localisé à l'extrémité 3'UTR d'un ARNm est donc susceptible d'influencer le recrutement de celui-ci par la machinerie de traduction ; le fait que l'initiation de la traduction s'effectue en 5'UTR de l'ARNm suggère qu'il existe une communication entre les deux extrémités de l'ARNm, ce qui est en accord avec le modèle en boucle décrit précédemment. De nouveaux acteurs, impliqués dans le contrôle traductionnel de protéines jouant un rôle clé dans des étapes importantes de la maturation méiotique ou de la polarité antéropostérieure (A-P) des embryons, ont été identifiés. Ces acteurs contrôlent la traduction d'ARNm définis en associant le mécanisme commun d'inhibition compétitive d'eIF4G avec eIF4E à un mécanisme d'ancrage spécifique sur ces ARNm, *via* des facteurs *trans*- et *cis*-régulateurs.

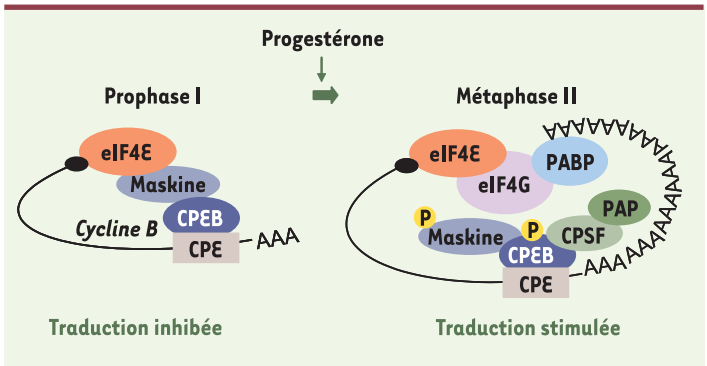


Figure 3. ***Poly-adénylation et recrutement d'ARNm au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope.*** Dans l'ovocyte de xénope, avant la maturation méiotique induite par la progestérone, la traduction est réprimée par la protéine Maskine, qui limite le recrutement d'eIF4G sur eIF4E. La Maskine est également liée à la protéine CPEB, qui interagit en 3'UTR avec des ARNm tels que celui codant pour la Cycline B. La progestérone induit la reprise des synthèses protéiques après induction d'une voie de phosphorylation de la CPEB et de la Maskine. La phosphorylation de la CPEB stabilise l'association du CPSF, qui recrute PAP, polymérase responsable de l'allongement de la queue poly (A) de l'ARNm. La protéine PABP s'associe à la queue poly (A) nouvellement synthétisée, ainsi qu'au facteur eIF4G, ce complexe déplaçant la Maskine d'eIF4E : la protéine eIF4G associée à eIF4E peut alors participer au recrutement d'ARNm contrôlé de manière dépendante de la coiffe.

Maturation méiotique de l'ovocyte chez le xénope

À l'issue de l'ovogenèse, les ovocytes ne sont pas systématiquement prêts à la fécondation ; ils doivent franchir une succession d'étapes, finement contrôlées, qui aboutit à un gamète femelle mature : l'ensemble de ces événements est appelé la maturation méiotique.

L'ovocyte de xénope est naturellement bloqué en prophase de la première division méiotique (prophase I). La reprise des divisions est induite par la progestérone, qui provoque l'entrée de l'ovocyte dans le cycle cellulaire jusqu'au stade métaphase de la seconde division méiotique, stade auquel la méiose est à nouveau bloquée, jusqu'à la fécondation. Cette entrée dans le cycle cellulaire induit une augmentation de l'activité de synthèse protéique nécessaire pour le déroulement des étapes de la maturation méiotique.

La poly-adénylation cytoplasmique de l'ARNm est un mécanisme hautement contrôlé au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte, ainsi qu'au cours du développement embryonnaire [26]. La poly-adénylation requiert deux éléments présents en 3'UTR : un hexanucléotide AAUAAA et un CPE, dont la séquence consensus est $U_{4-5}A_{1-2}U$. Cette dernière est portée par les ARNm des protéines telles que Mos, la Cycline B1 et les kinases Wee1 et Aurora. Dans les ovocytes en prophase I, la Maskine, identifiée comme un nouveau partenaire d'eIF4E, inhibe la synthèse protéique en empêchant la formation du complexe eIF4E/eIF4G. Dans le même temps, elle est associée à la protéine CPEB *(Figure 3)*. Après stimulation par la progestérone, la protéine CPEB est phosphorylée par la kinase Aurora, ce qui stabilise la fixation du facteur CPSF en 3'UTR : celui-ci recrute la polymérase PAP, responsable de l'allongement de la queue poly (A) en 3'UTR. La protéine PABP interagit avec la queue poly (A) nouvellement synthétisée et avec eIF4G. Le complexe tend à déplacer la Maskine d'eIF4E, et la phosphorylation de la Maskine par cdk1 diminue son affinité pour eIF4E. Le retrait de la Maskine d'eIF4E laisse ainsi la place à eIF4G,

qui recrute alors les partenaires impliqués dans la synthèse des protéines nécessaires à la maturation méiotique [27].

La maturation méiotique permet donc d'illustrer le lien entre la poly-adénylation active d'un ARNm et son recrutement efficace au sein de la machinerie de la traduction. Le développement embryonnaire de la drosophile, en aval de contrôles transcriptionnels importants, requiert lui aussi des mécanismes de contrôles traductionnels sophistiqués pour la mise en place des axes embryonnaires.

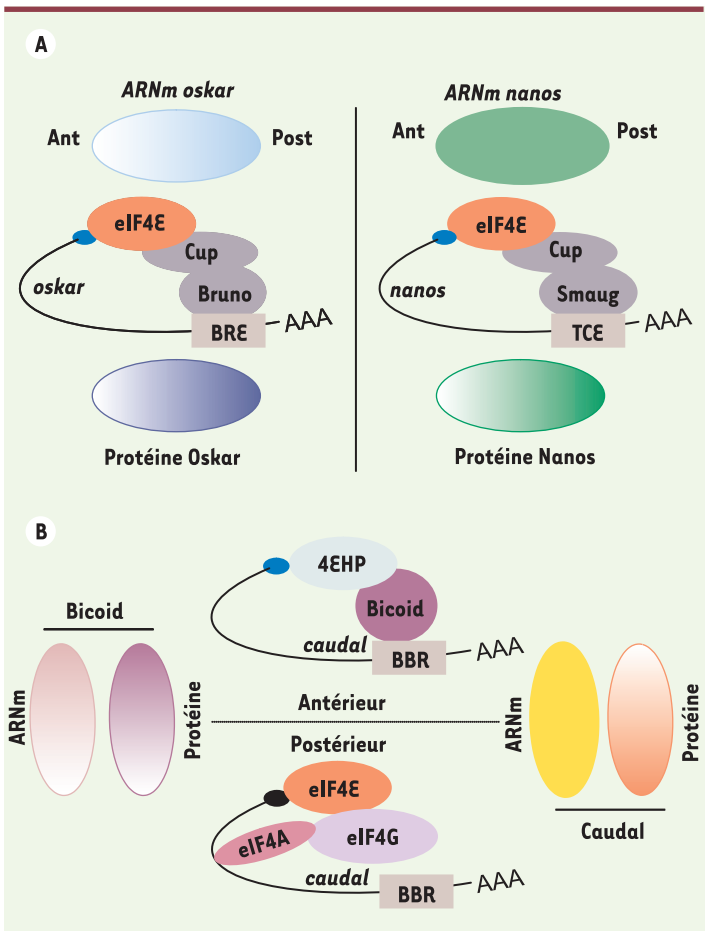


Figure 4. eIF4E et polarité embryonnaire. A. Contrôle traductionnel d'ARNm spécifiques par inhibition compétitive du complexe eIF4E/ eIF4G et ancrage *via* des facteurs *trans*- et *cis*-régulateurs. L'axe antéropostérieur de la drosophile nécessite la formation de gradients des protéines Oskar et Nanos. L'ARNm *oskar* est préférentiellement localisé dans la région postérieure des embryons, tandis que l'ARNm *nanos* se retrouve sur toute la surface embryonnaire. Le contrôle traductionnel est essentiel dans les deux cas pour s'assurer que les deux protéines ne s'exprimeront que dans la région postérieure. Le facteur eIF4E se lie à Cup, qui elle-même fixe des partenaires, Bruno ou Smaug, pour former des complexes spécifiques avec les ARNm *oskar* et *nanos* en 3'UTR. Ces associations, qui inhibent la formation de complexes eIF4E/eIF4G, doivent être rompues localement pour permettre aux protéines d'être synthétisées au bon endroit. ***B.*** Contrôle traductionnel d'un ARNm spécifique par un mécanisme de liaison compétitive à la coiffe. L'ARNm *caudal* est présent dans tout l'embryon, alors que sa protéine n'est exprimée que dans la région postérieure. Cette régulation fait intervenir 4EHP, une protéine homologue à eIF4E, qui d'un côté fixe la coiffe m^7GTP pour entrer en compétition avec eIF4E, et de l'autre s'associe avec Bicoid, capable de reconnaître spécifiquement l'ARNm *caudal* sur la séquence BBR. Ce complexe inhibe la synthèse de Caudal dans la majorité de l'embryon. L'absence de Bicoid dans la région postérieure permet la production localisée de la protéine Caudal.

Mise en place des axes embryonnaires chez la drosophile

Sans négliger l'importance incontestée des mécanismes de contrôle de l'expression des ARNm intervenant en amont de la traduction, le contrôle de la synthèse protéique est primordial pour l'établissement de la polarité embryonnaire A-P chez la drosophile. L'ARNm *oskar* s'accumule transitoirement dans la partie antérieure de l'embryon avant d'être relocalisé, par un mécanisme dépendant des microtubules, dans la partie postérieure, où s'effectue sa traduction [28]. Pour s'assurer que la protéine sera uniquement synthétisée à l'arrière de l'embryon, la traduction est réprimée dans la région antérieure par l'intervention de Cup. Possédant le site consensus d'association à eIF4E, cette protéine est capable d'empêcher l'interaction d'eIF4E avec eIF4G *(Figure 4A)*. Ce mécanisme implique la fixation de la protéine Bruno sur des séquences BRE en 3'UTR de l'ARNm *oskar* ; Bruno recrute alors Cup, et forme un complexe qui inhibe la traduction d'*oskar*. Au pôle postérieur des embryons, ce complexe est rompu par un mécanisme encore peu compris : la protéine Cup pourrait être phosphorylée à la manière des 4E-BP pour se dissocier d'eIF4E et laisser la place à eIF4G ; la protéine eIF4G pourrait également recruter des partenaires permettant de dissocier l'interaction entre Cup et eIF4E [28] ; enfin, la levée de l'inhibition pourrait être le résultat d'un allongement de la queue poly (A) de l'ARNm *oskar* qui, par un mécanisme similaire à celui de la rupture du complexe eIF4E/Maskine, permettrait de déstabiliser le complexe eIF4E/Cup [29].

De façon similaire, la protéine Nanos n'est présente qu'au pôle postérieur des embryons. Or, seulement 4 % des ARNm *nanos* se concentrent au pôle postérieur : il existe donc un système qui réprime la traduction de ces ARNm dans le reste de l'embryon. L'ARNm *nanos* possède une séquence TCE de 90 nucléotides en 3'UTR. Celle-ci est formée de deux structures « tige-boucle » permettant de recruter des facteurs inhibiteurs de la traduction [30]. La structure est capable de recruter Smaug, une protéine qui, comme Bruno précédemment, possède un site de liaison pour Cup. Ce complexe

eIF4E/Cup/Smaug inhibe la traduction de *nanos* dans l'embryon de drosophile *(Figure 4A)*. Cependant, les ARNm *nanos* localisés au pôle postérieur doivent être traduits, et la répression doit donc être annulée : le mécanisme de dérépression, encore peu connu, nécessiterait la localisation postérieure d'Oskar, cette dernière étant capable de fixer Smaug et d'inhiber ainsi son interaction avec Cup. La protéine Oskar séquestrerait ainsi Smaug et permettrait la synthèse locale de Nanos [31]. Par la suite, Nanos se fixe sur deux autres protéines, et exerce un effet inhibiteur sur la synthèse de Hunchback en région postérieure, pour déterminer la polarité embryonnaire.

L'ensemble des mécanismes de contrôle de la traduction illustrés précédemment fait intervenir globalement un mécanisme commun d'inhibition compétitive de la protéine eIF4G par des protéines capables d'associer eIF4E sur un site consensus de liaison. Récemment identifié dans l'embryon de drosophile, un mécanisme de contrôle complètement différent vient compléter les possibilités de modulation de la traduction dépendante de la coiffe d'un ARNm spécifique.

4EHP, un antagoniste d'eIF4E impliqué dans le contrôle de l'expression de Caudal chez la drosophile

La mise en place de l'axe A-P nécessite également l'expression localisée du gène *caudal* dans la partie postérieure des embryons, alors que son ARNm est présent de façon homogène sur toute la surface embryonnaire. Cette régulation traductionnelle, indispensable pour la localisation précise de la protéine Caudal, fait intervenir les protéines 4EHP et Bicoid, qui vont réprimer la traduction de l'ARNm *caudal* dans la région antérieure. La protéine 4EHP, tout comme eIF4E, est capable de lier la coiffe m^7GTP des ARNm, mais pas eIF4G. Si les deux protéines liant la coiffe sont réparties uniformément dans les embryons, Bicoid n'est présente que dans la région antérieure, résultat de la localisation spécifique de son ARNm [32]. De par sa répartition, la protéine Bicoid se fixe sur une séquence BBR en 3'UTR de l'ARNm *caudal* uniquement dans la région antérieure *(Figure 4B)*, où elle participe à l'inhibition traductionnelle de *caudal*.

Dans un premier temps, Bicoid avait été identifiée comme s'associant à eIF4E [33]. Récemment, il a été démontré que la protéine Bicoid n'interagit pas avec eIF4E, mais s'associe à la protéine homologue 4EHP [34]. Elle favorise donc la fixation de 4EHP sur l'ARNm *caudal* au détriment d'eIF4E dans la région antérieure de l'embryon. La protéine 4EHP étant incapable de recruter eIF4G, l'ARNm *caudal* n'est pas traduit dans la région antérieure. La protéine 4EHP, inhibiteur spécifique de *caudal*, représente une nouvelle stratégie pour inhiber efficacement la traduction d'un ARNm défini.

Conclusions

Les différents exemples cités précédemment soulignent l'importance de la régulation traductionnelle dans différentes étapes décisionnelles du développement embryonnaire. Les niveaux de contrôle de la disponibilité d'eIF4E, qui vont des régulations post-traductionnelles de répresseurs généraux, comme 4E-BP (phosphorylation et dégradation), à l'identification de nouveaux partenaires tels que Cup ou Bicoid, amènent à porter un regard nouveau sur la synthèse protéique. Nous avons volontairement limité notre argumentation au rôle central d'eIF4E et de ses partenaires, mais il est important de noter que, en aval du recrutement du 43S, d'autre mécanismes traductionnels, affectant notamment le balayage du 43S en 5'UTR [35], la réunion des deux sous-unités ribosomiques [36, 37] ou encore l'élongation [38], sont susceptibles de moduler la production d'une protéine.

Le contrôle du développement embryonnaire a souvent été réduit à l'expression de gènes « maîtres », correspondant à des facteurs de transcription. Cette vision réduisait les acteurs de la machinerie traductionnelle à des gènes « de ménage », seulement impliqués dans la traduction des ARNm présents. L'efficacité de la régulation traductionnelle et l'identification d'acteurs à double rôle au niveau de la transcription et de la traduction [39], tel Bicoid, démontrent que chaque niveau de la régulation des gènes est capital. Ainsi, les régulations traductionnelles peuvent toucher l'expression de facteurs de transcription permettant à leur tour de synthétiser de nouveaux ARNm à traduire. Les « valets » contrôleraient alors les « maîtres »... La connaissance de ces réseaux et des régulations affectant les facteurs de traduction, ainsi que la recherche de nouveaux acteurs, se révèlent donc essentielles à la compréhension des premiers instants de la vie. ◊

SUMMARY

eIF4E and developmental decisions: when translation drives the development

Regulation of mRNA translation is an important regulatory step in gene expression. During embryonic development, mRNA translation is tightly regulated to produce the protein at the right place, at the right time. The eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) is a major target for the regulation of cap-dependent translation, that plays a key role during embryogenesis including gametogenesis, fertilization and establishment of embryonic axes. In this review, we describe recent advances illustrating the importance of the translational regulator eIF4E and its partners in developmental decisions. ◊

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier leurs collègues de l'équipe Cycle cellulaire et développement de l'UMR 7150, à la station biologique de Roscoff. L'équipe Cycle cellulaire et développement bénéficie du support financier de l'Association pour la recherche contre le Cancer (ARC n° 4247, 3507, France), de la Ligue nationale contre le Cancer (Délégation départementale du Finistère, France) et du Conseil régional de Bretagne.

GLOSSAIRE

4E-BP : *eIF4E-binding protein*
4EHP : *eIF4E homologous protein*
4-ET : *eIF4E transporter*
5'UTR : *5'untranslated region*
BBR : *Bicoid binding region*
BRE : *Bruno responsive element*
CPE : *cytoplasmic polyadenylation element*
CPEB : *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*
CPSF : *cleavage and polyadenylation specificity factor*
eIF4E : *eukaryotic initiation factor 4E*
FRAP/mTOR : *FKBP12-rapamycin associated protein/mammalian target of rapamycin*
GLP-1 : *germ-line proliferation defective-1*
IRES : *internal ribosome entry site*
PABP : *poly(A) binding protein*
PAP : *poly (A) polymerase*
PGL-1 : *P granule abnormality-1*
TCE : *translational control element*

RÉFÉRENCES

1. Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. Origins and principles of translational control. In : Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, eds. *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press : 2000 : 1-31.
2. Cormier P. Translational factors: from protein synthesis to cell cycle regulation and tumorigenesis. *Med Sci (Paris)* 2000 ; 16 : 378-85.
3. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999 ; 68 : 913-63.
4. Cormier P, Pyronnet S, Salaun P, *et al*. Cap-dependent translation and control of the cell cycle. In : Meijer L, Jezequel A. Roberge M, eds. *Progress in cell cycle research.* Roscoff : Éditions Life in Progress, 2003 ; 5 : 469-75.
5. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, *et al.* eIF4E-from translation to transformation. *Oncogene* 2004 ; 23 : 3172-9.
6. Klein PS, Melton DA. Induction of mesoderm in *Xenopus laevis* embryos by translation initiation factor 4E. *Science* 1994 ; 265 : 803-6.
7. Amiri A, Keiper BD, Kawasaki I, *et al*. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* 2001 ; 128 : 3899-912.
8. Cormier P, Pyronnet S, Morales J, *et al*. eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev Biol* 2001 ; 232 : 275-83.
9. Robalino J, Joshi B, Fahrenkrug SC, Jagus R. Two zebrafish eIF4E family members are expressed and functionally divergent. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 10532-41.
10. Varani G. A cap for all occasions. *Structure* 1997 ; 5 : 855-8.
11. Von Der Haar T, Gross JD, Wagner G, Mc Carthy JE. The mRNA cap binding protein eIF4E in post transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 2004 ; 11 : 503-11.
12. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, *et al*. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts *via* multiple mechanisms. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 104-13.
13. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988 ; 334 : 320-5.
14. Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translational machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2001 ; 2 : 893-8.
15. Le Breton M, Cormier P, Belle R, *et al*. Translational control during mitosis. *Biochimie* 2005 ; 87 : 805-11.
16. Ye X, Fong P, Iizuka N, *et al*. *Ultrabithorax* and *Antennapedia* 5'untranslated regions promote developmentally regulated internal translation initiation. *Mol Cell Biol* 1997 ; 17 : 1714-21.
17. Bernal A, Kimbrell DA. *Drosophila* Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 6019-24.
18. Salaün P, Pyronnet S, Morales J, *et al*. eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev Biol* 2003 ; 255 : 428-39.
19. Morley SM, Coldwell MJ, Clemens MJ. Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Diff* 2005 ; 12 : 571-84.
20. Clemens MJ. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 2004 ; 23 : 3180-8.
21. Salaun P, Boulben S, Mulner-Lorillon O, *et al*. Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. *J Cell Sci* 2005 ; 118 : 1385-94.
22. Dostie J, Ferraiuolo M, Pause SA, Sonenberg N. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* 2000 ; 19 : 3142-56.
23. Gamberi C, Peterson DS, Gottlieb E. An anterior function for the *Drosophila* posterior determinant Pumilio. *Development* 2002 ; 129 : 2699-710.
24. Evans TC, Crittenden SL, Kodoyianni V, Kimble J. Translational control of maternal glp-1 mRNA establishes an asymetry in the *C. elegans* embryo. *Cell* 1994 ; 77 : 183-94.
25. Priess JR, Schnabel H, Schnabel R. The glp-1 locus and cellular interaction in early *C. elegans* embryos. *Cell* 1987 ; 51 : 601-11.
26. Richter JD. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999 ; 63 : 446-56.
27. Barnard D, Cao Q, Richter JD. Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. *Mol Cell Biol* 2005 ; 25 : 7605-15.
28. Nakamura A, Sato K, Hanyu-Nakurama K. *Drosophila* Cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA in oogenesis. *Dev Cell* 2004 ; 6 : 69-78.
29. Wilhelm JE, Smibert CA. Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell* 2005 ; 97 : 235-52.
30. Forrest KM, Clark IE, Jain RA, Gavis ER. Temporal complexity within a translational control element in the nanos mRNA. *Development* 2004 ; 131 : 5849-57.
31. Nelson M, Leidal AM, Smibert CA. *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J* 2004 ; 23 : 150-9.
32. Johnstone O, Lasko P. Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* 2001 ; 35 : 365- 406.
33. Niessing D, Blanke S, Jackle H. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev* 2002 ; 16 : 2576-82.
34. Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, *et al*. A new paradigm for translational control: inhibition *via* 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4E-HP. *Cell* 2005 ; 121 : 411-23.
35. Beckmann K, Grskovic M, Gebauer F, Hentze MW. A dual inhibitory mechanism restricts msl-2 mRNA translation for dosage compensation in *Drosophila*. *Cell* 2005 ; 122 : 529-40.
36. Reimann I, Huth A, Thiele H, Thiele BJ. Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'UTR control element DICE. *J Mol Biol* 2002 ; 5 : 965-74.
37. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, *et al*. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol* 2002 ; 13 : 4535-43.
38. Proud C. Control of the elongation phase of protein synthesis. In : Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, eds. *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press : 2000 : 719-39.
39. Nédélec S, Trembleau A. Emx2 in axons: translational functions of homeodomain transcription factors. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 237-9.

TIRÉS À PART
P. Cormier

L'importance des mécanismes de régulations au cours du développement est démontrée par le nombre croissant d'articles publiés sur ce sujet. En effet, en plus des mécanismes décrits dans cette revue 1, la régulation traductionnelle intervient à d'autres niveaux présentés ci-dessous.

Traduction et gamétogenèse

Deux études récentes effectuées sur la drosophile, présentent le rôle d'eIF4GII dans la spermatogenèse (Baker et Fuller, 2007 ; Franklin-Dumont et al, 2007). eIF4GII ne possède pas le site consensus d'association à eIF4E mais se retrouve en complexe de façon directe ou indirecte avec eIF4E après expression cellulaire et immunoprécipitation. Les mutants d'eIF4GII sont viables mais contrairement aux femelles, les mâles sont stériles. eIF4GII est nécessaire aux divisions méiotiques des spermatocytes, en régulant la synthèse de cycline B et de Twine (Cdc25 phosphatase), ainsi qu'à la différenciation des spermatides.

Il existe une forme d'eIF4E spécifique de la gamétogenèse et du développement précoce. En effet, eIF4E-1b se retrouve chez différentes espèces telles que le zébrafish (Robalino et al, 2004), la souris (Evsikov et al, 2006) et le xénope. L'ARNm codant pour cette protéine n'est présent que dans les étapes précoces du développement. Chez le xénope, eIF4E-1b a été découvert lors d'une recherche des partenaires de CPEB1 (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein 1), connue pour réguler la polyadénylation. Il existe 3 formes d'eIF4E présentes dans les ovocytes, eIF4E-1b est la forme la plus courte, elle possède tous les sites nécessaires pour interagir avec la coiffe et avec eIF4G mais contrairement à la forme eIF4E-1a, elle interagit faiblement avec la coiffe et pas du tout avec eIF4G. La structure d'eIF4E-1b avec et sans la coiffe, est similaire à celle d'eIF4E-1a et ces différences d'affinité sont pour l'instant inexpliquées. eIF4E-1b intervient dans la répression de la traduction permettant de réguler la maturation des ovocytes puisque l'injection d'anticorps dirigés contre eIF4E-1b, dans les ovocytes de xénope, accélère la maturation méiotique. Son seul partenaire connu est 4E-T mais l'interaction est indépendante du site consensus YxxxxLΦ (Minshall et al, 2007). En plus d'eIF4E-1b et 4E-T, de nombreuses protéines ont été retrouvées par co-immunoprécipitation avec CPEB1 dans les ovocytes de xénope : une ARN hélicase Xp54 et des protéines capables de se lier aux ARN : P100 et RAP55 (RNA Associated Protein 55).

Les études sur C. *elegans* indique un rôle d'eIF4G dans l'ovogenèse (Contreras et al, 2008). Il existe un seul gène qui code pour eIF4G chez le nématode C. *elegans* (*ifg-1*) mais deux isoformes sont synthétisées : p170 et p130. La protéine la plus longue est capable de s'associer à eIF4E, contrairement à p130 qui contient une région N-terminale plus petite. Des expériences de déplétion spécifique de p170 par RNAi (RNA interference) montrent que cette isoforme longue est nécessaire à la progression méiotique des ovocytes. Cette déplétion est aussi suffisante pour augmenter la production de protéines intervenant dans l'apoptose telles que CED-1 (CEll Death abnormal-1 : récepteur transmembranaire indispensable à l'ingestion des corps apoptotiques) et CED-4 (CEll Death abnormal 4 : orthologue de Apaf 1 des mammifères, composant l'apoptosome). L'utilisation de vers homozygotes *igf-1* (-/-) ne possédant aucune des deux isoformes démontre la nécessité d'eIF4G dans la prolifération mitotique des cellules germinales à l'origine des ovocytes.

Traduction et développement précoce

Bien que le facteur eIF4E soit exprimé dans beaucoup de types cellulaires eucaryotes, il fonctionne aussi de manière tissu spécifique. Des analyses d'hybridation in situ faites chez le zébrafish suggèrent qu'eIF4E régulerait la synthèse protéique lors de l'ovogenèse, la gastrulation et l'érythropoièse (Fahrenkrug et al, 1999). Par exemple, après la gastrulation, l'expression d'eIF4E est enrichie dans le mésoderme : un ARNm présent à cet endroit est peut être traduit spécifiquement grâce à eIF4E. D'autres exemples confortent le rôle d'eIF4E dans une traduction au niveau du mésoderme. (Klein et Melton, 1994). L'injection d'ARNm codant pour eIF4E dans des explants ectodermiques d'embryons de xénope induit un phénotype mésodermique et la production de marqueurs mésodermiques en passant par une voie dépendante de ras et d'un récepteur TFGβ (Transforming Growth Factor β). Les auteurs montrent que cette surexpression d'eIF4E ne stimule pas la synthèse protéique globale mais augmente la traduction spécifique de certains ARNm comme l'activine, un inducteur du mésoderme (Klein et Melton, 1994).

Chez l'oursin, les transcrits des facteurs eIF4G et eIF4A présentent des profils d'expression spécifiques. Dans les étapes précoces, ils sont répartis de façon homogène dans les blastomères. En blastula, ils apparaissent localisés au pôle apical, vers le blastocœle, dans toutes les cellules. De manière remarquable, au stade gastrula, les transcrits sont localisés à la base de l'archentéron. L'analyse plus précise de la localisation des ARNm d'eIF4G à l'aide

d'agents chimiques suggère une implication d'eIF4G dans la différenciation de l'endoderme à la base de l'archentéron (communication personnelle de V. Costache)

Traduction et différentiation

Contrairement à PML qui s'exprime dans tous les types cellulaires, l'expression de PRH (Proline Rich Homeodomain), aussi connue sous le nom de Hex (Hematopoietically expressed homeodomain), se limite aux cellules myéloïdes, aux poumons, au foie et à la thyroïde (Hromas et al, 1993 ; Martinez-Barbera et al, 2000). PRH interagit avec eIF4E dans les corps nucléaires des cellules monocytaires U937 (Topisirovic et al, 2003). Tout comme eIF4E et PML, ces corps nucléaires eIF4E / PRH sont perturbés par ajout de coiffe m^7GTP. PRH, lorsqu'elle est nucléaire, inhibe le transport de la cycline D1 dépendant d'eIF4E et inhibe la transformation induite par eIF4E. PRH serait donc un régulateur tissu – spécifique d'eIF4E. Les auteurs de ces résultats ont également réalisé une recherche des protéines à homéodomaines possédant le site consensus d'association à eIF4E. Sur 803 protéines, 199 ont au moins un site YxxxxLΦ (Topisirovic et al, 2003). C'est le cas de HOXA9 (Homeobox A9), protéine impliquée dans la leucémogénèse (Topisirovic et al, 2005). Contrairement à PRH, HOXA9 est un stimulateur de l'activité d'eIF4E dans le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme. En fait, HOXA9 est capable de déplacer PRH des corps nucléaires pour venir interagir avec eIF4E et stimuler le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm de la cycline D1 et de l'ODC. Cette compétition entre HOXA9 et PRH pour eIF4E est très importante pour contrôler la prolifération cellulaire, le développement et la différentiation. Ceci constitue un nouveau mécanisme de régulation d'eIF4E par interaction avec des protéines à homéodomaines inhibitrices ou stimulatrices. De plus, ces résultats mettent en évidence un nouveau rôle pour les protéines à homéodomaines qui en dehors de leur rôle bien connu de facteurs de transcription, sont capables de moduler l'expression des gènes au niveau post transcriptionnel (Topisirovic et al, 2003).

L'association d'eIF4E avec différents partenaires permet de réguler la synthèse spécifique de certaines protéines et cela de façon localisée au cours du développement embryonnaire. Ces mécanismes ont été étudiés chez la drosophile, dans le contrôle des protéines déterminant la polarité embryonnaire. Les régulations concernant Oskar, Nanos et Caudal sont présentées dans la revue 1 (Oulhen et Cormier, 2006). Il a été montré récemment que l'expression de Hunchback est régulée par l'isoforme 4E-HP (eIF4E de la classe 2), de

façon similaire à Caudal. 4E-HP se lie à la coiffe mais elle est incapable de fixer eIF4G. 4E-HP inhibe ainsi la production de Hunchback (**Fig 23**). Alors que l'ARNm est localisé de façon homogène à travers les embryons, la protéine Hunchback se retrouve uniquement au pôle antérieur (Vardy et Orr-Weaver, 2007). La traduction de Hunchback est réprimée au pôle postérieur par un complexe formé de trois protéines : Pumilio, Nanos et Brain Tumor. Pumilio s'associe à la région 3'UTR de l'ARNm Hunchback et Brain Tumor s'associe à 4E-HP. Sa traduction est également contrôlée par déadénylation.

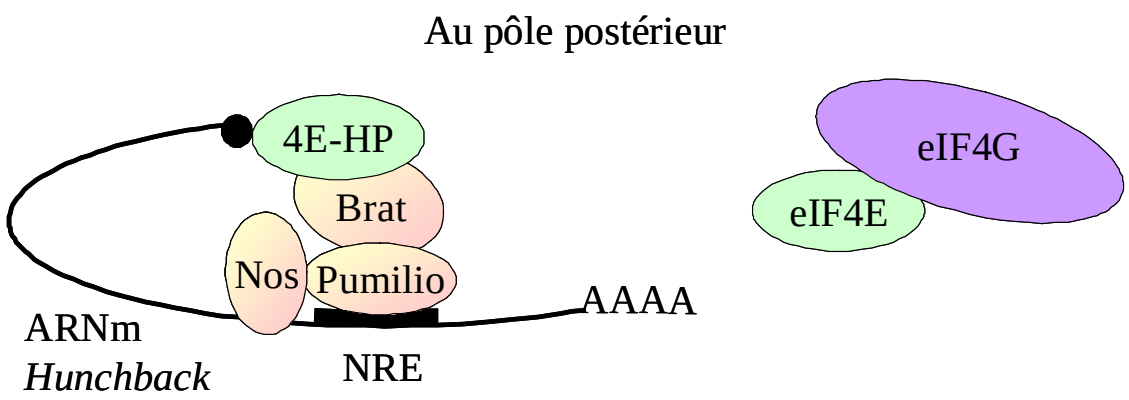


Figure 23 : Détermination des axes embryonnaires par 4E-HP chez la drosophile. *L'ARNm hunchback contient une séquence NRE (Nanos Response Element) qui recrute un complexe formé de Pumilio, Brain Tumor (Brat), et Nanos (Nos) et qui fixe 4E-HP pour inhiber la traduction au pôle postérieur.*

Vasa est une ARN hélicase, c'est une protéine à DEAD box comme eIF4A. Elle intervient au cours du développement embryonnaire chez la drosophile en régulant l'expression d'ARNm spécifiques tel que *gurken* et *oskar* qui participent à la détermination des axes de polarité. Ces deux ARNm possèdent une séquence spécifique capable de lier Bruno. Vasa interviendrait dans le relargage de Bruno/Cup pour libérer eIF4E et permettre la synthèse protéique. L'interaction de Vasa avec un autre facteur d'initiation, eIF5B, est indispensable à cette régulation (Johnstone et Lasko, 2004). Dans beaucoup d'espèces, Vasa est un marqueur des cellules germinales primordiales. Bien qu'aucun déterminant de lignée germinale n'ait été trouvé chez l'oursin, Vasa présente une localisation particulière dans les embryons (Voronina et al, 2008). Alors que l'ARNm de Vasa se retrouve localisé de façon uniforme dans les premiers stades de développement embryonnaire, la protéine se situe au niveau des micromères dès leur apparition au stade 16 cellules puis se restreint aux petits micromères à la division

suivante. Cette régulation de l'expression fait intervenir les micromères eux même puisque leur retrait au stade 16 cellules entraîne une expression ectopique de la protéine Vasa. La β-caténine est aussi un élément important dans ce processus. Ce n'est qu'à partir de la gastrula que l'on retrouve un profil similaire de localisation entre ARNm et protéine (Voronina et al, 2008).

1-4-3- Traduction et cycle saisonnier

La phosphorylation de 4E-BP1 est finement contrôler pour réguler la synthèse protéique. C'est aussi le cas pour l'écureuil chez qui l'état de phosphorylation de 4E-BP1 peut varier en fonction des saisons (Van Breukelen et al, 2004). En été, on ne trouve pas de 4E-BP1 dans le foie des écureuils, la traduction est seulement régulée en fonction de l'état de phosphorylation d'eIF4E. En hiver, lorsque les écureuils hibernent, il y a une alternance entre des phases de torpeur dans lesquelles la température du corps se rapproche de la température externe et des phases de réchauffement ramenant la température du corps à 37°C. Lors de la torpeur, 4E-BP1 est hypophosphorylé et inhibe la traduction mais lors des réchauffements du corps, 4E-BP1 est hyperphosphorylé pour permettre de synthétiser des protéines. La régulation de l'initiation de la traduction permet ainsi de moduler le métabolisme pour survivre en hiver.

1-4-4-Traduction et système nerveux

L'étude des régulations traductionnelles dans le système nerveux est assez récente mais il est maintenant accepté que la synthèse protéique est nécessaire à la plasticité synaptique et à la mémoire. Ces deux mécanismes incluent une phase précoce qui dépend de modifications de protéines pré-existantes et une phase tardive qui nécessite la synthèse de nouvelles protéines (Klann et al, 2004 ; Costa-Mattioli et al, 2005). Une perte de ces régulations peut entraîner des maladies très graves telles que la perte de matière blanche dans le cerveau des nouveaux-nés. C'est l'exemple de la VWM (Vanishing White Matter Disease), maladie dans laquelle le facteur eIF2B est muté (Ainsworth 2005). Certains résultats suggèrent que la régulation de la synthèse protéique par 4E-BP est très importante dans le système nerveux central (Richter et Sonenberg, 2005). De nouvelles données en neurobiologie apparaissent avec la délétion spécifique de 4E-BP2, chez des souris knock-out : cela entraîne des défauts d'apprentissage, de mémorisation et montre l'importance de la traduction

dépendante de la coiffe dans l'hippocampe (Banko et al, 2005). De plus, cette délétion de 4E-BP2 induit aussi une altération des comportements chez la souris (Banko et al, 2007).

eIF4E est aussi modifiée dans les mécanismes liés à l'apprentissage et à la mémoire. En effet, comme le montre Kelleher en utilisant des souris mutées produisant une forme dominante négative de MEK1, eIF4E est phosphorylée en 30 minutes dans l'hippocampe par une voie de signalisation dépendante de ERK en réponse à une stimulation neuronale provoquée par la peur (Kelleher et al, 2004). De plus, eIF4E pourrait réguler la synthèse protéique en fonction de ses partenaires. Par exemple, la Neuroguidine est impliquée dans la formation du tube neural au cours du développement du xénope. Dans les neurones de mammifères, cette protéine peut s'associer à eIF4E et à CPEB, cela pourrait permettre de contrôler la traduction d'ARNm spécifiques impliqués dans le développement neuronal (Jung et al, 2006).

D'autres facteurs d'initiation sont modifiés dans le système nerveux. En utilisant des souris hétérozygotes eIF2α $^{+/S51A}$, l'équipe de N. Sonenberg a démontré l'importance de la phosphorylation de eIF2α dans la plasticité synaptique à long terme et dans la mémoire (Costa-Mattioli et al, 2007). L'inhibition de la phosphorylation d'eIF2α chez ces souris entraîne une augmentation de la plasticité synaptique, de la mémoire spatiale, du conditionnement à la peur. De plus, dans l'hippocampe de souris sauvages, eIF2α est rapidement déphosphorylée après un conditionnement à la peur et l'inhibition de cette déphosphorylation par injection de salubrinal limite la mémoire à long terme. La phosphorylation d'eIF2α supprime la synthèse protéique globale mais stimule la traduction de ATF4 (Activating Transcription Factor 4) (Harding et al, 2000), un facteur de transcription impliqué indirectement dans la répression l'expression des gènes liés à la plasticité synaptique et à la mémoire.

Il existe deux types de transmission synaptique, le relargage de neurotransmetteurs peut être induit soit par potentiels d'action soit de manière spontanée lors de transmissions synaptiques « miniatures » encore appelées « minis », indépendamment des potentiels d'action (Sutton et al, 2007). Le facteur d'élongation eEF2 est touché différemment dans ces deux cas au niveau des dendrites post-synaptiques. Contrairement aux potentiels d'action qui provoquent la déphosphorylation de la Thr 56 d'eEF2, les minis augmentent significativement la phosphorylation de ce résidu dans les dendrites et inhibe localement la synthèse protéique.

Cette inhibition de l'élongation pourrait s'expliquer par deux hypothèses. D'abord, quelques études ont montré qu'une réduction du taux d'élongation pouvait limiter les erreurs de traduction (Abraham et Pilh, 1983), ensuite, cela pourrait permettre de traduire spécifiquement certains ARNm (Scheetz et al, 2000).

1-4-5- Intérêt des modèles marins pour étudier la traduction

L'étude des organismes marins nous apporte beaucoup d'informations sur la diversité des mécanismes traductionnelles qui existent au cours du développement. Ces données sont présentées dans la revue 2 (Oulhen et al, 2007).

Journal de la Société de Biologie, 201 (3), 297-306 (2007)

Régulation de l'expression des gènes au niveau de la traduction : intérêt des modèles marins

par Nathalie Oulhen, Julia Morales, Bertrand Cosson, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé & Patrick Cormier

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 Mer et Santé ; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7150 ; Équipe Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, F-29682 France.
Correspondance : Nathalie Oulhen, Station Biologique, Place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tél. : +33 2 98 29 23 23. Fax : +33 2 98 29 23 24. E-mail : oulhen@sb-roscoff.fr

Reçu le 22 juin 2007

RÉSUMÉ

La régulation de l'expression des gènes est cruciale pour la survie des organismes, chaque étape doit être finement régulée, depuis les gènes jusqu'à la formation des protéines. Les ARNm peuvent être stockés dans une cellule sans être traduits automatiquement. Cela permet à la cellule de réagir rapidement pour produire les protéines nécessaires au bon endroit et au bon moment en régulant l'étape de traduction. La cellule dépense beaucoup d'énergie pour synthétiser des protéines, il est essentiel de contrôler ces processus en fonction des besoins cellulaires. L'étape d'initiation de la traduction représente une étape régulatrice importante dans l'expression des gènes. Elle fait intervenir de nombreux facteurs protéiques capables de se lier aux ARNm et de recruter différents partenaires pour inhiber ou stimuler la synthèse protéique. Les océans contiennent une diversité d'organismes qui constituent d'excellents modèles pour étudier les bases de l'expression des gènes au niveau de la traduction. Ces organismes ont permis d'étudier des mécanismes de régulation traductionnelle dans différents processus physiologiques : cycle cellulaire (méiose lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer, mitose en réponse à la fécondation chez l'oursin), et de mieux comprendre le fonctionnement du système nerveux (aplysie). Toutes ces données permettront de trouver de nouveaux acteurs indispensables à la régulation de la traduction et de fournir de nouvelles cibles de thérapie dans la lutte contre les maladies chez l'Homme.

SUMMARY **Gene expression regulation at the translational level: contribution of marine organisms**

Gene expression regulation is crucial for organism survival. Each step has to be regulated, from the gene to the protein. mRNA can be stored in the cell without any direct translation. This process is used by the cell to control protein synthesis rapidly at the right place, at the right time. Protein synthesis costs a lot of energy for the cell, so that a precise control of this process is required. Translation initiation represents an important step to regulate gene expression. Many factors that can bind mRNA and recruit different partners are involved in the inhibition or stimulation of protein synthesis. Oceans contain an important diversity of organisms that are used as important models to analyse gene expression at the translational level. These are useful to study translational control in different physiological processes for instance cell cycle (meiosis during meiotic maturation of starfish oocytes, mitosis following fertilization of sea urchin eggs) or to understand nervous system mechanisms (aplysia). All these studies will help finding novel actors involved in translational control and will thus be useful to discover new targets for therapeutic treatments against human diseases.

RÉGULATION TRADUCTIONNELLE

L'expression des gènes est finement régulée tout au long de la vie d'un organisme. Chaque gène doit s'exprimer au bon moment et au bon endroit. Toutes les étapes sont rigoureusement contrôlées depuis le gène jusqu'à la formation de la protéine correspondante. Lors de la transcription, l'ADN donne un ARNm. Cet ARNm va ensuite subir des modifications (épissage, ajout d'une coiffe m^7GTP et d'une queue polyA, transport,...) avant de donner une protéine lors de la traduction. La synthèse protéique est parmi les dernières étapes de la régulation,

elle permet de moduler rapidement l'expression des gènes en activant ou en inhibant la formation des protéines à partir d'un stock d'ARNm déjà présent dans une cellule. La régulation de la synthèse protéique peut s'exercer à deux niveaux : sur les ARNm (localisation, masquage, polyadénylation) ou sur la machinerie de traduction (Proud, 2007). Dans beaucoup de processus biologiques, le contrôle de la machinerie de traduction s'exerce principalement lors de l'étape d'initiation (Fig. 1). La majorité des ARNm sont traduits de façon dépendante de la coiffe (Von der Haar *et al.*, 2004). La coiffe est formée d'une guanosine modifiée par ajout d'un méthyl en position 7. L'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation (eIFs : eukaryotic Initiation Factors) permet de recruter la sous unité 40S en 5'UTR (5' UnTranslated Region) des ARNm. Cette étape fait intervenir au moins onze facteurs protéiques (Gingras *et al.*, 1999a) dont eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, une cible clé pour réguler l'initiation de la traduction. eIF4G est une protéine de haut poids moléculaire qui recrute des partenaires tels que eIF4A, eIF3 et PABP (Fig. 2). Le facteur eIF3 recrute la sous-unité

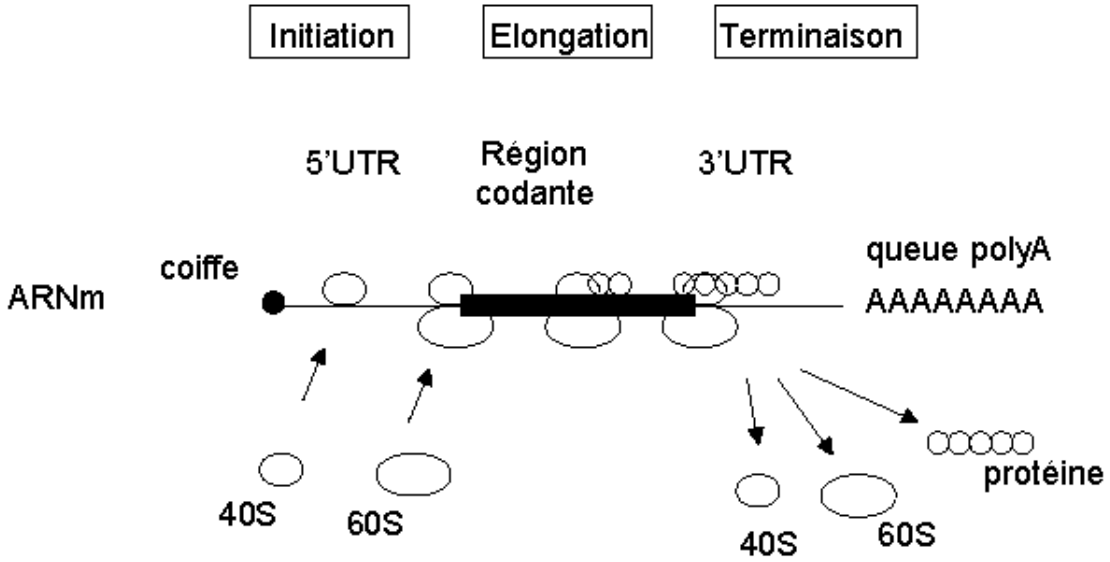


FIG. 1. – *Les trois étapes de la traduction.*

L'ARNm se compose d'une coiffe m^7GTP d'une région 5'UTR, d'une séquence codante, et d'une région 3'UTR qui se termine par une queue polyA. La synthèse protéique se décompose en trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. La sous-unité ribosomique 40S est recrutée en 5'UTR lors de l'initiation. En arrivant au début de la séquence codante, la deuxième sous-unité ribosomique 60S est recrutée. La chaîne d'acides aminés est produite durant l'étape d'élongation. Puis, les éléments sont libérés à la fin de la séquence codante lors de la terminaison.

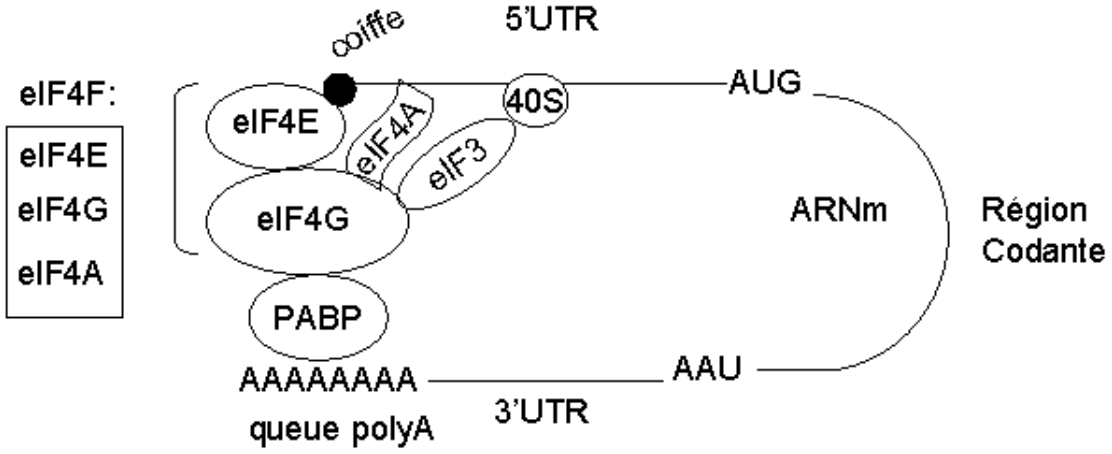


FIG. 2. – *Le modèle en boucle.*

eIF4E lie la coiffe des ARNm. Il fait partie du complexe eIF4F (eIF4E-eIF4G-eIF4A). eIF4G lie eIF4E et recrute les autres protéines. eIF4A défait les structures secondaires en 5'UTR des ARNm. eIF3 recrute la petite sous-unité ribosomique 40S sur l'ARNm. eIF4G s'associe également à PABP pour stimuler la traduction des ARNm polyadénylés en 3'UTR.

ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. La protéine PABP (Poly-Adenylated Binding Protein) se lie à la queue polyA des messagers et relie l'extrémité 3' et 5'UTR (Kahvejian *et al.*, 2005).

La disponibilité de eIF4E pour ses partenaires est le point essentiel dans la régulation de la traduction dépendante de la coiffe. Des petites protéines 4EBP (eIF4E Binding Protein) sont capables d'interagir avec eIF4E et d'inhiber la fixation de eIF4G sur eIF4E par compétition pour un même site (Haghighat *et al.*, 1995). En effet, 4EBP et eIF4G possèdent le site consensus d'interaction sur eIF4E : 4EBP empêche la formation du complexe eIF4F et inhibe la synthèse protéique. L'association eIF4E/4EBP dépend surtout de l'état de phosphorylation de 4EBP. Par exemple, dans les cellules de mammifères stimulées par des facteurs mitotiques, 4EBP est hyperphosphorylé par la kinase FRAP/mTOR (*FKBP12 Rapamycin Associated Protein*/*mammalian Target of Rapamycin*) et se dissocie de eIF4E (Gingras *et al.*, 1999b). La protéine eIF4E peut aussi être phosphorylée, sous l'effet de la kinase Mnk1 pour réguler la traduction dépendante de la coiffe (Pyronnet *et al.*, 1999).

Certains organismes marins représentent d'excellents modèles d'étude pour mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes. Ils ont permis de déterminer les contrôles de la traduction dans divers processus physiologiques tels que la méiose, la mitose et le fonctionnement du système nerveux. Les travaux réalisés chez l'étoile de mer mettent à jour l'importance des relations entre la polyadénylation et la traduction au cours de la maturation méiotique des ovocytes. L'embryon d'oursin permet de découvrir un nouveau mécanisme de régulation de la synthèse protéique affectant les facteurs 4EBP et eIF4G en réponse à la fécondation. Et enfin, l'aplysie nous apprend les régulations de la synthèse protéique du système nerveux à la base de la plasticité synaptique. Ces différents modèles biologiques mettent aussi en évidence une double régulation de la synthèse protéique : une régulation temporelle au cours des différents stades de développement (maturation méiotique chez l'étoile de mer, fécondation chez l'oursin) et une régulation spatiale (système nerveux de l'aplysie).

LES MODÈLES MARINS

L'étoile de mer : traduction et maturation méiotique

Chez la plupart des animaux, les ovocytes contiennent des stocks d'ARNm qui ne seront traduits qu'après la fécondation et qui seront nécessaires au développement embryonnaire. Il existe aussi des espèces chez qui les ARNm stockés dans les ovocytes sont traduits avant fécondation, lors de la maturation méiotique : succession d'étapes, finement contrôlées, qui aboutit à un gamète mature. Ce processus de maturation a été étudié à partir d'ovocytes de divers organismes tels que les mollusques, le xénope et l'étoile de mer (Colas & Guerrier, 1995). Ces deux derniers modèles sont particulièrement manipulés pour analyser la régulation de l'expression des gènes lors de la maturation méiotique. Par rapport au xénope, l'étoile de mer constitue un système de régulation simplifié pour comprendre les fondements de la maturation méiotique : un nombre limité d'acteurs interviennent dans l'étoile de mer et il y a moins de redondance. Par exemple, une seule cycline est mise en jeu dans les ovocytes d'étoile de mer alors qu'il y en a quatre dans les ovocytes de xénope (Hochegger *et al.*, 2001).

Les ovocytes immatures d'étoile de mer sont arrêtés en prophase de première division méiotique. C'est l'hormone 1-methyladénine, sécrétée par les cellules folliculaires environnantes, qui provoque la poursuite de la méiose en activant des voies de signalisation qui vont stimuler la synthèse protéique (Lee *et al.*, 2000) en agissant à la fois sur les ARNm stockés et sur les acteurs de la machinerie de traduction. La 1-methyladénine provoque la rupture de la vésicule germinative et l'émission du premier globule polaire. La reprise de la méiose n'est pas dépendante des synthèses protéiques, contrairement à la progression vers la deuxième division méiotique. La fin de la méiose est marquée par l'émission du deuxième globule polaire.

La traduction de la cycline B est l'élément essentiel de la progression méiotique, elle résulte d'une modification des ARNm préexistants. Le contrôle de la traduction de la cycline B se fait principalement par la régulation de la polyadénylation des ARNm *via* des interactions entre la région 3'UTR des ARNm et des protéines régulatrices. C'est le cas de la séquence CPE (*Cytoplasmic Polyadenylation Element*) qui est reconnue par la protéine CPEB (*CPE Binding protein*) (Mendez & Richter, 2001). Les travaux sur les ovocytes d'étoile de mer ont mis en évidence un nouveau facteur responsable de la régulation de la traduction de la cycline B lors de la maturation méiotique (Lapasset *et al.*, 2005). La rupture de la vésicule germinative provoque la libération d'une protéine nucléaire, l'inhibiteur 2, qui est un inhibiteur de phosphatase. Cela facilite la phosphorylation de CPEB, son association à d'autres protéines et conduit à la polyadénylation de l'ARNm de la cycline B pour stimuler sa traduction (Fig. 3). La synthèse de la cycline B dépend donc des interactions entre la séquence CPE de l'ARNm et la protéine CPEB. Cette régulation se fait en 3'UTR de l'ARNm mais cela est il le seul niveau de régulation ? La région 5'UTR, intervenant dans la traduction dépendante de la coiffe, est-elle également impliquée dans le contrôle traductionnel de la cycline B comme cela a été démontré en réponse à la fécondation chez l'oursin (Salaun *et al.*, 2004) ? Et y a-t-il d'autres protéines dont les synthèses sont indispensables à la progression méiotique ?

L'oursin : traduction et fécondation

L'embryon d'oursin est un modèle remarquable pour l'étude du développement embryonnaire. Les oursins sont des organismes gonochoriques (sexes séparés) qui produisent une grande quantité de gamètes matures toute l'année. Les œufs sont gros (100 µM de diamètre) et translucides, ce qui facilite les manipulations de microinjection et de microscopie. Ces embryons, utilisés comme

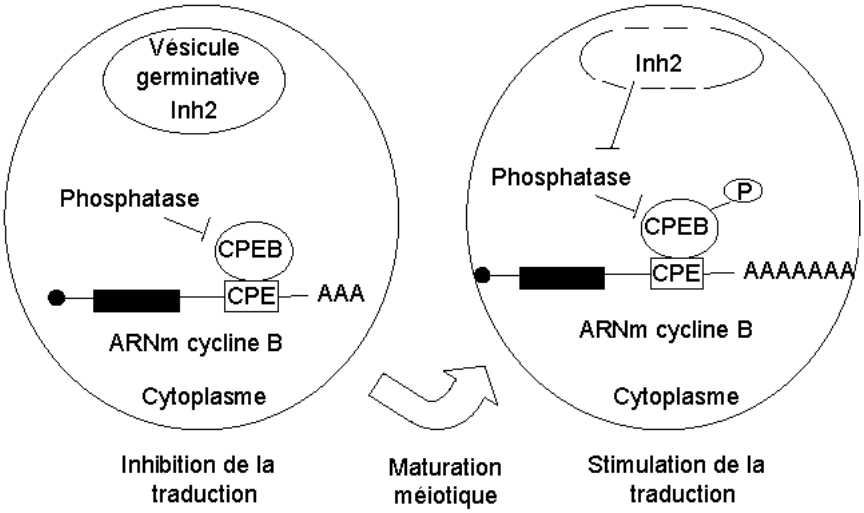


FIG. 3. – *La traduction de la cycline B lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer.*

Dans les ovocytes arrêtés en prophase de méiose I, la phosphorylation de CPEB est inhibée par une phosphatase cytoplasmique, la synthèse de cycline B est inhibée. La 1-methyladénine provoque la progression méiotique et la rupture de la vésicule germinative. Cela libère l'inhibiteur 2 (Inh2) dans le cytoplasme, un inhibiteur de phosphatase. CPEB peut alors être phosphorylée pour entraîner la polyadénylation de l'ARNm de la cycline B et activer sa traduction (le cercle noir représente la coiffe en 5'UTR du messager, le rectangle noir correspond à la séquence codante).

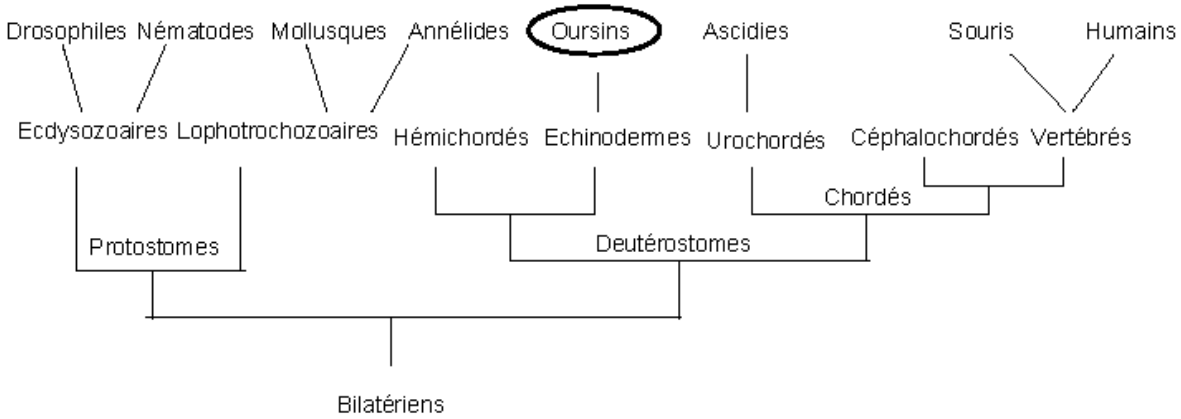


FIG. 4. – *Le génome de l'oursin est très proche de celui des humains.*
L'oursin est le premier Echinoderme séquencé, il appartient aux Deutérostomes tout comme les Vertébrés (d'après Sodergren *et al.*, 2006).

modèle depuis plus d'un siècle, ont permis de définir des principes de bases de la biologie du développement. C'est grâce à l'oursin qu'O. Hertwig a observé pour la première fois en 1875 la fécondation avec l'entrée d'un seul spermatozoïde dans l'ovule. Puis, T. Boveri a montré, à partir de cellules d'oursin, que le développement normal n'est possible que si chaque cellule embryonnaire possède tous les chromosomes. Il a émis l'hypothèse qu'une tumeur cancéreuse commence par une seule cellule dont la répartition des chromosomes ne s'est pas correctement déroulée. Et récemment, Tim Hunt a obtenu le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2001 (avec Paul Nurse et Lee Hartwell) pour la découverte, grâce à l'oursin, de la cycline B, une protéine cruciale dans la régulation du cycle cellulaire.

L'oursin est un invertébré marin appartenant à l'embranchement des Echinodermes. Il occupe une place intéressante dans l'évolution puisque l'embranchement des Echinodermes représente une radiation proche de celle des Vertébrés. Les Echinodermes sont plus apparentés aux êtres humains et aux autres Vertébrés que la drosophile et le nématode, deux organismes dont les génomes ont été séquencés (Fig. 4). Le génome de l'oursin violet, *Strongylocentrotus purpuratus*, vient d'être entièrement séquencé. L'analyse de ce génome a mobilisé 240 chercheurs de 11 pays différents et les résultats ont été présentés dans un numéro spécial de la revue *Science* (Sodergren *et al.*, 2006). Le génome d'oursin qui représente le premier génome d'Echinoderme séquencé révèle une forte similarité avec le génome humain : l'oursin possède 70 % de gènes en commun avec l'homme et de nombreuses voies de signalisation se retrouvent chez les deux organismes.

Ce séquençage va permettre d'obtenir de nouvelles données sur la structure et la fonction de notre propre génome et d'étudier la régulation de l'expression des gènes pour comprendre les mécanismes de fécondation ainsi que les différentes étapes du développement embryonnaire. Deux axes de recherche permettent d'analyser l'expression des gènes chez l'embryon d'oursin : l'ana-

lyse des régulations transcriptionnelles lors du développement embryonnaire tardif et l'analyse des régulations traductionnelles lors du développement embryonnaire précoce.

L'oursin a permis de fournir le premier réseau de régulation des gènes relié au développement animal. Le laboratoire de Eric Davidson en Californie a initié un projet permettant de déterminer expérimentalement les régulations transcriptionnelles responsables de la spécification de territoires embryonnaires tel que l'endomésoderme (Ben-Tabou de-Leon & Davidson, 2007). Chaque gène possède des séquences régulatrices qui définissent où et quand il sera exprimé. Les réseaux de régulation consistent à analyser, de façon spatiale et temporelle, les facteurs de transcription et leur fixation sur des séquences spécifiques d'ADN pour comprendre l'activation ou la répression d'un gène et son rôle au cours du développement.

L'oursin est aussi un modèle unique pour étudier la régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel lors des premières divisions mitotiques embryonnaires et de relier ces régulations au cycle cellulaire. Les femelles pondent jusqu'à 10^8 ovules qui sont physiologiquement arrêtés au stade G1 du cycle cellulaire. La fécondation provoque l'entrée dans le cycle cellulaire. Les premières divisions sont rapides et synchrones chez l'oursin. La fécondation provoque une augmentation de synthèse protéique qui est indispensable à l'entrée dans le cycle cellulaire. Ces processus sont indépendants de la transcription durant les premières divisions. La synthèse protéique est finement régulée, le contrôle s'exerce principalement lors de l'étape d'initiation. Le rôle de ces facteurs d'initiation chez l'oursin a beaucoup été étudié dans les mécanismes de fécondation et de régulation de la traduction dépendante de la coiffe.

L'annotation du génome de l'oursin montre qu'il existe un orthologue pour chaque facteur d'initiation identifié chez les mammifères (Morales *et al.*, 2006). De plus, l'oursin est avantageux puisque beaucoup de gènes codant pour les facteurs de traduction ne sont pas redondants, cela facilite les analyses fonctionnelles. Par exemple, chez l'oursin, il n'existe qu'un gène codant pour 4EBP ou eIF4G alors que l'Homme en possède 3 et 2 respectivement.

Dans les ovules, eIF4E est lié à 4EBP (Cormier *et al.*, 2001). La fécondation induit la dissociation de 4EBP, cette dernière est phosphorylée et dégradée. La rapamycine est un inhibiteur de la kinase FRAP/mTOR, elle est utilisée en thérapie en tant qu'agent immunosuppresseur et antiprolifératif. La rapamycine inhibe la dégradation de 4EBP et la dissociation du complexe eIF4E/4EBP, suggérant une conservation des voies de signalisation dans la régulation de la traduction dépendante de la coiffe au cours de l'évolution. L'inhibiteur limite l'augmentation de synthèse protéique post fécondation, il affecte la synthèse de la cycline B nécessaire à la poursuite du cycle cellulaire et inhibe la première division des embryons d'oursin (Salaun *et al.*, 2004). Ces données permettent de relier la traduction dépendante de la coiffe à la première division mitotique après fécondation (Fig. 5). De plus, la dégradation de 4EBP, démontrée

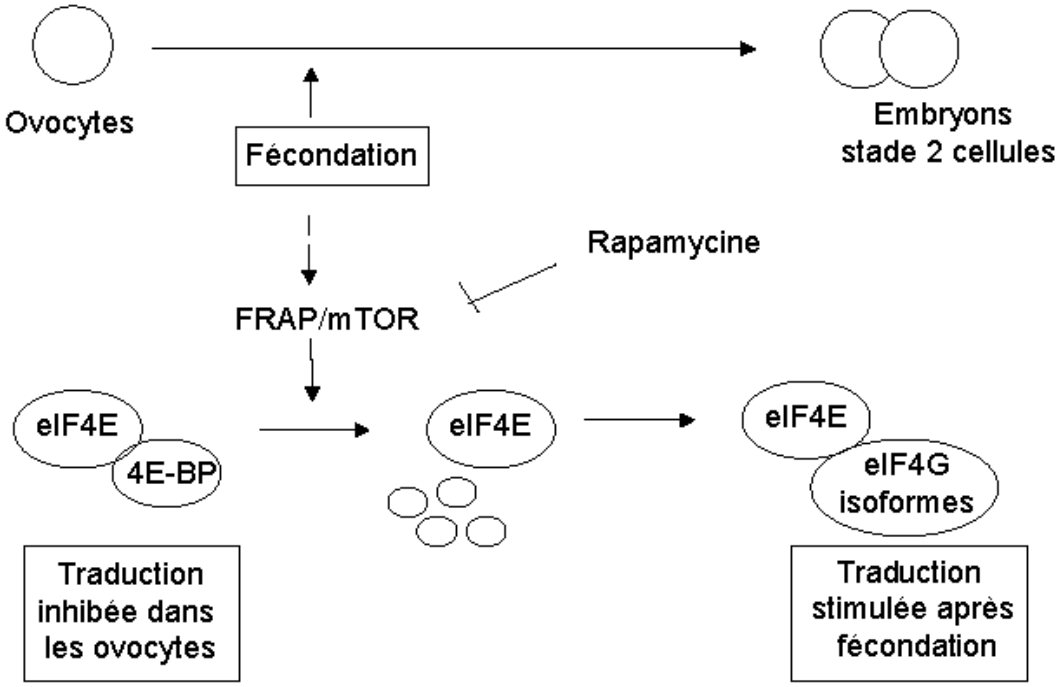


FIG. 5. – *Régulation de l'initiation de la traduction en réponse à la fécondation chez l'oursin.*

Avant fécondation, la protéine eIF4E est liée au répresseur 4E-BP. Après fécondation, 4E-BP est dissociée d'eIF4E et dégradée par un mécanisme dépendant de la kinase FRAP/mTOR sensible à la rapamycine. Par la suite, eIF4G vient se fixer sur eIF4E pour permettre le bon déroulement du cycle cellulaire et de la division mitotique.

pour la première fois chez l'oursin, représente un nouveau moyen de réguler la traduction dépendante de la coiffe. L'oursin est le seul modèle qui permet d'analyser des modifications d'expression de la protéine 4EBP de façon physiologique : 4EBP diminue peu de temps après la fécondation pour permettre la synthèse protéique et le cycle cellulaire mais plus tard au cours du développement, 4EBP réapparaît et se réassocie avec eIF4E (Salaun *et al.*, 2005). De plus, les stress tels que l'hypoxie ou la bléomycine (agent radiomimétique) induisent une surexpression de 4EBP qui pourrait inhiber la traduction dépendante de la coiffe pour favoriser la traduction dépendante des IRES et permettre de synthétiser des ARNm spécifiques (Le Bouffant *et al.*, 2006). L'analyse de ces modifications d'expression chez l'oursin nous permettra de comprendre la régulation et le rôle de 4EBP :

– dans la prolifération cellulaire : l'expression ectopique de 4EBP réverse les phénotypes malins induits par eIF4E, Src ou Ras (Rousseau *et al.*, 1996) ;

– dans la balance apoptose/survie cellulaire : 4EBP est surexprimée dans des lignées cancéreuses mammaires stimulées par la cytokine proapoptotique TRAIL (Clemens, 2004), l'expression ectopique de 4EBP dans des fibroblastes transformés par le facteur antiapoptotique Ras induit l'apoptose (Polunovsky *et al.*, 2000).

Chez l'oursin, la dissociation de eIF4E/4EBP après fécondation permet à eIF4E de recruter d'autres partenaires nécessaires à l'activation de la synthèse protéique. eIF4G est une grosse protéine qui vient se fixer sur eIF4E dans les 10 minutes qui suivent la fécondation (Oulhen *et al.*, 2007). L'oursin a permis de mettre en évidence l'apparition de nombreuses isoformes de eIF4G en moins de 2 minutes après fécondation et la capacité de toutes ces isoformes à lier eIF4E. De plus la rapamycine, qui agit sur la phosphorylation de 4EBP, inhibe la dissociation de eIF4E/4EBP et empêche l'association de eIF4G sur eIF4E mais n'affecte pas l'apparition des isoformes de eIF4G bien que trois sites de phosphorylation sensibles à la rapamycine aient été déterminés sur eIF4G1 de mammifères (Raught *et al.*, 2000). Peu de régulations sont connues sur eIF4G. Le gène eIF4G1, trouvé chez les mammifères, contient trois promoteurs et génère des sites d'épissage alternatif sur chaque ARNm pour former 5 isoformes ayant des activités traductionnelles différentes (Coldwell & Morley, 2006). Chez l'oursin, l'addition d'émétine, un inhibiteur de la traduction, n'inhibe pas l'apparition de ces isoformes eIF4G ; ce qui indique qu'elles résultent d'une modification des protéines déjà présentes avant fécondation et non d'une nouvelle synthèse. Ces isoformes pourraient être responsables d'une nouvelle voie de régulation du facteur eIF4G, voie spécifique du développement embryonnaire.

L'oursin devrait aussi permettre d'identifier de nouveaux acteurs de la traduction dépendante de la coiffe. Par exemple, l'obtention du génome complet a permis de lancer une recherche informatique dans le but de découvrir de nouveaux partenaires de eIF4E ayant le motif consensus de liaison à cette protéine.

L'aplysie : traduction et système nerveux

L'aplysie est un mollusque gastéropode plus connu sous le nom de Lièvre de mer. Au début des années 1950, le chercheur Ladislav Tauc décide de se lancer dans la neurobiologie cellulaire et de se tourner vers l'aplysie, un modèle idéal pour étudier les phénomènes complexes de l'intégration neuronale. Il mit en évidence les principes fondamentaux de la neurobiologie. Ses travaux sur l'aplysie furent suivis par Eric Kandel qui fut récompensé du prix Nobel en 2000.

Le cerveau des hommes ou des mammifères est trop complexe pour étudier les processus d'apprentissage. Kandel avait besoin d'un organisme modèle doté d'un système nerveux peu complexe et capable d'apprendre des choses simples. L'aplysie présente plusieurs avantages de ce point de vue.

– Elle ne possède que 20 000 cellules nerveuses alors qu'un cerveau de mammifères en possède mille milliards, elle est dotée d'un système nerveux très simple qui ne fait intervenir qu'une centaine de cellules dans un comportement donné.

– De plus, ces cellules nerveuses sont géantes, ce sont les plus grandes du règne animal. Elles sont visibles à l'œil nu (1 mm de diamètre). Elles peuvent être facilement isolées et manipulées.

– Et enfin, beaucoup de ces cellules nerveuses sont facilement identifiables au même endroit dans chaque animal de l'espèce.

Les travaux sur l'aplysie *Aplysia californica* ont permis de mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes dans le système nerveux. Ils ont mis en évidence pour la première fois l'utilisation de la traduction IRES dépendante dans le système nerveux en condition physiologique. Les IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) représentent un système alternatif à la traduction dépendante de la coiffe (voir article Saad *et al.,* dans cet ouvrage). Ce sont des séquences particulières en 5'UTR de certains ARNm, elles sont reconnues par des protéines spécifiques qui vont amener la sous unité ribosomique 40S sur l'ARNm concerné, sans passer par le complexe d'initiation relié à la coiffe. Chez l'aplysie, on trouve des cellules neuroendocrines appelées BCN pour Bag Cell Neurons (Wayne *et al.*, 2004). Ces cellules interviennent dans la reproduction en synthétisant et en sécrétant l'hormone responsable de la ponte, ELH (*Egg Laying Hormone*) en réponse à des signaux électriques provenant des ganglions de la tête. L'ELH agit sur l'ovotestis pour stimuler l'ovulation et sur le système nerveux central pour moduler le comportement de ponte (Fig. 6). L'aplysie vit seulement un an et présente une seule saison de reproduction. Les BCN sécrètent alors 1 à 2 µg de l'hormone ELH chaque jour. La synthèse de ELH nécessite un mécanisme spécial permettant de maintenir une forte production de cette hormone. Par Northern Blot, il a été démontré que le niveau d'ARNm d'ELH n'était pas modifié par la stimulation des BCN, il s'agit en fait d'une régulation traductionnelle exercée sur un pool préexistant d'ARNm d'ELH. De manière surprenante, lorsque la

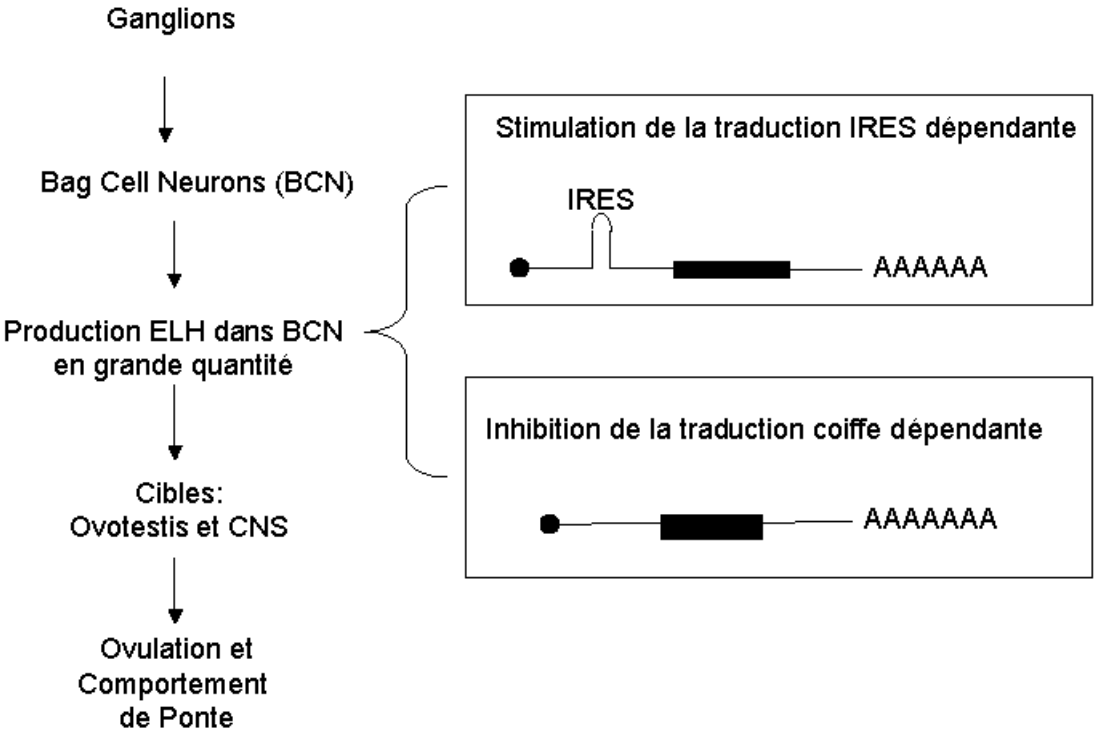


FIG. 6. – *La traduction de l'ELH chez l'aplysie.*

Après stimulation par des ganglions dans la tête, les *Bag Cell Neurons* (BCN) de l'aplysie produisent une grande quantité d'ELH (*Egg Laying Hormone*). Cette hormone est sécrétée par ces BCN et va agir sur l'ovotestis et le CNS (*Central Nervous System*) et provoquer l'ovulation et le comportement de ponte. En période de reproduction, la synthèse protéique globale diminue par inhibition de la traduction coiffe dépendante, mais la synthèse de l'hormone ELH se maintient grâce à une traduction IRES dépendante.

synthèse d'ELH est stimulée, le taux de traduction globale est inhibé. Ces travaux montrent aussi que la stimulation des BCN entraîne la déphosphorylation du facteur eIF4E (Dyer *et al.*, 2003). En injectant une construction bicistronique contenant la région 5'UTR de l'ARNm de l'ELH dans les BCN, permettant de produire un signal fluorescent bleu en présence de traduction dépendante de la coiffe et un signal fluorescent vert en présence de traduction IRES dépendante, Dyer *et al*. ont montré que la région 5'UTR de l'ARNm de l'ELH contenait un IRES. Ce passage à une traduction indépendante de la coiffe se fait au détriment des autres protéines nécessaires à l'organisme pour favoriser la production de l'ELH, l'hormone qui va permettre la transmission du matériel génétique et la survie de l'espèce.

L'aplysie est aussi le modèle de choix utilisé pour décrypter la régulation de l'expression des gènes au cours des processus de facilitation dans le système nerveux. L'aplysie réagit aux stimulations qu'elle juge dangereuses par un réflexe. Lorsque le siphon de l'aplysie est stimulé de façon tactile, elle retire celui-ci ainsi que les ouïes dans la cavité du manteau pour les protéger. La sensibilisation est une forme de crainte apprise, grâce à laquelle une personne ou un animal apprend à répondre de manière intense à un stimulus extérieur. Par exemple, lorsque l'aplysie reçoit un choc sur la queue, elle reconnaît un danger et augmente son réflexe de défense par rapport à d'autres stimulus qui sont normalement anodins (Kandel, 2003). Un choc unique donne naissance à une mémoire qui ne dure que quelques minutes et ne requiert pas de synthèse protéique. Au contraire, une répétition espacée de chocs conduit à une mémoire à long terme qui nécessite une synthèse protéique.

Pour étudier ce phénomène, des expériences ont été réalisées en substituant les chocs sur la queue par des incubations de sérotonine (le neurotransmetteur libéré lors de ces chocs) sur des cultures contenant des synapses entre une cellule sensorielle et un neurone moteur. En effet, une application de 5 minutes de sérotonine sur les synapses est suffisante pour entraîner une phase de facilitation à long terme (de 72 h) qui requiert une synthèse protéique. À partir de synaptosomes (structures artificielles correspondant aux terminaisons nerveuses, obtenues après fractionnement cellulaire d'extraits de tissus nerveux) mis en présence de sérotonine, l'équipe de John Dyer a mis en évidence le rôle de 4EBP dans la régulation de la traduction au niveau des cellules nerveuses (Carroll *et al.*, 2006).

Le clonage puis le séquençage de 4EBP chez l'aplysie ont montré la conservation des sites connus de phosphorylation. À partir d'un anticorps spécifique du 4EBP de l'aplysie, la protéine totale a été détectée aussi bien dans le corps cellulaire (soma) des neurones que dans les terminaisons synaptiques. Cependant, les formes hypo-

phosphorylées de 4EBP se retrouvent préférentiellement au niveau des terminaisons synaptiques. 4EBP aurait donc un rôle différent en fonction de sa localisation dans le soma ou au niveau des synapses. Pour comprendre le rôle de la phosphorylation de 4EBP au niveau des synapses, les synaptosomes ont été mis en présence de sérotonine. Après 10 minutes d'incubation, 4EBP est devenue hyperphosphorylée après activation de la kinase FRAP/mTOR puisque la rapamycine est capable de bloquer cet effet de la sérotonine. Cependant, cette hyperphosphorylation de 4EBP ne se maintient que 35 minutes avant de revenir à un niveau basal. En parallèle, la phosphorylation du facteur eIF4E diminue progressivement pour devenir significativement affectée après 35 minutes d'incubation avec la sérotonine. Cela a permis de mettre en évidence la réponse biphasique des synaptosomes en réponse à la sérotonine : il y a d'abord une activation transitoire de 10 minutes de la traduction dépendante de la coiffe qui résulte de l'hyperphosphorylation de 4EBP puis une phase d'inhibition de la traduction avec une baisse de phosphorylation de 4EBP et de eIF4E au bout de 35 minutes.

L'aplysie nous a montré que dans les cellules nerveuses, 4EBP est associée à eIF4E et de manière intéressante, cette 4EBP endogène liée à eIF4E n'est phosphorylée sur aucun de ses quatre sites potentiels. Par contre, pour dissocier le complexe 4EBP/eIF4E, les quatre sites doivent être phosphorylés sur 4EBP. Un nouveau mécanisme de régulation entre 4EBP et eIF4E a aussi été découvert grâce à l'aplysie. La surexpression de 4EBP diminue la traduction dépendante de la coiffe dans les cellules nerveuses mais augmente la quantité de eIF4E endogène. Cela suggère que le taux de eIF4E dans les neurones est finement régulé et que 4EBP protégerait eIF4E de la dégradation en agissant comme protéine chaperonne.

En parallèle, le rôle de la kinase Mnk a été analysé chez l'aplysie en réponse à la sérotonine (Ross *et al.*, 2006). Mnk est reconnue comme la kinase capable de phosphoryler eIF4E *in vivo* (Pyronnet *et al.*, 1999). Les neurones d'aplysie démontrent pour la première fois un rôle inhibiteur de Mnk dans la traduction dépendante de la coiffe. Mnk est capable de phosphoryler eIF4E dans les neurones de l'aplysie mais l'augmentation de l'expression de Mnk entraîne une baisse de la traduction dépendante de la coiffe. La traduction IRES dépendante est aussi réduite mais de façon moindre, ce qui favorise le rapport traduction IRES/traduction coiffe dépendante. En condition normale, Mnk et eIF4E sont associés à eIF4G. La phosphorylation de eIF4E se déroulerait pendant le processus d'initiation de la traduction. La phosphorylation de eIF4E sur la sérine 209 apporterait une charge négative responsable d'une répulsion électrostatique entre cette protéine et le groupe phosphate de la structure m^7GTP, cela pourrait diminuer l'interaction de eIF4E sur la coiffe suivie d'une augmentation de la synthèse protéique (Scheper & Proud, 2002). Cette phosphorylation serait responsable du relargage des complexes d'initiation, après le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S sur l'ARNm, permettant le recrutement d'un nouveau complexe d'initiation avant même la fin du premier tour. La phosphorylation prématurée de eIF4E pourrait entraîner le relargage des facteurs d'initiation de la traduction avant le recrutement de la sous-unité 40S sur un ARNm donné, inhibant ainsi la traduction. La surexpression de Mnk provoquerait la phosphorylation prématurée de eIF4E et d'autres substrats, qui serait responsable de l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe.

Les études sur ce mollusque marin permettent de déterminer les modifications des facteurs intervenant dans la machinerie de traduction du système nerveux, elles mettent en évidence l'importance de l'activation locale de 4EBP lors des phases tardives de plasticité synaptique. L'aplysie est un modèle idéal pour mieux comprendre les mécanismes régulant la formation de la mémoire à long terme.

PERSPECTIVES

L'étude de la régulation de l'expression des gènes à partir de modèles marins simples à analyser s'avère très enrichissante, non seulement pour comprendre les bases des systèmes de régulation chez les Vertébrés puisque l'on retrouve des voies de signalisation conservées, mais aussi pour découvrir de nouveaux systèmes de régulations originaux grâce à la diversité des organismes marins.

Beaucoup de protéines interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. Des analyses réalisées sur des embryons d'oursin vont permettre de découvrir de nouveaux acteurs qui régulent la synthèse protéique en réponse à la fécondation. Par exemple, la déphosphorylation du facteur eIF2-α, qui intervient dans la régulation de l'initiation de la traduction, participe aussi à l'augmentation de la synthèse protéique post-fécondation (données non publiées). L'oursin permettra ainsi de déterminer les voies de signalisation impliquées dans cette régulation au cours du développement embryonnaire précoce.

De plus, l'initiation n'est pas la seule étape régulatrice de la synthèse protéique. L'étape d'élongation qui correspond à la formation de la chaîne d'acides aminés fait intervenir les eEFs (eukaryotic Elongation Factors). Parmi eux, le facteur eEF1B présente une localisation particulière en fonction des phases du cycle cellulaire lors de la fécondation chez l'oursin (Boulben *et al.*, 2003). D'autres facteurs d'élongation sont régulés dans les embryons d'oursin, c'est le cas de eEF2 qui est déphosphorylé après fécondation et qui pourrait participer à l'augmentation de synthèse protéique (données non publiées). L'oursin représente donc un bon modèle pour comprendre les régulations traductionnelles à plusieurs niveaux au cours du développement embryonnaire.

Les océans abritent près de 15 % des espèces actuellement connues sur le globe. On y trouve une grande diversité d'organismes marins qui représentent d'excellents réservoirs pour y découvrir de nouvelles molécules

d'intérêt pharmacologique. De nombreuses molécules provenant d'organismes marins sont utilisées pour étudier la régulation de l'expression des gènes. Par exemple, l'hippuristanol, un inhibiteur de l'activité ARN hélicase de eIF4A, a été purifié à partir du corail *Isis Hippuris* (Bordeleau *et al.*, 2006). Lorsque des œufs d'oursin sont pré-incubés avec l'hippuristanol avant fécondation, les embryons ne passent pas la première division mitotique. Ces analyses soulignent le lien entre la régulation de la synthèse protéique et le contrôle du cycle cellulaire.

Enfin, les modèles marins constituent des modèles simples à analyser et permettent de faire le lien avec les pathologies humaines. De nouvelles données sont apparues en neurobiologie avec l'analyse de souris knock out n'exprimant pas la protéine 4EBP2. Ces souris démontraient des défauts de fonctionnement concernant la plasticité synaptique à long terme, l'apprentissage et la mémoire (Banko *et al.*, 2005). Ces données démontrent l'importance du contrôle traductionnel au niveau du cerveau. Les analyses à partir de modèles simples comme l'aplysie permettront de comprendre l'importance de ces régulations dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre les maladies humaines affectant le système nerveux.

CONCLUSION

Des dérégulations de la machinerie de traduction sont responsables de maladies chez les humains. Par exemple, une mutation du facteur eIF2B (le facteur d'échange de nucléotide pour eIF2) entraîne la mort des nouveaux-nés, causée par une perte progressive de matière blanche dans le cerveau (Ainsworth, 2005). De plus, de nombreux cancers sont reliés à une surexpression du facteur eIF4E : cancer de l'œsophage (Salehi & Mashayekhi, 2006), cancer du sein (Li *et al.*, 2002). Les différents modèles marins contenant des gènes et des voies de signalisations similaires à ceux des humains permettront de mieux comprendre ces maladies et de mettre au point de nouvelles thérapies. Les protéines eIF4E et 4EBP ont récemment été impliquées dans les mécanismes de survie et d'apoptose : eIF4E est anti-apoptotique, et 4EBP est pro-apoptotique (Holcik & Sonenberg, 2005). La leucémie lymphoïde chronique B-CD5$^+$ est caractérisée par une perte d'apoptose. L'étude des facteurs de traduction eIF4E et 4EBP et de leur interaction permettront de définir des peptides qui pourront être testés en laboratoire pour évaluer leurs effets sur la leucémie lymphoïde chronique (voir article Saad *et al.*, dans cet ouvrage). De plus, l'oursin représente un bon modèle pour étudier l'origine de la cancérisation (voir article Bellé *et al.*, dans cet ouvrage).

Enfin, l'utilisation des modèles marins permettra de définir des réseaux de régulation traductionnelle pour déterminer où et quand des ARNm spécifiques sont recrutés dans les polysomes pour être traduits, ou pour identifier les ARNm recrutés dans les polysomes à un instant donné.

Remerciements. – Les travaux de l'équipe ont été permis grâce aux financements des tutelles (CNRS et Université Pierre et Marie Curie), de l'Association de Recherche sur le Cancer (ARC), de la Ligue contre le Cancer, du Conseil Général du Finistère et de la région Bretagne.

Nous remercions l'ensemble des membres de l'équipe et la Station Biologique de Roscoff.

BIBLIOGRAPHIE

Ainsworth C., Molecular medicine: lost in translation. *Nature*, 2005, *435*, 556-558.

Banko J. L., Poulin F., Hou L., DeMaria C. T., Sonenberg N. & Klann E., The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *J. Neurosci*., 2005, *25*, 9581-9590.

Ben-Tabou de-Leon, S. & Davidson E. H., Gene regulation: gene control network in development. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*., 2007, *36*, 191-212.

Bordeleau M. E., Mori A., Oberer M., Lindqvist L., Chard L. S., Higa T., Belsham G. J., Wagner G., Tanaka J. & Pelletier J., Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat. Chem. Biol*., 2006, *2*, 213-220.

Boulben S., Monnier A., Le Breton M., Morales J., Cormier P., Belle R. & Mulner-Lorillon O., Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase. *Cell Mol. Life Sci*., 2003, *60*, 2178-2188.

Carroll M., Dyer J. & Sossin W. S., Serotonin increases phosphorylation of synaptic 4EBP through TOR, but eukaryotic initiation factor 4E levels do not limit somatic cap-dependent translation in aplysia neurons. *Mol. Cell Biol*., 2006, *26*, 8586-8598.

Clemens M. J., Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*, 2004, *23*, 3180-3188.

Colas P. & Guerrier P., The oocyte metaphase arrest. *Prog. Cell Cycle Res*., 1995, *1*, 299-308.

Coldwell M. J. & Morley S. J., Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol. Cell Biol*., 2006, *26*, 8448-8460.

Cormier P., Pyronnet S., Morales J., Mulner-Lorillon O., Sonenberg N. & Belle R., eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev. Biol*., 2001, *232*, 275-283.

Dyer J. R., Michel S., Lee W., Castellucci V. F., Wayne N. L. & Sossin W. S., An activity-dependent switch to cap-independent translation triggered by eIF4E dephosphorylation. *Nat. Neurosci*., 2003, *6*, 219-220.

Gingras A. C., Gygi S. P., Raught B., Polakiewicz R. D., Abraham R. T., Hoekstra M. F., Aebersold R. & Sonenberg N., Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*. 1999b, *13*, 1422-1437.

Gingras A. C., Raught B. & Sonenberg N., eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem*., 1999a, *68*, 913-963.

Haghighat A., Mader S., Pause A. & Sonenberg N., Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J*., 1995, *14*, 5701-5709.

Hochegger H., Klotzbucher A., Kirk J., Howell M., le Guellec K., Fletcher K., Duncan T., Sohail M. & Hunt T., New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. *Development*, 2001, *128*, 3795-3807.

Holcik M. & Sonenberg N., Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 2005, *6*, 318-327.

Kahvejian A., Svitkin Y. V., Sukarieh R., M'Boutchou M. N. & Sonenberg N., Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts *via* multiple mechanisms. *Genes Dev*., 2005, *19*, 104-113.

Kandel E., La biologie moléculaire de la mémoire: un dialogue entre gènes et synapses. *Medecine Sciences*, 2003, *19*, 625-633.

Lapasset L., Pradet-Balade B., Lozano J. C., Peaucellier G. & Picard A., Nuclear envelope breakdown may deliver an inhibitor of protein phosphatase 1 which triggers cyclin B translation in starfish oocytes. *Dev. Biol*., 2005, *285*, 200-210.

Le Bouffant R., Cormier P., Mulner-Lorillon O. & Belle R., Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J. Cell Biochem*., 2006, *99*, 126-132.

Lee S. J., Stapleton G., Greene J. H. & Hille M. B., Protein kinase C-related kinase 2 phosphorylates the protein synthesis initiation factor eIF4E in starfish oocytes. *Dev. Biol*., 2000, *228*, 166-180.

Li B. D., Gruner J. S., Abreo F., Johnson L. W., Yu H., Nawas S., McDonald J. C. & DeBenedetti A., Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann. Surg*., 2002, *235*, 732-738 ; discussion 738-739.

Mendez R. & Richter J. D., Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., 2001, *2*, 521-529.

Morales J., Mulner-Lorillon O., Cosson B., Morin E., Belle R., Bradham C. A., Beane W. S. & Cormier P., Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol*., 2006, *300*, 293-307.

Oulhen N., Salaun P., Cosson B., Cormier P. & Morales J., After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J. Cell Sci*., 2007, *120*, 425-434.

Polunovsky V. A., Gingras A. C., Sonenberg N., Peterson M., Tan A., Rubins J. B., Manivel J. C. & Bitterman P. B., Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *J. Biol. Chem*., 2000, *275*, 24776-24780.

Proud C. G., Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem. J*., 2007, *403*, 217-234.

Pyronnet S., Imataka H., Gingras A. C., Fukunaga R., Hunter T. & Sonenberg N., Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *Embo J*., 1999, *18*, 270-279.

Raught B., Gingras A. C., Gygi S. P., Imataka H., Morino S., Gradi A., Aebersold R. & Sonenberg N., Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *Embo J*., 2000, *19*, 434-444.

Ross G., Dyer J. R., Castellucci V. F. & Sossin W. S., Mnk is a negative regulator of cap-dependent translation in Aplysia neurons. *J. Neurochem*., 2006, *97*, 79-91.

Rousseau D., Gingras A. C., Pause A. & Sonenberg N., The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene*, 1996, *13*, 2415-2420.

Salaun P., Boulben S., Mulner-Lorillon O., Belle R., Sonenberg N., Morales J. & Cormier P., Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. *J. Cell Sci*., 2005, *118*, 1385-1394.

Salaun P., Le Breton M., Morales J., Belle R., Boulben S., Mulner-Lorillon O. & Cormier P., Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp. Cell Res*., 2004, *296*, 347-357.

Salehi Z. & Mashayekhi F., Expression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and 4E-BP1 in esophageal cancer. *Clin. Biochem*., 2006, *39*, 404-409.

Scheper G. C. & Proud C. G., Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem*., 2002, *269*, 5350-5359.

Sodergren E., Weinstock G. M., Davidson E. H., Camero, R. A., Gibbs R. A., Angerer R. C., Angerer L. M., Arnone M. I., Burgess D. R., Burke R. D., Coffman J. A., Dean M., Elphick M. R., Ettensohn C. A., Foltz K. R., Hamdoun A., Hynes R. O., Klein W. H., Marzluff W., McClay D. R., Morris R. L., Mushegian A., Rast J. P., Smith L. C., Thorndyke M. C., Vacquier V. D., Wessel G. M., Wray G., Zhang L., Elsik C. G., Ermolaeva O., Hlavina W., Hofmann G., Kitts P., Landrum M. J., Mackey A. J., Maglott D., Panopoulou G., Poustka A. J., Pruitt K., Sapojnikov V., Song X., Souvorov A., Solovyev V., Wei Z., Whittaker C. A., Worley K., Durbin K. J., Shen Y., Fedrigo O., Garfield D., Haygood R., Primus A., Satija R., Severson T., Gonzalez-Garay M. L., Jackson A. R., Milosavljevic A., Tong M., Killian C. E., Livingston B. T., Wilt F. H., Adams N., Belle R., Carbonneau S., Cheung R., Cormier P., Cosson B., Croce J., Fernandez-Guerra A., Geneviere A. M., Goel M., Kelkar H., Morales J., Mulner-Lorillon O., Robertson A. J., Goldstone J. V., Cole B., Epel D., Gold B., Hahn M. E., Howard-Ashby M., Scally M., Stegeman J. J., Allgood E. L., Cool J., Judkins K. M., McCafferty S. S., Musante, A. M., Obar, R. A., Rawson, A. P., Rossetti, B. J., Gibbons I. R., Hoffman M. P., Leone A., Istrail S., Materna S. C., Samanta M. P., Stolc V., Tongprasit W. *et al*., The genome of the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. *Science*, 2006, *314*, 941-952.

Von der Haar T., Gross J. D., Wagner G. & McCarthy J. E., The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol*., 2004, *11*, 503-511.

Wayne N. L., Lee W., Michel S., Dyer J. & Sossin W. S., Activity-dependent regulation of neurohormone synthesis and its impact on reproductive behavior in aplysia. *Biol. Reprod*., 2004, *70*, 277-281.

2- L'oursin, modèle pour la traduction et le cycle cellulaire

Les cellules en culture ont été très utilisées pour analyser les régulations du cycle cellulaire et des facteurs de traduction. Cependant, ces cellules doivent être synchronisées en utilisant des drogues qui sont susceptibles d'affecter les mécanismes physiologiques. Les cellules embryonnaires d'oursin possèdent une synchronicité naturelle qui permet d'étudier la traduction et le cycle cellulaire en conditions physiologiques en s'affranchissant de l'usage des drogues. L'oursin représente un atout majeur pour comprendre ces mécanismes.

Les oursins *Sphaerechinus granularis* sont des invertébrés marins Deutérostomiens de l'embranchement des échinodermes. On peut en récolter près de la rade de Brest. Ce sont des organismes gonochoriques (sexes séparés) qui produisent une grande quantité de gamètes matures toute l'année. La maturation méiotique a lieu dans la cavité générale des oursins. Les œufs sont grands (diamètre de 100 µm) et translucides, ce qui facilite les manipulations de microinjection et de microscopie. Les femelles pondent jusqu'à 10^8 ovules qui sont physiologiquement arrêtés au stade G1 du cycle cellulaire.

Les embryons d'oursin ont été utilisés depuis plus d'un siècle pour définir les principes de base de la biologie du développement. De plus, le séquençage récent du génome de l'oursin *Strangylocentrotus purpuratus* a permis de mettre évidence sa position clé dans l'arbre phylogénétique : les échinodermes sont les invertébrés les plus proches de la branche des chordés (Sodergren et al, 2006). Le génome de l'oursin, qui contient 23 300 gènes environ et qui représente le premier génome d'échinodermes obtenu, a mis en évidence plusieurs particularités de l'oursin concernant notamment son système immunitaire inné très sophistiqué et la présence de capacités sensorielles inattendues comme la vision ou l'audition. Cependant, il existe de nombreux points communs avec l'homme puisque 70% des gènes se retrouvent dans les deux espèces et beaucoup de voies de signalisation semblent conservées. Les gènes associés à de nombreuses maladies humaines sont présents chez l'oursin (Sodergren et al, 2006). Enfin, les données obtenues sur le développement embryonnaire de l'oursin et permettant de comprendre les liens entre la synthèse protéique et le cycle cellulaire apportent de nouvelles cibles pour lutter contre le cancer et en particulier contre la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Saad et al, 2007).

2-1-Oursin et Cycle cellulaire

Les ovules d'oursin obtenus lors de la ponte ont fini leur maturation méiotique et sont naturellement bloqués au stade G1 du cycle cellulaire. La fécondation provoque l'entrée dans le cycle en passant par la phase G1 suivie par la phase S puis par les phases G2 et M. On assiste ensuite à une succession de divisions mitotiques rapides (transitions S/M) et synchrones (Parisi et al, 1978).

C'est l'oursin qui a permis la découverte de la cycline et qui a valu en partie le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2001 à Tim Hunt, Paul Nurse et Lee Hartwell. En effet, 3 protéines sont fortement synthétisées après fécondation des embryons d'*Arbacia punctulata*. L'une d'entre elle, ainsi appelée cycline, est cycliquement dégradée (Evans et al, 1983). La cycline est l'un des acteurs clé qui régule la division cellulaire au sein du complexe CDK1/cycline B. Ce complexe phosphoryle beaucoup de substrats : les lamines nucléaires, l'histone H1, des facteurs de transcription et des régulateurs du cytosquelette (Nigg, 1995). Il phosphoryle aussi des facteurs de traduction comme 4E-BP et eEF1B (Heesom et al, 2001 ; Mulner-Lorillon et al, 1989). Il est à noter que ce complexe CDK1/cycline B qui intervient lors de la mitose est maintenu inactif jusqu'en G2/M. Différents modèles ont permis de comprendre sa régulation par phosphorylation de CDK1, par la localisation cellulaire de la cycline B, par dégradation de la cycline B et par association à des protéines inhibitrices (Bassermann et al, 2005).

2-1-1-Régulation de CDK1/cycline B par phosphorylation de CDK1

Deux sites doivent être déphosphorylés sur CDK1 pour permettre au complexe de s'activer : la thréonine 14 et la tyrosine 15 qui se situent dans la poche de liaison à l'ATP (Morgan, 1997) (**Fig 24**). Ces deux résidus sont phosphorylés par deux kinases : Wee1 et Myt1 (Leise et Mueller, 2002) et leur déphosphorylation est catalysée par la phosphatase Cdc25 (Millar et Russel, 1992 ; Boutros et al, 2006; Rudolph, 2007). Le lien entre ces phosphorylations et l'association à la cycline B n'est pas déterminé. Certains résultats indiquent que dans les embryons d'oursin *S. granularis*, CDK1 est phosphorylée sur la tyrosine 15 avant le début de la phase S et cela augmente jusqu'en phase G2. Ces variations dépendent de l'augmentation de synthèse protéique post fécondation et notamment de l'accumulation de cycline B non phosphorylée dans les embryons. La tyrosine est ensuite

déphosphorylée en G2/M lorsque la phosphorylation de la cycline B débute (Meijer et al, 1991). Cela est renforcé par les données obtenues dans les embryons de xénope qui montrent que la liaison de la cycline B sur CDK1 stimule la phosphorylation de CDK1 sur les deux sites (Solomon et al, 1990). D'un autre côté, des données provenant de l'étude de l'oursin *L. pictus*, montrent que la phosphorylation sur la tyrosine 15 de CDK1 est indépendante de la cycline B (Edgecombe et al, 1991).

Pour être activée, CDK1 doit aussi être phosphorylée sur la thréonine 161 par CAK (CDK Activating Kinase) (**Fig 24**). Cette phosphorylation n'est possible que si CDK1 est associée à la cycline B. En effet, la thréonine 161 se situe dans une boucle et ce site n'est accessible à CAK qu'après un changement de conformation induite par la liaison de la cycline B sur CDK1 (Sclafani, 1996). CAK est constituée de 3 protéines : CDK7, Cycline H et MAT1 (Ménage à Trois).

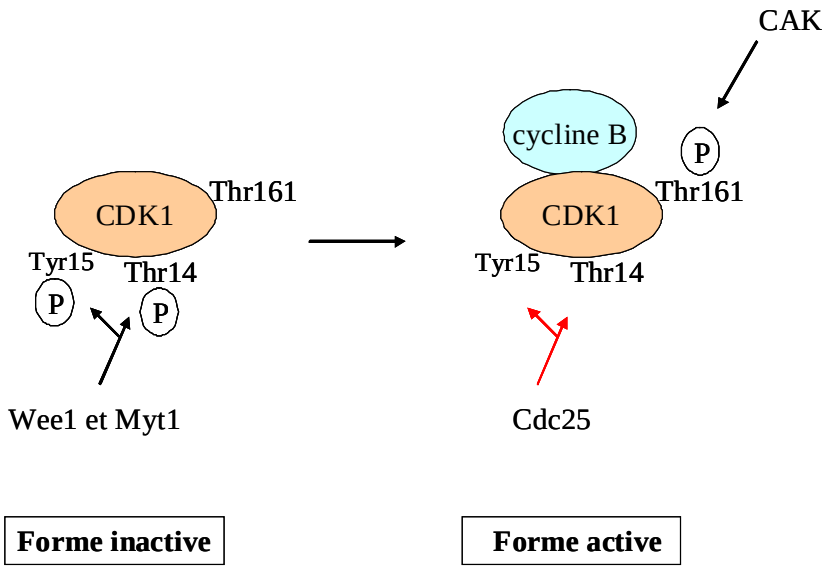


Figure 24 : Régulation de CDK1 par phosphorylation. *Les phosphorylations des thrénonine 14 et tyrosine 15 de CDK1 par Wee1 et Myt1 sont inhibitrices. Pour activer CDK1, ces 2 sites sont déphosphorylés par Cdc25. De plus, après association à la cycline B, la thréonine 161 est phosphorylée par CAK.*

2-1-2-Régulation de CDK1/cycline B par changement de localisation

En interphase, CDK1/ cycline B est localisé dans le cytoplasme, sous forme soluble ou associé aux microtubules et au centrosome (Takizawa et Morgan, 2000). Le complexe passe dans le noyau en phase M. La localisation nucléaire de la cycline B dépend de sa

phosphorylation (Li et al, 1997). La phosphorylation est décrite dans de nombreux types cellulaires, y compris dans les embryons d'oursin (Meijer et al, 1989). Cinq sérines phosphorylées ont été identifiées sur la cycline B1 de xénope : Ser 2, 94, 96, 101 et 113. Les quatre derniers sites sont concentrés dans une région particulière, le CRS (Cytoplasmic Retention Signal), régulant la localisation nucléaire de la cycline B. Le CRS contient en fait une séquence d'export nucléaire (NES : Nuclear Export Signal) qui empêche l'accumulation de la cycline B1 dans le noyau. Elle entre en permanence dans le noyau mais elle est vite ramenée dans le cytoplasme grâce à la protéine d'export CRM1 (Hagting et al, 1998; Yang et al, 1998). La phosphorylation de la cycline B la déplace vers le noyau en diminuant l'affinité pour CRM1 (Li et al, 1997). Il a été montré chez le xénope qu'en dehors de ce rôle, la phosphorylation de la cycline B est nécessaire à l'activation de Cdc25 responsable de la déphosphorylation de CDK1 (Peter et al, 2002). Les kinases responsables de la phosphorylation de la cycline B sont le complexe CDK1/cycline B lui-même (Izumi et Maller, 1991 ; Borgne et al, 1999) et Plk1 (Peter et al, 2002).

2-1-3-Régulation de CDK1/cycline B par dégradation de la cycline B

La dégradation de la cycline B est nécessaire pour sortir de la phase M. La cycline possède un motif « destruction box » qui lui permet d'être ubiquitinée et dégradée par la voie du protéasome (Hershko et al, 1991 ; Hershko et al, 1999). L'ubiquitination nécessite l'intervention de l'APC (Anaphase promoting complex) une ubiquitine ligase activée par CDK1/cycline B en mitose. La sécurine est une protéine impliquée dans le contrôle de la séparation des chromatides sœurs. Tout comme la cycline B, elle s'accumule jusqu'en prophase avant d'être détruite en début d'anaphase par un mécanisme dépendant de l'APC. Des résultats récents sur des ovocytes de souris indiquent qu'il existe une compétition entre la cycline B et la sécurine pour l'APC et que cela régulerait leur dégradation (Marangos et Caroll, 2008).

2-1-4-Régulation de CDK1/cycline B par des inhibiteurs

Un autre niveau de régulation des CDK/cycline est réalisé par l'association de protéines inhibitrices sur le complexe. Ce sont les CDK inhibitors (CKI). Ces protéines se classent en 2 groupes (Besson et al, 2008) :

- Les INK4 ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, and $p19^{INK4d}$) qui se lient à CDK4 et CDK6 en inhibant leur association à la cycline D
- Les Cip/Kip ($p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$, $p57^{Kip2}$) qui se lient à la fois aux cyclines D, E, A et B et à leur CDK

2-1-5-Activité du complexe chez l'oursin

Chez l'oursin, l'ARNm de la cycline B est présent dans les ovaires, les ovules et persiste jusqu'en blastula. La synthèse de cycline B n'est pas indispensable à l'entrée en méiose mais elle est nécessaire à la progression méiotique (Voronina et al, 2003). Dans les ovules, la protéine est présente en faible quantité et peut s'associer à CDK1 (Moreau et al, 1998). Sa synthèse augmente fortement après fécondation et cela est indispensable à l'activité du complexe CDK1/cycline B (Meijer et al, 1989 ; Meijer et al, 1991; Voronina et al, 2003). Chez *S. granularis*, l'activité du complexe augmente légèrement après la fusion des pronuclei mâle et femelle 30 minutes après fécondation puis baisse avant de remonter fortement pour donner un pic à 60 minutes (Geneviève-Garrigues et al, 1995).

2-2-Oursin et Synthèse protéique

L'oursin est aussi un excellent modèle pour étudier les régulations traductionnelles. L'oursin permet de relier la synthèse protéique au cycle cellulaire et de découvrir de nouveaux mécanismes de régulation.

2-2-1- La synthèse protéique après fécondation chez l'oursin

Le taux de synthèse protéique est très bas dans les ovules et augmente rapidement après fécondation. Cette augmentation dépend des ARNm déjà présents dans le cytoplasme des ovules puisqu'elle est insensible à l'actinomycine D, un inhibiteur de transcription, (Gross et Cousineau, 1964) ou à l'énucléation (Denny et Tyler, 1964). La synthèse protéique augmente de 5 à 15 fois dans les 20 minutes qui suivent la fécondation. (Epel, 1967).

2-2-2- Lien entre synthèse protéique et cycle cellulaire chez l'oursin

Les divisions embryonnaires précoces de l'oursin, en réponse à la fécondation, représentent un modèle puissant pour étudier les liens entre traduction et cycle cellulaire. En effet, dans ce système, la synthèse protéique doit reprendre après fécondation pour entrer dans

le cycle cellulaire. Cela a été montré par Wagenaar en 1983 : lorsque la synthèse protéique est inhibée par la puromycine (Hultin, 1961) ou l'émétine (Wagenaar, 1983), le cycle cellulaire s'arrête. La division est complètement bloquée lorsque l'émétine est ajoutée dans les 40 minutes après fécondation (Arion et Meijer, 1989). De nouvelles protéines doivent être synthétisées au début de chaque cycle pour permettre la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire et probablement pour l'alignement des chromosomes en métaphase. De plus, le temps nécessaire à la première division mitotique est corrélé au niveau de synthèse protéique (Dubé, 1988). Cette dernière, réduite à 35% de sa valeur normale, permet toujours un déroulement normal du cycle cellulaire mais avec un retard important et des embryons traités avec des concentrations croissantes d'émétine présentent un retard de division mitotique de plus en plus important.

2-2-3- L'initiation de la traduction chez l'oursin *S. granularis*

L'analyse du génome montre qu'il existe chez l'oursin *S. purpuratus*, un orthologue de chaque facteur de traduction par rapport aux mammifères. Concernant l'initiation, on trouve notamment 3 gènes pour eIF4E (eIF4E-1, eIF4E-2, eIF4E-3), les formes eIF4E1-b, eIF4E-2b sont absentes. Il existe un gène pour eIF4G et un pour 4E-BP (Morales et al, 2006). Le fait de ne pas avoir de multiples isoformes pour chaque facteur facilite l'étude de leur fonction et de leur régulation.

Ces facteurs d'initiation sont étudiés chez l'oursin *S. granularis*. La protéine 4E-BP, inhibitrice de la traduction, est présente dans les ovules et elle est associée à eIF4E. La fécondation entraîne la phosphorylation de 4E-BP et sa dissociation d'eIF4E (Cormier et al, 2001). De plus, 4E-BP est dégradée après fécondation. Chez l'oursin, une autre protéine est reconnue par les anticorps dirigés contre le 4E-BP2 humain, il s'agit de h4E-BP (heavy 4E-BP), protéine qui se comporte comme 4E-BP en réponse à la fécondation chez l'oursin (Salaun et al, 2005). Leur dégradation ainsi que leur dissociation d'eIF4E sont sensibles à la rapamycine, suggérant l'implication de la voie FRAP/mTOR dans ces processi. La dégradation de 4E-BP, identifiée pour la première fois chez l'oursin, représente un nouveau mode de régulation de la traduction dépendante de la coiffe.

La rapamycine retarde la synthèse de cycline B ainsi que la première division mitotique. Cela met en évidence l'importance de l'initiation de la traduction dépendante de la

coiffe dans le cycle cellulaire chez l'oursin (Salaun et al, 2003). En revanche, la traduction de la cycline B au cours de la maturation méiotique de l'étoile de mer passe par un mécanisme dépendant de CPEB (Lapasset et al, 2005). Chez l'oursin, la wortmannine, inhibiteur de PI3K, affecte aussi l'initiation en retardant partiellement la dégradation de 4E-BP et la dissociation de eIF4E/4E-BP. Contrairement à la rapamycine, la wortmannine a un effet drastique sur le cycle cellulaire, non seulement elle retarde la synthèse de cycline B mais elle perturbe également la déphosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1. Ainsi, la PI3K se retrouve impliquée en amont de deux voies de signalisation conduisant à la régulation de la synthèse protéique et du cycle cellulaire (Salaun et al, 2004). L'injection d'un peptide 4E-BP1 humain, correspondant au site d'interaction avec eIF4E, dans les ovules d'oursins retarde la première division cellulaire (Salaun et al, 2005). Cela démontre l'importance de la libération d'eIF4E par 4E-BP après fécondation pour permettre la division cellulaire.

L'oursin représente un modèle excellent pour identifier les régulations affectant l'expression de 4E-BP. En effet, après leur dégradation rapide, les protéines 4E-BP et h4E-BP réapparaissent vers 8 heures après fécondation et permettent une régulation fine de l'initiation de la traduction au cours du développement embryonnaire de l'oursin (Salaun et al, 2005). La quantité de protéine 4E-BP varie également en cas de stress comme l'hypoxie ou en réponse à des agents endommageant l'ADN : la bléomycine (Le Bouffant et al, 2006), le chrome III (Le Bouffant et al, 2008a) et le MMS (methyl methane sulfonate) (Le Bouffant et al, 2008b).

Le facteur eIF2α est aussi présent dans les ovules d'oursin. Sa quantité ne change pas mais la protéine est déphosphorylée en réponse à la fécondation. Cette protéine est rephosphorylée en présence de MMS (Le Bouffant et al, 2008b).

2-2-4-L'élongation de la traduction chez l'oursin

Chaque facteur a été retrouvé après analyse du génome de l'oursin *S. purpuratus* : eEF1A, eEF1B α, eEF1B γ, eEF1B δ et eEF2 (Morales et al, 2006).

Les embryons d'oursin *S. granularis* ont d'abord permis de découvrir une régulation de eEF1Bδ au cours du développement. En effet, deux ARNm d'eEF1Bδ, qui varient par polyadénylation alternative en 3'UTR, sont exprimés différemment au cours du développement embryonnaire de l'oursin (Delalande et al, 1998). *S. granularis* a aussi permis

de mettre en évidence, pour la première fois, l'existence de deux isoformes d'eEF1Bδ (δ1 et δ2) codées par deux ARNm différents qui résulteraient d'un épissage alternatif. Ces deux formes seraient présentes chez beaucoup de Métazoaires (Boulben et al, 2003 ; Le Sourd et al, 2006a). Des expériences d'immunoprécipitation montrent qu'il existe deux types de complexes eEF1B dans les œufs d'oursin:

- 60% de dimères [eEF1Bδ1, eEF1Bγ, eEF1Bα] [eEF1Bδ2, eEF1Bγ, eEF1Bα]
- 40% de dimères [eEF1Bδ1, eEF1Bγ, eEF1Bα] [eEF1Bδ1, eEF1Bγ, eEF1Bα]

Un anticorps reconnaissant les deux isoformes eEF1Bδ indiquent que ce facteur est localisé dans le cytoplasme de manière homogène en interphase puis se concentre autour du noyau en phase M et autour des asters (Boulben et al, 2003). eEF1Bγ se comporte de la même façon (Le Sourd et al, 2006b).

eEF1B peut être régulé par phosphorylation. Une analyse bidimensionnelle suivie par une coloration spécifique des protéines phosphorylées puis identification par spectrométrie de masse indique que le facteur eEF1Bα est phosphorylée après fécondation chez *S. purpuratus* (Roux et al, 2008). En effet, contrairement à beaucoup d'espèces, le site de phosphorylation par CDK1 ne se retrouve pas sur eEF1Bγ mais sur eEF1Bα chez *S.purpuratus* (Le Sourd et al, 2006a). Cette analyse a permis de montrer qu'en fonction des espèces chez les Métazoaires, le site pour CDK1 est présent soit sur eEF1Bγ soit sur eEF1Bα. eEF1B contient aussi des sites de phosphorylation par CK2 : il est présent sur eEF1Bα et les deux eEF1Bδ (Le Sourd et al, 2006a).

Le complexe eEF1B est régulé dans les embryons d'oursin. L'élongation fait des pauses à chaque mitose, en corrélation avec les pics d'activation de CDK1/cycline B (Monnier et al, 2001b). La phosphorylation d'eEF1B par CDK1/cycline B réduit la synthèse des protéines riches en acides aminés valine au profit de la synthèse des autres protéines (Monnier et al, 2001a).

3-Fécondation et activation artificielle des ovules d'oursin

3-1- La fécondation

La fécondation est le processus lors duquel un gamète mâle fusionne avec un gamète femelle pour donner une cellule unique, le zygote. La fécondation entraîne une série

d'événements nécessaires à l'activation des œufs et au développement embryonnaire (Epel, 1990). L'oursin a joué un rôle central dans la détermination de ces mécanismes d'activation (Epel, 1978 ; Whitaker et Steinhardt, 1982).

Les spermatozoïdes sont attirés vers les ovules par chimiotactisme et reconnaissent spécifiquement les ovules de la même espèce. Le contact spermatozoïde/ovule induit la réaction acrosomique qui se caractérise par l'exocytose des granules corticaux à l'extrémité apicale du spermatozoïde et permet de libérer les enzymes nécessaires à la fusion avec l'ovule. Le spermatozoïde apporte la part génétique du mâle ainsi qu'un centrosome et induit l'activation de l'ovule (Parrington et al, 2007). Le mode d'action du spermatozoïde pour activer un ovule est encore inconnu mais plusieurs hypothèses existent (Parrington et al, 2007) :

- la bombe calcique. Le spermatozoïde servirait de conduit en ouvrant ses canaux calciques pour laisser passer le calcium depuis le milieu extérieur vers l'ovule lors de la fusion. Cependant, l'injection directe de calcium dans les ovules d'oursins n'est pas suffisante pour induire un relargage des stocks intracellulaires de calcium.

- le facteur soluble. Un facteur provenant du sperme est relâché dans l'ovule lors de la fusion. Cette hypothèse se base sur les études faites chez les mammifères avec la découverte de la PLCζ spécifique du sperme. De plus, chez l'oursin, des extraits de spermatozoïdes injectés dans les ovules sont capables d'induire une levée de membrane de fécondation.

- le récepteur membranaire. Le spermatozoïde servirait de ligand en se fixant sur un récepteur de l'ovule pour induire les voies de signalisation.

L'activation des ovules peut être séparée en deux étapes. On distingue les phénomènes précoces qui se déroulent dans les 60 premières secondes (Epel, 1978) et qui se traduisent par une augmentation du potentiel membranaire et une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium, une exocytose corticale, une activation de l'enzyme NAD kinase, une alcalinisation cellulaire (sortie de H^+ couplée à une entrée de Na^+) et une augmentation de la respiration. Les phénomènes tardifs débutent 5 minutes après fécondation : on assiste à une augmentation de la conductance membranaire au potassium, une activation des systèmes de transport (acides aminés), une augmentation de la synthèse protéique et une synthèse d'ADN.

L'augmentation du calcium cytoplasmique et l'augmentation du pH sont les processi décisifs à la poursuite des événements d'activation.

3-1-1-La vague calcique induite par la fécondation

Le calcium est un élément important pendant tout le développement embryonnaire (Whitaker et Smith, 2008). Il intervient au moins dans deux mécanismes lors de l'activation des ovules. L'interaction du spermatozoïde avec un ovule se traduit d'abord par une dépolarisation membranaire qui entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage dépendant et produit une augmentation du calcium le long de la membrane plasmique, c'est le flash cortical. Cette dépolarisation est à la fois nécessaire pour empêcher la polyspermie de façon transitoire et pour faciliter la fusion du spermatozoïde avec l'ovule (Whitaker, 2006). Cependant, le rôle de ce calcium dans l'activation des ovules n'est pas encore déterminé, sachant que l'inhibition de cette étape n'affecte pas la suite des événements et que les ovules d'oursins peuvent être activés en l'absence de calcium extracellulaire (Townley et al, 2006). Un deuxième mécanisme, débutant lors de la repolarisation membranaire et inhibant la polyspermie de façon permanente consiste en la levée de la membrane de fécondation qui sert de barrière physique pour empêcher les spermatozoïdes de pénétrer dans l'ovule (Jaffe et Cross, 1986). Chez l'oursin, on trouve environ 15 000 granules corticaux situés juste sous la membrane plasmique de chaque ovule et l'ensemble est entouré d'une membrane vitelline (Wong et Wessel, 2006). Les granules corticaux contiennent à la fois des protéases et des protéines de structure. L'activation des ovules induit l'exocytose de ces granules corticaux et libère leur contenu à travers la membrane plasmique, créant un espace entre les membranes plasmique et vitelline et consolidant la membrane vitelline en une nouvelle structure : la membrane de fécondation (Wong et Wessel, 2006). Ces mécanismes sont dépendants d'une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium, une vague calcique, qui affecte des protéines comme la synaptogamine, rab3 et la rabphilin-3A intervenant dans l'exocytose des granules corticaux (Wong et Wessel, 2006 ; Horner et Wolfner, 2008).

La fécondation induit ainsi une vague de calcium dans l'ovule d'oursin. Elle débute au point de fusion du spermatozoïde puis se propage à travers l'ovule en une vingtaine de secondes (Whitaker, 2006). Contrairement aux mammifères, aux nématodes et aux ascidies qui présentent des oscillations de calcium, il y a une seule vague de calcium chez les oursins,

les amphibiens et les poissons (Parrington et al, 2007). La voie la plus étudiée pour comprendre les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique est celle de la phospholipase Cγ (PLCγ). L'interaction entre le spermatozoïde et l'ovule entraîne l'activation de SFK (Src Family Kinase) qui elle-même stimule la PLCγ par phosphorylation (**Fig 25**). Au niveau de la membrane plasmique, la PLCγ clive le PIP2 (Phosphatidyl Inositol 4,5 biphosphate) en IP3 (Inositol 1'4'5 triphosphate) et DAG (Diacylglycerol). L'IP3 va aller se fixer sur son récepteur IP3R présent à la surface du réticulum endoplasmique pour relarguer son contenu de calcium dans le cytoplasme (Townley et al, 2006 ; Whitaker, 2006). Ce relargage est stimulé par un mécanisme d'auto amplification correspondant au CICR (Calcium Induced Calcium Release) permettant de transférer la signalisation de récepteur en récépteur. Cela fait intervenir les récepteurs à la ryanodine (Whitaker, 2006).

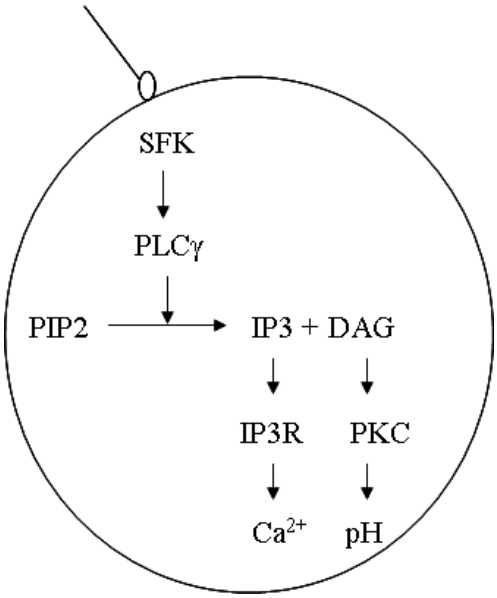


Figure 25 : Voies de signalisation induites après fécondation des ovules d'oursin. *La fusion du spermatozoïde avec l'ovule active la kinase SFK qui elle-même va stimuler la PLCγ. Cette phospholipase clive le PIP2 en IP3 et en DAG. L'IP3 va se fixer sur son récepteur IP3R présent à la surface du reticulum endoplasmique pour induire la libération de calcium dans le cytoplasme. Le DAG va activer la PKC pour stimuler l'échange* Na^+/H^+ *au niveau de la membrane plasmique et modifier le pH intracellulaire*

La voie de la PLCγ est la mieux étudiée mais l'injection de messagers secondaires comme NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) ou la voie NO (nitric oxide)/ cGMP (cyclic Guanosine MonoPhosphate) /cADPR (cyclic ADP Ribose) entraîne aussi un relargage de calcium. Leur rôle n'est cependant pas bien déterminé car ils ne sont pas indispensable dans l'augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique (Townley et al, 2006) :

- Le NAADP qui est synthétisé dans le spermatozoïde serait transmis à l'ovule lors de la fusion des gamètes pour induire les flux calciques (Churchill et al, 2003). Cependant, l'inhibition du NAADP n'affecte pas la vague calcique mais empêche le flash cortical. (Townley et al, 2006). De plus, la cible du NAADP ne semble pas être le réticulum endoplasmique mais plutôt les lysosomes (Whitaker, 2006).

- La voie NO/cGMP/cADPR permet de réguler l'activité des récepteurs à ryanodine. NO stimule la production de cGMP qui lui-même va activer la production de cADRP. Ce dernier stimule les récepteurs à ryanodine pour permettre le relargage de calcium. Cette voie est active lors de la fécondation chez l'oursin mais l'augmentation de la quantité de NO ne se déroule qu'après la vague calcique et dépend même de cette vague (Leckie et al, 2003). L'augmentation de NO résulterait de l'activation de la PKC (Protéine Kinase C), elle-même stimulée par le DAG (Parrington et al, 2007). Cette voie NO/cGMP/cADPR est aussi sensible aux variations de pH et agirait seulement sur la durée de la vague calcique plutôt que sur son induction.

Ainsi, l'augmentation de calcium se déroule en deux phases après fécondation chez l'oursin : il y a d'abord une augmentation de calcium au niveau de la membrane plasmique qui dépend du NAADP puis la propagation de la vague avec libération du calcium des stocks intracellulaires qui fait intervenir la PLCγ et la voie NO/cGMP/cADPR. Ce sont aussi dans les embryons d'oursins que les courants calciques de la mitose ont été enregistrés pour la première fois. En effet, la concentration calcique de calcium augmente avant la rupture de l'enveloppe nucléaire puis avant la transition métaphase/anaphase. D'autres petites variations calciques sont enregistrées par la suite et participeraient à la cytokinèse (Whitaker et Larman, 2001). L'oursin est un excellent modèle pour analyser les courants calciques contrairement aux cellules de mammifères où les enregistrements de ces courants sont difficiles.

3-1-2-Voies de signalisation induites par le calcium

Le calcium stimule des voies de signalisation qui permettent de poursuivre l'activation des ovules et qui vont agir sur la progression dans le cycle cellulaire. La calmoduline est une protéine ubiquitaire capable de fixer le calcium, cette association entraîne un changement de conformation qui va permettre de stimuler plusieurs enzymes cellulaires. Chez l'oursin *Lytechinus pictus*, la calmoduline s'active lorsque que la concentration cytoplasmique de calcium augmente, c'est-à-dire avant la rupture de l'enveloppe nucléaire et lors de la transition métaphase-anaphase. L'inhibition de la calmoduline à différents instants de développement empêche les embryons de passer ces deux étapes. De plus, la calmoduline activée se localise au niveau des microtubules du fuseau lors de la division. Cette localisation suggère que la calmoduline active agit sur certaines cibles au niveau du fuseau. Ces résultats démontrent l'importance du calcium et de la calmoduline lors de la division cellulaire (Torok et al, 1998).

L'un des substrats régulés par le complexe calcium/calmoduline est la Calcium/ Calmodulin dependent protein kinase. Cette protéine est aussi nécessaire après fécondation pour la rupture de l'enveloppe nucléaire chez l'oursin (Baitinger et al, 1990). En effet, l'injection d'un peptide inhibiteur de l'activité de cette kinase ou l'injection d'anticorps dirigés contre elle retarde la rupture de l'enveloppe nucléaire chez *L. pictus*.

Une autre protéine sensible à l'augmentation du calcium est la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Dans les ovules d'oursin, les kinases MEK et MAPK sont phosphorylées et actives (Carroll et al, 2000 ; Kumano et al, 2001). MEK est la kinase responsable de la phosphorylation de la MAPK puisque l'incubation des ovules avec un inhibiteur de MEK induit la déphosphorylation de MAPK. Cet inhibiteur induit également l'entrée des œufs non fécondés dans le cycle cellulaire (Carroll et al, 2000 ; Zhang et al, 2006). Carroll et ses collaborateurs montrent que la fécondation entraîne la déphosphorylation de la MAPK (Carroll et al, 2000), résultant à la fois d'une inactivation de MEK et de l'activation d'une MAPK Phosphatase (MKP) (Kumano et al, 2001). De plus, l'utilisation de BAPTA, un chélateur de calcium, empêche la déphosphorylation de la MAPK post fécondation et inhibe la synthèse d'ADN. Ces résultats suggèrent que la MAPK active agit comme frein dans les ovules, son inactivation contrôlée par un mécanisme dépendant du calcium permet d'initier la réplication de l'ADN.

3-1-3-Augmentation du pH intracellulaire

La fécondation provoque une augmentation du pH intracellulaire de 0,4 unités chez *S. purpuratus* et *L. pictus* (Johnson et Epel, 1981) Cette variation qui se maintient lors des premières divisions cellulaires (Johnson et Epel, 1981) découle d'une sortie de H^+ du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, couplée à une entrée de Na^+. Cet échange Na^+/H^+ est sensible à l'amiloride, un diurétique qui inhibe les transports passifs de Na^+ mais pas la pompe Na^+/K^+ ATPase (Johnson et Epel, 1976). La variation de pH intracellulaire dépend du pH extracellulaire. Par exemple, en dessous d'un pH extracellulaire de 6.5, l'efflux acide est inhibé.

Il semble que cette augmentation de pH se fasse en deux phases. La phase précoce se déroule dans la première minute qui suit la fécondation, elle correspond à 20% du relargage total de H^+. Elle est indépendante du Na^+ extérieur et insensible à l'amiloride. La phase plus tardive nécessite du Na^+ extracellulaire, elle est inhibée par l'amiloride.

La PKC (Protéine Kinase C), stimulée par le DAG, est l'un des acteurs impliqués dans l'augmentation du pH après fécondation (**Fig 25**). En effet, l'injection d'un peptide inhibiteur de PKC dans les ovules de *L. pictus* réduit considérablement les variations de pH post fécondation (Shen et Buck, 1990) alors que l'incubation d'ovules avec des activateurs de PKC tels que les phorbols esters stimulent l'échange de Na^+/H^+ (Swann et Whitaker, 1985). L'activité de la PKC augmente en quelques minutes après fécondation. Cette activation qui se déplace du cytoplasme vers la membrane plasmique, est sensible à la concentration cytoplasmique de calcium (De Barry et al, 1997).

3-2- Activation artificielle des ovules par modifications du calcium cytoplasmique ou du pH intracellulaire

3-2-1-Modifications de la concentration cytoplasmique de calcium par le calcium ionophore

Il est possible d'activer les ovules sans fécondation en augmentant simplement la concentration cytoplasmique de calcium intracellulaire grâce au calcium ionophore. L'effet du calcium ionophore a d'abord été analysé chez l'oursin *L. pictus* (Steinhardt et Epel, 1974). Il

provoque le relargage des granules corticaux ainsi que la levée de la membrane de fécondation, un changement de conductance membranaire, une augmentation de la respiration, une augmentation de synthèse protéique et une synthèse d'ADN

Le taux de synthèse protéique est aussi fort dans les ovules activés par du calcium ionophore 5µM que dans les ovules fécondés chez *L. pictus*. Cependant, cette synthèse induite par le calcium ionophore chute au bout d'une centaine de minutes (Epel et al, 1974).

L'activation par le calcium ionophore est indépendante des ions présents dans le milieu extérieur, suggérant l'origine intracellulaire du calcium relâché lors de l'activation (Steinhardt et Epel, 1974). Le calcium ionophore entraîne aussi des modifications de pH similaires à celles provoquées par la fécondation (Whitaker et Steinhardt, 1981). Enfin, il agit sur la MAPK. L'activation des ovules par le calcium ionophore entraîne la déphosphorylation de la MAPK et celle-ci est inhibée par le BAPTA (Carroll et al, 2000).

3-2-2-Modifications du pH intracellulaire par le NH4Cl

Il est possible de provoquer une augmentation de pH artificiellement dans les ovules, en l'absence de fécondation, par incubation avec du chlorure d'ammonium (NH4Cl). Cela se fait par un mécanisme insensible à l'amiloride et ne faisant donc pas intervenir l'échangeur Na^+/H^+ (Johnson et Epel, 1976). A pH8, le NH4Cl 10mM induit la condensation des chromosomes et la conductance membranaire au potassium. Par contre, il n'y a pas d'exocytose corticale, d'augmentation de respiration, d'influx de Na^+ ni de stimulation du transport d'acides aminés. Cela indique également que tous les différents événements induits par la fécondation peuvent apparaître séparément après activation et qu'ils sont donc stimulés indépendamment les uns des autres.

Cette activation des ovules par le NH4Cl induit une augmentation de synthèse protéique qui peut atteindre 60 à 80% du taux de synthèse correspondant à des ovules fécondés chez *L. pictus* (Brandis et Raff, 1978 ; Epel et al, 1974). Cette augmentation est aussi plus lente que dans les ovules fécondés (Grainger et al, 1979). La synthèse protéique est maximale après activation par du NH4Cl 10mM pH8 ou du NH4Cl 2mM pH9 (Epel et al, 1974). Il faut noter que pour augmenter la synthèse protéique, le NH4Cl semble stimuler en parallèle d'autres voies indépendantes du pH (Dube et Epel, 1986). Le NH4Cl 10mM pH8.1 provoque rapidement un influx transitoire de calcium à partir du calcium extérieur mais n'agit

pas sur les stocks intracellulaires de calcium d'après les données obtenues sur l'oursin *L. pictus*. Cet influx n'est pas nécessaire à l'activation des ovules par le NH4Cl puisque l'absence de calcium extracellulaire conduit toujours à une condensation des chromosomes (Zucker et al, 1978). Un autre petit influx plus tardif de calcium après activation par le NH4Cl a aussi été mis en évidence chez *S. granularis* mais celui-ci n'affecte pas le taux de synthèse protéique (Dubé et Guerrier, 1983). Enfin, il est décrit que le NH4Cl agit sur le démasquage des ARNm, ce qui augmente leur disponibilité, induit la polyadénylation des ARNm pour stimuler la synthèse protéique dans les ovules activés mais n'affecte pas l'efficacité de la traduction en ce qui concerne le mouvement des ribosomes sur les ARNm (Brandis et Raff, 1979).

3-2-3-Effet du calcium ionophore et du NH4Cl sur la synthèse protéique

Le calcium et le pH n'ont pas le même effet sur la synthèse protéique. L'augmentation de calcium cytoplasmique induite par le calcium ionophore dans des ovules incubés en eau de mer sans Na^+ (et donc incapables de modifier leur pHi) n'est pas suffisante pour stimuler la synthèse protéique. En revanche, une augmentation de pHi induite par le NH4Cl en l'absence de calcium extracellulaire stimule partiellement la synthèse protéique (Winkler et al, 1980). L'ajout de calcium extracellulaire permet un influx de calcium dans les ovules activés au NH4Cl, cet influx accroît légèrement la synthèse protéique par rapport à des ovules activés en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, même si cela est insuffisant pour entraîner l'exocytose des granules corticaux. Ces résultats sont confirmés par ceux de Dubé et Guerrier qui montrent aussi que cet influx de calcium après activation par le NH4Cl 10mM pH8 a un effet minimal sur la stimulation de la synthèse protéique (Dubé et Guerrier, 1983). Enfin, pour atteindre un taux de synthèse protéique similaire à celui de la fécondation, les ovules doivent être activés à la fois par le NH4Cl et le calcium ionophore (Winkler et al, 1980).

Ainsi, ces résultats montrent l'importance des variations de pH intracellulaire dans la stimulation de la synthèse protéique. Il faut noter cependant que ces modifications de pH ne représentent que l'une des voies qui participe à la synthèse protéique post fécondation puisque des embryons dans lesquels les variations de pH sont inhibées par l'amiloride atteignent un taux de traduction correspondant à 50% du taux obtenu dans les embryons non traités (Rees et al, 1995). Cela indique l'existence d'événements indépendants de l'augmentation du pH après fécondation.

3-2-4- Effet du calcium ionophore et du NH4Cl sur le cycle cellulaire

Les ovules activés artificiellement ne se divisent pas. Ils stimulent la synthèse de cycline B mais celle-ci ne cycle pas après traitement par 10µM calcium ionophore ou par 10mM NH4Cl (Evans et al, 1983).

Le calcium ionophore 5µM ainsi que le NH4Cl 10mM pH8 sont incapables de stimuler l'activité H1 kinase dans les ovules de *S. granularis* (Meijer et Pondaven, 1988). Un traitement des ovules de *L. pictus* au NH4Cl 15mM pH9 induit une phosphorylation progressive de la tyrosine 15 de CDK1 suivie de sa déphosphorylation, donnant un profil similaire à ce qui se passe après fécondation (Edgecombe et al, 1991). Cependant, il est probable que la synthèse protéique soit très faible dans ces conditions d'après les résultats de Epel et de ses collaborateurs indiquant une synthèse protéique maximale à 2mM en utilisant le NH4Cl à pH9 (Epel et al, 1974).

Résultats

I) Analyse du facteur eIF4G en réponse à la fécondation

Article 1 : Oulhen N, Salaun P, Cosson B, Cormier P, Morales J (2007). After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. J Cell Sci. 120:425-34.

Dans ce premier article, nous avons caractérisé le facteur eIF4G chez l'oursin *S. granularis* (SgIF4G). SgIF4E est présent dans les ovules et il est associé à l'inhibiteur de la traduction Sg4E-BP. La fécondation induit la dissociation du complexe SgIF4E/Sg4E-BP et la dégradation de Sg4E-BP par une voie sensible à la rapamycine. Pour permettre la synthèse protéique, eIF4G doit s'associer à eIF4E chez les mammifères. Dans l'article 1, nous avons mis en évidence l'existence de modifications post-traductionnelles de SgIF4G et l'association de ce facteur à SgIF4E. Nous démontrons aussi l'importance de ce complexe et de la traduction dépendante de la coiffe dans la première division mitotique.

Résultats :

Le facteur eIF4G a été cloné chez l'oursin *S. granularis* (SgIF4G). L'analyse de la séquence montre que SgIF4G contient le site consensus d'interaction à eIF4E. Une protéine de fusion GST-SgIF4G a été produite, elle est capable d'interagir *in vitro* avec une protéine de fusion GST-mIF4E (mouse IF4E).

La protéine de fusion GST-SgIF4G a également été utilisée pour produire un anticorps spécifique. De manière intéressante, plusieurs isoformes de SgIF4G existent dans les ovules et sont modifiées après fécondation. Ces modifications sont post-traductionnelles puisqu'elles sont insensibles à l'émétine, un inhibiteur de la traduction. L'identification de ces isoformes représente un challenge important dans la compréhension des mécanismes de régulation traductionnelle au cours du développement embryonnaire.

Ces isoformes de SgIF4G s'associent à SgIF4E rapidement après fécondation, en corrélation avec une baisse de complexe SgIF4E/Sg4E-BP. La rapamycine inhibe la formation du complexe SgIF4G/SgIF4E mais n'affecte pas l'apparition des multiples isoformes de SgIF4G.

La microinjection d'un peptide inhibant l'association SgIF4G/SgIF4E ou la microinjection d'un analogue de la coiffe, le m^7GDP, retarde la première division mitotique. Cela démontre l'importance de la traduction dépendante de la coiffe pour le déroulement de la première division mitotique suivant la fécondation chez l'oursin.

Ces résultats présentent la première caractérisation du facteur eIF4G chez l'oursin et démontre l'importance de la traduction dépendante de la coiffe dans la progression du cycle cellulaire.

Bilan :

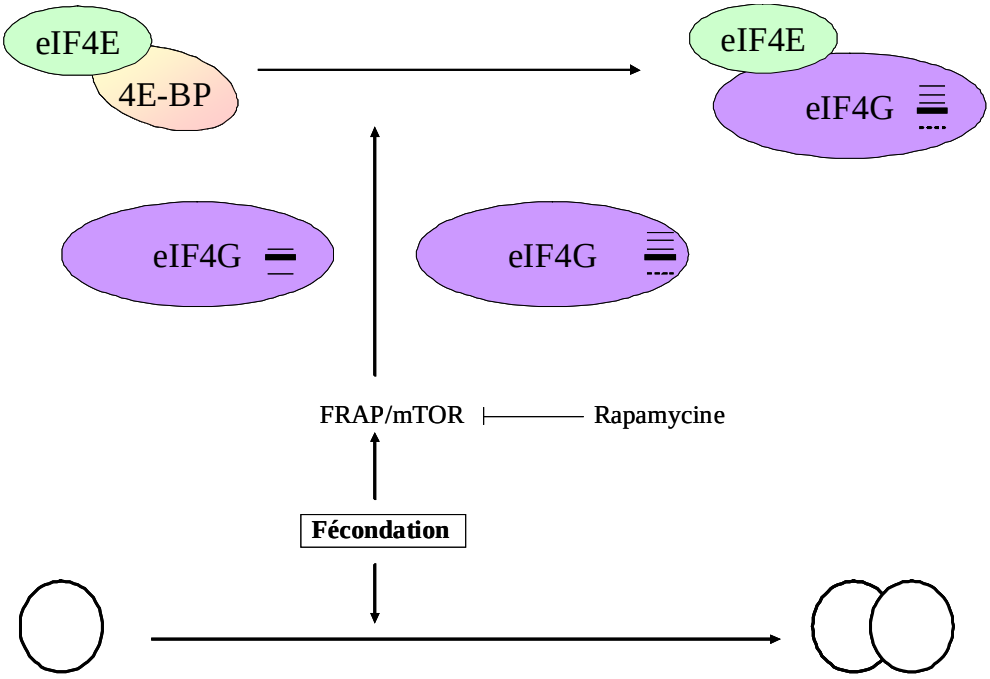


Figure 26 : Régulation de la traduction dépendante de la coiffe en réponse à la fécondation chez l'oursin. *Avant fécondation des ovules, 4E-BP est lié à eIF4E. Après fécondation, l'inhibiteur 4E-BP se dissocie et est dégradé par un mécanisme dépendant de FRAP/mTOR sensible à la rapamycine. La fécondation provoque aussi la modification du facteur eIF4G ainsi que son association à eIF4E pour permettre le bon déroulement du cycle cellulaire. Les isoformes d'eIF4G sont symbolisées par des traits noirs au sein de la protéine, la bande la plus intense représentant le signal majoritaire à 175 kDa. Les formes hautes apparaissent de manière indépendante de la voie FRAP/mTOR.*

After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E

Nathalie Oulhen*, Patrick Salaün*,‡, Bertrand Cosson, Patrick Cormier§ and Julia Morales

Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR 7150, Equipe Cycle Cellulaire et Développement and CNRS, UMR 7150, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff CEDEX, France

*These authors contributed equally to this work
‡Present address: UMR6061, CNRS, Campus Villejean, avenue du professeur Léon Bernard, 35043 Rennes CEDEX, France
§Author for correspondence (e-mail: cormier@sb-roscoff.fr)

Accepted 14 November 2006
Journal of Cell Science 120, 425-434 Published by The Company of Biologists 2007
doi:10.1242/jcs.03339

Summary

Release of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) from its translational repressor eIF4E-binding protein (4E-BP) is a crucial event for the first mitotic division following fertilization of sea urchin eggs. Finding partners of eIF4E following fertilization is crucial to understand how eIF4E functions during this physiological process. The isolation and characterization of cDNA encoding *Sphaerechinus granularis* eIF4G (SgIF4G) are reported. mRNA of SgIF4G is present as a single 8.5-kb transcript in unfertilized eggs, suggesting that only one ortholog exists in echinoderms. The longest open reading frame predicts a sequence of 5235 nucleotides encoding a deduced polypeptide of 1745 amino acids with a predicted molecular mass of 192 kDa. Among highly conserved domains, SgIF4G protein possesses motifs that correspond to the poly(A) binding protein and eIF4E protein-binding sites. A specific polyclonal antibody was produced and used to characterize the SgIF4G protein in unfertilized and fertilized eggs by SDS-PAGE and western blotting. Multiple differentially migrating bands representing isoforms of sea urchin eIF4G are present in unfertilized eggs. Fertilization triggers modifications of the SgIF4G isoforms and rapid formation of the SgIF4G-eIF4E complex. Whereas rapamycin inhibits the formation of the SgIF4G-eIF4E complex, modification of these SgIF4G isoforms occurs independently from the rapamycin-sensitive pathway. Microinjection of a peptide corresponding to the eIF4E-binding site derived from the sequence of SgIF4G into unfertilized eggs affects the first mitotic division of sea urchin embryos. Association of SgIF4G with eIF4E is a crucial event for the onset of the first mitotic division following fertilization, suggesting that cap-dependent translation is highly regulated during this process. This hypothesis is strengthened by the evidence that microinjection of the cap analog m^7GDP into unfertilized eggs inhibits the first mitotic division.

Key words: Sea urchin fertilization, eIF4E, eIF4G, 4E-BP, Protein synthesis, Cell cycle, Embryonic early development

Introduction

Unfertilized sea urchin eggs are haploid cells, that are arrested after completion of their meiotic divisions at the G1 stage. Fertilization triggers entry into S phase and completion of the first mitotic division of the embryonic development. The overall rate of protein synthesis is low in unfertilized sea urchin eggs and is stimulated rapidly following fertilization. This dramatic rise in protein synthesis is independent of mRNA transcription and ribosome biogenesis (Epel, 1967; Brandhorst, 1976). De novo protein synthesis is dispensable for progression through the S phase but is required for the onset of the M phase and subsequent embryonic cell cycles (Wagenaar, 1983; Dube, 1988). The unfertilized egg apparently contains all the necessary components for translation (Davidson et al., 1982) but protein synthesis is repressed until fertilization occurs. The exact mechanisms by which translation is increased following fertilization and how those controls contribute to proper development are not yet well understood.

Among the translational machinery components, the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) is a crucial target for regulation of translation initiation (Raught et al., 2000a; Richter and Sonenberg, 2005) and plays an important role in the control of the cell cycle (Cormier et al., 2003; Clemens, 2004; Mamane et al., 2004). In different organisms, eIF4E is also thought to play a role in embryogenesis including gametogenesis (Amiri et al., 2001), fertilization (Cormier et al., 2001) and establishment of embryonic axes (Niessing et al., 2002; Cho et al., 2005). In mammalian cells, the function of eIF4E is to recognize the 7-methyl guanosine triphosphate (m^7GTP) 'cap' at the 5′ terminus of the mRNA, thereby allowing the latter to bind to the 43S complex composed of the ribosomal 40S subunit, eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) and eukaryotic initiation factor 2 (eIF2). For protein synthesis to take place, eIF4E must function in conjunction with a large scaffolding protein, eIF4G, that interacts with several proteins, including eIF4E, eIF4A (an ATP-dependent RNA helicase) and eIF3. eIF4G provides a physical link between the 5′ end of capped mRNA and the ribosome (Morley et al., 1997; Raught et al., 2000a). eIF4G also associates with the poly(A)-binding protein (PABP) to stimulate translation of polyadenylated

Journal of Cell Science

Journal of Cell Science

RNAs, and with the MAP-kinase-interacting kinases Mnk1 and Mnk2, which phosphorylate eIF4E at serine 209 when associated with eIF4G (Gingras et al., 1999; Raught et al., 2000a). In addition to its important function in cap-dependent translation, eIF4G is also required for cap-independent translation initiation of picornavirus RNAs to recruit the 40S ribosomal subunit to mRNA (Lomakin et al., 2000). In this case, eIF4G binds independently of eIF4E to a large secondary structure element within the RNA called the internal ribosome entry site (IRES). Although only one eIF4G ortholog has been found in insects (Hernández et al., 1998), two independent isoforms of eIF4G (eIF4GI and eIF4GII) have been described in humans (Yan et al., 1992; Gradi et al., 1998). The longest possible open reading frame (ORF) of human eIF4GI has been identified only recently and it has been suggested that five isoforms of eIF4GI protein exist in cells, generated by alternative translation initiation (Bradley et al., 2002; Byrd et al., 2002). Little is known about the specific role of these different isoforms in the cell. Recent data indicate a distinctive but complex pattern of cellular localization of different fragments that result from cleavage of eIF4G during apoptosis or viral infection (Coldwell et al., 2004).

eIF4E-binding protein (4E-BP) inhibits cap-dependent translation (Haghighat et al., 1995) by competing with eIF4G for a common site on eIF4E (Mader et al., 1995). Only one 4E-BP ortholog has been described in invertebrates (Bernal and Kimbrell, 2000; Cormier et al., 2001; Miron et al., 2001); whereas three 4E-BP homologs (4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) exist in mammals (Pause et al., 1994; Rousseau et al., 1996; Poulin et al., 1998). In mammals, the phosphorylation state of 4E-BPs regulates their interaction with eIF4E. The underphosphorylated forms of 4E-BPs interact strongly with eIF4E and thereby inhibit cap-dependent translation, whereas the hyperphosphorylated forms do not (Pause et al., 1994). 4E-BP is a downstream effector of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) and Akt/protein kinase B (PKB) (Gingras et al., 1998) and 4E-BP hyperphosphorylation is dependent on FRAP/mTOR (FKBP12 and rapamycin-associated protein/the mammalian target of rapamycin) (Gingras et al., 2001). In sea urchin, rapid 4E-BP degradation following fertilization represents an additional mechanism of 4E-BP regulation that is controlled by a rapamycin-sensitive mTOR pathway (Salaün et al., 2003). Furthermore, the protein 4E-BP provides a molecular link between hypoxia cellular response and prolonged activation of the cell-cycle–DNA-damage checkpoints in sea urchin embryos (Le Bouffant et al., 2006).

Recently, the release of eIF4E from its translational repressor 4E-BP has been shown to be a crucial event for the first mitotic division following fertilization in sea urchin (Salaün et al., 2005). Finding partners of eIF4E following fertilization is thus important to understand how eIF4E functions during early development of sea urchin embryos. Here, we report the isolation and characterization of a full-length cDNA encoding for eIF4G from the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (SgIF4G). We show that several protein isoforms of SgIF4G exist in unfertilized eggs and that these isoforms are modified following fertilization. The protein SgIF4G associates rapidly with eIF4E in response to fertilization and we provide evidence that SgIF4G interaction with eIF4E is functionally important for the completion of the first mitotic division following fertilization, implicating cap-dependent translation in this process. Taken together, our results provide a basis for the future analysis of the role of the cap-dependent translational regulation in early embryonic development.

Results

Isolation and characterization of the cDNA encoding the sea urchin eIF4G

The release of eIF4E from 4E-BP is a major event correlated with the rise in protein synthesis triggered by fertilization of sea urchin eggs. It is then conceivable that eIF4E associates with partners such as eIF4G following fertilization. In order to analyse a potential role of eIF4G after fertilization and during early embryonic development, we decided to isolate and sequence the cDNA encoding for this protein in sea urchin eggs. Full-length *S. granularis eIF4G* (*SgIF4G*) was cloned (see Materials and Methods) and we obtained a final composite cDNA sequence that consisted of 7012 bp (EMBL accession number AJ634049). The first ATG in the 5′ extended sequence, which is located 103 nucleotides from the 5′ end of the cDNA, begins an open reading frame of 5235 nt encoding a deduced polypeptide of 1745 amino acids (Fig. 1) with a predicted molecular mass of 192 kDa. Since three in-frame upstream stop codons exist, at position 25, 52 and 88, in the 5′ untranslated region (5′ UTR), it is very likely that the first ATG in the 5′ UTR is the authentic start codon. The 3′ UTR region of the cDNA consists of 1672 nt and contains a canonical polyadenylation signal at position 6973. The cDNA was terminated with a 30-base poly(A) tail.

When the sequence of the peptide encoded by the ORF (Fig. 1A) was compared with the amino acid sequences of human eIF4GI (accession number NP-937884) and eIF4GII (accession number NP-001409), an overall identity of approximately 26% was found. However, this value increased when the central and the C-terminal regions of SgIF4G were aligned with human eIF4G proteins. The last 1005 amino acids of SgIF4G share 40% identity and 55% similarity with the C-terminal part of human eIF4GI. When compared with C-terminal human eIF4GII, only the last 820 amino acids of SgIF4G share identity (24%) and similarity (43%). The highest homology between SgIF4G and eIF4GI is found in some conserved domains such as MIF4G (the middle domain of eIF4G, a predicted eIF4A- and eIF3-binding domain), MA3 (a domain present in DAP-5, eIF4G and MA-3), and eIF5C (domain at the C-termini of GCD6, eIF-2Bϵ, eIF5 and eIF4G). The N-terminal region of SgIF4G was examined for the presence of eIF4E- and PABP-binding sites (Mader et al., 1995; Gradi et al., 1998). The sea urchin eIF4G contains sequence motifs that have significant similarity to the known eIF4E-binding motif (Fig. 1B) and to the PABP-binding domain previously reported (Fig. 1C).

A complete genome of *Strongylocentrotus pupuratus* (Cameron et al., 2000) is available at the National Human Genome Research Institute of Baylor College of Medicine-Houston, TX. The analysis in silico using the human genome sequencing resource suggested existence of a unique gene encoding for eIF4G in sea urchin (Morales et al., 2006). Indeed, when a 1-kb cDNA within the *eIF4G* coding region obtained by PCR amplification was used to probe a northern blot of polyadenylated RNAs isolated from unfertilized eggs (see Materials and Methods), a unique 8.5-kb transcript (Fig.

Journal of Cell Science

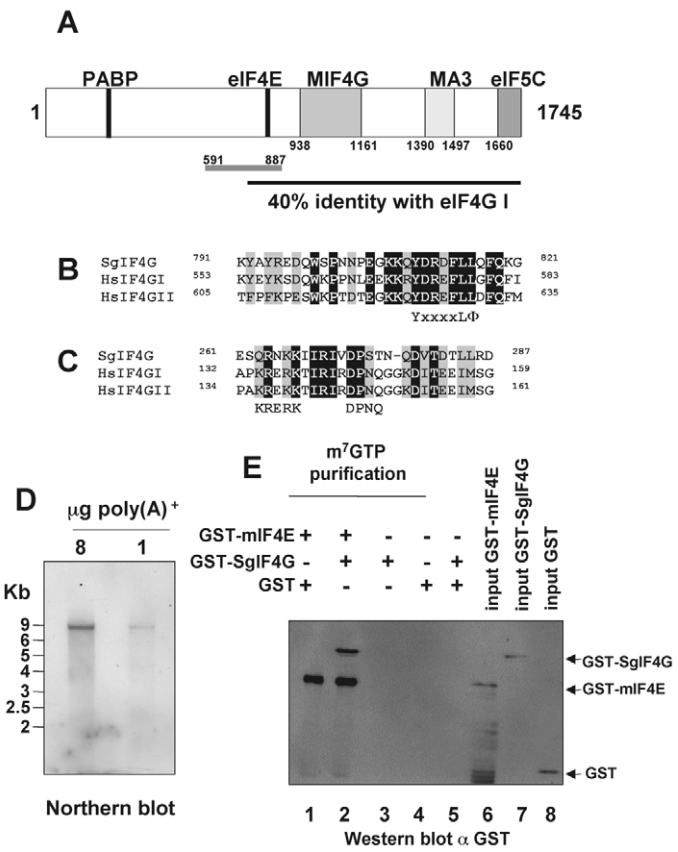


Fig. 1. Characterization of sea urchin eIF4G. (A) Schematic diagram of SgIF4G protein deduced from the cDNA. The SgIF4G conserved domains MIF4G (middle domain of eIF4G: predicted eIF4A- and eIF3-binding domain), MA3 (domain present in DAP-5, eIF4G and MA-3), eIF5C (domain at the C-termini of GCD6, eIF-2B ϵ, eIF5 and eIF4G) and amino acid sequence corresponding to the eIF4E- and PABP-binding sites are indicated. The last 1005 residues of the predicted protein scored 40% with human eIF4GI. The sequence corresponding to the peptide used to generate an SgIF4G-GST fusion protein is indicated by a grey line. Numbers indicate the positions of amino acids in the protein sequence deduced from the cDNA sequence. (B) Protein alignment of the eIF4E-binding domain of sea urchin eIF4G, and human eIF4GI and eIF4GII. Identical and conserved amino acid residues are on black and grey background, respectively. The common eIF4E recognition motif is indicated above (where x is any amino acid and Φ is an aliphatic residue, usually L, M or F). (C) Protein alignment of the PABP-binding region of SgIF4G and human eIF4GI and eIF4GII. Residues suggested to be important for the interaction with PABP in human eIF4GI are indicated above (Imataka and Sonenberg, 1997; Wakiyama et al., 2000). (D) A single ortholog of *SgIF4G* is expressed in unfertilized eggs of sea urchin. Northern blot derived from gel loaded with 1 or 8 μg poly(A+) mRNAs from unfertilized sea urchin eggs was assessed for the presence of *SgIF4G* transcript as described in Materials and Methods. (E) The SgIF4G fusion protein (GST-SgIF4G) interacts with a mouse eIF4E-fusion protein (GST-mIF4E). After incubation, the fusion proteins were affinity-purified using an m^7GTP column (lanes 1-5), analysed by immunoblotting and detected by chemifluorescence using an anti-GST antibody as described in Materials and Methods. Affinity-purified proteins were compared with the GST-fusion proteins loaded separately (lanes 6-8). The positions of the respective GST proteins are indicated with arrows on the right side of the panel.

1D) was detected. These data suggest that a single ortholog of *eIF4G* is expressed in unfertilized sea urchin eggs.

To provide further evidence for the notion that cDNA encodes sea urchin eIF4G, we tested the ability of a sea urchin eIF4G polypeptide to interact with eIF4E. A GST-tagged SgIF4G fusion protein (from residue 591 to residue 887, see Fig. 1A) containing the eIF4E-binding site of the sea urchin eIF4G (GST-tagged SgIF4G) was produced and its ability to associate with a mouse recombinant GST-tagged eIF4E (GST-tagged mIF4E) was analysed (Fig. 1E). As expected, the GST-tagged mIF4E was retained on an m^7GTP-affinity column (cap column) but did not co-purify with a pre-incubated GST protein (lane 1) used as a control. When pre-incubated with the GST-tagged mIF4E, the recombinant GST-tagged SgIF4G was retained on the cap column (lane 2), whereas GST-tagged SgIF4G alone did not (lane 3). Taken together, these data demonstrate that the sea urchin recombinant eIF4G polypeptide interacts and co-purifies on a cap column with a heterologous eIF4E.

Multiple isoforms of eIF4G protein exist in unfertilized and post-fertilized eggs of sea urchin

To analyse native eIF4G protein in sea urchin eggs and embryos, a polyclonal antibody directed against the GST-tagged SgIF4G was produced (see Materials and Methods). Using western analysis, we first checked that the anti-SgIF4G antibody recognized the recombinant GST-tagged SgIF4G protein; pre-immune serum did not yield any signal (data not shown). Using this antibody, we then performed western blot analysis of extracts prepared prior to fertilization (Fig. 2A, lanes 1, 3, 5 and 7) or 30 minutes post-fertilization (Fig. 2A, lanes 2, 4, 6 and 8). Immunoblotting of proteins from unfertilized eggs using the anti-SgIF4G antibody revealed several polypeptides (lane 1): a set of upper bands (approximately four) of higher molecular mass (between 190 kDa and 250 kDa, with a higher doublet corresponding to bands a/b and a lower doublet corresponding to bands c/d), one main band of 150-175 kDa (band e), a lower and weak doublet (bands f/g) and a lower band of 125 kDa (band h). Immunoblotting of proteins from eggs 30 minutes post fertilization revealed a dramatic pattern of modification of the polypeptides (Fig. 2A, lane 2). Whereas band h disappeared and the level of the polypeptide corresponding to band e significantly decreased, a new set of polypeptides of more than 250 kDa (set of bands corresponding to i) appeared. Interestingly, emetine treatment of the eggs did not affect the modifications of the isoforms pattern triggered by fertilization (data not shown), demonstrating that SgIF4G isoforms were targeted by post-translational modifications after fertilization. As a control of the specificity of the different bands recognized by the anti-SgIF4G antibodies used, immunoblotting using the pre-immune serum showed no aspecific-reacting proteins (lanes 3 and 4). Batches of anti-SgIF4G antibody were pre-incubated with 1 μg of purified recombinant GST-SgIF4G or with 1 μg of purified GST protein (Fig. 2A, lanes 5 and 6, or 7 and 8, respectively) and then used for immunoblotting protein extracts. Pre-incubation with purified GST-SgIF4G abolished the antibody reactivity towards the different polypeptides recognized by the anti-SgIF4G antibody (compare lanes 1 and 2 with lanes 5 and 6 of Fig. 2A). Conversely, pre-incubation with the purified GST

protein did not hinder the antibody–antigen reaction (compare lanes 1 and 2 with lanes 7 and 8 of Fig. 2A). Therefore, the anti-SgIF4G antibody specifically and efficiently recognizes different native SgIF4G forms, suggesting that multiple isoforms of eIF4G exist in extracts prepared from eggs prior to or 30 minutes after fertilization of eggs. We then performed a pull-down assay by incubating the GST-tagged mIF4E with total protein extracts prepared prior to or post-fertilization of eggs (Fig. 2B). The multiple isoforms present in unfertilized or post-fertilized eggs interacted with GST-tagged mIF4E.

The multiple isoforms of SgIF4G associate in vivo with eIF4E

To analyse the association between the different isoforms of sea urchin eIF4G and the endogenous eIF4E, proteins in total extracts and proteins purified pre- or post-fertilization of eggs by using m^7GTP columns were analysed by western blotting (Fig. 2C). The multiple isoforms of SgIF4G that were revealed in total extracts co-purified with endogenous eIF4E after m^7GTP-column purification (compare left and right upper panels of Fig. 2C). Interestingly, the level of SgIF4G isoforms that co-purified with eIF4E increased dramatically following fertilization. We then asked whether the different isoforms of SgIF4G could be immunoprecipitated using anti-SgIF4G from extracts prepared pre- or post-fertilization (Fig. 2D). Whereas the multiple isoforms of SgIF4G were efficiently immunoprecipitated by the antibody from extracts prior to and following fertilization of eggs (Fig. 2D, top panel), eIF4E was only co-immunoprecipitated from post-fertilization extracts (Fig. 2D, bottom panel). Taken together these data strongly suggest that the different SgIF4G isoforms can associate with eIF4E but that SgIF4G-eIF4E complex formation increases significantly following fertilization of sea urchin eggs.

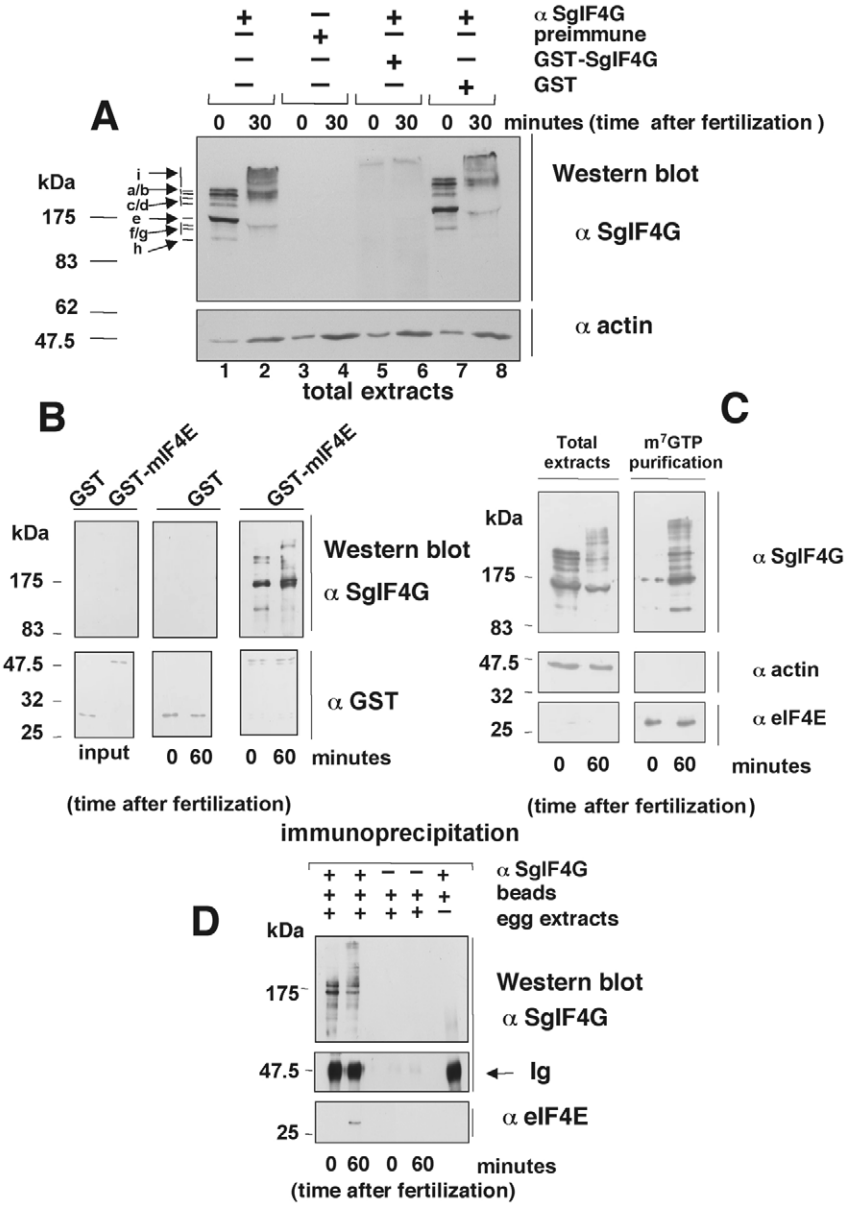


Fig. 2. Sea urchin eIF4G is modified following fertilization and interacts with eIF4E in vivo. (A) Specificity of SgIF4G antibodies. Supernatants obtained from low-level speed centrifugation of egg homogenates were prepared prior to (lanes 1, 3, 5 and 7) or following (lanes 2, 4, 6 and 8) fertilization. Identical amounts of extract proteins (10 μg) were resolved by 7.5% SDS-PAGE and subjected to western blot analyses using anti-SgIF4G antibody (lanes 1 and 2), corresponding pre-immune serum (lanes 3 and 4), anti-SgIF4G antibody pre-incubated with 1 μg recombinant GST-SgIF4G (lanes 5 and 6) or anti-SgIF4G antibody pre-incubated with 1 μg of GST (lanes 7 and 8); anti-actin antibody was used as loading control. (B) The multiple isoforms of SgIF4G associate with the GST-tagged mIF4E. Proteins extracted from unfertilized eggs or eggs 60 minutes post fertilization were incubated with GST alone or GST-tagged mIF4E proteins bound to glutathione-Sepharose beads as described in Materials and Methods. Precipitates were analysed by western blotting using anti-SgIF4G (top panels) and anti-GST (bottom panels) antibodies. Input represents 20% of total protein used for pull-down. (C) SgIF4G co-purifies with sea urchin eIF4E. Total-extract proteins (left panels) or affinity-purified proteins using an m^7GTP column (right panels) prior to or 60 minutes post-fertilization were subjected to western blot analyses using anti-SgIF4G (top panels), anti-actin (middle panels) or anti-eIF4E (bottom) antibodies. (D) Sea urchin eIF4E coimmunoprecipitates with SgIF4G after fertilization. Proteins extracted from unfertilized eggs or eggs 60 minutes post fertilization were immunoprecipitated with SgIF4G, resolved by SDS-PAGE and analysed by western blotting using anti-rabbit eIF4E (lower panel) and anti-SgIF4G antibodies (upper panels). The arrow indicates IgG recognized by secondary antibodies. Protein A Sepharose beads with anti-SgIF4G but without proteins and protein A Sepharose beads with proteins but without anti-SgIF4G were used as controls.

Journal of Cell Science

Fertilization induces rapid modification of SgIF4G isoforms and SgIF4G-eIF4E complex formation

We have shown previously that eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization (Cormier et al., 2001) making eIF4E available for other partners. It is then conceivable that SgIF4G association with eIF4E correlates with eIF4E–4E-BP complex dissociation following sea urchin fertilization. The proteins 4E-BP or SgIF4G bound to eIF4E were analysed after affinity purification of eIF4E on m^7GTP columns using extracts from unfertilized and fertilized eggs collected every 2 minutes following fertilization (Fig. 3A). Resolution of the proteins was performed on a 15% SDS-PAGE to analyse the three different proteins in the same gel. SgIF4G associated with eIF4E approximately 10 minutes after fertilization, concurrent with eIF4E–4E-BP dissociation.

We then analysed the multiple isoforms of SgIF4G following fertilization. Total proteins extracted from eggs prior to and every 2 minutes after fertilization were resolved on 7.5% SDS-PAGE and were analysed by western blot (Fig. 3B). Interestingly, the set of higher-mass polypeptides (set of bands i) appeared and the abundance of the peptide corresponding to band h decreased as quickly as 2 minutes after fertilization. Therefore, these data demonstrate that sea urchin eIF4G modifications occur rapidly after fertilization and that these modifications precede the release of eIF4E from its repressor 4E-BP and consequently also precede the association of SgIF4G with eIF4E.

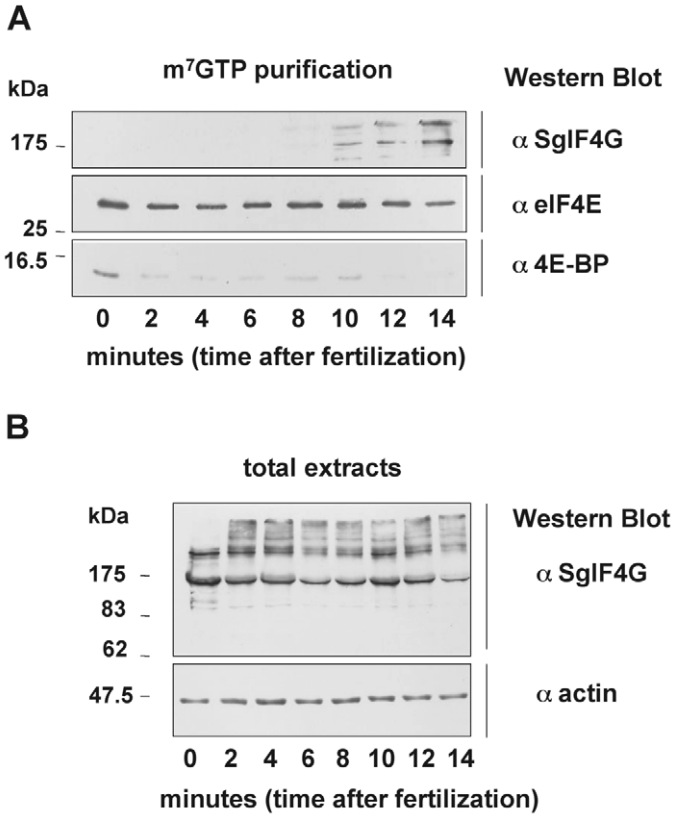


Fig. 3. The increase in the association of SgIF4G and eIF4E following fertilization correlates with the dissociation of eIF4E and 4E-BP, and occurs after modifications of SgIF4G protein. (A) SgIF4G associates with eIF4E when 4E-BP dissociates from eIF4E. m^7GTP-column affinity-purified egg proteins extracted prior to or at the indicated times after fertilization were resolved by 15% SDS-PAGE and subjected to western blotting using anti-4E-BP2 (bottom), anti-eIF4E (middle) and anti-SgIF4G (top) antibodies. (B) SgIF4G modifications occur rapidly following fertilization. Supernatants obtained from low-speed centrifugation of egg homogenates prepared prior to or at the indicated times following fertilization, were resolved by 7.5% SDS-PAGE and subjected to western blotting using anti-SgIF4G (top). Anti-actin was used as loading control (bottom).

Rapamycin inhibits SgIF4G-eIF4E association but does not affect SgIF4G isoform modifications induced by fertilization

We have previously shown that dissociation of eIF4E–4E-BP complex is mediated by a rapamycin-sensitive mTOR pathway induced by fertilization (Salaün et al., 2003). We therefore tested whether rapamycin affects the formation of the SgIF4G-eIF4E complex and the modifications of the SgIF4G isoform (Fig. 4). First, we tested the effect of rapamycin on SgIF4G-eIF4E complex formation (Fig. 4A). Rapamycin prevented formation of the SgIF4G-eIF4E complex in treated embryos; SgIF4G associated with eIF4E in controls (Fig. 4A, top

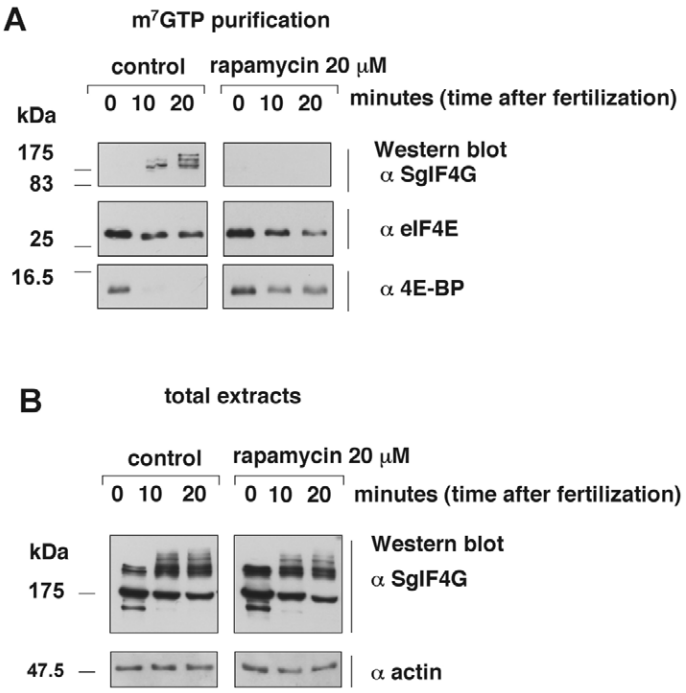


Fig. 4. SgIF4G-eIF4E association following fertilization, but not SgIF4G modification, is sensitive to rapamycin treatment. (A) SgIF4G-eIF4E association is inhibited by rapamycin. Affinity-purified protein (using an m^7GTP column) obtained prior to or at the indicated times after fertilization from untreated (left) or 20 μM rapamycin-treated (right) eggs were subjected to western blot analyses using anti-SgIF4G (top), anti-human 4E-BP2 (bottom) and anti-eIF4E (middle) antibodies. (B) SgIF4G modification is not affected by rapamycin. The total amount of SgIF4G from untreated (left) or rapamycin-treated (20 μM) eggs (right), obtained prior to and at the indicated times after fertilization, was analysed by western blotting using anti-SgIF4G antibody (top). Anti-actin was used as loading control (bottom).

panels). The effect of rapamycin was also evaluated for its ability to enhance association of the eIF4E–4E-BP complex (Fig. 4A, bottom panels). Inhibition of formation of the SgIF4G-eIF4E complex correlates with the maintenance of the eIF4E–4E-BP complex in treated embryos (bottom and right panel); association of SgIF4G-eIF4E complex appeared after eIF4E–4E-BP disruption in control embryos (bottom and left panel). We then tested whether rapamycin alters modifications of the SgIF4G isoform that occur after fertilization (Fig. 4B). Rapamycin was entirely ineffective on SgIF4G isoform modifications induced by fertilization. Taken altogether, these data demonstrate that fertilization triggers rapid SgIF4G isoform modifications independently of a rapamycin-sensitive TOR pathway; this signaling pathway is involved in eIF4E–4E-BP dissociation required for formation of the SgIF4G-eIF4E complex.

An eIF4E-binding-motif peptide of sea urchin eIF4G inhibits formation of the SgIF4G-eIF4E complex and affects the onset of the first mitotic division of sea urchin embryos

Since SgIF4G associates with eIF4E and is rapidly modified following fertilization, it was important to test the effect of the inhibition of SgIF4G-eIF4E complex formation on the onset of the first mitotic division induced by fertilization. We produced a peptide based on the eIF4E-binding motif within the sea urchin eIF4G protein, deduced from cDNA and a scrambled peptide as a control. We first tested the ability of the peptide to alter the association between the recombinant protein GST-mIF4E and the recombinant GST-SgIF4G (Fig. 5A). The two recombinant proteins were incubated with 20 μM or 50 μM of eIF4E-binding peptide (KKQYDRDFLLQFQKGCT), corresponding to the eIF4E-binding sequence of the sea urchin eIF4G or a scrambled peptide (DLCQKQYRFLFKQDTGK). After incubation, GST-SgIF4G was analysed after affinity purification of GST-mIF4E on m^7GTP columns (Fig. 5A). The eIF4E-binding peptide from sea urchin eIF4G inhibited the formation of the SgIF4G-eIF4E complex formation, whereas the scrambled peptide did not affect the association between the two recombinant proteins. We then tested the effects of the peptides microinjected into unfertilized eggs on the first mitotic division following fertilization. Peptides were microinjected at a final concentration of 20 μM. Fertilization per se was not affected by microinjection, because the fertilization membranes were raised normally after microinjection (data not shown). The peptide based on the eIF4E-binding of sea urchin eIF4G microinjected at this concentration delayed the first cleavage significantly compared with the control, whereas the scrambled peptide did not (Fig. 5B). These data suggest that availability of eIF4E for its partner SgIF4G is required for the completion of the first mitotic division of sea urchin eggs following fertilization.

Microinjection of m^7GDP into unfertilized eggs affects the first mitotic division of sea urchin embryos

Since fertilization triggers SgIF4G-eIF4E complex formation, we sought direct evidence of a role of the cap dependent translation in the onset of the first mitotic division of sea urchin embryos. We investigated the effect of the cap analog, m^7GDP (1 mM final concentration), microinjected into eggs on the first mitotic division of sea urchin embryos (Fig. 6). m^7GDP

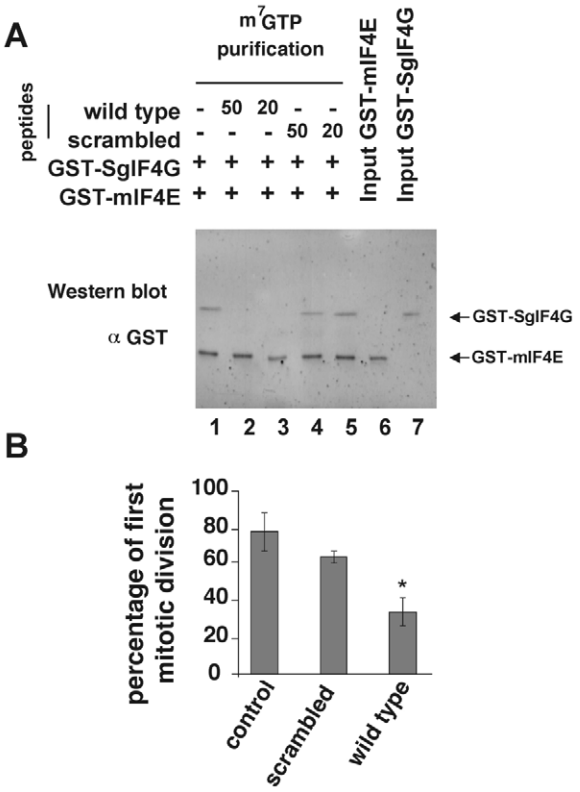


Fig. 5. A peptide based on the eIF4E-binding sequence of sea urchin eIF4G inhibits formation of the SgIF4G-eIF4E complex and affects the first mitotic division of sea urchin embryos. (A) Incubation of a peptide based on the eIF4E-binding site of sea urchin eIF4G with recombinant eIF4E and SgIF4G fusion proteins inhibits their interaction. The fusion proteins, untreated (lane 1) or incubated with the SgIF4G peptide corresponding to the binding site on eIF4E (wild type) used at 50 μM (lane 2) or 20 μM (lane 3) or a scrambled peptide used at 50 μM (lane 4) or 20 μM (lane 5) were affinity-purified using an m^7GTP column and were analysed by immunoblotting as described in Materials and Methods using an anti-GST antibody. Affinity-purified proteins were compared with the GST-fusion proteins loaded separately (lanes 6 and 7). The positions of the respective GST-fusion proteins are indicated by arrows on the right side of the panel. (B) A peptide based on the eIF4E-binding of sea urchin eIF4G affects the first mitotic division of sea urchin embryos. SgIF4G peptide corresponding to the binding site on eIF4E (wild type) or a scrambled peptide was introduced by microinjection at a final intracellular concentration of 20 μM into unfertilized eggs. The control corresponds to non-injected eggs. Cleavage was assessed under a light microscope at 150 minutes after fertilization. An average of 100 unfertilized eggs were injected for each compound in each experiment and error bars represent the standard deviation (± s.d.) of three independent experiments. Significance was assessed using Fisher's *F*-test and Student's *t*-test. *$P<0.005$, significant difference between eggs microinjected with the SgIF4G wild-type peptide, microinjected with the scrambled peptide and non-injected eggs.

administered in this way efficiently inhibits the first cleavage compared with the controls. These data suggest that the cap-dependent translation is implicated in the first mitotic division following fertilization and reinforce our hypothesis that SgIF4G interaction with eIF4E is functionally important for the early development of sea urchin embryos.

Journal of Cell Science

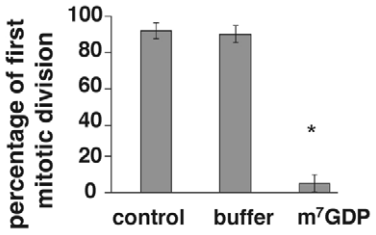


Fig. 6. Microinjection of m^7GDP inhibits the first mitotic division of sea urchin embryos. m^7GDP was introduced by microinjection at a final intracellular concentration of 1 mM into unfertilized eggs. The control corresponds to non-injected eggs and buffer corresponds to eggs injected with the microinjection buffer. Cleavage was scored by observation under a light microscope at 150 minutes post-fertilization. An average of 60 unfertilized eggs were injected for each compound in each experiment, and error bars represent the standard deviation (± s.d.) of three independent experiments. Significance was assessed using Fisher's *F*-test and Student's *t*-test. $*P<0.005$, significant difference between eggs microinjected with m^7GDP, microinjected with buffer and non-injected eggs.

Discussion

In this report we have provided experimental evidence supporting the notion that eIF4G is encoded as a single gene in sea urchins but that multiple protein isoforms of SgIF4G are present in eggs and early embryos. The existence of several isoforms of eIF4G in vivo has been described in mammals (Etchison et al., 1982; Grifo et al., 1983), but the nature of these different polypeptides has long remained unclear. Multiple isoforms of sea urchin eIF4G could be the result of a complex translation strategy involving internal initiation (Gan and Rhoads, 1996; Gan et al., 1998; Johannes and Sarnow, 1998; Byrd et al., 2005), upstream ORF codons, alternative splicing or alternate translation initiation sites (Byrd et al., 2002; Byrd et al., 2005). Since it is known that human *eIF4G* mRNA can direct translation by internal initiation, some of the isoforms present in unfertilized eggs could also arise from this cap-independent translational process and an investigation of *SgIF4G* mRNA will be required to address this question. In mammals, an upstream ORF in the 5′ UTR has been suggested to serve to downregulate cap-dependent initiation of *eIF4GI* translation and the cDNA encoding *Drosophila* eIF4G contains seven short ORFs upstream of the initiator AUG (Hernández et al., 1998). The absence of an upstream ORF in *SgIF4G* mRNA suggests that its translational regulation occurs independently of this mechanism in sea urchin. Since only one mRNA is detected by northern blot analysis, this also rules out the possibility that the different isoforms present in unfertilized eggs arise from alternative splicing or alternative promoter usage. In animals, the optimal consensus sequence for recognition of the AUG start codon is RCCAUGG, where the purine (R) at position –3 is the most conserved and functionally the most important position (Kozak, 2002). The G at position +4 is also conserved and important, especially in the absence of A at position –3 (Kozak, 1997). Therefore, a 'strong' initiation codon is considered to contain the purine at –3, the G at +4 or both. Following the first AUG start codon, the cDNA sequence encoding the first half of the N-terminal part of SgIF4G contains 11 other AUG start codons corresponding to potential functional initiation codons. Consequently, these internal AUG codons could be involved in the production of the multiple isoforms. This hypothesis is supported by two recent studies, which demonstrate that multiple isoforms of human eIF4G are generated by use of alternate translation initiation codons (Bradley et al., 2002; Byrd et al., 2002). Little is known about the function of these different isoforms in the cell. Since eIF4G is a scaffolding protein that interacts with multiple partners, it is then conceivable that production of different eIF4G isoforms can have consequences on mRNA translation.

We found a high level of identity (40%) and similarity (60%) in the C-terminal region (in the last 370 amino acids) between sea urchin eIF4G and human eIF4GI proteins. Since the C-terminal third part of eIF4GI binds to the protein kinase Mnk1 (Pyronnet et al., 1999; Waskiewicz et al., 1999) it is reasonable to assume that SgIF4G associates with a homolog of Mnk1. Indeed, the existence of this kinase in sea urchin eggs is supported by the identification of Mnk1 in the sea urchin genome (our unpublished data). Therefore, we hypothesize that eIF4E phosphorylation occurs following fertilization (Waltz and Lopo, 1987) only when eIF4G brings Mnk1 in the vicinity of eIF4E. We also found that the sequence in the N-terminal region of sea urchin eIF4G contains the PABP recognition site and that this motif is relatively well-conserved with respect to the motifs found formerly in human eIF4GI and eIF4GII. Since PABP is now considered as a canonical initiation factor (Kahvejian et al., 2005), it would be of great interest to analyse the functional interaction between PABP and SgIF4G following sea urchin fertilization and during the embryonic cell cycle.

In agreement with the presence of the eIF4E-binding site and using convergent approaches, we have demonstrated that sea urchin eIF4G associates with eIF4E following fertilization of sea urchin eggs. Our study shows that eIF4G is rapidly involved in this early event of life, because association of SgIF4G with eIF4E increases within minutes following fertilization. Our data show perfect synchronization between the release of eIF4E from its repressor 4E-BP and the formation of the SgIF4G-eIF4E complex. By microinjecting eIF4E-binding peptide derived from SgIF4G into sea urchin eggs, we have also provided evidence that eIF4E availability for SgIF4G association is required for the onset of the first mitosis triggered by fertilization of the eggs. Taken together, these data demonstrate that, dissociation of eIF4E–4E-BP followed by formation of the SgIF4G-eIF4E complex represent important events that correlate with the rise in mRNA translation which occurs after fertilization, and these events are required for the onset of the first mitotic division of sea urchin embryonic development. Furthermore, our experiment showing that m^7GDP microinjected into unfertilized eggs efficiently inhibits the first mitotic division triggered by fertilization reinforces the hypothesis that cap-dependent translation is an important way to regulate gene expression following fertilization. However, we observed that a low level of SgIF4G can be associated with eIF4E in unfertilized eggs (see Fig. 2C), suggesting that low amounts of SgIF4G-eIF4E complex exists before fertilization. This observation is in agreement with the fact that in quiescent or starved HEK 293 cells, a similarly low amount eIF4G protein is recovered after cap-column purification of eIF4E (Raught et al., 2000b). Consequently, it would be interesting to know whether pre-

existing SgIF4G-eIF4E complex is involved in the low translation rate in unfertilized eggs (Epel, 1967).

The most surprising aspect of this work is the discovery that fertilization triggers a dramatic pattern modification of the SgIF4G isoforms due to post-translational processes. These modifications precede the association between eIF4E and SgIF4G (Fig. 3). Moreover, pull-down assays demonstrate that the multiple isoforms of SgIF4G present in unfertilized eggs can associate with eIF4E (Fig. 2B). These data suggest that SgIF4G-eIF4E complex formation occurs independently of the SgIF4G modifications. Therefore the functional significance of the various eIF4G isoforms remains to be elucidated. On the one hand, a new set of SgIF4G polypeptides of high molecular mass appears and, on the other hand, the level of some isoforms decreases following fertilization. Human eIF4Gs are phosphoproteins (Duncan et al., 1987; Morley and Traugh, 1989; Morley and Traugh, 1990; Donaldson et al., 1991; Raught et al., 2000b). In HEK 293 cells, several serum-stimulated phosphorylation sites have been identified by mass spectrometry and mutational analyses, and three phosphorylation sites (serines 1108, 1148 and 1192) of eIF4GI have been shown to be sensitive to rapamycin (Raught et al., 2000b). In sea urchin, rapamycin does not affect the SgIF4G modifications we observed following fertilization. Even if this result does not rule out the possibility that SgIF4G is phosphorylated via the FRAP/mTOR pathway, it demonstrates that this pathway is not involved in the appearance of the high molecular mass eIF4G isoforms. Furthermore, in our hands, treatment of extracts 30 minutes post-fertilization with different type of phosphatases does not affect the pattern of the SgIF4G isoforms (data not shown), suggesting that it is not due to phosphorylation. Rather than the result of protein phosphorylation, the SgIF4G isoforms that appear after fertilization might be the result of other post-translational modifications such as ubiquitylation. Ubiquitylation modification is conceivable because our data demonstrate that a set of SgIF4G isoforms disappears or decreases (Fig. 2A, band h or e, respectively) suggesting that fertilization may promote the instability of these isoforms. Ubiquitylation of SgIF4G has been investigated by western blotting analyses using different commercially available antibodies directed against mammalian ubiquitin but, unfortunately, none of the antibodies crossreacted with the sea urchin proteins (data not shown). As eIF4G plays a central role in the assembly of the pre-initiation complex, such modifications of SgIF4G can have drastic consequences on translation initiation induced by fertilization and during early embryonic development of the sea urchin. An intriguing question is why some SgIF4G isoforms decrease while formation of the SgIF4G-eIF4E complex increases (our results) in correlation with the stimulation of protein synthesis induced by fertilization (Epel, 1967). One possibility is that some isoforms of SgIF4G present in unfertilized eggs participate in the inhibition of the cap-dependent translation in unfertilized eggs. Indeed, distinct eIF4G fragments cleaved proteolytically following picornaviral infection or apoptosis in mammals have been shown to inhibit cap-dependent translation (Lamphear et al., 1995; Ohlmann et al., 1996; Clemens et al., 1998). However, the translation of some cellular mRNAs possessing an IRES is maintained (Henis-Korenblit et al., 2002; Stoneley and Willis, 2004). Thus, it will be of great interest to study whether SgIF4G isoforms are involved in some cap-independent translation at a low rate in unfertilized eggs and whether the removal of these isoforms is required to stimulate protein synthesis triggered by fertilization. Therefore, investigation of the molecular causes, as well as the molecular consequences of the different isoforms of sea urchin eIF4G should provide new insights in how this important player regulates translation during physiological processes such as fertilization and embryonic cell cycle progression.

Materials and Methods

Chemicals

Acetylcholin, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF) and glycine were purchased from Interchim. Sodium orthovanadate, EDTA, β-glycerophosphate, dithiothreitol (DTT), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*′-2-ethanesulfonic acid (HEPES), leupeptin, aprotinin, Tween 20, protamine sulfate, rapamycin, m^7GDP were obtained from Sigma. Alexa Fluor 488-dextran was purchased from Molecular Probes. ECL detection reagents, 7-methyl-GTP Sepharose 4B beads were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. Mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Rabbit anti-guinea pig, goat anti-mouse and swine anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase-coupled) were obtained from Dako SA. Polyclonal antibodies directed against 4E-BP2 (Rousseau et al., 1996) were a generous gift from Nahum Sonenberg (McGill University, Montreal, Quebec, Canada). The amino acid sequence of the peptide corresponding to the sea urchin eIF4G (wild type: KKQYDRDFLLQFQKGCT) and the amino acid sequence of the scrambled peptide (DLCQKQYRFLFKQDTGK) were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). For the generation of the mouse eIF4E recombinant protein (GST-mIF4E), the construct was a generous gift from Simon Morley (University of Sussex, Brighton, UK).

Preparation of gametes and determination of cleavage rates

Sphaerechinus granularis sea urchins collected in the Brest area (France), were kept in running seawater and used within 5 days. Spawning of gametes, in vitro fertilization and culturing of eggs and embryos were performed as described by Marc et al. (Marc et al., 2002). Stock solutions of 20 mM rapamycin was prepared in ethanol and stored at –20°C. A final concentration of 20 μM rapamycin was added to the eggs 10 minutes before fertilization. In microinjection experiments, de-jellied unfertilized eggs were placed and stuck in a line on a dish coated with 1% protamine sulfate. Peptides and m^7GDP were diluted at 2 mM and 100 mM, respectively, in microinjection buffer (10 mM HEPES pH 7.0, 200 mM KCl, 550 mM mannitol) containing 1 mM Alexa Fluor 488-dextran to allow visualization of injected eggs. The microinjection system we used resulted in the injection of approximately 1% of the volume of the egg (De Nadai et al., 1998). Cleavage was scored by observation under a light microscope.

Cloning of *S. granularis* eIF4G

Primers designed from the *Strongylocentrotus purpuratus* EST database (5′-GAT GGG CTT CCA AAC ATT CC-3′ and 5′-GTT AAA CAT CTG AGG AGT CAG C-3′) were used to amplify a 376-bp fragment by PCR using a *S. granularis* cDNA library (Delalande et al., 1998). Further screening of the cDNA library using the PCR fragment as a probe led to the isolation of a partial 3-kb clone. 5′ and 3′ ends were extended by RACE PCR (Smart RACE cDNA amplification kit, Clontech) using primers 5′-GAG GTA CAA GCC ACT GCT GTC ATG CCT C-3′ and 5′-GCC GCT CCT CTG TAT TAA TGG GAA GCT G-3′ to obtain a final 7-kb cDNA, containing a 5235 nt ORF. Sequencing was performed on an Applied biosystem AB3100 automatic sequencer at the Génopole Ouest sequencing facility in Roscoff (France). The EMBL accession number for *S. granularis eIF4G* (*SgIF4G*) cDNA is AJ634049.

RNA preparation and northern blot analysis

Total RNA was purified from embryos by the guanidinium thiocyanate method (Chomczynski and Sacchi, 1987) and poly(A)+ RNAs were isolated using the Oligotex mRNA isolation kit (Quiagen). One and 8 μg of poly(A)+ RNAs were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde. After electrophoresis, RNAs were partially hydrolyzed in 0.05 N NaOH for 20 minutes and transferred to a hybond-N+ nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) in 20×SSC overnight. After transfer, membranes were washed in 5×SSC and UV-crosslinked in a GS gene linker™ UV chamber (Bio-Rad). Blots were prehybridized in a solution containing 5×SSC, 5×Denhardt, 0.1% SDS and 100 μg/ml denatured salmon sperm at 65°C for 1–2 hours. A 1-kb DNA fragment within the *SgIF4G* coding region (nucleotides 1928-3001) was amplified by PCR using primers 5′-CTT CAA CCC TTC CAG AAA GTA AAG ACG G-3′ and 5′-GCC GCT CCT CTG TAT TAA TGG GAA GCT G-3′, and purified twice on GeneElute Agarose™ spin columns (Sigma). The purified PCR product (25 ng) was labeled in the presence of [α-^{32}P]dCTP with Megaprime™ DNA labeling systems

Journal of Cell Science

(Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The prehybridization solution was replaced with fresh solution containing *SgIF4G* cDNA probe, and the filters were incubated overnight at 65°C. Filters were washed at 65°C in 0.1×SSC, 0.1% SDS. Radioactivity on blots was revealed by autoradiography on X-OMAT AR film (Kodak).

GST-recombinant proteins and antibodies directed against SgIF4G protein

A 900-bp fragment within the *SgIF4G*-coding region (amino acids 591-887), containing the eIF4E-binding site, was amplified using primers 5′-CGC GGA TCC GTG CAA CAG TCA ATG CCA G-3′ and 5′-CCG GAA TTC TCT GGA CGA TCT CCT ACC-3′. The fragment was inserted into pGEX-4T-1 vector digested with *Bam*HI and *Eco*RI. The GST and the fused GST-SgIF4G and GST-mIF4E proteins were overexpressed in *E. coli* (strain BL21) and purified on a glutathione Sepharose 4B column according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Polyclonal antibodies against the recombinant GST-SgIF4G protein were obtained in guinea pigs by standard immunization protocol (Eurogentec). The pre-immune and immune sera were kept in aliquots at –20°C.

Analysis of in vitro interaction between SgIF4G and mIF4E

After production and purification, recombinant proteins were dialysed overnight in buffer A (50 mM HEPES pH 7.7, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol). One microgram of GST-mIF4E or GST alone was incubated for 1 hour with m^7GTP-Sepharose beads in buffer A. After washing, the beads were incubated for 1 hour in buffer A containing 1 mg/ml of BSA, 0.5% IGEPAL (Sigma Aldrich) and peptides as indicated. GST-SgIF4G or GST as controls were then added and incubation was prolonged for a further 1 hour. After extensive washing, the beads were boiled in Laemmli buffer and analysed by western blotting using anti-GST antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and a chemifluorescence detection system (ECF, Amersham Pharmacia Biotech).

Preparation of cell lysates

After fertilization, at the times indicated, cells were collected by centrifugation in a Heraeus Labofuge 4000 centrifuge for 2 minutes at 2000 ***g***. The cell pellet was frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Cells were lysed by passage through a 25G syringe in one cell volume of 2× binding buffer (40 mM HEPES pH 7.4, 100 mM sodium fluoride, 10 mM ATP, 20 mM tetrasodium pyrophosphate (PPi), 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM AEBSF, and 20 μg/ml of aprotinin and leupeptin). Cell lysates were centrifuged for 15 minutes at 16,000 ***g*** at 4°C in an Eppendorf centrifuge 5415R and the supernatants were stored at –20°C before use. Protein quantification was performed in duplicate by the Bradford assay.

Isolation of eIF4E and associated proteins

Isolation of eIF4E from egg extracts and its partners was performed using m^7GTP beads as described previously (Salaün et al., 2004). Briefly, extracts were mixed with 25 μl of m^7GTP-Sepharose beads (m^7GTP column). After 60 minutes incubation at 4°C, the columns were washed three times with 1 ml of 1× binding buffer containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was added directly to the beads.

Immunoprecipitation of sea urchin eIF4G

For the affinity purification procedure, 500 μl of supernatant resulting from the 16,000 ***g*** centrifugation were incubated in batches with 2% BSA-presaturated immobilized protein A beads (50 μl packed beads) covalently coupled to eIF4G antibodies, in 1 ml of an IP buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.6, 500 mM NaCl and 1% Nonidet P40) for 2 hours at 4°C. The beads were then washed three times in the IP buffer and twice in 500 mM NaCl and 50 mM Tris–HCl (pH 7.6). After washing, bound proteins were eluted with Laemmli buffer and resolved on a 10% acrylamide gel and analysed by western blot.

Pull-down assay

One microgram of GST-tagged mIF4E or GST alone were mixed and pre-incubated with 25 μl of gluthathione-Sepharose in a final volume of 200 μl of 1× binding buffer for 1 hour at 4°C. The beads were washed three times with 1× binding buffer. Five hundred microliters (2 mg of proteins) of supernatant resulting from the 16,000 ***g*** centrifugation were mixed and incubated end-over-end for 60 minutes at 4°C. Then the samples were washed three times with 1 ml of 1× binding buffer containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was added directly to the beads and the proteins were resolved by SDS-PAGE and analysed by western blotting.

Western blot analyses

Western blot analyses were performed following electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE onto 0.22-μm nitrocellulose membranes (Towbin et al., 1979). 4E-BP was analysed using rabbit polyclonal antibodies directed against human 4E-BP2 (Rousseau et al., 1996). eIF4E was analysed using mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E. Sea urchin eIF4G was analysed using guinea pig polyclonal antibodies directed against SgIF4G.

Membranes were incubated with antibodies directed against 4E-BP2 (1:2000), eIF4E (1:2000), SgIF4G (1:2000) or actin (1:2000) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5% skimmed milk and 0.1% Tween 20 at room temperature. The antigen-antibody complex was measured by chemiluminescence using horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies according to the manufacturer's instructions (ECL; Amersham Pharmacia Biotech). Depending on the experiments, a chemifluorescence detection system (ECF, Amersham Pharmacia Biotech) was used for detection of antibody complexes.

We thank Nahum Sonenberg for the gift of 4E-BP2 antibody. We thank Simon Morley for the gift of the construct encoding the recombinant GST-eIF4E protein. We thank Mark Levingston for helpful comments and for manuscript corrections. We are grateful to the members of the cell cycle and development group for helpful discussions and comments on this manuscript. This work was supported by Association pour la Recherche contre la Cancer (ARC, France; grants 4247 and 3507) to P.C., Ligue Nationale contre le Cancer (Délégations Départementales Finistère, Morbihan, Vendée et Côte d'Armor) to P.C., Conseil Régional de Bretagne and Conseil Général du Finistère.

References

Amiri, A., Keiper, B. D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R. E. and Strome, S. (2001). An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* **128**, 3899-3912.

Bernal, A. and Kimbrell, D. A. (2000). *Drosophila* Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6019-6024.

Bradley, C. A., Padovan, J. C., Thompson, T. L., Benoit, C. A., Chait, B. T. and Rhoads, R. E. (2002). Mass spectrometric analysis of the N terminus of translational initiation factor eIF4G-1 reveals novel isoforms. *J. Biol. Chem.* **277**, 12559-12571.

Brandhorst, B. P. (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **52**, 310-317.

Byrd, M. P., Zamora, M. and Lloyd, R. E. (2002). Generation of multiple isoforms of eukaryotic translation initiation factor 4GI by use of alternate translation initiation codons. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4499-4511.

Byrd, M. P., Zamora, M. and Lloyd, R. E. (2005). Translation of eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) proceeds from multiple mRNAs containing a novel cap-dependent internal ribosome entry site (IRES) that is active during poliovirus infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 18610-18622.

Cameron, R. A., Mahairas, G., Rast, J. P., Martinez, P., Biondi, T. R., Swartzell, S., Wallace, J. C., Poustka, A. J., Livingston, B. T., Wray, G. A. et al. (2000). A sea urchin genome project: sequence scan, virtual map, and additional resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9514-9518.

Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P. and Sonenberg, N. (2005). A new paradigm for translational control: inhibition via 5′-3′ mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* **121**, 411-423.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Clemens, M. J. (2004). Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* **23**, 3180-3188.

Clemens, M. J., Bushell, M. and Morley, S. J. (1998). Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* **17**, 2921-2931.

Coldwell, M. J., Hashemzadeh-Bonehi, L., Hinton, T. M., Morley, S. J. and Pain, V. M. (2004). Expression of fragments of translation initiation factor eIF4GI reveals a nuclear localisation signal within the N-terminal apoptotic cleavage fragment N-FAG. *J. Cell Sci.* **117**, 2545-2555.

Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N. and Bellé, R. (2001). eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev. Biol.* **232**, 275-283.

Cormier, P., Pyronnet, S., Salaün, P., Mulner-Lorillon, O. and Sonenberg, N. (2003). Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* **5**, 469-475.

Davidson, E. H., Hough-Evans, B. R. and Britten, R. J. (1982). Molecular biology of the sea urchin embryo. *Science* **217**, 17-26.

De Nadai, C., Huitorel, P., Chiri, S. and Ciapa, B. (1998). Effect of wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, on the first mitotic divisions of the fertilized sea urchin egg. *J. Cell Sci.* **111**, 2507-2518.

Delalande, C., Monnier, A., Minella, O., Geneviere, A. M., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R. and Cormier, P. (1998). Developmental regulation of elongation factor-1 delta in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae. *Exp. Cell Res.* **242**, 228-234.

Donaldson, R. W., Hagedorn, C. H. and Cohen, S. (1991). Epidermal growth factor or okadaic acid stimulates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4F. *J. Biol. Chem.* **266**, 3162-3166.

Dube, F. (1988). Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. *J. Cell Physiol.* **137**, 545-552.

Duncan, R., Milburn, S. C. and Hershey, J. W. (1987). Regulated phosphorylation and

low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J. Biol. Chem.* **262**, 380-388.

Epel, D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 899-906.

Etchison, D., Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N. and Hershey, J. W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* **257**, 14806-14810.

Gan, W. and Rhoads, R. E. (1996). Internal initiation of translation directed by the 5′-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation. *J. Biol. Chem.* **271**, 623-626.

Gan, W., LaCelle, M. and Rhoads, R. E. (1998). Functional characterization of the internal ribosome entry site of eIF4G mRNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 5006-5012.

Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. and Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 502-513.

Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913-963.

Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* **15**, 807-826.

Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. and Sonenberg, N. (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 334-342.

Grifo, J. A., Tahara, S. M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J. and Merrick, W. C. (1983). New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **258**, 5804-5810.

Haghighat, A., Mader, S., Pause, A. and Sonenberg, N. (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1, competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* **14**, 5701-5709.

Henis-Korenblit, S., Shani, G., Sines, T., Marash, L., Shohat, G. and Kimchi, A. (2002). The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5400-5405.

Hernández, G., del Mar Castellano, M., Agudo, M. and Sierra, J. M. (1998). Isolation and characterization of the cDNA and the gene for eukaryotic translation initiation factor 4G from *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* **253**, 27-35.

Imataka, H. and Sonenberg, N. (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6940-6947.

Johannes, G. and Sarnow, P. (1998). Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *RNA* **4**, 1500-1513.

Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N. and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 104-113.

Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* **16**, 2482-2492.

Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**, 1-34.

Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T. and Rhoads, R. E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* **270**, 21975-21983.

Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Bellé, R. (2006). Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J. Cell. Biochem.* **99**, 126-132.

Lomakin, I. B., Hellen, C. U. and Pestova, T. V. (2000). Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6019-6029.

Mader, S., Lee, H., Pause, A. and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4990-4997.

Mamane, Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L. W. and Sonenberg, N. (2004). eIF4E – from translation to transformation. *Oncogene* **23**, 3172-3179.

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. and Bellé, R. (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 326-331.

Miron, M., Verdu, J., Lachance, P. E., Birnbaum, M. J., Lasko, P. F. and Sonenberg, N. (2001). The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 596-601.

Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Bellé, R., Bradham, C. A., Beane, W. S. and Cormier, P. (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.* **300**, 293-307.

Morley, S. J. and Traugh, J. A. (1989). Phorbol esters stimulate phosphorylation of eukaryotic initiation factors 3, 4B, and 4F. *J. Biol. Chem.* **264**, 2401-2404.

Morley, S. J. and Traugh, J. A. (1990). Differential stimulation of phosphorylation of initiation factors eIF-4F, eIF-4B, eIF-3, and ribosomal protein S6 by insulin and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **265**, 10611-10616.

Morley, S. J., Curtis, P. S. and Pain, V. M. (1997). eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA* **3**, 1085-1104.

Niessing, D., Blanke, S. and Jackle, H. (2002). Bicoid associates with the 5′-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev.* **16**, 2576-2582.

Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V. M. and Morley, S. J. (1996). The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.* **15**, 1371-1382.

Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5′-cap function. *Nature* **371**, 762-767.

Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S. and Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* **273**, 14002-14007.

Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T. and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* **18**, 270-279.

Raught, B., Gingras, A. C. and Sonenberg, N. (2000a). Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes. In *Translational Control of Gene Expression* (ed. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey and M. B. Mathews), pp. 245-293. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Raught, B., Gingras, A. C., Gygi, S. P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R. and Sonenberg, N. (2000b). Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J.* **19**, 434-444.

Richter, J. D. and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477-480.

Rousseau, D., Gingras, A. C., Pause, A. and Sonenberg, N. (1996). The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* **13**, 2415-2420.

Salaün, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N. and Cormier, P. (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **255**, 428-439.

Salaün, P., Le Breton, M., Morales, J., Bellé, R., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O. and Cormier, P. (2004). Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp. Cell Res.* **296**, 347-357.

Salaün, P., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N., Morales, J. and Cormier, P. (2005). Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. *J. Cell Sci.* **118**, 1385-1394.

Stoneley, M. and Willis, A. E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**, 3200-3207.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Wagenaar, E. B. (1983). The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.* **144**, 393-403.

Wakiyama, M., Imataka, H. and Sonenberg, N. (2000). Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Curr. Biol.* **10**, 1147-1150.

Waltz, K. and Lopo, A. C. (1987). Change in covalent modification of eIF-4E with activation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. In *Translational Control* (ed. M. Mathews, J. W. B. Hershey and B. Safer), p. 157. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Waskiewicz, A. J., Johnson, J. C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S. R. and Cooper, J. A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1871-1880.

Yan, R., Rychlik, W., Etchison, D. and Rhoads, R. E. (1992). Amino acid sequence of the human protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* **267**, 23226-23231.

Journal of Cell Science

II) Liens entre phosphorylation de 4E-BP et traduction dépendante de la coiffe

Article 2: Oulhen N, Boulben S, Morales J, Cormier P and Cosson B. A mutant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in sea urchin cell-free cap dependent translation system. *Submitted*.

Ce deuxième article démontre que Sg4E-BP est un inhibiteur de la traduction dépendante de la coiffe et nous apporte une nouvelle vision sur l'importance de la phosphorylation et de la dégradation de Sg4E-BP chez l'oursin.

Chez les mammifères, la traduction dépendante de la coiffe est inhibée lorsqu'eIF4E est lié à 4E-BP. L'association entre eIF4E et 4E-BP dépend de l'état de phosphorylation de 4E-BP. La forme hypophosphorylée de 4E-BP lie eIF4E alors que la forme hyperphosphorylée se dissocie. Chez l'oursin *Sphaerechinus granulari*s, Sg4E-BP est phosphorylé, dissocié de SgIF4E et dégradé après fécondation. Pour comprendre le rôle de la phosphorylation de Sg4E-BP, nous avons analysé l'effet d'un mutant, mimant l'hyperphosphorylation de ce facteur, sur la traduction dépendante de la coiffe en utilisant un système acellulaire.

Résultats :

Le 4E-BP de l'oursin *Sphaerechinus granularis* a été cloné (Sg4E-BP). L'analyse de la séquence indique que le site consensus d'interaction avec eIF4E est conservé chez cet oursin. On retrouve également 4 sites connus pour être phosphorylés chez les mammifères (Thr-37, Thr-46, Ser-65, Thr-70 d'après la numérotation du 4E-BP1 humain).

Pour analyser le rôle de Sg4E-BP sur la traduction, nous avons mis au point des extraits acellulaires réalisés à partir d'ovules ou d'embryons prélevés 30 minutes après fécondation. Les extraits post fécondation miment l'augmentation physiologique de la synthèse protéique et effectuent une traduction dépendante de la coiffe.

La protéine de fusion GST-Sg4E-BP a été produite et ajoutée à un extrait post fécondation, les résultats indiquent que GST-Sg4E-BP inhibe fortement la synthèse protéique dépendante de la coiffe.

Cette protéine de fusion a été mutée soit sur le site d'interaction avec eIF4E (mutant YALA), soit sur les 4 sites de phosphorylation de manière à mimer une hyperphosphorylation (mutant 4xE). Le mutant YALA ne s'associe pas à la GST-mIF4E (GST-mouse IF4E) et démontre la fonctionnalité de cette séquence chez l'oursin. En revanche et de manière très

originale, le mutant 4xE s'associe à la GST-mIF4E, indiquant que l'hyperphosphorylation de Sg4E-BP n'est pas suffisante à sa dissociation avec un eIF4E.

Comme la GST-Sg4E-BP, le mutant 4xE inhibe la traduction dépendante de la coiffe dans un extrait post fécondation. Ces nouvelles données indiquent que chez l'oursin, un mutant de Sg4E-BP mimant son hyperphosphorylation inhibe la traduction dépendante de la coiffe. Ces résultats mettent en avant l'importance de la dégradation de Sg4E-BP qui serait alors le seul moyen pour dissocier le complexe Sg4E-BP/SgIF4E après fécondation et stimuler la synthèse protéique.

Ces résultats apportent la première preuve directe du rôle inhibiteur de Sg4E-BP sur la traduction dépendante de la coiffe et remettent en cause le modèle établi concernant le rôle de la phosphorylation de 4E-BP.

Bilan :

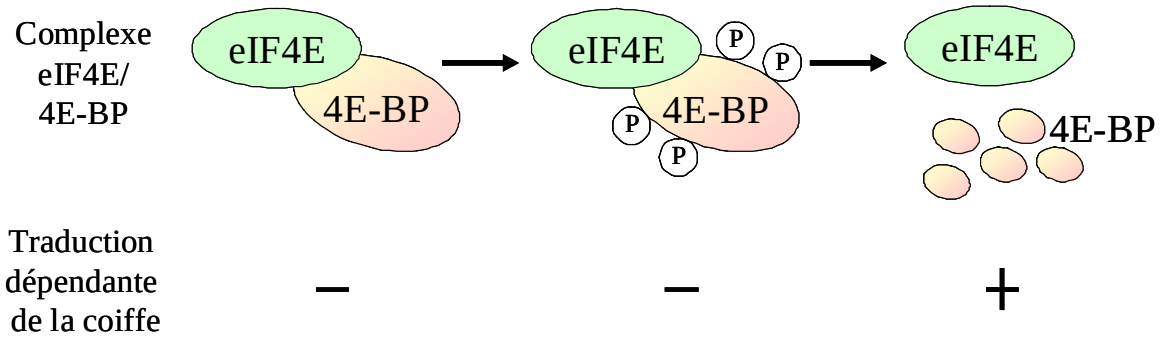


Figure 27 : Régulation de 4E-BP en réponse à la fécondation chez l'oursin. *Dans les ovules, eIF4E est associé à 4E-BP et la synthèse protéique est très faible. La fécondation provoque la phosphorylation, la dissociation et la dégradation de 4E-BP. Les résultats obtenus à partir d'extraits acellulaires suggèrent que 4E-BP phosphorylé sur les acides aminés correspondants aux Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70 humains reste associé à eIF4E et inhibe la synthèse protéique. La dégradation de 4E-BP serait ainsi essentielle à la libération d'eIF4E pour stimuler la traduction dépendante de la coiffe.*

A Mutant Mimicking Hyperphosphorylated 4E-BP Inhibits Protein Synthesis in Sea Urchin Cell-Free Cap-Dependent Translation System

NATHALIE OULHEN, SANDRINE BOULBEN, JULIA MORALES, PATRICK CORMIER[1] AND BERTRAND COSSON

Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7150 Mer & Santé;

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150;

Université Européenne de Bretagne, UEB;

Equipe Traduction, Cycle cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff CEDEX, France

[1] Author for correspondence (e-mail: cormier@sb-roscoff.fr)

Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff CEDEX, France

Fax : +33 2 98 29 23 06

RUNNING TITLE: 4E-BP translational activity

KEYWORDS: Translation regulation, 4E-BP, Cell-free translation system, Sea urchin, Fertilization

Abstract

Background: 4E-BP is a translational inhibitor that binds to eIF4E to repress cap-dependent translation initiation.

Methodology/Principal Findings: Using sea urchin cell-free cap-dependent translation system prepared from fertilized eggs, we provide the first direct evidence that the sea urchin 4E-BP inhibits cap-dependent translation. We show here that a sea urchin 4E-BP mutant, mimicking phosphorylation on the four sites recognized to be required to remove eIF4E binding, functions in the association of eIF4E and inhibits protein synthesis.

Conclusions/Significance: These studies demonstrate the conserved activity of 4E-BP translational repressor but suggest that there are additional mechanisms to that of phosphorylation at the four critical sites, which are required to release eIF4E from its repressor in sea urchin.

INTRODUCTION

Changes in the protein synthesis machinery are important in the regulation of gene expression in eukaryotes [1]. Although sea urchin eggs contain all the necessary components for translational activity [2], protein synthesis is low in unfertilized eggs and is stimulated rapidly following fertilization [3,4]. The change has been demonstrated to result from an increase of the translation initiation rate of masked maternal mRNAs [5,6], independently of mRNA transcription and ribosome biogenesis [3,7]. Cap-dependent translation is highly regulated following fertilization and cap-dependent translation activity increase is involved in the onset of the first mitotic division of sea urchin embryos [8]. Translation initiation involves a complex machinery [9]. We recently identified in the sea urchin genome [10] an ortholog of each mammalian translation factor as compared to the mammalian set known to be involved in the initiation step [11].

Among the protein synthesis machinery components, the eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E) is a major target for the control of the cap-dependent translation initiation [12]. eIF4E is a cap-binding protein that interacts with the mRNA 5'-cap structure m^7GpppN (where N is any nucleotide). eIF4E functions by binding with eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G), a large scaffolding protein that acts as docking site for several proteins including eukaryotic Initiation Factors 4A (eIF4A) and 3 (eIF3), and consequently bridges the ribosome and the mRNA [13]. eIF4G binds also to the poly(A)-binding protein (PABP), which interacts with the poly(A) tail, and this allows close loop conformation of the mRNA, thought to stabilize the interaction of the cap-binding complex and to stimulate translation of polyadenylated RNAs [14]. eIF4E is the limiting factor in translation initiation under most circumstances and plays an important role in the regulation of the cell cycle [15-17], and is also

thought to have a role during reproduction and embryogenesis [18].

The 4E-binding proteins [4E-BP; also called phosphorylated heat-and-stable protein, insulin-stimulated (PHAS-I)] compete with eIF4G for an eIF4E recognition motif site YxxxxLΦ (where x is any amino acid and Φ is an aliphatic residue, usually L, M or F) [19] and consequently inhibit cap-dependent translation [20]. Binding of 4E-BPs to eIF4E is classically associated with the phosphorylation status of 4E-BPs [21,22]. Underphosphorylated 4E-BPs bind to eIF4E and inhibit cap-dependent translation, whereas hyperphosphorylated forms do not [13]. However, the relationships between the multiple states of 4E-BPs phosphorylation and their dissociation from eIF4E is still far from being fully understood [23]. Three 4E-BP proteins (4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) exist in mammals [21,24,25]. The most thoroughly studied of these is 4E-BP1 for which multiple and hierarchical phosphorylation events are required to release 4E-BP1 from eIF4E [26]. A large body of evidence indicates that phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) and FKBP12 rapamycin-associated protein/mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) signaling kinases affect the release of 4E-BP1 from eIF4E [27]. Recently, it has been proposed that 4E-BP1 phosphorylation may play a dual role in the regulation of protein synthesis, both reducing the affinity of 4E-BP1 for eIF4E and promoting the conversion of 4E-BP1 to alternative polyubiquitinated forms that may be involved in the increase of the turnover of this translational repressor [28].

In sea urchin, only one 4E-BP ortholog exists, presenting a highly-conserved core domain containing the eIF4E-binding motif and the phosphorylation sites (Thr-37, Thr-46, Ser-65 and Thr-70, numbered according to mouse 4E-BP1) [11]. Following fertilization of the sea urchin eggs, 4E-BP is rapidly phosphorylated and degraded [8,29]. The release of eIF4E from its translational repressor 4E-BP and the eIF4E/eIF4G complex formation are correlated with the rapid increase of protein synthesis triggered by fertilization and are required for the onset of the first mitotic division of embryonic development [30,31]. The dissociation of 4E-BP from eIF4E and its degradation are inhibited by rapamycin, suggesting a role for protein phosphorylation in these two processes.

Using cell-free translation systems, the activity of several protein synthesis initiation factors has been shown to be enhanced [32-35], consistent with the increase of the rate of translation initiation in fertilized eggs. It was suggested that eIF4E association with its partners eIF4G and eIF4A was

repressed by an inhibitor of unknown identity in unfertilized eggs [36]. Our previous works demonstrated correlation between eIF4E release from its repressor 4E-BP and the rise of protein synthesis that occurs shortly following egg fertilization. In the present study we provide direct evidence of the translational repressor activity of the sea urchin 4E-BP and we characterize this activity in cell-free translation system that mimics the increase of the rate of translation initiation in fertilized eggs.

RESULTS

Isolation and characterization of the cDNA encoding the *Spharechinus granularis* Sg4E-BP.

In order to analyze and characterize the translational inhibitory function of the sea urchin 4E-BP, we isolated and sequenced the cDNA encoding for this small protein in the sea urchin *Sphaerechinus granularis*. A deduced polypeptide of 113 amino acids (Fig 1) with a deduced molecular mass of 12,1 kDa was obtained. The predicted protein presents a core domain highly conserved containing the phosphorylation sites (Thr37, Thr46, Ser65 and Thr70, numbered according to human 4E-BP) and the eIF4E-binding motif (YxxxxLΦ). Two motifs important for protein-protein interactions, the RAIP motif [37] and the TOS site [38] were also found. Full-length *Sphaerechinus granularis* 4E-BP (Sg4E-BP) was cloned and GST-tagged Sg4E-BP fusion protein containing the complete 4E-BP protein sequence was produced (see Materials and Methods). We first tested the ability of the GST-Sg4E-BP to associate the sea urchin eIF4E (Fig 2). When pre-incubated in sea urchin extract prepared from unfertilized eggs, the GST-Sg4E-BP fusion protein associated equally with two isoforms of endogenous eIF4E that are also detected as a doublet in total extract (compare lanes 3 and 5). Interestingly, when pre-incubated in extract prepared from 60 minutes post-fertilized eggs, the GST-Sg4E-BP associated preferentially with the lower band of the doublet (compare lane 4 with lane 3). Neither of the two bands from the doublet interacted with the GST protein used as a control (lanes 1-2). These data demonstrate that the sea urchin recombinant 4E-BP polypeptide interacts with endogenous sea urchin eIF4E isoforms. In order to characterize further Sg4E-BP we decided to analyze its potential inhibitory activity for cap-dependent translation measured in cell-free translation systems from sea urchin eggs.

Sg4E-BP inhibits cap-dependent translation in a sea urchin cell-free cap-dependent translation system. We first developed cell-free translation systems that were capable of initiating on exogenous capped *luciferase* mRNA (Fig 3A). While cell-free translation systems prepared from unfertilized eggs showed low protein synthesis rate of the exogenous capped mRNA, those prepared from 30 minutes post-fertilized eggs show rates of protein synthesis 5 fold higher (compare lanes 1 and 2), reflecting the increase of protein synthesis rates observed *in vivo* after sea urchin egg fertilization. Interestingly, neither cell-free translation systems prepared from unfertilized nor 30 min post-fertilized eggs were capable of initiating on exogenous uncapped *luciferase* mRNA (lanes 3-4). Therefore, the cell-free translation systems used for the work described above exhibit cap-dependent protein synthesis activity. We then showed that the GST-Sg4E-BP fusion protein inhibited protein synthesis activity dramatically when measured in cell-free extract systems prepared from fertilized eggs (Fig 3B, compare lanes 1 and 2). Interestingly, the specific inhibition of cap-dependent translation by Sg4E-BP was rescued by concomitant addition of a mouse recombinant GST-tagged eIF4E (GST-mIF4E) in the cell-free translation system (lane 3). Taken together, these data give the first direct demonstration that sea urchin 4E-BP possesses functional inhibitory activity of the cap-dependent protein synthesis.

The mutant that mimics phosphorylation on T36/T45/S64/T69 of Sg4E-BP associates efficiently with eIF4E and inhibits association between eIF4E and eIF4G *in vitro*. The predicted Sg4E-BP protein presents a highly-conserved core domain containing the phosphorylation sites and the eIF4E-binding motif (Fig 1). We produced GST-Sg4E-BP mutants, Y53A and L58A (YALA) and T36E/T45E/S64E/T69E (4xE), and analyzed their ability to associate with GST-mIF4E (Fig 4). As expected, the GST-mIF4E retained on an m^7GTP-affinity column (cap column) co-purified with a pre-incubated wild type GST-Sg4E-BP (Fig 4A and 4B, lanes 2) used as a control, whereas the YALA mutant was not retained efficiently on the cap column when pre-incubated with GST-mIF4E (Fig 4A and 4B, lanes 3). Strikingly the 4xE mutant that mimics the hyperphosphorylated form of Sg4E-BP co-purified with GST-mIF4E on cap-column (Fig 4A and 4B, lanes 4). This last result is in discrepancy with the classical model in which phosphorylation of all four residues of 4E-BP is sufficient to remove

eIF4E binding [26]. We then decided to test the ability of the 4xE mutant to inhibit competitively the association between eIF4E and eIF4G (Fig 5). Both wild type and 4xE mutant efficiently compete with GST-SgIF4G for binding with GST-mIF4E (Fig 5A and 5B). Taken together, these data suggest that Sg4E-BP phosphorylated on all four residues T36/T45/S64/T69 is functional to inhibit eIF4G/eIF4E complex formation. We then decided to test the protein synthesis inhibitory activity of the 4xE mutant in the sea urchin cell-free cap-dependent translation system.

Using increasing amounts (20; 100; 200; 1,000 ng) of the different constructs, GST alone, GST-Sg4E-BP, YALA and 4xE mutants, we tested their ability to inhibit the translation of a capped *luciferase* mRNA in the sea urchin cell-free translation system prepared from fertilized eggs (Fig 6). Strikingly, when added to active sea urchin cell-free translation system, 200 ng of GST-Sg4E-BP or 4xE mutant dramatically affected the translation of the capped *luciferase* mRNA whereas the same amount of YALA mutant or GST alone did not affect the translation of the exogenous mRNA. The inhibitory effect of GST-Sg4E-BP and 4xE on the cap-dependent translation was completely rescued by addition of the GST-mIF4E fusion protein (Fig 7). Taken together, these data demonstrate that the mutant that mimics the phosphorylation on T36/T45/S64/T69 of Sg4E-BP is still functional to inhibit the protein synthesis activity in sea urchin cell-free cap-dependent translation systems.

DISCUSSION

Using cell-free translation systems from unfertilized eggs and early cleavage embryos, it was suggested that eukaryotic Initiation Factors 4 activity was repressed in unfertilized eggs owing to the presence of an unidentified inhibitor that interacted with eIF4E [36,39]. Our previous data showed that 4E-BP associated with eIF4E in unfertilized eggs and that increasing protein synthesis rate was correlated with eIF4E/4E-BP complex dissociation in combination with phosphorylation [29] and degradation of 4E-BP [8]. Establishment of highly active cell-free cap-dependent translation systems allowed studying the molecular mechanisms governing the regulation of protein synthesis initiation in fertilized egg of sea urchins. We provide here the first direct evidence that sea urchin 4E-BP inhibits

efficiently the cap-dependent protein synthesis in cell-free cap-dependent translation system from post-fertilized eggs. These data are consistent with our hypothesis proposing that 4E-BP is a main repressor of protein synthesis in unfertilized eggs and that its dissociation from eIF4E plays a crucial role in the rise in protein synthesis that occurs shortly following fertilization [8,29,40].

4E-BP sequences from protists, fungi and metazoa can be found in the Joshi/Jagus 4E-BP database (http://umbicc3-215.umbi.umd.edu). In metazoa, below urochordates only one 4E-BP is found per species. To date, they have been few functional studies of 4E-BP outside mammals. Recently, association of 4E-BP with eIF4E has been demonstrated to be downregulated upon meiotic maturation of the starfish oocyte [41]. In *Drosophila melanogaster*, 4E-BP presents a nonconsensus eIF4E binding site and binds eIF4E poorly [42]. We have shown here that *Sphaerechinus granularis* contains a consensus eIF4E binding site and that the YALA mutant does not interact with eIF4E (Fig 4). Furthermore, we provided evidence that this site is required for the cap-dependent translation inhibitory activity of the sea urchin 4E-BP (Fig 6). These results are consistent with finding from the mollusc *Aplysia*, another invertebrate model in which 4E-BP role has been characterized. *Aplysia* 4E-BP contains a consensus eIF4E-binding site, and alters cap-dependent translation when overexpressed in the soma [43].

We previously demonstrated sea urchin 4E-BP is phosphorylated to a significant extent in unfertilized eggs, and that fertilization causes hyperphosphorylation [29]. These observations led us to propose that sea urchin 4E-BP phosphorylations regulate eIF4E/4E-BP complex formation in a manner similar to that of vertebrate 4E-BP1 where phosphorylation of T37 and T46 appears to prime for phosphorylation of downstream sites, S65 and T70 (numbering according to human nomenclature) [13,26,44,45]. Additional phosphorylatable sites of 4E-BP1 have been identified on Ser 83 [44], Ser 101 [46] and Ser 112 [47]. Notably, of the seven phosphorylation sites identified in vertebrate 4E-BP1, only the four sites most linked to regulating 4E-BP binding to eIF4E are conserved in sea urchin (Fig 1) and *Aplysia* 4E-BP [43]. It was somewhat surprising to see that serine/threonine-to-glutamic acid mutations at all four residues on 4E-BP did not decrease significantly sea urchin 4E-BP association with eIF4E (Fig 4 and Fig 5A) and did not affect its protein synthesis inhibitory activity in cell-free cap-dependent translation systems (Fig. 6). These data suggest that phosphorylation at the four sites of

the sea urchin 4E-BP is not sufficient to release eIF4E from its repressor and are in discrepancy with the role for these phosphorylation sites classically described in human 4E-BP1 and 4E-BP2 regulation [48]. The serine/threonine-to-glutamic mutations at all four residues on sea urchin 4E-BP could have a weaker effect than phosphorylation at these residues, but this hypothesis is not supported by the finding that S/T-E mutations at all four residues of *Aplysia* 4E-BP significantly abolished binding to eIF4E [43]. Therefore, we hypothesize that phosphorylation at the four sites could be required, but is not sufficient to disrupt the 4E-BP/eIF4E complex in sea urchin. Additional control of 4E-BP through rapamycin-sensitive proteolysis has been shown in sea urchin eggs [8]. Phosphorylation of 4E-BP could represent an important signal for its proteolysis. This hypothesis is reinforced by the finding that phosphorylation of 4E-BP1 both reduces the affinity of 4E-BP1 for eIF4E, and promotes the conversion of 4E-BP1 to alternative polyubiquitinated forms that precedes degradation in human cells [28]. Therefore, that mutant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP still interacts with eIF4E and inhibits protein synthesis in cell-free cap dependent-translation systems reinforce the idea that degradation represents an important mechanism to regulate 4E-BP function in sea urchin. The proteolysis pathway responsible for 4E-BP degradation following fertilization is currently underway.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF) and glycine were purchased from Interchim. Acetylcholine, Sodium orthovanadate, EDTA, β-glycerophosphate, dithiothreitol (DTT), igepal, leupeptin, aprotinin, chymostatin and soybean trypsin inhibitor were obtained from Sigma. Pepstatin was purchased from Euromedex. ECL, ECL+ and ECF detection reagents, 7-methyl-GTP Sepharose 4B beads (m^7GTP column) were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. QuickChange site-directed mutagenesis kit was obtained from Stratagene. Mouse monoclonal antibody directed against eIF4E from rabbit was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Rabbit polyclonal antibodies directed against GST were purchased from Santa Cruz. Goat anti-mouse, and swine anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase-coupled) were obtained from

Dako SA. For the generation of the mouse eIF4E recombinant protein (GST-mIF4E), the construct was a generous gift from Simon Morley (University of Sussex, Brighton, UK). Renilla Luciferase Assay system, Riboprobe *in vitro* Transcription System and amino acids were obtained from Promega. *Eco*RV enzyme was purchased from Biolabs and RNasin was obtained from Ambion. The Smart Race cDNA amplification kit was obtained from Clontech.

Cloning of *S. granularis Sg4E-BP*

Primers designed from the *Strongylocentrotus purpuratus* genome (5'- ATG TCA GCC CCT GCA GCA AGT CG -3' and 5'- TCA GAT GTC CAT TTG GAA CTG ATC TTC AGC -3') were used to amplify a 342-bp fragment by PCR using a *S. granularis* cDNA library. 3' ends of the *S. granularis* cDNA fragment were extended by RACE PCR (Smart RACE cDNA amplification kit) using primers 5'- ATG TCA GCC CCT GCA GCA AGT CG -3' to obtain a final 882-pb cDNA, containing a 342 nt ORF. Sequencing was performed on an Applied Biosystems AB3130 automatic sequencer at the Génopole Ouest sequencing facility in Roscoff (France). The EMBL accession number for *S. granularis Sg4E-BP cDNA* is FM179949.

GST-recombinant proteins

The 342-bp fragment corresponding to the *Sg4E-BP* coding region was amplified using primers 5'- CGC GGA TCC ATG TCA GCC CCT GCA GCA AGT CG -3' and 5'- CCG CTC GAG CGG TCA GAT GTC CAT TTG GAA CTG ATC -3'. The fragment was inserted into pGEX-4T-1 vector digested with *Bam*HI and *Xho*I. GST-Sg4E-BP YALA (Y53A/L58A) and GST-Sg4E-BP 4xE (T36E/T45E/S64E/T69E) were produced using QuickChange site-directed mutagenesis and confirmed by DNA sequencing. Wild type and mutant proteins: GST, GST-Sg4E-BP, GST-Sg4E-BP YALA, GST-Sg4E-BP 4xE, GST-SgIF4G [31] and GST-mIF4E were overexpressed in *E. coli* (strain BL21) and purified on a glutathione Sepharose 4B column according to the manufacturer's instructions.

Preparation of gametes

Sphaerechinus granularis sea urchins were collected in the Brest area (France), kept in seawater and used within 5 days. Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Eggs were collected in 0.22 µm Millipore-filtered seawater and rinsed twice by centrifugation at 2,000 rpm for 2 min. For the preparation of lysates, eggs were dejellied by swirling twenty seconds in 3.5 mM citric acid pH 5 and rinsed three times in filtered seawater prior to fertilization. For fertilization, eggs were suspended in filtered seawater (5% suspension) containing 0.1% glycine. Diluted sperm was added to the eggs and withdrawn after fertilization envelope elevation. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization, and each experiment used gametes from a single female. Cultures were performed at 16°C under constant agitation.

Interaction between GST-Sg4E-BP and endogenous SgIF4E

This interaction was analysed by GST pull down assay. Unfertilized or 60 min post-fertilized embryos were collected after centrifugation 2 min. at 2,000 g. Cells were lysed by passage through a 25G syringe in one cell volume of 2x binding buffer (40 mM HEPES pH 7.4, 0.2 mM Sodium orthovanadate, 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 mM PPi, 100 mM sodium fluoride, 100 mM β-glycerophosphate, 1 mM AEBSF and 20µg/ml of aprotinin and leupeptin). Cell lysates were centrifuged for 15 min at 16,000 g at 4°C in an Eppendorf centrifuge 5415R and the supernatants were stored at –20°C before use. Protein quantification was performed in duplicate by the Bradford assay. One microgram of GST-Sg4E-BP or GST alone were mixed and pre-incubated with 25 µl of gluthathione-Sepharose in a final volume of 200 µl of 1x binding buffer for 1 hour at 4°C. The beads were washed three times with 1x binding buffer. Five hundred microliters (2 mg of proteins) of supernatant resulting from the 16,000 g centrifugation were mixed and incubated end-over-end for 60 min at 4°C. Then the samples were washed three times with 1 ml of 1x binding buffer containing 100

mM NaCl. Laemmli sample buffer was added directly to the beads, and the proteins were resolved by SDS-PAGE and analysed by Western blotting.

Analysis of *in vitro* interaction between GST-Sg4E-BP recombinant proteins and GST-mIF4E.

After production and purification, GST recombinant proteins were dialysed overnight in buffer A (50 mM HEPES pH 7.7, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol). One microgram of GST-mIF4E was incubated for 1 hour with m^7GTP-Sepharose beads in buffer A. After washing, the beads were incubated for 1 hour in buffer A containing 1 mg/ml of BSA, 0.5% Igepal with one microgram of GST, GST-Sg4E-BP, GST-Sg4E-BP YALA or GST-Sg4E-BP 4xE. After extensive washing, the beads were boiled in Laemmli buffer and analysed by Western blotting using anti-GST antibodies and a chemifluorescence detection system (ECF).

Analysis of *In vitro* competition between GST-Sg4E-BP recombinant proteins and GST-SgIF4G.

After production and purification, GST recombinant proteins were dialysed overnight in buffer A (50 mM HEPES pH 7.7, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol). One microgram of GST-mIF4E was incubated for 1 hour with m^7GTP-Sepharose beads in buffer A. After washing, the beads were incubated for 1 hour in buffer A, containing 1 mg/ml of BSA, 0.5% Igepal with one, two or ten micrograms of GST-Sg4E-BP, GST-Sg4E-BP 4xE or GST-SgIF4G. After extensive washing, the beads were boiled in Laemmli buffer and analysed by Western blotting using anti-GST antibodies and a chemiluminescence detection system (ECL+).

Western blot analyses

Western blot analyses were performed following electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE onto 0.22-µm nitrocellulose membranes [49]. GST fusion proteins were analysed using rabbit polyclonal antibodies directed against GST. SgIF4E was analysed using mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E. Membranes were incubated with antibodies directed against GST

(1:2000) or eIF4E (1:2000) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5% skimmed milk and 0.1% Tween 20 at room temperature. The antigen-antibody complex was measured by chemiluminescence using horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies according to the manufacturer's instructions (ECL or ECL+).

Cell-free translation systems

Sphaerechinus granularis unfertilized eggs and 30 min post fertilization embryos were obtained as described above in “Preparation of gametes”. Fertilization was done at 16°C in sea water containing 50 mM 3-amino-1,2,4-triazole to prevent hardening of the fertilization envelope [50]. The procedure we used to prepare lysates is a modification of the method described by Winkler and Steinhardt [51] for *Lytechinus pictus* and by Lopo [35] for *Strongylocentrotus purpuratus*. Unfertilized eggs or 30 min embryos (2ml) were washed twice in 6 vol. of ice-cold buffer (50 mM HEPES pH 7.2, 40 mM NaCl, 106 mM potassium gluconate, 263 mM glycerol, 300 mM glycine, 10 mM EGTA, 7.3 mM CaCl2, 0.52 mM MgCl2, 80 mM β-glycerophosphate) complemented with 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 0.5 mg/ml reduced glutathione. Cells were then resuspended 1:1 in the same buffer after addition of 300 units/ml RNasin, 0.1 mg/ml Leupeptin, 0.1 mg/ml Pepstatin, 0.1 µg/ml Chymostatin. Cells were lysed after fifteen strokes in a Dounce homogenizer and centrifuged for 5 min at 15,000g at 4°C. The supernatant was frozen in liquid N2 and stored at - 80°C.

After dilution to obtain the same protein concentration between unfertilized and fertilized extracts, these cell-free systems were complemented with the master mix [35] to give final concentrations of 2 mM ATP, 0.8 mM GTP, 20 mM creatine phosphate, 10 units/ml of creatine phosphokinase, 50 µM glucose 6-phosphate, 2.8 mM MgCl2, 20 amino acids (50 µM), 0.1 mg/ml Leupeptin and 0.1 mg/ml Pepstatin. Buffer or GST-recombinant proteins dialysed against the ice cold buffer were added to these lysates. Addition of mRNA (0,4 fmol/µl of reaction) was considered as the start of the translation reaction. Cap and Uncapped mRNA were obtained after *in vitro* transcription with the plasmid pGb-Eg2-410Δ2-hxG-A65 linearised with *Eco*RV [52]. After 1h at 16°C under agitation, reactions were stopped and luminescence was measured on TriStar LB 941 from Berthold Technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Simon Morley for the gift of the construct encoding the recombinant GST-mIF4E protein. We thank V. Legagneux, HB Osborne and L. Paillard for the gift of the plasmid pGb-Eg2-410Δ2-hxG-A65. We thank S. Stewart for manuscript corrections. We are grateful to the members of the cell cycle and development group for helpful discussions and comments on this manuscript.

REFERENCES

1. Mathews MB, Sonenberg, N and Hershey JWB (2007) Origins and Principles of Translational Control. In: Mathews MB, Sonenberg N and Hershey JWB, eds. Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Davidson EH, Hough-Evans BR, Britten RJ (1982) Molecular biology of the sea urchin embryo. Science 217: 17-26.
3. Epel D (1967) Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A 57: 899-906.
4. Epel D (1990) The initiation of development at fertilization. Cell Differ Dev 29: 1-12.
5. Humphreys T (1971) Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. Dev Biol 26: 201-208.
6. Grainger JL, Winkler MM (1987) Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. Mol Cell Biol 7: 3947-3954.
7. Brandhorst BP (1976) Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. Dev Biol 52: 310-317.
8. Salaun P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Belle R, et al. (2003) eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. Dev Biol 255: 428-439.
9. Pestova TV, Lorsch JR, Hellen CUT (2007) The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. In: Mathews MB, Sonenberg N and Hershey JWB, eds. Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, et al. (2006) The genome of the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Science 314: 941-952.
11. Morales J, Mulner-Lorillon O, Cosson B, Morin E, Belle R, et al. (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. Dev Biol 300: 293-307.
12. Sonenberg N, Rupprecht KM, Hecht SM, Shatkin AJ (1979) Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4345-4349.
13. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu Rev Biochem 68: 913-963.
14. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. Genes Dev 19: 104-113.
15. Cormier P, Pyronnet S, Salaun P, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N (2003) Cap-dependent translation and control of the cell cycle. Prog Cell Cycle Res 5: 469-475.
16. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, et al. (2004) eIF4E--from translation to transformation. Oncogene 23: 3172-3179.
17. Sivan G, Elroy-Stein O (2008) Regulation of mRNA Translation during cellular division. Cell Cycle 7: 741-744.
18. Thompson B, Wickens, M and Kimble J (2007) Translational Control in Development. In: Mathews MB, Sonenberg N and Hershey JWB, eds. Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
19. Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. Mol Cell Biol 15: 4990-4997.

20. Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. Embo J 14: 5701-5709.
21. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, et al. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. Nature 371: 762-767.
22. Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. Genes Dev 12: 502-513.
23. Tomoo K, Abiko F, Miyagawa H, Kitamura K, Ishida T (2006) Effect of N-terminal region of eIF4E and Ser65-phosphorylation of 4E-BP1 on interaction between eIF4E and 4E-BP1 fragment peptide. J Biochem 140: 237-246.
24. Rousseau D, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N (1996) The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. Oncogene 13: 2415-2420.
25. Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. J Biol Chem 273: 14002-14007.
26. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, et al. (2001a) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes Dev 15: 2852-2864.
27. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001b) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. Genes Dev 15: 807-826.
28. Elia A, Constantinou C, Clemens MJ (2008) Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. Oncogene 27: 811-822.
29. Cormier P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N, et al. (2001) eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. Dev Biol 232: 275-283.
30. Salaun P, Boulben S, Mulner-Lorillon O, Belle R, Sonenberg N, et al. (2005) Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. J Cell Sci 118: 1385-1394.
31. Oulhen N, Salaun P, Cosson B, Cormier P, Morales J (2007) After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. J Cell Sci 120: 425-434.
32. Clemens M (1987) Translational control. Developments in development. Nature 330: 699-700.
33. Colin AM, Brown BD, Dholakia JN, Woodley CL, Wahba AJ, et al. (1987) Evidence for simultaneous derepression of messenger RNA and the guanine nucleotide exchange factor in fertilized sea urchin eggs. Dev Biol 123: 354-363.
34. Huang WI, Hansen LJ, Merrick WC, Jagus R (1987) Inhibitor of eukaryotic initiation factor 4F activity in unfertilized sea urchin eggs. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 6359-6363.
35. Lopo AC, Lashbrook CC, Hershey JW (1989) Characterization of translation systems in vitro from three developmental stages of Strongylocentrotus purpuratus. Biochem J 258: 553-561.
36. Jagus R, Huang W, Hiremath LS, Stern BD, Rhoads RE (1993) Mechanism of action of developmentally regulated sea urchin inhibitor of eIF-4. Dev Genet 14: 412-423.
37. Tee AR, Proud CG (2002) Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. Mol Cell Biol 22: 1674-1683.

38. Schalm SS, Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. Curr Biol 12: 632-639.
39. Jagus R, Huang WI, Hansen LJ, Wilson MA (1992) Changes in rates of protein synthesis and eukaryotic initiation factor-4 inhibitory activity in cell-free translation systems of sea urchin eggs and early cleavage stage embryos. J Biol Chem 267: 15530-15536.
40. Salaun P, Le Breton M, Morales J, Belle R, Boulben S, et al. (2004) Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. Exp Cell Res 296: 347-357.
41. Lapasset L, Pradet-Balade B, Verge V, Lozano JC, Oulhen N, et al. (2008) Cyclin B synthesis and rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions. Mol Reprod Dev.
42. Miron M, Verdu J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, et al. (2001) The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in Drosophila. Nat Cell Biol 3: 596-601.
43. Carroll M, Dyer J, Sossin WS (2006) Serotonin increases phosphorylation of synaptic 4EBP through TOR, but eukaryotic initiation factor 4E levels do not limit somatic cap-dependent translation in aplysia neurons. Mol Cell Biol 26: 8586-8598.
44. Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC, Jr. (1997) Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. J Biol Chem 272: 10240-10247.
45. Mothe-Satney I, Brunn GJ, McMahon LP, Capaldo CT, Abraham RT, et al. (2000) Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. J Biol Chem 275: 33836-33843.
46. Wang X, Li W, Parra JL, Beugnet A, Proud CG (2003) The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. Mol Cell Biol 23: 1546-1557.
47. Heesom KJ, Avison MB, Diggle TA, Denton RM (1998) Insulin-stimulated kinase from rat fat cells that phosphorylates initiation factor 4E-binding protein 1 on the rapamycin-insensitive site (serine-111). Biochem J 336 (Pt 1): 39-48.
48. Raught B and Gingras AC (2007) Signaling to Translation Initiation. In: Mathews MB, Sonenberg N and Hershey JWB, eds. Translational Control in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
49. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4350-4354.
50. Foerder CA, Shapiro BM (1977) Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 4214-4218.
51. Winkler MM, Steinhardt RA (1981) Activation of protein synthesis in a sea urchin cell-free system. Dev Biol 84: 432-439.
52. Legagneux V, Omilli F, Osborne HB (1995) Substrate-specific regulation of RNA deadenylation in Xenopus embryo and activated egg extracts. Rna 1: 1001-1008.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. **Schematic diagram of 4E-BP proteins**. Sg4E-BP protein was deduced from the cDNA and aligned with the three human 4E-BPs, *Ciona intestinalis* 4E-BP, *Drosophila melanogaster* Thor, *Aplysia californica* 4E-BP and *Nematostella vectensis* 4E-BP. Accession numbers of human proteins are: 4E-BP1 (NP_004086), 4E-BP2 (Q13542), 4E-BP3 (NP_003723) on NCBI. The Accession number is NP_477295 for *Drosophila melanogaster* (NCBI), 299279 for *Ciona intestinalis* (http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/) and SB_47700 for *Nematostella vectensis* (http://www.stellabase.org/). The *Aplysia californica* 4E-BP was obtained from [43]. The four residues known to be phosphorylated on human 4E-BPs and conserved on sea urchin are indicated by stars. Identical and conserved amino acid residues are on black and grey background, respectively. The common eIF4E motif indicated by YxxxxLΦ (where x is any amino acid and Φ is an hydrophobic residue), the RAIP motif and the TOS site are denoted with a line above.

Figure 2. **Recombinant proteins GST-Sg4E-BP (4E-BP) interacts with endogenous SgIF4E isoforms in sea urchin extracts**. After incubation of the GST alone (lanes 1-2) or the GST-Sg4E-BP protein (lanes 3-4) into extract prepared from unfertilized eggs (UF, lanes 1 and 3) or from 60 minutes post-fertilization embryos (F, lanes 2 and 4), proteins were affinity- purified using Gluthatione Sepharose 4B column, resolved by 15% SDS-PAGE, analysed by immunoblotting and detected by chemiluminescence using an anti-GST antibody (top and intermediate panels) or anti-eIF4E antibody (bottom panels) as described in Materials and Methods. SgIF4E that co-purified with GST-Sg4E-BP (lanes 3 and 4) was compared with the endogenous SgIF4E detected in total extracts loaded separately (lanes 5-6).

Figure 3. **Sg4E-BP inhibits protein synthesis activity in sea urchin cell-free cap-dependent translation systems.** (A) Activity of sea urchin cell-free cap-dependent translation systems. Cell-free translation systems from unfertilized eggs (UF) and 30 minutes post-fertilization embryos (F) were prepared as described in Materials and Methods. Luciferase activity was measured after addition of

capped (Cap+) or uncapped (Cap-) mRNA encoding Renilla Luciferase. The Luciferase activity is represented in RLU (Relative Light Units). Error bars represent the standard deviation (s.d.) of duplicates. (B) Sg4E-BP inhibits cap dependent translation activity and this inhibition is rescued by eIF4E. 100 ng of GST (lane 1), 100 ng of GST-Sg4E-BP alone (4E-BP, lane 2) or preincubated 5 min with 250 ng of GST-mIF4E (4E-BP + eIF4E, lane 3) were added to the fertilized cell free translation system and Luciferase activity was measured as described in Materials and Methods after addition of a capped mRNA encoding Renilla Luciferase. Error bars represent the standard deviation (s.d.) of duplicates. Significance was assessed using Fisher's *F*-test and Student's *t*-test. $*P<0.005$, significant difference between 4E-BP and GST, and between 4E-BP and 4E-BP+eIF4E.

Figure 4. The mutant mimicking hyperphosphorylation of Sg4E-BP does not decrease its association with eIF4E. (A) The S/T-E Sg4E-BP mutated at all four phosphorylation sites binds to eIF4E. GST-mIF4E (eIF4E) was incubated with m^7GTP column (lanes 1-4) and the GST recombinant proteins were added: GST, GST-Sg4E-BP (4E-BP), GST-Sg4E-BP YALA (YALA), GST-Sg4E-BP 4xE (4xE). Complexes were affinity purified and analysed by Western blot using a GST antibody. Inputs are shown on the right panel (lanes 5-9). (B) The affinity between the GST recombinant proteins and GST-mIF4E was analysed by quantification of the signals obtained on the Fig 4.A, using Image Quant. Error bars represent the standard deviation (s.d.) of two experiments. Significance was assessed using Fisher's *F*-test and Student's *t*-test. $^{*}P<0.01$ significant difference between GST or GST-Sg4E-BP YALA with GST-Sg4E-BP.

Figure 5. Sg4E-BP S/T-E mutant and wild type inhibit eIF4E/eIF4G association with the same efficiency. (A) The S/T-E mutant of Sg4E-BP inhibits eIF4E/eIF4G association. The m^7GTP column was incubated (lanes 1-7) or not (lanes 8-9) with GST-mIF4E (eIF4E). Then, recombinant proteins GST-Sg4E-BP 4xE (4xE) and GST-SgIF4G (eIF4G) were added separately for lanes 1-2 and lanes 8-9, and concurrently for other lanes (3-4-5-6-7). We used the same concentration in lane 5, a 1/2 ratio in lanes 4 and 6 and a 1/10 ratio in lanes 3 and 7. Proteins were affinity-purified using the m^7GTP column and were analysed by immunoblotting as described in Materials and Methods using an anti-

GST antibody. Affinity-purified proteins were compared with the GST-fusion proteins loaded separately (lanes 10-12). (B) Wild type Sg4E-BP inhibits eIF4E/eIF4G association. The m^7GTP column was incubated (lanes 1-7) or not (lanes 8-9) with GST-mIF4E (eIF4E). Then, recombinant proteins GST-Sg4E-BP (4E-BP) and GST-SgIF4G (eIF4G) were added separately for lanes 1-2 and lanes 8-9, and concurrently for other lanes (3-4-5-6-7).

We used the same concentration in lane 5, a 1/2 ratio in lanes 4 and 6 and a 1/10 ratio in lanes 3 and 7. Proteins were affinity-purified using the m^7GTP column and were analysed by immunoblotting using an anti-GST antibody. Affinity-purified proteins were compared with the GST-fusion proteins loaded separately (lanes 10-12).

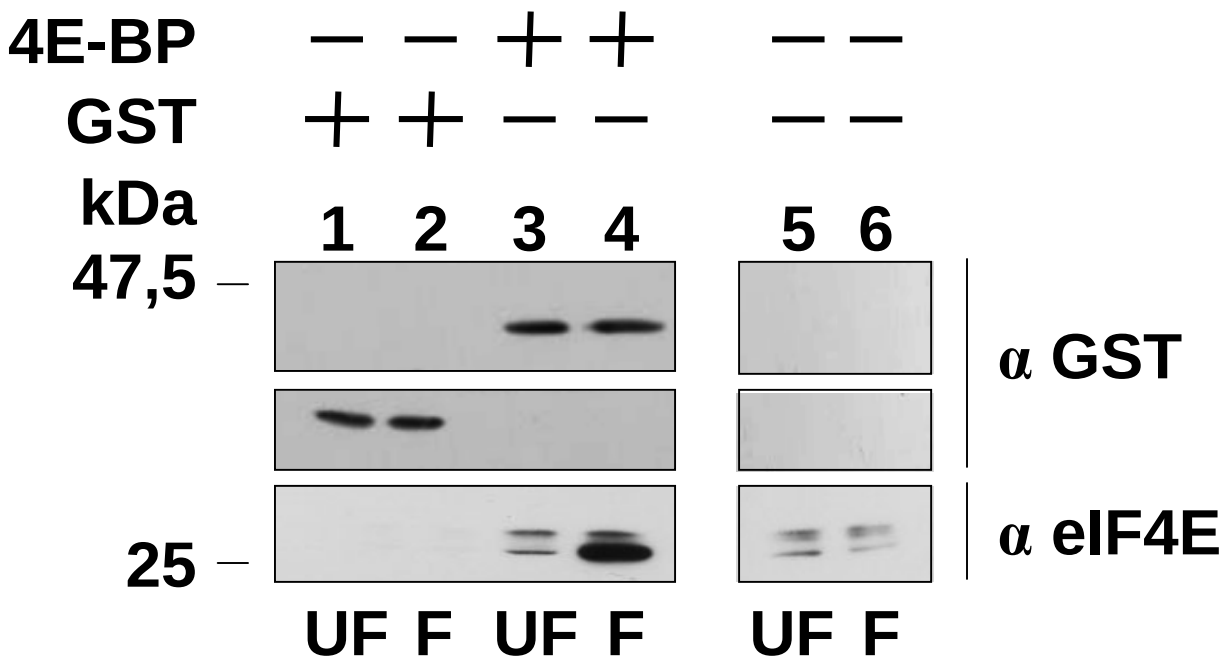
Figure 6. The Sg4E-BP mutant mimicking hyperphosphorylation inhibits protein synthesis in sea urchin cell-free cap-dependent translation system. Different amounts (20; 100; 200 or 1,000 ng) of recombinant proteins (GST, GST-Sg4E-BP (4E-BP), GST-Sg4E-BP YALA (YALA), GST-Sg4E-BP 4xE (4xE)) were added to the fertilized cell-free translation system and Luciferase activity was measured as described in Materials and Methods after addition of a cap mRNA encoding Renilla Luciferase. The Luciferase activity is represented in RLU (Relative Light Units). Error bars represent the standard deviation (s.d.) of duplicates.

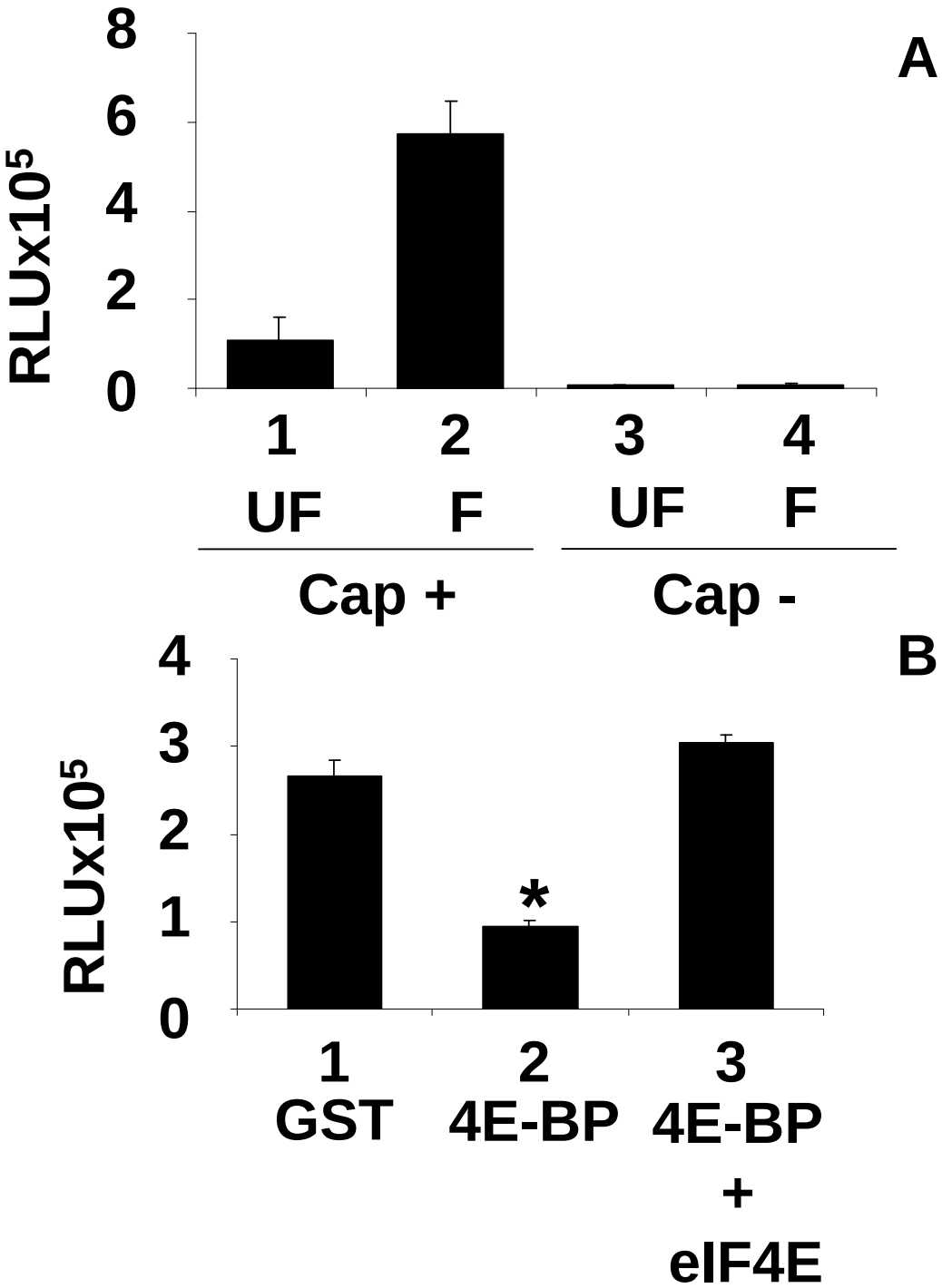
Figure 7. Translation inhibition mediated by the S/T-E Sg4E-BP mutant is rescued by GST-mIF4E. 200 ng of GST recombinant proteins (GST, GST-Sg4E-BP (4E-BP), GST-Sg4E-BP YALA (YALA), GST-Sg4E-BP 4xE (4xE)) were added to the fertilized cell free translation system with (lanes 6-10) or without (lanes 1-5) a 5 min preincubation with 500 ng of GST-mIF4E (eIF4E) and Luciferase activity was measured as described in Materials and Methods after addition of a cap mRNA encoding Renilla Luciferase. The Luciferase activity is represented in RLU (Relative Light Units). Error bars represent the standard deviation (s.d.) of duplicates.

```
                                  RAIP                                   *       *     YxxxxLϕ    *
S. granularis 4E-BP     MSA-PAAS-RQLSAGRDIPA-KRVAVSDPSQLP-QDYSTTPGGTLFSTTPGGTRIIYDRHFLLNMRNSPL 66
H. sapiens 4E-BP1       MSG-GSSCSQTP--SRAIPATRRVVLGDGVQLPPGDYSTTPGGTLFSTTPGGTRIIYDRKFLMECRNSPV 67
H. sapiens 4E-BP2       MSS-SAGSGHQPSQSRAIPT-RTVAISDAAQLP-HDYCTTPGGTLFSTTPGGTRIIYDRKFLLDRRNSPM 67
H. sapiens 4E-BP3       MST-STSC--------PIPG-------GRDQLP-DCYSTTPGGTLYATTPGGTRIIYDRKFLLECKNSPI 53
C. intestinalis 4E-BP   -----MSE------SKGIPI-RHIRLNHLSELP-NDYGTTPGGTFYSTTPGGTRIIYDRSFLLKCRSSPM 57
A. californica 4E-BP    -----MAGQDQSPKGREIPAIRRVVLNDVSQLP-SDYSSTPGGTLFSTTPGGTRIVYDRSRLMQLRNSPL 64
D. melanogaster Thor    MSASPTARQAITQALPMIT--RKVVISDPIQMP-EVYSSTPGGTLYSTTPGGTKLIYERAFMKNLRGSPL 67
N. vectensis 4E-BP      MNG-TQAERGSPL-ARAIPS-RRVPVHDPNHMP-SDYSTTPGGTIYSTTPGGTRIIYERKFLLELRNSPL 66

                          *
S. granularis 4E-BP     SQTPPKNLPSIPGVTCP-EVTD---DK----PNGESKAPTKS-KTEPGDD-------------------- 107
H. sapiens 4E-BP1       TKTPPRDLPTIPGVTSPSSDEP-----PMEASQSHLRNSPEDKR-AGGEESQ------------------ 113
H. sapiens 4E-BP2       AQTPPCHLPNIPGVTSPGTLIE---DSKVEVNNLNNLNNHDR-KHAVGDDA------------------- 114
H. sapiens 4E-BP3       ARTPPCCLPQIPGVTTPPTAPL---------SKLEELKEQET-EEEIPDDA------------------- 94
C. intestinalis 4E-BP   ANTPPSNLPDIPGVTSPDKSPTRQITKIKEEEEIANKDGSNGKENGDSHKDEEQ---------------- 111
A. californica 4E-BP    ARSPPPNMAKIPGITDFEPESSE---KSEAKDKENGPKEDSKDESKFGHDEHPQ---------------- 115
D. melanogaster Thor    SQTPPSNVPSCLLRGTPRTPFR-----KCVPVPTELIKQTKSLKIEDQEQ-------------------- 112
N. vectensis 4E-BP      AKSPPANLPVIPGVTCEDNGKP----EPEEKPEVTSLPGARG-EGGVGNRSPEISMCSQFSAYACMLAQF 131

                                  TOS
S. granularis 4E-BP     --------QFQMDI---- 113
H. sapiens 4E-BP1       ---------FEMDI---- 118
H. sapiens 4E-BP2       --------QFEMDI---- 120
H. sapiens 4E-BP3       --------QFEMDI---- 100
C. intestinalis 4E-BP   ---------FDLEI---- 116
A. californica 4E-BP    ---------FEMDI---- 120
D. melanogaster Thor    ---------FQLDL---- 117
N. vectensis 4E-BP      FRRARIV-FFDVLAARFN 148
```


4E-BP
GST
kDa
1 2 3 4 5 6
47,5
25
α GST
α eIF4E
UF F UF F UF F


A
RLUx10^5
8
6
4
2
0
1
2
3
4
UF
F
UF
F
Cap +
Cap -
B
RLUx10^5
4
3
2
1
0
*
1
GST
2
4E-BP
3
4E-BP
+
eIF4E

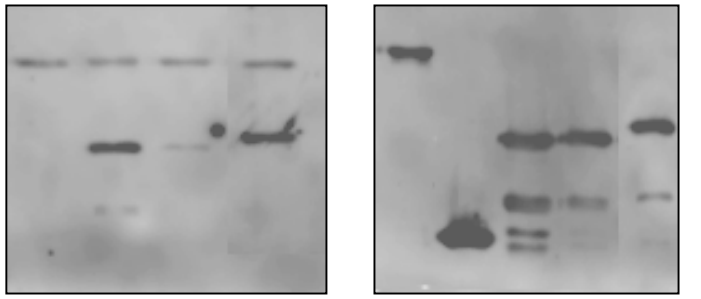
A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
eIF4E	+	+	+	+	+	–	–	–	–
GST	+	–	–	–	–	+	–	–	–
4E-BP	–	+	–	–	–	–	+	–	–
YALA	–	–	+	–	–	–	–	+	–
4xE	–	–	–	+	–	–	–	–	+

kDa

47,5–

32–

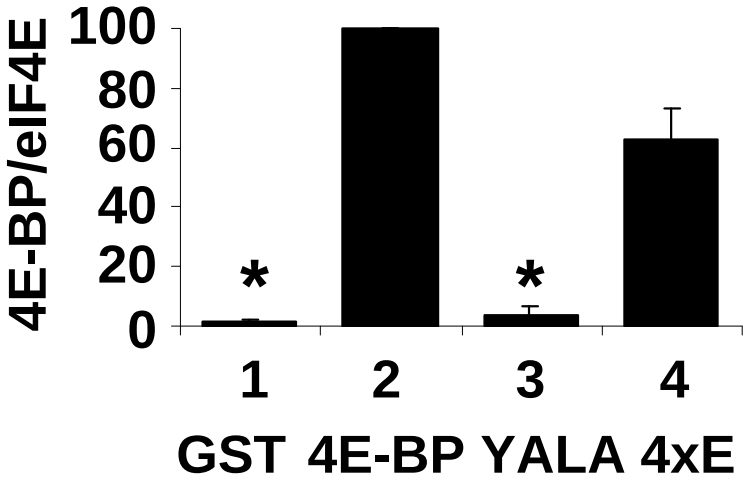


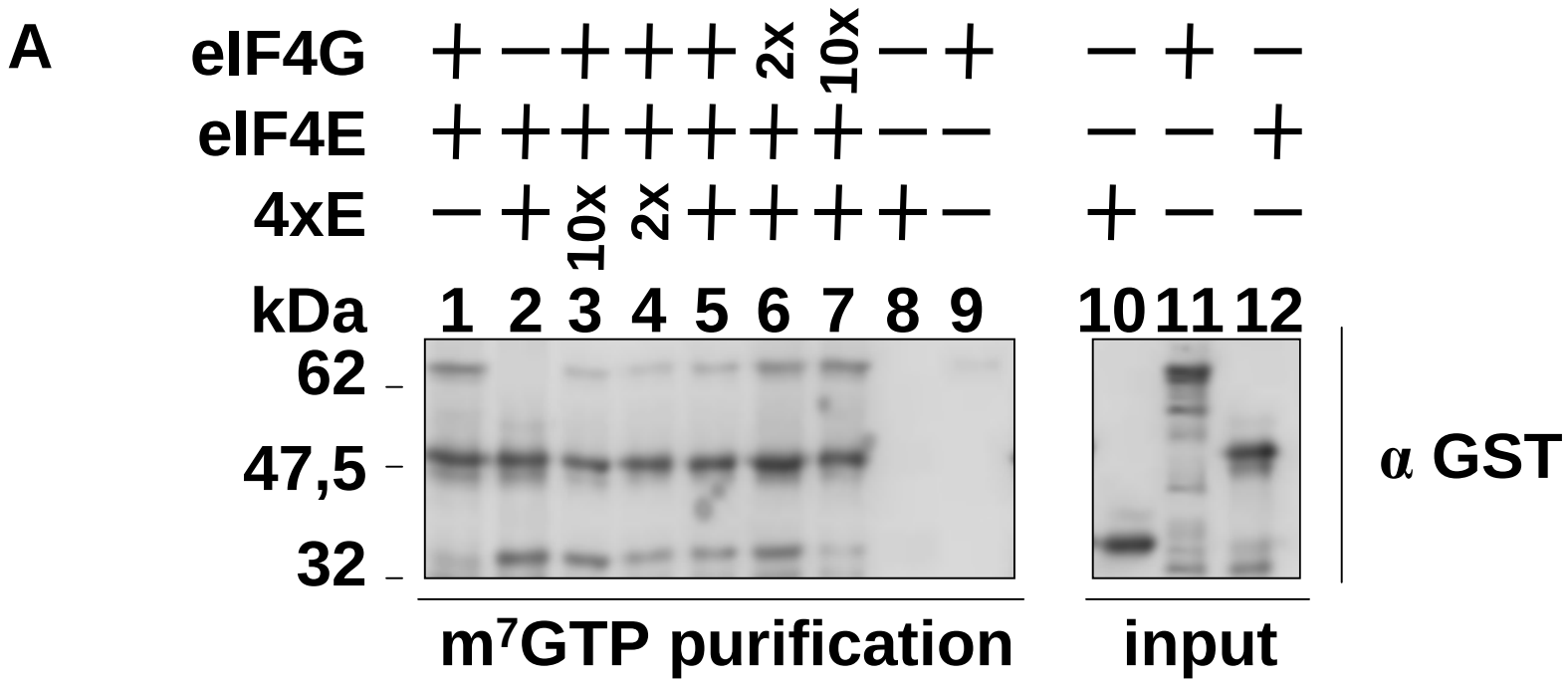
α GST

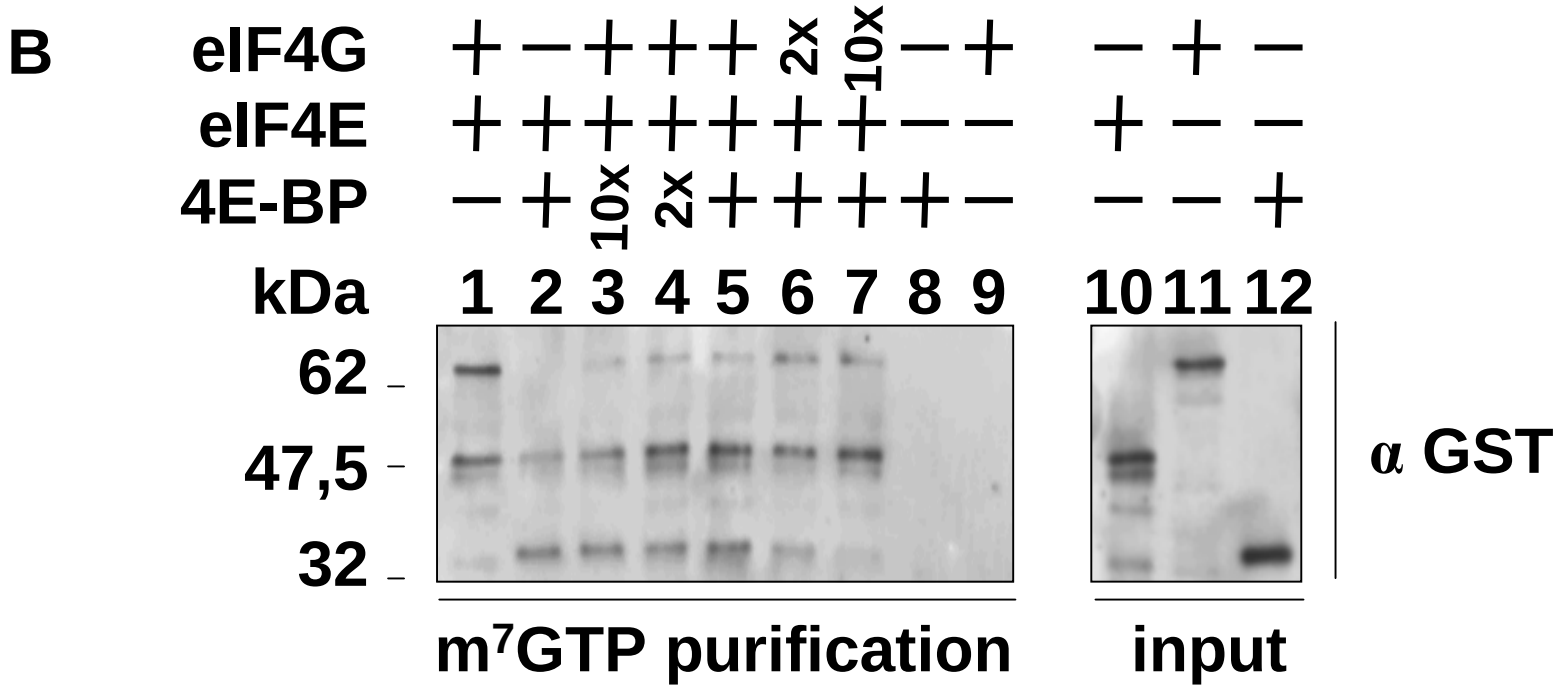
m^{7}GTP purification

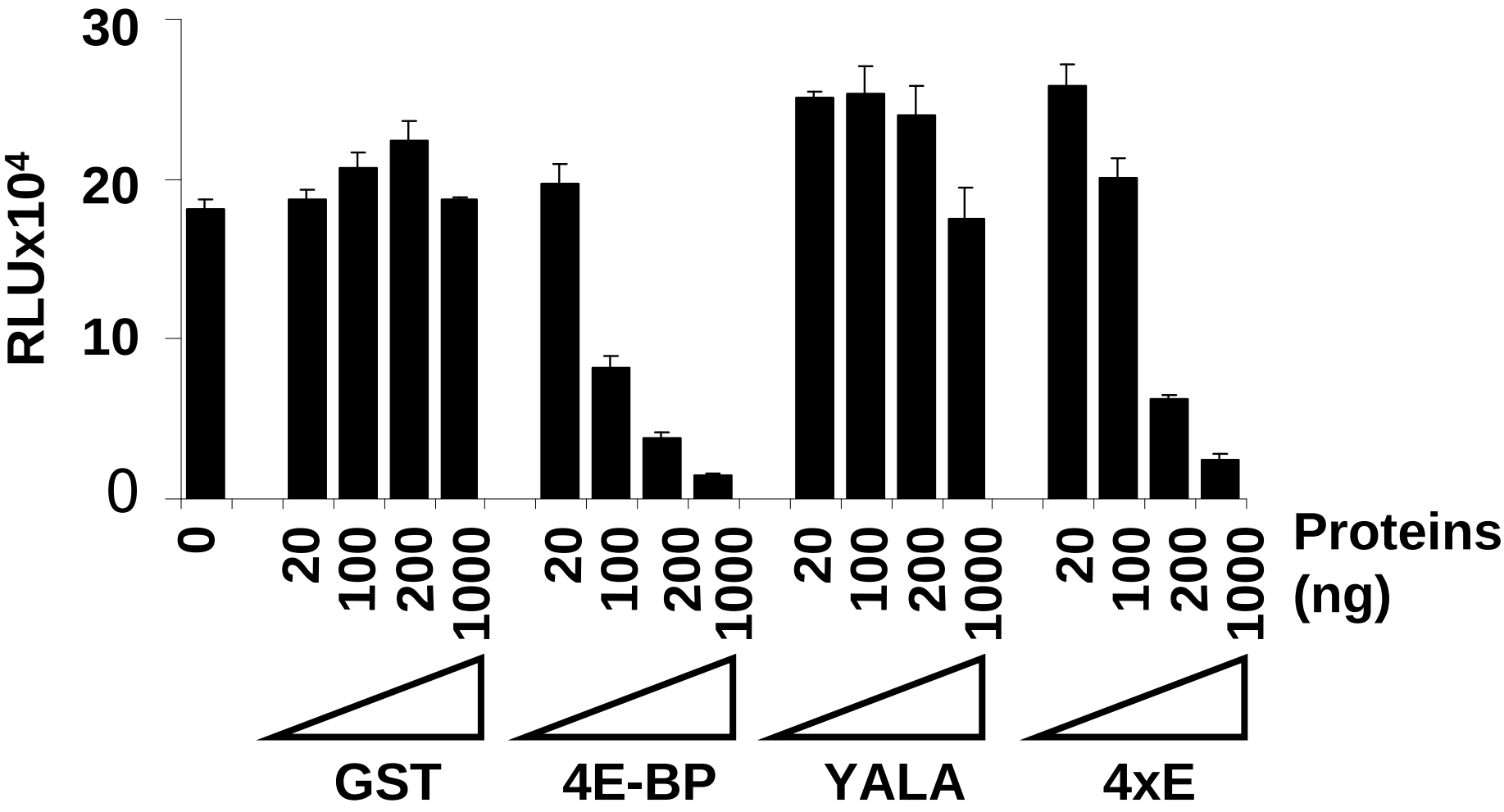
input

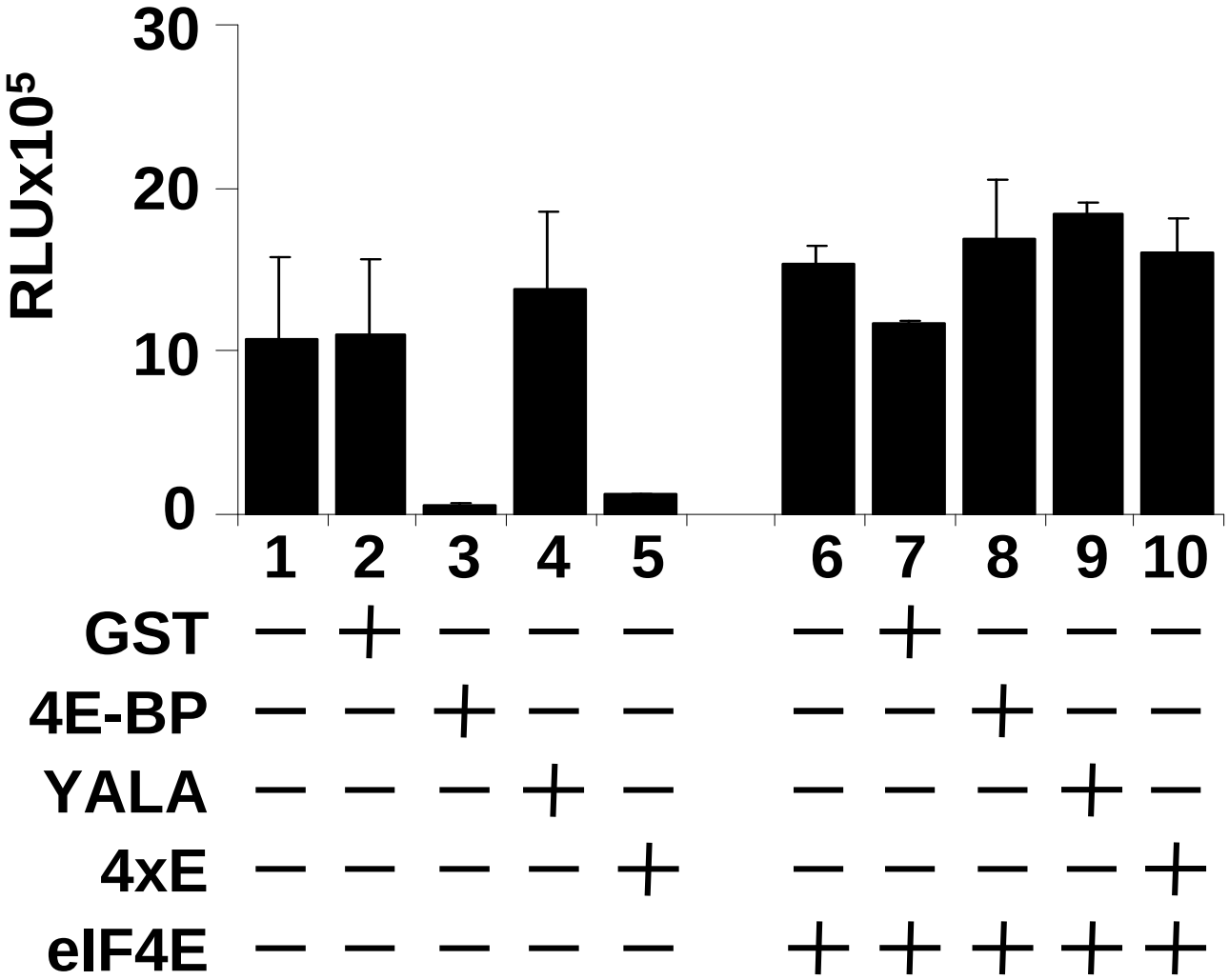
B




A
eIF4G + − + + + 2x 10x − + − + −
eIF4E + + + + + + + − − − − +
4xE − + 10x 2x + + + + − + − −
kDa 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
62
47,5
32
α GST
m7GTP purification
input


B
eIF4G + − + + + 2x 10x − + − + −
eIF4E + + + + + + + − − + − −
4E-BP − + 10x 2x + + + + − − − +
kDa 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
62
47,5
32
α GST
m7GTP purification
input


30
20
10
0
RLUx10^4
0
20
100
200
1000
20
100
200
1000
20
100
200
1000
20
100
200
1000
Proteins (ng)
GST
4E-BP
YALA
4xE


RLUx10^5
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
GST
4E-BP
YALA
4xE
eIF4E

III) Activation artificielle des ovules d'oursin par le calcium ionophore et le NH4Cl.

Article 3: Oulhen N, Morales J, Bellé R, Cosson B, Cormier P and Mulner-Lorillon O. Translational factors are modified after sea urchin egg artificial activation, leading to protein synthesis increase and Cyclin B synthesis. *In preparation*.

Cet article décrit les modifications des facteurs de traduction induites par le calcium ionophore et le NH4Cl dans les ovules d'oursin et fait le lien avec les acteurs du cycle cellulaire.

Dans les ovules d'oursin, la machinerie de traduction est modifiée après fécondation. Sg4E-BP est phosphorylé, dissocié de SgIF4E et dégradé. SgIF4E est alors libre pour s'associer aux multiples isoformes de SgIF4G. SgIF2 est déphosphorylé. La fécondation active le métabolisme des ovules et permet d'initier le développement en induisant principalement une augmentation de la concentration calcique dans le cytoplasme ainsi qu'une augmentation du pH intracellulaire (pHi). Pour comprendre les régulations traductionnelles induites par les modifications de calcium et de pHi, nous avons analysé les facteurs de traduction en réponse à une activation artificielle des ovules, par le calcium ionophore et le NH4Cl. Nous avons étudié en parallèle la synthèse de la cycline B ainsi que l'activité du complexe CDK1/cycline B dans ces conditions.

Résultats :

La synthèse protéique augmente après activation artificielle des ovules chez l'oursin *S. granularis*.

La GST-Sg4E-BP décrite dans l'article précédent a été utilisée pour produire un anticorps spécifique du 4E-BP de *S. granularis*. Par Western blot, nos résultats montrent pour la première fois que le facteur Sg4E-BP est dégradé et se dissocie de SgIF4E après activation artificielle par le calcium ionophore et le NH4Cl. De manière très intéressante, Sg4E-BP réapparaît après traitement au NH4Cl et se réassocie à SgIF4E.

Libéré de Sg4E-BP, SgIF4E s'associe aux multiples isoformes de SgIF4G après activation par le calcium ionophore de manière comparable à la régulation post fécondation. Des résultats très originaux sont obtenus après modifications du pHi par le NH4Cl puisque seules les formes basses de SgIF4G sont associées à SgIF4E. Ces résultats suggèrent que ces formes basses seraient suffisantes pour stimuler la synthèse protéique dépendante de la coiffe. Elles se dissocient partiellement par la suite en laissant la place à Sg4E-BP. Il faut noter que

la synthèse protéique se poursuit lorsque Sg4E-BP se réassocie à SgIF4E. L'analyse de ce phénomène représente un challenge important pour comprendre les régulations traductionnelles.

Le facteur SgIF2 est déphosphorylé après activation artificielle par le calcium ionophore et le NH4Cl, de façon similaire à la fécondation.

Nos résultats montrent pour la première fois l'existence de deux isoformes du facteur d'élongation SgEF2. Ces formes sont régulées de manière différente que ce soit après fécondation ou après activation artificielle.

Le calcium ionophore et le NH4Cl stimulent la synthèse de la cycline B mais sont insuffisants pour activer le complexe CDK1/cycline B. L'analyse de ces processi nous permettra de mieux comprendre la régulation du cycle cellulaire et les voies de signalisation mises en jeu.

Ces résultats fournissent la première preuve que les facteurs de traduction sont modifiés après une activation artificielle des ovules d'oursin par le calcium ionophore et le NH4Cl et indiquent que des événements supplémentaires sont nécessaires à l'activation du complexe CDK1/cycline B.

Bilan :

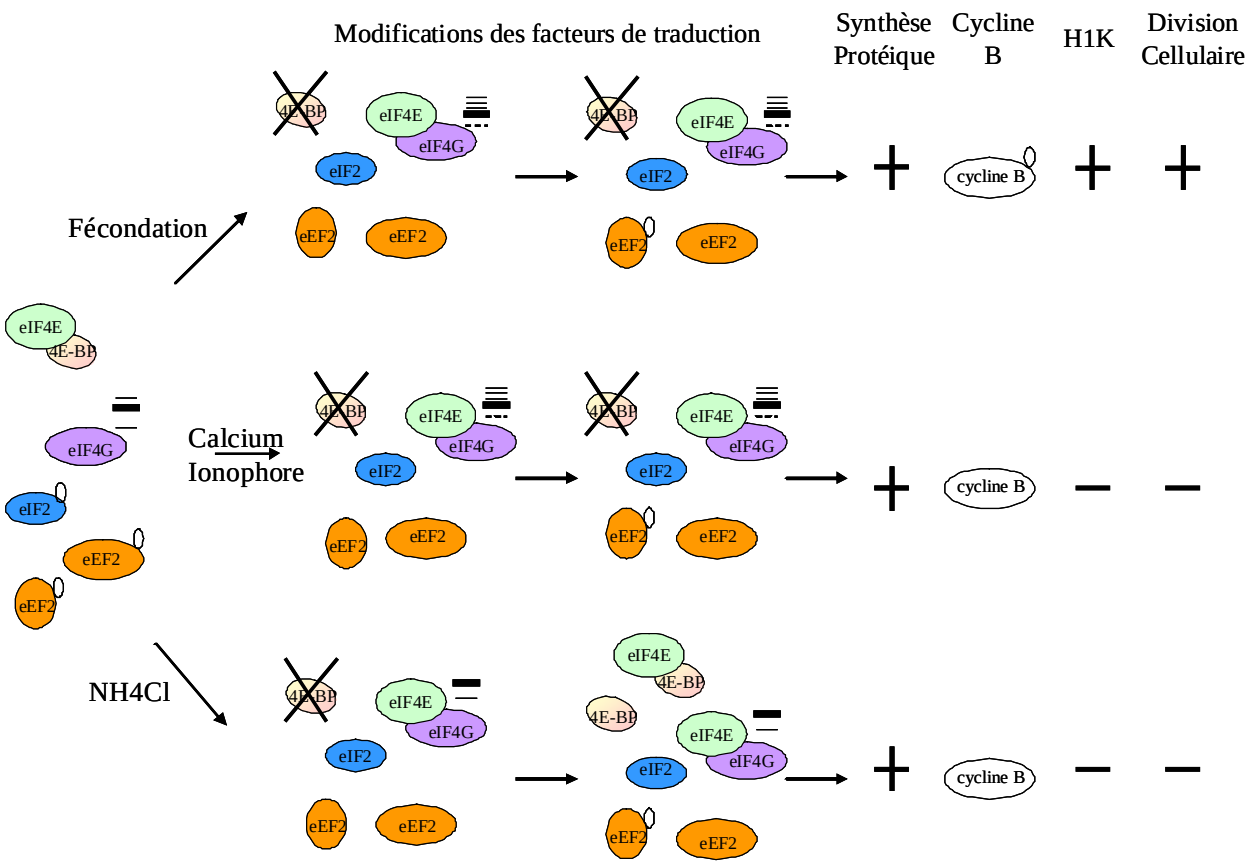


Figure 28 : Modifications des facteurs de traduction et analyse du complexe CDK1/cycline B après fécondation et activation artificielle des ovules d'oursin. *Dans les ovules : eIF4E est lié à 4E-BP, les formes basses d'eIF4G sont présentes mais peu associées à eIF4E (les isoformes d'eIF4G sont représentées par des traits noirs situés à côté de la protéine, la bande la plus intense représentant le signal majoritaire à 175 kDa). Le facteur eIF2 ainsi que les deux isoformes d'eEF2 sont phosphorylés (les phosphorylations sont représentées par un ovale blanc). La fécondation entraîne la dégradation de 4E-BP et l'association d'eIF4E avec les multiples isoformes d'eIF4G. Les facteurs eIF2 et eEF2 sont déphosphorylés. La forme courte d'eEF2 est ensuite rephosphorylée. Les mêmes résultats sont obtenus après activation par le calcium ionophore. En revanche, après traitement par le NH4Cl, les facteurs 4E-BP et eIF4G se comportent de manière originale. Après dégradation, 4E-BP réapparaît et se réassocie à eIF4E. Seules les formes basses d'eIF4G se fixent sur eIF4E. Dans les trois types d'activation, la synthèse protéique est stimulée et permet de synthétiser la cycline B mais seule la fécondation aboutit à la phosphorylation de la cycline B, à l'activation du complexe CDK1/cycline B (mesurée par l'activité H1K) et à la division cellulaire.*

Translational factors are modified after sea urchin egg artificial activation, leading to protein synthesis increase and Cyclin B synthesis.

Nathalie Oulhen, Julia Morales, Robert Bellé, Bertrand Cosson, Patrick Cormier, Odile Mulner-Lorillon

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR 7150 Mer et Santé ;

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 ;

Université Européenne de Bretagne, UEB ;

Equipe Traduction, Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff,

29682 Roscoff CEDEX, France.

Abstract

Fertilization of sea urchin eggs triggers a global increase in protein synthesis, required for the first mitotic division, through a signaling pathway involving a transient increase of cytoplasmic free calcium followed by a sustained intracellular pH elevation. Artificial elevation of intracellular calcium by ionophore or alkalinization in presence of NH4Cl were both reported to induce an increase in protein synthesis in unfertilized eggs. Analysis of translational factors showed that 4E-BP (4E-Binding Protein) is degraded and dissociated from eIF4E, eIF4G is associated with eIF4E, eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) and eEF2 (eukaryotic Elongation Factor 2) are dephosphorylated after fertilization. The same rapid modifications of these factors are also observed after artificial activation by calcium ionophore or NH4Cl treatment. We show that cyclin B is synthesized and accumulates after artificial egg activation but no CDK1/cyclin B activation is observed. Interestingly, specific features were observed for the eIF4 proteins after NH4Cl treatment. We further report the existence of two eEF2 isoforms in unfertilized eggs, which are differentially regulated by phosphorylation following fertilization and activation. Altogether, these data represent a valuable contribution to the elaboration of regulatory network of translational regulation following fertilization.

Introduction

Sea urchin ovulated eggs are metabolically quiescent cells arrested at the G1 step of the cell cycle after completion of their meiotic divisions. Fertilization triggers metabolism activation and cell cycle re-entry and progression through the early divisions of embryonic development. The fertilization-induced activation of the sea urchin eggs is mediated by two ionic changes in the egg cytoplasm: a transitory increase in cytoplasmic free intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration and a sustained rise in intracellular pH (pHi) [review in Epel, 1990]. Both events are required to induce a rapid and dramatic increase in protein synthesis that is needed for progression in the first mitotic cell division [Wagenaar, 1983; Dube, 1988]. Artificial intracellular elevations of calcium using calcium ionophore treatment or of pH using ammonia incubation were reported to induce protein synthesis increase into unfertilized eggs [Epel, 1978; Whitaker and Steinhardt, 1982]. Calcium ionophore is able to modified pH with the same level observed after fertilization in the sea urchin *L pictus* eggs [Whitaker et Steinhardt, 1981]. Ammonia provokes only small transitory calcium influx not sufficient for fertilization membrane elevation and not required for NH4Cl activation [Zucker et al, 1978]. Those treatments designed as artificial activations do not lead to cell division [Steinhardt and Epel, 1974; Epel et al, 1974].

The synthesis of proteins following fertilization results from the translation of maternally stored mRNAs [Epel, 1967; Brandhorst, 1976], among which the one encoding for cyclin B [Evans et al, 1983]. Cyclin B synthesis is known to be essential for the activation of CDK1, the kinase controlling the onset of the G2/M transition [review in Murray, 2004]. Sea urchin early development represents an excellent model to analyze the relationships between cell cycle regulation and translational control.

In the last several years, it has become obvious that translation is a key control point for gene expression. This level of regulation was evidenced in the signaling pathways of physio-pathological stimuli (as insulin, stress, viral infection), in the regulation of cell growth and differentiation as well as in embryonic development [review in Mathews et al, 2007]. The regulatory events driving translation control involve rapid changes in the activity or association of components of the translational

machinery. At the level of initiation, usually regarded as the major rate-limiting step for mRNA translation, two key control points are generally studied: the availability or activity of the cap-binding factor eIF4E, mainly regulated by the 4E-BP family of proteins [review in Averous and Proud, 2006; Sonenberg, 2008] and the activity of the guanine nucleotide exchange factor eIF2B, involved in the 43S initiation complex formation [reviews in Webb and Proud, 1997; Kubica et al, 2006]. It was recently emphasized that regulation at the elongation level could play significant role for controlling translation [Le Sourd et al, 2006; Proud, 2007], notably through the phosphorylation of eEF2, the factor responsible for ribosomal translocation [Kimball, 2001; Proud, 2006].

In mammalian cells, the binding of eIF4E to 4E-BP, blocking its interaction with eIF4G and making eIF4E unavailable for initiation complex formation, is regulated by the phosphorylation status of 4E-BP through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [review in Mamane et al, 2006]. An additional and new level of translational control was discovered for this translational repressor in *Sphaerechinus granularis* (Sg) sea urchin embryos. Fertilization triggers the rapid degradation of Sg4E-BP, allowing SgIF4E to interact with SgIF4G to activate the cap-dependent translation [Cormier et al, 2001; Salaun et al, 2003, Salaun et al, 2005, Oulhen et al, 2007]. It was demonstrated that Sg4E-BP degradation after fertilization is regulated by a wortmannin and rapamycin-sensitive signaling pathway, therefore implicating PI3K and mTOR kinase [Salaun et al, 2004].

The binding of the initiator methionyl-tRNA (met-tRNAi) to the 40S ribosomal subunit to form the 43S preinitiation complex is regulated by the activity of eIF2B, which catalyzes the exchange of GTP/GDP at the level of eIF2. It was reported that the interaction between eIF2B and eIF2 depends on the phosphorylation of the epsilon subunit of eIF2B directed by GSK3 and CKII [Wang et al, 2001]. On the other hand, the activity of eIF2B is regulated by phosphorylation of eIF2. Phosphorylation of the α subunit of eIF2, by one of the several stress-responsive eIF2 kinases, converts eIF2 from a substrate to a competitive inhibitor of eIF2B through the sequestration of eIF2B in inactive phosphorylated eIF2B-eIF2α complexes [reviewed in Dever et al, 2007]. Recent studies in sea urchin embryos have recently demonstrated that protein synthesis inhibition occurring during DNA-damage induced apoptosis correlated with the re-phosphorylation of SgIF2α, which had been dephosphorylated after fertilization [Le Bouffant et al, 2008].

Sea urchin embryos could also serve as an efficient model to analyze the pathways of translation control at the level of elongation. In fact, the regulation of protein synthesis activity following fertilization and during the first embryonic cell divisions was showed to implicate changes in the elongation rate [Monnier et al, 2001] associated with modification in the SgEF1B localization [Boulben et al, 2003]. The role of eEF2, a key regulatory factor at the level of elongation, has not yet been investigated in sea urchin embryo. In mammalian cells, the phosphorylation of eEF2 by a highly specific Ca/CaM dependent kinase totally inactivates the factor, thus impairing translation. The activity of eEF2kinase is under the control of a number of kinases of the MAPK and the mTOR signaling pathways [Browne and Proud, 2002].

Here, we report the modifications of different key translation factors correlated with the protein synthesis increase following fertilization of sea urchin eggs and compared them to their modifications during artificial activation by calcium ionophore or ammonia. Initiation factors were modified in the same way after artificial activation or fertilization. Sg4E-BP is degraded and dissociates from SgIF4E in correlation with SgIF4G/SgIF4E complex formation. Ammonia treatment results in the reversible degradation of Sg4E-BP and in the association of SgIF4G specific isoforms with SgIF4E. SgIF2α is dephosphorylated after fertilization as well as after artificial activation. Furthermore we report the existence of two SgEF2 isoforms in sea urchin eggs, the phosphorylation of which is regulated after fertilization and following calcium ionophore or ammonia treatment. Finally we show that in these conditions, cyclin B is synthesized but this is not sufficient for CDK1/cyclin B activation. Taken together, our results enable to better understand the molecular mechanisms involved in translational regulation and the link with the cell cycle regulation.

Results

Protein synthesis increases after sea urchin egg activation. Protein synthesis activity, estimated as [^{35}S] methionine incorporation into proteins after 10 min pulse incubations, was analyzed in sea urchin eggs at different times following fertilization and activation by calcium ionophore or by alkalinisation (NH4Cl) treatments. As reported [Epel, 1990, Monnier et al, 2001], protein synthesis activity rose as early as 15 min after fertilization and continued to increase progressively during the first 3 hours (Fig 2). A global increase of 5 to 10 fold was generally found in fertilized eggs as compared to unfertilized eggs, depending on females. Eggs treatment by ionophore or by alkalinisation also induced a rapid increase in protein synthesis activity (Fig 2), consistent with previous reports [Steinhardt et Epel, 1974; Dubé et Guerrier, 1983]. The synthesis activity in activated eggs remained generally lower than the activity observed in fertilized eggs. Among different experiments performed on individual females, the stimulation by ionophore ranged from x3 to x8 and by alkalinisation from x2 to x4. It was reproducibly observed that fertilized eggs divided in 120 to 150 min., whereas activated eggs never showed dividing features, even if ionophore treatment always induced fertilization membrane rise, known to result from the intracellular calcium elevation that provokes cortical granule exocytosis (data not illustrated). In order to characterize the molecular pathways controlling the protein synthesis increase after fertilization and egg activation, we decided to investigate the modifications of some key translation factors.

Sg4E-BP is degraded after sea urchin egg activation. To analyze the level of the translational inhibitor 4E-BP in sea urchin eggs, a polyclonal antibody directed against the GST-tagged Sg4E-BP was produced (see Materials and Methods). Using this antibody, we performed western blot analysis of extracts prepared every 15 min after egg activation (Fig 3). Extracts from unfertilized eggs prepared in the same conditions showed that Sg4E-BP protein level was stable for at least 3 hours of incubation (Fig 3A). As it was previously shown [Salaun et al, 2003], the total amount of Sg4E-BP decreased rapidly following sea urchin egg fertilization (Fig 3B). Same results were obtained after sea urchin egg activation: Sg4E-BP was degraded in less than 15 min after calcium ionophore (Fig 3C) or NH4Cl

treatment (Fig 3D). It was verified that the amount of actin, used as a loading control, remained unchanged whatever was the treatment (Fig 3). Interestingly, while Sg4E-BP remained undetectable for at least 3 hours after fertilization or after calcium ionophore activation, the protein could be readily detected in eggs 90 min following NH4Cl treatment. To analyze whether this reappearance resulted from new protein synthesis, we used emetine, a potent inhibitor of elongation, which at 100 µM rapidly abolishes protein synthesis in sea urchin eggs [Hogan et Gross, 1971]. Emetine applied 30 min before NH4Cl exposure did not interfere with the degradation of Sg4E-BP 15 min following NH4Cl treatment but totally prevented the reappearance of Sg4E-BP normally occurring after 90 min (Fig 4).

Taken together, these results demonstrate that the degradation of Sg4E-BP triggered by fertilization involves a calcium and pH dependent signaling pathway and that eggs alkalinization implicated a specific process, depending on new protein synthesis and resulting in Sg4E-BP reappearance after the degradation phase.

Sea urchin egg activation induces Sg4E-BP/SgIF4E dissociation. We purified sea urchin SgIF4E in the different activation conditions by affinity chromatography and compared the co-purified proteins by Western Blot analysis (Fig 5). As already showed [Cormier et al, 2001], Sg4E-BP was associated with SgIF4E in unfertilized eggs (Fig 5A) and fertilization triggers the dissociation of Sg4E-BP/SgIF4E complex (Fig 5B). Interestingly, calcium ionophore (Fig 5C) and NH4Cl (Fig 5D) activation also induced a decrease in the association between Sg4E-BP and SgIF4E. Thus, the dramatic decrease in Sg4E-BP total amount after egg activation was correlated with Sg4E-BP/SgIF4E complex dissociation. Moreover, it was shown that the Sg4E-BP that reappears after NH4Cl treatment was able to re-associate with SgIF4E (Fig. 5D). These results indicate that SgIF4E/Sg4E-BP complex is regulated by calcium and pH modifications.

SgIF4G association with SgIF4E increases after sea urchin egg activation. Several SgIF4G isoforms exist in sea urchin unfertilized eggs and embryos and are able to associate with SgIF4E [Oulhen et al, 2007]. Using a sea urchin specific antibody, we showed that a low level of two SgIF4G isoforms (at 175kDa and below) was associated with SgIF4E in unfertilized eggs (Fig 5A). Fertilization increased the association of the 175kDa isoform with SgIF4E and induced SgIF4G high isoforms (above 175kDa) association with SgIF4E (Fig 5B). In a similar manner, the 175kDa and higher isoforms of SgIF4G were found associated with SgIF4E in sea urchin eggs activated by calcium ionophore (Fig 5C). Strikingly, in eggs activated by NH4Cl, no high SgIF4G isoforms were found associated with SgIF4E (Fig 5D). We observed an increase in the association of SgIF4E with the two low SgIF4G isoforms (at 175kDa and below) purified from unfertilized eggs. Moreover, the association of these SgIF4G isoforms with SgIF4E decreased at 120 min after treatment, in correlation with the Sg4E-BP association increase. These results demonstrate that SgIF4G association with SgIF4E is controlled by the presence of Sg4E-BP/SgIF4E following activation by calcium ionophore and NH4Cl as it is the case after fertilization. Furthermore, NH4Cl treatment led to a specific SgIF4G/SgIF4E association.

SgIF2 is dephosphorylated after sea urchin egg activation. Another important step of translation initiation regulation involves eIF2α phosphorylation. Previous results suggest that SgIF2α participates to the control of translational regulation during sea urchin early embryonic development in physiological conditions [Le Bouffant et al, 2008]. Immmunoblotting of proteins from unfertilized (Fig 6A) and fertilized eggs (Fig 6B) collected every 15 min, were used as a control to confirm that SgIF2α was dephosphorylated early after fertilization and remained under its dephosphorylated during the first three hours. The SgIF2α total amount was analyzed in parallel and showed no variation during the same time. The SgIF2α phosphorylation state was then explored after sea urchin egg activation by calcium ionophore and NH4Cl (Fig 6C and 6D). In both cases, SgIF2α was progressively dephosphorylated as it happens following sea urchin fertilization. This result indicates that the dephosphorylation of SgIF2α is under a calcium and pH dependent signaling pathway as the degradation of Sg4E-BP

Unfertilized eggs contain two phosphorylated SgEF2 isoforms. Analysis of the *Strongylocentrotus purpuratus* complete genome [Morales et al, 2006] revealed that the sea urchin elongation factor 2 was encoded by a unique gene sharing 75% identity with its human homolog at the level of protein primary sequence, and possessed the conserved phosphorylatable threonine residue (Thr-56 as numbered in the human sequence) known to be the site of regulation by eEF2kinase [Browne et Proud, 2002]. Using commercial antibodies, we analyzed the presence and phosphorylation status of eEF2 in *S. granularis* unfertilized eggs (Fig. 7). Unexpectedly, an antibody directed against the phosphorylated form of human EF2 (hEF2), revealed two proteins migrating at respectively 80 and 83kDa in the sea urchin unfertilized eggs (Fig 7A). These two bands were also detected with an antibody directed against the C-Terminal region of hEF2 (Fig 7B). Using this antibody, quantification analysis indicated that the upper band was 10 times more abundant than the other one. In contrast, an antibody directed against hEF2 N-Terminal region did not recognize the lower protein (Fig. 7C). Altogether, these results demonstrate the presence of two isoforms for SgEF2. Both proteins are expressed under their phosphorylated form in unfertilized eggs. The epitote of the N-Ter region of the human protein is present only in the upper 83 kDa isoform, suggesting that the lower protein represents a truncated SgEF2 missing the N-Terminal region.

Phosphorylation of sea urchin SgEF2 isoforms shows complex pattern following fertilization and activation. The level and phosphorylation of the two SgEF2 isoforms was analyzed after fertilization and activation by calcium ionophore or NH4Cl treatment (Fig 8). Whatever treatment, the amount and ratio of the two SgEF2 isoforms remained unchanged. On the other side, fertilization as well as ionophore or NH4Cl treatment triggered dephosphorylation of both SgEF2 isoforms in less than 15 minutes. Strikingly, as early as 30 min, the phosphorylation of the lower 80 kDa reappeared increasing progressively with time up to at least 3 hours (Fig 8B, 8C, 8D). By the same time, the upper 83 kDa remained weakly or undetectably phosphorylated (Fig 8B, 8C, 8D). Taken together, these results indicate that SgEF2 phosphorylation is highly regulated after sea urchin eggs fertilization through a calcium and pH dependent regulatory pathway.

Cyclin B is synthesized and accumulates after egg activation but it is not sufficient for CDK1/cyclin B activation. In sea urchins, CDK1/cyclin B complex activation is largely dependent on translation to enter the first cell cycle following fertilization [Arion and Meijer, 1989]. Protein synthesis increases after calcium ionophore and NH4Cl treatment in sea urchin eggs, but no CDK1/cyclin B complex activation was observed [Meijer and Pondaven, 1988]. In order to correlate the results of translational factor modifications, protein synthesis increase and entry in the cell cycle, the CDK1/cyclin B activation was analyzed in the conditions used above. CDK1/cyclin B complexes were purified by affinity chromatography on p13-suc1-Sepharose beads and assayed *in vitro* for histone H1 Kinase activity following eggs fertilization and artificial activation (Fig 9). As expected, whereas activity remained unchanged in unfertilized eggs, a characteristic peak of CDK1/cyclin B activation was observed 105 to 120 min after fertilization (Fig 9A, 9B). During the same period, no H1kinase activity peak, reflecting the CDK1/cyclin B complex activation, was detectable after calcium ionophore (Fig 9A) or NH4Cl (Fig 9B) treatment. This is consistent with the observation that no cell division occurs after sea urchin eggs artificial activation. The cyclin B level was monitored by immunoblotting in total extracts of eggs after fertilization and artificial activation using a specific sea urchin cyclin B antibody [Lozano et al, 1998]. Two bands of cyclin B were reproducibly observed in unfertilized eggs (Fig 10A), related to different phosphorylated forms of the protein [Meijer et al, 1989]. After fertilization, the intensity of the lower band increased with time until 105 min, reflecting the synthesis of cyclin B triggered by fertilization and required for CDK1/cyclin B complex activation. A shift in the ratio between the lower and the upper band then occurred that is the sign of the overall phosphorylation of cyclin B correlated to CDK1/cyclin B activation, Thereafter, the two bands became undetectable between 165 and 180 min (Fig 10B) as a result of cyclin B degradation corresponding to the cells exit from mitosis. These observations are consistent with the data obtained in the sea urchin *Arbacia punctulata* [Evans et al, 1983]. In calcium ionophore (Fig 10C) and NH4Cl (Fig 10D) activated eggs, cyclin B was synthesized and the lower band accumulated, reaching level well above the level observed in fertilized eggs. However, the characteristic shift of CDK1/cyclin B activation and the disappearance of the band reflecting the CDK1-induced degradation of cyclin B was never

observed up to 3 hours after treatment. In all cases, the amount of CDK1 as revealed with the PSTAIR antibody, did not vary. It was verified that the cyclin B synthesized in the artificially activated eggs was able to interact with CDK1 since the protein was found associated to CDK1 upon affinity purification on p13 beads (data not illustrated). Altogether, our results demonstrate that cyclin B is synthesized after egg activation as well as after fertilization, but this is not sufficient for CDK1/cyclin B complex activation.

Discussion

In this report, we investigated the molecular pathway involved in the protein synthesis increase triggered by fertilization in sea urchin embryo. It had yet been reported that posttranslational degradation of 4E-BP [Cormier et al, 2001; Salaun et al, 2003] and complex modifications of eIF4G [Oulhen et al., 2007] were responsible, at least in part for the stimulation of translation following fertilization. Our present results demonstrate that two additional translational regulators are modified in sea urchin embryos in time correlation with the protein synthesis increase. The initiation factor eIF2α and the elongation factor eEF2, known to act as inhibitors of translation under their phosphorylated forms [Proud, 2007], are both rapidly dephosphorylated following fertilization. Altogether, this suggests that the protein synthesis restraint could be coordinately controlled by the presence of high level 4E-BP and the inhibitory phosphorylation of eIF2α and eEF2 in unfertilized eggs and that the post-fertilization translation increase relies on the release from these three inhibitory factors. Our results further demonstrate that 4E-BP degradation, eIF2 and eEF2 dephosphorylation are under the control of Ca^{2+} and pH dependent events which are triggered by fertilization since they occurred in unfertilized eggs after artificial activation induced by calcium ionophore or ammonia treatment. We further show that 4E-BP degradation and eIF2α and eEF2 dephosphorylation induced by artificial activation are correlated, as in fertilized eggs, with an increase in global protein synthesis activity together with the neosynthesis of cyclin B. The level of cyclin B reached in artificially activated eggs is even higher than in fertilized embryos although the complex CDK1/cyclin B remains in its inactivated form. Our results confirm that cyclin B synthesis although necessary is not sufficient

to trigger CDK1/cyclin B activation and that an additional event, probably related with the tyrosine dephosphorylation of CDK1 is triggered by fertilization but not by artificial activation through intracellular calcium or pH increases.

Interestingly, specific features were observed after ammonia treatment. First, following an early phase of degradation, Sg4E-BP protein reappears in the treated eggs, under an emetine sensitive process. A possible explanation would be that the treatment by ammonia provoked only a transient intracellular alkalinization of the eggs, which is reversed after 1 hour. However, on the one hand, it seems strange that the reversibility does not apply to the other factors, SgIF2α and SgEF2 that remain under their dephosphorylated form at least up to three hours after NH4Cl treatment and, on the other hand, measurements of intracellular pH performed under comparable incubation conditions in ammonia were not indicative of a transient alkalinization [Dube and Epel, 1986]. It has been shown that Sg4E-BP expression is up regulated in sea urchin embryos following hypoxic stress, or DNA damage checkpoint activation implicating Sg4E-BP in the apoptotic activation pathway [Le Bouffant et al, 2006; Le Bouffant et al, 2008]. As reported here and confirming previous studies, ammonia treatment never induces the occurrence of a M-phase in the sea urchin eggs. Such activated eggs contain high level of cyclin B capable to associate with CDK1, however the complex remains in its inactivated form, probably due to the tyrosine inhibitory phosphorylation of CDK1, a situation characteristic of the G2/M checkpoint activation which is often followed by apoptosis activation [Kastan et Bartek, 2004]. We hypothesize that in artificially activated eggs, the reversible disappearance of Sg4E-BP would allow the cells arrested by checkpoint mobilization or waiting for missing pathways existing after fertilization, thus representing equilibrium between survival and apoptosis.

The situation appears somehow different in eggs activated by calcium ionophore. As after ammonia treatment, the calcium ionophore treatment leads to protein synthesis activation and cyclin B synthesis, through Sg4E-BP degradation and SgIF2α and SgEF2 dephosphorylation. However, the large increase in intracellular calcium triggered by ionophore incubation does not mimic the physiological transient and localized modifications of calcium intracellular levels that are known to occur in fertilized eggs [review in Roux et al, 2006]. Above all, the sustained high intracellular

calcium concentration induced by ionophore treatment must result in an inhibition of the CDK1/cyclin B activity as already demonstrated [Suprynowicz et al, 1994].

A second interesting result observed after ammonia induced eggs activation is the behaviour of the SgIF4G isoforms. As already reported [Oulhen et al, 2007], our results confirm that fertilization induces the appearance of a number of SgIF4G isoforms and their rapid association with SgIF4E in perfect synchronization with the release of SgIF4E from its repressor Sg4E-BP. The same pattern of SgIF4G isoforms modification and association with SgIF4E is observed in calcium ionophore treated eggs demonstrating that both the Sg4E-BP degradation and the SgIF4G modifications are under the calcium-signaling pathway of fertilization. On other hand, after ammonia treatment, the rapid association of the low SgIF4G isoforms with SgIF4E correlates with the disappearance of Sg4E-BP and the associated increase in translation rate. Intriguingly, the high SgIF4G isoforms are not associated with SgIF4E. Furthermore, the reappearance of Sg4E-BP in 120 min ammonia treated-eggs correlates with its re-association with SgIF4E together with a decrease in the SgIF4G isoforms association. Altogether, an acute comparison of the modifications in the Sg4E-BP/SgIF4E/SgIF4G complex formation after fertilization and ammonia treatment will help to characterize the role of this highly regulated complex in the control of translation.

A major essential finding reported here concerns the elongation factor eEF2 and its regulation after fertilization. We found that two SgEF2 isoforms are present in sea urchin eggs and embryos. As only one gene was identified in the sea urchin *S. purpuratus* genome [Morales et al, 2006], the two isoforms can result either from the translation of the same messenger at the level of two close initiation sites either from a post-translational modification such as a cleavage. These hypotheses are under investigations. Moreover, we provide here the first evidence that SgEF2 is regulated in eggs and embryos. In unfertilized eggs both SgEF2 isoforms are phosphorylated, therefore under their inhibited form involving SgEF2 in the protein synthesis repression that exists in the eggs before fertilization. Fifteen minutes following fertilization, both SgEF2 isoforms are de-phosphorylated, presumably participating to the derepression of the protein synthesis machinery induced by fertilization. As reported up to now, eEF2 is phosphorylated by the unique eEF2kinase (eEF2K), which has calcium-calmodulin dependent activity [Ryazanov, 2002] and eEF2 is dephosphorylated by the phosphatase

PP2A [Everett et al, 2001]. Considering that intracellular calcium is increased after fertilization and calcium ionophore activation, our results suggest that the dephosphorylation of SgEF2 in these conditions is not due to eEF2K inhibition but results from a phosphatase activation. Therefore, we propose that the signaling pathway leading to the activation of PP2A depends on calcium and pH increase.

Strikingly, while the upper SgEF2 isoform remains mainly under its de-phosphorylated form during at least 3 hours after fertilization (as well as after calcium ionophore or ammonia treatment), in correlation with the high translation rate during the same time, the lower form begins to re-phosphorylate as early as 30 min. Considering that the lower form represents a minor part of the total SgEF2 amount, we propose that this phosphorylated form inhibits the synthesis of a specific protein involved in the control of fertilization events. Investigations are currently performed to define the specific role(s) of the SgEF2 isoforms in translation and cell cycle regulation.

All these data concerning translational factors modifications will be use to design the first translational regulation network during the early embryonic development in sea urchin.

Materials and Methods

Chemicals

4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF) and glycine were purchased from Interchim. Acetylcholine, Sodium orthovanadate, Tetrasodium pyrophosphate (PPi), EDTA, β-glycerophosphoate, dithiothreitol (DTT), leupeptin, aprotinin, soybean trypsin inhibitor, Calcium ionophore (C5149), NH4Cl (A0171) and emetine were obtained from Sigma. [γ^{32}P]ATP, [^{35}S]L-methionine, Optiphase Supermix scintillation liquid was purchased from Perkin–Elmer. ECL and ECL+ detection reagents, 7-methyl-GTP-Sepharose 4B beads were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. Rabbit anti-guinea pig, goat anti-mouse and swine anti-rabbit IgG (horseradish peroxydase-coupled) were obtained from Dako SA. Mouse monoclonal antibody directed against eIF4E from rabbit (610269) was purchased from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY). Rabbit polyclonal antibodies directed against the GST fusion protein *Sphaerechinus granularis* Sg4E-

BP were produced by Eurogentec. Rabbit polyclonal antibodies directed against human actin (20-33), Mouse monoclonal antibodies directed against human PSTAIR (7962) were purchased from Sigma. Polyclonal antibodies directed against *Sphaerechinus granularis* SgIF4G were previously described [Oulhen et al, 2007]. Rabbit polyclonal antibodies directed against human full length eIF2α (FL-315) and Rabbit polyclonal antibodies directed against human C-Ter eEF2 (sc-25634) were obtained from Santa Cruz and those directed against human N-Ter eEF2 (#2332) were from Cell Signaling. Rabbit polyclonal antibodies directed against phosphorylated Ser-51 eIF2α (9721) and Rabbit polyclonal antibodies directed against phosphorylated Thr-56 eEF2 (2331) were obtained from Cell Signaling. Rabbit polyclonal antibodies directed against sea urchin Cyclin B were a generous gift from Professor Gérard Peaucellier (Banyuls, France).

GST-Sg4E-BP antibodies purification

GST-Sg4E-BP protein was overexpressed in *E. coli* (strain BL21) and purified on a glutathione Sepharose 4B column according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). This protein was used to produce antibodies after injection in rabbits. Antibodies were purified using the GST-Sg4E-BP fusion protein. GST-Sg4E-BP was purified on glutathione Sepharose 4B column, the column was washed 2 times 5 min by 0.2 M borate pH 8.6 and centrifuged 1 min at 400 g to discard the supernatant. To cross-link GST-Sg4E-BP on the glutathione, 1 ml of DMP solution (7.25 mg of dimethylpimelimidate diluted in 1 ml of 0.2 M triethanolamine pH 8.3) was added to the column. After 30 min incubation at room temperature, the column was centrifuged 1 min at 400 g and the supernatant was discarded. The cross-linking reaction was stopped by a 60 min incubation in 0.2M ethanolamine pH 8.2 followed by 2 washes of 3 min in 0.1 M glycine pH 2.5 and 2 washed in TBS 1x (20 mM Tris HCl pH7, 150 mM NaCl). Anti Sg4E-BP serum was purified on this GST-Sg4E-BP column after 10 hours incubation at 4°C. The supernatant was discarded after centrifugation 1 min at 400 g. After 5 washes in TBS 1x and 2 washes with TBS 0.1x, anti-Sg4E-BP were eluted by 500 µl of 0.1M glycine HCl pH 2.5. 2 M Tris pH 8.5 were added on the elution before the storage of antibodies at –20°C. Using Western analysis, we first checked that the anti-Sg4E-BP recognized the recombinant

GST-Sg4E-BP protein (0,5µg of this protein were loaded) (Fig 1A). Sg4E-BP is known to be associated with SgIF4E in unfertilized eggs and to dissociate after fertilization [Cormier et al, 2001]. Thus, we verified that this anti-Sg4E-BP recognized the Sg4E-BP protein after m^7GTP purification in unfertilized eggs (Fig 1B); pre-immune serum did not yield any signal.

Preparation of gametes

Sphaerechinus granularis sea urchins collected in the Brest area (France), were kept in running seawater and used within 5 days. Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Eggs were collected in 0.22 µm Millipore-filtered seawater and rinsed twice by centrifugation at 2,000 rpm for 2 min. For the preparation of lysates, eggs were dejellied by swirling twenty seconds in 3.5 mM citric acid pH5 and rinsed three times in filtered seawater prior to fertilization. For fertilization, eggs were suspended in filtered seawater (5% suspension) containing 0.1% glycine. Diluted sperm was added to the eggs. For eggs activation, stock solution of 10 mM calcium ionophore was prepared in DMSO and stored at –20°C. A final concentration of 10 µM was added to the eggs. Stock solution of 100 mM NH4Cl pH8 was prepared in seawater and stored at 16°C. A final concentration of 10 mM was added to the eggs for activation. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization and activation, each experiment used gametes from a single female. Cultures were performed at 16°C under constant agitation.

Total embryo extracts

At different times following fertilization and activation, total extracts were obtained by homogenisation of 20 µl pelleted cells (eggs or embryos) in 150 µl of SDS-Fix buffer containing 2% sodium dodecyl-sulfate (SDS), 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris HCl pH 6.8. Proteins were separated on SDS-PAGE.

Isolation of eIF4E and associated proteins

At the indicated times after fertilization and activation, cells were collected by centrifugation in a Heraeus Labofuge 4000 centrifuge for 2 min at 2,000 g. Cells were lysed by passage through a 25G synringe in one cell volume of 2x binding buffer (40 mM HEPES pH7.4, 0.2 mM Sodium orthovanadate, 100 mM NaCl, 0,4 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 mM PPi, 100 mM sodium fluoride, 100 mM β-glycerophosphate, 1mM AEBSF and 20 µg/ml of aprotinin and leupeptin). Cell lysates were centrifuged for 15 min at 16,000 g at 4°C in an Eppendorf centrifuge 5415R and the supernatants were stored at –20°C before use. Protein quantification was performed in duplicate by Bradford assay. Isolation of eIF4E and its partners from egg extracts was performed using m^7GTP column as described previously [Salaun et al, 2004]. Briefly, 2 mg of proteins were mixed with 25 µl of m^7GTP Sepharose beads (m^7GTP column) and incubated end-over-end for 60 min at 4°C. Then, the samples were washed three times with 1 ml of 1x binding buffer containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was added directly to the beads and proteins were resolved by SDS-PAGE and analysed by Western blotting.

Western blot analyses

Western blot analyses were performed following electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE onto 0.22 µm nitrocellulose membranes [Towbin, 1979]. Membranes were incubated with antibodies against eIF4E (1:2000), Sg4E-BP (1:1000), actin (1:1000), PSTAIR (1:1000), SgIF4G (1:2000), full length eIF2α (1:1000), phospho-eIF2α (1:1000), full length eEF2 (1:1000), phospho-eEF2 (1:1000), cyclin B (1:1000). The antigen-antibody complex was measured by chemiluminescence using horseradish peroxydase-coupled secondary antibodies according to the manufacturer's instructions (ECL or ECL+).

Protein synthesis *in Vivo*.

Every 15 min, embryos (5% suspension in sea water) were pulse-labelled for 10 min with [^{35}S]-L-Methionine at the final concentration of 10 µCi/ml. 500 µl of cells were pelleted and frozen in liquid nitrogen. Cells extracts were prepared as described above in 2x binding buffer. [^{35}S] Methionine incorporation into proteins was measured on duplicate aliquots after 10% TCA precipitation on Whatman 3M filters and counting in a scintillation counter in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid. The results are expressed as percentage incorporation of [^{35}S]-methionine into protein over total radioactivity taken up by the cells.

Measurement of CDK1/cyclin B complex activity *in vitro*

Every 15 min following fertilization or activation, 1 ml of cells were packed by centrifugation for 5 seconds at full speed in an Eppendorf centrifuge, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at −80°C until further use. 50 µl pelleted cells were resuspended in 400 µl ice-cold buffer (60 mM β-glycerophosphate; 15 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS pH 7.2, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM disodium phenylphosphate, 1 mM AEBSF, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, leupeptin 10 µg/ml; aprotinin 10 µg/ml, 100 mM benzamidine, 1% Triton) and were homogenized through a 25-G needle. The homogenates were clarified by 14,000 rpm centrifugation for 10 min at 4°C. Using the ability of the 13-kDa product of the suc-1 gene from yeast to interact with CDK1 [Dunphy et al., 1988], CDK1/cyclin B complex was extracted from 300 µl of homogenate by affinity on p13suc-1-Sepharose beads, prepared using bacterially produced p13suc-1 protein coupled to Sepharose [Arion and Meijer, 1989]. Incubation was performed for 45 min under constant rotation at 4°C in the presence of 50 µl of p13^{suc-1}-Sepharose beads, and after three washes, the activity of the bound kinase was determined using the following protocol. CDK1/cyclin B activity was assayed under standard conditions using histone H1 (Sigma type III-S) as a substrate [Borgne and Meijer, 1996]. Phosphorylation of histone H1 (50 µg/ml final) was performed for 10 min at 30°C in 50 µl reaction mixture containing 1 µCi/ml [γ-^{32}P]ATP (20 µCI/ml final), 10 µM unlabeled ATP in buffer containing 60 mM β-glycerophosphate; 30 mM *p*-nitrophenyl phosphate; 25 mM MOPS pH 7.2, 5 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$; 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM sodium

orthovanadate. Reaction was stopped by chilling the tubes in ice. Duplicate aliquots of 10 µl were spotted on Whatman P81 phosphocellulose papers which were washed five times in 1% phosphoric acid and counted in a scintillation counter in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid.

Figure Legends

Figure 1. Specificity of *Sphaerechinus granularis* Sg4E-BP antibody. (A) Anti-Sg4E-BP antibodies recognized the GST-Sg4E-BP fusion protein. (B) Anti-Sg4E-BP antibodies recognized endogenous Sg4E-BP. Affinity-purified proteins using an m^7GTP column at the indicated times: 0 and 1 hour after fertilization. Proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and subjected to Western Blot using anti-eIF4E (top panel), anti-Sg4E-BP antibodies or pre-immune serum (bottom panel).

Figure 2. Protein synthesis increases after sea urchin eggs artificial activation. The rate of *in vivo* protein synthesis was monitored in eggs unfertilized (UF) fertilized (F), activated by 10 µM calcium ionophore (C.I.) or 10 mM NH4Cl pH8 (NH4Cl). Embryos were metabolically pulse-labelled in the presence of [^{35}S] Methionine and radioactivity incorporation into TCA-precipitated proteins was determined, as explained under Materials and methods, at the indicated times after treatment.

Figure 3. Sg4E-BP is degraded after sea urchin eggs artificial activation. Extracts from unfertilized (A), fertilized (B) or activated eggs by calcium ionophore (C) and NH4Cl (D) were prepared at the indicated times. After resolution on 15% SDS-PAGE, proteins were analysed by Western blot using anti-Sg4E-BP (bottom panels), anti-actin was used as a loading control (top panels).

Figure 4. Sg4E-BP reappearance after NH4Cl activation depends on protein synthesis. Total extracts of NH4Cl activated eggs were analysed by Western blot using anti-Sg4E-BP (bottom panels), anti-actin was used as a loading control (top panels). Before activation, eggs were pre-incubated 20 min with 100 µM emetine (right panel).

Figure 5. Sg4E-BP/SgIF4E dissociates and SgIF4G/SgIF4E associates after eggs artificial activation. Affinity-purified proteins using an m^7GTP column at the indicated times: 0, 30, 60, 120 min after treatment for unfertilized (A), fertilized (B), activated eggs by calcium ionophore (C) and NH4Cl (D) were resolved by 7.5% SDS-PAGE for SgIF4G and by 15% SDS-PAGE for SgIF4E and Sg4E-BP. Proteins were subjected to Western blot using anti-SgIF4G (top panels), anti-eIF4E (middle panels) or anti-Sg4E-BP antibodies (bottom panels).

Figure 6. SgIF2α is dephosphorylated after sea urchin eggs artificial activation. Extracts from unfertilized (A), fertilized (B) or activated eggs by calcium ionophore (C) and NH4Cl (D) were prepared every 15 min. Proteins from total extracts were resolved on 12% SDS PAGE and analyzed by Western blot using anti-eIF2α full length (top panels) or anti-phospho-eIF2α (bottom panels).

Figure 7. Two SgEF2 isoforms, full length and N-terminal truncated, exist in sea urchin eggs. Proteins from unfertilized eggs extracts prepared at the indicated time: 0, 15, 30, 45, 60 min were analysed after resolution on 10% SDS PAGE and Western blot using different anti-eEF2 antibodies. Anti-phospho-eEF2 (A) and anti-C-eEF2 directed against the C-terminal region of human EF2 (B) recognized two isoforms. Anti-N-eEF2 antibodies directed against the N-terminal region of human EF2 recognized only the upper band.

Figure 8. SgEF2 is dephosphorylated after sea urchin eggs activation. Extracts from unfertilized (A), fertilized (B) or activated eggs by calcium ionophore (C) and NH4Cl (D) were prepared every 15 min. Proteins from total extracts were separated by a 10% SDS PAGE and analysed by Western blot using anti C-eEF2 (top panels) or anti-phospho-eEF2 (bottom panels).

Figure 9. CDK1/cyclin B complex is not activated after sea urchin eggs artificial activation. Eggs were frozen at the indicated times. Histone H1 Kinase activity of CDK1/cyclin B complex purified on p13 sepharose beads was measured, as described in Materials and methods. (A) CDK1/cyclin B complex is not activated after calcium ionophore treatment. Activity in unfertilized eggs (UF) is

represented by lozenges, in fertilized eggs (F) by squares and in calcium ionophore activated eggs (C.I.) by triangles. (B) CDK1/cyclin B complex is not activated after NH4Cl treatment. Activity in unfertilized eggs (UF) is represented by lozenges, in fertilized eggs (F) by squares and in NH4Cl activated eggs (NH4Cl) by triangles.

Figure 10. Cyclin B is synthesized after sea urchin eggs artificial activation. Unfertilized (A), fertilized (B) or activated eggs by calcium ionophore (C) and NH4Cl (D) were stopped every 15 min. Proteins from total extracts were separated by a 10 % SDS PAGE and analysed by Western blot using anti-cyclin B (top panels). Anti-PSTAIR (bottom panels) was used as loading control.

Acknowledgments

We are grateful to the members of the cell cycle and development group for helpful discussions and comments on this manuscript. This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, France; grants 4247 and 3507) to P.C., Ligue Nationale contre le Cancer (Délégations Départementales Finistère, Morbihan, Vendée et Côte d'Armor) to P.C., J.M. and O.M.L Conseil Régional de Bretagne and Conseil Général du Finistère.

References

Arion D, Meijer L (1989) M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. Exp Cell Res 183: 361-375.

Averous J, Proud CG (2006) When translation meets transformation: the mTOR story. Oncogene 25: 6423-6435.

Borgne A, Meijer L (1996) Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. J Biol Chem 271: 27847-27854.

Boulben S, Monnier A, Le Breton M, Morales J, Cormier P, et al. (2003) Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase. Cell Mol Life Sci 60: 2178-2188.

Brandhorst BP (1976) Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. Dev Biol 52: 310-317.

Browne GJ, Proud CG (2002) Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. Eur J Biochem 269: 5360-5368.

Cormier P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N, et al. (2001) eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. Dev Biol 232: 275-283.

Dever T.E. DAC, Sicheri F. (2007) The eIF2alpha Kinases; Mathews MB, Sonenberg, N. and Hershey J.W.B., editor. New York: CSHL Press.

Dube F (1988) Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. J Cell Physiol 137: 545-552.

Dube F, Epel D (1986) The relation between intracellular pH and rate of protein synthesis in sea urchin eggs and the existence of a pH-independent event triggered by ammonia. Exp Cell Res 162: 191-204.

Dube F, Guerrier P (1983) Ca2+ influx and stimulation of protein synthesis in sea urchin eggs. Exp Cell Res 147: 209-215.

Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J (1988) The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell 54: 423-431.

Epel D (1967) Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A 57: 899-906.

Epel D (1978) Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. Curr Top Dev Biol 12: 185-246.

Epel D (1990) The initiation of development at fertilization. Cell Differ Dev 29: 1-12.

Epel D, Steinhardt R, Humphreys T, Mazia D (1974) An analysis of the partial metabolic derepression of sea urchin eggs by ammonia: the existence of independent pathways. Dev Biol 40: 245-255.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33: 389-396.

Everett AD, Stoops TD, Nairn AC, Brautigan D (2001) Angiotensin II regulates phosphorylation of translation elongation factor-2 in cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281: H161-167.

Hogan B, Gross PR (1971) The effect of protein synthesis inhibition on the entry of messenger RNA into the cytoplasm of sea urchin embryos. J Cell Biol 49: 692-701.

Kastan MB, Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature 432: 316-323.

Kimball SR (2001) Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. Prog Mol Subcell Biol 26: 155-184.

Kubica N, Jefferson LS, Kimball SR (2006) Eukaryotic initiation factor 2B and its role in alterations in mRNA translation that occur under a number of pathophysiological and physiological conditions. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 81: 271-296.

Le Bouffant R, Boulben S, Cormier P, Mulner-Lorillon O, Belle R, et al. (2008) Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos. Exp Cell Res 314: 961-968.

Le Bouffant R, Cormier P, Mulner-Lorillon O, Belle R (2006) Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. J Cell Biochem 99: 126-132.

Le Sourd F, Boulben S, Le Bouffant R, Cormier P, Morales J, et al. (2006) eEF1B: At the dawn of the 21st century. Biochim Biophys Acta 1759: 13-31.

Lozano JC, Schatt P, Marques F, Peaucellier G, Fort P, et al. (1998) A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin B splice variant. J Cell Biol 140: 283-293.

Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006) mTOR, translation initiation and cancer. Oncogene 25: 6416-6422.

Mathews MB, Sonenberg, N. and Hershey J.W.B. (2007) Origins and Principles of Translational Control; Mathews MB, Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B. , editor. New York: CSHL Press.

Meijer L, Arion D, Golsteyn R, Pines J, Brizuela L, et al. (1989) Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. Embo J 8: 2275-2282.

Meijer L, Pondaven P (1988) Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. Exp Cell Res 174: 116-129.

Monnier A, Morales J, Cormier P, Boulben S, Belle R, et al. (2001) Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. Zygote 9: 229-236.

Morales J, Mulner-Lorillon O, Cosson B, Morin E, Belle R, et al. (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. Dev Biol 300: 293-307.

Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell 116: 221-234.

Oulhen N, Salaun P, Cosson B, Cormier P, Morales J (2007) After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. J Cell Sci 120: 425-434.

Proud CG (2006) Regulation of protein synthesis by insulin. Biochem Soc Trans 34: 213-216.

Proud CG (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. Biochem J 403: 217-234.

Roux MM, Townley IK, Raisch M, Reade A, Bradham C, Humphreys G et al. (2006). A functional genomic and proteomic perspective of sea urchin calcium signaling and egg activation. Dev Biol 300: 416-433.

Ryazanov AG (2002) Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives. FEBS Lett 514: 26-29.

Salaun P, Boulben S, Mulner-Lorillon O, Belle R, Sonenberg N, et al. (2005) Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. J Cell Sci 118: 1385-1394.

Salaun P, Le Breton M, Morales J, Belle R, Boulben S, et al. (2004) Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. Exp Cell Res 296: 347-357.

Salaun P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Belle R, et al. (2003) eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. Dev Biol 255: 428-439.

Sonenberg N (2008) eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. Biochem Cell Biol 86: 178-183.

Steinhardt RA, Epel D (1974) Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. Proc Natl Acad Sci U S A 71: 1915-1919.

Suprynowicz FA, Prusmack C, Whalley T (1994) Ca2+ triggers premature inactivation of the cdc2 protein kinase in permeabilized sea urchin embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 6176-6180.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4350-4354.

Wagenaar EB (1983) The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. Exp Cell Res 144: 393-403.

Wang X, Paulin FE, Campbell LE, Gomez E, O'Brien K, et al. (2001) Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. Embo J 20: 4349-4359.

Webb BL, Proud CG (1997) Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B). Int J Biochem Cell Biol 29: 1127-1131.

Whitaker MJ, Steinhardt RA (1981) The relation between the increase in reduced nicotinamide nucleotides and the initiation of DNA synthesis in sea urchin eggs. Cell 25: 95-103.

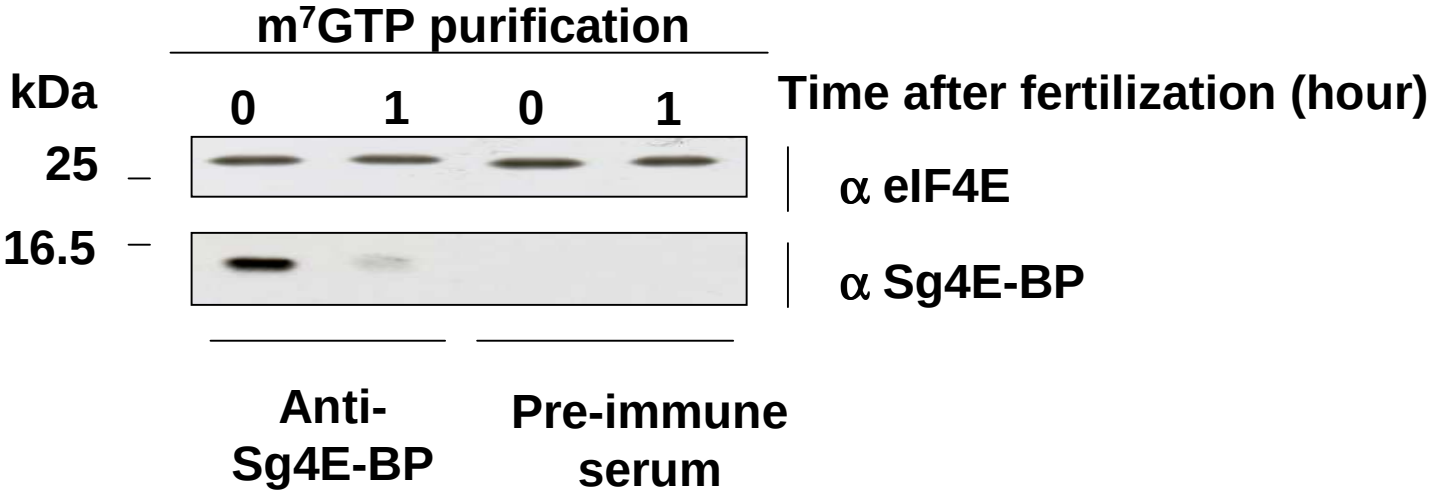
Whitaker MJ, Steinhardt RA (1982) Ionic regulation of egg activation. Q Rev Biophys 15: 593-666.

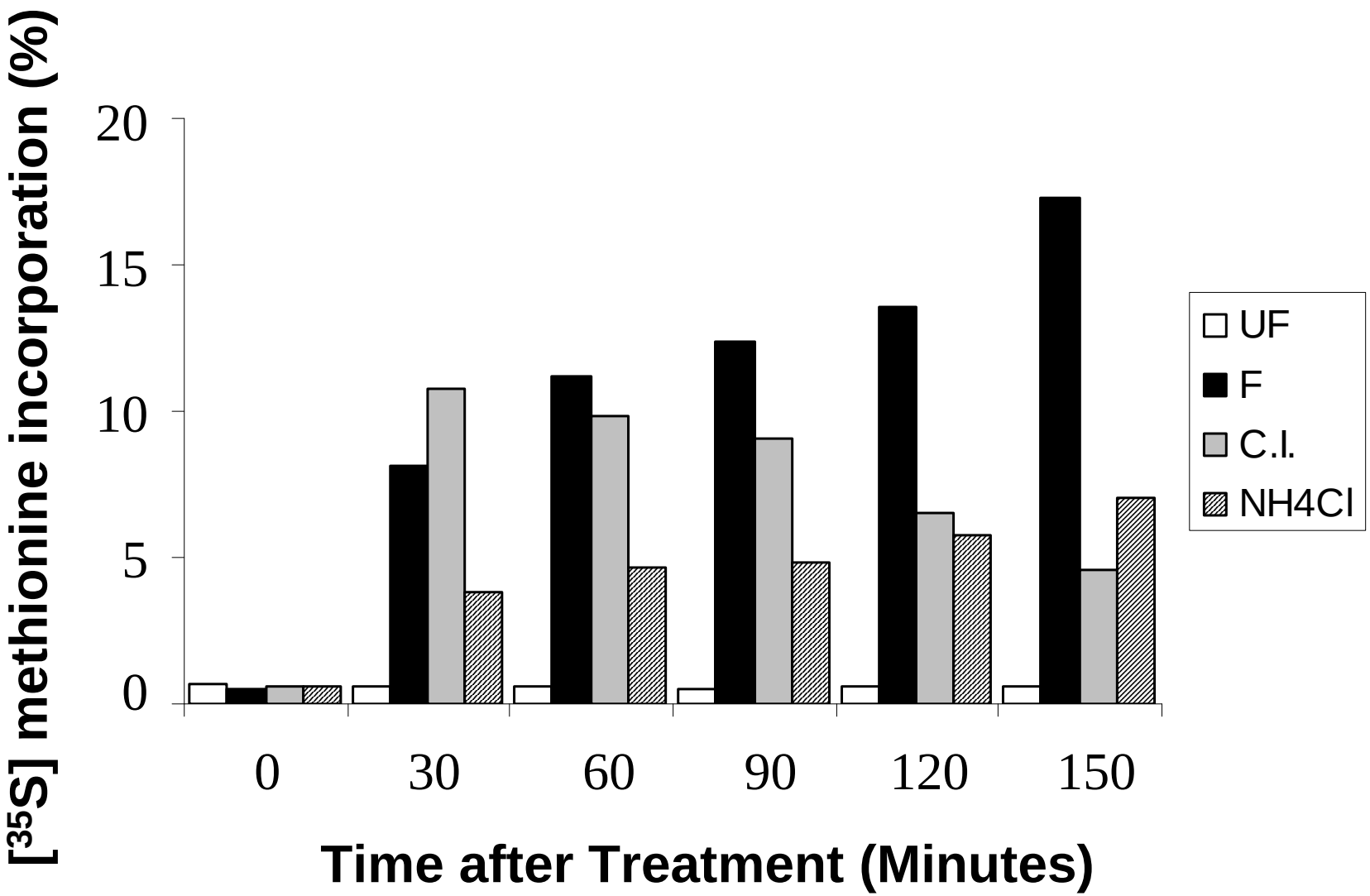
Zucker RS, Steinhardt RA, Winkler MM (1978) Intracellular calcium release and the mechanisms of parthenogenetic activation of the sea urchin egg. Dev Biol. 65(2):285-95.

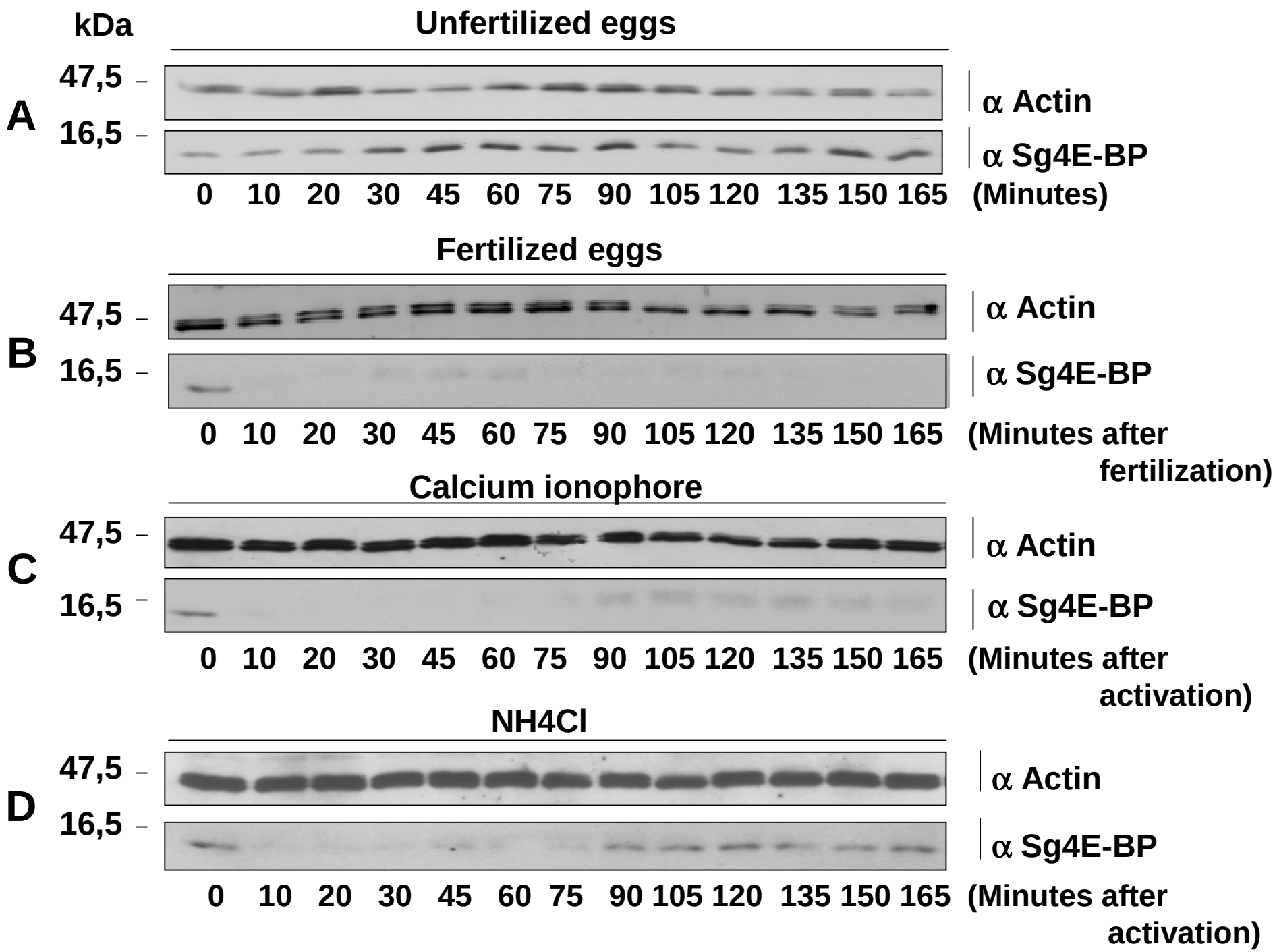
A

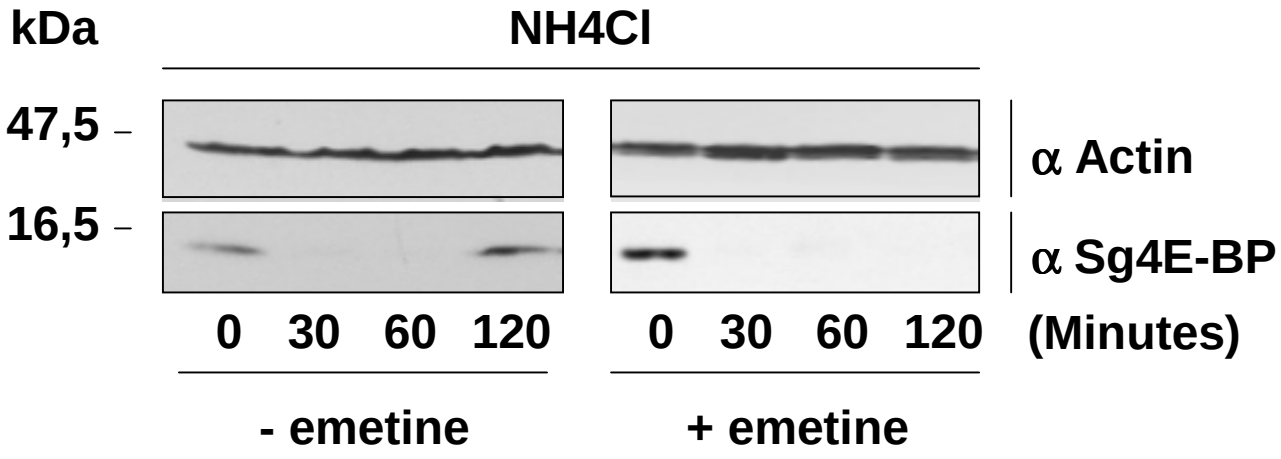
kDa
47.5
32
25
GST
Sg4E-BP

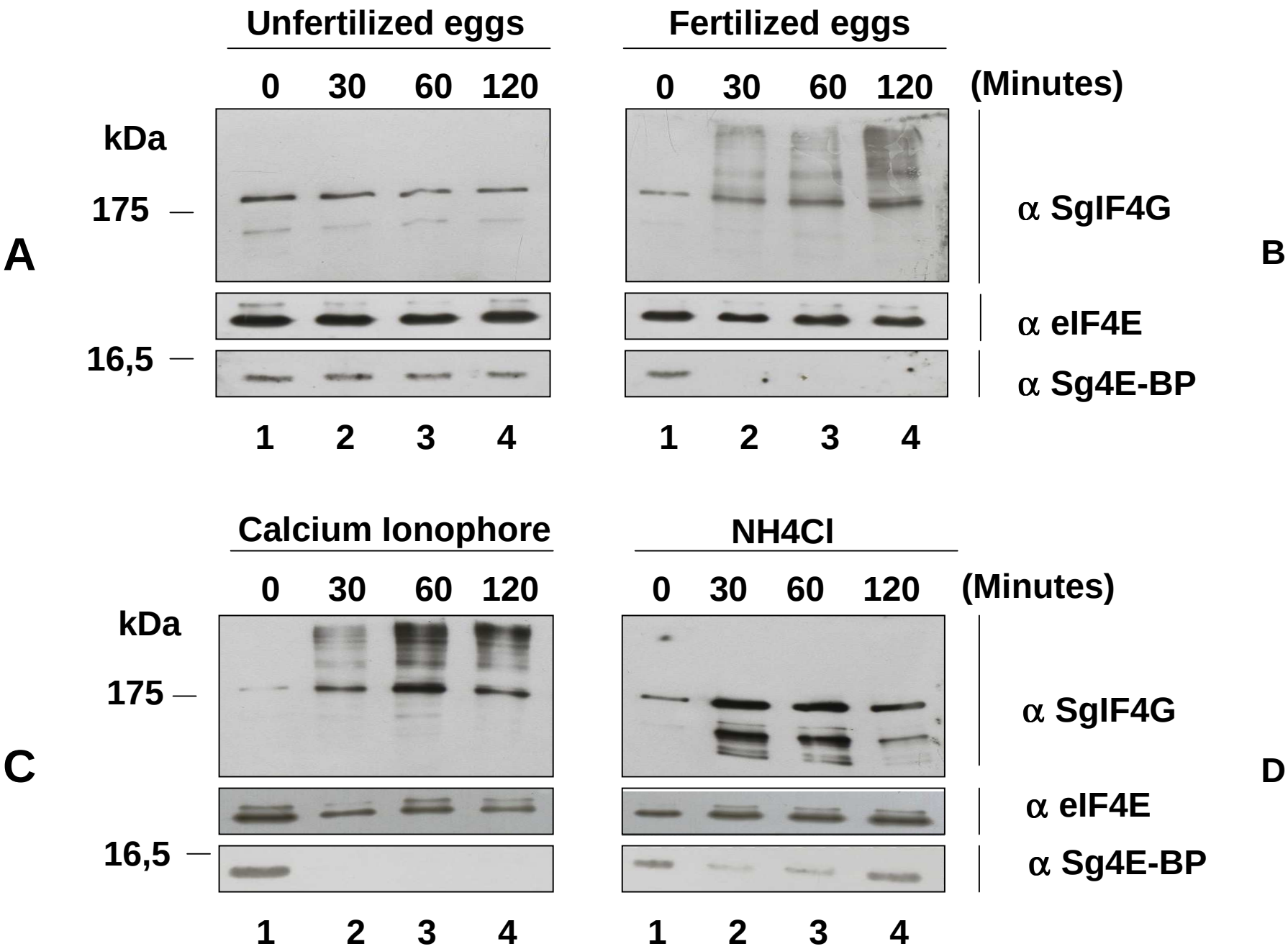
B

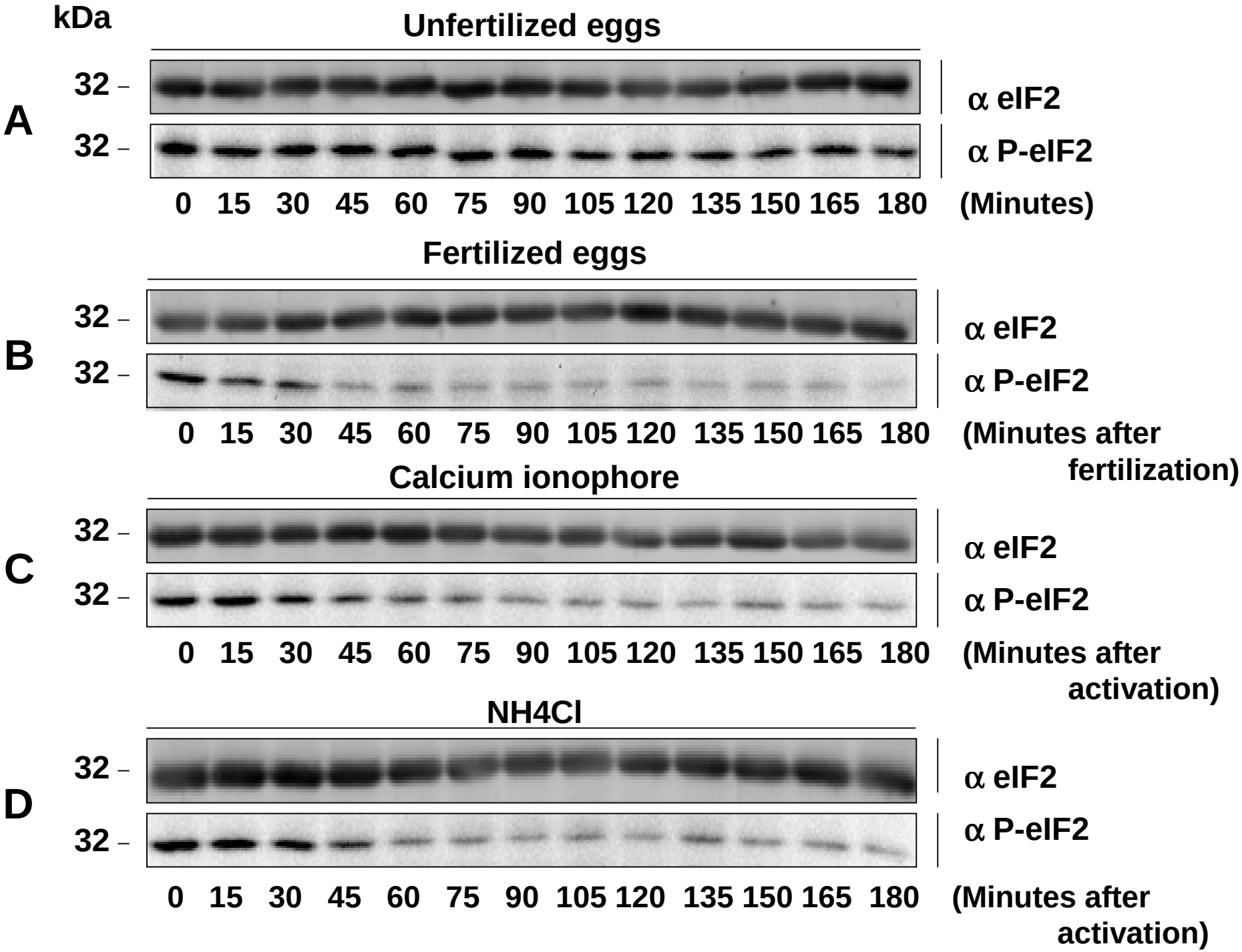

m7GTP purification
kDa
0
1
0
1
Time after fertilization (hour)
25
16.5
α eIF4E
α Sg4E-BP
Anti-
Sg4E-BP
Pre-immune
serum

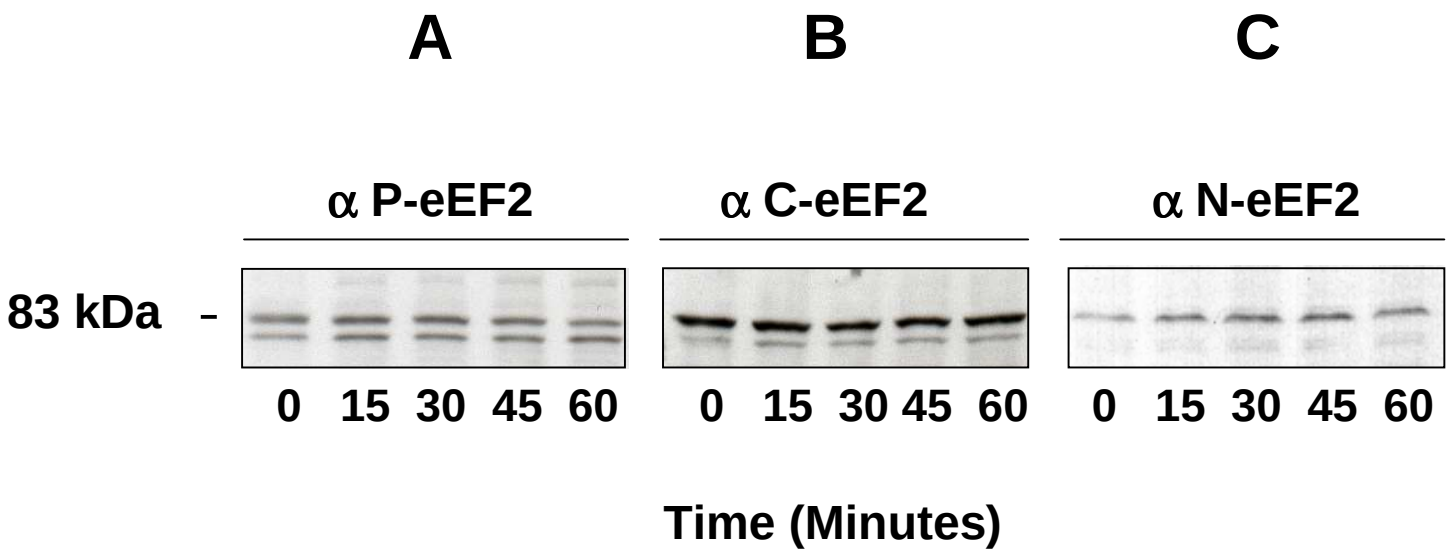

[35S] methionine incorporation (%)
20
15
10
5
0
0
30
60
90
120
150
Time after Treatment (Minutes)
UF
F
C.I.
NH4Cl

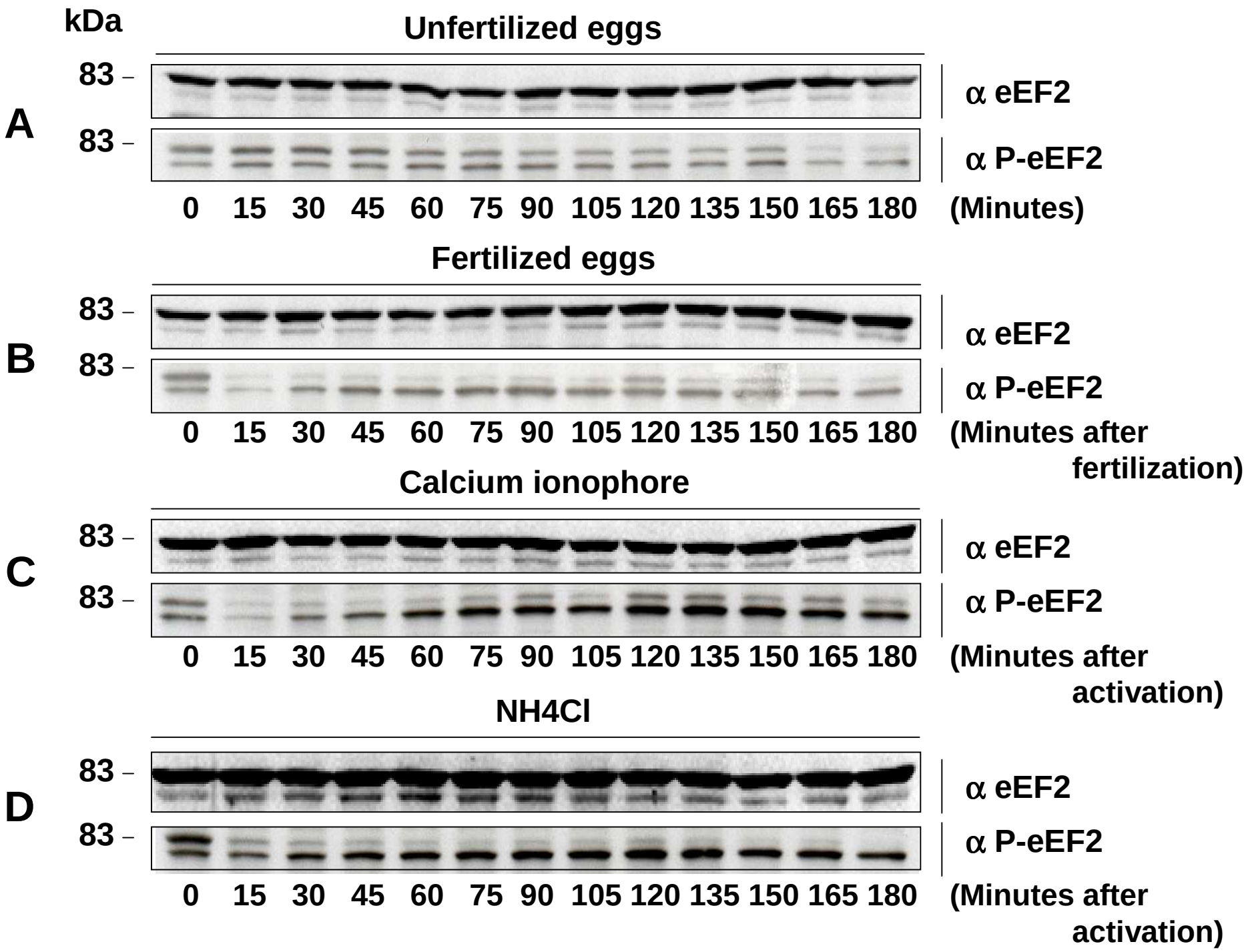

kDa
Unfertilized eggs
A
47,5
16,5
α Actin
α Sg4E-BP
0 10 20 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165
(Minutes)
Fertilized eggs
B
47,5
16,5
α Actin
α Sg4E-BP
0 10 20 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165
(Minutes after fertilization)
Calcium ionophore
C
47,5
16,5
α Actin
α Sg4E-BP
0 10 20 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165
(Minutes after activation)
NH4Cl
D
47,5
16,5
α Actin
α Sg4E-BP
0 10 20 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165
(Minutes after activation)

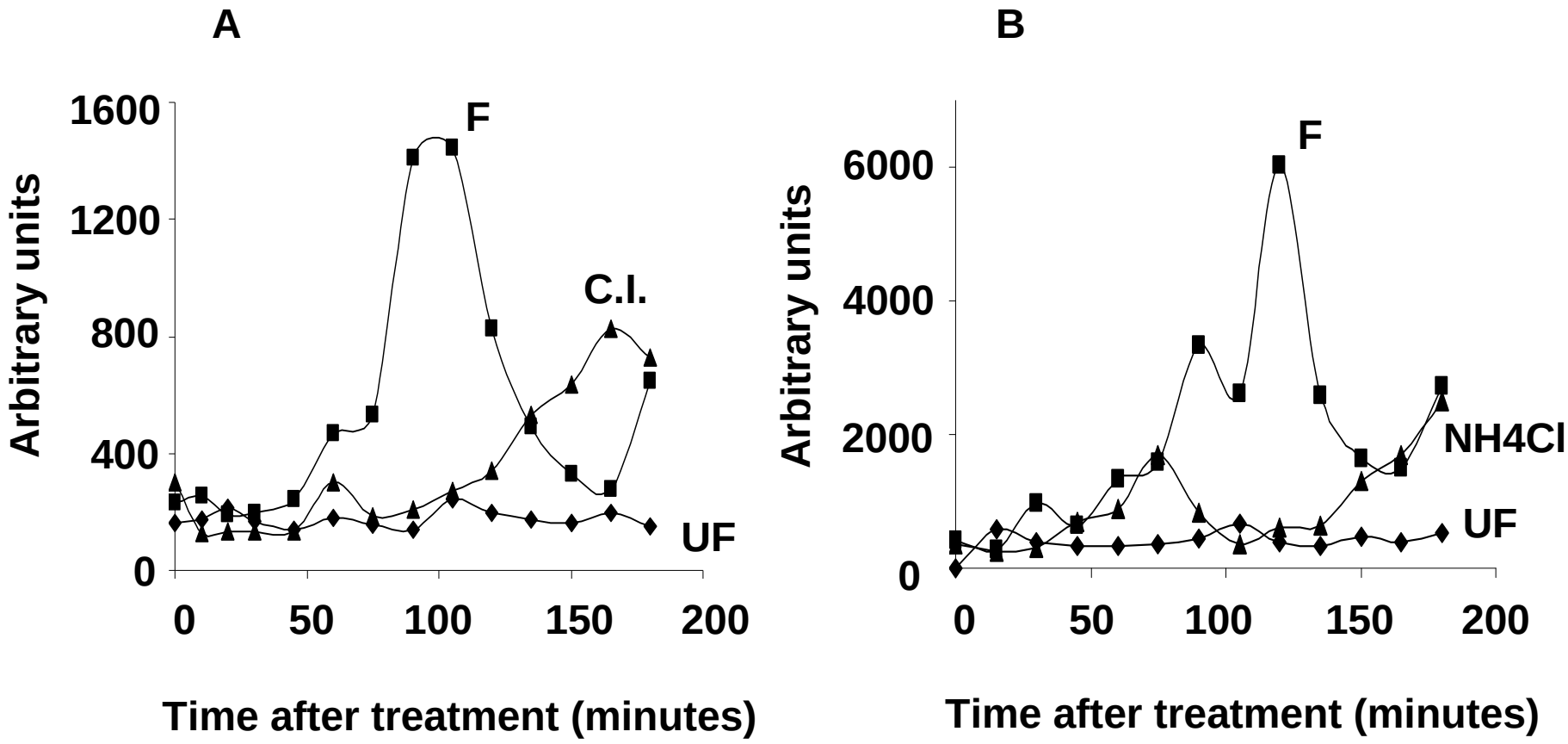

kDa
NH4Cl
47,5
16,5
α Actin
α Sg4E-BP
0 30 60 120
0 30 60 120
(Minutes)
- emetine
+ emetine

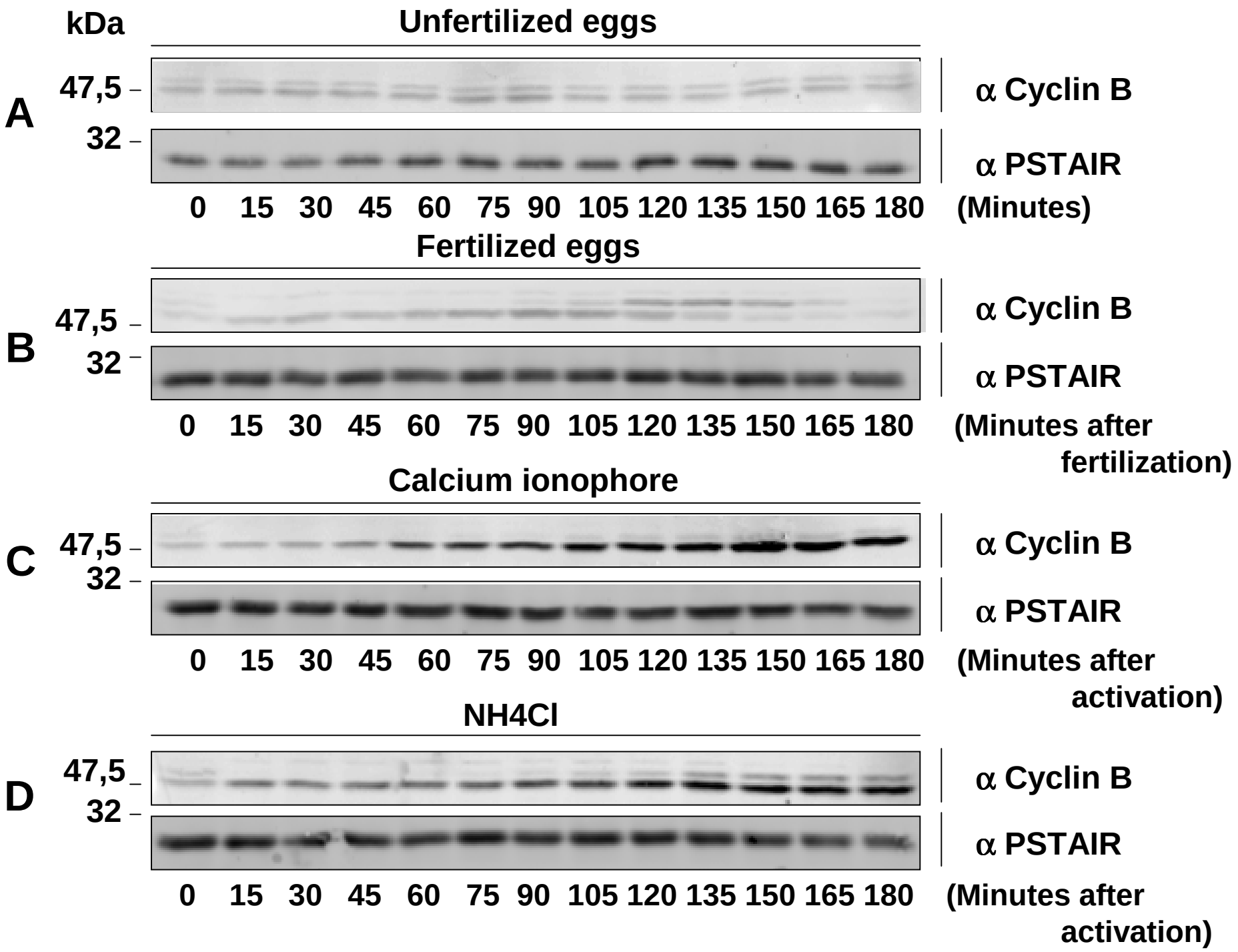

Unfertilized eggs
Fertilized eggs
0 30 60 120
0 30 60 120
(Minutes)
kDa
175
16,5
A
B
α SgIF4G
α eIF4E
α Sg4E-BP
1 2 3 4
1 2 3 4
Calcium Ionophore
NH4Cl
0 30 60 120
0 30 60 120
(Minutes)
kDa
175
16,5
C
D
α SgIF4G
α eIF4E
α Sg4E-BP
1 2 3 4
1 2 3 4


kDa
Unfertilized eggs
A
32 –
32 –
α eIF2
α P-eIF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes)
Fertilized eggs
B
32 –
32 –
α eIF2
α P-eIF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after fertilization)
Calcium ionophore
C
32 –
32 –
α eIF2
α P-eIF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after activation)
NH4Cl
D
32 –
32 –
α eIF2
α P-eIF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after activation)


A
B
C
α P-eEF2
α C-eEF2
α N-eEF2
83 kDa
0 15 30 45 60
0 15 30 45 60
0 15 30 45 60
Time (Minutes)


kDa
Unfertilized eggs
A
83
83
α eEF2
α P-eEF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes)
Fertilized eggs
B
83
83
α eEF2
α P-eEF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after fertilization)
Calcium ionophore
C
83
83
α eEF2
α P-eEF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after activation)
NH4Cl
D
83
83
α eEF2
α P-eEF2
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after activation)


A
1600
1200
800
400
0
Arbitrary units
F
C.I.
UF
0
50
100
150
200
Time after treatment (minutes)
B
6000
4000
2000
0
Arbitrary units
F
NH4Cl
UF
0
50
100
150
200
Time after treatment (minutes)


kDa
Unfertilized eggs
A
47,5
32
α Cyclin B
α PSTAIR
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes)
Fertilized eggs
B
47,5
32
α Cyclin B
α PSTAIR
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after fertilization)
Calcium ionophore
C
47,5
32
α Cyclin B
α PSTAIR
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after activation)
NH4Cl
D
47,5
32
α Cyclin B
α PSTAIR
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
(Minutes after activation)

IV) Traduction dépendante de la coiffe et synthèse de cycline B lors de la maturation méiotique chez l'étoile de mer.

Article 4: Lapasset L, Pradet-Balade B, Vergé V, Lozano JC, Oulhen N, Cormier P and Peaucellier G. (2008). Cyclin B synthesis and rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions. Mol Reprod Dev. 75(11): 1617-26.

Ce dernier article nous montre que la traduction dépendante de la coiffe est aussi régulée lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer *Astropecten aranciacus* et que contrairement à la régulation observée après fécondation chez l'oursin, la synthèse de la cycline B fait intervenir un autre mécanisme dépendant de CPEB.

Après la vitellogenèse, les ovocytes d'étoiles de mer sont arrêtés en prophase de première division méiotique. La 1-méthyladénine (1-MA) stimule la synthèse protéique et permet la reprise du cycle cellulaire. La synthèse de cycline B est nécessaire à cette progression méiotique et passe par une voie dépendante de la phosphorylation de CPEB. La synthèse de cycline B est sensible à la rapamycine après fécondation chez l'oursin *S. granularis,* elle fait intervenir la traduction dépendante de la coiffe. Pour regarder si cette voie dépendante de la coiffe intervient aussi au cours de la maturation méiotique de l'étoile de mer, nous avons étudié la sensibilité de la cycline B à la rapamycine et nous nous sommes intéressés aux partenaires d'eIF4E.

Résultats :

La rapamycine inhibe la traduction globale mais n'affecte pas les synthèses de la cycline B et de Mos, induites par la 1-MA.

La rapamycine n'inhibe pas la première division méiotique mais bloque l'émission du deuxième globule polaire, indiquant que la synthèse rapamycine-sensible d'une ou de plusieurs protéines est nécessaire à la deuxième division méiotique.

Les résultats montrent pour la première fois que dans les ovocytes de *A. aranciacus* arrêtés en prophase I, eIF4E est lié à 4E-BP. Le complexe se dissocie dès 40 minutes après addition de 1-MA, cette dissociation est sensible à la rapamycine. De manière intéressante, les deux protéines se réassocient 120 minutes après stimulation.

Dans ces ovocytes arrêtés en prophase I, eIF4E est aussi en complexe avec CPEB. L'ajout de 1-MA provoque sa dissociation ainsi qu'un changement électrophorétique de

CPEB qui correspondrait à sa phosphorylation. Ces mécanismes font intervenir une voie indépendante de la rapamycine.

Ces résultats indiquent que la traduction dépendante de la coiffe est régulée lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer et démontrent que la synthèse de la cycline B fait intervenir des mécanismes traductionnels différents de ceux identifiés après fécondation chez l'oursin.

Bilan :

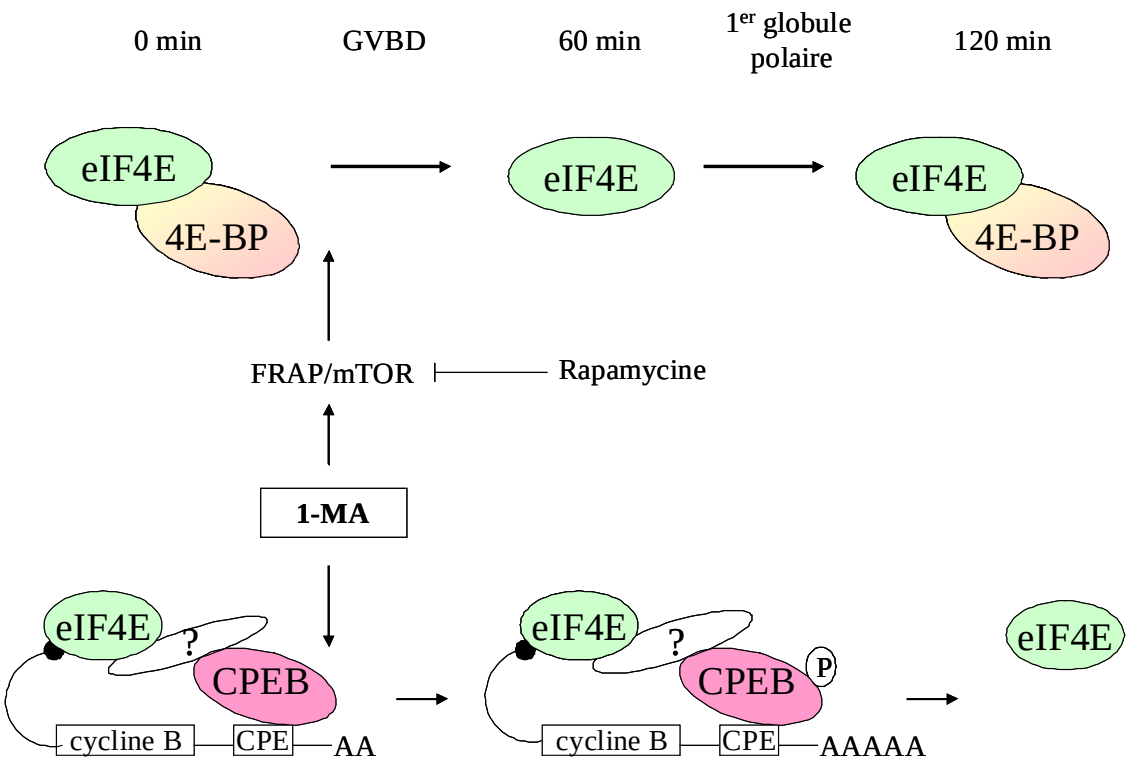


Figure 29 : Régulation de la traduction dépendante de la coiffe et synthèse de cycline B lors de la maturation méiotique chez l'étoile de mer. *Dans les ovocytes arrêtés en prophase de première division méiotique (temps 0 min), la protéine eIF4E est associée à l'inhibiteur 4E-BP. eIF4E est aussi en complexe avec CPEB qui se fixe spécifiquement sur l'ARNm de la cycline B par l'intermédiaire d'un élément CPE. Pour poursuivre la méiose, la 1-méthyladénine (1-MA) stimule d'une part la voie FRAP/mTOR pour dissocier le complexe eIF4E/4E-BP et induit d'autre part la phosphorylation de CPEB pour stimuler la synthèse de la cycline B (temps 60 min). Par la suite, le complexe eIF4E/4E-BP se reforme alors que le complexe eIF4E/CPEB se dissocie (temps 120 min). La présence d'une protéine comme Maskine (représentée par un ?) reliant eIF4E et CPEB reste à prouver. (GVBD : germinal vesicle breakdown*).

Cyclin B Synthesis and Rapamycin-Sensitive Regulation of Protein Synthesis During Starfish Oocyte Meiotic Divisions

LAURE LAPASSET,[1,2] BÉRENGÈRE PRADET-BALADE,[1,2] VALÉRIE VERGÉ,[1,2] JEAN-CLAUDE LOZANO,[1,2] NATHALIE OULHEN,[3,4] PATRICK CORMIER,[3,4] AND GÉRARD PEAUCELLIER[1,2]*

[1]*UPMC Univ Paris 06, Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, France*
[2]*CNRS, UMR7628, Laboratoire d'Océanographie Biologique de Banyuls, Banyuls-sur-Mer, France*
[3]*UPMC Univ Paris 06, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France*
[4]*CNRS, UMR7150, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France*

ABSTRACT Translation of cyclin mRNAs represents an important event for proper meiotic maturation and post-fertilization mitoses in many species. Translational control of cyclin B mRNA has been described to be achieved through two separate but related mechanisms: translational repression and polyadenylation. In this paper, we evaluated the contribution of global translational regulation by the cap-dependent translation repressor 4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) on the cyclin B protein synthesis during meiotic maturation of the starfish oocytes. We used the immunosupressant drug rapamycin, a strong inhibitor of cap-dependent translation, to check for the involvement of this protein synthesis during this physiological process. Rapamycin was found to prevent dissociation of 4E-BP from the initiation factor eIF4E and to suppress correlatively a burst of global protein synthesis occurring at the G2/M transition. The drug had no effect on first meiotic division but defects in meiotic spindle formation prevented second polar body emission, demonstrating that a rapamycin-sensitive pathway is involved in this mechanism. While rapamycin affected the global protein synthesis, the drug did not alter neither the specific translation of cyclin B mRNA nor the expression of the Mos protein. The expression of these two proteins was correlated with the phosphorylation and the dissociation of the cytoplasmic polyadenylation element-binding protein from eIF4E. *Mol. Reprod. Dev.* © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: cyclin B; translation; eIF4E; 4E-BP; CPEB; rapamycin; meiosis; starfish oocytes

INTRODUCTION

During eukaryotic cell division, transcription is mostly shut down, due to chromatin compaction, and the adjustment of regulatory protein levels relies significantly on the regulation of translation, see Le Breton et al. (2005) for a review. Oocyte meiosis is an extreme case where large amounts of messenger RNAs are stored during vitellogenesis but must be translated only later and in a precise order for meiotic divisions and early development (Richter, 1991). Special attention has been devoted to the regulation by polyadenylation of the stored messenger RNAs, since the discovery of cytoplasmic polyadenylation in sea urchin eggs (Slater et al., 1973; Wilt, 1973). In *Xenopus laevis* oocytes, cytoplasmic polyadenylation regulates the translation of proteins essential for meiotic divisions, as Mos and cyclins (Sheets et al., 1994; Stebbins-Boaz et al., 1996; de Moor and Richter, 1997). The stored mRNAs have short poly(A) tails, which must be elongated by poly(A) polymerase (PAP) to be translated (Fig. 1A). This is regulated by two cis-acting sequences, in the 3′ untranslated region (UTR), the U-rich cytoplasmic polyadenylation element (CPE) and the hexanucleotide AAUAAA (Fox et al., 1989; McGrew et al., 1989). The CPE is bound by the cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB) (Paris et al., 1991; Hake and Richter, 1994). When activated by phosphorylation, CPEB stabilizes the binding, on the hexanucleotide sequence,

Abbreviations used: 1-MA, 1-methyladenine; 3′UTR, 3′ untranslated region; 4E-BP, eIF4E binding protein; ERK, extracellular-signal-regulated kinase; cdc2, p34cdc2; CPE, cytoplasmic polyadenylation element; CPEB, cytoplasmic polyadenylation element binding protein; CPSF, cleavage and polyadenylation specific factor; eIF4E, eukaryotic initiation factor; GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; Inh-2, inhibitor-2 of protein phosphatase 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Mnks, MAPK signal-integrating kinases; MPF, M-phase promoting factor; mTOR, mammalian target of rapamycin; PABP, poly(A) binding protein; PAP, poly(A) polymerase.

Grant sponsor: Association pour la Recherche contre le Cancer; Grant sponsor: Ligue Nationale contre le Cancer (Délégations Départementales Finistère, Morbihan, Vendée et Côte d'Armor); Grant sponsor: Conseil Régional de Bretagne and Conseil Général du Finistère.

*Correspondence to: Gérard Peaucellier, Laboratoire Arago, UMR 7628, BP 44, F 66650 Banyuls-sur-Mer, France.
E-mail: gerard.peaucellier@obs-banyuls.fr

Received 22 November 2007; Accepted 28 January 2008
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI 10.1002/mrd.20905

© 2008 WILEY-LISS, INC.

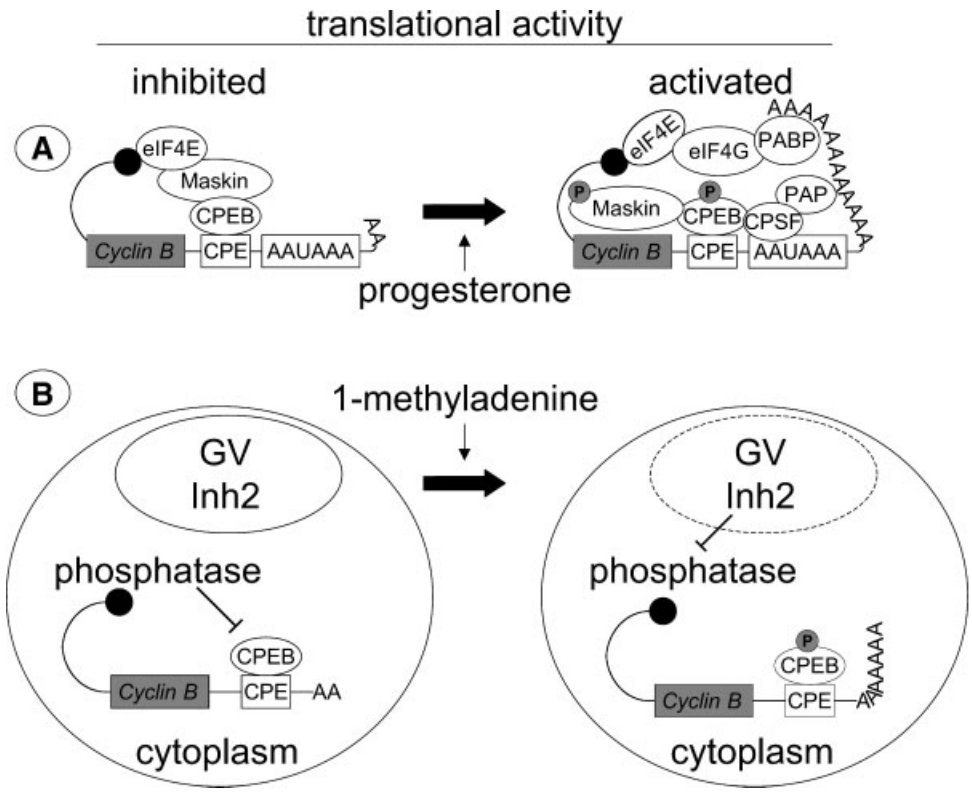


Fig. 1. Regulation of specific cyclin B mRNA translation during the reinitiation of meiosis in *Xenopus* and in starfish oocytes. **A**: *In Xenopus* oocytes blocked in prophase I, Maskin binding to both CPEB and eIF4E prevents cyclin B mRNA translation. After meiosis reinitiation by progesterone, CPEB is phosphorylated and recruits CPSF, which attracts PAP to the 3′ end of the mRNA. PABP binds both to the newly elongated poly(A) tail and eIF4G. This complex displaces Maskin from eIF4E allowing eIF4G association with eIF4E and consequent translation of the *cyclin B* mRNA. **B**: In starfish oocytes blocked in prophase of the first meiotic division, the phosphorylation of CPEB is inhibited by a cytoplasmic type 1 phosphatase. During meiosis reinitiation induced by 1-methyladenine, the cytoplasmic phosphatase is inhibited by a nuclear type 2 inhibitor (Inh-2) released after the disruption of the germinal vesicle (GV), and CPEB is consequently phosphorylated allowing *cyclin B* mRNA translation.

of the cleavage and polyadenylation specific factor (CPSF)(Mendez et al., 2000), which in turn attracts PAP to catalyse poly(A) elongation. The polyadenylation process must finally activate translation initiation at the mRNA 5′ cap. The initiation factor eIF4E is bound there to the 7-methyl guanosine residue but is prevented to recruit the 40S ribosomal subunit by an inhibitory protein, maskin, which is also bound to CPEB. Maskin binds eIF4E at the same region as eIF4G, a scaffold protein of the 40S ribosomal subunit. Maskin phosphorylation and association of eIF4G with the poly(A) binding protein (PABP), on the folded elongated poly(A) tail, frees eIF4E which then can bind eIF4G, forming the complete eIF4F initiation complex (Cao and Richter, 2002; Barnard et al., 2005; Pascreau et al., 2005). Similar regulatory processes are known to operate in *Drosophila* where translation of development regulators, as the germ line determinant oskar, are controlled by the binding of an inhibitory complex on 3′ UTR specific response elements, reviewed in Richter and Sonenberg (2005).

Translation can also be inhibited in a non-mRNA specific way by small eIF4E binding proteins (4E-BPs), which prevent eIF4G interaction (Lin et al., 1994; Pause et al., 1994). The tightness of the interaction depends on 4E-BP phosphorylation level. It is high when 4E-BP is hypophosphorylated, null when maximally phosphorylated. 4E-BP is sequentially phosphorylated by several protein kinases, with the involvement of the mammalian target of rapamycin kinase (mTOR). This kinase was initially discovered by searches on the toxicity of rapamycin, a potent immunosupressant, isolated from a *Streptomyces* strain (Heitman et al., 1991). It plays a central role in the response pathways to growth factors, hormones or nutrients (Hay and Sonenberg, 2004), but the precise interactions with substrates, activators and inhibitors are still controversial (Proud, 2007). However a recent report on mice lacking 4E-BPs confirms that they are major physiological targets of stimulatory extracellular signal transduction (Le Bacquer et al., 2007). eIF4E is also submitted to phosphorylation by Mnks (MAPK signal-integrating enzymes), themselves regulated by extracellular-signal-regulated kinase (ERK) and stress- and ctytokine-activated p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Pyronnet et al., 1999). The effect of eIF4E phosphorylation on its binding to the cap is still controversial (Scheper and Proud, 2002) but, in *Drosophila*, it plays an important role in normal development and growth (Lachance et al., 2002).

Sea urchin eggs and starfish oocytes are also relevant models to study the relationships between translation and cell division, and examples of involvement of both cap-dependent and 3′UTR dependent mechanisms have been reported. Starfish oocytes have proven useful to complete the data obtained on meiosis reinitiation with *Xenopus* oocytes (Fig. 1), due to several simplifications in regulatory processes, see Kishimoto (2003) for a review. In both cases, oocytes, after completion of vitellogenesis, are arrested in prophase of first meiotic division. Meiosis reinitiation is induced by hormonal stimulation, a steroid in *Xenopus*, 1-methyladenine (1-MA) in starfish, both of which act on the oocyte surface. The hormone receptor is not identified in starfish while several have been described in *Xenopus*. Signal transduction is then effected by an activation cascade leading to transformation of stored inactive pre-MPF (M-phase promoting factor) into active cyclin B-cdc2 (see Doree and Hunt, 2002), responsible for the G2-M transition. In both species, the rate of protein synthesis increases upon meiosis reinitiation (Guerrier and Doree, 1975; Richter et al., 1982; Wasserman et al., 1982) but it is absolutely necessary only in *Xenopus* (see Kishimoto, 2003; Haccard and Jessus, 2006 for review) and the chronology is different, with Mos synthesis beginning before cdc2 activation in *Xenopus* while only after in starfish. Cyclin is one of the major newly synthesized protein, with a simpler system in starfish where there is only one cyclin B, whereas *Xenopus* has four, with cyclins B2 and B5 being replaced by cyclins B1 and B4 during entry into meiosis II (Hochegger et al., 2001). It has been shown that, as in *Xenopus*, cyclin synthesis is regulated by polyadenylation of pre-existing mRNAs, upon starfish oocyte meiosis reinitiation (Rosenthal et al., 1982; Standart et al., 1987) and, in a recent work, we gave evidence for a CPEB-dependent regulation (Fig. 1B). In various experimental conditions where cyclin B synthesis was prevented by enucleation or restored by microinjection of a phosphatase inhibitor we showed a correlation with CPEB phosphorylation and cyclin B mRNA translation. Thus the regulation of cyclin B translation could result from an equilibrium between CPEB phosphorylation, by cdc2 activation following hormone addition, and dephosphorylation, by a cytoplasmic type 1 phosphatase finally inactivated by a nuclear inhibitor released at the disruption of the germinal vesicle (Lapasset et al., 2005).

The sea urchin egg is another widely used model for the study of proteins synthesis regulation in relation with cell division (Epel, 1967; Evans et al., 1983; Morales et al., 2006). The cell cycle context differs from oocytes since unfertilized eggs are arrested after completion of meiosis, at the G1 stage, and will undergo mitotic divisions after fertilization. The increase in protein synthesis which follows fertilization has been extensively studied and is correlated with an elevation of intracellular pH (see Hille et al., 1990 for a review). As in oocytes, this synthesis relies on stored mRNAs whose translation is inhibited until fertilization. Cyclin B are among the main proteins to be synthesized but their translation has been recently shown to be regulated by a rapamycin-sensitive pathway (Salaun et al., 2003). In starfish oocytes also, significant changes in cap regulatory proteins have been found to be correlated with the maturation induced increase in protein synthesis, but these studies were mostly focused on the regulation of eIF4E phosphorylation (Xu et al., 1993; Lee et al., 2000). This prompted us to investigate the effect of rapamycin on starfish meiotic divisions, in search for specific cap-dependent regulations. The present results demonstrate that in starfish oocytes, while the increase of the global protein synthesis triggered by 1-MA is regulated by a rapamycin-sensitive pathway, specific translation of cyclin B and other key initiators of meiosis reinitiation, as Mos, are not affected by rapamycin. Cylin B translation and Mos expression are correlated with the phosphorylation and the dissociation of CPEB from eIF4E. Furthermore, we also show that rapamycin precludes the completion of the starfish oocytes meiotic maturation suggesting that a cap-dependent translation is involved in this crucial physiological process.

MATERIALS AND METHODS

Starfish Oocytes

The starfishes *Astropecten aranciacus* were collected by diving during the breeding season near the marine biological station of Banyuls sur mer (Banyuls, France), and kept in running sea water (SW). Prophase-blocked oocytes were prepared free of follicle cells by washing in calcium-free SW, before returning to normal SW, and meiosis reinitiation was induced by addition of 1 μM 1-methyladenine, as previously described (Picard and Doree, 1984).

Oocyte Labeling With ^{35}S-Methionine

Batches of 10 oocytes of *A. aranciacus* were pulse labeled for 10 min in the presence of 300 μCi/ml ^{35}S-methionine (G.E. Healthcare, Saclay, France), transferred in SW containing 100 mM methionine, fixed in sample buffer (Laemmli, 1970) and processed for SDS–PAGE and autoradiography of ^{35}S incorporated into proteins (Galas et al., 1993). Quantification was performed, from densitometric scanning of the autoradiograms, with Bio1D software (Vilber-Lourmat, France). ^{35}S uptake was measured on pulse labeled oocytes washed three times with 100 v of SW, dissolved in Laemmli sample buffer and counted by liquid scintillation. For immunoprecipitation, 50 oocytes were homogenized and frozen in 400 μl of IP buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 mM NaF, 10 mM phenylphosphate, 5 mM Na pyrophosphate, 0.5 mM Na orthovanadate, 0.1% Triton X-100, 0.1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor). After thawing, sonication and clearing by centrifugation for 10 min at 10,000*g*, anti-cyclin B or non immune immunoglobulins were added to the supernatant (10 μg/ml) for 2 hr at 4° and recovered on 10 μl of protein A sepharose beads (Moreau et al., 1998). Beads and supernatants were fixed and processed for SDS–PAGE and autoradiography.

Antibodies

The anti-cyclin B polyclonal antibody was raised in rabbit against a synthetic peptide (Neosystem, Strasbourg, France) corresponding to the N-terminal part of *A. aranciacus* cyclin B: MALRERGTPNVLGNC (EMBL accession no. AM851052), and affinity purified on the same peptide. Polyclonal anti-eIF4E, raised in rabbit against eIF4E protein of the starfish *Pisaster ochraceus* (Lee et al., 2000), was a generous gift from Dr M. Hille. Polyclonal antibody directed against human 4E-BP2 (Rousseau et al., 1996), was a generous gift from Dr N. Sonenberg. The anti-CPEB antibody was produced in rabbit and affinity purified against the recombinant protein corresponding to *Marthasterias glacialis* CPEB sequence (Lapasset et al., 2005). Anti-active-ERK antibody was from Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, sc-7383).

Immunofluorescence

The jelly coat and vitelline membrane were removed by a 20 min pronase treatment (0.5 mg/ml in SW), followed by three rinses in bovine serum albumin (0.1% in SW). Oocytes were extracted for 1 hr in extraction buffer (20% glycerol, 50 mM MES, pH 6.7, 10 mM EGTA, 0.5 mM $MgCl_2$, and 0.5% NP40) then fixed in methanol for 1 hr. Anti-α tubulin (monoclonal, G.E. Healthcare, dil. 1/100) was applied overnight at 4° and second antibody for 2 hr at room temperature. Hoechst (1 μg/ml) was added to the last wash, for DNA-staining.

Isolation of eIF4E and Associated Proteins

Pellets of oocytes, treated or not with rapamycin, were frozen in liquid nitrogen and kept at −80° until use. Cells were thawed in 5 volumes of binding buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 50 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 5 mM ATP, 10 mM tetrasodium pyrophosphate (PPi), 0.2 mM EDTA, 0.1 mM Na_3VO_4, 1 mM DTT, 0.5 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenzesulfonyl-fluoride hydrochloride (AEBSF), and 10 μg/ml of aprotinin and leupeptin), briefly sonicated and centrifuged for 10 min at 10,000*g*. The supernatant was mixed with 1/40 volume of m^7GTP-Sepharose beads and incubated for 1 hr at 4°C. The beads were washed four times with binding buffer containing 100 mM NaCl, and then added with Laemmli sample buffer.

Western Blots

For western blots, 10 *A. aranciacus* oocytes in 5 μl SW were added to 15 μl Laemmli sample buffer, separated by SDS–PAGE, blotted, incubated with antibodies and visualized by ECL plus (G.E. Healthcare).

Far-Western Analysis

Far-western blots were performed using ^{32}P-labeled heart muscle kinase (HMK)-tagged recombinant murine eIF4E, as described previously (Pause et al., 1994). Briefly, proteins were separated on SDS–PAGE and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were pre-incubated in HBB buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.7, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40 and 5% skimmed milk) for 2 hr at 4°C and then incubated in Hyb75 buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.7, 75 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40 and 1% skimmed milk) containing ^{32}P-labeled HMK-eIF4E (250,000 cpm/ml) overnight at 4°C. After extensive washing in Hyb75 buffer, the membrane was dried and autoradiographed.

RESULTS

Cyclin B Synthesis is Independent of the Rapamycin-Sensitive Pathway During the Meiotic Maturation of Starfish Oocytes

New cyclin B synthesis is required for progression from meiosis I into meiosis II and correlates with the increase of general protein synthesis in starfish oocytes. In sea urchin, another echinoderm, cyclin B translation has been shown to be regulated by a rapamycin-sensitive pathway following fertilization (Salaun et al., 2003). To test the effect of rapamycin on cyclin B translation during the meiotic maturation of starfish oocytes, the pattern of proteins synthesized de novo in oocytes stimulated by 1-MA in the presence of the drug was analyzed following resolution of ^{35}S-methionine-labeled proteins by SDS–PAGE and autoradiography (Fig. 2A). In untreated oocytes (left panel), 1-MA induced a rapid increase of global translation and a 46 kDa labeled protein appeared somewhat later (40 min), just after germinal vesicle breakdown (GVBD) and became gradually predominant until completion of both meiotic divisions at 180 min after 1-MA addition. The production of this labeled protein was in agreement with the expected cyclin B protein pattern (Galas et al., 1993). Following immunoprecipitation using specific anti-cyclin B, this protein was definitively identified as *A. aranciacus* cyclin B (Fig. 2B). As previously reported on another starfish species (Lee et al., 2000), rapamycin had no effect on the time or the extent of GVBD (results not shown), but the main increase in global translation rate, which occurred between 20 and 120 min, was suppressed in rapamycin treated oocytes (Fig. 2A, compare right and left panels). Interestingly, the pattern of cyclin B de novo synthesized was not affected by rapamycin treatment (Fig. 2A, right panel). In similar experiments with oocytes isolated from four different females, rapamycin was found to induce a 20% decrease of ^{35}S-methionine uptake, which may account for the similar lower incorporation in cyclin B, measured by quantitative analysis of the autoradiograms, whereas global protein synthesis was reduced by more than 50% (Fig. 2C). These results suggest that the mTOR pathway controls partially the global protein synthesis triggered by 1-MA but does not alter the specific translation of cyclin B during the meiotic maturation of starfish oocytes.

Effect of Rapamycin on the Second Polar Body Emission

Since rapamycin did not affect cylin B translation, we then tested the effect of the drug on the completion of

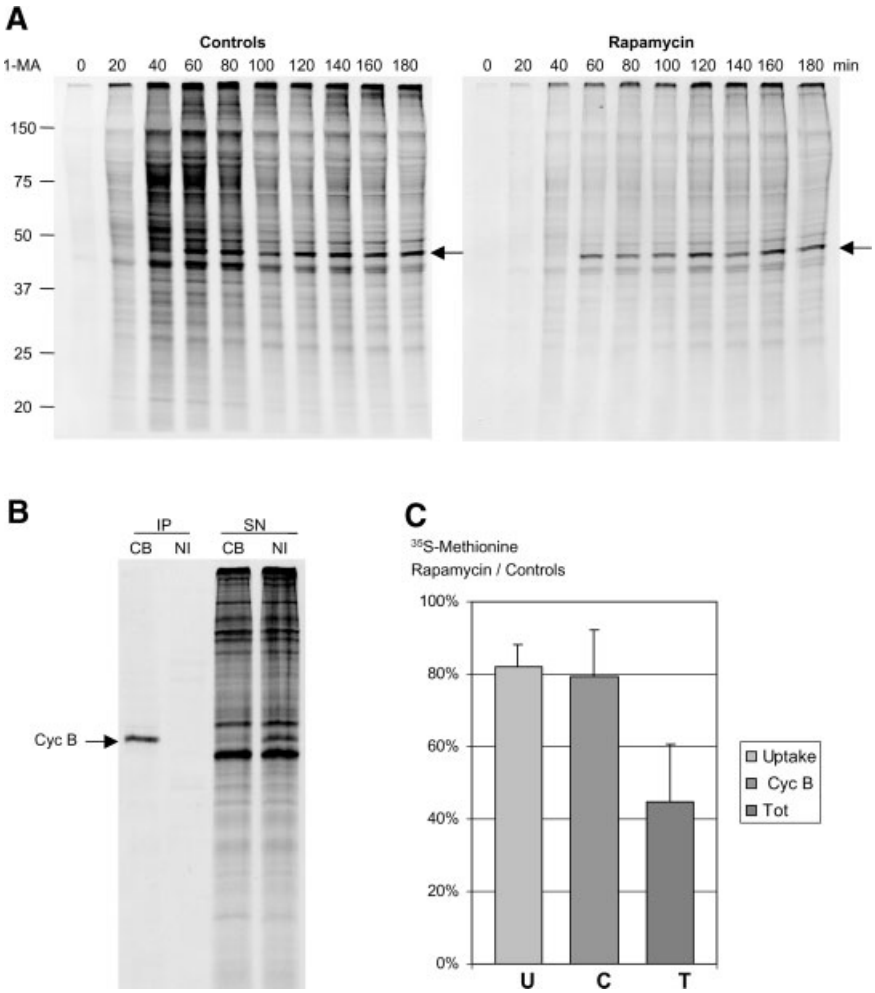


Fig. 2. Rapamycin affects global protein synthesis more than cyclin B synthesis. **A**: Protein synthesis in *Astropecten aranciacus* oocytes treated with 10 μM rapamycin (Rapamycin) or not (Controls), 10 min before 1-MA addition. Autoradiography of ^{35}S-pulse labeling, for 10 min, taken at the indicated time after 1-MA addition (min). Germinal vesicle breakdown occurred at 35 min, first polar body emission at 105 min, and second polar body emission at 135 min, in controls, while rapamycin treated oocytes did not emit second polar body. The migration positions of molecular weight markers, with their value in kDa, are indicated on the left and that of cyclin B on the right, by an arrow. **B**: Immunoprecipitation of cyclin B from ^{35}S-labeled oocytes at 80 min after 1-MA addition. Autoradiography of the immunoprecipitates (IP) with anti-cyclin B (CB) or non-immune (NI) immunoglobulins, or of the extracts after immunoprecipitation (SN). **C**: Quantitative analysis of rapamycin effect on cyclin B or global protein synthesis. Autoradiograms of ^{35}S-pulse labeling between 60 and 140 min were analyzed by densitometry for global protein synthesis (T) or the cyclin B peak (C) and compared to ^{35}S uptake (U). The results are indicated as the percent of rapamycin treated versus control samples. The standard deviation from four independent experiments is indicated.

maturation. Oocytes were preincubated in the presence of rapamycin for 10 min and then 1-MA was added and maintained in the presence of rapamycin. The different stages of the meiotic cell cycle were monitored by DNA staining with bis-benzimide and microtubular network analysis was performed using anti-tubulin antibodies (Fig. 3). While rapamycin did not affect the first polar body emission, the drug impaired second polar body emission. When compared to control oocytes at the time of metaphase II (panel A) or second polar body emission (panel B), rapamycin-treated oocytes showed damaged microtubular networks, with condensed chromatin in the vicinity of two unorganized asters with long microtubules, localized near the cell surface, which failed to reassemble a normal spindle (panel C) and emit the second polar body (panel D). Taken together, our data suggest that rapamycin does not affect the first meiotic division but prevents the synthesis of one or several essential proteins necessary for a correct distribution of the chromosomes and the completion of the second meiotic division.

Rapamycin Prevents eIF4E Release From its Repressor 4E-BP

Since rapamycin treatment of starfish oocytes affects partially the global protein synthesis increase and inhibits the second meiotic division triggered by 1-MA addition, we asked whether the drug could act on the cap-binding protein eIF4E and its association with the small protein inhibitor 4E-BP (Fig. 4). To test this

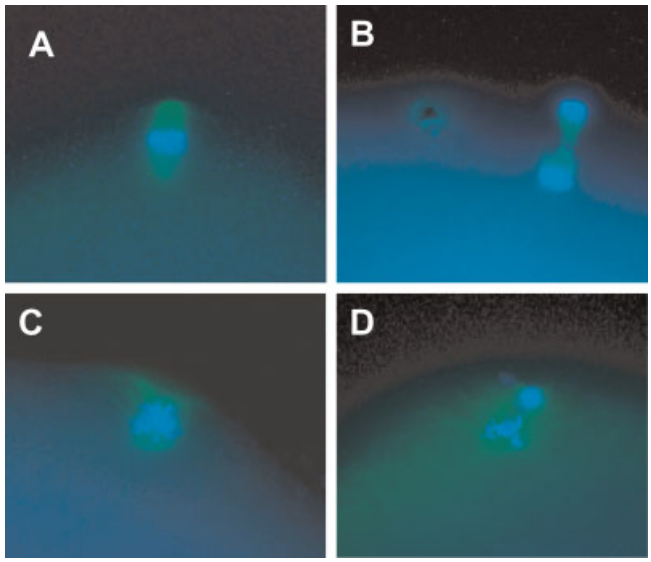


Fig. 3. Rapamycin impairs second polar body emission. Oocytes treated with 10 μM rapamycin (**C**,**D**) or not (**A**,**B**) 10 min before 1-MA addition were processed for immunofluorescence detection of tubulin (green) or DNA (blue) at the time of metaphase II (A,C) or second polar body emission in controls (B,D).

hypothesis, the eIF4E interaction with 4E-BP during the oocyte meiotic maturation was first analyzed in control oocytes after affinity purification of eIF4E on m^7GTP column (Fig. 4A, left panels). Before 1-MA addition (zero-time), 4E-BP copurified with eIF4E and interestingly, the amount of 4E-BP associated with eIF4E diminished dramatically 40 min after hormone addition, remained low until 100 min and then increased at 120 min. In order to confirm that eIF4E/4E-BP complex dissociation occurred during starfish oocyte meiotic maturation, eIF4E/4E-BP interaction was also analyzed in total extracts of control oocytes by far-Western blotting at different time during meiotic maturation. As expected, ^{32}P-labeled recombinant eIF4E bound strongly to 4E-BP (17 kDa) in extracts prepared before 1-MA addition, while the interaction decreased dramatically within 40 min, remained low until 80 min and increased at 90 min following hormone addition (Fig. 4B, left panel). These results demonstrate for the first time that the association of 4E-BP with eIF4E is downregulated upon meiotic maturation of the starfish oocyte, in 40 min after 1-MA. Interestingly, the eIF4E/4E-BP dissociation, in the 40–80 min post-1-MA period, is inhibited by rapamycin (Fig. 4, right panels).

eIF4E/CPEB Complex is Regulated During Meiotic Maturation Via a Rapamycin-Independent Pathway

The regulation of cyclin B synthesis for progression through starfish meiosis has been suggested to be dependent of the CPEB phosphorylation status (Lapasset et al., 2005). In other systems, such as the meiotic maturation of amphibian's oocyte, CPEB has been found to be physically associated to a translational repressor that sequesters eIF4E and prevents it from binding

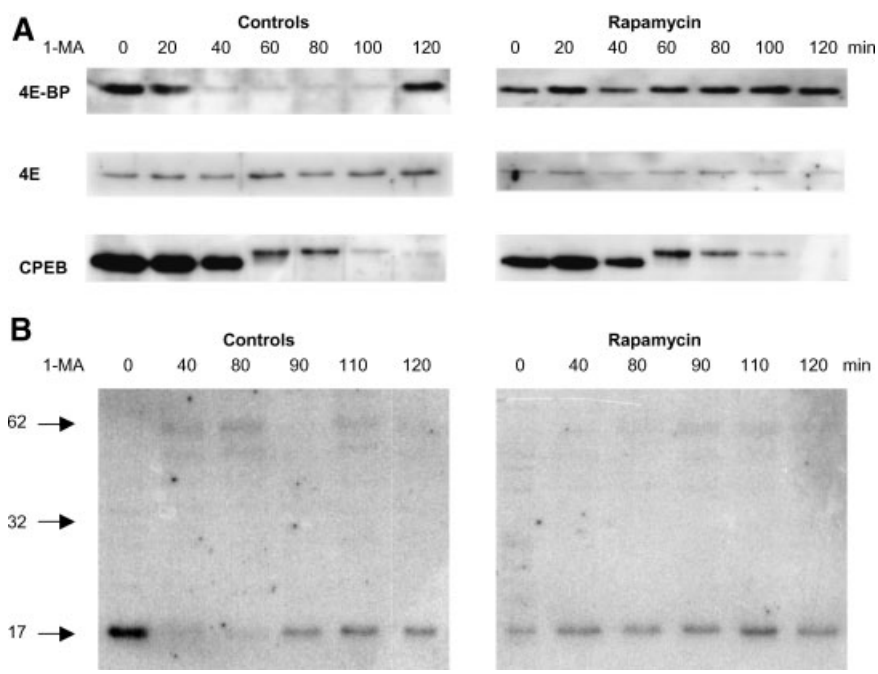


Fig. 4. Rapamycin prevents dissociation of 4E-BP from eIF4E upon meiosis reinitiation. **A**: Extracts of oocytes treated with 10 μM rapamycin (Rapamycin) or not (Controls), 10 min before 1-MA addition, were taken at the indicated times (min) and incubated with m^7GTP beads. Bound proteins were analyzed by Western-blot with anti-4E-BP, anti-4E, or anti-CPEB. The areas shown correspond to molecular weights around 17, 26, and 100 kDa respectively. **B**: Far-Western analysis of the binding of ^{32}P-labeled eIF4E on electrophoretic blots of oocytes treated with rapamycin (Rapamycin) or not (Controls), taken at the indicated times (min) after 1-MA addition. The electrophoretic migration position of molecular weight markers of 17, 32, and 62 kDa are indicated.

eIF4G. We then asked whether CPEB could copurify with eIF4E in starfish oocytes. Using the same membranes than for the analysis of eIF4E-associated 4E-BP, the presence of CPEB was searched using an anti-CPEB antibody (Fig. 4A, bottom panels). CPEB co-purified with endogenous eIF4E after m^7GTP-column purification from starfish oocytes in prophase-blocked oocytes before 1-MA addition (zero-time). Interestingly, the level and the electrophoretic mobility of CPEB that co-purified with eIF4E decreased dramatically following hormone addition (Fig. 4A, bottom left panel). This decrease in the mobility of eIF4E-co-purified CPEB showed the same behavior that has been previously described for the CPEB studied in cellular extracts of whole starfish oocytes (Lapasset et al., 2005). Since it is well documented that the mobility shift is the consequence of phosphorylation of CPEB on multiples sites (Paris et al., 1991; Hake and Richter, 1994; Walker et al., 1999; Thom et al., 2003), we then asked whether the mTOR signaling pathway could be involved in these modifications. We therefore tested whether rapamycin affects the eIF4E-co-purified CPEB modifications that occurred during meiotic maturation. Rapamycin had no effect on the chronology of CPEB binding to eIF4E and of its phosphorylation related mobility changes following hormone addition (Fig. 4A, bottom right).

Mos Translation is Also Unaffected by Rapamycin

Mos is one of the central regulators of meiosis in vertebrate oocytes (Sagata, 1997). It is not detected in G2 arrested oocytes but starts to be synthesized shortly after induction of meiosis reinitiation, as a result of CPEB mediated polyadenylation in *Xenopus* (Mendez et al., 2000). Although dispensable for the induction of GVBD, Mos is also newly synthesized in starfish oocytes and controls the activation of the MAPK pathway, as demonstrated in *Asterina pectinifera* by Tachibana et al. (2000). We wanted to verify that in starfish also, Mos synthesis is not regulated through the mTOR pathway. In starfish as in other oocytes, MAPK activity is dependent on the continuous presence of Mos: MAPK activity disappears if Mos synthesis is experimentally suppressed in maturing oocytes and appears if exogenous Mos protein is injected (Tachibana et al., 2000; Lapasset et al., 2005). Western blot analysis with anti-active MAPK antibodies showed the expected appearance of MAPK activity immediately after GVBD, even in rapamycin-treated oocytes (Fig. 5, bottom panel). The drug had no effect on the chronology of this activation as well as the phosphorylation of CPEB, indicated by the electrophoretic mobility shift (Fig. 5, top panel), or the progressive destruction of cyclin B related to first polar body emission at 105 min (Fig. 5, middle panel). Thus, it can be deduced from this experiment that Mos synthesis is not affected by rapamycin, and the temporal correlation of MAPK activation, shortly after CPEB phosphorylation, suggests that it is controlled by a CPEB dependent pathway.

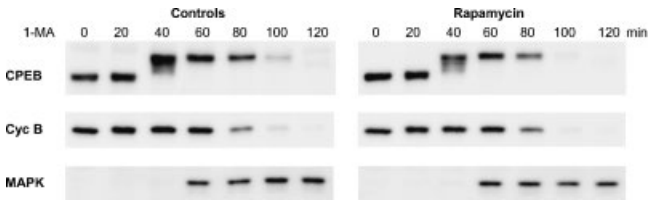


Fig. 5. Rapamycin has no effect on Mos-dependent MAP kinase activation. Western-blot analysis with anti-CPEB, anti-Cyclin B or anti-active MAP kinase, of oocytes treated with 10 μM rapamycin (Rapamycin) or not (Controls), taken at the indicated times (min) after 1-MA addition.

DISCUSSION

In the present work, we provide evidence for the involvement of a rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions. The target of this regulation, by the mTOR pathway, is the increased synthesis of a large variety of proteins, occurring between 20 and 100 min after 1-MA stimulation, thus starting before GVBD (35 min) and around first polar body emission (105 min). The pattern of newly synthesized protein in the ^{35}S-methionine pulse labeling experiments also shows the existence of a slower and rapamycin-insensitive increase in protein synthesis reaching its maximal level at completion of GVBD and staying mostly unchanged until the end of both meiotic divisions. The most prominent synthesis in this latter category is that of a 46 kDa protein identified as cyclin B.

The cap-dependent translational repressor 4E-BP is an mTOR target and has emerged as a key molecular actor for the global protein synthesis regulation. The presence of eIF4E and 4E-BP has been previously reported in the starfish *Pisaster ochraceus* (Xu et al., 1993; Lee et al., 2000), and both of them were found to be associated, by affinity purification on m^7GTP beads. In our experiments using another starfish species, *Astropecten aranciacus*, these proteins were similarly copurified and identified by Western blot at similar molecular weights of 26 and 17 kDa for eIF4E and 4E-BP respectively. We further confirm, by far-Western, the ability of 4E-BP to bind an heterologous eIF4E. While three 4E-BPs of different molecular weights are classically described in mammals, a single band is detected here, suggesting that only one 4E-BP ortholog exists in starfish oocytes according with what has been previously demonstrated in sea urchin (Cormier et al., 2001; Morales et al., 2006), another echinoderm.

Our data demonstrate that, at the time of GVBD completion, 4E-BP no longer associates with eIF4E, either bound to m^7GTP beads or in far-Western, and that this change is inhibited by treatment with rapamycin, suggesting 4E-BP phosphorylation due to mTOR signaling pathway activation. This differs apparently from previous results on *Pisaster* where 4E-BP was reported to stay associated with m^7GTP bound eIF4E, upon initiation of maturation (Lee et al., 2000). Besides species specific differences, the simpler explanation of

this discrepancy is that the change in affinity occurs at the time of GVBD, so that 4E-BP may still bind to eIF4E when the first signs of nuclear envelope disruption can be seen, whereas it does not at completion of GVBD, as reported in the present work. Another apparent difference is that, in the experiments on *Pisaster*, 4E-BP was shown to undergo increased phosphorylation, upon initiation of maturation, which was not significantly inhibited in the presence of rapamycin. However mammalian 4E-BP1 is known to be sequentially phosphorylated on several serine and threonine amino acids and maximal phosphorylation is needed to disrupt association with eIF4E (Gingras et al., 2001). Thus the phosphorylation detected by in vivo ^{32}P labeling, in *Pisaster*, may result from the initial steps of phosphorylation, which are also reported to be rapamycin resistant in serum stimulated mammalian cells. Rapamycin may still prevent mTOR to bring 4E-BP to the maximal phosphorylation level required for inhibition of eIF4E binding, as seen in our results.

Interestingly, the dissociation of the eIF4E/4E-BP complex is transitory, since the heterodimeric complex is progressively restored before first polar body emission and stays unchanged during completion of meiosis (results not shown). Additional control of 4E-BP through rapamycin-sensitive proteolysis has been shown in sea urchin eggs (Salaun et al., 2003) and mammalian cells (Elia et al., 2008). The question of the stability of 4E-BP remains open in starfish oocytes, since in this organism, the protein could not be directly detected in Western blots from whole oocyte homogenates, even after removal of heat and acid precipitable proteins (Lee et al., 2000 and the present work). In any case, these are evidences for a sophisticated regulation of global protein translation, through eIF4E association and dissociation with its repressor, in the different steps of the meiotic maturation of starfish oocyte.

While cyclin B synthesis, and thus the onset of mitosis, has been shown to be regulated by a rapamycin-sensitive pathway following sea urchin fertilization (Salaun et al., 2003), our present data indicate that during starfish oocyte meiotic divisions, cyclin B translation occurs independently from this pathway. This confirms our previous results supporting a regulation of cyclin B translation through a 3′ UTR specific response element of its mRNA (Lapasset et al., 2005) controlling polyadenylation and release of eIF4E inhibition, in accordance with the *Xenopus* oocyte model. We showed that cyclin B synthesis is strictly correlated with the phosphorylation of CPEB, itself controlled by cdc2 activity and a type 1 protein phosphatase. We bring here an additional argument by showing the association of CPEB with eIF4E on m^{7}GTP beads, probably mediated by an intermediate protein like maskin (Stebbins-Boaz et al., 1999). Therefore we propose that in starfish, as in *Xenopus*, cyclin synthesis is regulated by the binding of a multiprotein complex to its mRNA. Specificity is conferred by CPEB, which binds the CPE 3′-UTR sequence, and inhibition by maskin which binds eIF4E, preventing eIF4G fixation and translation initiation, while other components of this complex regulate polyadenylation (Barnard et al., 2004). Upon meiosis reinitiation, polyadenylation is activated and CPEB and maskin are sequentially phosphorylated, by cdc2 in the last step, releasing completely the inhibition on eIF4E (Cao et al., 2006). This hypothesis is supported by the kinetic of cyclin synthesis, whose initiation at GVBD is preceded by cdc2 activation (Labbe et al., 1988; Galas et al., 1993), and concomitant with CPEB hyperphosphorylation (Lapasset et al., 2005 and this work). Besides cyclin B, the translation of several other key regulatory proteins, as Mos, has been shown to be controlled by CPEB and polyadenylation in *Xenopus* (Stebbins-Boaz et al., 1996). The present results, which show that Mos synthesis is not rapamycin-dependent, as judged from the normal activation of MAP kinase, argue for a similar regulation in starfish oocyte.

As previously reported in another starfish species (Lee et al., 2000) and *Xenopus* (Morley and Pain, 1995), we found that rapamycin has no effect on the occurrence of GVBD. The cytological effect of rapamycin treatment, on second meiotic division only, reported in the present work fits with previous reports which showed that first polar body emission was unaltered, even when protein synthesis was completely inhibited by emetine (Picard et al., 1985). However in studies using emetine, the impairment of second meiotic division was primarily due to the lack of synthesis of the needed cyclin B. This is not the case with rapamycin, which does not block cyclin B synthesis and does not induce exit from M phase, as evidenced by the condensed state of chromatin. The defects in spindle formation observed here resemble those observed upon treatment of mammalian cells with rapamycin (Bonatti et al., 1998). However, in these cells, they are assumed to result from inhibition of the ribosomal protein S6 kinase, p70^{S6K}, which also interacts with the Rho family of G proteins (Chou and Blenis, 1996), known to control various aspects of cytoskeleton. This interpretation is unlikely in oocytes, since at that time, S6 kinase activity is due to the rapamycin-insensitive p90^{Rsk} (Okumura et al., 2002; Mori et al., 2006). A direct link with mTOR inhibition may also be considered, as a recent study in *Drosophila* showed the direct involvement of Raptor and RheB, two proteins of the TOR complex, in chromosome misalignment (Goshima et al., 2007). Since antisense RNA experiments have shown that the translation of a large variety of protein mRNAs is required for meiotic spindle organization (see Terret et al., 2003; Pearson et al., 2005 as examples in mouse and *Drosophila* oocytes), the simplest hypothesis is that the block results from the lack of synthesis, during the rapamycin-sensitive period of first meiosis, of some of these essential proteins. A detailed analysis of meiotic spindle function in starfish oocyte may shed light on such a connection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Nahum Sonenberg for the gift of 4E-BP2 antibody and the construct encoding the recombinant (HMK) tagged recombinant murine eIF4E

protein, and Dr Merril B. Hille for anti-eIF4E. This work was supported by Association pour la Recherche contre la Cancer to P.C., Ligue Nationale contre le Cancer (Délégations Départementales Finistère, Morbihan, Vendée et Côte d'Armor) to P.C., Conseil Régional de Bretagne and Conseil Général du Finistère.

REFERENCES

Barnard DC, Ryan K, Manley JL, Richter JD. 2004. Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. Cell 119:641–651.

Barnard DC, Cao Q, Richter JD. 2005. Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. Mol Cell Biol 25:7605–7615.

Bonatti S, Simili M, Galli A, Bagnato P, Pigullo S, Schiestl RH, Abbondandolo A. 1998. Inhibition of the Mr 70,000 S6 kinase pathway by rapamycin results in chromosome malsegregation in yeast and mammalian cells. Chromosoma 107:498–506.

Cao Q, Richter JD. 2002. Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. EMBO J 21: 3852–3862.

Cao Q, Kim JH, Richter JD. 2006. CDK1 and calcineurin regulate Maskin association with eIF4E and translational control of cell cycle progression. Nat Struct Mol Biol 13:1128–1134.

Chou MM, Blenis J. 1996. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. Cell 85:573–583.

Cormier P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N, Belle R. 2001. eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. Dev Biol 232:275–283.

de Moor CH, Richter JD. 1997. The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. Mol Cell Biol 17:6419–6426.

Doree M, Hunt T. 2002. From Cdc2 to Cdk1: When did the cell cycle kinase join its cyclin partner? J Cell Sci 115:2461–2464.

Elia A, Constantinou C, Clemens MJ. 2008. Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. Oncogene 27:811–822.

Epel D. 1967. Protein synthesis in sea urchin eggs: A "late" response to fertilization. Proc Natl Acad Sci USA 57:899–906.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33:389–396.

Fox CA, Sheets MD, Wickens MP. 1989. Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: Distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. Genes Dev 3:2151–2162.

Galas S, Barakat H, Doree M, Picard A. 1993. A nuclear factor required for specific translation of cyclin B may control the timing of first meiotic cleavage in starfish oocytes. Mol Biol Cell 4:1295–1306.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E- BP1. Genes Dev 15:2852–2864.

Goshima G, Wollman R, Goodwin SS, Zhang N, Scholey JM, Vale RD, Stuurman N. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. Science 316:417–421.

Guerrier P, Doree M. 1975. Hormonal control of reinitiation of meiosis in starfish. The requirement of 1-methyladenine during nuclear maturation. Dev Biol 47:341–348.

Haccard O, Jessus C. 2006. Oocyte maturation, Mos and cyclins—A matter of synthesis: Two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. Cell Cycle 5:1152–1159.

Hake LE, Richter JD. 1994. CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. Cell 79:617–627.

Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev 18:1926–1945.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science 253:905–909.

Hille MB, Dholakia JN, Wahba A, Fanning E, Stimler L, Xu Z, Yablonka-Reuveni Z. 1990. In-vivo and in-vitro evidence supporting co-regulation of translation in sea-urchin eggs by polypeptide initiation factors, pH optimization, and mRNAs. J Reprod Fertil Suppl 42:235–248.

Hochegger H, Klotzbucher A, Kirk J, Howell M, le Guellec K, Fletcher K, Duncan T, Sohail M, Hunt T. 2001. New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation. Development 128:3795–3807.

Kishimoto T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. Curr Opin Cell Biol 15:654–663.

Labbe JC, Lee MG, Nurse P, Picard A, Doree M. 1988. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene cdc2+. Nature 335:251–254.

Lachance PE, Miron M, Raught B, Sonenberg N, Lasko P. 2002. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. Mol Cell Biol 22:1656–1663.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.

Lapasset L, Pradet-Balade B, Lozano JC, Peaucellier G, Picard A. 2005. Nuclear envelope breakdown may deliver an inhibitor of protein phosphatase 1 which triggers cyclin B translation in starfish oocytes. Dev Biol 285:200–210.

Le Bacquer O, Petroulakis E, Paglialunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, Sonenberg N. 2007. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. J Clin Invest 117:387–396.

Le Breton M, Cormier P, Belle R, Mulner-Lorillon O, Morales J. 2005. Translational control during mitosis. Biochimie 87: 805–811.

Lee SJ, Stapleton G, Greene JH, Hille MB. 2000. Protein kinase C-related kinase 2 phosphorylates the protein synthesis initiation factor eIF4E in starfish oocytes. Dev Biol 228:166–180.

Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC Jr. 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. Science 266:653–656.

McGrew LL, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB, Richter JD. 1989. Poly(A) elongation during Xenopus oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. Genes Dev 3:803–815.

Mendez R, Hake LE, Andresson T, Littlepage LE, Ruderman JV, Richter JD. 2000. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. Nature 404:302–307.

Morales J, Mulner-Lorillon O, Cosson B, Morin E, Belle R, Bradham CA, Beane WS, Cormier P. 2006. Translational control genes in the sea urchin genome. Dev Biol 300:293–307.

Moreau JL, Marques F, Barakat A, Schatt P, Lozano JC, Peaucellier G, Picard A, Geneviere AM. 1998. Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. Dev Biol 200:182–197.

Mori M, Hara M, Tachibana K, Kishimoto T. 2006. p90Rsk is required for G1 phase arrest in unfertilized starfish eggs. Development 133: 1823–1830.

Morley SJ, Pain VM. 1995. Hormone-induced meiotic maturation in Xenopus oocytes occurs independently of p70s6k activation and is associated with enhanced initiation factor (eIF)-4F phosphorylation and complex formation. J Cell Sci 108:1751–1760.

Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, Hanada Si S, Kozutsumi R, Mori M, Tachibana K, Kishimoto T. 2002. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. Nat Cell Biol 4:111–116.

Paris J, Swenson K, Piwnica-Worms H, Richter JD. 1991. Maturation-specific polyadenylation: In vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein. Genes Dev 5: 1697–1708.

Pascreau G, Delcros JG, Cremet JY, Prigent C, Arlot-Bonnemains Y. 2005. Phosphorylation of maskin by Aurora-A participates in the control of sequential protein synthesis during Xenopus laevis oocyte maturation. J Biol Chem 280:13415–13423.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5′-cap function. Nature 371:762–767.

Pearson NJ, Cullen CF, Dzhindzhev NS, Ohkura H. 2005. A pre-anaphase role for a Cks/Suc1 in acentrosomal spindle formation of Drosophila female meiosis. EMBO Rep 6:1058–1063.

Picard A, Doree M. 1984. The role of the germinal vesicle in producing maturation-promoting factor (MPF) as revealed by the removal and transplantation of nuclear material in starfish oocytes. Dev Biol 104:357–365.

Picard A, Peaucellier G, le Bouffant F, Le Peuch C, Doree M. 1985. Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation-promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes. Dev Biol 109:311–320.

Proud CG. 2007. Signalling to translation: How signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. Biochem J 403: 217–234.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. 1999. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. EMBO J 18:270–279.

Richter JD. 1991. Translational control during early development. Bioessays 13:179–183.

Richter JD, Sonenberg N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. Nature 433:477–480.

Richter JD, Wasserman WJ, Smith LD. 1982. The mechanism for increased protein synthesis during Xenopus oocyte maturation. Dev Biol 89:159–167.

Rosenthal ET, Brandhorst BP, Ruderman JV. 1982. Translationally mediated changes in patterns of protein synthesis during maturation of starfish oocytes. Dev Biol 91:215–220.

Rousseau D, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N. 1996. The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. Oncogene 13:2415–2420.

Sagata N. 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? Bioessays 19:13–21.

Salaun P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Belle R, Sonenberg N, Cormier P. 2003. eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. Dev Biol 255:428–439.

Scheper GC, Proud CG. 2002. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? Eur J Biochem 269:5350–5359.

Sheets MD, Fox CA, Hunt T, Vande Woude G, Wickens M. 1994. The 3′-untranslated regions of c-mos and cyclin mRNAs stimulate translation by regulating cytoplasmic polyadenylation. Genes Dev 8:926–938.

Slater I, Gillespie D, Slater DW. 1973. Cytoplasmic adenylylation and processing of maternal RNA. Proc Natl Acad Sci USA 70:406–411.

Standart N, Minshull J, Pines J, Hunt T. 1987. Cyclin synthesis, modification and destruction during meiotic maturation of the starfish oocyte. Dev Biol 124:248–258.

Stebbins-Boaz B, Hake LE, Richter JD. 1996. CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in Xenopus. EMBO J 15:2582–2592.

Stebbins-Boaz B, Cao Q, de Moor CH, Mendez R, Richter JD. 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with elF-4E. Mol Cell 4:1017–1027.

Tachibana K, Tanaka D, Isobe T, Kishimoto T. 2000. c-Mos forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. Proc Natl Acad Sci USA 97:14301–14306.

Terret ME, Lefebvre C, Djiane A, Rassinier P, Moreau J, Maro B, Verlhac MH. 2003. DOC1R: A MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. Development 130:5169–5177.

Thom G, Minshall N, Git A, Argasinska J, Standart N. 2003. Role of cdc2 kinase phosphorylation and conserved N-terminal proteolysis motifs in cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB) complex dissociation and degradation. Biochem J 370:91–100.

Walker J, Minshall N, Hake L, Richter J, Standart N. 1999. The clam 3′ UTR masking element-binding protein p82 is a member of the CPEB family. RNA 5:14–26.

Wasserman WJ, Richter JD, Smith LD. 1982. Protein synthesis during maturation promoting factor- and progesterone-induced maturation in Xenopus oocytes. Dev Biol 89:152–158.

Wilt FH. 1973. Polyadenylation of maternal RNA of sea urchin eggs after fertilization. Proc Natl Acad Sci USA 70:2345–2349.

Xu Z, Dholakia JN, Hille MB. 1993. Maturation hormone induced an increase in the translational activity of starfish oocytes coincident with the phosphorylation of the mRNA cap binding protein, eIF-4E, and the activation of several kinases. Dev Genet 14:424–439.

Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les relations fonctionnelles entre les facteurs impliqués dans la traduction dépendante de la coiffe m^7GTP et la régulation de la synthèse protéique dans l'entrée du cycle cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé comme système d'étude la fécondation et le développement embryonnaire chez les échinodermes qui représente un modèle de choix pour l'étude entre la synthèse protéique et le cycle cellulaire. La machinerie de traduction est constituée de nombreux facteurs représentés de manière non redondante dans l'oursin (Morales et al, 2006). De plus, la conservation des acteurs au cours de l'évolution permet sans difficulté de transférer les données de l'oursin à l'homme.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à des facteurs clés pour la synthèse protéique. Nous avons étudié leur rôle et leur régulation en réponse à la fécondation et après activation artificielle des ovules d'oursin. Les régulations traductionnelles ont également été mises en évidence au cours d'un autre processus, la maturation méiotique, chez un autre échinoderme, l'étoile de mer. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ouvre de nouvelles perspectives sur les régulations traductionnelles.

1-Les multiples isoformes d'eIF4G

1-1-Modifications d'eIF4G au cours du développement embryonnaire

eIF4G est une protéine essentielle pour le recrutement du ribosome sur l'ARNm. Plusieurs isoformes d'eIF4G existent chez les mammifères (Byrd et al, 2002 ; Byrd et al, 2005) mais peu de données sont disponibles pour comprendre leur rôle respectif (Coldwell et Morley, 2006). Nous mettons ici en évidence que ce facteur eIF4G est aussi présent sous plusieurs isoformes dans les ovules d'oursin et que celles-ci sont modifiées très rapidement de manière post-traductionnelle en réponse à la fécondation (Article 1). Chez les mammifères, trois sites de phosphorylation sensibles à la rapamycine ont été identifiés sur eIF4GI (Raught et al, 2000). Ces trois sites ne sont pas conservés chez l'oursin. Les modifications d'eIF4G sont insensibles à un traitement à la phosphatase et sont aussi insensibles à la rapamycine chez l'oursin. Ces modifications post-traductionnelles sont pour l'instant indéterminées mais le profil en échelle obtenu en Western blot ressemble à une ubiquitination ou à une sumoylation.

L'ubiquitination correspond à l'ajout d'ubiquitine sur les lysines des protéines pour les dégrader par une voie dépendante du protéasome. La sumoylation correspond à l'ajout de sumo également sur les lysines, sumo rentre en compétition avec l'ubiquitine et protège de la dégradation (Hoege et al, 2002). Nous avons commencé à analyser ces modifications d'eIF4G chez l'oursin. Après immunoprécipitation d'eIF4G avec l'anticorps spécifique d'oursin, nous avons étudié les isoformes par Western Blot en utilisant différents anticorps anti-ubiquitine et anti-sumo (résultats non présentés). Ces expériences n'ont pas permis de conclure, il est probable que les anticorps utilisés ne croisent pas avec les protéines d'oursin. Nous avons également essayé d'identifier ces modifications après immunoprécipitation d'eIF4G puis analyse par spectrométrie de masse mais aucun résultat significatif n'a été obtenu. Ces analyses devront être poursuivies et complémentées par l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome par exemple.

D'autres résultats obtenus chez le même oursin *S. granularis* indiquent qu'eIF4G est également modifié en réponse à un stress induit par un agent endommageant l'ADN, le MMS (Le Bouffant et al, 2008b). L'identification de ces modifications permettra aussi de mieux comprendre la régulation d'eIF4G au cours du développement embryonnaire.

1-2-Rôle des isoformes d'eIF4G chez l'oursin

eIF4G est une protéine plateforme qui recrute plusieurs facteurs près de l'ARNm. Chez l'oursin, eIF4G interagit avec eIF4E. Les autres partenaires d'eIF4G pourront être identifiés après immunoprécipitation de ce facteur avant et après fécondation. Les protéines qui copurifient avec eIF4G seront déterminées après SDS PAGE et analyse par spectrométrie de masse. Ces interactions obtenues pourront être confirmées *in vitro* par GST pull down et la fonction de ces partenaires sera étudiée par des techniques de microinjection de peptides ou de morpholinos.

Toutes les isoformes d'eIF4G qui apparaissent après fécondation sont capables de s'associer à eIF4E (Article 1), on obtient un profil identique après activation des ovules par le calcium ionophore (Article 3). En revanche, seules les formes basses d'eIF4G sont recrutées sur eIF4E après alcalinisation des ovules par le NH4Cl. Cela suggère que ces isoformes sont suffisantes pour stimuler la synthèse protéique. Le calcium ionophore et le NH4Cl ont un effet différent sur les isoformes d'eIF4G, l'analyse des voies de signalisation impliquées dans ces

deux activations sera indispensable pour déterminer la régulation d'eIF4G par le calcium et le pH.

Chez l'oursin, les modifications post-traductionnelles qui affectent eIF4G pourraient permettre de recruter spécifiquement différents partenaires sur le complexe eIF4F. Puisque seules les formes basses d'eIF4G s'associent à eIF4E après traitement au NH4Cl, il faudrait purifier les complexes eIF4F sur colonne m^7GTP à partir d'ovules activés au NH4Cl et les comparer aux complexes purifiés à partir d'ovules fécondés et d'ovules activés par le calcium ionophore. Les complexes devront être analysés par SDS PAGE puis coloration protéique. Les protéines associées aux complexes seront identifiées par spectrométrie de masse.

De manière intéressante, on observe la présence simultanée de deux complexes différents avec eIF4E après activation des ovules par le NH4Cl. Deux heures après activation, 4E-BP réapparaît et se réassocie avec eIF4E, les complexes eIF4G/eIF4E diminuent mais sont toujours présents (Article 3). Malgré cette baisse de complexe eIF4G/eIF4E, aucune baisse de la synthèse protéique n'est observée. La synthèse mesurée en NH4Cl pourrait correspondre en grande partie à une traduction indépendante de la coiffe. L'analyse de la synthèse protéique induite après activation des ovules par le NH4Cl et en présence de rapamycine nous donnera des indications sur la nature des mécanismes mis en jeu.

2-Nouvelle vision sur la régulation de 4E-BP

Le modèle oursin a permis d'identifier la dégradation de 4E-BP comme un nouveau mécanisme régulateur de ce répresseur de la traduction (Salaun et al, 2003). Cette régulation par la dégradation a ensuite été démontrée chez les mammifères (Elia et al, 2008). De plus, comme chez la drosophile (Teleman et al, 2005, Tettweiller et al, 2005), l'expression de la protéine 4E-BP est régulée en fonction des stress chez l'oursin. Chez *S. granularis*, l'expression de 4E-BP varie en réponse à l'hypoxie, après un endommagement de l'ADN par la bléomycine (Le Bouffant et al, 2006) et après traitement par le chrome (Le Bouffant et al, 2008a). 4E-BP est un acteur important dans la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses (Armengol et al, 2007). La détermination de la régulation de 4E-BP est essentielle pour comprendre son influence sur le cycle cellulaire et pour l'utiliser comme cible thérapeutique. La fécondation et l'embryon d'oursin représentent un modèle de choix pour

étudier la régulation de 4E-BP et son implication dans le contrôle de la synthèse protéique dépendante de la coiffe m^7GTP.

2-1-Expression de 4E-BP

Chez l'oursin, la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP et la phosphorylation de 4E-BP sont corrélés à une rapide dégradation après fécondation (Cormier et al, 2001 ; Salaun et al, 2003). Cette dégradation de 4E-BP permet ainsi la libération d'eIF4E qui peut alors s'associer à de nouveaux partenaires comme eIF4G (Article 1). Cette libération d'eIF4E est cruciale pour le cycle cellulaire puisque l'injection d'un peptide 4E-BP (Salaun et al, 2005) ou d'un peptide eIF4G (Article 1) possédant le site d'interaction à eIF4E retarde la première division mitotique. Le fait que le niveau de la protéine 4E-BP soit dramatiquement modifié à la suite de la fécondation et au cours du développement embryonnaire (Salaun et al, 2003 ; Salaun et al, 2005) offre l'opportunité remarquable d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de 4E-BP. Le mécanisme de protéolyse est pour l'instant inconnu. Nous avons montré au cours de cette thèse que la protéolyse de 4E-BP est aussi activée après traitement des ovules par le calcium ionophore et le NH4Cl (Article 3). La comparaison des systèmes de protéolyse activés après fécondation et activation artificielle des ovules nous donnera des indications sur les mécanismes responsables de la dégradation de 4E-BP.

Chez l'oursin *Lytechinus pictus*, l'utilisation d'inhibiteur comme le MG-115 indique que le protéasome est important pour la première division mitotique (Kawahara et al, 2000). Le MG-115 rajouté après fécondation retarde le cycle cellulaire mais n'affecte pas la synthèse protéique. Ceci suggère que si 4E-BP est également dégradé chez *L. pictus*, le protéasome ne serait pas impliqué dans ce processus. Il faut noter également que l'inhibiteur a été rajouté 10 minutes après fécondation et qu'à ce moment 4E-BP est peut être déjà dégradé entièrement. Sachant que le MG-115 n'est pas très soluble dans l'eau de mer et doit mettre du temps à rentrer dans les cellules, il faudrait le rajouter juste après fécondation. Nous avons testé un autre inhibiteur du protéasome, le MG-132, sur *S. granularis*. Le MG-132 rajouté 3 minutes après fécondation retarde la première division mitotique mais n'inhibe pas la dégradation de 4E-BP (résultats non présentés). D'autres protéases impliquées dans le cycle cellulaire sont aussi présentes dans les embryons d'oursin (Penn et al, 1976). Leur rôle dans la dégradation de 4E-BP devra être évalué.

Les extraits acellulaires se sont révélés très utiles pour comprendre le rôle de la phosphorylation de 4E-BP chez l'oursin (Article 2). Pour étudier les mécanismes de dégradation de 4E-BP, des extraits acellulaires devront être mis au point à partir d'embryons d'oursin prélevés quelques minutes après fécondation, période à laquelle 4E-BP est activement dégradé. La dégradation de 4E-BP sera étudiée par ajout de la protéine de fusion GST-Sg4E-BP dans ces extraits. Les acides aminés impliqués dans la dégradation de 4E-BP pourront être identifiés en ajoutant également des mutants dans ces extraits. Le niveau de dégradation sera suivi par Western Blot.

Contrairement à la fécondation et à l'activation des ovules par le calcium ionophore, l'activation par le NH4Cl induit la dégradation puis la réapparition de 4E-BP (Article 3). En condition physiologique, 4E-BP réapparait également aux environs de 8H après fécondation (Salaun et al, 2005). Ces réapparitions de 4E-BP peuvent résulter d'une stimulation de sa synthèse ou d'une inhibition de sa dégradation. Déterminer comment est régulé 4E-BP représente un challenge important pour comprendre le contrôle de la synthèse protéique. En utilisant à la fois la fécondation, l'activation artificielle ainsi que les conditions de stress (Le Bouffant et al, 2006 ; Le Bouffant et al, 2008a), l'oursin apportera de nouvelles données sur le contrôle du niveau de 4E-BP.

2-2- Phosphorylation de 4E-BP

Dans l'oursin, 4E-BP est sous forme hypophosphorylé dans l'ovule et la fécondation provoque sa phosphorylation rapide (Salaun et al, 2003). Dans les cellules de mammifères, la phosphorylation de 4E-BP est le résultat d'une régulation extrêmement fine avec un contrôle hiérarchique (Gingras et al, 2001a). La phosphorylation des résidus Thr 37 et Thr 46 est nécessaire à la phosphorylation des Ser 65 et Thr 70. Le modèle actuellement admis dans les cellules de mammifères indique que l'hyperphosphorylation de 4E-BP est reliée à la dissociation du complexe 4E-BP/eIF4E (Gingras et al, 2001b). Cependant, les liens entre l'état de phosphorylation de 4E-BP et son interaction/dissociation avec eIF4E restent encore incompris. Nous montrons ici que l'oursin *S. granularis* possède les 4 sites de phosphorylation cités ci-dessus (Article 2). Nos résultats remettent en cause le modèle classique reliant hyperphosphorylation de 4E-BP et dissociation d'eIF4E. De manière très originale, un mutant mimant l'hyperphosphorylation de 4E-BP chez *S. granularis* est toujours capable de s'associer à une protéine eIF4E *in vitro* et inhibe la traduction dépendante de la

coiffe dans des extraits acellulaires d'oursin. Ces observations devront être confirmées par d'autres expériences. Il faudrait démontrer cette interaction *in vivo* en purifiant en grande quantité les partenaires d'eIF4E sur colonne m^7GTP à partir d'ovules et d'embryons prélevés peu de temps après fécondation, avant la dégradation complète de 4E-BP. La protéine 4E-BP qui copurifie avec eIF4E avant et après fécondation sera analysée par électrophorèse bidimensionnelle (2-D) suivie d'un Western blot en utilisant l'anticorps spécifique du 4E-BP d'oursin. Des changements de phosphorylation du 4E-BP toujours lié à eIF4E pourront alors être visualisés. Ces résultats obtenus chez *S. granularis* incitent à analyser la régulation de 4E-BP dans d'autres organismes pour comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de l'évolution.

Elia et ses collaborateurs ont récemment montré qu'il existe des formes de 4E-BP de mammifères de hauts poids moléculaires (Elia et al, 2008). Ces formes sont à la fois phosphorylées et ubiquitinées. Les auteurs suggèrent que la phosphorylation de 4E-BP régule à la fois la dissociation du complexe 4E-BP/eIF4E et l'ubiquitination de cet inhibiteur. Chez l'oursin, la phosphorylation de 4E-BP sur les 4 sites (Thr 37, Thr 46, Ser 65 et Thr 70) semble insuffisante pour le dissocier d'eIF4E. Il faudra alors comprendre leur rôle et notamment leur influence sur la dégradation de 4E-BP.

La voie de signalisation qui relie la fécondation à la dissociation du complexe 4E-BP/eIF4E chez l'oursin est sensible à la rapamycine (Salaun et al, 2003; Salaun et al, 2004), suggérant l'implication de la kinase FRAP/mTOR dans ces processi. L'ovule d'oursin représente donc un système intéressant pour analyser le rôle de la kinase FRAP/mTOR dans la traduction dépendante de la coiffe. Après clonage de FRAP/mTOR et production d'une protéine de fusion, un anticorps spécifique de l'oursin sera obtenu pour suivre la protéine en Western Blot. Pour comprendre l'implication de FRAP/mTOR dans la voie de signalisation en réponse à la fécondation, les protéines sauvage et mutante pourront être produites et introduites par microinjection dans des ovules avant fécondation. L'expression du gène sera inhibée par l'utilisation de morpholinos. L'anticorps permettra d'immunoprécipiter FRAP/mTOR pour analyser ses partenaires au cours du développement embryonnaire.

3-Partenaires d'eIF4E

La fonction d'eIF4E est principalement régulée par ses partenaires. Chez l'oursin, eIF4E est capable de s'associer à 4E-BP et à eIF4G. Dans d'autres organismes, de nombreuses protéines qui s'associent à eIF4E ont été identifiées comme des régulateurs importants de l'initiation de la traduction ou comme régulateurs du transport des ARNm.

3-1-Recherche des partenaires d'eIF4E

L'identification de nouveaux partenaires qui s'associent avec eIF4E et l'analyse de leur fonction et de leur régulation au cours du cycle cellulaire et du développement représente un challenge important pour comprendre le rôle biologique du facteur eIF4E lors de ces mécanismes physiologiques. Au cours de cette thèse, nous avons fait des mises au point en vue d'analyse protéomique (résultats non présentés). Après purification sur colonne m^7GTP, les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et visualisées en bleu de Coomassie. La bande majoritaire située au-dessus de 25kDa a été identifiée en tant qu'eIF4E-1 par spectrométrie de masse. Cette technique permettra d'identifier les partenaires d'eIF4E présents en fonction des stades de développement. La fonction de ces protéines pourra ensuite être analysée par des approches de microinjection de peptides ou de morpholinos.

Trois gènes ont été retrouvés dans le génome de l'oursin *S. purpuratus*, codant pour eIF4E-1, eIF4E-2 et eIF4E-3. Des anticorps spécifiques de chaque protéine permettront de les suivre en Western Blot et d'identifier les différents complexes après immunoprécipitation.

3-2-Analyse structurale d'eIF4E et de ses partenaires

Les analyses structurales des 3 classes d'eIF4E avec leurs partenaires respectifs permettront de mieux comprendre les régulations qui affectent eIF4E au cours du développement embryonnaire de l'oursin. Au cours de cette thèse, le 4E-BP et les 3 eIF4E de l'oursin *S. purpuratus* ont été clonés. Les protéines de fusion correspondantes ont été produites. Un projet est initié en étroite collaboration avec l'équipe de Mirjam Czjzek à la Station Biologique de Roscoff. La structure cristallographique d'eIF4E-1 a déjà été résolue chez les mammifères (Marcotrigiano et al, 1997) et plus récemment celle d'eIF4E-2

(Rosettani et al, 2007). En revanche, aucune structure d'eIF4E-3 n'est à ce jour disponible. Avec l'oursin, nous avons obtenu les premiers cristaux d'eIF4E-3 et l'optimisation des conditions de cristallisation est en cours. Le 4E-BP de mammifère ne semble pas adopter de structure particulière quand il se lie à eIF4E-1 (Fletcher et al, 1998). 4E-BP étant une petite protéine, elle est difficilement cristallisable. C'est pourquoi, des analyses sont également en cours en utilisant une technique de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS : small angle X ray scattering) pour analyser la protéine 4E-BP d'oursin seule et en complexe. Les résultats préliminaires obtenus à Heidelberg au synchrotron Desy (Deutsches Elektronen Synchrotron) suggèrent que la protéine 4E-BP de *S. purpuratus* est dépliée quand elle est seule (résultats non présentés). L'analyse structurale de 4E-BP en complexe avec les différentes classes d'eIF4E de *S. purpuratus* permettra d'analyser les modifications de 4E-BP après association. Les structures obtenues permettront de mieux comprendre le rôle des interactions au cours du développement embryonnaire.

4-Traduction dépendante de la coiffe et cycle cellulaire

La traduction dépendante de la coiffe est indispensable au bon déroulement de la première division mitotique après fécondation chez l'oursin. Ceci a été démontré par l'injection de peptides et de m^7GDP dans les ovules de *S. granularis* (Article 1). Nous sommes maintenant capables de suivre et d'analyser le rôle des facteurs 4E-BP, eIF4G et eIF4E chez l'oursin mais qu'en est-il du troisième facteur du complexe eIF4F? Un seul gène d'eIF4A a été retrouvé dans le génome de *S. purpuratus* (Morales et al, 2006). Il a été cloné au cours de cette thèse et utilisé pour produire une protéine de fusion GST-eIF4A. Après optimisation de la production, cette protéine permettra d'obtenir un anticorps pour suivre la protéine eIF4A au cours du développement. De plus, des résultats préliminaires obtenus sur l'oursin *S. granularis* indiquent qu'eIF4A est un facteur important pour le cycle cellulaire. L'hippuristanol est la molécule connue pour inhiber eIF4A (Bordeleau et al, 2006). Chez *S. granularis*, l'hippuristanol inhibe la première division mitotique après fécondation des ovules d'oursin *S. granularis* (résultats non présentés). L'effet de l'hippuristanol sur l'activité d'eIF4A pourra être analysé en collaboration avec l'équipe de Jerry Pelletier au Canada qui a caractérisé l'hippuristanol. L'utilisation de cet inhibiteur permettra de mieux comprendre le rôle d'eIF4A au cours du cycle cellulaire et du développement embryonnaire.

Les extraits acellulaires capables de traduction dépendante de la coiffe permettront une approche fonctionnelle des différents acteurs important pour le cycle cellulaire (eIF4E, eIF4G, eIF4A,…). Il sera intéressant d'analyser l'effet obtenu sur la synthèse protéique après ajout des différents facteurs mais également après l'immunodéplétion d'un acteur spécifique suivi d'une complémentation par des protéines mutées.

L'un des mécanismes important dans le contrôle de l'entrée en mitose et faisant intervenir la traduction dépendante de la coiffe est la synthèse de la cycline B. Une part importante de nos connaissances actuelles des mécanismes qui contrôlent l'activité des kinases mitotiques, les CDK (Cyclin Dependent Kinases) provient d'études de la maturation méiotique et de la fécondation chez les échinodermes (Kishimoto, 1996, Evans et al, 1983). Chez l'oursin *S. granularis*, les facteurs d'initiation eIF4E et 4E-BP sont impliqués dans la synthèse de la cycline B nécessaire à la première division mitotique suivant la fécondation (Salaun et al, 2003). Nous mettons ici en évidence que la synthèse de la cycline B n'est pas régulée de la même façon en fonction des processi considérés et des organismes. Contrairement à la régulation induite après fécondation de l'ovule de l'oursin, la synthèse de la cycline B n'est pas altérée en présence de rapamycine au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte chez l'étoile de mer (Article 4). Même si le complexe eIF4E/4E-BP est régulé au cours de la maturation méiotique, la synthèse de la cycline B passe par un autre processus dépendant de CPEB (Lapasset et al, 2005).

Après fécondation de l'ovule d'oursin, la cycline B est synthétisée, phosphorylée et dégradée (Meijer et al, 1989). L'activation artificielle des ovules de *S. granularis* par le calcium ionophore et le NH4Cl stimulent également la synthèse de cycline B mais celle-ci s'accumule sous une forme non phosphorylée (Article 3). Le complexe CDK1/cycline B est inactif après activation artificielle bien que la cycline B est été efficacement produite. La synthèse protéique est donc requise mais non suffisante pour l'activation de CDK1/cycline B. L'analyse des voies de signalisation impliquées dans chaque activation permettra de mieux comprendre les mécanismes régulant le complexe CDK1/cycline B.

Cette synthèse de cycline B et par conséquent l'entrée dans le premier cycle cellulaire qui suit la fécondation, est sensible à la rapamycine suggérant que la traduction de la cycline B est sous contrôle de la voie FRAP/mTOR (Salaun et al, 2003). Une approche de protéomique permettrait d'identifier d'autres protéines dont la synthèse dépend de cette kinase

en réponse à la fécondation et au cours du développement précoce. Après incubation des embryons en présence ou non de rapamycine, les protéines cytosoliques pourront être analysées par électrophorèse bidimensionnelle : 2D-DIGE. Les protéines dont la synthèse est sensible à la rapamycine et donc dépendante de la coiffe seront identifiées par spectrométrie de masse. FRAP/mTOR est une kinase aussi impliquée dans les mécanismes de transformation et de résistance aux traitements anticancéreux (Wendel et al, 2004). L'identification des ARNm recrutés dans les polysomes sous contrôle de cette voie permettra aussi de mieux comprendre la relation entre la traduction et le cycle cellulaire et fournira de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique.

Conclusion générale

L'embryon d'oursin nous permet d'étudier les régulations traductionnelles en conditions physiologiques, dans les étapes précoces de l'entrée en mitose lors du développement embryonnaire. Les conditions physiologiques utilisées qui se caractérisent par une synchronisation naturelle de l'entrée et du passage en mitose dans les premières divisions cellulaires de l'embryon sont d'autant plus remarquables que récemment, les résultats obtenus à partir des cellules synchronisées ont été largement critiqués (communication personnelle de S. Morley). Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la régulation du complexe eIF4F après activation physiologique ou artificielle des ovules d'oursin et à son rôle dans le cycle cellulaire. Les résultats obtenus apportent une nouvelle vision sur la diversité des régulations qui affectent la traduction dépendante de la coiffe après fécondation chez l'oursin. Ils renforcent l'implication de la traduction dépendante de la coiffe dans le contrôle du cycle cellulaire au cours du développement embryonnaire. Ces données permettront de mieux comprendre les processi de régulation mis en jeu dans les premières minutes de la vie et nécessaires au bon développement des organismes. De plus, l'étude de ces mécanismes est aussi nécessaire pour comprendre les dérégulations observées dans certaines pathologies et en particulier dans les cancers.

Bibliographie

Abraham AK, Pihl A (1983) Effect of protein synthesis inhibitors on the fidelity of translation in eukaryotic systems. Biochim Biophys Acta 741(2): 197-203.

Acker MG, Shin BS, Dever TE, Lorsch JR (2006) Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. J Biol Chem 281(13): 8469-8475.

Ainsworth C (2005) Molecular medicine: lost in translation. Nature 435(7042): 556-558.

Akcakanat A, Singh G, Hung MC, Meric-Bernstam F (2007) Rapamycin regulates the phosphorylation of rictor. Biochem Biophys Res Commun 362(2): 330-333.

Algire MA, Maag D, Lorsch JR (2005) Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. Mol Cell 20(2): 251-262.

Allen GS, Frank J (2007) Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. Mol Microbiol 63(4): 941-950.

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R et al. (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. Rna 11(5): 717-727.

Arion D, Meijer L (1989) M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. Exp Cell Res 183(2): 361-375.

Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M et al. (2007) 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. Cancer Res 67(16): 7551-7555.

Arquier N, Bourouis M, Colombani J, Leopold P (2005) Drosophila Lk6 kinase controls phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E and promotes normal growth and development. Curr Biol 15(1): 19-23.

Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ et al. (2007) Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. Science 318(5852): 977-980.

Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M (2006) Searching for IRES. Rna 12(10): 1755-1785.

Baird SD, Lewis SM, Turcotte M, Holcik M (2007) A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. Nucleic Acids Res 35(14): 4664-4677.

Baitinger C, Alderton J, Poenie M, Schulman H, Steinhardt RA (1990) Multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope breakdown. J Cell Biol 111(5 Pt 1): 1763-1773.

Baker CC, Fuller MT (2007) Translational control of meiotic cell cycle progression and spermatid differentiation in male germ cells by a novel eIF4G homolog. Development 134(15): 2863-2869.

Banko JL, Poulin F, Hou L, DeMaria CT, Sonenberg N et al. (2005) The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. J Neurosci 25(42): 9581-9590.

Banko JL, Merhav M, Stern E, Sonenberg N, Rosenblum K et al. (2007) Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2. Neurobiol Learn Mem 87(2): 248-256.

Baranick BT, Lemp NA, Nagashima J, Hiraoka K, Kasahara N et al. (2008) Splicing mediates the activity of four putative cellular internal ribosome entry sites. Proc Natl Acad Sci U S A 105(12): 4733-4738.

Bassermann F, Peschel C, Duyster J (2005) Mitotic entry: a matter of oscillating destruction. Cell Cycle 4(11): 1515-1517.

Belle R, Le Bouffant R, Morales J, Cosson B, Cormier P et al. (2007) [Sea urchin embryo, DNA-damaged cell cycle checkpoint and the mechanisms initiating cancer development]. J Soc Biol 201(3): 317-327.

Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. Embo J 15(3): 658-664.

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Dev Cell 14(2): 159-169.

Beugnet A, Wang X, Proud CG (2003) Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. J Biol Chem 278(42): 40717-40722.

Bordeleau ME, Matthews J, Wojnar JM, Lindqvist L, Novac O et al. (2005) Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. Proc Natl Acad Sci U S A 102(30): 10460-10465.

Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS et al. (2006) Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. Nat Chem Biol 2(4): 213-220.

Borgne A, Ostvold AC, Flament S, Meijer L (1999) Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. J Biol Chem 274(17): 11977-11986.

Boulben S, Monnier A, Le Breton M, Morales J, Cormier P et al. (2003) Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase. Cell Mol Life Sci 60(10): 2178-2188.

Boutros R, Dozier C, Ducommun B (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. Curr Opin Cell Biol 18(2): 185-191.

Brandis JW, Raff RA (1978) Translation of oogenetic mRNA in sea urchin eggs and early embryos. Demonstration of a change in translational efficiency following fertilization. Dev Biol 67(1): 99-113.

Brandis JW, Raff RA (1979) Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilisation. Nature 278(5703): 467-469.

Brenner C, Nakayama N, Goebl M, Tanaka K, Toh-e A et al. (1988) CDC33 encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 8(8): 3556-3559.

Browne GJ, Proud CG (2002) Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. Eur J Biochem 269(22): 5360-5368.

Bu X, Haas DW, Hagedorn CH (1993) Novel phosphorylation sites of eukaryotic initiation factor-4F and evidence that phosphorylation stabilizes interactions of the p25 and p220 subunits. J Biol Chem 268(7): 4975-4978.

Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. Proc Natl Acad Sci U S A 95(4): 1432-1437.

Byrd MP, Zamora M, Lloyd RE (2002) Generation of multiple isoforms of eukaryotic translation initiation factor 4GI by use of alternate translation initiation codons. Mol Cell Biol 22(13): 4499-4511.

Byrd MP, Zamora M, Lloyd RE (2005) Translation of eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) proceeds from multiple mRNAs containing a novel cap-dependent internal ribosome entry site (IRES) that is active during poliovirus infection. J Biol Chem 280(19): 18610-18622.

Caron S, Charon M, Cramer E, Sonenberg N, Dusanter-Fourt I (2004) Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. Mol Cell Biol 24(11): 4920-4928.

Carroll DJ, Albay DT, Hoang KM, O'Neill FJ, Kumano M et al. (2000) The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. Dev Biol 217(1): 179-191.

Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N et al. (2003) Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. Nature 426(6966): 579-584.

Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. Annu Rev Biochem 76: 51-74.

Chauvin C, Salhi S, Le Goff C, Viranaicken W, Diop D et al. (2005) Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. Mol Cell Biol 25(14): 5801-5811.

Chauvin C, Salhi S, Jean-Jean O (2007) Human eukaryotic release factor 3a depletion causes cell cycle arrest at G1 phase through inhibition of the mTOR pathway. Mol Cell Biol 27(16): 5619-5629.

Chauvin C, Jean-Jean O (2008) Proteasomal degradation of human release factor eRF3a regulates translation termination complex formation. Rna 14(2): 240-245.

Cheung YN, Maag D, Mitchell SF, Fekete CA, Algire MA et al. (2007) Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. Genes Dev 21(10): 1217-1230.

Chiu SY, Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE (2004) The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. Genes Dev 18(7): 745-754.

Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD et al. (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. Cell 121(3): 411-423.

Cho PF, Gamberi C, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Lasko P et al. (2006) Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in Drosophila embryos. Curr Biol 16(20): 2035-2041.

Choi KM, McMahon LP, Lawrence JC, Jr. (2003) Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor. J Biol Chem 278(22): 19667-19673.

Churchill GC, O'Neill JS, Masgrau R, Patel S, Thomas JM et al. (2003) Sperm deliver a new second messenger: NAADP. Curr Biol 13(2): 125-128.

Clemens MJ (2004) Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. Oncogene 23(18): 3180-3188.

Cohen N, Sharma M, Kentsis A, Perez JM, Strudwick S et al. (2001) PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. Embo J 20(16): 4547-4559.

Coldwell MJ, Morley SJ (2006) Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. Mol Cell Biol 26(22): 8448-8460.

Connolly E, Braunstein S, Formenti S, Schneider RJ (2006) Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells. Mol Cell Biol 26(10): 3955-3965.

Constantinou C, Elia A, Clemens MJ (2008) Activation of p53 stimulates proteasome-dependent truncation of eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1). Biol Cell 100(5): 279-289.

Contreras V, Richardson MA, Hao E, Keiper BD (2008) Depletion of the cap-associated isoform of translation factor eIF4G induces germline apoptosis in C. elegans. Cell Death Differ.

Cormier P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N et al. (2001) eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. Dev Biol 232(2): 275-283.

Cormier P, Pyronnet S, Salaun P, Mulner-Lorillon O, Sonenberg N (2003) Cap-dependent translation and control of the cell cycle. Prog Cell Cycle Res 5: 469-475.

Corradetti MN, Guan KL (2006) Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? Oncogene 25(48): 6347-6360.

Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, Herdy B, Azzi M et al. (2005) Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. Nature 436(7054): 1166-1173.

Costa-Mattioli M, Gobert D, Stern E, Gamache K, Colina R et al. (2007) eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. Cell 129(1): 195-206.

Craig AW, Haghighat A, Yu AT, Sonenberg N (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. Nature 392(6675): 520-523.

Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL (2005) eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. J Cell Biol 169(2): 245-256.

Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL (2006) eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. J Cell Biol 175(3): 415-426.

Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL (2007) Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. Cell Cycle 6(1): 65-69.

Culjkovic B, Tan K, Orolicki S, Amri A, Meloche S et al. (2008) The eIF4E RNA regulon promotes the Akt signaling pathway. J Cell Biol 181(1): 51-63.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J 351(Pt 1): 95-105.

de Barry J, Kawahara S, Takamura K, Janoshazi A, Kirino Y et al. (1997) Time-resolved imaging of protein kinase C activation during sea urchin egg fertilization. Exp Cell Res 234(1): 115-124.

Delalande C, Monnier A, Minella O, Geneviere AM, Mulner-Lorillon O et al. (1998) Developmental regulation of elongation factor-1 delta in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae. Exp Cell Res 242(1): 228-234.

Denny PC, Tyler A (1964) Activation of protein biosynthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. Biochem Biophys Res Commun 14: 245-249.

Dostie J, Lejbkowicz F, Sonenberg N (2000a) Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. J Cell Biol 148(2): 239-247.

Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N (2000b) A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. Embo J 19(12): 3142-3156.

Dube F, Guerrier P (1983) Ca2+ influx and stimulation of protein synthesis in sea urchin eggs. Exp Cell Res 147(1): 209-215.

Dube F, Epel D (1986) The relation between intracellular pH and rate of protein synthesis in sea urchin eggs and the existence of a pH-independent event triggered by ammonia. Exp Cell Res 162(1): 191-204.

Dube F (1988) Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. J Cell Physiol 137(3): 545-552.

Duncan R, Milburn SC, Hershey JW (1987) Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. J Biol Chem 262(1): 380-388.

Edgecombe M, Patel R, Whitaker M (1991) A cyclin-abundance cycle-independent p34cdc2 tyrosine phosphorylation cycle in early sea urchin embryos. Embo J 10(12): 3769-3775.

Eguchi S, Tokunaga C, Hidayat S, Oshiro N, Yoshino K et al. (2006) Different roles for the TOS and RAIP motifs of the translational regulator protein 4E-BP1 in the association with raptor and phosphorylation by mTOR in the regulation of cell size. Genes Cells 11(7): 757-766.

Elia A, Constantinou C, Clemens MJ (2008) Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1. Oncogene 27(6): 811-822.

Epel D (1967) Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A 57(4): 899-906.

Epel D, Steinhardt R, Humphreys T, Mazia D (1974) An analysis of the partial metabolic derepression of sea urchin eggs by ammonia: the existence of independent pathways. Dev Biol 40(2): 245-255.

Epel D (1978) Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. Curr Top Dev Biol 12: 185-246.

Epel D (1990) The initiation of development at fertilization. Cell Differ Dev 29(1): 1-12.
Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell 33(2): 389-396.

Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, Hampl A, Holbrook AE et al. (2006) Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. Genes Dev 20(19): 2713-2727.

Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC, Jr. (1997) Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. J Biol Chem 272(15): 10240-10247.

Fahrenkrug SC, Dahlquist MO, Clark KJ, Hackett PB (1999) Dynamic and tissue-specific expression of eIF4E during zebrafish embryogenesis. Differentiation 65(4): 191-201.

Fan-Minogue H, Du M, Pisarev AV, Kallmeyer AK, Salas-Marco J et al. (2008) Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. Mol Cell 30(5): 599-609.

Ferguson G, Mothe-Satney I, Lawrence JC, Jr. (2003) Ser-64 and Ser-111 in PHAS-I are dispensable for insulin-stimulated dissociation from eIF4E. J Biol Chem 278(48): 47459-47465.

Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR et al. (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. J Cell Biol 170(6): 913-924.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C et al. (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. Mol Cell Biol 24(1): 200-216.

Fletcher CM, McGuire AM, Gingras AC, Li H, Matsuo H et al. (1998) 4E binding proteins inhibit the translation factor eIF4E without folded structure. Biochemistry 37(1): 9-15.

Flynn A, Proud CG (1996) Insulin and phorbol ester stimulate initiation factor eIF-4E phosphorylation by distinct pathways in Chinese hamster ovary cells overexpressing the insulin receptor. Eur J Biochem 236(1): 40-47.

Franklin-Dumont TM, Chatterjee C, Wasserman SA, Dinardo S (2007) A novel eIF4G homolog, Off-schedule, couples translational control to meiosis and differentiation in Drosophila spermatocytes. Development 134(15): 2851-2861.

Fukuchi-Shimogori T, Ishii I, Kashiwagi K, Mashiba H, Ekimoto H et al. (1997) Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. Cancer Res 57(22): 5041-5044.

Fukunaga R, Hunter T (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. Embo J 16(8): 1921-1933.

Geneviere-Garrigues AM, Barakat A, Doree M, Moreau JL, Picard A (1995) Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. J Cell Sci 108 (Pt 7): 2693-2703.

Gilmartin GM (2005) Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. Genes Dev 19(21): 2517-2521.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annu Rev Biochem 68: 913-963.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M et al. (2001a) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes Dev 15(21): 2852-2864.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001b) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. Genes Dev 15(7): 807-826.

Giorgi C, Moore MJ (2007) The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. Semin Cell Dev Biol 18(2): 186-193.

Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B et al. (1998) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. Mol Cell Biol 18(1): 334-342.

Grainger JL, Winkler MM, Shen SS, Steinhardt RA (1979) Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchine egg and early embryo. Dev Biol 68(2): 396-406.

Greenberg VL, Zimmer SG (2005) Paclitaxel induces the phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 through a Cdk1-dependent mechanism. Oncogene 24(30): 4851-4860.

Gross PR, Cousineau GH (1964) Macromolecule Synthesis and the Influence of Actinomycin on Early Development. Exp Cell Res 33: 368-395.

Gu M, Lima CD (2005) Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. Curr Opin Struct Biol 15(1): 99-106.

Guo B, Yang SH, Witty J, Sharrocks AD (2007) Signalling pathways and the regulation of SUMO modification. Biochem Soc Trans 35(Pt 6): 1414-1418.

Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. Embo J 14(22): 5701-5709.

Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J (1998) MPF localization is controlled by nuclear export. Embo J 17(14): 4127-4138.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N et al. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell 110(2): 177-189.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R et al. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell 6(5): 1099-1108.

Haystead TA, Haystead CM, Hu C, Lin TA, Lawrence JC, Jr. (1994) Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase in vitro and in response to insulin in rat adipocytes. J Biol Chem 269(37): 23185-23191.

Heesom KJ, Avison MB, Diggle TA, Denton RM (1998) Insulin-stimulated kinase from rat fat cells that phosphorylates initiation factor 4E-binding protein 1 on the rapamycin-insensitive site (serine-111). Biochem J 336 (Pt 1): 39-48.

Heesom KJ, Gampel A, Mellor H, Denton RM (2001) Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). Curr Biol 11(17): 1374-1379.

Hernandez G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez del Corral R et al. (2005) Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in Drosophila. Mech Dev 122(4): 529-543.

Hershko A (1991) The ubiquitin pathway for protein degradation. Trends Biochem Sci 16(7): 265-268.

Hershko A (1999) Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 354(1389): 1571-1575; discussion 1575-1576.

Hershko A (2005) The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. Cell Death Differ 12(9): 1191-1197.

Hinton TM, Coldwell MJ, Carpenter GA, Morley SJ, Pain VM (2007) Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. J Biol Chem 282(3): 1695-1708.

Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. Nature 419(6903): 135-141.

Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 6(4): 318-327.

Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G (2004) Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. Oncogene 23(18): 3138-3144.

Holzmann K, Gerner C, Poltl A, Schafer R, Obrist P et al. (2000) A human common nuclear matrix protein homologous to eukaryotic translation initiation factor 4A. Biochem Biophys Res Commun 267(1): 339-344.

Horner VL, Wolfner MF (2008) Transitioning from egg to embryo: triggers and mechanisms of egg activation. Dev Dyn 237(3): 527-544.

Hromas R, Radich J, Collins S (1993) PCR cloning of an orphan homeobox gene (PRH) preferentially expressed in myeloid and liver cells. Biochem Biophys Res Commun 195(2): 976-983.

Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD (2008) The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. Mol Cell Biol 28(12): 4104-4115.

Hultin T (1961) Activation of ribosomes in sea urchin eggs in response to fertilization. Exp Cell Res 25: 405-417.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. Proc Natl Acad Sci U S A 102(47): 16961-16966.

Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. Science 293(5532): 1139-1142.

Imataka H, Sonenberg N (1997) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. Mol Cell Biol 17(12): 6940-6947.

Imataka H, Gradi A, Sonenberg N (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. Embo J 17(24): 7480-7489.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. Genes Dev 17(15): 1829-1834.

Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. Cell 106(5): 607-617.

Izumi T, Maller JL (1991) Phosphorylation of Xenopus cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. Mol Cell Biol 11(8): 3860-3867.

Jaffe LA, Cross NL (1986) Electrical regulation of sperm-egg fusion. Annu Rev Physiol. 1986; 48:191-200.

Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC et al. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. J Virol 62(8): 2636-2643.

Jiang H, Coleman J, Miskimins R, Miskimins WK (2003) Expression of constitutively active 4EBP-1 enhances p27Kip1 expression and inhibits proliferation of MCF7 breast cancer cells. Cancer Cell Int 3(1): 2.

Johnson JD, Epel D (1976) Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. Nature 262(5570): 661-664.

Johnson CH, Epel D (1981) Intracellular pH of sea urchin eggs measured by the dimethyloxazolidinedione (DMO) method. J Cell Biol 89(2): 284-291.

Johnstone O, Lasko P (2004) Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. Development 131(17): 4167-4178.

Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M et al. (1996) An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. Mol Cell Biol 16(9): 4754-4764.

Joshi B, Cameron A, Jagus R (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. Eur J Biochem 271(11): 2189-2203.

Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. BMC Evol Biol 5: 48.

Jung MY, Lorenz L, Richter JD (2006) Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein. Mol Cell Biol 26(11): 4277-4287.

Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. Genes Dev 19(1): 104-113.

Karim MM, Svitkin YV, Kahvejian A, De Crescenzo G, Costa-Mattioli M et al. (2006) A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. Proc Natl Acad Sci U S A 103(25): 9494-9499.

Kawahara H, Philipova R, Yokosawa H, Patel R, Tanaka K et al. (2000) Inhibiting proteasome activity causes overreplication of DNA and blocks entry into mitosis in sea urchin embryos. J Cell Sci 113 (Pt 15): 2659-2670.

Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ et al. (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in Caenorhabditis elegans. J Biol Chem 275(14): 10590-10596.

Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. Cell 116(3): 467-479.

Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT et al. (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. Cell 129(6): 1141-1151.

Kishimoto T (1996) Starfish maturation-promoting factor. Trends Biochem Sci 21(1): 35-37.

Klann E, Antion MD, Banko JL, Hou L (2004) Synaptic plasticity and translation initiation. Learn Mem 11(4): 365-372.

Kleijn M, Scheper GC, Wilson ML, Tee AR, Proud CG (2002) Localisation and regulation of the eIF4E-binding protein 4E-BP3. FEBS Lett 532(3): 319-323.

Klein PS, Melton DA (1994) Induction of mesoderm in Xenopus laevis embryos by translation initiation factor 4E. Science 265(5173): 803-806.

Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Merrick WC, Rhoads RE (2001) Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. J Biol Chem 276(4): 2872-2879.

Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. J Biol Chem 266(30): 19867-19870.

Kumano M, Carroll DJ, Denu JM, Foltz KR (2001) Calcium-mediated inactivation of the MAP kinase pathway in sea urchin eggs at fertilization. Dev Biol 236(1): 244-257.

Lachance PE, Miron M, Raught B, Sonenberg N, Lasko P (2002) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. Mol Cell Biol 22(6): 1656-1663.

Lai HK, Borden KL (2000) The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. Oncogene 19(13): 1623-1634.

Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. J Biol Chem 270(37): 21975-21983.

Lapasset L, Pradet-Balade B, Lozano JC, Peaucellier G, Picard A (2005) Nuclear envelope breakdown may deliver an inhibitor of protein phosphatase 1 which triggers cyclin B translation in starfish oocytes. Dev Biol 285(1): 200-210.

Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N (1990) Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. Nature 345(6275): 544-547.

Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N (1992) The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts. Mol Cell Biol 12(3): 1234-1238.

Lazaris-Karatzas A, Smith MR, Frederickson RM, Jaramillo ML, Liu YL et al. (1992) Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation. Genes Dev 6(9): 1631-1642.

Le Bouffant R, Cormier P, Mulner-Lorillon O, Belle R (2006) Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. J Cell Biochem 99(1): 126-132.

Le Bouffant R, Mulner-Lorillon O, Morales J, Cormier P, Belle R (2008a) Chromium(III) triggers the DNA-damaged checkpoint of the cell cycle and induces a functional increase of 4E-BP. Chem Res Toxicol 21(2): 542-549.

Le Bouffant R, Boulben S, Cormier P, Mulner-Lorillon O, Belle R et al. (2008b) Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos. Exp Cell Res 314(5): 961-968.

Le Breton M, Cormier P, Belle R, Mulner-Lorillon O, Morales J (2005) Translational control during mitosis. Biochimie 87(9-10): 805-811.

Leckie C, Empson R, Becchetti A, Thomas J, Galione A, Whitaker M (2003) The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. J Biol Chem. 4; 278(14):12247-12254.

Le Sourd F, Boulben S, Le Bouffant R, Cormier P, Morales J et al. (2006a) eEF1B: At the dawn of the 21st century. Biochim Biophys Acta 1759(1-2): 13-31.

Le Sourd F, Cormier P, Bach S, Boulben S, Belle R et al. (2006b) Cellular coexistence of two high molecular subsets of eEF1B complex. FEBS Lett 580(11): 2755-2760.

Lee VH, Healy T, Fonseca BD, Hayashi A, Proud CG (2008) Analysis of the regulatory motifs in eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. Febs J 275(9): 2185-2199.

Leise W, 3rd, Mueller PR (2002) Multiple Cdk1 inhibitory kinases regulate the cell cycle during development. Dev Biol 249(1): 156-173.

Lejbkowicz F, Goyer C, Darveau A, Neron S, Lemieux R et al. (1992) A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A 89(20): 9612-9616.

Lejeune F, Ishigaki Y, Li X, Maquat LE (2002) The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. Embo J 21(13): 3536-3545.

Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE (2004) eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. Nat Struct Mol Biol 11(10): 992-1000.

Lewis SM, Holcik M (2008) For IRES trans-acting factors, it is all about location. Oncogene 27(8): 1033-1035.

Li J, Meyer AN, Donoghue DJ (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A 94(2): 502-507.

Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Jr., Richter-Cook NJ et al. (1999) Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. Mol Cell Biol 19(11): 7336-7346.

Li W, Belsham GJ, Proud CG (2001) Eukaryotic initiation factors 4A (eIF4A) and 4G (eIF4G) mutually interact in a 1:1 ratio in vivo. J Biol Chem 276(31): 29111-29115.

Lin TA, Lawrence JC, Jr. (1996) Control of the translational regulators PHAS-I and PHAS-II by insulin and cAMP in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem 271(47): 30199-30204.

Lin CJ, Cencic R, Mills JR, Robert F, Pelletier J (2008) c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. Cancer Res 68(13): 5326-5334.

Liu G, Zhang Y, Bode AM, Ma WY, Dong Z (2002) Phosphorylation of 4E-BP1 is mediated by the p38/MSK1 pathway in response to UVB irradiation. J Biol Chem 277(11): 8810-8816.

Lopez-Lastra M, Rivas A, Barria MI (2005) Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. Biol Res 38(2-3): 121-146.

Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. Mol Cell Biol 15(9): 4990-4997.

Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW et al. (2004) eIF4E--from translation to transformation. Oncogene 23(18): 3172-3179.

Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O et al. (2007) Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. PLoS ONE 2(2): e242.

Marangos P, Carroll J (2008) Securin regulates entry into M-phase by modulating the stability of cyclin B. Nat Cell Biol 10(4): 445-451.

Marash L, Kimchi A (2005) DAP5 and IRES-mediated translation during programmed cell death. Cell Death Differ 12(6): 554-562.

Marash L, Liberman N, Henis-Korenblit S, Sivan G, Reem E et al. (2008) DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis. Mol Cell 30(4): 447-459.

Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK (1997) Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. Cell 89(6): 951-961.

Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D et al. (2000) The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. Development 127(11): 2433-2445.

Martinez-Salas E (1999) Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. Curr Opin Biotechnol 10(5): 458-464.

Mathews MB, Sonenberg, N. and Hershey J.W.B. (2007) Origins and Principles of Translational Control; Mathews MB, Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B., Eds, editor. New York: CSHL Press.

McKendrick L, Morley SJ, Pain VM, Jagus R, Joshi B (2001a) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. Eur J Biochem 268(20): 5375-5385.

McKendrick L, Thompson E, Ferreira J, Morley SJ, Lewis JD (2001b) Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. Mol Cell Biol 21(11): 3632-3641.

McMahon LP, Choi KM, Lin TA, Abraham RT, Lawrence JC, Jr. (2002) The rapamycin-binding domain governs substrate selectivity by the mammalian target of rapamycin. Mol Cell Biol 22(21): 7428-7438.

Meijer L, Pondaven P (1988) Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. Exp Cell Res 174(1): 116-129.

Meijer L, Arion D, Golsteyn R, Pines J, Brizuela L et al. (1989) Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. Embo J 8(8): 2275-2282.

Meijer L, Azzi L, Wang JY (1991) Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. Embo J 10(6): 1545-1554.

Meijer L (2003) Le cycle de division cellulaire et sa régulation. Oncologie 5: 311-326.

Merrick WC, Nyborg, J. (2000) The Protein Biosynthesis Elongation Cycle; Sonenberg N, Hershey, J. and Mathews, M., Eds, editor. New York: CSHL Press.

Michlewski G, Sanford JR, Caceres JF (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. Mol Cell 30(2): 179-189.

Millar JB, Russell P (1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. Cell 68(3): 407-410.

Minshall N, Reiter MH, Weil D, Standart N (2007) CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early Xenopus oocytes. J Biol Chem 282(52): 37389-37401.

Moerke NJ, Aktas H, Chen H, Cantel S, Reibarkh MY et al. (2007) Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. Cell 128(2): 257-267.

Monnier A, Belle R, Morales J, Cormier P, Boulben S et al. (2001a) Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. Nucleic Acids Res 29(7): 1453-1457.

Monnier A, Morales J, Cormier P, Boulben S, Belle R et al. (2001b) Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. Zygote 9(3): 229-236.

Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. Science 309(5740): 1514-1518.

Morales J, Mulner-Lorillon O, Cosson B, Morin E, Belle R et al. (2006) Translational control genes in the sea urchin genome. Dev Biol 300(1): 293-307.

Moreau JL, Marques F, Barakat A, Schatt P, Lozano JC et al. (1998) Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. Dev Biol 200(2): 182-197.

Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annu Rev Cell Dev Biol 13: 261-291.

Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV, Sonenberg N (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. Mol Cell Biol 20(2): 468-477.

Morley SJ, Traugh JA (1989) Phorbol esters stimulate phosphorylation of eukaryotic initiation factors 3, 4B, and 4F. J Biol Chem 264(5): 2401-2404.

Morley SJ, Coldwell MJ, Clemens MJ (2005) Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. Cell Death Differ 12(6): 571-584.

Mothe-Satney I, Yang D, Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC, Jr. (2000a) Multiple mechanisms control phosphorylation of PHAS-I in five (S/T)P sites that govern translational repression. Mol Cell Biol 20(10): 3558-3567.

Mothe-Satney I, Brunn GJ, McMahon LP, Capaldo CT, Abraham RT et al. (2000b) Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. J Biol Chem 275(43): 33836-33843.

Mulner-Lorillon O, Poulhe R, Cormier P, Labbe JC, Doree M et al. (1989) Purification of a p47 phosphoprotein from Xenopus laevis oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. FEBS Lett 251(1-2): 219-224.

Nigg EA (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. Bioessays 17(6): 471-480.

Nousch M, Reed V, Bryson-Richardson RJ, Currie PD, Preiss T (2007) The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. Rna 13(3): 374-384.

Nurse P (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. Cell 79(4): 547-550.

Orton KC, Ling J, Waskiewicz AJ, Cooper JA, Merrick WC et al. (2004) Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk. J Biol Chem 279(37): 38649-38657.

Oulhen N, Cormier P (2006) eIF4E and developmental decisions: when translation drives the development. Med Sci (Paris) 22(5): 507-513.

Oulhen N, Morales J, Cosson B, Mulner-Lorillon O, Belle R et al. (2007) Gene expression regulation at the translational level: contribution of marine organisms. J Soc Biol 201(3): 297-306.

Pallier C (2001) The role of untranslated regions of eukaryotic transcripts in protein synthesis. Med Sci (Paris) 17(1): 23-32.

Parisi E, Filosa S, De Petrocellis B, Monroy A (1978) The pattern of cell division in the early development of the sea urchin. Paracentrotus lividus. Dev Biol 65(1): 38-49.

Parrington J, Davis LC, Galione A, Wessel G (2007) Flipping the switch: how a sperm activates the egg at fertilization. Dev Dyn 236(8): 2027-2038.

Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG et al. (2007) The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. Mol Cell 26(1): 41-50.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA et al. (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. Nature 371(6500): 762-767.

Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334(6180): 320-325.

Penn A, Lake S, Timourian H, Gledhill BL (1976) Division delay in sea urchin embryos induced by a specific protease inhibitor. Exp Cell Res 97: 164-174.

Pestova TV, Kolupaeva VG (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. Genes Dev 16(22): 2906-2922.

Pestova TV, Lorsch J.R., Hellen C.U.T. (2007) The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes; Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB, Eds, editor. New York: CSHL Press.

Peter M, Le Peuch C, Labbe JC, Meyer AN, Donoghue DJ et al. (2002) Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. EMBO Rep 3(6): 551-556.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N et al. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. Science 309(5740): 1573-1576.

Pisarev AV, Unbehaun A, Hellen CU, Pestova TV (2007) Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. Methods Enzymol 430: 147-177.

Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. J Biol Chem 273(22): 14002-14007.

Preiss T, Hentze M (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. Bioessays 25(12): 1201-1211.

Prodon F, Sardet C, Nishida H (2008) Cortical and cytoplasmic flows driven by actin microfilaments polarize the cortical ER-mRNA domain along the a-v axis in ascidian oocytes. Dev Biol 313(2): 682-699.

Proud CG (2000) Control of the Elongation Phase of Protein Synthesis; Sonenberg N, Hershey, J. and Mathews, M., Eds, editor. New York: CSHL Press.

Proud CG (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. Biochem J 403(2): 217-234.

Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM, McCarthy JE (1999) Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. Embo J 18(14): 4068-4075.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T et al. (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. Embo J 18(1): 270-279.

Pyronnet S (2000) Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. Biochem Pharmacol 60(8): 1237-1243.

Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N (2001) Suppression of cap-dependent translation in mitosis. Genes Dev 15(16): 2083-2093.

Qin H, Raught B, Sonenberg N, Goldstein EG, Edelman AM (2003) Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I. J Biol Chem 278(49): 48570-48579.

Rau M, Ohlmann T, Morley SJ, Pain VM (1996) A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. J Biol Chem 271(15): 8983-8990.

Raught B, Gingras AC, Gygi SP, Imataka H, Morino S et al. (2000) Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. Embo J 19(3): 434-444.

Rees BB, Patton C, Grainger JL, Epel D (1995) Protein synthesis increases after fertilization of sea urchin eggs in the absence of an increase in intracellular pH. Dev Biol 169(2): 683-698.

Remenyi A, Scholer HR, Wilmanns M (2004) Combinatorial control of gene expression. Nat Struct Mol Biol 11(9): 812-815.

Richter JD (1999) Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. Microbiol Mol Biol Rev 63(2): 446-456.

Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. Nature 433(7025): 477-480.

Robalino J, Joshi B, Fahrenkrug SC, Jagus R (2004) Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent. J Biol Chem 279(11): 10532-10541.

Rogers GW, Jr., Richter NJ, Lima WF, Merrick WC (2001) Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. J Biol Chem 276(33): 30914-30922.

Roig J, Traugh JA (2001) Cytostatic p21 G protein-activated protein kinase gamma-PAK. Vitam Horm 62: 167-198.

Rojo F, Najera L, Lirola J, Jimenez J, Guzman M et al. (2007) 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. Clin Cancer Res 13(1): 81-89.

Rolli-Derkinderen M, Machavoine F, Baraban JM, Grolleau A, Beretta L et al. (2003) ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. J Biol Chem 278(21): 18859-18867.

Rong L, Livingstone M, Sukarieh R, Petroulakis E, Gingras AC et al. (2008) Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. Rna 14(7): 1318-1327.

Rosettani P, Knapp S, Vismara MG, Rusconi L, Cameron AD (2007) Structures of the human eIF4E homologous protein, h4EHP, in its m7GTP-bound and unliganded forms. J Mol Biol 368(3): 691-705.

Rousseau D, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N (1996a) The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. Oncogene 13(11): 2415-2420.

Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N (1996b) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. Proc Natl Acad Sci U S A 93(3): 1065-1070.

Roux MM, Radeke MJ, Goel M, Mushegian A, Foltz KR (2008) 2DE identification of proteins exhibiting turnover and phosphorylation dynamics during sea urchin egg activation. Dev Biol 313(2): 630-647.

Rudolph J (2007) Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism. Biochemistry 46(12): 3595-3604.

Saad H, Belle R, Morales J, Cosson B, Mulner-Lorillon O et al. (2007) [Initiation factors eIF4: from sea urchin embryonic development to chronic lymphocytic leukemia]. J Soc Biol 201(3): 307-315.

Salas-Marco J, Bedwell DM (2004) GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. Mol Cell Biol 24(17): 7769-7778.

Salaun P, Pyronnet S, Morales J, Mulner-Lorillon O, Belle R et al. (2003) eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. Dev Biol 255(2): 428-439.

Salaun P, Le Breton M, Morales J, Belle R, Boulben S et al. (2004) Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. Exp Cell Res 296(2): 347-357.

Salaun P, Boulben S, Mulner-Lorillon O, Belle R, Sonenberg N et al. (2005) Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. J Cell Sci 118(Pt 7): 1385-1394.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR et al. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol 14(14): 1296-1302.

Schalm SS, Blenis J (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. Curr Biol 12(8): 632-639.

Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M (2000) NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. Nat Neurosci 3(3): 211-216.

Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ et al. (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. J Biol Chem 277(5): 3303-3309.

Scheper GC, Proud CG (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? Eur J Biochem 269(22): 5350-5359.

Schmidt EV (2004) The role of c-myc in regulation of translation initiation. Oncogene 23(18): 3217-3221.

Sclafani RA (1996) Cyclin dependent kinase activating kinases. Curr Opin Cell Biol 8(6): 788-794.

Sefton BM (2001) Overview of protein phosphorylation. Curr Protoc Cell Biol Chapter 14: Unit 14 11.

Shen SS, Buck WR (1990) A synthetic peptide of the pseudosubstrate domain of protein kinase C blocks cytoplasmic alkalinization during activation of the sea urchin egg. Dev Biol 140(2): 272-280.

Shibata S, Morino S, Tomoo K, In Y, Ishida T (1998) Effect of mRNA cap structure on eIF-4E phosphorylation and cap binding analyses using Ser209-mutated eIF-4Es. Biochem Biophys Res Commun 247(2): 213-216.

Shibuya T, Tange TO, Sonenberg N, Moore MJ (2004) eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. Nat Struct Mol Biol 11(4): 346-351.

Silva RL, Wendel HG (2008) MNK, EIF4E and targeting translation for therapy. Cell Cycle 7(5): 553-555.

Sivan G, Elroy-Stein O (2008) Regulation of mRNA Translation during cellular division. Cell Cycle 7(6): 741-744.

Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA et al. (2006) The genome of the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Science 314(5801): 941-952.

Solomon MJ, Glotzer M, Lee TH, Philippe M, Kirschner MW (1990) Cyclin activation of p34cdc2. Cell 63(5): 1013-1024.

Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ (1978) A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A 75(10): 4843-4847.

Sonenberg N (2008) eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. Biochem Cell Biol 86(2): 178-183.

Steinhardt RA, Epel D (1974) Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. Proc Natl Acad Sci U S A 71(5): 1915-1919.

Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. Oncogene 23(18): 3200-3207.

Sutton MA, Taylor AM, Ito HT, Pham A, Schuman EM (2007) Postsynaptic decoding of neural activity: eEF2 as a biochemical sensor coupling miniature synaptic transmission to local protein synthesis. Neuron 55(4): 648-661.

Suzuki C, Garces RG, Edmonds KA, Hiller S, Hyberts SG et al. (2008) PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. Proc Natl Acad Sci U S A 105(9): 3274-3279.

Swann K, Whitaker M (1985) Stimulation of the Na/H exchanger of sea urchin eggs by phorbol ester. Nature 314(6008): 274-277.

Takizawa CG, Morgan DO (2000) Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. Curr Opin Cell Biol 12(6): 658-665.

Tee AR, Proud CG (2002) Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. Mol Cell Biol 22(6): 1674-1683.

Teleman AA, Chen YW, Cohen SM (2005) 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. Genes Dev 19(16): 1844-1848.

Tettweiler G, Miron M, Jenkins M, Sonenberg N, Lasko PF (2005) Starvation and oxidative stress resistance in Drosophila are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. Genes Dev 19(16): 1840-1843.

Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A et al. (2007) PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. PLoS ONE 2(11): e1217.

Tomoo K, Abiko F, Miyagawa H, Kitamura K, Ishida T (2006) Effect of N-terminal region of eIF4E and Ser65-phosphorylation of 4E-BP1 on interaction between eIF4E and 4E-BP1 fragment peptide. J Biochem 140(2): 237-246.

Topisirovic I, Culjkovic B, Cohen N, Perez JM, Skrabanek L et al. (2003) The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. Embo J 22(3): 689-703.

Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL (2004) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. Cancer Res 64(23): 8639-8642.

Topisirovic I, Kentsis A, Perez JM, Guzman ML, Jordan CT et al. (2005) Eukaryotic translation initiation factor 4E activity is modulated by HOXA9 at multiple levels. Mol Cell Biol 25(3): 1100-1112.

Torok K, Wilding M, Groigno L, Patel R, Whitaker M (1998) Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis. Curr Biol 8(12): 692-699.

Townley IK, Roux MM, Foltz KR (2006) Signal transduction at fertilization: the Ca2+ release pathway in echinoderms and other invertebrate deuterostomes. Semin Cell Dev Biol 17(2): 293-302.

Tuazon PT, Morley SJ, Dever TE, Merrick WC, Rhoads RE et al. (1990) Association of initiation factor eIF-4E in a cap binding protein complex (eIF-4F) is critical for and enhances phosphorylation by protein kinase C. J Biol Chem 265(18): 10617-10621.

Uchida N, Hoshino S, Imataka H, Sonenberg N, Katada T (2002) A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. J Biol Chem 277(52): 50286-50292.

Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R (2004) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. Mol Cell Biol 24(15): 6539-6549.

van Breukelen F, Sonenberg N, Martin SL (2004) Seasonal and state-dependent changes of eIF4E and 4E-BP1 during mammalian hibernation: implications for the control of translation during torpor. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287(2): R349-353.

Vardy L, Orr-Weaver TL (2007) Regulating translation of maternal messages: multiple repression mechanisms. Trends Cell Biol 17(11): 547-554.

Vilela C, Velasco C, Ptushkina M, McCarthy JE (2000) The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. Embo J 19(16): 4372-4382.

von der Haar T, McCarthy JE (2002) Intracellular translation initiation factor levels in Saccharomyces cerevisiae and their role in cap-complex function. Mol Microbiol 46(2): 531-544.

von der Haar T, Gross JD, Wagner G, McCarthy JE (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. Nat Struct Mol Biol 11(6): 503-511.

Voronina E, Marzluff WF, Wessel GM (2003) Cyclin B synthesis is required for sea urchin oocyte maturation. Dev Biol 256(2): 258-275.

Voronina E, Lopez M, Juliano CE, Gustafson E, Song JL et al. (2008) Vasa protein expression is restricted to the small micromeres of the sea urchin, but is inducible in other lineages early in development. Dev Biol 314(2): 276-286.

Wagenaar EB (1983) The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. Exp Cell Res 144(2): 393-403.

Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ, Webb BL, Vries RG et al. (1998) The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. J Biol Chem 273(16): 9373-9377.

Wang X, Li W, Parra JL, Beugnet A, Proud CG (2003) The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. Mol Cell Biol 23(5): 1546-1557.

Wang Z, Burge CB (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. Rna 14(5): 802-813.

Warnke S, Kemmler S, Hames RS, Tsai HL, Hoffmann-Rohrer U et al. (2004) Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. Curr Biol 14(13): 1200-1207.

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. Embo J 16(8): 1909-1920.

Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR et al. (1999) Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. Mol Cell Biol 19(3): 1871-1880.

Weerapana E, Imperiali B (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. Glycobiology 16(6): 91R-101R.

Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S et al. (2004) Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. Nature 428(6980): 332-337.

Whalen SG, Gingras AC, Amankwa L, Mader S, Branton PE et al. (1996) Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. J Biol Chem 271(20): 11831-11837.

Whitaker MJ, Steinhardt RA (1981) The relation between the increase in reduced nicotinamide nucleotides and the initiation of DNA synthesis in sea urchin eggs. Cell 25(1): 95-103.

Whitaker MJ, Steinhardt RA (1982) Ionic regulation of egg activation. Q Rev Biophys 15(4): 593-666.

Whitaker M, Larman MG (2001) Calcium and mitosis. Semin Cell Dev Biol 12(1): 53-58.

Whitaker M (2006) Calcium at fertilization and in early development. Physiol Rev 86(1): 25-88.

Whitaker M, Smith J (2008) Introduction. Calcium signals and developmental patterning. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363(1495): 1307-1310.

Winkler MM, Steinhardt RA, Grainger JL, Minning L (1980) Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. Nature 287(5782): 558-560.

Wong JL, Wessel GM (2006) Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. Curr Top Dev Biol 72: 1-151.

Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV et al. (2007) PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. J Biol Chem 282(35): 25604-25612.

Yamanaka S, Zhang XY, Maeda M, Miura K, Wang S et al. (2000) Essential role of NAT1/p97/DAP5 in embryonic differentiation and the retinoic acid pathway. Embo J 19(20): 5533-5541.

Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA et al. (1998) Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. Genes Dev 12(14): 2131-2143.

Yang D, Brunn GJ, Lawrence JC, Jr. (1999) Mutational analysis of sites in the translational regulator, PHAS-I, that are selectively phosphorylated by mTOR. FEBS Lett 453(3): 387-390.

Yang DQ, Kastan MB (2000) Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. Nat Cell Biol 2(12): 893-898.

Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC et al. (2003) The transformation suppressor Pdcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. Mol Cell Biol 23(1): 26-37.

Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL (2006) Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. Genes Dev 20(20): 2820-2832.

Zhu N, Gu L, Findley HW, Zhou M (2005) Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53. Biochem Biophys Res Commun 335(4): 1272-1279.

Zucker RS, Steinhardt RA, Winkler MM (1978) Intracellular calcium release and the mechanisms of parthenogenetic activation of the sea urchin egg. Dev Biol 65(2): 285-295.