



HAL
open science

Facteurs de traduction et mécanismes de surveillance du cycle cellulaire

Ronan Le Bouffant

► **To cite this version:**

Ronan Le Bouffant. Facteurs de traduction et mécanismes de surveillance du cycle cellulaire. Biologie cellulaire. Rennes 1, 2007. Français. NNT : . tel-01117521

HAL Id: tel-01117521

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117521>

Submitted on 17 Feb 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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° Ordre : 3580
de la thèse

THESE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES I

Pour obtenir

Le grade de : *DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES I*

Mention : Biologie

PAR

LE BOUFFANT Ronan

Equipe d'accueil : Cycle Cellulaire et Développement, UMR 7150, Unité Mer & Santé CNRS/UPMC

Ecole doctorale : Vie-Agro-Santé

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

TITRE DE LA THESE :

**Facteurs de traduction et mécanismes de surveillance du
cycle cellulaire**

SOUTENUE LE 12 OCTOBRE 2007 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY

Dr Catherine JESSUS	DR CNRS Paris	rapporteur
Dr Anne Marie GENEVIERE	CR CNRS Banyuls	rapporteur
Dr Georges BAFFET	DR INSERM Rennes	examineur
Dr Luc PAILLARD	MC Université de Rennes	examineur
Dr Stéphane PYRONNET	CR INSERM	examineur
Dr Odile MULNER-LORILLON	DR CNRS Roscoff	directeur de thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
RESUME	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
LISTE DES PUBLICATIONS	9
AVANT PROPOS	12
INTRODUCTION	16
1 POINT DE SURVEILLANCE DU CYCLE CELLULAIRE	16
1-1 Cycle cellulaire	16
Description.....	16
Régulation des CDKs.....	19
1-2 Points de surveillance	23
Détection des lésions.....	23
Arrêt du cycle cellulaire.....	25
Réparation de l'ADN.....	28
La mort cellulaire programmée : l'apoptose.....	32
1-3 Cycle cellulaire, réparation de l'ADN, apoptose et cancer	40
2 LA TRADUCTION.....	45
2-1 Etape clé de la régulation de l'expression des gènes.....	45
2-2 Les étapes de la traduction.....	46
2-3 L'initiation de la traduction	47
Initiation dépendante de la coiffe.....	48
Régulation de la synthèse protéique dépendante de la coiffe	51
Initiation par une séquence IRES.....	53
2-4 Initiation de la traduction et cycle cellulaire	55
2-5 Initiation de la traduction dans un contexte de stress et d'apoptose.....	59
2-6 Initiation de la traduction et cancers	65
3 L'EMBRYON D'OURSIN, UN MODELE POUR L'ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE ET DE LA TRADUCTION.....	69
3-1 Embryon d'oursin, cycle cellulaire, réparation de l'ADN et apoptose	69

<i>Cycle cellulaire</i>	69
<i>Réparation de l'ADN</i>	73
<i>Apoptose</i>	74
<i>3-2 Embryon d'oursin et facteurs d'initiation de la traduction</i>	75
RESULTATS	78
ARTICLE 1	78
ARTICLE 2	79
ARTICLE 3	80
ARTICLE 4	81
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	83
1 L'EMBRYON D'OURSIN ET ENDOMMAGEMENTS DE L'ADN	84
2 LA PROTEINE EIF2 α , UN INHIBITEUR DE LA TRADUCTION DANS L'EMBRYON D'OURSIN	85
3 LA PROTEINE 4E-BP, ENTRE SURVIE ET APOPTOSE	86
3-1 Expression de la protéine 4E-BP	86
3-2 Dégradation de la protéine 4E-BP.....	88
3-3 Implication du niveau d'expression de 4E-BP : survie ou mort cellulaire ?.....	89
4 LA PROTEINE EIF4G DANS TOUS SES ETATS	91
4-1 Modification de la protéine eIF4G.....	91
4-2 Clivage de la protéine eIF4G.....	92
4-3 Dégradation de eIF4G	93
5 ENDOMMAGEMENT DE L'ADN ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE SPÉCIFIQUE.....	93
6 CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	96
BIBLIOGRAPHIE	97

RESUME

La division cellulaire est un processus physiologique extrêmement régulé et la moindre anomalie entraîne la mobilisation de points de surveillance. Lorsque qu'un problème survient dans le contrôle de la division, cela peut entraîner l'apparition de pathologies graves comme le cancer. L'étude de l'implication des facteurs de traduction lors de la mobilisation des points de surveillance a été réalisée en profitant des atouts du modèle de l'embryon d'oursin.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse, ont montré que le point de surveillance de l'ADN endommagé (arrêt du cycle-réparation-apoptose) était fonctionnel dès le premier cycle suivant la fécondation dans l'embryon d'oursin. Nous avons également mis en évidence que dans les embryons d'oursin, la phosphorylation de la protéine eIF2 α est impliquée dans l'augmentation de synthèse protéique induite par la fécondation et dans l'inhibition de synthèse protéique induite par un traitement avec une molécule alkylant l'ADN, le MMS.

Nos études montrent que la protéine 4E-BP, un inhibiteur de la traduction, est surexprimée et fonctionnelle en réponse à la mobilisation du point de surveillance de l'ADN endommagé par une molécule radiomimétique (bléomycine), à un stress hypoxique ou lors de l'exposition à un métal lourd (ChromeIII) dans l'embryon d'oursin. Enfin, nous démontrons que lors du traitement des embryons par le MMS, qui n'induit pas de surexpression de 4E-BP, la protéine eIF4G est modifiée, dégradée ou clivée selon la dose de drogue utilisée.

Nos études renforcent l'intérêt et les connaissances sur l'implication des facteurs de traduction lors de la mobilisation des points de surveillance du cycle cellulaire dans l'embryon d'oursin mis en situation de stress et/ou d'endommagement de l'ADN. Ainsi les résultats obtenus permettent de poser les bases de nouvelles régulations des facteurs de traduction eIF4E et eIF4G et de leur inhibiteur 4E-BP permettant de contrôler la synthèse protéique lorsque la cellule s'engage dans la voie de survie ou de mort cellulaire.

ABSTRACT

Cell division is a highly regulated process and when a problem occurs, the cell cycle checkpoints are activated. When cell cycle checkpoints are defective, pathological disease, as cancer, can occur. The implication of translation factors during checkpoints activation was studied in sea urchin embryo model.

The work realized during this PhD demonstrated a functional DNA damage checkpoint during the first cell division of sea urchin embryo. The eIF2 α phosphorylation was shown to be implicated in translational activation after fertilization and in translation inhibition after MMS treatment, a DNA alkylating molecule.

This study shows an expression of functional 4E-BP protein, a translational inhibitor, after induction of DNA damages by radiomimetic drug (bleomycin), hypoxic stress or heavy metal (ChromeIII) treatment in sea urchin embryo. We demonstrated that, after MMS treatment, which doesn't induced 4E-BP expression, the eIF4G protein was modified, degraded or cleaved as a function of drug dose.

Our work support interest and knowledge on translational factors implication when checkpoint was mobilised after DNA damages or cellular stress in sea urchin embryo. These results are a starting point to study new regulations of translational factors eIF4E, eIF4G and 4E-BP when cell is directed toward survival or cell death pathways.

LISTE DES ABBREVIATIONS

γ H2AX	Variant γ de l'histone 2AX
3' ou 5'UTR	3' ou 5' UnTranslated Region
4E-BP	4E Binding Protein
4E-T	eIF4E Transporter
53BP1	p53 Binding Protein 1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Akt	protéine kinase isolée du retrovirus AKT8
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC	Anaphase Promoting Complex
APE1	Apurinic/Apyrimidimic endonuclease 1
Apo-1	Accumulation of Photosystem protein 1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM and Rad3-related
ATRIP	ATR-Interacting Protein
Bad	Bcl2 Associated Death promoter
Bak	Bcl2 homologous Antagonist/Killer
Bax	Bcl2 Associated X protein
Bcl-2	B Cell Lymphoma 2
BCR	Breakpoint Cluster Region
BER	Base Excision Repair
BRCA1	BReast Cancer Associated protein 1
c-abl	Abelson murine leukaemia viral oncogen
CAK	CDK Activating Kinase
CARD	Caspase Recruitment Domain
caspases	cysteinylyl aspartyl proteases
Cdc (6, 25 ou 45)	Cell Division Control (6, 25 ou 45)

CDK	Cyclin Dependent Kinase
CHK (1 ou 2)	Checkpoint protein (1 ou 2)
CKIs	Cyclin dependent Kinase Inhibitors
CTAK1	Cdc25 Associated Protein Kinase 1
DAP5/ NAT1	Death Associated Protein 5 / Arylamine N-acetyltransferase 1
DEAD	Asp-Glu-Ala-Asp protein
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA-PK	DNA dependent Protein Kinase
DNA-PKcs	DNA dependent Protein Kinase catalytic subunit
DP1	Dimerisation Partner 1
DR4/DR5	Death Receptor 4 et 5
DSB	Double Strand Break
eEF (1 ou 2)	eukaryotic Elongation Factor (1 ou 2)
Egr-1	Early Growth Response protein 1
eIF (1A, 2, 3, 4A, 4B, 4E, 4F, 4G, 5B)	eukaryotic Initiation Factor (1A, 2, 3...)
eRF (1, 2, 3)	eukaryotic Releasing Factor (1, 2 ou 3)
FADD	Fas Associated Death Domain
FasL	Fas ligand
FEN1	Flap ENdonuclease 1
FOXO	Forkhead box protein O
FRAP/mTOR	FKBP12 Rapamycin Associated Protein/ mammalian Target Of Rapamycin
GCN2	General Control Non-derepressible-2
GTP	Guanosine TriPhosphate
hnRNPs	heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins
HR	Homologous Recombinaison
HRI	Haem Regulated Inhibitor kinases
IAPs	Inhibitors of APoptosis
IGF-BP3	Insulin Growth Factor Binding Protein 3
INK4	INhibiteur de CDK4
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ITAF	IRES transactivating factor
JNK	c-jun N-terminal Kinase

Killer/DR5	Death Receptor 5
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
m ⁷ GTP	7-methyl Guanosine Tri Phosphate
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mcl-1	induced Myeloid leukaemia cell differentiation protein
MCM	Mini-Chromosome Maintenance
Mdc1	Mediator of DNA damage checkpoint 1
Mdm2	Murine double minute 2
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MMR	MisMatch Repair
MMS	Methyl methanesulfonate
Mnk (1, 2)	MAP Kinase-interacting protein Kinase
MNR	Complexe Mre11/NBS1/Rad50
Mre11	Meiotic recombination 11 homolog
Myt1	Membrane associated tyrosine and threonine specific cdc2 inhibitory kinase
NBS	Nijmegen Breakage Syndrome
NER	Nucleotide Excision Repair
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
NHEJ	Non Homologous End Joining
ODC	Ornithine decarboxylase
Omi/HtrA2	Omi/High Temperature Requirement protein A2
ORC	Origin Recognition Complex
ORF	Open Reading Frame
p53AIP1	p53 regulated Apoptosis Inducing protein 1
PABP	Poly(A) Binding Protein
PAK2	p21 Activated protein Kinase 2
PARP1	Poly(ADP)Ribose Polymerase 1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PERK	Pkr-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIKK	PI3-kinase related kinase

PKA	Protein Kinase A
PKR	double-stranded RNA-dependent Protein Kinase
PLK1	Polo Like Kinase 1
PNK	PolyNucleotide Kinase
polX	Polymerase X
poly A	Poly Adenine
PUMA	p53 Upregulated Modulator Of Apoptosis
Rad (50, 51, 52)	DNA Repair protein (50,51, ou 52)
Rb	Retinoblastome protein
RPA	Replication Protein A
Scd1	Shape and conjugation deficiency 1
Smac/DIABLO	Second Mitochondria derivated activator of caspases/ Direct IAP-binding protein with low pl
SSB	Single Strand Break
sum1	suppressor of uncontrolled mitosis 1
TLK1	Tousled-Like Kinase 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR1	TNF Receptor
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TRBP	TAR RNA Binding Protein
TSC1/TSC2	Tuberous sclerosis protein
UV	Ultra Violet
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XRCC (1 ou 4)	X-ray Cross Complementing protein

LISTE DES PUBLICATIONS

Le Bouffant, R., P. Cormier, A. Cueff, R. Belle and O. Mulner-Lorillon (2007). "Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damages checkpoint, DNA repair and apoptosis." *Cell Mol Life Sci* **64**, 1723-34.

Le Bouffant, R., P. Cormier, O. Mulner-Lorillon and R. Belle (2006). "Hypoxia and DNA damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP." *J Cell Biochem* **99**(1): 126-32.

Le Bouffant, R., O. Mulner-Lorillon, J. Morales, P. Cormier and R. Belle. "Chromium(III) triggers the DNA-damaged checkpoint of the cell cycle and induces a functional increase of 4E-BP." *Under revision in Chemical Research in Toxicology*.

Le Bouffant, R., P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, R. Belle and J. Morales. "Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA damaging agent MMS in sea urchin embryos." *Submitted*.

Le Sourd, F., S. Boulben, **R. Le Bouffant**, P. Cormier, J. Morales, R. Belle and O. Mulner-Lorillon (2006). "eEF1B : At the dawn of the 21st century" *Biochim Biophys Acta* 1759, 13-31.

Belle, R., **R. Le Bouffant**, J. Morales, B.Cosson, P. Cormier and O. Mulner-Lorillon.

L'embryon d'oursin, le point de surveillance de l'ADN endommagé de la division cellulaire et les mécanismes à l'origine de la cancérisation. *J Soc Biol in press*.

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Complexes CDK-Cycline durant le cycle cellulaire.....	17
Figure 2 : Régulation des complexes CDK-Cycline par phosphorylation.	20
Figure 3 : Cibles des CKI au cours du cycle cellulaire.	22
Figure 4 : Détection des dommages de ADN.....	24
Figure 5 : Dommages de l'ADN et arrêt du cycle cellulaire par inhibition des complexes CDK-Cycline.....	26
Figure 6 : Réparation de cassures double brin de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).....	30
Figure 7 : Réparation de bases endommagées par le mécanisme de réparation par excision de base (BER).	32
Figure 8 : Les voies apoptotiques.....	33
Figure 9 : Points de surveillance et apoptose.	35
Figure 10 : Etapes de la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes.	46
Figure 11 : Structure de l'ARN messager mature.	48
Figure 12 : Initiation dépendante de la coiffe.	50
Figure 13 : Régulation de l'initiation dépendante de la coiffe.....	53
Figure 14 : Facteurs de traduction impliqués dans l'initiation dépendante de séquence IRES.	55
Figure 15 : Traduction du messenger GCN4	63
Figure 16 : Stades de développement de l'embryon d'oursin.....	72
Figure 17: Activation du point de surveillance de l'embryon d'oursin traité par des molécules génomiques.....	85
Figure 18: Comportement de la protéine 4E-BP en réponse à l'action de molécules génomiques.....	88

Figure 19 : Comportement de la protéine eIF4G en réponse à l'action de molécules génétoxiques.....	92
Figure 20 : Analyse de messagers recrutés dans les polysomes d'embryons d'oursin traités avec des molécules génotoxiques.....	95

AVANT PROPOS

La régulation traductionnelle est depuis 10 ans reconnue comme un niveau de contrôle important de l'expression des gènes. Contrôler la traduction d'un ARN (Acide RiboNucléique) messenger en protéine permet à la cellule de répondre dans un contexte spatio-temporel fin à différents stimuli physiologiques ou à des conditions de stress. Ainsi le contrôle au niveau de la traduction est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la croissance, la survie, la division cellulaire, la différenciation ou encore la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Ainsi, la perte de contrôle du taux de traduction est étroitement associée à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses.

Il est maintenant admis que les cancers ont pour origine un dysfonctionnement des points de surveillance de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) endommagé. Les points de surveillance sont les mécanismes qui assurent que chaque étape de la division cellulaire se déroule sans défaut et au bon moment. Ainsi, l'endommagement de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de l'expression génique, en particulier au niveau de la traduction, sont étroitement liés. Généralement, les études de ces processus physiologiques sont réalisées dans des modèles de cellules en culture qui présentent plusieurs inconvénients. Ces cellules sont transformées et possèdent donc déjà un phénotype altéré. Ces cellules sont asynchrones et la réponse observée à la suite de l'action d'une molécule génotoxique est le résultat d'un mélange de réponses en fonction de la phase du cycle dans laquelle se trouve chaque cellule. L'étude de la réponse sur des cellules synchronisées nécessite l'utilisation d'agents qui sont eux même des molécules endommageant la cellule et rendent les interprétations très délicates. L'étude de la régulation de l'expression des gènes au niveau de

la traduction dans les cellules en culture est également difficile car elle nécessite l'emploi de drogues permettant de s'affranchir de la régulation transcriptionnelle.

Ainsi, l'étude de l'implication des facteurs de traduction lors de l'activation des points de surveillance du cycle cellulaire demande un modèle présentant des divisions synchrones ainsi qu'une activité transcriptionnelle la plus faible possible. Le modèle de l'embryon précoce d'oursin a été choisi pour ces raisons. De plus, contrairement à d'autres modèles reconnus pour l'étude du cycle cellulaire comme les œufs et embryons de xénope ou les ovocytes d'étoile de mer, l'ovule d'oursin présente la caractéristique d'avoir terminé sa maturation méiotique et permet d'étudier directement les divisions mitotiques lors de la fécondation. Associée à ces caractéristiques physiologiques, l'acquisition récente de nouvelles données renforce l'intérêt du modèle de l'embryon précoce d'oursin. D'un côté, plusieurs acteurs de la régulation traductionnelle ont déjà été caractérisés d'un point de vue fonctionnel dans ce modèle. D'un autre côté, l'obtention récente du génome complet de cet organisme permet d'envisager des études génomiques.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons abordé la question des liens entre la régulation traductionnelle et la réponse cellulaire à un stress, en particulier un endommagement de l'ADN en tirant profit du modèle que représente le développement embryonnaire précoce de l'oursin. L'ensemble de ce projet nous a amené à nous confronter aux mécanismes complexes qui contrôlent le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la mort programmée des cellules et ceux qui orchestrent la régulation traductionnelle. Appréhender ces mécanismes dans leur globalité représente un challenge important. Dans ce manuscrit, dans un souci de clarté pour le lecteur, nous avons choisi de présenter une introduction générale divisée en trois parties principales.

La première partie présente la régulation du cycle cellulaire et aborde les différents mécanismes de surveillance existant pour répondre à un endommagement de l'ADN. Nous avons ensuite décrit les mécanismes de réparation de l'ADN et d'apoptose, faisant partie de ces points de surveillance. Un dysfonctionnement de ces mécanismes étant à la base de pathologies graves, cela nous a amené naturellement à souligner leur importance dans le processus de cancérisation.

La seconde partie de l'introduction est consacrée à la régulation traductionnelle au niveau de l'initiation. Nous avons mis l'accent sur les relations entre l'initiation de la traduction et le contrôle du cycle cellulaire, la réponse au stress et les mécanismes d'apoptose. Nous avons conclu cette partie en montrant l'importance de ces régulations dans la compréhension des mécanismes de cancérisation.

Dans la troisième partie de l'introduction, nous avons illustré l'ensemble des mécanismes précédemment décrits dans le contexte physiologique particulier du développement embryonnaire précoce de l'oursin. Cette dernière partie permet d'intégrer les résultats des travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse portant sur l'étude des facteurs de traduction et des points de surveillance du cycle cellulaire.

Les données expérimentales originales acquises dans l'embryon précoce d'oursin sont ensuite présentées sous forme de quatre articles scientifiques. L'ordre de présentation de ces articles permet d'aborder dans un premier temps la mobilisation des mécanismes de surveillance à la suite de l'endommagement de l'ADN. Les deux articles suivants démontrent la relation étroite et originale qui existe entre le niveau d'expression d'un régulateur traductionnel important et la réponse au stress hypoxique et génotoxique. Enfin le quatrième et dernier article présente l'analyse de plusieurs facteurs de traduction au cours des mécanismes de mort cellulaire induits par un stress génotoxique. L'ensemble des résultats originaux obtenus au cours de cette thèse nous permet, en fin de ce manuscrit, de présenter

une conclusion générale qui met en avant une régulation sophistiquée des différents acteurs en fonction des conditions étudiées.

En annexe, sont présentées deux revues auxquelles nous avons participé.

En conclusion, ces études effectuées dans l'embryon précoce d'oursin apportent de nouvelles connaissances importantes pour la compréhension de la régulation traductionnelle dans le contexte spécifique du modèle et aussi dans le cadre général de la régulation de l'expression des gènes au sein de la cellule.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1 Point de surveillance du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le processus qui permet la division des cellules, indispensable à la vie d'un organisme. Chaque phase du cycle est extrêmement régulée et des points de surveillance sont constamment sollicités afin d'arrêter la division à la moindre anomalie (Kastan and Bartek 2004). Lorsqu'un des points de surveillance est activé, le blocage de la division est suivi de la mise en place de mécanismes capables de réparer la lésion cellulaire et ainsi de permettre à la division de se poursuivre. Lorsque les dommages sont trop importants pour être réparés, la mort cellulaire programmée (ou apoptose) est déclenchée. Un dérèglement de ces points de surveillance peut conduire à l'apparition de pathologies graves comme le cancer.

Dans cette première partie, le mécanisme de division cellulaire des cellules eucaryotes est brièvement décrit, puis les points de surveillance mobilisés en réponse à l'endommagement de l'ADN sont abordés. Enfin, des acteurs impliqués dans ces voies et pouvant entraîner la transformation cellulaire sont présentés.

1-1 Cycle cellulaire

Description

Le cycle cellulaire est composé de l'interphase, durant laquelle la cellule prépare sa division, et de la phase mitotique (phase M) qui aboutit à la formation des deux cellules filles (Nurse 1990). L'interphase est constituée de plusieurs étapes, la phase S de synthèse de l'ADN et les phases G1 (Gap 1) et G2 (Gap 2) qui permettent la préparation des phases S et M, respectivement.

La progression dans le cycle est assurée par des protéines appelées cyclines, qui sont synthétisées à des moments précis du cycle et dont la dégradation permet le passage à la phase suivante. Les cyclines sont indispensables à l'activité des kinases CDKs (Cyclin Dependent Kinase) et seul le complexe CDK-Cycline est actif. Chaque complexe CDK-Cycline est spécifiquement activé pour une phase particulière (Figure 1). Les complexes CDK4/6-Cycline D, CDK2-Cycline E et CDK2-Cycline A coordonnent l'interphase alors que les complexes CDK1-Cycline A et CDK1-Cycline B régissent la mitose (Murray 2004).

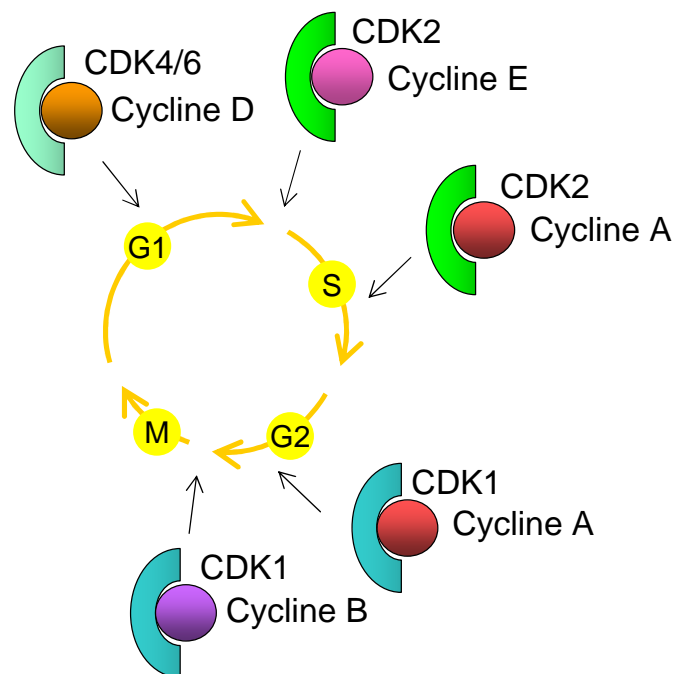


Figure 1 : Complexes CDK-Cycline durant le cycle cellulaire

Les complexes CDK4/6-Cycline D, CDK2-Cycline E et CDK2-Cycline A contrôlent l'interphase alors que les complexes CDK1-Cycline A et CDK1-Cycline B contrôlent la mitose.

L'entrée en phase G1 est sous dépendance du complexe CDK4/6-Cycline D et Rb, la protéine du rétinoblastome (Sherr and Roberts 1999; Ekholm and Reed 2000). Les facteurs de transcription DP1 (Dimerisation Partner 1) et E2F sont inhibés par interaction avec la protéine

Rb. Lorsque le complexe CDK4/6-Cycline D est actif, il phosphoryle la protéine Rb provoquant ainsi le relargage de DP1 et E2F. Les facteurs de transcription ainsi libérés peuvent induire l'expression de gènes requis pour la transition G1/S, notamment le gène de la cycline E (Bartek and Lukas 2001).

La transition G1/S est contrôlée par la cycline E qui s'associe à CDK2 et induit la fixation de Cdc45 (Cell Division Cycle 45) sur le complexe de pré-réplication composé des protéines ORC (Origin Recognition Complex), Cdc6 (Cell Division Cycle 6) et MCM (Mini-Chromosome Maintenance). Ceci induit le relargage de Cdc6 et ORC, et permet l'initiation de la réplication par le recrutement de l'ADN polymérase sur l'ADN (Bartek and Lukas 2001). Le complexe kinasique CDK2-Cycline A est nécessaire à l'élongation de la réplication bien que sa fonction exacte dans la réplication soit encore largement recherchée. Pendant les phases S, G2 et M, la fixation de MCM sur les origines de réplication est bloquée, ce qui empêche la re-réplication (Bartek and Lukas 2001). Le complexe de pré-réplication peut être assemblé uniquement en G1 et activé uniquement en S. Lorsque le complexe kinasique CDK2-cycline A est actif, les protéines Cdc6 et ORC sont phosphorylées, ce qui verrouille la machinerie de réplication (Yam et al. 2002).

En fin de phase S, la cycline A s'associe à CDK1 et phosphoryle la phosphatase Cdc25 qui retire le phosphate inhibiteur du complexe CDK1-Cycline B et participe ainsi à son activation (Mitra and Enders 2004).

Le complexe CDK1-Cycline B activé orchestre la phase mitotique des cellules qui conduit à la ségrégation chromosomique (Nurse and Thuriaux 1980; Nurse 1990). La mitose est séparée en plusieurs phases, la prophase, marquée par la condensation des chromosomes et finissant par la rupture de l'enveloppe nucléaire, la prométaphase caractérisée par la formation

du fuseau mitotique, la métaphase permettant l'alignement des chromosomes sur le fuseau, l'anaphase caractérisée par la séparation des chromatides sœurs et enfin la télophase qui termine la mitose par la disparition du fuseau et l'entrée en cytokinèse. Le complexe CDK1-Cycline B est impliqué dans toutes ces étapes et phosphoryle des protéines comme les lamines au cours de la rupture de l'enveloppe nucléaire, des histones (H1) lors de la condensation chromosomique ou des MAP (Mitogen Activated Protein) impliquées dans la formation du fuseau mitotique (Nigg 1995). Le complexe kinasique CDK1-Cycline B est capable de phosphoryler également l'APC (Anaphase Promoting Complex) ou cyclosome, permettant la dégradation de la cohésine qui assure la cohésion des chromatides. Les chromatides sœurs peuvent alors migrer vers les pôles opposés du fuseau qui s'écartent l'un de l'autre. La phosphorylation de l'APC permet également la dégradation de la cycline B par la voie de l'ubiquitine, ce qui entraîne la fin de la mitose (Murray 2004).

Régulation des CDKs

L'activité des complexes CDK-Cycline est contrôlée par un équilibre de phosphorylation - déphosphorylation. Certaines phosphorylations sont indispensables à l'activité du complexe CDK-Cycline, d'autres entraînent son inhibition. Les résidus phosphorylés provoquant une inhibition devront être déphosphorylés pour permettre l'activité du complexe kinasique (Figure 2).

L'activité des complexes CDK-Cycline est également régulée par des protéines appelées CKIs (Cyclin dependent Kinase Inhibitors).

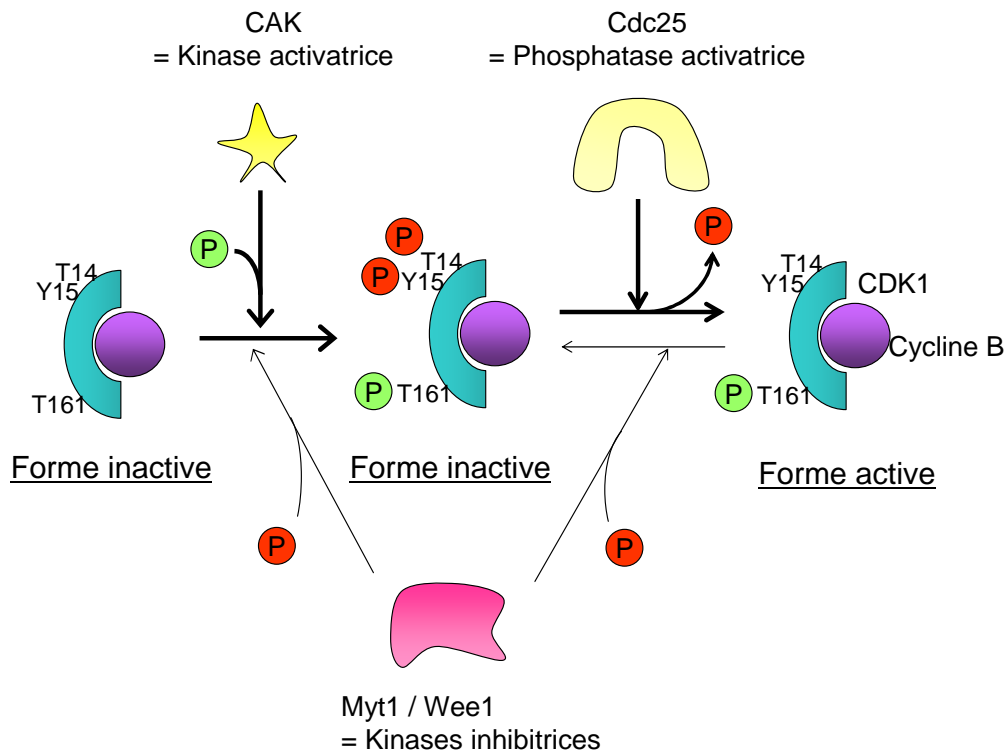


Figure 2 : Régulation des complexes CDK-Cycline par phosphorylation.

Les phosphorylations activatrices (en vert) sont réalisées par la kinase CAK alors que les phosphorylations inhibitrices (en rouge) sont réalisées par des kinases Wee1 et Myt1. Les déphosphorylations activatrices sont réalisées par les phosphatases Cdc25.

- Les phosphorylations activatrices

Les CDKs impliquées dans le cycle cellulaire sont phosphorylées sur un résidu thréonine (Thr-160 pour CDK2 et Thr-161 pour CDK1 chez l'homme), ce qui entraîne la stabilisation et l'activation du complexe CDK-Cycline (Gu et al. 1992). La kinase responsable de cette phosphorylation est la kinase CAK (CDK Activating Kinase) (Figure 2), qui est elle-même une CDK (CDK7) et se lie à la cycline H.

- Les phosphorylations inhibitrices

L'activité des CDKs est inhibée par des phosphorylations sur des résidus thréonine et tyrosine (Thr-14 et Tyr-15 pour CDK1 et CDK2 chez l'homme) présentes dans le domaine de liaison de l'ATP. La phosphorylation de ces résidus (Figure 2) est réalisée par les kinases Wee1 ou Myt1 (Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase). La kinase Wee 1 (Parker et al. 1992) ne phosphoryle que la tyrosine 15 alors que Myt 1 (Mueller et al. 1995) est capable de phosphoryler les deux résidus.

- Les déphosphorylations activatrices

Les phosphates inhibiteurs doivent être retirés des CDKs pour que celles-ci assurent leurs fonctions kinasiques. Pour cela, des phosphatases de la famille des Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C chez l'homme) sont capables de retirer les phosphates inhibiteurs des résidus Tyr-15 et Thr-14 (Millar et al. 1991; Rudolph 2007) (Figure 2). Cdc25A est classiquement décrit comme un régulateur fonctionnant seulement en G1/S alors que Cdc25B et C sont considérés comme actifs seulement en G2/M. Mais des études récentes ont démontré que les différentes isoformes de Cdc25 coopèrent pour réguler chaque transition du cycle (Boutros et al. 2006).

- Les CKIs

Il existe deux familles d'inhibiteurs de CDKs (CKIs), la famille des INK4 (Inhibiteur de CDK4) et la famille des Cip1/Waf1/Kip1-2. Les protéines de la famille INK4 sont capables de se fixer et d'inhiber CDK4 et CDK6. Les INK4 sont composés de p16^{Ink 4a}, p15^{Ink 4b},

p18^{Ink 4c} et p19^{Ink 4d}. L'action de ces protéines entraîne un arrêt du cycle en G1 en formant des complexes ternaire INK4-CDK4/6-Cyclin D ou binaire INK4-CDK4/6 (Jeffrey et al. 2000; Maddika et al. 2007). Les protéines de la famille de CKIs Cip1/Waf1/Kip1-2 incluant p21^{Cip1/Waf1} et p27^{Kip1} peuvent se fixer et inhiber le complexe CDK2- Cycline E (Figure 3). Il a également été montré que p27^{Kip1} est capable de s'associer au complexe kinasique CDK2- Cycline A (Russo et al. 1996). Les protéines p21^{Cip1/Waf1} et p27^{Kip1} peuvent également avoir une fonction activatrice et permettent l'assemblage du complexe CDK4-Cycline D (Coqueret 2003).

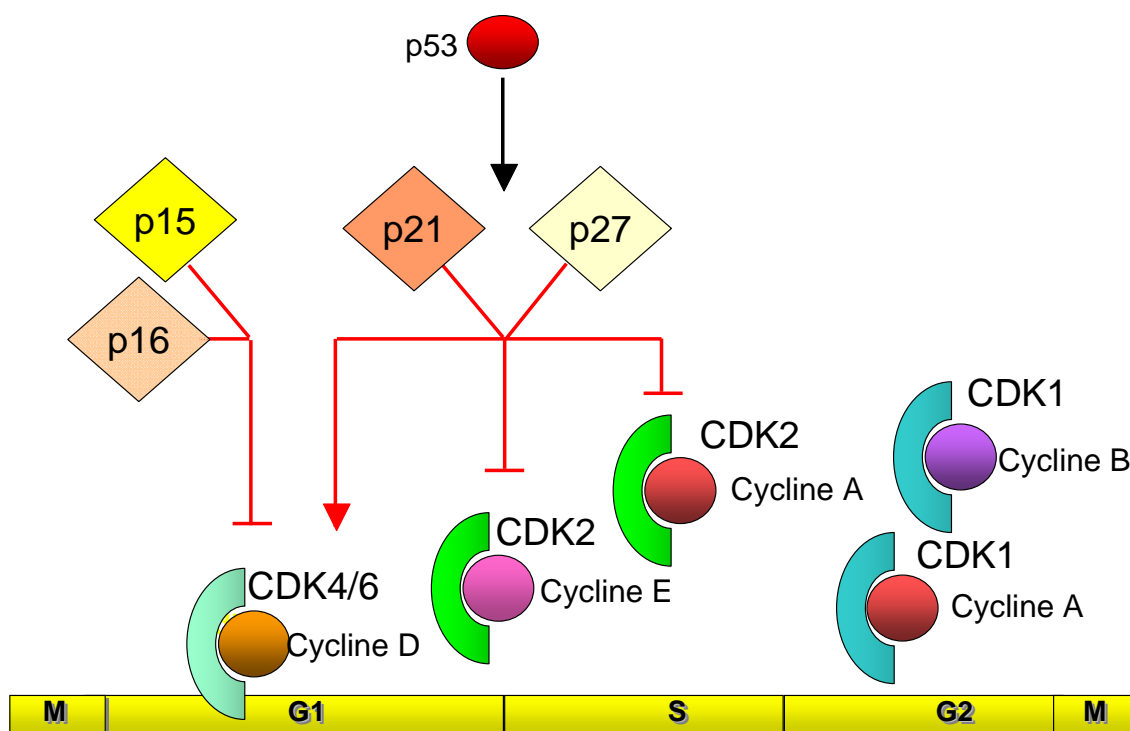


Figure 3 : Cibles des CKI au cours du cycle cellulaire.

Les CKIs de la famille des INK4 (p15 et p16) inhibent les CDK4/6 alors que les CKIs de la famille Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21 et p27) inhibent la CDK2.

1-2 Points de surveillance

Lorsque des anomalies interviennent au cours de la division, des points de surveillance sont mobilisés. C'est en particulier le cas lors de l'apparition de dommages de l'ADN qui peuvent être causés par des agents exogènes mutagènes (produits chimiques, rayons UV ou ionisants), par le métabolisme cellulaire comme la production d'espèces oxygénées réactives au cours de la respiration, ou encore un mauvais appariement de bases par une polymérase répliquative. La réponse cellulaire mise en place lors d'un endommagement de l'ADN se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, les senseurs détectent la lésion puis transmettent l'information, par le biais de transducteurs, aux effecteurs qui déclenchent les mécanismes d'arrêt du cycle et de réparation de l'ADN, et la mort cellulaire programmée, l'apoptose (Hartwell and Weinert 1989; Hoeijmakers 2001; van Gent et al. 2001; Kastan and Bartek 2004).

Détection des lésions

Les kinases ATM/ATR (ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated et ATR : ATM and Rad3-related) sont les principaux acteurs impliqués dans les premières étapes de la mobilisation des points de surveillance enclenchés lors d'un dommage de l'ADN (Figure 4). La protéine ATM est présente et inactive sous forme de dimères dans les cellules dont l'ADN n'est pas endommagé, et active sous forme de monomères. L'induction de cassures double brin de l'ADN conduit à la dissociation des dimères d'ATM entraînant son autophosphorylation et aboutissant ainsi à l'activation d'ATM (Bakkenist and Kastan 2003). La protéine ATM ainsi activée, phosphoryle la protéine NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome), qui fait partie du complexe MNR (Mre11/NBS1/Rad50) présent au niveau du dommage. La phosphorylation de NBS1 stabilise le complexe MNR et permet le recrutement

de molécules ATM supplémentaires au niveau des foyers de lésions (Zhao et al. 2000). Le complexe MNR augmente aussi directement l'activité kinasique d'ATM (Lee and Paull 2004).

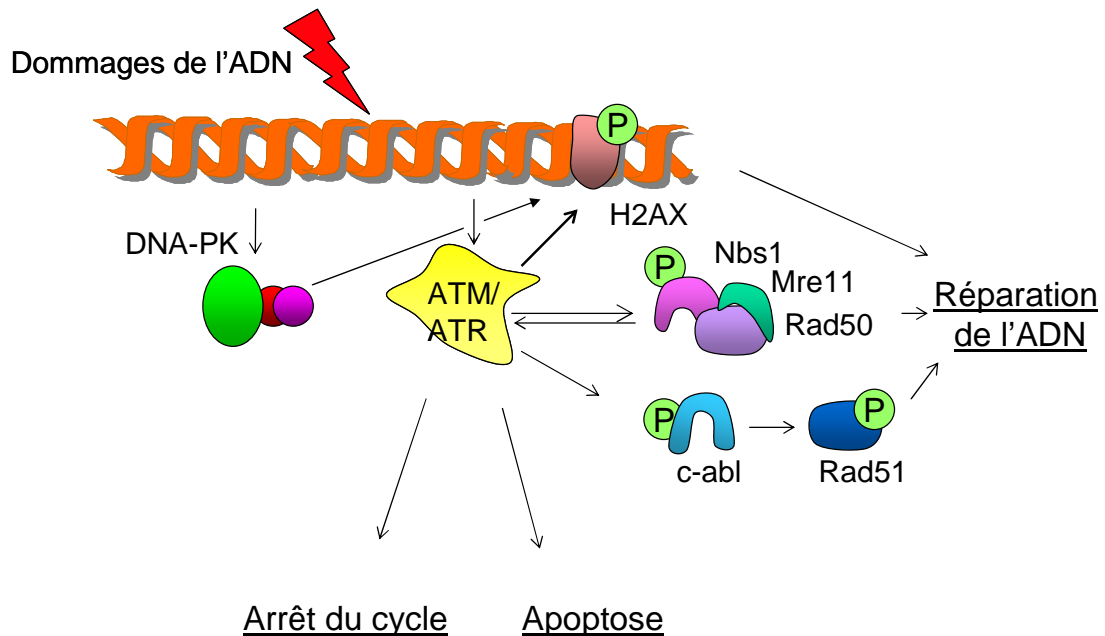


Figure 4 : Détection des dommages de ADN.

Les kinases ATM/ATR (jaunes) et DNA-PK (vert-rouge-rose) sont impliquées avec différents complexes dans la détection des liaisons afin d'induire l'arrêt du cycle, la réparation de l'ADN et l'apoptose.

Un des substrats de la protéine ATM est le variant d'histone γ H2AX (Histone 2AX) qui permet le recrutement de la protéine Mdc1 (Mediator of DNA damage checkpoint 1). La protéine Mdc1 forme ensuite un complexe avec les protéines BRCA1 (Breast Cancer Associated Protein), 53BP1 (p53 Binding Protein 1), le MNR et ATM qui vont ainsi s'accumuler au site de la lésion. ATM peut également phosphoryler c-abl (Abelson murine leukaemia viral oncogen) qui phosphoryle à son tour Rad51 afin de permettre son interaction avec Rad52, impliqué dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Chen et al. 1999; Shangary et al. 2000). Ainsi, la protéine ATM permet le recrutement de protéines de réparation au sein des foyers de réparation.

En réponse à un endommagement par les UV, le complexe protéique ATR / ATRIP (ATR-Interacting Protein) est capable, *in vitro*, de se lier au niveau d'une fourche de réplication en interagissant avec la protéine RPA (Replication Protein A), protéine impliquée aussi dans la détection des dommages (Zou and Elledge 2003).

Comme ATM et ATR, la DNA-PK (DNA dependent Protein Kinase), enzyme clé de la réparation par NHEJ (Non Homologous End Joining), est considérée comme un senseur primaire des dommages de l'ADN (Durocher and Jackson 2001; Yang et al. 2003). La DNA-PK peut se fixer directement sur des cassures double brin de l'ADN par le biais de sa sous-unité régulatrice, l'hétérodimère Ku 70/80 (Mimori and Hardin 1986; Blier et al. 1993). De la même manière que la protéine ATM, la DNA-PK peut phosphoryler le variant d'histone γ H2AX (Paull et al. 2000).

De manière intéressante, il a été montré que la détection des dommages double brin par ATM ou par la DNA-PK nécessite respectivement NSB1 et Ku70/80, alors que la détection de cassures simple brin par ATR nécessite ATRIP. Les régions C terminales des protéines NSB1, Ku 80 ou ATRIP présentent de fortes homologies de séquences (Falck et al. 2005).

La détection de la lésion peut également faire intervenir d'autres facteurs, comme des glycosylases (pour la réparation par excision de base) par exemple (Hoeijmakers 2001).

Arrêt du cycle cellulaire

- Arrêt du cycle en G1

Les kinases ATM/ATR, activées lors d'un endommagement de l'ADN, phosphorylent la protéine p53 (Vousden and Lane 2007), soit directement, soit par le biais des kinases CHK1/CHK2 (Checkpoint protein 1 et 2). Le facteur de transcription p53 contrôle la

transcription du gène codant pour p21^{Cip1/Waf1} et inhibe le complexe CDK2-Cycline E, responsable de la transition G1/S (Ekholm and Reed 2000; Child and Mann 2006) en se fixant sur la CDK (Figures 3 et 5). La protéine p21^{Cip1/Waf1} est également capable de bloquer la réplication en se fixant sur le facteur de processivité PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), nécessaire à l'activité de l'ADN polymérase et donc à la réplication, empêchant ainsi l'entrée en phase S (Luo et al. 1995).

Le point de surveillance G1/S implique également la phosphatase Cdc25A. Lorsque Cdc25A est phosphorylée par CHK1 ou CHK2, elles même activées par ATM ou ATR, elle est ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome et ne peut donc plus activer le complexe CDK2-Cycline E (Busino et al. 2004).

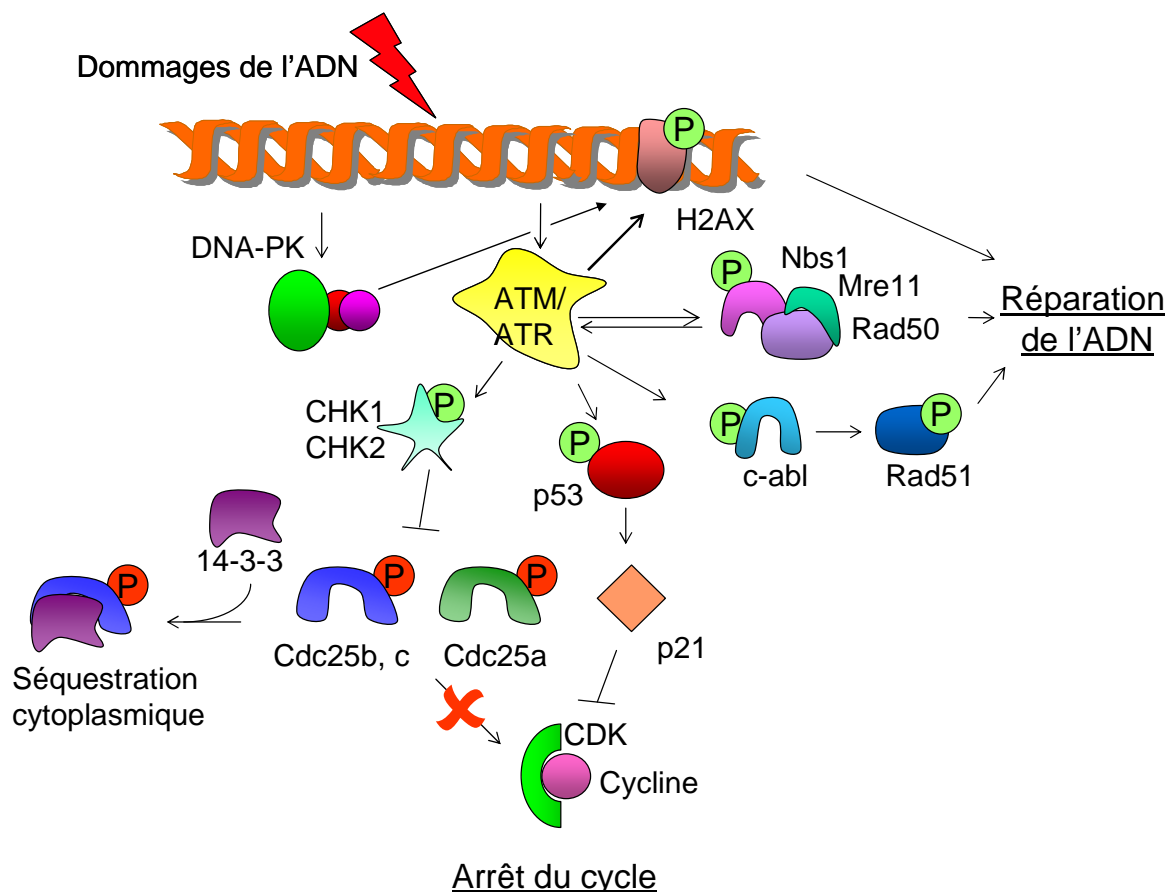


Figure 5 : Dommages de l'ADN et arrêt du cycle cellulaire par inhibition des complexes CDK-Cycline.

Les kinases ATM/ATR peuvent réguler différentes protéines impliquées dans les points de surveillance en les activant (vert) ou en les inhibant (rouge) par phosphorylations.

- Arrêt du cycle en phase S

Le mécanisme du point de surveillance de la phase S est le moins bien caractérisé. La phosphatase Cdc25A joue un rôle très important dans la régulation de ce point de surveillance. En effet, à la suite d'une erreur de réplication ou de l'induction de dommages de l'ADN, la kinase ATM phosphoryle CHK2 entraînant l'inhibition par phosphorylation de Cdc25A qui est alors incapable de déphosphoryler la kinase CDK2 (Falck et al. 2001). La kinase CDK2 ne peut donc plus activer l'initiation de la réplication (Nyberg et al. 2002).

- Arrêt du cycle en phase G2/M

Le point de surveillance G2/M, qui contrôle l'activité du complexe kinasique CDK1-Cycline B, implique les phosphatases Cdc25B et Cdc25C. L'inhibition de l'activité phosphatase peut avoir différentes origines. Cdc25C peut être phosphorylée par CHK1 ou CTAK1 (Cdc25 Associated Protein Kinase 1) en réponse aux dommages de l'ADN, entraînant sa fixation à la protéine 14-3-3 qui va alors la séquestrer dans le cytoplasme et ainsi l'empêcher d'activer CDK1-Cycline B nucléaire (Boutros et al. 2006; Hermeking and Benzinger 2006). De plus, en réponse aux dommages de l'ADN, l'activité de Aurora A est inhibée et ne permet donc plus d'activer Cdc25B (Cazales et al. 2005). En effet, lors de la transition G2/M, la protéine Aurora A peut phosphoryler et activer Cdc25B au niveau des centrosomes, où le complexe CDK1-Cycline B est initialement activé, et participer ainsi au contrôle de la phase M (Dutertre et al. 2004).

En réponse aux dommages induits par les UV, la protéine MAPKp38 (Mitogen Activated Protein Kinase) est activée très rapidement pour induire l'arrêt G2/M. La protéine MAPKp38 active, phosphoryle Cdc25B ce qui entraîne sa fixation sur la protéine 14-3-3,

bloquant l'accès de Cdc25B à son substrat (Bulavin et al. 2001; Hermeking and Benzinger 2006).

A la suite de l'endommagement de l'ADN, les kinases ATM/ATR sont capables, par le biais des kinases CHK1 et 2, de phosphoryler PLK1 (Polo Like Kinase 1) et l'empêcher ainsi d'activer Cdc25C (Smits et al. 2000; van Vugt et al. 2001). En effet, la protéine PLK1 est capable de réguler la transition G2/M en influant sur CDK1-cycline B par le biais de l'activation de Cdc25C (Barr et al. 2004).

La protéine p21^{Cip1/Waf1}, exprimée grâce à l'action de la protéine p53, peut également être impliquée dans l'arrêt G2/M. Les protéines p21^{Cip1/Waf1}, Cdc25 et le complexe CDK1-Cycline B peuvent tous interagir avec PCNA mais pas en même temps. PCNA joue le rôle de plateforme qui permet les interactions entre p21^{Cip1/Waf1} ou Cdc25, et PCNA-CDK1-Cycline B (Ando et al. 2001). Lorsque p21^{Cip1/Waf1} est présent, il interagit avec le complexe PCNA-CDK1-Cycline B et empêche l'action activatrice de Cdc25 C. La protéine p21^{Cip1/Waf1} peut également inhiber directement CDK1 en inhibant la phosphorylation activatrice par CAK (Smits et al. 2000).

La phosphorylation de la protéine BRCA1 par ATM est indispensable à la mise en place de l'arrêt dans deux phases différentes G2/M et S, selon le site sur lequel elle est phosphorylée. En effet, si le dommage intervient en phase S le résidu phosphorylé par ATM sur BRCA1 est la sérine 1387, s'il intervient en G2/M, la sérine 1423 (Xu et al. 2001; Xu et al. 2002).

Réparation de l'ADN

Lorsque les lésions sont détectées, l'arrêt du cycle cellulaire est induit (voir précédemment) et les systèmes de réparation sont activés (Figure 5).

L'ADN est la cible d'un grand nombre d'agents générateurs de lésions entraînant l'apparition de bases ou de nucléotides endommagés, ou encore de cassures simple brin (SSB: Single Strand Break) ou double brin (DSB : Double Strand Break). Afin de réparer ces différents dommages, la cellule met en œuvre différents mécanismes. Cinq principaux systèmes de réparation ont été mis en évidence chez les eucaryotes (Hoeijmakers 2001). La réparation par excision de base, ou BER (Base Excision Repair) permet de réparer une base modifiée (oxydée, alkylée ou déaminée) ou délétère (spontanément clivée). La réparation par excision de nucléotide, le NER (Nucleotide Excision Repair) permet de remplacer des nucléotides modifiés par des rayons UV (dimère de pyrimidine). La réparation par le système de réparation de mésappariement, le MMR (MisMatch Repair) permet de rétablir les erreurs causées par l'infidélité des polymérase répliquatives. Les DSBs sont prises en charge par deux systèmes de réparation, la recombinaison homologue, ou HR (Homologous Recombinaison) qui permet le retour à la séquence initiale par copie du brin homologue du chromosome homologue, et le système de réparation par jonction d'extrémités non homologues, le NHEJ (Non Homologous End Joining) qui permet le collage direct des extrémités de la lésion, entraînant une perte d'information génétique (Hoeijmakers 2001).

Les études réalisées au cours de cette thèse ont permis d'aborder deux principaux mécanismes de réparation qui seront détaillés par la suite : le NHEJ et le BER.

- La réparation par NHEJ (Non Homologous End Joining)

L'acteur principal de la réparation par NHEJ est la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK). La DNA-PK est une sérine/thréonine kinase de 465 kDa dont le domaine catalytique appartient à la sous famille des "PI3-kinase related kinase" (PIKK), sans activité lipide kinase, au même titre que ATM et FRAP/mTOR (FKBP12 Rapamycin Associated

Protein / mammalian Target Of Rapamycin). La DNA-PK est composée d'une sous unité régulatrice, l'hétérodimère Ku70/80 et d'une sous unité catalytique la DNA-PKcs (DNA dependent Protein Kinase catalytic subunit). La mise en place du mécanisme de réparation par NHEJ commence par la liaison de l'hétérodimère Ku70/80, qui recrute, au site de la lésion, la DNA-PKcs (Downs and Jackson 2004). Une fois fixée, la DNA-PK s'autophosphoryle, et permet également le recrutement, au niveau de la DSB, du complexe XRCC4-Ligase IV (X-Ray Cross Complementing protein 4) qui va assurer la résolution de la cassure par religation (Calsou et al. 2003). Une polymérase de la famille des polX (Polymerase X) permet de remplir la brèche formée par la jonction (Figure 6).

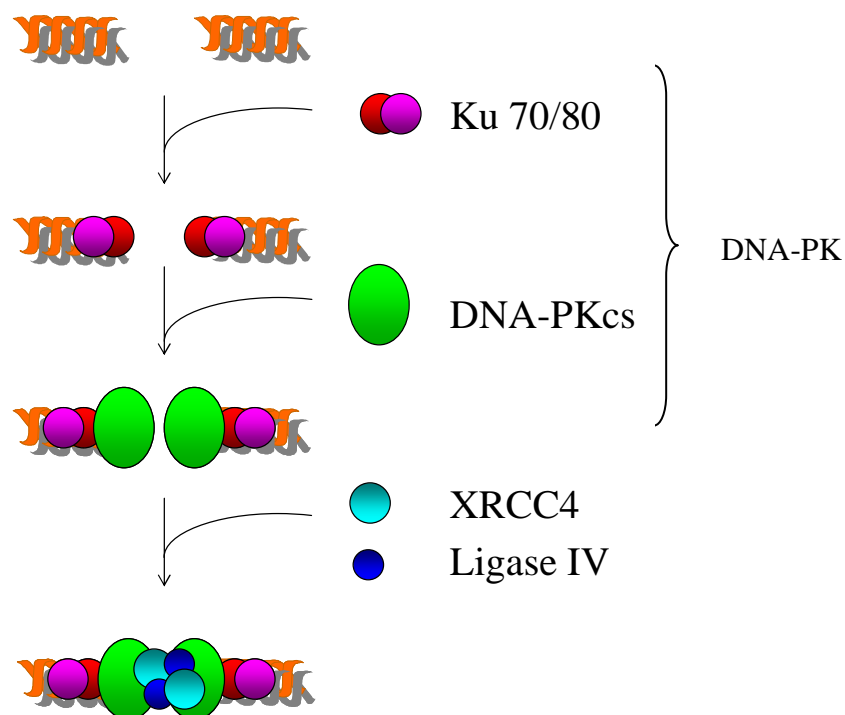


Figure 6 : Réparation de cassures double brin de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).

Cinétique de recrutement des protéines Ku 70/80 (rouge/fuchsia), DNA-PKcs (vert), XRCC4 (bleu clair) et Ligase IV (bleu foncé) dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ.

- La réparation par BER (Base Excision Repair)

Le mécanisme de réparation par excision de base (Figure 7) prend en charge les bases modifiées comme les bases oxydées, 8-oxoguanine par exemple, les bases alkylées, deaminées ou encore les sites abasiques spontanés.

Le mécanisme de réparation par BER met tout d'abord en jeu une glycosylase qui permet la détection et l'excision de la base et entraîne l'apparition du site abasique (Hoeijmakers 2001). La glycosylase va ensuite cliver en 3' du site abasique (1). Une AP endonucléase (APE1 : APurinic/APyrimidinic Endonuclease 1) clive l'extrémité 5' (2). Ensuite, dans la voie classique ou voie du 'Short Patch', la polymérase β permet, d'après la matrice du brin complémentaire, l'incorporation d'une nouvelle base non modifiée (3). La réparation se termine par l'intervention du complexe de ligation XRCC1-Ligase III (4).

Parfois, des dommages simple brin entraînés par des radiations ionisantes conduisent à l'apparition d'extrémités nucléiques bloquées 3'P et 5'OH nécessitant l'intervention du complexe PARP1/XRCC1/PNK (PARP1 : Poly(ADP)Ribose Polymérase 1 ; PNK : Polynucléotide Kinase) pour être rétablies en 3'OH et 5'P. Les dommages peuvent aussi être réparés par la voie minoritaire ou voie du 'Long Patch' permettant l'incorporation de plusieurs bases. Cette voie implique les polymérases β , δ et ϵ , un facteur de processivité PCNA et la protéine PARP1. Il y a alors déplacement du brin d'ADN qui est clivé par l'endonucléase FEN1 (Flap Endonuclease 1) (5). La ligation finale est réalisée par la Ligase I (6).

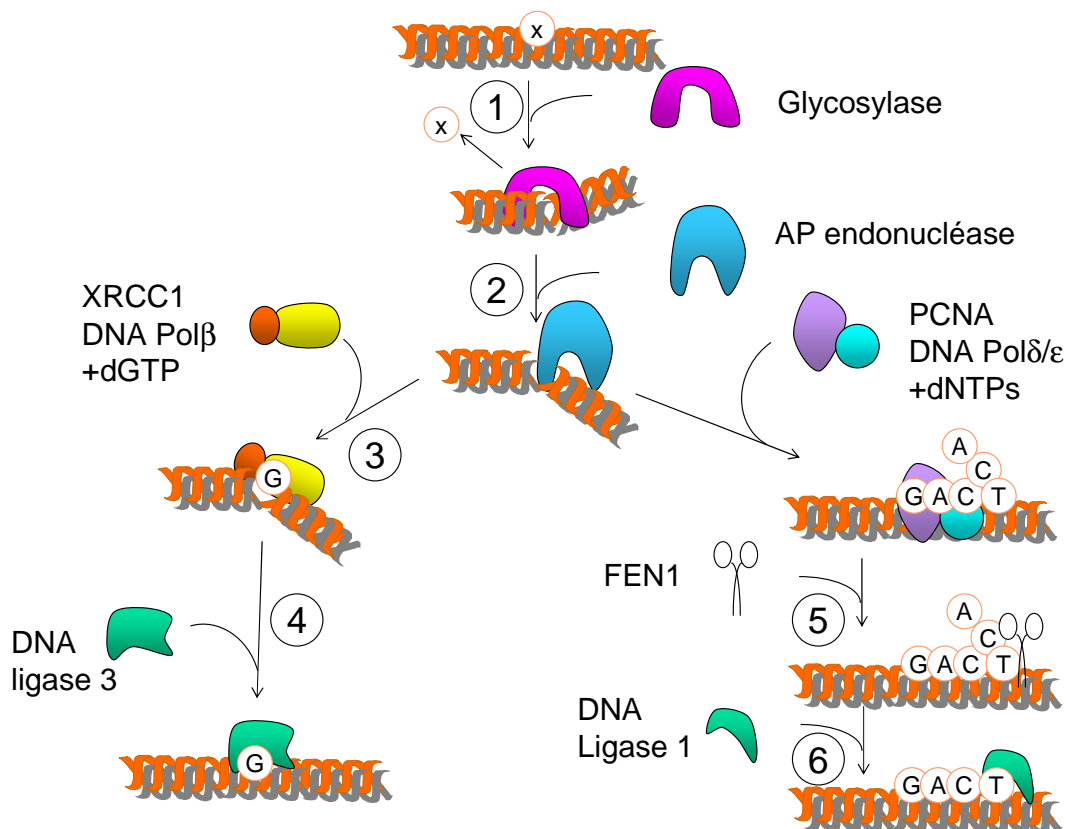


Figure 7 : Réparation de bases endommagées par le mécanisme de réparation par excision de base (BER).

(1) La glycosylase (fuchsia) va détecter et exciser la base endommagée et cliver en 3' du site abasique. (2) L'endonucléase clive en 5' du site abasique. (3) et (5) Les ADN polymérases incorporent les bases manquantes. (4), (5) et (6) Les protéines ligases referment les brèches.

La mort cellulaire programmée : l'apoptose

Lorsque le nombre et/ou la gravité de lésions sont trop élevés pour qu'elles soient réparées, le processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose, est engagé. L'apoptose permet de détruire la cellule sans répandre son contenu vers l'extérieur et ainsi risquer de déclencher une forte réponse inflammatoire dans un tissu par exemple. L'apoptose est, contrairement à la nécrose, une mort organisée des cellules aboutissant à la fragmentation de l'ADN ainsi qu'à la condensation du cytoplasme et à la formation de corps apoptotiques (Kerr et al. 1972).

L'apoptose peut emprunter plusieurs voies (Figure 8). Deux voies (intrinsèque et extrinsèque) sont caractérisées de caspase-dépendantes car elles font intervenir des caspases (cystéinyl aspartyl protéases). Ces protéases sont activées par clivage protéolytique de protéines précurseurs, les pro-caspases, et permettent de cliver spécifiquement de nombreuses protéines cellulaires. La première voie caspase dépendante est la voie intrinsèque ou 'voie de l'apoptosome' qui met en jeu la mitochondrie. La deuxième voie est la voie extrinsèque activée par les récepteurs de mort. Il existe également une autre voie apoptotique qui se déroule sans l'intervention des caspases, dont l'acteur principal est le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor).

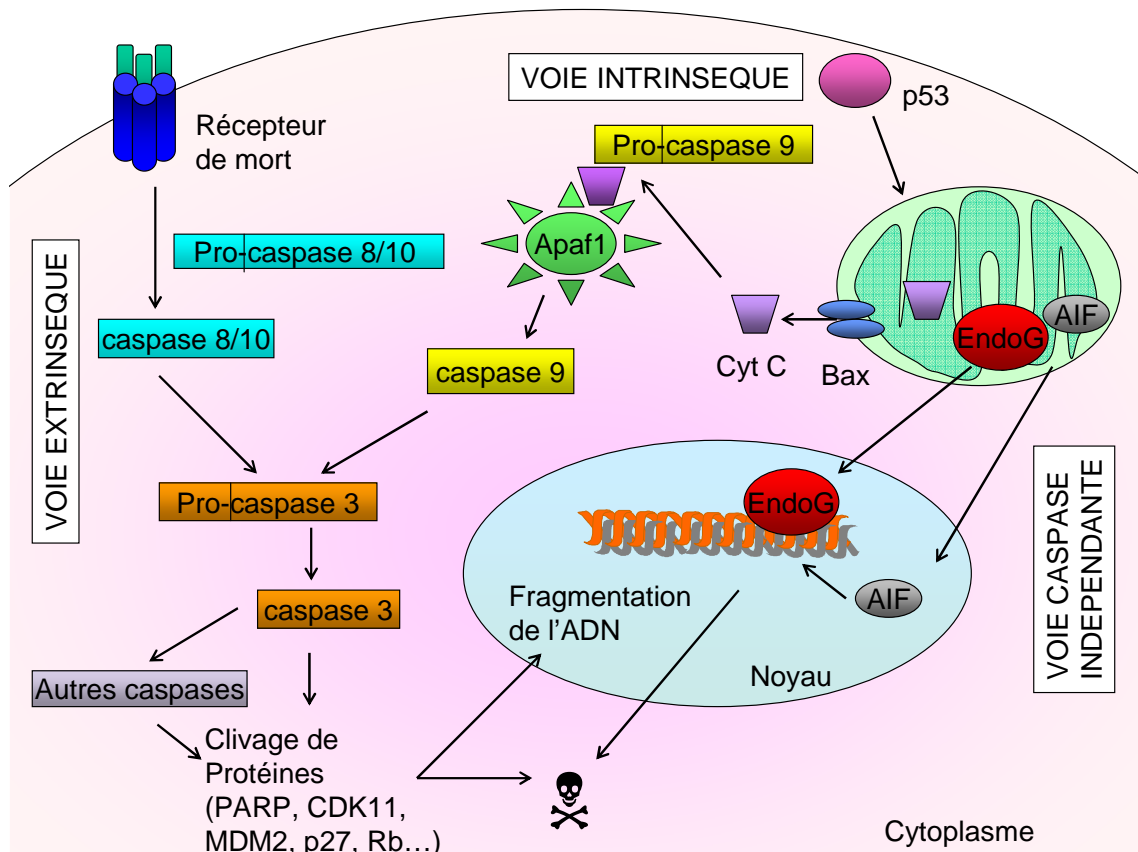


Figure 8 : Les voies apoptotiques.

Les 3 voies apoptotiques sont représentées sur le schéma. La voie intrinsèque dépendante des caspases (en haut) implique l'apoptosome assemblé grâce au cytochrome C relargué de la mitochondrie, et active la caspase 9. La voie extrinsèque dépendante des caspases (à gauche) implique les récepteurs de mort et entraîne l'activation des caspases 8/10. La voie caspase indépendante (à droite) entraîne la translocation d'AIF et de l'endonucléase G (endoG) de la mitochondrie au noyau.

- Les voies de l'apoptose dépendantes des caspases

Voie intrinsèque

La protéine p53, est l'acteur clé de la signalisation apoptotique (Figure 9). Elle est capable d'activer plusieurs voies, mais active principalement la voie intrinsèque. L'activation de p53 est contrôlée par la protéine kinase ATM qui phosphoryle, directement ou indirectement (par CHK1/2), la protéine p53 et/ou le facteur Mdm2 (Murine double minute 2). Le facteur Mdm2 est un antagoniste de p53, agissant d'une part en l'ubiquitinylant, ce qui entraîne sa dégradation, et d'autre part en bloquant son activité transcriptionnelle (Moll and Petrenko 2003). La phosphorylation de p53 et/ou de Mdm2 active p53 par trois mécanismes : (1) la stabilisation de p53 par la dissociation du complexe p53/Mdm2, (2) la régulation directe de son activité transcriptionnelle et (3) sa localisation nucléaire (Jin and Levine 2001).

La protéine p53 peut également être activée, en réponse à des radiations ionisantes, par la DNA-PK. Des cellules de souris DNA-PK $-/-$ sont ainsi incapables d'induire la phosphorylation de la p53 normalement induite lors de l'apoptose (Yang et al. 2003).

L'apoptose induite par p53 peut être dépendante ou indépendante de son activité de transcription. L'activation du facteur de transcription p53 entraîne l'expression de plusieurs facteurs apoptotiques directement impliqués dans la voie intrinsèque comme, par exemple, Bax (Bcl2 Associated X protein), Noxa ou p53AIP1 (p53 regulated Apoptosis Inducing Protein 1) (Moll and Zaika 2001).

La protéine p53 peut induire l'apoptose de manière indépendante de son activité de transcription (Yan et al. 1997; Gao and Tsuchida 1999). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique ne suffit pas à empêcher l'apoptose induite, alors que la protéine p53 reste

indispensable. Bien que cette voie soit encore peu connue, il semble qu'elle requiert certaines caspases (Ding et al. 2000; Moll and Zaika 2001).

L'apoptose induite par la voie intrinsèque peut également être activée par la protéine p73, un homologue de p53. Ainsi, la protéine ATM phosphoryle c-abl qui active par phosphorylation p73, qui est une protéine pro-apoptotique (Wang 2000). Bien que les mécanismes par lesquels p73 induit l'apoptose ne soient pas bien connus, il a été montré que la protéine p73 est capable d'induire la synthèse de protéines de la voie intrinsèque comme Bax et PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) (Melino et al. 2004). La protéine c-abl peut également être activée par la voie JNK (c-jun N-terminal Kinase) et MAPKp38 (Kharbanda et al. 1998).

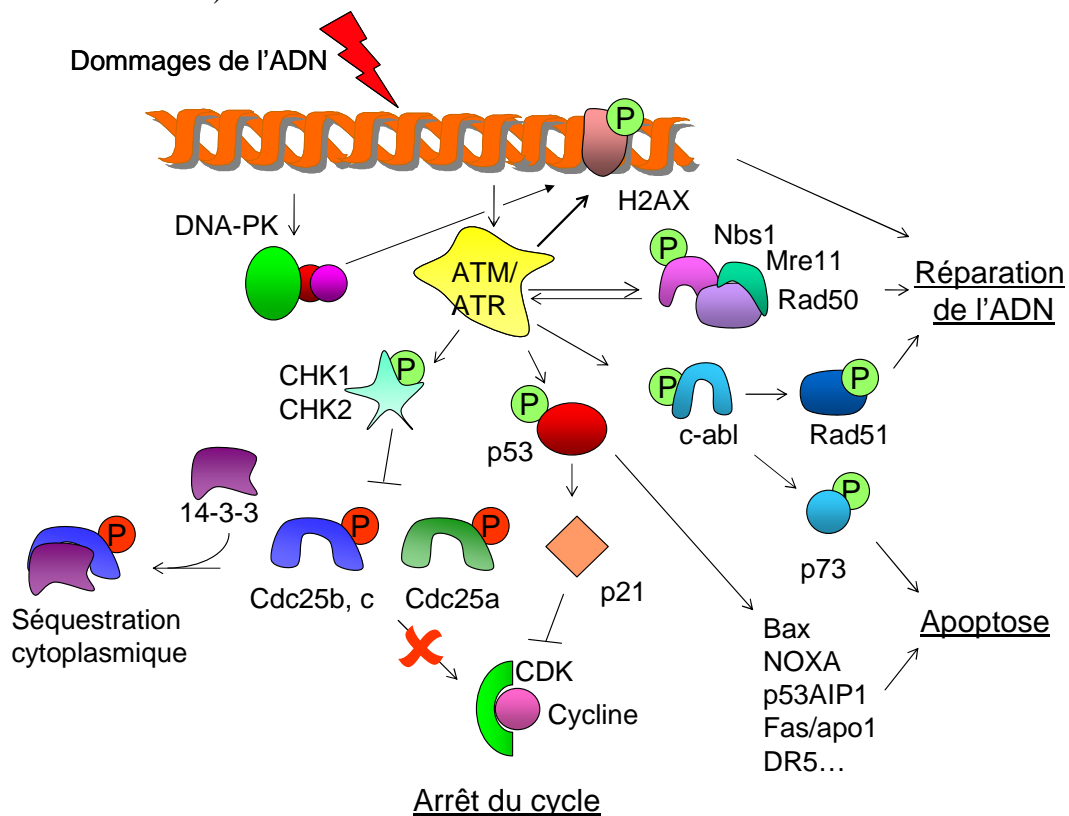


Figure 9 : Points de surveillance et apoptose.

Les kinases ATM/ATR peuvent réguler différentes protéines impliquées dans la mise en place de l'apoptose en les activant (vert) ou en les inhibant (rouge) par phosphorylations.

Lorsque la voie intrinsèque est activée, la perméabilité de la mitochondrie est modifiée afin de permettre le relargage cytoplasmique de certaines protéines comme le cytochrome C.

En effet, le cytochrome C est libéré de la mitochondrie grâce à la formation de canaux comme par exemple le pore Bax (Antonsson et al. 2000). Bax est une protéine de la famille de Bcl-2 (B Cell Lymphoma 2) qui joue un rôle primordial dans la signalisation de l'apoptose par la voie intrinsèque. La famille des Bcl-2 comprend des facteurs pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Noxa et PUMA ou anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w et Mcl-1 (induced Myeloid leukaemia cell differentiation protein). Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 jouent leur rôle en séquestrant des protéines pro-apoptotiques comme Bax. En réponse à un stimulus apoptotique, Bax est libérée de Bcl-2 et forme un canal (sous forme de tétramère) en s'insérant dans la membrane de la mitochondrie. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome C participe à la formation de l'apoptosome en s'associant à APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) et à la pro-caspase 9, via des domaines CARD (Caspase Recruitment Domain). Le complexe multi-protéique ainsi formé, la pro-caspase 9 est clivée en caspase 9 active qui activera à son tour, par clivage de pro-domaines, des caspases effectrices comme les caspases 3 ou 7 (Slee et al. 1999).

Il existe des molécules appelées IAPs (Inhibitors of Apoptosis) capables d'inhiber l'apoptose. Par exemple, la protéine XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis) est capable de se fixer et d'inhiber l'apoptosome (Bratton et al. 2001). A l'inverse, d'autres protéines facilitent l'apoptose en inhibant les IAPs. Ainsi, la protéine Smac/DIABLO (Second mitochondria derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI) est une protéine mitochondriale synthétisée sous la forme d'un précurseur de 29 kDa, pouvant être libérée en réponse à un stimulus apoptotique et entraînant l'inhibition des IAPs par séquestration (Verhagen et al. 2000). D'autres protéines comme Omi/HtrA2 (High Temperature Requirement protein A2) ont le même mode de fonctionnement que Smac/Diablo (van Loo et al. 2002).

Voie extrinsèque

L'activation de la voie extrinsèque repose sur la stimulation des récepteurs de mort (Enari et al. 1995; Longthorne and Williams 1997). Les récepteurs de mort comprennent les récepteurs TNFR1 (récepteurs au TNF), les Fas (récepteurs aux FasL) ainsi que DR4 ou DR5 (récepteurs au TRAIL, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand). Les récepteurs de mort sont activés par la fixation de leur ligand et recrutent des protéines cellulaires dites adaptatrices. Ces protéines recrutent à leur tour les pro-caspases initiatrices (principalement les pro-caspases 8 et 10) qui sont activées par auto-clivage. Ces caspases vont ensuite cliver et activer les pro-caspases effectrices 3 et 7. Ainsi, par exemple, le récepteur Fas, le plus décrit, se lie à la protéine FADD (Fas Associated Death Domain) (Kischkel et al. 1995) et à la pro-caspase 8 lorsqu'il est activé par un complexe trimérique du ligand FasL. La formation de ce complexe (nommé DISC : Death Inducing Signaling Complex) entraîne l'auto-activation de la caspase 8.

De manière intéressante, il a été démontré que la protéine p53, principal activateur de la voie mitochondriale intrinsèque (Moll and Zaika 2001), peut également activer la voie extrinsèque, ce qui conduit à l'amplification du signal apoptotique (Roos and Kaina 2006). Ainsi la protéine p53 induit la transcription de récepteurs de mort comme Killer/DR5 (Death Receptor 5) (Wu et al. 1997) ou Fas/Apo-1 (Accumulation of Photosystem protein 1) (Owen-Schaub et al. 1995).

L'expression de protéines impliquées dans la voie extrinsèque peut être activée par d'autres protéines que p53. Ainsi des dommages, comme des pontages inter-brin de l'ADN, induisent l'activation des kinases JNK ou MAPKp38 entraînant l'expression de FasL, le ligand Fas qui induit l'apoptose par la voie extrinsèque (Brozovic et al. 2004; Roos and Kaina 2006).

Clivage de protéines par les caspases

Les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, conduisent à l'activation des caspases effectrices dont la caspase 3 (Figure 8). Les caspases clivent un large panel de protéines cellulaires : cytoplasmiques (actine, eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G), 4E-BP (eukaryotic Initiation Factor 4E-binding proteins) ...), nucléaires (lamines A et B ...), des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (PARP, ARN polymérase 1, ADN topoisomérase 1, DNA-PKcs ...), des protéines impliquées dans la transduction du signal (NF- κ B (nuclear factor-kappa B), cytokines ...), des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la prolifération (p27^{Kip1}, Rb ...) et des protéines dont le clivage a un rôle direct dans l'apoptose (caspases, protéines de la famille Bcl-2, CDK 11, DAP5 (Death Associated Protein 5) ...). Bien que le rôle du clivage caspase ne soit pas établi pour toutes les protéines, il est généralement admis que le clivage des protéines de réparation de l'ADN, de facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2) ou des protéines nucléaires comme les lamines permet l'inactivation de protéines pouvant interférer avec le mécanisme d'apoptose. D'autres protéines comme DAP5 peuvent être clivées afin d'être activées et permettre de réaliser leurs fonctions pro-apoptotiques (Earnshaw et al. 1999; Henis-Korenblit et al. 2000; Shi et al. 2003; Morley et al. 2005).

Fragmentation de l'ADN

Dans les deux voies caspase-dépendantes, la fragmentation de l'ADN se fait par l'intervention de DNases aboutissant à l'apparition de fragments nucléosomaux (oligonucléosomes) de 200 paires de bases (Wyllie 1980). Il existe trois types de DNases, les DNases de type I, actives en présence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} à pH neutre, les DNases de type II,

actives à pH acide en l'absence de cations et celles dépendantes uniquement d'un seul cation, dont le groupe le plus important est celui des DNases dépendantes du Mg^{2+} . Certains auteurs soutiennent que, parmi ces différentes enzymes, c'est la DNase I qui est l'enzyme responsable de la digestion du génome en apoptose (Stephan et al. 1996), tandis que d'autres affirment qu'il s'agit de la DNase II (Eastman 1994).

- La voie de l'apoptose indépendante des caspases

La voie apoptotique indépendante des caspases est contrôlée par le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor). AIF est une flavoprotéine synthétisée sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Lorsque la protéine parvient dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, le précurseur est clivé et cela entraîne la formation de la protéine mature de 57 kDa, appelée AIF. Lorsque l'apoptose est induite, la protéine de 57kDa est libérée de la mitochondrie (Susin et al. 1999). La protéine AIF possède une double fonction de NADPH oxydase / monodéhydroascorbate réductase, et de facteur apoptogène. Toutefois, son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique (Klein et al. 2002; Mate et al. 2002).

L'activation de la voie caspase indépendante est encore aujourd'hui mal connue. L'étape clé est le relargage dans le cytosol du facteur AIF à la suite de son clivage dans la mitochondrie. L'activation de la voie caspase indépendante repose donc sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale, et elle est donc souvent activée parallèlement à la voie intrinsèque. Ainsi, la surexpression de Bax, protéine intervenant dans la voie mitochondriale, induit également l'activation de la voie indépendante des caspases, en formant des pores membranaires (Cregan et al. 2004; Kim et al. 2005).

Un des mécanismes d'activation de la voie caspase indépendante a été décrit comme impliquant la protéine PARP-1, une enzyme nucléaire activée en réponse au stress oxydatif et aux dommages de l'ADN pris en charge par le BER. Bien que le lien entre PARP-1 et AIF, ne soit pas élucidé, la protéine PARP-1 entraînerait la formation d'un canal mitochondrial (MOMP), permettant le relargage d'AIF de la mitochondrie (Yu et al. 2002; Hong et al. 2004; Koh et al. 2005).

Après un stimulus apoptotique, AIF est libéré dans le cytoplasme, puis transloqué dans le noyau des cellules en apoptose et induit, en coopération avec des endonucléases, comme l'endonucléase G, le clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires de 50 kpb (Susin et al. 1999). L'endonucléase G est une enzyme mitochondriale codée par le génome nucléaire et son principal rôle est dans la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose des cellules de mammifères, l'endonucléase G est elle-même relarguée par la mitochondrie, transloquée vers le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (Li et al. 2001).

1-3 Cycle cellulaire, réparation de l'ADN, apoptose et cancer

Les points de surveillance de l'ADN endommagé assurent le maintien de l'intégrité du génome. Ainsi, les cellules qui échappent au contrôle des points de surveillance, soit parce qu'un mécanisme de surveillance est affecté, soit parce que l'ADN n'a pas été correctement réparé, acquièrent l'instabilité génétique qui permet, par un processus de sélection, de conduire aux tumeurs et aux cancers (Kastan and Bartek 2004; Massague 2004).

Dans une cellule en division, si un dommage n'est pas réparé, une mutation peut être introduite dans le génome. Ces défauts de réparation peuvent induire des mutations dans des gènes régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose. Ces mutations peuvent toucher des gènes codant pour des protéines comme des suppresseurs de tumeurs (régulateurs de

l'apoptose), ou toucher une région contrôlant la synthèse d'oncogènes (régulateurs du cycle cellulaire). Ainsi l'inactivation d'un suppresseur de tumeur ou la perte de régulation d'un oncogène entraînant sa surexpression, induit la perte de contrôle du cycle cellulaire amenant à un cancer (Kastan and Bartek 2004; Massague 2004).

- Mutation et réparation

Une déficience d'un mécanisme de réparation peut suffir à entraîner des mutations à la base de cancers. Dans le cas d'un système de réparation par BER déficient, une guanine oxydée conduit à une mutation GC → TA (transversion de base), liée à une mauvaise incorporation lors de la réplication (Michaels et al. 1992). De même, un déficit du NER est à la base du syndrome Xeroderma Pigmentosum (XP). Les patients XP sont déficients dans le mécanisme prenant en charge les lésions induites par les UV, et accumulent donc des mutations qui amènent très rapidement à des cancers s'ils s'exposent aux rayons (Mitchell et al. 2003). Enfin pour le NHEJ, certains patients atteints de leucémie présentent une mutation sur le gène codant pour la protéine Ligase IV et sont hypersensibles aux rayons ionisants (Jeggo et al. 1998).

De plus, certains dysfonctionnements de réparation aboutissent à des modifications génétiques par translocations, amenant à des cancers. Les translocations peuvent amener à la perte de fonction d'un suppresseur de tumeurs ou à la perte de régions régulatrices d'oncogène, et même parfois à la formation de nouveaux oncogènes. En effet, dans des leucémies myéloïdes chroniques, la liaison du chromosome 9 et 22 entraîne la synthèse d'un oncogène, la protéine c-abl-BCR par la fusion du gène BCR (Breakpoint Cluster Region) avec le gène c-abl (de Klein et al. 1982).

Dans le cas des traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques, la réparation des nombreuses DSBs engendrées peut amener à des translocations chromosomiques et à l'apparition de leucémies secondaires (van Gent et al. 2001). Ainsi, dans des cellules lymphoïdes tumorales, de nombreuses translocations impliquant les chromosomes 2, 7, 14, 22 ont été rapportées (Vanasse et al. 1999).

De manière générale, les DSBs, lorsqu'elles sont prises en charge par le NHEJ, amènent à la perte d'information génétique parfois à la base d'un défaut de régulation d'un gène.

Les principaux oncogènes et suppresseurs de tumeurs impliqués dans la cancérisation sont détaillés ci-dessous. Le processus tumoral peut aussi être le résultat d'un simple échappement apoptotique sans prolifération cellulaire, grâce à l'expression de facteurs de survie.

- Cancer et oncogènes

Dans certaines tumeurs malignes, les cyclines sont surexprimées et considérées comme des proto-oncogènes. La cycline D est surexprimée dans les cancers des poumons, du sein, gastrique et de l'œsophage (Dobashi 2005). La cycline E, indispensable à la transition G1/S, est dérégulée dans les cancers du sein et gastrique (Dobashi 2005). La cycline A est également surexprimée dans des adénocarcinomes du poumon et dans des cancers du foie (van Diest et al. 2004; Dobashi 2005).

Les protéines régulatrices des CDKs, comme les phosphatases, sont également impliquées dans certains cancers et sont même parfois à la source de la cancérisation cellulaire. La surexpression de la phosphatase Cdc25 est considérée comme un marqueur de l'agressivité de certaines tumeurs et un mauvais pronostic (Boutros et al. 2007). Les

protéines Cdc25, particulièrement les isoformes Cdc25A et Cdc25B, sont surexprimées dans des cancers du sein, des ovaires, de la prostate, des poumons, colorectaux, de l'œsophage, de la thyroïde, du larynx, gastrique, pancréatique, neuroblastique et lymphoblastique (Boutros et al. 2007). Les troubles entraînés par la protéine Cdc25 peuvent être liés à une mauvaise régulation de sa fonction. Si la protéine ne peut être dégradée par le protéasome ou séquestrée par la protéine 14-3-3 (afin d'empêcher son activité de déphosphorylation activatrice du complexe CDK-Cycline), le point de surveillance ne pourra pas être mobilisé (Bugler et al. 2006).

- Cancer et suppresseur de tumeur

Le plus connu des suppresseurs de tumeur est le facteur p53 dont la mutation est observée dans de nombreux cancers (Soussi and Lozano 2005). Des mutations dans les protéines CHK1 et CHK2 sont observées dans des cancers du colon ou des poumons (Stewart et al. 2003). Des mutations dans les gènes codant pour BRCA1 et 2, deux protéines impliquées dans la mise en place des points de surveillance, sont présentes dans de nombreux cancers (Kastan and Bartek 2004). Les patients possédant une protéine ATM mutée, souffrent de l'Ataxia Telangiectasia Mutated syndrome (ATM syndrome), c'est à dire une hypersensibilité aux rayons ionisants. Les patients NBS (Nijmegen Breakage Syndrome) possèdent une mutation sur le gène codant pour la protéine NBS1, impliquée dans la détection de dommages de l'ADN. Les patients ATM et NBS sont prédisposés aux cancers (Rotman and Shiloh 1998; Zhao et al. 2000).

- Cancer et défaut d'apoptose

Certaines tumeurs sont liées à des cellules qui ne prolifèrent pas mais échappent à la mort cellulaire, ce qui aboutit à leur accumulation dans le tissu où elles se trouvent. C'est le cas par exemple des cellules de la leucémie lymphoïdes chronique (LLC) dans lesquelles il a été observé une inhibition par phosphorylation de Bad (protéine de la famille de Bcl-2) et de la procaspase 9. Cette phosphorylation provoque l'inhibition de leur activité pro-apoptotique, en séquestrant Bad par liaison avec la protéine 14-3-3 (Franke and Cantley 1997) et en inhibant le clivage de la procaspase 9 (Cardone et al. 1998). Ces phosphorylations inhibitrices sont réalisées par la protéine Akt (protéine kinase isolée du retrovirus AKT8), elle-même activée par la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase), toutes deux impliquées dans l'équilibre prolifération/apoptose (Barragan et al. 2002).

Les facteurs de traduction sont de véritables oncogènes/suppresseurs de tumeurs, et peuvent conduire à une perte de régulation du cycle cellulaire, et donc à la cancérisation. L'implication de ces facteurs dans la régulation du cycle cellulaire a fait l'objet de nombreuses études, amenant l'idée d'une régulation fine et complexe, indispensable à la physiologie cellulaire et aux réponses mises en place lors de stress.

Ainsi, la partie suivante met en avant le rôle clé des facteurs de traduction dans les mécanismes de cycle cellulaire et de mise en place des points de surveillance.

2 La traduction

2-1 Etape clé de la régulation de l'expression des gènes

La molécule d'ADN est la molécule de base du vivant portant l'information génétique indispensable à l'expression des caractères d'un être vivant. Le niveau de régulation de l'expression de la molécule d'ADN est fonction de la complexité de l'être vivant qui contient cette information. Les eucaryotes ont ainsi acquis au cours de l'évolution un noyau (contrairement aux procaryotes), qui permet une étape supplémentaire dans la régulation des ARN messagers par excision de certains domaines appelés exons : l'épissage. L'expression des gènes dans les organismes eucaryotes est schématisée sur la figure 10. La première étape est la transcription, qui permet la synthèse à partir de la molécule d'ADN, d'un messenger intermédiaire, l'ARN transformé en ARN messenger après l'étape d'épissage, de polyadénylation et d'acquisition d'une coiffe m⁷GTP (7-methyl guanosine tri-phosphate). L'ARN messenger est alors transporté dans le cytoplasme, contenant la machinerie de traduction, pour être traduit. Les protéines ainsi synthétisées peuvent ensuite être modifiées de manière post-traductionnelle, afin de stabiliser la protéine, d'entraîner sa dégradation ou encore de permettre son activation ou son interaction avec d'autres partenaires. Ces modifications peuvent être très variées, il peut s'agir de glycosylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation... Toutes ces étapes conduisent à la régulation de l'expression et de la fonction des protéines.

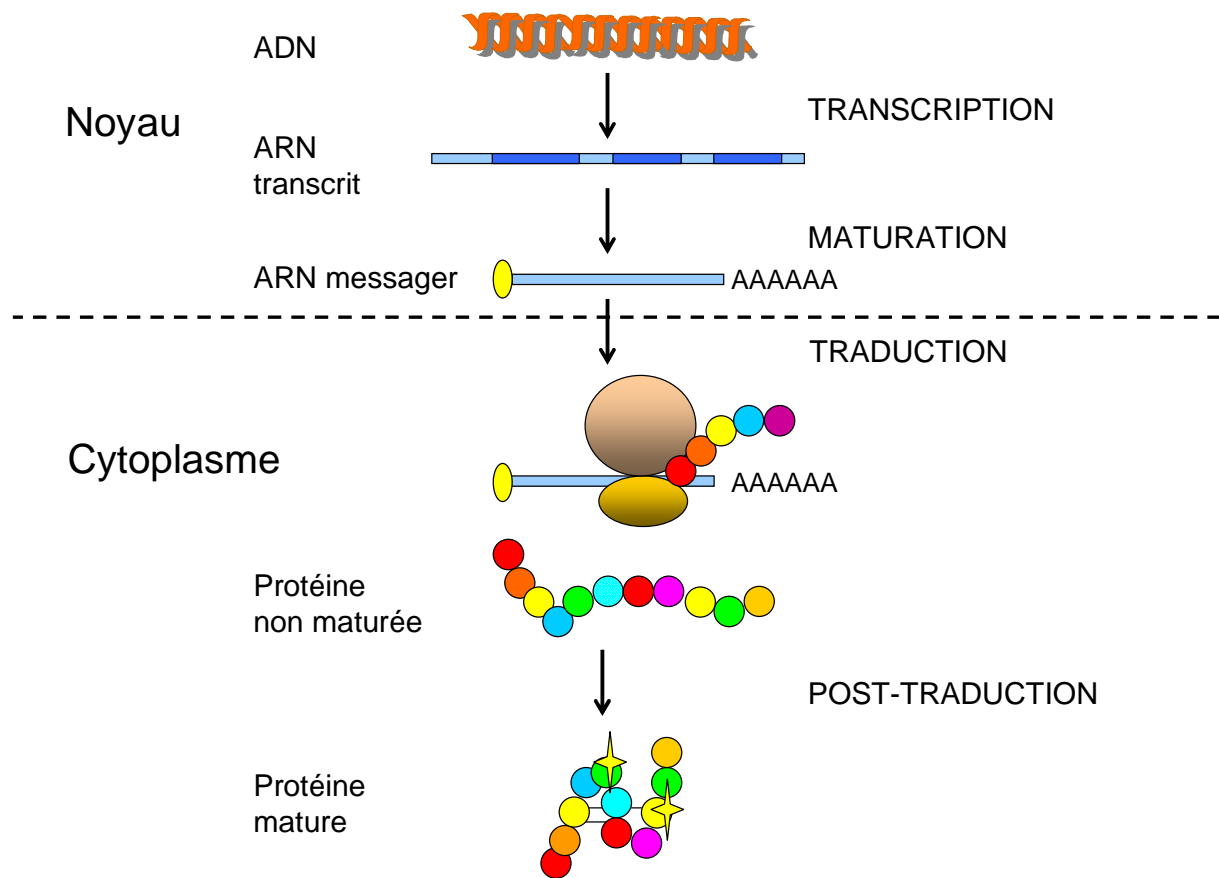


Figure 10 : Etapes de la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes.

Dans le noyau, l'ADN (orange) est transcrit (bleu clair / bleu foncé). Le transcrit est mûré par retrait des séquences introniques (bleu foncé), ajout de la coiffe (jaune) et de la queue polyA (AAAAAA) et forme l'ARN messenger (bleu clair). L'ARN messenger est transloqué dans le cytoplasme pour être traduit et donner naissance à la séquence peptidique correspondante (disques colorés). Les protéines sont ensuite mûrées (repliement + étoiles).

2-2 Les étapes de la traduction

La traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines fait intervenir un nombre important de facteurs (ribosomes, ARN de transfert (ARNt), synthétases, facteurs de traduction), impliqués dans trois phases distinctes. La phase d'initiation de la traduction permet le recrutement du ribosome sur l'ARNm et la mise en place du premier acide aminé de la future chaîne peptidique, la méthionine de départ. L'ajout des acides aminés, succédant à la méthionine initiatrice, est réalisé au cours de l'élongation de la traduction, catalysée par les

facteurs d'élongation eEF1 et eEF2 (eukaryotic Elongation Factor). La synthèse de la protéine se termine lors de la reconnaissance d'un codon terminateur (codon stop) sur l'ARNm par les protéines de terminaison de la traduction eRF1, eRF2 et eRF3 (eukaryotic Releasing Factors).

Le travail réalisé au cours de cette thèse se focalisant sur les facteurs d'initiation de la traduction, seule cette étape sera détaillée.

2-3 L'initiation de la traduction

Tous les ARNm eucaryotes (Gebauer and Hentze 2004) possèdent une extrémité 5' non traduite (5'UTR), un cadre ouvert de lecture correspondant à la séquence codant pour la protéine (ORF : Open Reading Frame) et une extrémité 3' non traduite (3'UTR) se finissant par une succession de résidus adénine (queue poly A). La région 5'UTR est le domaine du messenger où a lieu, dans la plupart des cas, le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction (Figure 11). Cette région contient différentes structures ou séquences sur lesquelles viennent se fixer les facteurs d'initiation : une coiffe m⁷GTP à l'extrémité du domaine 5' UTR ou une séquence interne (IRES : Internal Ribosome Entry Site).

L'initiation de la traduction est un phénomène hautement régulé. Cette régulation peut se faire par des structures secondaires (épingles à cheveux) empêchant l'initiation des messagers, par des séquences spécifiques d'ancrage pour certains facteurs régulateurs, par une structure uORF (détaillé plus bas) ou encore par des micro ARN (miRNAs) qui peuvent s'hybrider sur des séquences spécifiques souvent situées en 3'UTR (Gebauer and Hentze 2004) et inhiber la traduction du messenger (Figure 11). Les messagers peuvent également être régulés par polyadénylation, afin d'obtenir un modèle en boucle permettant la stabilisation du complexe d'initiation.

Dans cette partie, la régulation des facteurs d'initiation (eIF, eukaryotic Initiation Factors) ainsi que l'initiation de messagers spécifiques dans des contextes physiologiques particuliers sont détaillées.

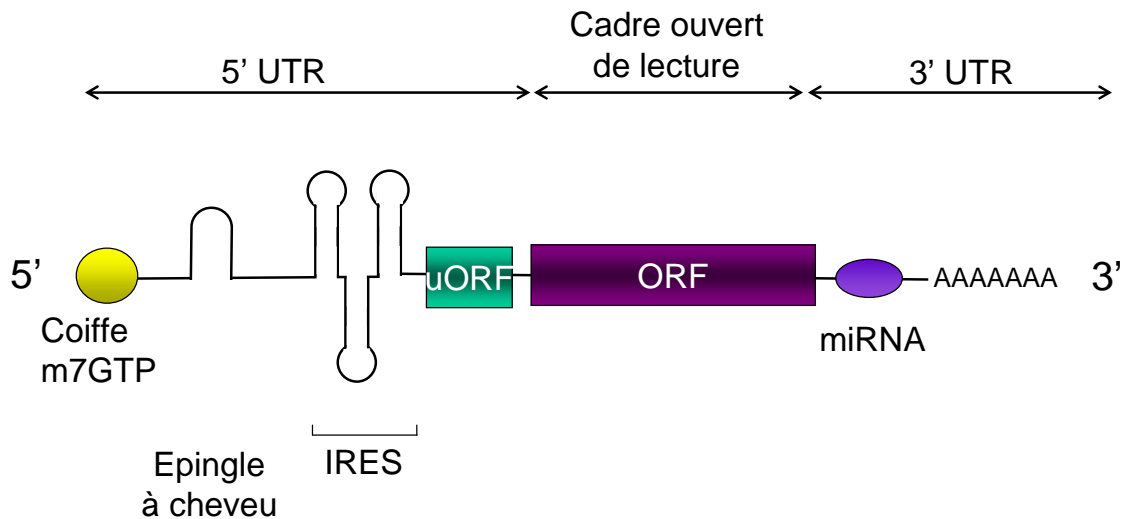


Figure 11 : Structure de l'ARN messenger mature.

L'ARN messenger mature peut contenir une coiffe (jaune), une séquence uORF (vert), un cadre de lecture ORF (violet), une séquence d'ancrage de miRNA (violet clair), une queue polyA en 3' ainsi qu'une séquence IRES ou des épingles à cheveux en 5'UTR.

Initiation dépendante de la coiffe

Observée pour une large majorité des ARN messagers (Holcik and Sonenberg 2005), l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe est un processus complexe (Figure 12). (1) La structure de la coiffe de l'ARNm interagit avec la protéine eIF4E qui forme un complexe ternaire stable avec les protéines eIF4A et eIF4G, appelé le complexe eIF4F. (2) La protéine eIF4A est une ARN hélicase, de la famille des DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp protein), qui permet de dérouler les structures secondaires de la région 5'UTR du messenger, avec l'aide du facteur eIF4B. La protéine eIF4G est une protéine qui permet de structurer le complexe eIF4F. La protéine eIF4G est capable de s'associer avec des protéines se fixant à la queue poly A,

comme PABP (Poly(A) Binding Protein), formant ainsi le modèle en boucle stabilisant la formation du complexe et facilitant la réutilisation des ribosomes (Derry et al. 2006). (3) Un complexe ternaire contenant la protéine eIF2 sous sa forme active, c'est à dire liée au GTP (Guanosine TriPhosphate) et à l'aminoacyl-tRNA de départ (Roll-Mecak et al. 2004), se fixe sur la sous unité ribosomale 40S, avec les protéines eIF3, eIF1 et eIF1A, pour former le complexe de pré-initiation 43S. (4) Le complexe de pré-initiation se lie à eIF4F et eIF4B et forme le complexe 48S qui scanne le messenger jusqu'au codon initiateur (AUG). (5) La reconnaissance du codon initiateur déclenche l'hydrolyse de GTP par eIF2 (Kapp and Lorsch 2004) catalysée par eIF5 (Unbehaun et al. 2004) et permet la dissociation des facteurs d'initiation. (6) La fixation de la sous unité 60S nécessite l'intervention de la protéine eIF5B et permet la formation du ribosome complet (80S). L'échange de GDP/GTP sur la protéine eIF2 est réalisé par la protéine eIF2B, et est nécessaire pour réactiver eIF2.

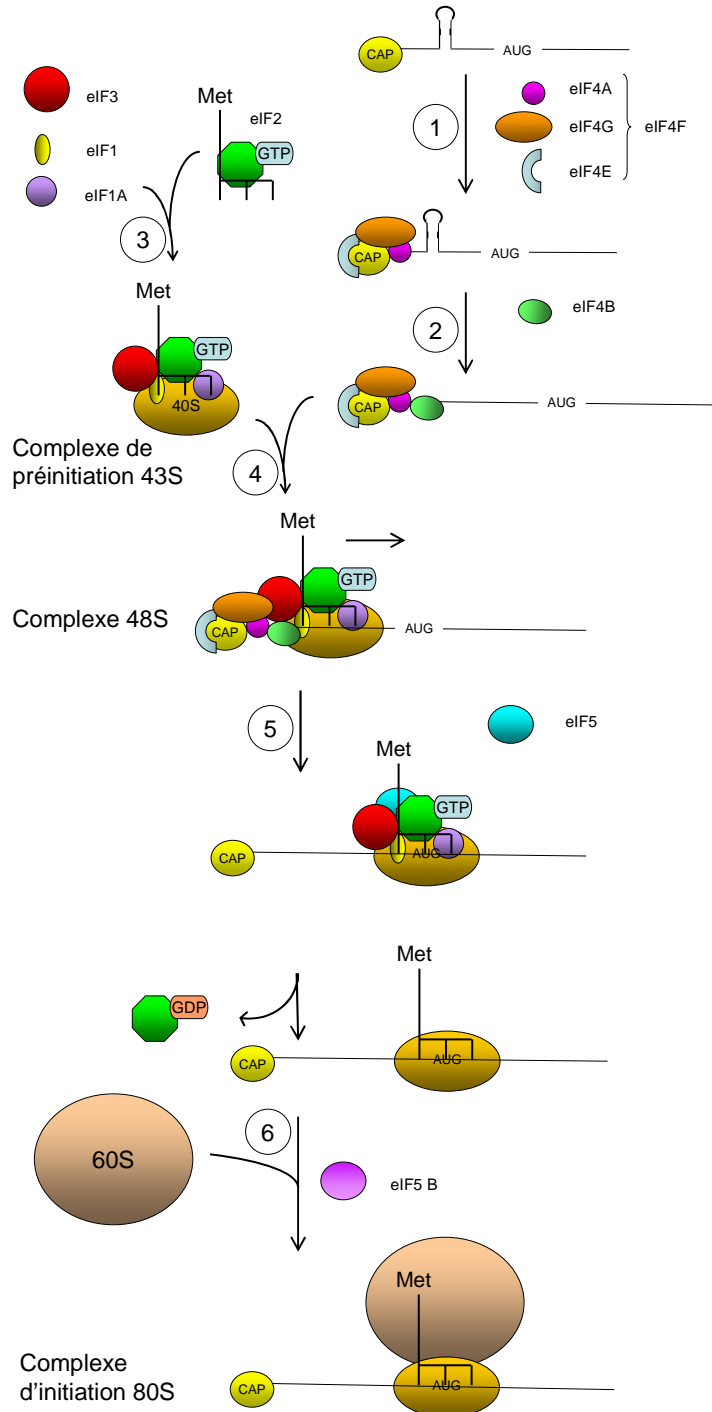


Figure 12 : Initiation dépendante de la coiffe.

Implication des facteurs de la traduction au cours de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe.

Régulation de la synthèse protéique dépendante de la coiffe

La synthèse protéique dépendante de la coiffe est régulée à toutes les étapes de l'initiation de la synthèse. L'assemblage du complexe eIF4F peut être bloqué par une protéine inhibitrice de la traduction 4E-BP (4E Binding Protein), pour protéine se liant à eIF4E (Figure 13). Chez les mammifères trois 4E-BPs ont été identifiées, les mieux caractérisées sont les protéines 4E-BP1 et 4E-BP2. Ces dernières sont capables de s'associer avec la protéine eIF4E, empêchant ainsi la protéine eIF4G de se fixer par inhibition compétitive (même site de liaison). Toutefois, un inhibiteur compétitif de eIF4G (inhibant sa liaison avec eIF4E) n'empêche pas la liaison de 4E-BP1 à eIF4E, démontrant une spécificité de liaison des partenaires de eIF4E (Moerke et al. 2007). La liaison de 4E-BP1 et 4E-BP2 à eIF4E est régulée par phosphorylation chez les mammifères (Pause et al. 1994). Chez les embryons d'oursin (Salaun et al. 2003) et de drosophile (Teleman et al. 2005; Tettweiler et al. 2005), la protéine 4E-BP est également régulée au niveau de son expression. La protéine 4E-BP1 peut être phosphorylée par des kinases de la famille des PI3K comme la kinase FRAP/mTOR (Hara et al. 1997; Burnett et al. 1998; Gingras et al. 1998; Yang et al. 1999) ou par la kinase ATM (Yang and Kastan 2000). Cette phosphorylation est un mécanisme complexe et hiérarchisé. Elle fait intervenir plusieurs sites de phosphorylation sur 4E-BP1 et cela dans un ordre précis. Chez les mammifères, la phosphorylation des thréonines 37 et 46 est nécessaire mais non suffisante pour la libération d'eIF4E. Il semble en effet que la phosphorylation d'autres sites soit requise pour dissocier eIF4E de 4E-BP1 (Gingras et al. 1999). Cette phosphorylation supplémentaire se situe au niveau de la thréonine 70 et de la sérine 65 et peut être inhibée par la rapamycine dans des cellules stimulées à l'insuline (Proud 2006). Enfin, la protéine 4E-BP1 est phosphorylée, en réponse à l'insuline, sur la sérine 111 par la kinase ATM (Yang and Kastan 2000). La protéine 4E-BP1 possède une constante d'affinité pour eIF4E qui est forte lorsqu'elle est sous forme hypophosphorylée, et faible lorsqu'elle est

hyperphosphorylée (Fadden et al. 1997; Gingras et al. 1998; Marcotrigiano et al. 1999). La protéine 4E-BP1 ne présente toutefois pas de structure tridimensionnelle figée, et est le premier exemple de protéine qui peut se lier à un partenaire et être fonctionnelle sans avoir de structure tridimensionnelle définie (Matsuo et al. 1997; Fletcher et al. 1998).

L'expression de la protéine 4E-BP1 est régulée, dans des cellules hématopoïétiques humaines traitées au PMA (phorbol 12-myristate 13 acetate), par le facteur de transcription Egr-1 (Early Growth Response protein 1) qui se fixe sur la région promotrice du gène codant pour 4E-BP1 et inhibe son expression. L'expression de Egr-1 est régulée, dans ces cellules, par l'activation des protéines ERK et MAPKp38 (Rolli-Derkinderen et al. 2003).

Un niveau de régulation existe également pour la protéine eIF4E, car elle est phosphorylée sur la sérine 209 par la kinase Mnk1 (MAP Kinase-interacting protein) lorsque celle-ci est activée par la protéine MAPKp38 et par ERK (Waskiewicz et al. 1997; Pyronnet et al. 1999; Ueda et al. 2004). La phosphorylation sur la sérine 209 a pour effet de modifier l'affinité de la protéine eIF4E pour la coiffe, bien que la forme la plus affine soit encore aujourd'hui très discutée. En effet, une première étude a montré que la phosphorylation de eIF4E augmente son affinité pour des analogues de la coiffe (Minich et al. 1994), mais des études plus récentes démontrent que la phosphorylation de eIF4E réduit son affinité pour des ARN messagers coiffés (Scheper et al. 2002; Zuberek et al. 2003).

Le complexe protéique eIF2 peut également réguler l'initiation de la synthèse protéique grâce à une de ses sous unités, eIF2 α . En effet, le complexe eIF2 qui permet l'apport de l'ARNt porteur de la méthionine de départ, est composé de trois sous unités protéiques, eIF2 α , eIF2 β et eIF2 γ . La phosphorylation de eIF2 α augmente l'affinité de eIF2 pour son facteur d'échange de GTP/GDP, le complexe eIF2B. Ainsi, eIF2 séquestre eIF2B en formant un complexe, ce qui entraîne une inhibition de la recharge de GTP de eIF2 α et donc l'inhibition de la traduction. La sous unité eIF2 α peut être phosphorylée par différentes

kinases telles que la PKR (double-stranded RNA-dependent Protein Kinase), PERK (Pkr-like Endoplasmic Reticulum Kinase), GCN2 (General Control Non-derepressible-2), ou HRI (Haem Regulated Inhibitor kinases) (Holcik and Sonenberg 2005).

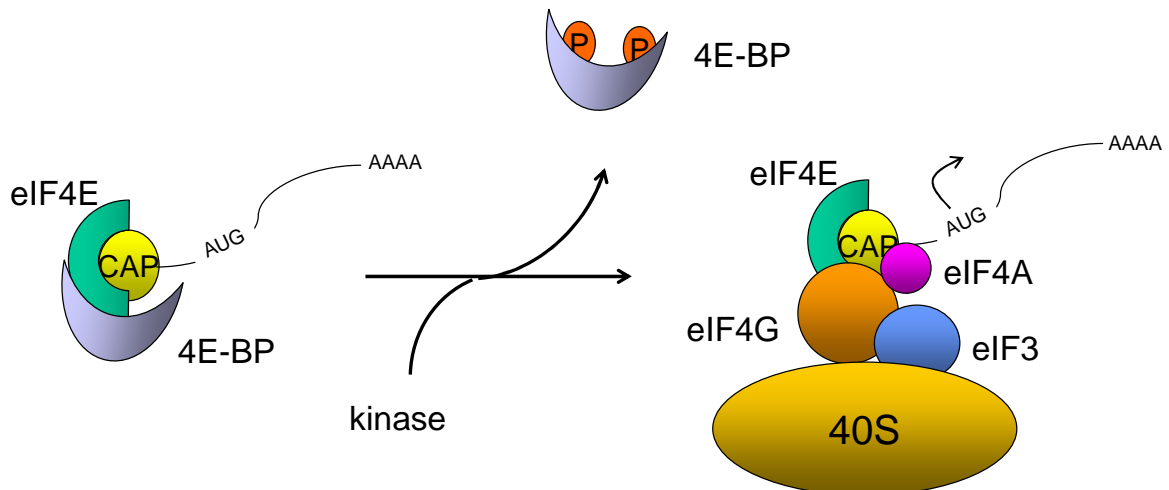


Figure 13 : Régulation de l'initiation dépendante de la coiffe.

La protéine 4E-BP (violet) est capable de s'associer à eIF4E (vert) lorsqu'elle est sous forme hypophosphorylée. La phosphorylation de 4E-BP libère eIF4E qui s'associe à eIF4G (orange) et permet le recrutement des protéines eIF3 (bleu), eIF4A (rose) et la sous unité 40S du ribosome (jaune-orangé).

Initiation par une séquence IRES

Certaines séquences présentes sur le messager permettent le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe (Figure 14). Ces séquences particulières sont appelées IRES et permettent une traduction spécifique de certains messagers au cours de processus physiologiques ou pathologiques. En effet, la synthèse protéique indépendante de la coiffe est utilisée lors de conditions physiologiques particulières, durant une infection virale, un stress, au cours du cycle cellulaire ou de l'apoptose par exemple (Sarnow 1989; Johannes and Sarnow 1998; Johannes et al. 1999; Clemens 2001; Qin and Sarnow 2004). Les séquences IRES sont la plupart du temps observées dans la région 5'UTR de l'ARNm ou parfois même dans la région codant (ORF) pour la protéine. A ce jour, il existe

85 IRES cellulaires et 39 IRES virales connues (Baird et al. 2006), dont la liste est disponible sur le web (<http://ifr31w3.toulouse.inserm.fr/IRESDatabase/>). Les séquences IRES virales ne présentent pas d'homologie de séquence mais ont des structures très conservées. Les IRES cellulaires ne présentent ni d'homologie de séquence ni d'homologie de structure, ce qui rend impossible toute prédiction. Cela implique une analyse individuelle de chaque IRES à l'aide de messagers bicistroniques rapporteurs. La traduction IRES est très spécifique puisque chaque ARNm traduit spécifiquement détient une séquence unique permettant le recrutement de facteurs spécifiques (Baird et al. 2006). En effet, pour être reconnues, les structures IRES nécessitent l'intervention d'ITAF (IRES transactivating factors). Ce sont des protéines se liant à l'ARN (RNA binding protein) qui reconnaissent les structures et se fixent sur les séquences IRES. Les ITAFs permettent le recrutement de facteurs d'initiation et du ribosome sur le messenger. Il existe un grand nombre d'ITAFs (listés également sur le site internet) faisant, pour la plupart, partie de la famille des hnRNPs (Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProteins).

Le recrutement et l'implication des facteurs d'initiation de la traduction dans l'initiation de séquences IRES sont moins bien caractérisés que dans le cas de l'initiation dépendante de la coiffe. Il est démontré que les facteurs eIF4G et DAP5, un homologue de eIF4G, stimulent la traduction IRES lorsqu'ils sont clivés (Henis-Korenblit et al. 2002), et permettent le recrutement des protéines eIF4A et eIF3. La protéine eIF3 apporte la sous unité ribosomale 40S (Lamphear et al. 1995). L'initiation de la traduction au niveau de séquences IRES peut impliquer, pour des messagers du picornavirus, le recrutement du complexe de pré-initiation 43S (Pestova et al. 1996) ou engager directement la sous unité 40S du ribosome, dans le cas des messagers du virus du criquet (Wilson et al. 2000). Les IRES peuvent permettre l'initiation de la synthèse protéique au niveau d'un codon AUG ou non-AUG (Jan 2006) et ne requièrent donc pas forcément la protéine eIF2. Pour l'initiation au niveau des

séquences IRES cellulaires, la phosphorylation inhibitrice de la protéine eIF2 α a pu être observée lorsque des messagers étaient traduits par l'intermédiaire d'IRES (Tinton et al. 2005).

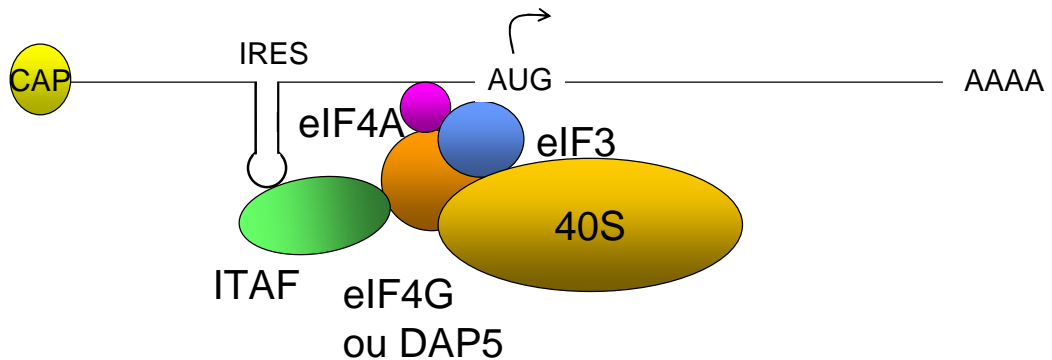


Figure 14 : Facteurs de traduction impliqués dans l'initiation dépendante de séquence IRES.

Les séquences/structures IRES sont reconnues par des ITAFs (vert) entraînant le recrutement des protéines eIF4G ou DAP5 (orange), eIF3 (bleu), eIF4A (rose) et la sous unité 40S du ribosome (jaune-orangé).

2-4 Initiation de la traduction et cycle cellulaire

Les facteurs de traduction jouent un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire. La synthèse protéique est indispensable pour l'expression de messagers codant pour des protéines régulant le cycle comme par exemple les cyclines (Cao and Richter 2002; Salaun et al. 2003). L'activité de synthèse globale des protéines est beaucoup plus faible durant la mitose que pendant l'interphase (Bonneau and Sonenberg 1987). La synthèse protéique en mitose est finement régulée et permet l'expression de messagers spécifiques (Pyronnet and Sonenberg 2001). Ces régulations sont présentées ici.

Synthèse spécifique

La surexpression artificielle de la protéine 4E-BP1 non-phosphorylable dans des cellules MCF7 (cellules de cancers du sein) entraîne la surexpression de p27^{Kip1} et la répression de l'expression de la cycline D1 (Jiang et al. 2003). Le messenger de la protéine p27^{Kip1} est traduit spécifiquement grâce à une séquence IRES dans la région 5'UTR (Miskimins et al. 2001). La protéine p27^{Kip1} ainsi traduite se lie à la protéine CDK2 et inhibe son activité, ce qui induit l'arrêt du cycle.

La dissociation de la protéine eIF4E de ses inhibiteurs est nécessaire à la synthèse de cycline B et donc au déroulement du cycle cellulaire dans l'embryon de xénope et d'oursin (Cao and Richter 2002; Salaun et al. 2003).

La traduction spécifique de messagers initiée par le biais d'une séquence IRES est très importante pour la régulation et la mise en place du cycle cellulaire. La protéine kinase PITSLRE possède une séquence IRES dans l'ORF codant pour la p110^{PITSLRE} (CDK11). La protéine p110^{PITSLRE} est impliquée dans l'épissage des pré-messagers et dans la régulation de la transcription (Trembley et al. 2002). Lors de l'entrée en mitose, le messenger est initié au niveau de la séquence IRES et permet la synthèse de la p58^{PITSLRE} alors que p110^{PITSLRE} n'est pas traduit (Cornelis et al. 2000). La protéine p58^{PITSLRE} est impliquée dans la formation des centrosomes et du fuseau mitotique (Petretti et al. 2006).

La protéine 14-3-3 σ régule la traduction en mitose en interagissant avec le facteur eIF4B (Wilker et al. 2007). L'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe et la stimulation de la traduction IRES dépendante en mitose ne sont pas observées dans des cellules déficientes pour la protéine 14-3-3 σ . Ainsi, des protéines régulées en mitose par des séquences IRES, comme p58^{PITSLRE} ne sont plus traduites causant ainsi des problèmes de cytokinèse (Wilker et al. 2007).

L'ornithine décarboxylase (ODC), est une enzyme clé dans la biosynthèse des polyamines, nécessaire à l'entrée en phases S et M du cycle cellulaire (Childs et al. 2003). L'initiation de la traduction du messenger de l'ODC se fait de manière très faible par la voie dépendante de la coiffe car son extrémité 5'UTR très structurée empêche la fixation et le scanning du ribosome (Manzella and Blackshear 1990). A la transition G2/M, l'initiation de la traduction du messenger codant pour l'ODC se fait par la voie indépendante de la coiffe, par la liaison de la sous unité 40S du ribosome sur une séquence IRES en 5' UTR du messenger (Pyronnet et al. 2000).

La synthèse de l'ODC et de p58^{PITSLRE} est observée en mitose lorsque la protéine eIF2 α est fortement phosphorylée. Il a été démontré, dans des cellules surexprimant artificiellement la PKR, que la phosphorylation de eIF2 α provoque l'augmentation de la synthèse de ces messagers (Tinton et al. 2005).

Synthèse globale

La protéine 4E-BP1 semble jouer un rôle important dans l'inhibition de synthèse protéique globale en mitose bien que cela soit discuté. Les différents résultats obtenus peuvent s'expliquer par la position différente des cellules dans le cycle (début ou fin de phase M).

En effet, une première étude montre que la protéine 4E-BP1 est un des substrats du complexe CDK1-cycline B, actif en phase M, et est phosphorylée sur la sérine 65 et la thréonine 70. Ces phosphorylations empêchent la protéine 4E-BP1 de se lier à eIF4E, permettant ainsi la traduction dépendante de la coiffe. Les auteurs proposent que la phosphorylation de 4E-BP1 par CDK1-cycline B serait présente en fin de phase M, afin de permettre une augmentation de synthèse protéique et l'entrée en G1 (Heesom et al. 2001).

Une deuxième étude indique que 4E-BP1 est sous forme hypophosphorylée en entrée de mitose, empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F, et donc l'initiation de la synthèse protéique dépendante de la coiffe. De plus, la kinase Mnk1 liée à eIF4G ne peut plus phosphoryler la protéine eIF4E séquestrée par 4E-BP1. Cette dernière étude permettrait de donner une première explication à la baisse de la synthèse protéique globale en mitose, associée à une baisse de la synthèse protéique dépendante de la coiffe (Pyronnet et al. 2001). Cette étude montre également que la protéine eIF4G2 est hyperphosphorylée lors de l'entrée en mitose, ce qui pourrait contribuer à la dissociation de eIF4E du complexe eIF4F.

D'autres auteurs montrent que l'utilisation de Paclitaxel, provoquant l'accumulation de cellules arrêtées en G2/M, induit une hyperphosphorylation de 4E-BP1 entraînant la formation du complexe eIF4E-eIF4G. L'hyperphosphorylation de 4E-BP1 est sous la dépendance de l'activité de CDK1 (Greenberg and Zimmer 2005).

La traduction du messenger codant pour la cycline D1, protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire lors du passage G1/S, est augmentée lorsque la protéine eIF4E est artificiellement surexprimée (Shantz et al. 1994; Rousseau et al. 1996). Cette augmentation n'est toutefois pas due à l'augmentation d'une initiation dépendante de la coiffe mais au rôle de transport de la protéine eIF4E. En effet, eIF4E permet le transport du messenger de la cycline D1 dans le cytoplasme, ce qui entraîne sa traduction (Rousseau et al. 1996).

Le complexe multiprotéique eIF3 est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire : chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une mutation de la sous unité p110 de eIF3 (homologue de p170 humain) entraîne le blocage, chez un mutant thermosensible, du cycle cellulaire en G1 (Kovarik et al. 1998). La sous unité moe 1 de eIF3 (homologue de p66 humain) interagit chez *Schizosaccharomyces pombe* avec Scd1 (Shape and conjugation deficiency 1) (Chen et al. 1999), un effecteur de Ras, suggérant ainsi son implication dans la

voie de transduction mitogénique. L'homologue humain p39 de eIF3 chez *Schizosaccharomyces pombe* (sum1 : suppressor of uncontrolled mitosis 1) est impliqué dans la progression du cycle cellulaire de la phase S du cycle à la phase G2/M (Humphrey and Enoch 1998) en interagissant avec la voie de transduction MAPK de réponse au stress.

Chez *Arabidopsis thaliana*, CDKA (homologue de CDK1 humain) interagit avec la protéine eIF4A. Le complexe CDKA-eIF4A est très abondant dans les cellules en prolifération mais absent dans les cellules quiescentes, indiquant un rôle potentiel du complexe dans la prolifération cellulaire (Hutchins et al. 2004).

2-5 Initiation de la traduction dans un contexte de stress et d'apoptose

Les facteurs de traduction sont impliqués dans la réponse cellulaire apoptotique ou mise en place en réponse à un stress cellulaire comme le choc thermique, l'hypoxie (van den Beucken et al. 2006) ou encore lors d'une privation alimentaire (Tettweiler et al. 2005). Une des réponses cellulaires la plus souvent rencontrée est l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe. Cette inhibition permet de limiter la consommation en énergie de la cellule, estimée à plus de 50% de l'énergie de la cellule (Warner 1999; Rudra and Warner 2004) pour le seul processus de traduction et de rediriger les efforts vers la réparation des dommages ou la mise en place de mécanismes de survie.

Synthèse globale

En condition hypoxique, dans des cellules de mammifères, le complexe TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis protein) inhibe la kinase FRAP/mTOR qui ne peut plus phosphoryler 4E-BP1. La protéine 4E-BP1 hypophosphorylée se lie à eIF4E, empêche la liaison de eIF4G et

entraîne l'inhibition de la traduction globale des protéines (Wouters et al. 2005). Le stress hypoxique entraîne l'expression de 4E-BP dans l'embryon d'oursin (Le Bouffant et al. 2006). La protéine 4E-BP est également exprimée dans les embryons de drosophile par le biais du facteur de transcription FOXO (Forkhead box protein O) lorsqu'ils sont soumis à un stress oxydatif ou à une privation alimentaire. Dans ce cas, 4E-BP est exprimée pour permettre la survie des embryons jusqu'au retour de conditions environnementales favorables (Teleman et al. 2005; Tettweiler et al. 2005). Cette régulation transcriptionnelle a également été mise en évidence dans des cellules de muscle de mammifères. La protéine FOXO1 entraîne une augmentation de la protéine 4E-BP1 et inhibe l'expression et l'activité de la kinase FRAP/mTOR. Ainsi, l'activité de FOXO1 provoque une surexpression de 4E-BP1 actif (Southgate et al. 2007). La protéine 4E-BP1 est déphosphorylée en réponse à des agents endommageant l'ADN comme l'étoposide, le cisplatine ou encore la mitomycine C (Tee and Proud 2000). La protéine 4E-BP1 est déphosphorylée, dans des cellules Swiss 3T3, avant le déclenchement de l'apoptose et clivée pendant l'apoptose. Ce clivage est dépendant des caspases car il est inhibé en présence d'un inhibiteur de caspases, le Z-VAD-FMK (Tee and Proud 2000). La protéine 4E-BP1 sous sa forme phosphorylée, peut être également ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome (Elia et al. 2007).

Dans des cellules MEL (murine erythroleukemia), l'activation de p53 induit une inhibition de synthèse protéique liée à la déphosphorylation de 4E-BP1. Les protéines 4E-BP1 et eIF4G1 sont ensuite clivées dans ces cellules de manière dépendante de p53 mais indépendante des caspases (Constantinou and Clemens 2005).

Chez les mammifères, la protéine 4E-BP1 peut également être déphosphorylée en réponse aux rayons ionisants via l'inhibition de la kinase FRAP/mTOR et entraîner la traduction de TLK1 (Tousled-Like Kinase 1) (Sunavala-Dossabhoy et al. 2004). De manière intéressante, la kinase TLK1 est impliquée dans la mise en place du point de surveillance en

interagissant avec ATM et CHK1 (Groth et al. 2003) et facilite la réparation des cassures double brin de l'ADN (Sunavala-Dossabhoy et al. 2005). L'activation du récepteur de mort TRAIL induit l'inhibition de la synthèse protéique corrélée à la déphosphorylation de 4E-BP1 qui s'associe alors à eIF4E (Morley et al. 2005).

Lors d'un stress hypoxique, la protéine eIF4E peut être séquestrée par son inhibiteur 4E-BP1 (paragraphe précédent) mais aussi par son transporteur 4E-T (eIF4E Transporter) (Koritzinsky et al. 2006). La protéine 4E-T est capable de s'associer à eIF4E sur le même site d'interaction que 4E-BP1 et eIF4G, ce qui permet le transport d'eIF4E du cytoplasme vers le noyau (Dostie et al. 2000) et empêche ainsi l'activité de eIF4E dans le cytoplasme.

La protéine eIF2 est également une protéine impliquée dans la réponse au stress par la phosphorylation de eIF2 α . En effet, les kinases responsables de cette phosphorylation inhibitrice (voir paragraphe précédent) sont activées en réponse aux différents stress cellulaires. La kinase HRI, par exemple, est activée lorsque le niveau d'hème dans le sang est bas ou en réponse à des traitements à l'arsenic ou après un choc osmotique ou thermique. La kinase GCN2, quant à elle, est activée à la suite d'un manque d'acides aminés (Kimball 2001) ou à la suite d'un endommagement de l'ADN par irradiation UV (Deng et al. 2002; Jiang and Wek 2005). La kinase PKR est activée par les ARN double brin produits lors d'une infection virale et enfin, la kinase PERK est activée en réponse à un stress du réticulum endoplasmique entraîné par une accumulation de protéines mal repliées à ce niveau (Ron 2002). La protéine eIF2 α est impliquée dans la réponse rapide à un stress hypoxique permettant l'inhibition de la synthèse protéique et la survie cellulaire (Wouters et al. 2005; Koritzinsky et al. 2007). Des études récentes ont montré que chez la levure, l'arrêt du cycle en G1/S, à la suite d'un traitement aux rayons UV, est complètement dépendant de la kinase GCN2 et est accompagné de la phosphorylation de eIF2 α (Tvegard et al. 2007).

La protéine eIF2 α est phosphorylée consécutivement à l'activation du récepteur de mort TRAIL et est clivée au cours du processus apoptotique par la caspase 3 (Morley et al. 2005).

L'activité de la protéine eIF4G est régulée directement ou indirectement par la protéine PAK2 (p21 Activated protein Kinase 2). PAK2 est une kinase activée en réponse à l'endommagement de l'ADN entraînant l'apoptose (Roig and Traugh 1999). La kinase PAK2 se fixe et phosphoryle eIF4G inhibant ainsi sa liaison à eIF4E (Ling et al. 2005). La kinase PAK2 peut également réguler eIF4G indirectement en entraînant la phosphorylation de Mnk1 qui ne pourra plus se fixer sur eIF4G pour phosphoryler eIF4E (Orton et al. 2004). Dans les deux cas, l'activité de PAK2 entraîne une inhibition de l'initiation dépendante de la coiffe.

Le facteur multiprotéique eIF3 est impliqué dans l'apoptose. La sous unité p35 de eIF3 est clivée par les caspases au cours du processus apoptotique caspase dépendant (Clemens et al. 2000). Une interaction, par double hybride et GST pull down, a été mise en évidence entre la sous unité p44 de eIF3 et l'acteur principal de l'apoptose caspase indépendant AIF (Kim et al. 2006). Cette interaction entraînerait l'inhibition de la synthèse protéique.

Synthèse spécifique

La phosphorylation de eIF2 α entraîne une inhibition de la synthèse de la majorité des protéines, mais permet également la traduction de messagers spécifiques. Par exemple, à la suite d'une privation en acides aminés, la kinase GCN2 phosphoryle eIF2 α et induit ainsi l'inhibition globale de la synthèse protéique, alors que la traduction du messenger codant pour GCN4 augmente. La protéine GCN4 est un facteur de transcription impliqué dans la synthèse des acides aminés. La région 5'UTR de son messenger contient plusieurs cadres de lecture en amont (uORF) de celui codant pour la protéine active. Quand le niveau de phosphorylation de

eIF2 α est faible, le ribosome initie le premier uORF et réinitie les uORFs suivants, car des complexes eIF2 sont disponibles pour chaque réinitiation, sans parvenir à l'ORF de GCN4 (Figure 15-A). Lorsque la protéine eIF2 α est phosphorylée, la sous unité 40S du ribosome ne peut plus initier les uORFs, par manque de complexe protéique eIF2 disponible, et continue de scanner le messageur jusqu'à l'ORF de GCN4 (Figure 15-B). D'autres messageurs sont régulés de cette manière, comme par exemple, le messageur codant pour la protéine ATF4 (Activating Transcription Factor 4) (Harding et al. 2000).

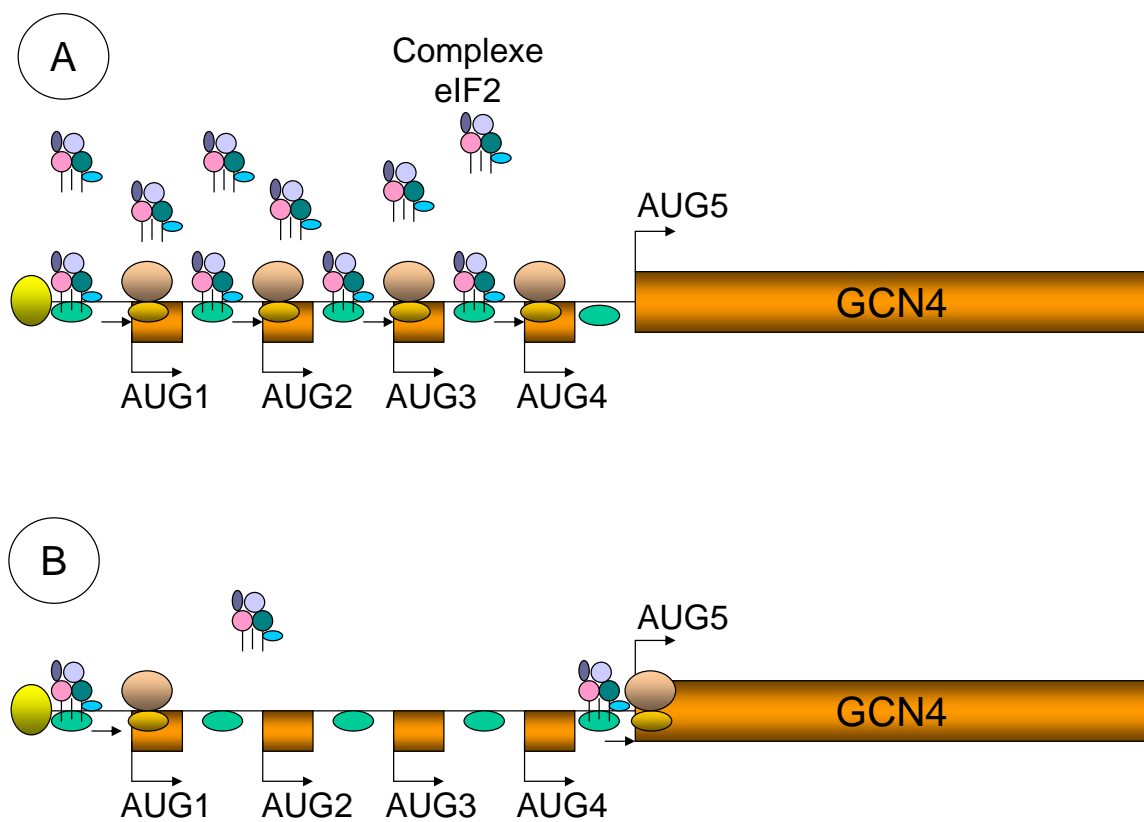


Figure 15 : Traduction du messageur GCN4

Le messageur codant pour GCN4 possède quatre séquences uORF et son initiation est fonction de la quantité de complexe eIF2 disponible. (A) Le nombre de complexe eIF2 disponible est très élevé, ce qui permet au ribosome d'initier toutes les séquences uORFs sans arriver à la séquence codant pour la protéine GCN4. (B) Le nombre de complexe eIF2 est faible, le ribosome ne va pas pouvoir initier les uORFs par manque d'eIF2 disponible et continuera de scanner le messageur. Le ribosome aura ainsi une probabilité plus forte d'arriver jusqu'à l'ORF codant pour la protéine GCN4.

La traduction de messagers spécifiques, initiée par des séquences IRES est importante dans la régulation de l'équilibre survie / mort cellulaire. Ainsi, certaines molécules anti-apoptotiques, comme XIAP, sont synthétisées par le biais d'IRES, en réponse aux rayons ionisants (Holcik et al. 1999). Des protéines pro-apoptotiques, comme APAF, indispensable au bon déroulement de l'apoptose induite par la voie intrinsèque (voir paragraphe apoptose) et permettant la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9, sont exprimées suite à une initiation IRES dépendante, lorsque la cellule s'engage sur la voie apoptotique (Coldwell et al. 2000). De plus, il a été démontré que la traduction de messagers pro-apoptotiques est privilégiée dans un contexte de mort cellulaire, et les anti-apoptotiques dans un contexte de survie. Ainsi, le messenger de APAF est exprimé en réponse au UV pour des doses induisant la mort cellulaire alors que le messenger de XIAP n'est pas traduit (Ungureanu et al. 2006).

La protéine eIF4G est clivée spécifiquement par les caspases au cours du processus apoptotique (Clemens et al. 2000). La protéine possède deux sites de clivage qui vont permettre de générer trois fragments, le N-FAG (fragment N-terminal), le C-FAG (fragment C-terminal) et le M-FAG (fragment du Milieu). Le M-FAG peut être recruté par l'intermédiaire d'un ITAF sur des structures IRES et permettre l'initiation spécifique d'un messenger (Holcik and Sonenberg 2005). Un homologue de la protéine eIF4G, la protéine DAP5/p97/NAT1 est également clivée lors de l'apoptose afin de permettre la traduction IRES des messages nécessaires à l'apoptose (Holcik et al. 2000).

De manière très intéressante, l'hétérodimère Ku 70/80, sous unité régulatrice de la DNA-PK, complexe protéique indispensable à la réparation par NHEJ (voir paragraphe réparation) est capable de s'associer à un grand nombre d'ARN porteurs de séquences IRES. De plus, la surexpression de Ku 80 entraîne une augmentation de l'activité IRES alors que les cellules Ku^{-/-} ont une activité IRES très faible, suggérant que la protéine Ku joue un rôle important dans la traduction IRES dépendante (Silvera et al. 2006).

2-6 Initiation de la traduction et cancers

La division des cellules est le résultat de la balance entre l'expression de gènes qui stimulent et permettent la division, et ceux qui l'inhibent. L'expression des gènes étant régulée au niveau de différentes étapes, dont la traduction, il n'est pas étonnant de voir que certains facteurs clés de cette étape sont des protéines à forte propriété oncogénique comme les protéines eIF4E et eIF4G ou au contraire, des protéines considérées comme de véritables suppresseurs de tumeurs, comme 4E-BP.

- eIF4E/eIF4G

La surexpression artificielle de la protéine eIF4E entraîne la transformation de cellules NIH-3T3 en cellules tumorales et l'apparition d'une tumeur suite de leur injection dans des souris nues (Lazaris-Karatzas et al. 1990). La surexpression de eIF4E active la transformation cellulaire par l'activation de l'oncogène Ras (Lazaris-Karatzas et al. 1992) bien que le mode d'activation de Ras par eIF4E soit inconnu. La protéine eIF4E est capable de coopérer avec les oncogènes v-myc et l'adénovirus E1A pour entraîner la transformation de fibroblastes d'embryons de rat (Lazaris-Karatzas and Sonenberg 1992). Une surexpression artificielle du partenaire de eIF4E, eIF4G entraîne également la transformation de cellules NIH3T3 provoquant l'apparition de tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des souris nues (Fukuchi-Shimogori et al. 1997).

Un inhibiteur spécifique de l'interaction eIF4E/eIF4G entraîne l'induction de l'apoptose dans des cellules leucémiques (Jurkat) et l'inhibition de synthèse de l'oncogène c-myc (Moerke et al. 2007).

De plus, des facteurs d'initiation de la traduction sont surexprimés dans de nombreux cancers. La protéine eIF4E est surexprimée dans des lymphomes non-hodgkinien (Wang et al.

1999) et très abondante dans les cancers du sein (Miyagi et al. 1995; Anthony et al. 1996), son abondance dans ce cancer étant associée à l'agressivité de la tumeur (Li et al. 1997). La surexpression de eIF4E est corrélée avec l'expression de TLK1B (Tousled-like kinase 1B) dans des cancers du sein (Byrnes et al. 2007). Afin de comprendre les mécanismes liant la surexpression de eIF4E et la transformation tumorale, le recrutement de messagers dans les polysomes a été étudiée par 'microarray' pour des cellules NIH3T3 où la protéine eIF4E est surexprimée. Les ARN messagers traduits dans ces cellules sont, pour la plupart, des messagers codant pour des protéines anti-apoptotiques ou des facteurs de croissance (Mamane et al. 2007).

- 4E-BP

La protéine 4E-BP peut être considérée sous certains aspects comme un suppresseur de tumeur, car la surexpression de 4E-BP1 ou 4E-BP2 peut reverser le phénotype tumoral associé à l'expression de eIF4E (Rousseau et al. 1996). Cet effet pro-apoptotique de 4E-BP est intimement lié à sa capacité d'inhibition de eIF4E puisque l'ajout du peptide d'interaction de 4E-BP ou de eIF4G avec eIF4E suffit à reverser le phénotype tumoral des cellules surexprimant eIF4E et déclenche le processus apoptotique (Herbert et al. 2000).

De plus, les patients possédant une protéine ATM mutée présentent notamment une réponse cellulaire anormale à l'insuline. Or, des études ont montré un rôle nouveau pour la protéine ATM dans la réponse à l'insuline passant par la phosphorylation de la protéine 4E-BP1. Cela suggère l'implication de la protéine 4E-BP1 dans le défaut de réponse à l'insuline observé chez ces patients (Yang and Kastan 2000).

- eIF2

L'expression d'une protéine eIF2 α non phosphorylable (sérine 51 mutée en alanine) inhibe la mise en place de l'apoptose (Srivastava et al. 1998) et induit la transformation de cellules NIH3T3 saines en cellules malignes (Donze et al. 1995).

L'expression du mutant dominant négatif d'une kinase phosphorylant eIF2 α , la PKR, entraîne la transformation des cellules NIH3T3 (Koromilas et al. 1992), proposant ainsi la PKR comme un suppresseur de tumeur (Meurs et al. 1993). De façon corrélée, la surexpression de TRBP (TAR RNA Binding Protein)(Benkirane et al. 1997) ou de p58 (Barber et al. 1994), inhibiteur de la PKR, entraîne la transformation de cellules saines en cellules malignes.

- eIF3

L'expression artificielle de plusieurs protéines du complexe multiprotéique eIF3 entraîne la transformation de cellules NIH3T3 en cellules malignes (Zhang et al. 2007). L'expression individuelle de cinq des sous unités de eIF3 entraîne une perte de contrôle de la croissance cellulaire ainsi qu'un échappement cellulaire au processus apoptotique. Des protéines du complexe eIF3 sont également surexprimées dans de multiples cancers. L'expression de la sous unité p170 est très forte dans les cancers mammaires et de l'œsophage (Bachmann et al. 1997) et la surexpression de la sous unité p40 d'eIF3 a été observée dans des cancers du sein et de la prostate (Nupponen et al. 1999).

Ainsi, les facteurs de traduction jouent un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire et peuvent être à l'origine de la perte de contrôle de la division. Le modèle de l'embryon

d'oursin est un modèle avéré pour l'étude du cycle cellulaire et de la traduction. La troisième partie illustre cette affirmation.

3 L'embryon d'oursin, un modèle pour l'étude du cycle cellulaire et de la traduction

L'oursin est un invertébré marin deutérostome appartenant à l'embranchement des Echinodermes, comme les étoiles de mer, les holoturies, les ophiures ou les crinoïdes. L'oursin est un modèle biologique important, qui a permis la découverte des cyclines, couronnée par l'obtention du prix Nobel par Tim Hunt en 2001. Actuellement, l'intérêt pour l'oursin grandit grâce au récent séquençage du génome de l'oursin américain, le *Strongylocentrotus purpuratus*. En effet, l'analyse du génome de 814 megabases de l'oursin a permis d'annoter 23 300 gènes non redondants et de montrer que les échinodermes sont les invertébrés les plus proches phylogénétiquement des chordés (Sodergren et al. 2006).

3-1 Embryon d'oursin, cycle cellulaire, réparation de l'ADN et apoptose

Cycle cellulaire

L'embryon précoce d'oursin est un modèle remarquable pour l'étude biochimique du cycle cellulaire au même titre que l'embryon de xénope ou l'ovocyte d'étoile de mer. D'autres modèles, comme la levure, sont utilisés pour les études génétiques. L'ovule non fécondé d'oursin est naturellement bloqué en phase G1 du cycle cellulaire et la fécondation permet la reprise de la division. Les œufs fécondés présentent une synchronicité physiologique à la différence des levures ou des cellules en cultures qui sont immortalisées (transformées) et doivent être traitées pour être synchronisées. L'avantage de l'oursin sur les autres espèces modèles est que la maturation méiotique est achevée dans l'ovule non fécondé. L'embryon d'oursin permet ainsi d'étudier le cycle en s'affranchissant des régulations observées au cours de la maturation méiotique (Prigent and Hunt 2004).

- Etude génomique

Le séquençage récent de l'oursin américain *Strongylocentrotus purpuratus* (Sodergren et al. 2006) a rendu possible la comparaison des séquences obtenues dans d'autres espèces. Ainsi ceci a permis de savoir que toutes les CDKs, à l'exception de CDK3, possèdent des homologues chez l'oursin. Les kinases CDK4 et CDK6 ne sont représentées que par une seule kinase chez l'oursin qui a été annotée CDK4. Les CKIs ont également été trouvées, mais un seul homologue a été annoté pour les protéines p21^{Cip1/Waf1} et p27^{Kip1}. Les protéines de la famille des INK4 sont absentes, indiquant leur spécificité aux vertébrés. Les protéines impliquées dans l'activation du point de surveillance mobilisé en réponse aux dommages de l'ADN, comme les protéines CHK1 et 2 ou ATM et ATR ont leurs homologues chez l'oursin. Les kinases mitotiques comme Aurora ou Plk1 ont également leurs homologues chez l'oursin. Enfin, les protéines régulant les CDKs comme les kinases Wee1 et CAK, la phosphatase Cdc25 qui n'a qu'un seul isoforme, le facteur de transcription E2F ou encore les suppresseurs de tumeur p53 et pRb sont présentes chez l'oursin. Les protéines 14-3-3, régulant le cycle par séquestration protéique, ont trois isoformes chez l'oursin contre sept chez l'humain (Fernandez-Guerra et al. 2006).

- Etudes fonctionnelles

Dans l'œuf d'oursin, la fécondation permet le déclenchement de la transition G1/S puis le déroulement des différentes phases du cycle S, G2 et M. Le mécanisme de reprise du cycle cellulaire dans l'œuf fécondé d'oursin est encore mal connu aujourd'hui. En effet, le complexe CDK2-Cycline E, responsable de l'entrée en phase S dans les cellules humaines, est constitutivement actif dans l'embryon d'oursin (Sumerel et al. 2001). Le complexe CDK2-

Cycline E est requis pour la maturation du pronoyau mâle mais pas pour la réplication de l'ADN dans la première division de l'embryon d'oursin (Schnackenberg et al. 2007). La synthèse de la cycline A n'est pas requise non plus pour la phase de synthèse d'ADN et l'activité de la CDK2 est stable durant les premières divisions (Zhang and Ruderman 1993; Moreau et al. 1998).

La transition G2/M est régulée par le complexe CDK1-Cycline B. La découverte de la cycline B, indispensable à l'entrée en phase M des cellules, a été mise en évidence pour la première fois dans l'embryon d'oursin par Tim Hunt (Evans et al. 1983). La synthèse de la cycline B et donc la transition G2/M est dépendante de l'activité de traduction. L'activation de CDK1 est dépendante de la dégradation spécifique de certaines protéines, car l'inhibition du protéasome provoque l'arrêt en phase M (Kawahara et al. 2000).

L'existence de points de surveillance dans la première division de l'embryon d'oursin a longtemps été controversée et certains auteurs proposent que ces points de surveillance ne seraient fonctionnels qu'à partir du stade blastula (Epel 2003). Une étude montre que chez des embryons d'oursin *Strongylocentrotus droebachiensis* au stade blastula (Figure 16) et exposés aux rayons UV, les protéines p53 et p21^{Cip1/Waf1} sont surexprimées, ce qui provoque une inhibition de l'activité CDK1 et l'arrêt du cycle cellulaire (Lesser et al. 2003). Lors d'un cotraitement aphidicoline (un inhibiteur de la réplication) avec de la caféine, les embryons ne sont plus capables d'induire l'arrêt en G2/M normalement observé en présence d'aphidicoline (Patel et al. 1997). La caféine est connue pour inhiber les kinases ATM/ATR (Sarkaria et al. 1999).

Nos études ont démontré clairement que la machinerie permettant de bloquer la cellule en entrée de mitose durant la première division cellulaire est fonctionnelle dans l'embryon d'oursin *Sphaerechinus granularis*. En effet, lorsque des embryons sont traités par des pesticides (Marc et al. 2002) ou par des agents endommageant l'ADN (Le Bouffant et al.

2007) , le cycle de division cellulaire est arrêté en G2/M et cet arrêt implique une inhibition du mécanisme d'activation du complexe kinasique CDK1-Cycline B, dont la tyrosine reste phosphorylée. En réponse à l'endommagement de l'ADN, lorsque le cycle cellulaire est arrêté, les mécanismes de réparation de l'ADN ou d'apoptose se mettent en place (Le Bouffant et al. 2007).

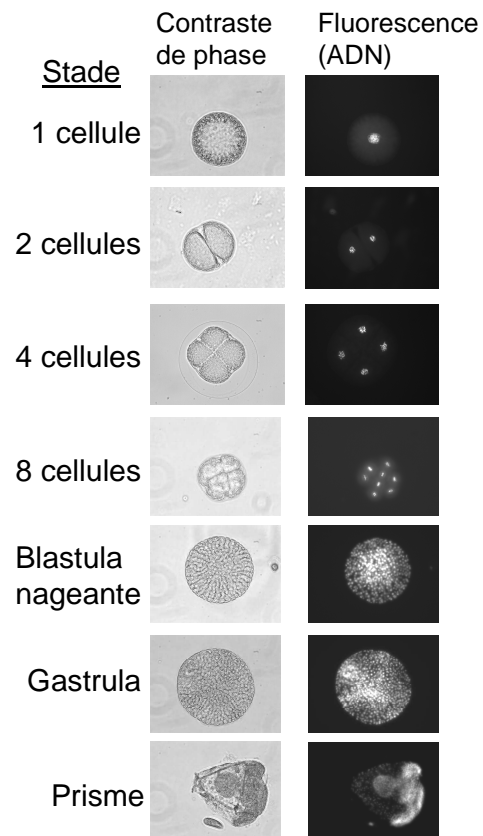


Figure 16 : Stades de développement de l'embryon d'oursin.

Observations microscopiques en contraste de phase (colonne de gauche) permettant d'observer la morphologie de l'embryon ou à fluorescence (colonne de droite) permettant d'observer l'ADN des cellules de l'embryon marquées au Hoescht.

Réparation de l'ADN

- Etude génomique

La plupart des acteurs de la réparation de l'ADN sont présents chez l'oursin, dix sept gènes correspondant à des protéines prédites de réparation ont été annotés pour le BER, huit gènes pour la réparation des DSBs (HR et NHEJ), dix neuf gènes pour le NER et sept gènes pour le MMR (Fernandez-Guerra et al. 2006). Pour le BER, toutes les protéines connues sont présentes chez l'oursin à l'exception d'une glycosylase. Pour le NHEJ, les sous unités formant la DNA-PK (DNA-PKcs, Ku70 et Ku80) et le complexe XRCC4-Ligase IV sont présents chez l'oursin.

- Etudes fonctionnelles

La réparation des dommages de l'ADN est fonctionnelle chez l'oursin *Sphaerechinus granularis* (Le Bouffant et al. 2007). En effet, les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'observer que les embryons d'oursin sont capables de réparer *in vivo* des dommages entraînés par une molécule radiomimétique (bléomycine) ou une molécule alkylant l'ADN (MMS : méthyl méthanesulfonate), réparés respectivement par le NHEJ et le BER dans des cellules de mammifères. De plus, des oligonucléotides mimant des cassures de l'ADN, prises en charge par le mécanisme du NHEJ ou du BER, ont été réparés par des extraits embryonnaires d'oursin (Le Bouffant et al. 2007).

Les protéines Ku 70 et Ku 80 jouent un rôle indispensable dans les premières divisions d'oursin puisque la microinjection d'un anticorps dirigé contre l'hétérodimère Ku70/80 entraîne un arrêt de la division chez *Lytechinus pictus*. Cet arrêt de division peut être reversé par l'apport de complexe DNA-PK actif (Kanungo et al. 1999).

Apoptose

- Etude génomique

L'annotation du génome de l'oursin a permis d'analyser la conservation des voies mises en place lors du processus apoptotique (Robertson et al. 2006). La comparaison de séquences (conservation de domaines spécifiques) des protéines humaines avec les protéines prédites d'oursin a mis en évidence l'existence de quatre protéines de la famille d'APAF chez l'oursin contre une seule chez l'humain. De la même manière, l'oursin possède un nombre important de caspases. En effet, quatre gènes codant pour des protéines de la famille de la caspase 9, un gène codant pour des protéines de la famille des caspases 3/7 et caspase 6, cinq gènes codant pour des protéines de la famille de la caspase 8 ont été trouvés chez l'oursin. De manière intéressante, onze 'nouvelles' caspases, dont la fonction est inconnue, sont prédites chez l'oursin. Des gènes codant pour les protéines de la famille des Bcl-2 ou pour les IAPs ont été trouvés chez l'oursin. Pour les acteurs de la voie extrinsèque, sept protéines correspondant aux TNFR (récepteur au TNF) et quatre au TNF ligand sont prédites chez l'oursin alors que les récepteurs Fas, ou TRAIL sont absents ainsi que leurs ligands respectifs. Enfin, les acteurs de la voie de l'apoptose caspase indépendante, comme le facteur AIF sont présents et bien conservés chez l'oursin.

- Etudes fonctionnelles

Au cours du développement embryonnaire, certaines cellules de l'embryon tardif d'oursin entrent naturellement en apoptose afin de permettre le bon développement et la métamorphose (Roccheri et al. 1997; Voronina and Wessel 2001). L'exposition d'embryons tardifs (pris aux stades blastula et gastrula : Figure 16) à des molécules chimiques

cytotoxiques (Roccheri et al. 1997) ou à des rayonnements UV (Lesser et al. 2003), induit le processus apoptotique.

Le traitement d'ovules non fécondés ou d'embryons d'oursin en première division par la staurosporine (inhibiteur des kinases PKC, PKA (Protein Kinase A) et MLCK (Myosin Light Chain Kinase)), induit l'apoptose (Voronina and Wessel 2001). Toutefois, les résultats obtenus par Voronina et Wessel ont été récemment controversés : la mort cellulaire induite par la staurosporine ne serait pas une apoptose mais une nécrose, et l'apoptose ne pourrait pas être induite dans l'embryon avant le stade blastula (Vega Thurber and Epel 2007).

Les études réalisées au cours de cette thèse démontrent que l'apoptose est induite dans la première division de l'embryon d'oursin en réponse à des agents endommageant l'ADN, comme une molécule radiomimétique (bléomycine) ou une molécule alkylant l'ADN (Le MMS) (Le Bouffant et al. 2007) ou encore par un métal lourd le chrome(III) (Le Bouffant et al, submitted : [Article 3](#)).

3-2 Embryon d'oursin et facteurs d'initiation de la traduction

- Etude génomique

Les données génomiques ont ici encore apporté des renseignements très importants sur les facteurs de traduction (Morales et al. 2006). La plupart des protéines (prédites) possèdent des homologues chez l'oursin mais la plupart n'ont qu'un seul isoforme. Par exemple, la protéine 4E-BP possède trois isoformes chez l'humain et un seul, proche de 4E-BP2, chez l'oursin. La protéine eIF4G a deux isoformes chez l'humain et n'en a qu'un seul chez l'oursin. De manière très intéressante, la protéine eIF4E a trois isoformes chez l'humain qui sont présentes chez l'oursin, mettant ici en avant leur importance. Les acteurs de la voie

régulant le complexe eIF4F sont également présents dans l'embryon d'oursin. Enfin des facteurs d'initiation de la traduction impliqués dans le processus apoptotique, comme la protéine DAP5/p97/NAT1, sont présents chez l'oursin.

- Etudes fonctionnelles

L'embryon d'oursin est un modèle avéré pour l'étude du cycle cellulaire et de sa régulation, mais est également un excellent modèle pour étudier la régulation de l'expression des gènes au niveau de leur traduction. En effet, en réponse à la fécondation, la traduction augmente de manière très forte et est indispensable à la division (Wagenaar 1983). La transcription, quant à elle, n'est pas indispensable durant les premiers stades de développement (Epel 1967; Brandhorst 1976). L'utilisation d'un inhibiteur de transcription, l'actinomycine D, entraîne un arrêt, ou du moins un ralentissement du développement, à partir du stade 16 cellules alors que les premiers clivages cellulaires ne sont, eux, pas affectés (Gross and Cousineau 1963; Gross and Cousineau 1964).

L'existence d'un inhibiteur du complexe d'initiation eIF4F dans l'ovule non fécondé était soupçonné depuis longtemps puisque l'ajout de complexe eIF4F purifié dans des lysats d'ovule d'oursin entraîne l'augmentation de la synthèse protéique (Huang et al. 1987). Le facteur 4E-BP a été impliqué dans la levée de l'inhibition de la synthèse protéique en réponse à la fécondation (Cormier et al. 2001). En effet, la protéine 4E-BP est très abondante dans l'ovule non fécondé et, en réponse à la fécondation, cette protéine est dégradée, dégradation qui est sous dépendance de la kinase FRAP/mTOR (Salaun et al. 2004). Lorsque la protéine 4E-BP est dégradée, eIF4E est libre, ce qui permet à la protéine eIF4G de se fixer sur eIF4E (Oulhen et al. 2007) et entraîne l'augmentation de la synthèse protéique (Salaun et al. 2003). Cette régulation de la protéine 4E-BP est très originale et permet d'étudier facilement les

modifications d'expression de la protéine 4E-BP au cours du développement ou dans des conditions particulières. La première division de l'embryon d'oursin est sous la dépendance de la protéine 4E-BP, car l'inhibition de dégradation de la protéine 4E-BP, en réponse à la fécondation, empêche la synthèse de la cycline B (Salaun et al. 2003).

Le répresseur de la traduction 4E-BP est exprimé dans l'embryon d'oursin en réponse à un stress hypoxique, à un radiomimétique (la bléomycine) et au chrome (Le Bouffant et al. 2006 ; Le Bouffant et al. submitted [Article 3](#)). L'expression de 4E-BP est régulée traductionnellement et entraîne l'inhibition globale de la synthèse protéique par dissociation du complexe eIF4F impliquant la fixation de 4E-BP à eIF4E dans des embryons traités au chrome (Le Bouffant et al. submitted [Article 3](#)).

Des études précédentes avaient déjà suggéré le rôle important de eIF2 dans la régulation de la synthèse protéique chez l'oursin car l'ajout de l'échangeur de GTP de eIF2, eIF2B, permet l'augmentation de la synthèse protéique dans des lysats d'embryons (Dholakia et al. 1990; Akkaraju et al. 1991). Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la protéine eIF2 est impliquée lors de la fécondation et en réponse à l'endommagement de l'ADN. En effet, la sous unité eIF2 α est phosphorylée dans l'ovule d'oursin puis déphosphorylée en réponse à la fécondation (Le Bouffant et al. submitted [Article 4](#)). La protéine eIF2 α est rephosphorylée en réponse à un agent génotoxique, le MMS (Methyl methanesulfonate), de façon corrélée à l'inhibition de la synthèse protéique.

RESULTATS

RESULTATS

Article 1

Le Bouffant, R., P. Cormier, A. Cueff, R. Belle and O. Mulner-Lorillon (2007). "Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damages checkpoint, DNA repair and apoptosis." Cell Mol Life Sci 64, 1723-34.

Ce premier travail a pour objectif d'étudier la fonctionnalité du point de surveillance (arrêt du cycle, réparation de l'ADN et apoptose) mis en place en réponse à l'endommagement de l'ADN au cours de la première division cellulaire de l'embryon d'oursin.

Le traitement par une molécule alkylant l'ADN, le MMS, ou par un agent radiomimétique, la bléomycine, entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, en inhibant la déphosphorylation activatrice du complexe CDK1-Cycline B. Les embryons soumis à l'action des molécules génotoxiques, durant de courtes périodes, sont capables de réparer les lésions induites, afin de reprendre un développement normal. Lorsque les lésions de l'ADN sont trop importantes, le processus de mort cellulaire programmée, ou apoptose, caractérisée par la fragmentation de l'ADN, la présence de corps apoptotiques ou encore l'activation des caspases est déclenchée dans l'embryon d'oursin.

Les résultats démontrent que ces cellules possèdent les mécanismes fonctionnels enclenchés lors de l'activation du point de surveillance, à la suite d'un endommagement de l'ADN. Cette caractérisation est indispensable pour pouvoir aborder par la suite l'étude des relations entre les points de surveillance et les facteurs de traduction.

Research Article

Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis

R. Le Bouffant^{a,b}, P. Cormier^{a,b}, A. Cueff^{a,c}, R. Bellé^{a,b} and O. Mulner-Lorillon^{a,b,*}

^a CNRS, UMR 7150 Mer & Santé; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7150; Station Biologique, Place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff (France), Fax : +33 2 9829 2306, e-mail: mulner@sb-roscoff.fr

^b Equipe Cycle Cellulaire et Développement

^c Equipe Physiologie cellulaire des erythrocytes

Received 10 April 2007; accepted 23 April 2007
Online First 11 May 2007

Abstract. DNA integrity checkpoint control was studied in the sea urchin early embryo. Treatment of the embryos with genotoxic agents such as methyl methanesulfonate (MMS) or bleomycin induced the activation of a cell cycle checkpoint as evidenced by the occurrence of a delay or an arrest in the division of the embryos and an inhibition of CDK1/cyclin B activating dephosphorylation. The genotoxic treatment was shown to induce DNA damage that depended on the genotoxic concentration and was correlated with the observed cell cycle delay. At low genotoxic concentrations, embryos were able to repair the DNA damage and recover from checkpoint arrest,

whereas at high doses they underwent morphological and biochemical changes characteristic of apoptosis. Finally, extracts prepared from embryos were found to be capable of supporting DNA repair *in vitro* upon incubation with oligonucleotides mimicking damage. Taken together, our results demonstrate that sea urchin early embryos contain fully functional and activatable DNA damage checkpoints. Sea urchin embryos are discussed as a promising model to study the signaling pathways of cell cycle checkpoint, DNA repair and apoptosis, which upon deregulation play a significant role in the origin of cancer.

Keywords. DNA damage, cell cycle checkpoint, sea urchin embryo, DNA repair, apoptosis, cancer biology.

Introduction

There is evidence that tumors and metastases originate from a minority of undifferentiated cells, which were called cancer stem cells, and resemble normal stem cells in their multipotency and their capacity to replicate almost indefinitely [1]. The hypothesis then arises that cancers can be viewed as a stem cell disease

[2,3]. Obviously, the stem cells possess a life span long enough to accumulate the six to eight mutations required for a cell to become cancerous [4], supporting the concept that cancer stem cells could originate from the stem cell compartment [3]. The unlimited replication capacity of adult stem cells is normally tightly constrained by highly orchestrated processes controlling growth, elimination of abnormal cells or anarchic migration of the cells [5]. Accordingly, normal cell growth is controlled by surveillance mechanisms known as cell cycle checkpoints [6],

* Corresponding author.

which ensure the faithful transmission of undamaged genetic information. These genome-surveillance mechanisms monitor the integrity of the chromosomes and coordinate repair and cell cycle progression [7]. Usually, the parallel activation of programmed cell death (apoptosis) ensures that the abnormal cells are eliminated if no repair occurs (for review see [8]). Among the actors known to be implicated in the checkpoint response, the PI3-kinase-related protein kinases of the ATM/ATR family play a central role as a transducer in the DNA damage signaling response. ATM orchestrates the cell response by arresting/delaying the cell cycle through a phosphorylation cascade involving Chk1/2 and cdc25, by activating the DNA repair through a pathway that may implicate RPA, BRCA1 and H2AX phosphorylation, and by inducing the p53-dependent activation of the caspase apoptotic pathway [9]. An alteration of one actor implicated in these surveillance pathways would produce cells that escape the normal control of cell proliferation and cell death and acquire the genomic instability underlying cancer cells [10–12].

Deciphering the pathways that regulate proliferation, self-renewal, survival and differentiation of normal stem cells is a pre-requisite to the comprehension of mechanisms which are deficient or circumvented in cancer stem cells, resulting in delineating new therapeutic strategies to selectively kill the cancer stem cells, the ultimate condition to irreversibly cure cancers. The description of the molecular machines required to execute cell cycle control steps resulted primarily from genetic studies with yeast [13], and benefited from the discovery that a number of genes classified as oncogenes or tumor suppressor genes were actors in the checkpoint pathways [10]. Subsequent biochemical analyses of the pathways rely on the use of synchronized culture cells. Thus, timely progression through cell division was shown to require phosphorylation events orchestrated by cyclin-dependent protein kinases (CDKs), the universal cell cycle regulators. Their activity is controlled at multiple levels by synthesis of the regulatory cyclin subunits, phosphorylation of both the catalytic and cyclin subunits, binding to CDK inhibitors (CKIs), subcellular localization, and by specific ubiquitination targeting of cyclins and CKIs to proteasome-mediated proteolysis (for review see [14]). Amphibian or marine invertebrate oocytes or eggs have been used for a long time as relevant models for studies on cell cycle control biochemical mechanisms. The reason is that female gametes are physiologically cell-cycle arrested cells, which are synchronously induced to resume the cycle under a natural stimulus, *i.e.*, fertilization. Upon fertilization, the cells are naturally and synchronously triggered to enter cell cycle and go

through mitotic divisions in a saline medium without addition of external drugs or growth factor. The sea urchin female gamete is an especially advantageous model in cell cycle studies since it has completed the entire maturation process and is arrested in the G1 phase of the cell cycle (reviewed in [15]). Therefore, fertilization in sea urchin allows the study of the molecular pathways involved in cell cycle entry without interference with a prior step of meiosis resumption, as it is the case in *Xenopus* embryos (reviewed in [16]). Furthermore, the whole genome of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, has recently become available (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/seaurchin/>) [17] and was shown to contain the orthologs for the major genes known to be implicated in the cell cycle and its checkpoints [18, 19]. The archetype for a normal stem cell is the zygote, the initial totipotent embryonic cell from which all the cells of an organism originate [20], further favoring the use of embryos to study the transformation of a normal stem cell into a cancer stem cell. However, it was generally assumed that rapidly developing embryos lack checkpoints and induction of stress responses until after mid blastula transition [21]. This assumption relied mainly on the observation that cells in embryos proceed through rapid and continuous cycles of DNA replication (S-phase) and nuclear division (M-phase), without gap (G) periods, which allow for the repair of DNA damage and replication errors. Nevertheless, activation of the G2/M checkpoint has been demonstrated to occur during the first cell cycle of sea urchin embryos in response to toxic exposure [22, 23]. Furthermore, eukaryotic initiation factor-4 binding protein (4E-BP), the universal inhibitor of translation initiation known to be implicated in cell survival and/or apoptosis was overexpressed in sea urchin embryos under hypoxic stress or prolonged bleomycin exposure [24]. We show here that genotoxic drugs induce DNA breaks in sea urchin embryos leading to cell cycle delay or arrest. The embryo response depends on the importance of the DNA damage induced by the genotoxics. At low dose or short exposure time, the DNA damage provokes a delay in development and the induction of DNA repair. At high doses, the cell cycle is arrested and the embryo manifests cytological and biochemical hallmarks of apoptosis. Furthermore, we report the production of embryo extracts that are appropriate for studying DNA repair activities *in vitro*. The results demonstrate the presence of a fully functional and activatable DNA damage checkpoint in sea urchin embryos favoring the use of embryos as a powerful model to study the pathways of cell cycle checkpoints and the consequences of their deregulation on the origin of cancer.

Materials and methods

Handling of gametes and embryos. Sea urchins (*Sphaerechinus granularis*) were collected in the Brest area and maintained in running seawater. Spawning of gametes was induced by intra-coelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Sperm was collected 'dry' and kept undiluted at 4°C. Eggs, collected in 0.22- μ m Millipore-filtered seawater, were dejellied by swirling for 30 s in filtered seawater (pH 5), rinsed twice in fresh seawater and suspended in filtered seawater at 5% (v/v) dilution. Diluted (1/1000th) sperm was added to the eggs and withdrawn after 5 min. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization. Each experiment used gametes and eggs from a single female.

Embryo treatments. At the indicated time after fertilization, genotoxic agents bleomycin (Aventis) or methyl methanesulfonate (MMS) (Sigma) were added to the incubation medium at the indicated concentration. Genotoxic mother solutions were made in seawater and adjusted to pH 7.5 before addition to the embryo incubations. When needed, genotoxic agents were removed from the incubation medium by rinsing embryos twice in fresh seawater.

Cytological analysis. Embryos were cultured at 16°C under constant stirring and observed at time intervals by phase-contrast microscopy for developmental progression. Thousands of embryos were incubated for each experimental determination from which around 100 were scored for the developmental stage [23]. At various times after fertilization, 0.2-ml aliquots of the embryo suspension were fixed overnight in 1 ml methanol/glycerol (3:1, v/v) in the presence of the DNA dye Hoechst (bisbenzimidazole, 0.1 μ g/ml), mounted in 50% glycerol and observed under fluorescence microscopy [25].

For transmission electron microscopy, embryos were fixed for 2 h in a mixture of 2.5% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde buffered to pH 7.2 with 0.2 M sodium cacodylate and 20% sea water. They were then rinsed three times in 0.2 M sodium cacodylate, pH 7.2 containing 450 mM sucrose and 20% sea water. After the dehydration series in ethanol, samples were embedded in epoxy resin (SPURR). The resin was cut and ultra-thin sections were mounted on a grid and labeled with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds). Observations were made under transmission electron microscope (JEOL 1200EX).

CDK1/cyclin B activation *in vivo*. The activation state of CDK1/cyclin B at various times after fertilization was determined from activity measurements of the protein kinase affinity purified from the embryos as already described [23]. Briefly, low-speed (16 000 g, 10 min) supernatants were prepared from 1 ml pelleted embryos homogenized in 400 μ l ice-cold buffer [60 mM β -glycerophosphate pH 7.2, 15 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 25 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), 15 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 15 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM disodium phenylphosphate, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor (SBTI), 100 μ M benzamide, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 0.1% Triton]. The CDK1/cyclin B complex was isolated from the extract supernatants by affinity chromatography on p13^{suc1} Sepharose beads prepared as described in [23] and the activity of the bound kinase was determined using histone H1 substrate under standard conditions [26].

Western blot analyses. Electrophoretic resolution of the p13^{suc1}-affinity purified proteins was performed under SDS denaturing conditions on a 15% polyacrylamide gel according to Laemmli [27]. Proteins were electro-transferred from the gel onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). The membranes were saturated in Tris buffer saline containing 0.1% Tween 20 and 5% BSA (Serva) during 1 hour. The membranes were then incubated overnight at 4°C in monoclonal anti-phosphotyrosine horseradish peroxidase-conjugated antibody (ref PY99, Santa Cruz) at 1:500. The antigen-antibody complexes were revealed by the chemiluminescence system (ECL) according to the manufacturer's instructions (Amersham). The total amount of CDK1, taken as a loading control, was verified after immunorevelation using a

mouse monoclonal antibody directed against human PSTAIRE (ref 7962, Sigma).

Analysis of DNA damage and repair *in vivo*. The DNA profile was analyzed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) [28]. At 20 min after fertilization, the embryo suspension was treated for 30 min in the presence of different genotoxic agents at the indicated concentrations. After treatment, aliquots (50 μ l) of pelleted cells were embedded in agarose plugs [1% low melting point agarose (Appligene), 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer (TBE, Sigma)] and the plugs were incubated for 48 h in 0.5 M EDTA, 1% *N*-laurylsarcosyl and proteinase K (1 mg/ml; Amresco) at 20°C in the case of bleomycin treatment, and at 20°C or 50°C in the case of MMS treatment. The 50°C treatment was reported to convert the heat-labile alkylation sites induced by MMS to double-strand breaks observable after PFGE [29]. Agarose plugs were washed twice with washing buffer (10 mM Tris, pH 7.5, and 0.1 M EDTA) and incubated with RNase [10 mM Tris, pH 7.5, 0.1 M EDTA and 0.1 mg/ml RNase A (Sigma)] at 37°C for 1 h. Electrophoresis was carried out with a CHEF-DR II system (Bio-Rad) in 1% agarose gels. Gels were run at 14°C with increasing pulse times from 60 to 240 s over 24 h at 100 V. DNA was revealed by ethidium bromide staining and quantified by densitometry. Regression analysis of DNA fragmentation was realized and expressed as the fraction of activity released (FAR), which is the ratio of fragmented DNA to total DNA [28].

DNA repair activity *in vitro*. Extracts were prepared from embryos at 60 min after fertilization by the previously described protocol [30]. Briefly, embryos were washed twice in 10 volumes of lysis buffer (10 mM HEPES, 250 mM NaCl, 25 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 110 mM glycine, 250 mM glycerol, 1 mM DTT and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride), then resuspended in lysis buffer at a ratio of 1:1 and homogenized with a syringe fitted with a 23-gauge needle. The lysate was centrifuged twice at 16 000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was stored at -80°C. An ATP regenerating system (final concentration: 2 mM ATP, 20 mM phosphocreatine and 50 μ g/ml creatine kinase) was added to the extracts before the DNA repair assay. A non-homologous end-joining (NHEJ) assay was performed using the duplex oligonucleotides (P1/P3 and P2/ labeled-P4; see below) and the method described in detail by Fan and Wu [31]. Briefly, repair activity is reflected by the appearance of a 62-base labeled oligonucleotide after electrophoresis, resulting from ligation of the precursors P3 and P4. The assay was conducted using 2 pmol of each oligonucleotide incubated in the presence of embryo extract (100 μ g protein) for 180 min at 37°C. Base excision repair (BER) was analyzed using the protocol described by Cabelof *et al.* [32]. In brief, restoration of a restriction site was used to test the repair of a G:U mismatch-containing oligonucleotide (labeled-P5/P7; see below). The assay was conducted using 2 pmol of duplex oligonucleotide P5/P7 mimicking BER substrate, or control substrate (labeled P6/P7 containing the original restriction site), incubated in the presence of the embryo extract (100 μ g protein) for 10 min at 37°C. After purification, oligonucleotides were digested with 50 U *Hpa*II (New England Biolabs) for 30 min. For both assays, oligonucleotides were resolved on denaturing gels (50% urea, 20%, acrylamide, 30% formamide) and analyzed by PhosphorImager scanning. The oligonucleotides were purchased from Eurogentec. Their sequences are indicated below:

P1 (5-ACAAAGTTTGATTGCTACTGACCGCTCTC GTGCTCGTCGCTGCGTT-3, 47-mer)

P2 (5-GCCTCGCGACGCATG-3, 15-mer)

P3 (5-GCGACGAGCACGAGAGCGGTCAGTAGCAATCCA AACTTTGT-3, 41-mer)

P4 (5-CATGCGTCGCGAGGCAACGC-3, 20-mer)

P5 (5-ATATACCGCGGUCGGCCGATCAAGCTTATT-3, 30-mer)

P6 (5-ATATACCGCGCCGCGGATCAAGCTTATT-3, 30-mer)

P7 (5-AATAAGCTTGATCGGCCGCGCGGTATAT-3, 30-mer)

Caspase activity assay. Acetyl-DEVD-4-methyl-coumaryl-7-amide (Ac-DEVD-MCA), a fluorogenic substrate for caspase, and acetyl-DEVD-aldehyde (acetyl-DEVD-CHO), a caspase inhibitor, (BD Bioscience) were used for the estimation of caspase activity in embryo extracts. At different times after fertilization, 1 ml from a

5% suspension of control or treated embryos was pelleted. Pellets were suspended in 500 μ l ice-cold buffer A (100 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT) and homogenized by short sonication (5 s, amp. 40). Embryo extracts were clarified by a 14 000 g centrifugation for 15 min at 4°C. Caspase assays were carried out at 20°C for 3 h in 1 ml buffer A containing 10 μ M substrate, in the presence of embryo extract (100 μ g protein). At the end of the incubation, the fluorescence of 7-amino-4-methylcoumarin that had been cleaved from Ac-DEVD-MCA by caspase was detected by excitation at 380 nm and emission at 460 nm with a luminescence spectrophotometer (LS 50 Perkin Elmer).

Results

Embryonic sea urchin cells contain an activatable DNA damage checkpoint. In mammalian cells, genotoxics like MMS, which induces DNA base alkylation [29], or bleomycin, a radiomimetic agent that causes double-strand DNA breaks [33], are commonly used to trigger DNA damage checkpoints. In this study, the genotoxic agents were applied to sea urchin embryos to investigate the DNA damage checkpoint. MMS or

bleomycin when added to embryos 20 min after fertilization provoked a delay in the occurrence of the first cleavage as observed under phase-contrast microscope (Fig. 1). The delay in the first cytokinesis was dependent on the concentration of the genotoxic agents, and ranged from several minutes to complete arrest. Depending on the experiments using different animals, an average 30 min delay was observed with concentration ranges 1–4 mM MMS or 0.4–4 mM bleomycin (Fig. 1a). Complete cell cycle arrest, as judged by the absence of cell division was reproducibly obtained for doses of 10 mM MMS or 10 mM bleomycin (Fig. 1a). The chromatin morphology, as illustrated in Figure 1b, was comparable during all phases of the cell cycle in the genotoxic-treated and the control embryos at the interphasic state (uncondensed chromatin) and at the three main mitotic steps (chromosome condensation, metaphasic alignment and chromatin segregation). Thus, genotoxic treatments specifically affected cell cycle kinetics without major metabolic injury. Figure 1b further shows that

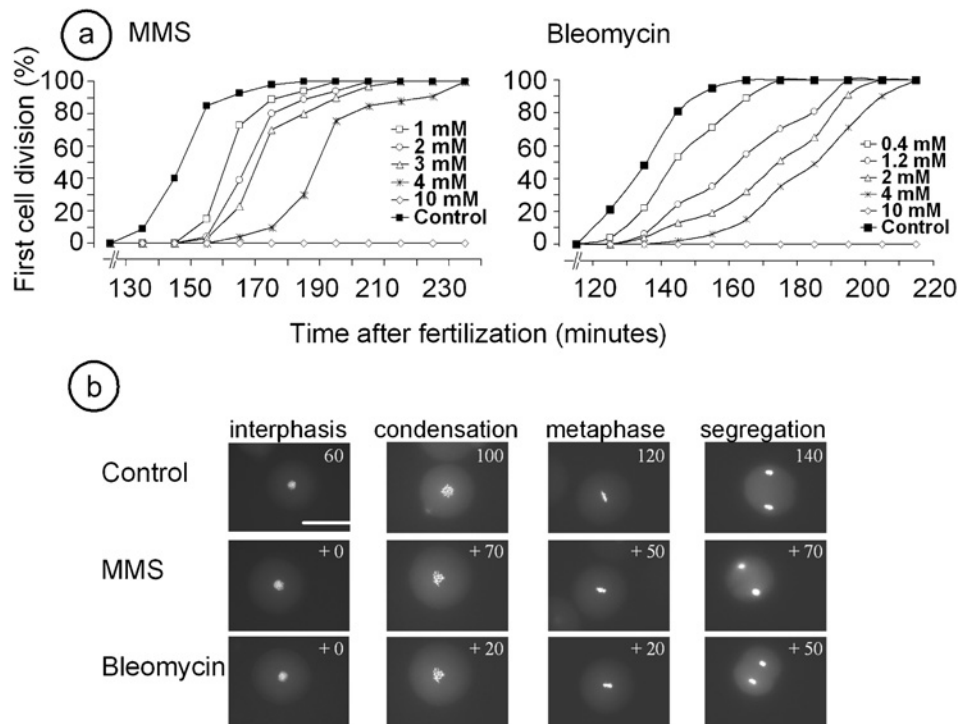


Figure 1. Genotoxic treatment affects the kinetic of the first cell division. Sea urchin eggs were fertilized and the embryos were transferred 20 min later to fresh seawater (5% suspension) without (Control) or in the presence of MMS (MMS) or bleomycin (Bleomycin). (a) For each treatment, 100 embryos were scored for the first cleavage by phase-contrast microscopy as a function of time after fertilization. Control embryos are represented by closed symbols and genotoxic-treated embryos at the indicated concentrations by open symbols. Each kinetic was obtained for the eggs isolated from a single female and is representative of at least three independent experiments. (b) The chromatin morphology was observed by fluorescence microscopy after Hoechst staining of the control embryos, 4 mM MMS-treated embryos or 1.2 mM bleomycin-treated embryos. The four main cell cycle stages (interphasis, chromatin condensation, metaphase alignment, chromosome segregation) are illustrated. Each photograph shows an embryo representative of at least 80% of the embryo population at the related time. The time in minutes after fertilization is indicated for each stage in the control lane; for the treated lanes, the number (mean of three experiments) in each panel symbolizes the time delay (in minutes) as compared to the control to reach the identical stage. Bar: 100 μ m.

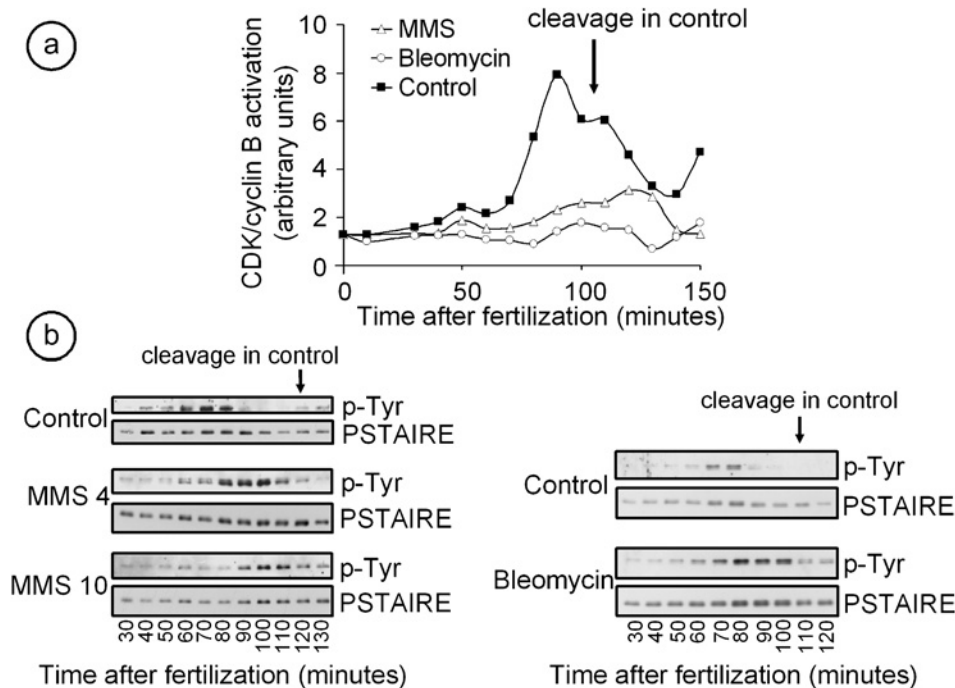


Figure 2. Genotoxic treatment affects CDK1/cyclin B activation *in vivo*. Sea urchin eggs were fertilized and embryos were transferred 20 min later to fresh seawater or in the presence of MMS or bleomycin. At the indicated times after fertilization, batches of embryos were processed for CDK1/cyclin B affinity purification on p13-Sepharose beads as indicated in Materials and methods. (a) The CDK1/cyclin B activation state estimated by the kinase activity of the purified complex was measured in control embryos (Control), in 1 mM MMS-treated embryos (MMS) or 0.4 mM bleomycin-treated embryos (Bleomycin). In this experiment, the first cleavage indicated by an arrow occurred around 110 min after fertilization for control embryos. (b) The phosphorylation state of CDK1 was analyzed by Western blot on purified complex using phosphotyrosine (p-Tyr) antibodies. The experiment was done on control (Control), MMS-treated embryos at 4 mM (MMS4) or at 10 mM (MMS10) and bleomycin-treated embryos at 10 mM (Bleomycin). The total amount of purified CDK1, revealed by PSTAIRE antibodies, is taken as the loading control. Arrows indicate the time for first cleavage in control embryos.

the genotoxic agent induced the cell cycle delay as early as the chromosome condensation stage (*i.e.*, entry into M-phase), a feature reminiscent of the DNA damage checkpoint activation. The checkpoint triggering was further supported by the analysis of CDK1/cyclin B activation *in vivo* (Fig. 2). As already reported [34], control embryos presented a characteristic peak of CDK1/cyclin B activation at 90 min after fertilization, around 20 min before the cleavage occurred. Figure 2a illustrates that during the same period, no CDK1/cyclin B activity peak was detectable in the genotoxic-treated embryos, indicating that the complex activation had been impaired. The fact that, at the doses tested, the embryos finally underwent cell division, although with a delay kinetic (see Fig. 1a) implies that activation of CDK1/cyclin B complex has been delayed in the treated embryos as compared with the control. The phosphorylation state on tyrosine of CDK1 was analyzed in control and genotoxic-treated embryos (Fig. 2b). In control embryos, CDK1 tyrosine phosphorylation increased progressively up to 70 min after fertilization and abruptly disappeared around 90 min, indicative of the CDK1/cyclin B complex activation, as already well

documented [23]. When the embryos were incubated in the presence of MMS or bleomycin, the tyrosine dephosphorylation of CDK1 was either delayed (4 mM MMS) or barely detectable (10 mM MMS or 10 mM Bleomycin) in correlation with the dose-dependent delay or arrest in the cell division occurrence (see Fig. 1a). Therefore, genotoxics dramatically affect the activating dephosphorylation of CDK1 on tyrosine, a critical feature in the DNA damage checkpoint pathway [10].

Altogether, the experiments demonstrated that the cell cycle DNA damage checkpoint is operative and can be triggered in sea urchin embryos.

Induction of DNA repair in the genotoxic-treated embryos.

To test whether genotoxics affect the sea urchin embryo DNA as they do in mammalian cells [35], the embryo DNA profile was examined by PFGE under different experimental conditions (Fig. 3). Intact chromosomal DNA isolated from control embryos was reproducibly found to resolve as large bands at the top of the gel (Fig. 3a, both panels, lanes 0, brackets). DNA isolated from embryos treated with 10 or 20 mM MMS displayed a smear

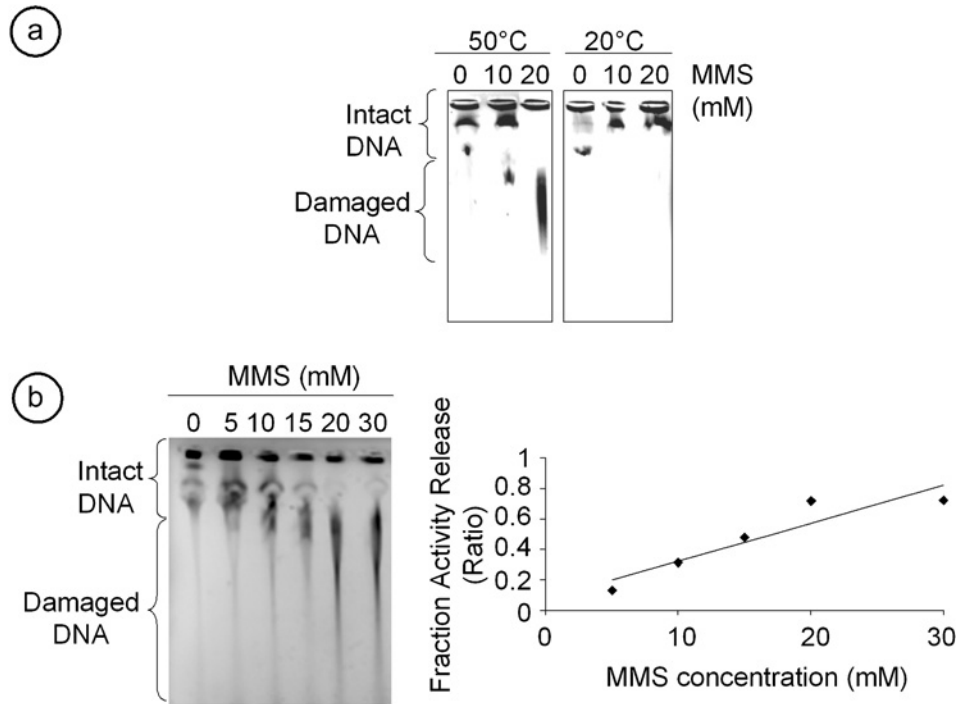


Figure 3. Genotoxic treatment induces embryo DNA damage. Sea urchin eggs were fertilized in fresh sea water (5% suspension) and, 20 min later, the embryos were treated for 30 min in the presence of MMS at the indicated concentrations. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was realized on 50- μ l aliquots of pelleted embryos embedded in agarose plugs as described in Materials and methods. DNA was visualized on gel after BET staining. (a) MMS produces heat-labile DNA damage. The agarose plugs from control embryos (0) and MMS-treated embryos at 10 mM (10) or at 20 mM (20) were incubated at 20°C or 50°C before electrophoresis. (b) DNA damage increases with MMS concentration. The DNA profile on PFGE was analyzed after embryo treatment at increasing MMS concentration. Left panel: Gel after BET staining. Right panel: Quantification of the intensity of DNA damage after densitometric analysis of the gel, and is expressed as fraction activity release as described in the Material and methods.

profile created by high molecular weight DNA fragments entering the gel (Fig. 3a, 50°C left panel, lanes 10 and 20), indicating that the sea urchin embryo DNA was damaged by MMS. Likewise, PFGE analysis demonstrated that bleomycin induced double-strand breaks in sea urchin embryo DNA as judged by the occurrence of smear DNA profile (illustrated below). It is noteworthy that when the preparation of DNA from MMS-treated embryos was not pre-heated at 50°C before electrophoresis, a treatment which reveals the heat-labile site induced by MMS-induced DNA alkylation (see Materials and methods), no smear bands could be observed (Fig. 3a, compare 50°C left and 20°C right panels), indicating that no huge unspecific DNA damage had occurred. Further analyses of the DNA damage induced by MMS in embryos showed that the size and mobility of the smear increased with the concentration of the genotoxic (5–30 mM) applied to the embryos (Fig. 3b, left panel). Quantification of the smear after densitometry of the gel (Fig. 3b, right panel) illustrated the dose-dependent intensity of the DNA damage, which is then correlated with the dose-dependent activation of the checkpoint shown in

Figure 1a. Altogether, this demonstrates that exposure to MMS or bleomycin induces DNA damage in sea urchin embryos as well as in mammalian cells.

In mammalian cells, activation of the checkpoint is accompanied by the mobilization of the repair machinery allowing the resumption of cell cycle [7]. We then tested the reversibility of the genotoxics-induced damages in sea urchin embryos. In correlation with the DNA damage induced by a 30-min treatment in the presence of MMS, short (30 or 60 min) incubation in high dose (10 mM) MMS led to the checkpoint activation, as judged by the significant delay in the occurrence of the first cell division (Fig. 4, compare the 3-h column control lane with the 30-min and 60-min MMS lanes). Similarly, checkpoint triggering was induced by short incubations in a high dose (10 mM) of bleomycin, with the delay in cell division increasing with the incubation time (from 30 to 120 min, Fig. 4). Moreover, when the embryos were washed free of the genotoxics and further incubated in fresh sea-water, the cell cycles resumed and the embryos developed at least to the blastula stage (about 400 or 800 cells) (Fig. 4, 20-h column). Cell cycle resump-

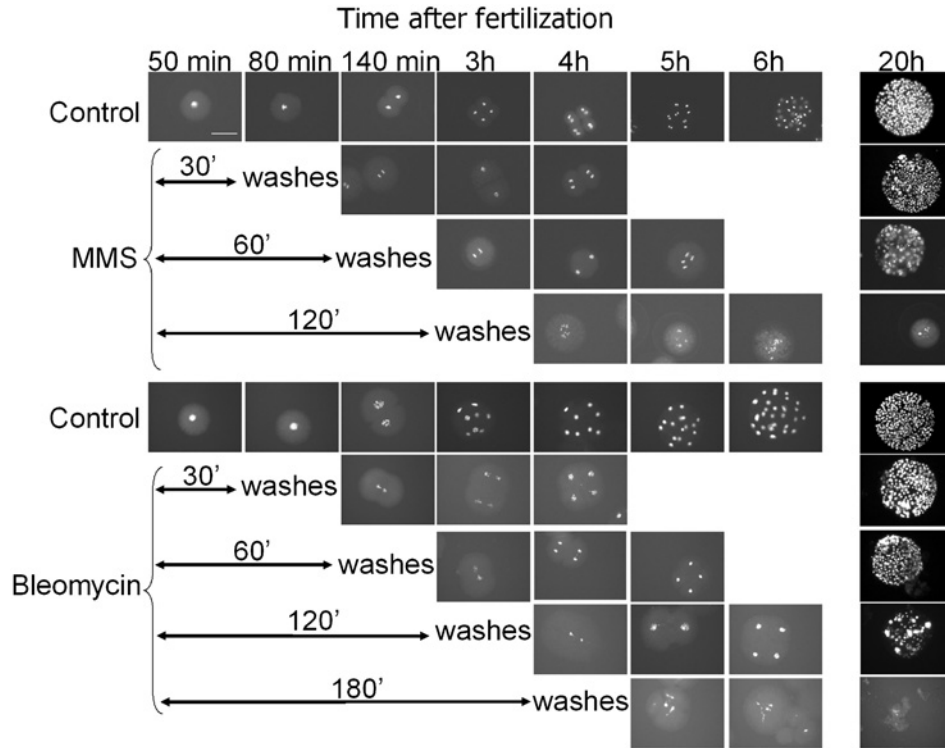


Figure 4. The reversibility of cell cycle arrest depends on the time of treatment in the presence of the genotoxic. At 20 min after fertilization, batches of embryos were incubated in fresh seawater in the absence (control), in the presence of 10 mM MMS (MMS) for 30, 60, or 120 min, or in the presence of 10 mM bleomycin (Bleomycin) for 30, 60, 120 or 180 min. After the treatment, the genotoxics were removed by two successive washes in fresh seawater. The chromatin morphology was observed by fluorescence microscopy after Hoechst staining on batches of embryos taken at different times from 50 min to 20 h after fertilization. Each photograph shows an embryo representative of at least 80% of the thousand present in the population at the related time. Bar: 100 μ m.

tion suggested either that the checkpoint has been by-passed or that the lesions have been repaired.

Sea urchin embryos were therefore tested for their ability to repair DNA *in vitro*. Two main DNA repair processes were analyzed: BER and NHEJ. The BER system repairs modified bases generated by alkylating agents such as MMS and endogenous hydrolytic and oxidative processes, whereas NHEJ repairs DNA double-strand breaks, the more toxic DNA damage for the cell, which is induced by ionizing radiation or radiomimetic drugs such as bleomycin (for review see [36]). When oligonucleotides mimicking double-strand breaks were introduced into the extracts, NHEJ repair occurred, as judged by the occurrence after denaturing gel analysis of a high (62 bases) nucleotide (nt) band (arrow in Fig. 5, upper panel), resulting from the ligation of two short linear duplex precursors. Quantification of the joining activity was estimated by densitometric analysis of the autoradiograph. The ligated product at 62-nt represented around 8.7% of the total labeled signal, comparable to the activity reported for 5 nM ligase complex tested under the same experimental conditions [31]. Figure 5 (lower panel) shows that the embryo extracts were

also able to support a base-mismatch repair. Whereas a control oligonucleotide, 30 bases long, containing a restriction site, was efficiently cleaved into a 12-base fragment (lane 1), the same oligonucleotide containing a base mismatch (C \rightarrow U) could not be cleaved (lane 2). After incubation in the presence of embryo extracts, the mismatch-containing oligonucleotide could now be cleaved as well as the control one (Fig. 5, lower panel, lanes 3 and 4), indicating that the restriction site had been restored by incubation in the extract, by means of BER. Therefore, two of the main DNA repair activities are functional in embryos and can be easily measured in extracts *in vitro*.

It was then essential to demonstrate that the embryos' DNA repair activities were mobilized after genotoxic-induced damage and allowed the resumption of cell cycle through repair of the lesions. The DNA state was then examined by PFGE experiments after a short (30 min) high-dose (10 mM) treatment of the embryos in the presence of the MMS or bleomycin, and further incubation in fresh seawater (Fig. 6). DNA was found to be repaired as early as 60 min after washing, as judged from the disappearance of the smeary profile and migration of the DNA as a single band at the top

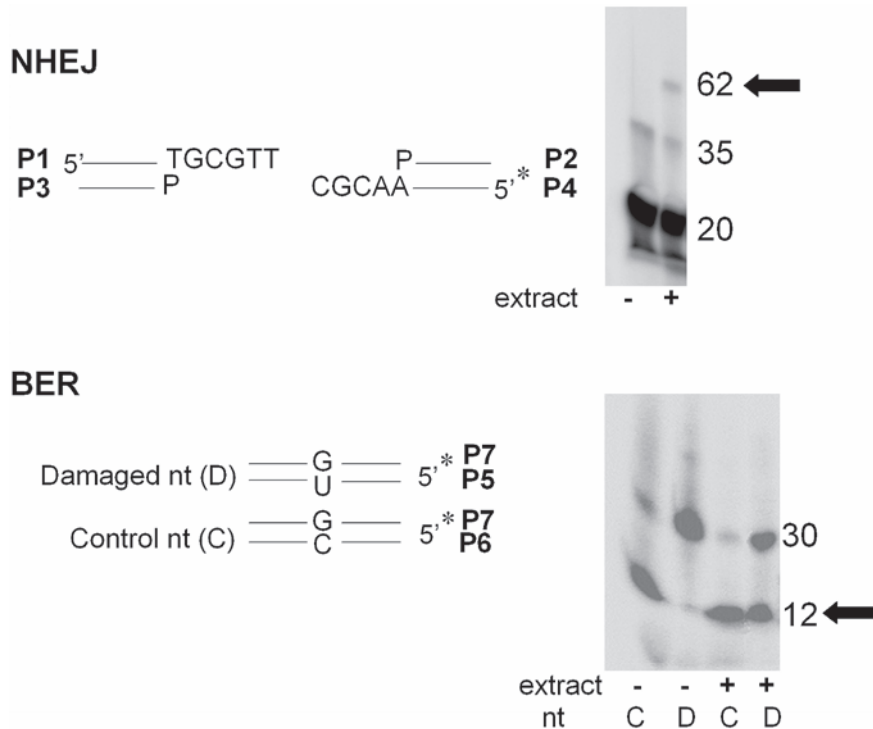


Figure 5. Embryo extracts repair DNA *in vitro*. Extracts were prepared from 60-min fertilized embryos as described in the Materials and methods. (Upper panel) Non-homologous end-joining (NHEJ) activity was measured by incubation of the duplex oligonucleotides (nt) mimicking DNA breaks (illustrated at the top left) in the absence (–) or presence (+) of the embryo extracts (100 µg protein). (Lower panel) Base excision repair (BER) activity was measured using the duplex oligonucleotides (nt) illustrated at the bottom left. Control (C) or damaged (D) oligonucleotides were subjected to digestion by the restriction enzyme *HpaII* either directly (–) or after pre-incubation in the presence of the embryo extract (100 µg protein). The resulting oligonucleotides were analyzed by denaturing gel electrophoresis and visualized after autoradiography of the gel. Arrows indicate the position of the expected relevant product of reaction. Note that labeling at the level of 35-nt (in NHEJ) corresponds to incomplete denaturation of the P2/P4 precursor duplex.

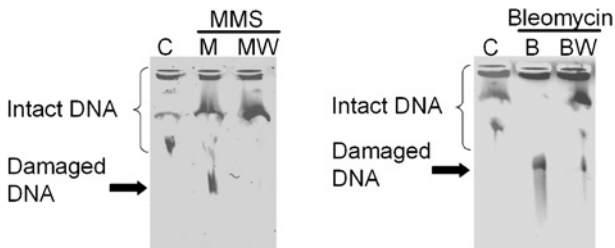


Figure 6. DNA repair occurs in embryos after genotoxic treatments. Sea urchin eggs were fertilized and, 20 min later, the embryos were incubated for 30 min in the absence (C) or in the presence of 10 mM MMS (MMS) or 10 mM bleomycin (Bleomycin). At the end of the incubation, one batch of the treated embryos (M or B) was immediately prepared for PFGE and another was transferred to fresh seawater and further incubated for 60 min before preparation for electrophoresis (MW or BW). PFGE was realized on 50-µl aliquots of pelleted embryos as described in the Materials and methods. The DNA was visualized on gel after BET staining.

of the gel, which was comparable to the profile in control embryos (compare lanes M and W in Fig. 6, left panel and lanes B and W in Fig. 6, right panel). Therefore, in addition to the activation of the cell cycle checkpoint to arrest cell cycle, the sea urchin embryos

respond to DNA damage by an activation of the DNA repair machinery.

Induction of apoptosis in the genotoxic-treated embryos. Incubation of the embryos for 120 min or more in 10 mM MMS, or 180 min or more in 10 mM bleomycin induced complete arrest in cell cycle. The embryos remained at the one cell stage for at least a 20-h period (see Fig. 4), indicative of permanent checkpoint activation probably related to permanent DNA damage. Although cytologically intact, the cells started to look unhealthy at the chromatin morphology level (Fig. 4, lanes 6 h or 20 h for treated embryos), and the main proteins underwent extensive degradation as judged from the electrophoretic profile after Ponceau red staining (data not shown). To further address this point, embryos were treated for 5 h in 10 mM MMS or bleomycin and thereafter maintained in fresh seawater for 4 days. Whereas control embryos had developed normally until the prism stage (Fig. 7, control column), both the MMS- and bleomycin-treated embryos, remained undivided until 90 h after treatment and progressively presented typical apoptotic figures. The DNA of

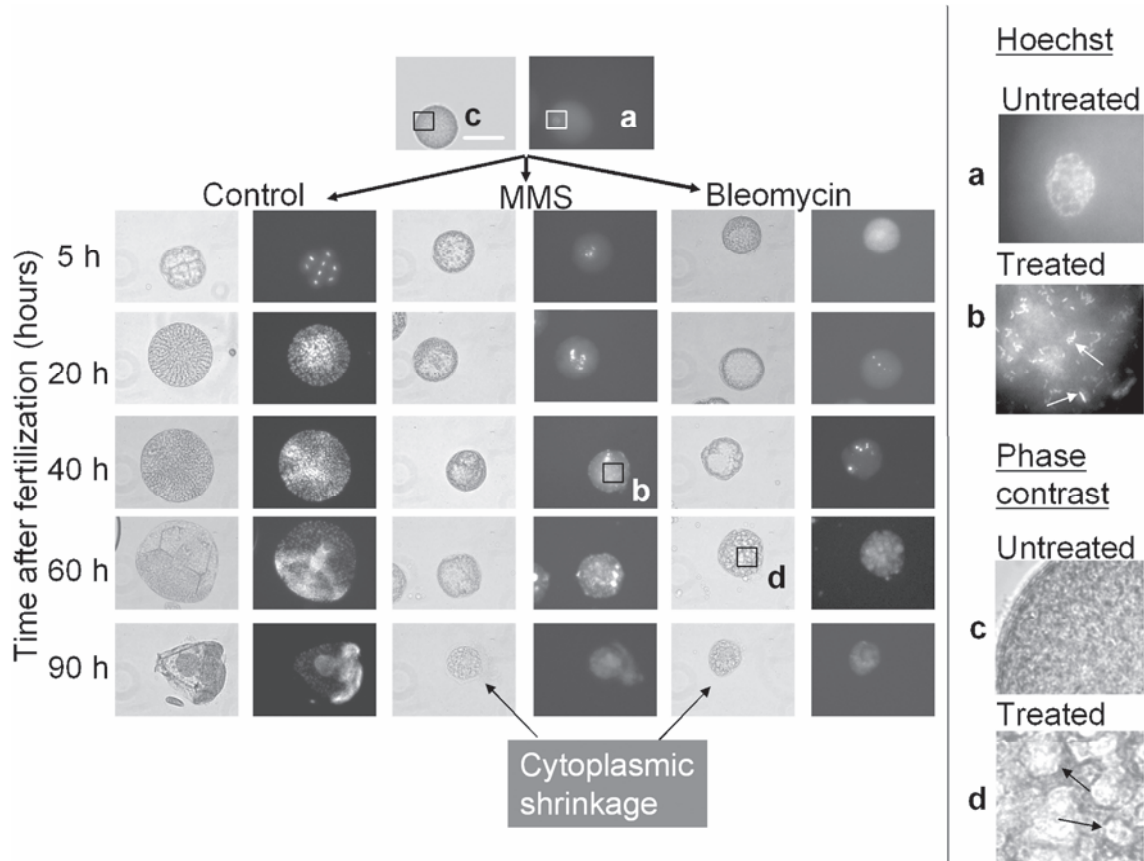


Figure 7. Genotoxics induce cell death in sea urchin embryos. Sea urchin eggs were fertilized and 20 min later the embryos were transferred to fresh seawater in the absence (Control) or presence of 10 mM MMS (MMS) or 10 mM bleomycin (Bleomycin) for 5 h. Control or treated embryos were then thoroughly washed and further incubated in fresh seawater. Left panel: The cytoplasmic and DNA morphologies of the embryos were followed for 4 days under, respectively, phase-contrast microscopy (left column for each treatment) and fluorescence microscopy after Hoechst staining (right column for each treatment). Bar: 100 μ m. Right panel: Comparison at high magnification ($\times 9$) of the DNA (Hoeschst) and cytoplasmic (phase-contrast) morphologies in untreated (untreated) or genotoxic-treated (treated) cells. The photographs (a–d) correspond to the zones highlighted by squares on the left panel. Arrows indicate the characteristic apoptotic features (DNA fragmentation and cytoplasm budding) as described in text.

these one cell-stage-arrested embryos appeared condensed and fragmented (Fig. 7, compare insert a and insert b), whereas the cytoplasm displayed figures of budding (Fig. 7, compare insert c and insert d). At 90 h, the treated embryos underwent cytoplasmic shrinkage (Fig. 7, lane 90 h). To further confirm the occurrence of apoptosis in genotoxic-treated embryos, electron microscopy analysis was conducted (Fig. 8). At 20 h after fertilization, the MMS-treated and bleomycin-treated embryos contained small round bodies surrounded by membranes and containing intact organelles, a characteristic of apoptotic bodies [37, 38].

The molecular hallmark of apoptosis is the activation of cysteine proteases named caspases, which are central regulators of apoptosis [9]. Caspase activity was therefore assayed in extracts from control and genotoxic-treated embryos (Fig. 9). Whereas no significant caspase activity could be detected in control

embryos from 5 to 50 h after fertilization, the MMS-treated embryos displayed a peak of caspase activity at around 20 h after treatment. The specificity of the activity was ascertained by its inhibition in the presence of caspase inhibitor in the incubation medium (Fig. 9).

Thus, over the limit of possible reversion of DNA damage by DNA repair, sea urchin embryos engage a cell death program when they are treated with genotoxics.

Discussion

The results reported here demonstrate for the first time that the complete DNA damage checkpoint pathway is fully functional and activatable during the early divisions of sea urchin embryos. In mammalian cells, alkylating agents (such as MMS), double-strand

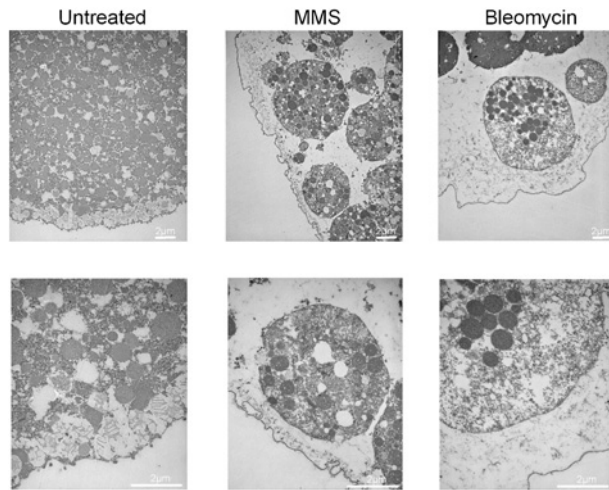


Figure 8. Apoptotic bodies arise in genotoxic-arrested sea urchin embryos. Sea urchin eggs were fertilized and 20 min later the embryos were transferred to fresh seawater in the absence or presence of 10 mM MMS or 10 mM bleomycin for 5 h. Control or treated embryos were then thoroughly washed and further incubated in fresh seawater. At 20 h after fertilization, batches of control eggs (Untreated), 10 mM MMS-treated (MMS) or 10 mM bleomycin-treated (Bleomycin) embryos were processed for transmission electron microscopy observation as described in the Material and methods. Each photograph shows an embryo representative of the population at the related time and treatment. Photographs in the lower lane are 3.2 magnification of the upper lane.

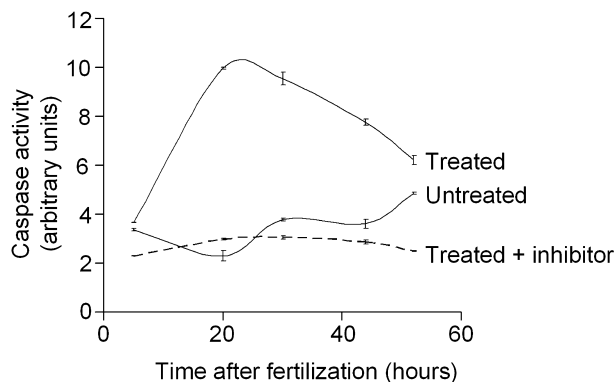


Figure 9. Genotoxics activate caspase in sea urchin embryos. Sea urchin eggs were fertilized and 20 min later the embryos were transferred to fresh seawater in the absence or presence of 10 mM MMS for 5 h. Control or treated embryos were then thoroughly washed and further incubated in fresh seawater. At different times after fertilization, 50- μ l aliquots of pelleted control (Untreated) or 10 mM MMS-treated (Treated) embryos were processed for caspase activity assay as described in the Material and methods. The caspase activity assay was performed in triplicate for each extract in the absence or presence of the caspase inhibitor (Treated + inhibitor). Caspase activity (expressed in arbitrary unit) was measured by the intensity of the fluorescence detected by the photometer.

break inducing agents (such as bleomycin) were shown to activate a complex response known as the DNA damage response, implicating a signal trans-

duction network leading to cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis [7]. Accordingly, we have shown that MMS or bleomycin treatments of sea urchin embryos induce cell cycle delay or arrest as evidenced by the delay or absence of cytokinesis correlated with delay or absence of the peak of CDK1/cyclin B activation and CDK1 tyrosine dephosphorylation. The DNA from treated embryos presents the characteristic lesions described generally for MMS or bleomycin [28, 29]. The embryos are also able to activate the repair of damage, as demonstrated by pulsed-field analysis of the DNA state. In addition, two main DNA repair processes are measurable in embryo extracts: BER, and NHEJ. Finally, in the case of excessive or sustained DNA damage induced by high dose or long exposure time to genotoxics, the embryos switch on the program of cell death, as shown by the appearance of characteristic apoptotic morphological and biochemical features (apoptotic bodies, caspase activity). Therefore, the sea urchin embryo, already used as a relevant model for studies of cell cycle control, is a pertinent and advantageous model for analysis of checkpoints and their regulation. Major challenges in cancer biology are to understand how stem cells transform into cancer stem cells, and how the cancer stem cells generate tumors and cancer (see Introduction). In these processes, main clues may be found by understanding the involvement of cell cycle checkpoints, DNA damage and apoptosis control in the origin of cancerization [10]. Since human stem cell, the most relevant model for such studies, are not readily available and are not synchronized in their division, the sea urchin early development model, which involves authentic stem cells [20], constitutes a powerful alternative and complementary model. Embryonic cells offer the advantage of being naturally dividing stem cells, easily and quantitatively available from sea urchins. They are not affected in their cell cycle regulators in contrast with most available cell lines, which are transformed cells and therefore already affected in the cell cycle checkpoints. Quantitative amounts of cells or cell extracts can be obtained at specific stages of cell division, as also reported for *Xenopus* (reviewed in [39]) and have already been used for biochemical analysis, for instance, extracts reproducing *in vivo* cell cycle regulation [40–43]. Further valuable advantages of the sea urchin embryo model are (1) the experimental facility for phase-specific determination due to the transparency of the embryos, (2) the possibility for functional analysis *in vivo* using fluorescent probes, and (3) the tools provided by the recent availability of the sea urchin complete genome [17] in which the genes were found that are implicated in the cell cycle and the cell cycle checkpoints (CDKs, p21/27, ATM/ATR, Chk1/2, p53, ...) as well as DNA

metabolism [18] and the basic apoptotic machinery (caspases, Apaf-1, IAP and the bcl2 family proteins) [19].

Thus, we propose the sea urchin embryo as a pertinent alternative and complementary model for studies on cell cycle checkpoints and their de-regulation, a feature at the origin of the transformation of a normal cell into a cancerous one.

Acknowledgements. We are very grateful to Delphine Scornet for PFGE technical assistance and Jean Souriman for the development of transmission electron microscopy photographs. We thank Dr. Catherine André (UMR 6061) for the gift of the PFGE instrument. We are grateful to Dr. Jean Rosec and Dr. Christian Berthou for their invaluable help. This work was supported by Conseil Régional de Bretagne, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and Ligue Nationale contre le Cancer. R.L.B. is a doctoral research fellow financed by the Region Bretagne.

- 1 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105 – 111.
- 2 Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. and Berman, D. M. (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324 – 331.
- 3 Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Dobrowolska, H., Wanzeck, J., Reza, R. and Ratajczak, J. (2006) Emerging concept of cancer as a stem cell disorder. *Cent. Eur. J. Biol.* 1, 73 – 87.
- 4 Nowak, M. A., Komarova, N. L., Sengupta, A., Jallepalli, P. V., Shih, I. E., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16226 – 16231.
- 5 Clarke, M. F. and Fuller, M. (2006) Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 124, 1111 – 1115.
- 6 Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629 – 634.
- 7 Zhou, B. B. and Elledge, S. J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433 – 439.
- 8 Norbury, C. J. and Zhivotovskiy, B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 2797 – 2808.
- 9 Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. and Weinert, T. A. (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617 – 656.
- 10 Kastan, M. B. and Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316 – 323.
- 11 Massague, J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298 – 306.
- 12 Sawyers, C. (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432, 294 – 297.
- 13 Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821 – 1828.
- 14 Murray, A. W. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221 – 234.
- 15 Gilbert, S. F. (2000) *Developmental Biology, Part 2, Chapter 7*, Sinauer Associates, Sunderland.
- 16 Masui, Y. (2001) From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of maturation-promoting factor (MPF) and cytosstatic factor (CSF). *Differentiation* 69, 1 – 17.
- 17 Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A. and the Sea Urchin Genome Sequencing Consortium (2006) The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941 – 952.
- 18 Fernandez-Guerra, A., Aze, A., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Cormier, P., Bradham, C., Adams, N., Robertson, A. J., Marzluff, W. F., Coffman, J. A. and Genevriere, A. M. (2006) The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Dev. Biol.* 300, 238 – 251.
- 19 Robertson, A. J., Croce, J., Carbonneau, S., Voronina, E., Miranda, E., McClay, D. R. and Coffman, J. A. (2006) The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* 300, 321 – 334.
- 20 Sell, S. (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 1 – 28.
- 21 Epel, D. (2003) Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. *Evol. Dev.* 5, 83 – 88.
- 22 Hansen, E., Even, Y. and Genevriere, A. M. (2004) The alpha, beta, gamma, delta-unsaturated aldehyde 2-trans-4-trans-decadienal disturbs DNA replication and mitotic events in early sea urchin embryos. *Toxicol. Sci.* 81, 190 – 197.
- 23 Marc, J., Belle, R., Morales, J., Cormier, P. and Mulner-Lorillon, O. (2004) Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol. Sci.* 82, 436 – 442.
- 24 Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and 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.
- 25 Boulben, S., Monnier, A., Le Breton, M., Morales, J., Cormier, P., Belle, R. and Mulner-Lorillon, O. (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.
- 26 Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. and Belle, R. (2002) Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 326 – 331.
- 27 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685.
- 28 Joshi, N. and Grant, S. G. (2005) DNA double-strand break damage and repair assessed by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 291, 121 – 129.
- 29 Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. and Helleday, T. (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 33, 3799 – 3811.
- 30 Collas, P. and Poccia, D. (1998) Methods for studying *in vitro* assembly of male pronuclei using oocyte extracts from marine invertebrates: sea urchins and surf clams. *Methods Cell Biol.* 53, 417 – 452.
- 31 Fan, W. and Wu, X. (2004) DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 1328 – 1333.
- 32 Cabelof, D. C., Raffoul, J. J., Yanamadala, S., Guo, Z. and Heydari, A. R. (2002) Induction of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in response to oxidative stress *in vivo*. *Carcinogenesis* 23, 1419 – 1425.
- 33 Povirk, L. F. (1996) DNA damage and mutagenesis by radio-mimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediyne. *Mutat. Res.* 355, 71 – 89.
- 34 Monnier, A., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S., Belle, R. and Mulner-Lorillon, O. (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.
- 35 Hoeijmakers, J. H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366 – 374.
- 36 Friedberg, E. C. (2003) DNA damage and repair. *Nature* 421, 436 – 440.
- 37 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239 – 257.

- 38 Perl, M., Chung, C. S. and Ayala, A. (2005) Apoptosis. *Crit. Care Med.* 33, S526 – 529.
- 39 Philpott, A. and Yew, P. R. (2005) The *Xenopus* cell cycle: an overview. *Methods Mol. Biol.* 296, 95 – 112.
- 40 Collas, P. (1998) Cytoplasmic control of nuclear assembly. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 581 – 592.
- 41 Collas, P. (2000) Formation of the sea urchin male pronucleus in cell-free extracts. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 265 – 270.
- 42 Gliksman, N. R., Parsons, S. F. and Salmon, E. D. (1993) Cytoplasmic extracts from the eggs of sea urchins and clams for the study of microtubule-associated motility and bundling. *Methods Cell Biol.* 39, 237 – 251.
- 43 Zhang, H. and Ruderman, J. V. (1993) Differential replication capacities of G1 and S-phase extracts from sea urchin eggs. *J. Cell Sci.* 104, 565 – 572.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/CMLS>

Article 2

Le Bouffant, R., P. Cormier, O. Mulner-Lorillon and R. Belle (2006). "Hypoxia and DNA damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP." J Cell Biochem 99(1): 126-32.

Ce travail a pour but d'étudier des modifications des facteurs de traduction en réponse à la mobilisation du point de surveillance.

Cette étude a permis de montrer que lorsque les embryons d'oursin sont soumis, après fécondation, à un stress hypoxique ou lorsqu'ils sont traités par un agent radiomimétique, la bléomycine, un retard de la première division et du développement est observé. De façon intéressante, ce retard est associé à l'expression de la protéine 4E-BP qui avait été dégradée dans les premières minutes suivant la fécondation. L'expression de 4E-BP est observée 1h après l'induction de l'hypoxie. Lorsque le niveau d'oxygène est restauré, les embryons soumis au stress hypoxique reprennent un développement normal et le niveau de 4E-BP redevient bas. Cette observation suggère que 4E-BP est un facteur associé à la survie cellulaire. La protéine 4E-BP est exprimée très tardivement, à 20h dans des embryons traités avec la bléomycine en corrélation avec un développement très retardé par rapport aux témoins. Le niveau de la protéine est fonction de la dose de drogue utilisée.

Cette étude montre pour la première fois, en utilisant le modèle embryonnaire d'oursin, que la mobilisation prolongée du point de surveillance ou un stress hypoxique sont corrélés avec une modification du niveau d'expression de l'inhibiteur de traduction dépendante de la coiffe, 4E-BP.

Hypoxia and DNA-Damaging Agent Bleomycin Both Increase the Cellular Level of the Protein 4E-BP

Ronan Le Bouffant, Patrick Cormier, Odile Mulner-Lorillon, and Robert Bellé*

Equipe Cycle Cellulaire et Développement, Unité de Recherche Mer & Santé, UMR 7150, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Station Biologique de Roscoff 29682 Roscoff Cedex France

Abstract The 4E-binding proteins (4E-BPs) regulate the cap-dependent eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). The level of 4E-BP protein is regulated during early development of sea urchin embryos. Fertilization leads to the rapid disappearance of the protein that reappears later in development. We show that two important cellular stresses, hypoxia and bleomycin prolonged checkpoint mobilization provoked the overexpression of the protein 4E-BP in developing sea urchin embryos. Hypoxia resulted after 1 h in a reversible gradual increase in the protein 4E-BP level. At 20 h, the protein 4E-BP had reached the level existing in the unfertilized eggs. Bleomycin used as a DNA-damaging agent for checkpoint activation, provoked cell cycle inhibition and after prolonged exposure (20 h), induced the expression of the protein 4E-BP. The effect of bleomycin on 4E-BP protein overexpression was dose-dependent between 0.4 and 1.2 mM. The role of the overexpression of the protein 4E-BP is discussed in relation with cellular stress responses. *J. Cell. Biochem.* 99: 126–132, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: 4E-BP; hypoxia; bleomycin radiomimetic; cell cycle checkpoint; sea urchin early development

Hypoxia is insufficient oxygen delivery for the demand of the tissue and cellular hypoxia can arise from physiological circumstances such as exercise or travel to high elevation, as well as from pathophysiological conditions such as poorly formed tumor vasculature [review in Papandreou et al., 2005; Wouters et al., 2005]. The investigation of the hypoxia cellular response is of great importance since hypoxia impacts normal development, wound healing, and the malignant progression of a solid tumor. The cellular response to hypoxia depends on the severity of the hypoxic insult, and may result in complex gene expression changes designed to maintain cellular and tissue viability by involvement of transcriptional and post-transcriptional events. Severe hypoxia has cell cycle adverse effects and provokes apoptosis [review in Hammond and Giaccia, 2005]. Many

results have been obtained in the past decade on the cellular mechanisms of hypoxia response [review in Papandreou et al., 2005]. Response to hypoxia is driven in a large part by a transcriptional program initiated by stabilization of hypoxia-inducible factors (HIF), which promote both angiogenesis and cell survival [reviews in Guillemin and Krasnow, 1997; Semenza, 2003; Cummins and Taylor, 2005; Wouters et al., 2005]. The hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) activates transcription of genes that are involved in crucial aspects of cancer biology and its discovery has opened an attractive field in anticancer therapeutics since inhibition of HIF-1 activity was shown to have marked effects on tumor growth [review in Semenza, 2003].

Beside HIF stabilization, hypoxia also results in all cell lines tested to date, in a rapid inhibition of protein synthesis, which occurs through the repression of the initiation step of mRNA translation [review in Wouters et al., 2005]. Inhibition of translation has been found to be mediated by two distinct mechanisms involving on the one hand the eukaryotic initiation factor eIF2 α and on the other hand the eukaryotic initiation factor, eIF4E [Wouters

*Correspondence to: Robert Bellé, Station Biologique, Place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France.
E-mail: belle@sb-roscoff.fr

Received 1 December 2005; Accepted 20 January 2006

DOI 10.1002/jcb.20856

© 2006 Wiley-Liss, Inc.

et al., 2005]. The eukaryotic initiation factor, eIF4E, is implicated in cap-dependent translation and serves as a major control point for regulating the efficiency of mRNA translation by the cell [review in Richter and Sonenberg, 2005]. The eIF4E factor is the rate-limiting element of cap-dependent translation and is regulated by the small 4E-binding protein family, 4E-BPs [Pause et al., 1994; Haghighat et al., 1995]. The availability of eIF4E protein has been involved in the hypoxia responses in part by the phosphorylation of the 4E-BPs [review in Wouters et al., 2005]. Hypoxia negatively regulates the protein kinase mTOR resulting in the decrease of the phosphorylation of 4E-BP leading to its reassociation to eIF4E and the consequent inhibition of cap-dependent translation [Wouters et al., 2005]. No effect of hypoxia on the synthesis or level of 4E-BP has yet been described. Sea urchin early embryos contain a small 4E-BP protein of 16 kDa [Cormier et al., 2001] which is, as in mammalian cells under the control of the protein kinase mTOR [Salaun et al., 2003, 2004]. Early development of sea urchin is characterized by rapid cell divisions and a large increase in protein synthesis independent of transcription [Davidson, 1986; Epel, 1990; Gilbert, 2003]. The 4E-BP is fully degraded shortly after fertilization in correlation with the cap-dependent protein synthesis increase [Salaun et al., 2003]. Therefore, sea urchin early development offers the opportunity to analyze new insights into the regulation of 4E-BP under hypoxic stress.

In addition to regulation of translation and translation factors [review in Epel, 1990; Mathews et al., 2000], sea urchin early development allows the study of cell cycle regulation [Evans et al., 1983; Epel, 1990; Nurse, 2002]. It is noteworthy that sea urchin embryo contains the DNA-damage checkpoint of the cell cycle [Marc et al., 2002; 2004a,b]. The cell cycle checkpoint refers to mechanisms by which the cell actively halts progression through the cell cycle until it can ensure that an earlier process, such as DNA replication or mitosis, is complete [review in Hartwell and Kastan, 1994; Kastan and Bartek, 2004; Van Vugt et al., 2005]. Since hypoxia may induce DNA-damage checkpoint activation through reactive oxygen species (ROS) production [Barzilai and Yamamoto, 2004], it was of interest to compare the hypoxia response of the embryos with a DNA-damaging agent. We used bleomycin, a radiomimetic [Povirk, 1996] shown

to be an efficient DNA-damage checkpoint inducer. Bleomycin provokes DNA double-strand breaks mobilizing the ATM pathway [Scott and Zampetti-Bosseler, 1985; Kaufmann and Kies, 1998] and producing ROS [Barzilai and Yamamoto, 2004]. The radiomimetic bleomycin provokes both G2 cell cycle delay and apoptosis in mammalian cells as a result of the checkpoint activation [Kaufmann and Kies, 1998; Vernole et al., 1998]. Interestingly, the 4E-BP protein was shown to be regulated by ATM phosphorylation under cell growth condition [Yang and Kastan, 2000].

We show here for the first time, that hypoxia and the radiomimetic drug bleomycin both induce expression of the protein 4E-BP. Therefore, the protein 4E-BP provides a molecular link between hypoxia cellular response and prolonged activation of the cell cycle DNA-damage checkpoint.

MATERIALS AND METHODS

Handling of Eggs and Embryos

Sphaerechinus granularis sea urchins were collected in the Brest area and maintained in running seawater. Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Eggs were collected in 0.22- μ m Millipore-filtered seawater, rinsed twice and suspended in filtered seawater containing 0.1% glycine. Diluted sperm was added to the eggs and withdrawn after fertilization membrane elevation. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization and each experiment used eggs from a single female [Marc et al., 2002].

DNA Staining

At various times after fertilization, 0.2 ml aliquots of the embryos suspension were fixed overnight in 1 ml methanol/glycerol (3:1 v/v) in the presence of the DNA dye Hoechst (bisbenzimidide: 0.1 μ g/ml), were mounted in 50% glycerol and observed under fluorescence microscopy [Marc et al., 2002].

Embryo Treatments

For bleomycin treatment, eggs were dejellied by swirling 30 s in pH 5.0 filtered seawater, and rinsed twice in fresh seawater prior to fertilization. Twenty minutes post-fertilization, bleomycin (Aventis) was added to the incubation medium at the indicated concentration. Bleomycin was

removed from the incubation medium by rinsing the embryos twice in fresh seawater.

Hypoxia (oxygen level under 2 mg/l) was induced by incubation of the embryos 10 min post-fertilization, at the indicated dilution, in a closed chamber device preventing oxygen turnover. To relieve from hypoxia, the device was opened. Oxygen concentration in the embryos suspension was measured with oxygen electrodes DW3 Clark-type, Hansatech Instruments, King's Lynn, UK [Kupper et al., 2001].

Embryo Extracts and Protein Analysis

At different times following fertilization, whole embryo extracts were obtained by homogenization of 30 μ l pelleted cells in 100 μ l of buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 [Boulben et al., 2003].

Western Blot Analyses

Electrophoretic resolution of proteins was performed under SDS denaturing conditions on a 15% polyacrylamide gel according to Laemmli [1970]. Proteins were electro-transferred from the gel onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). The membranes were saturated overnight in tris buffer saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 10% skimmed milk. The protein 4E-BP was analyzed using rabbit polyclonal antibodies directed against human 4E-BP2 [Rousseau et al., 1996] used at 1:1,000. Rabbit polyclonal anti human actin (20–33, Sigma) was used at a 1:500 dilution. Secondary peroxidase conjugated antibodies (goat anti rabbit IgG antiserum, DAKO) were used at 1:5,000. Revelation was done by ECL method according to the manufacturer instruction (Amersham).

RESULTS

Effect of Hypoxia on the level of 4E-BP Expression

We took advantage of the physiological disappearance of the protein 4E-BP shortly after fertilization in sea urchin [Salaun et al., 2005] to analyze the effect of hypoxia on the level of the protein. Figure 1 illustrates the cellular level of the 4E-BP protein as judged from immunoblotting experiments using specific anti-4E-BP antibodies at different times following fertilization. The 16 kDa protein 4E-BP rapidly disappeared and slowly reappeared

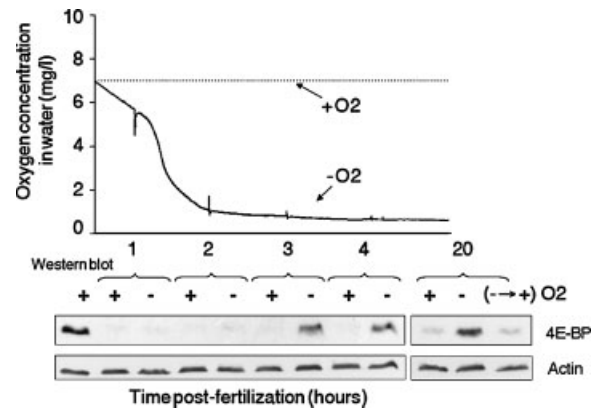


Fig. 1. Hypoxia regulates the protein 4E-BP expression in sea urchin embryo. Sea urchin eggs (15% suspension) were fertilized and after 10 min, placed in a closed chamber ($-O_2$), or in an open chamber ($+O_2$). At 4 h, part of the embryos in the closed chamber was transferred in an open chamber ($- \rightarrow +$) to restore oxygen level (~ 7 mg/l). Oxygen level was measured with a Clark electrode. At the indicated time after fertilization whole protein extracts were performed and analyzed after electrophoresis for the presence of 4E-BP by immunoblotting. Immunoblotting with anti-actin antibodies was used as a loading control. NF: unfertilized eggs.

in the control embryos in concordance with previous results [Salaun et al., 2005]. In the hypoxia condition, which occurred after 2 h as judged from the oxygen concentration in seawater (below 2 mg/l), the reappearance of 4E-BP occurred at 3 h post-fertilization, that is, as early as 1 hour after hypoxia condition. At 20 h post-fertilization, whereas the expression of 4E-BP in the control embryos was barely detectable, the level of the protein in the hypoxia embryos was comparable to the initial level in the unfertilized embryos (Fig. 1). Correlatively, we observed a delay in early development in the hypoxia conditions both in the kinetic of cell divisions and hatching event (data not shown). Nonetheless, no sign of cytolysis, or apoptosis was observed under phase contrast microscopic analysis. When the embryos were replaced after 4 h under normal conditions, almost all of the embryos fully recovered progression in early development and the level of 4E-BP returned after 20 h to the basal level observed in untreated embryos (Fig. 1; right side). When hypoxia was applied 30 h post-fertilization, hatching was inhibited, gastrulation did not occur and again, 4E-BP protein expression was induced and reached the initial unfertilized egg level 20 h later (data not shown). Therefore, hypoxia induced 4E-BP protein expression in sea urchin embryos.

Bleomycin Impedes Sea Urchin Early Development

The radiomimetic bleomycin, known to affect the DNA-damage checkpoint of mammalian cell cycle (see Introduction) was applied to sea urchin embryos. When bleomycin was added to embryos 20 min post-fertilization, a delay in the first cell cycle was observed as judged by the occurrence of the first cleavage under phase contrast microscope (Fig. 2). The delay in cell cycle was dependent on the concentration of bleomycin (Fig. 2). Therefore, sea urchin cell cycle is affected by the radiomimetic as reported for mammalian cells involving a mobilization of the DNA-damage checkpoint, which results in a delay in the cell cycles [Kaufmann and Kies, 1998]. Analysis of the morphology of chromatin using Hoechst dye showed that the evolution of chromatin correlated with the delay observed in the first cleavage (Fig. 3). The delay in cell cycle judged as the number of nuclei was again dependent on the concentration of bleomycin (Fig. 3; compare the time at which one DNA spot separated into two, and the time at which the two DNA spots separated into four). After 20 h in bleomycin, when the control embryos had reached blastula stage, the bleomycin-treated cells were strongly delayed in development. The number of cells was estimated as the number of individual nuclei labeled spots. Control embryos contained around 300 cells, and bleomycin-treated embryos 150, 67, and 26 cells for concentrations of bleomycin of respectively 0.4, 0.8, and 1.2 mM (Fig. 3). Bleomycin-treated embryos, therefore, perform one to three less rounds of cell division compared to control. When bleomycin was removed from the incubation medium at 3 h post-

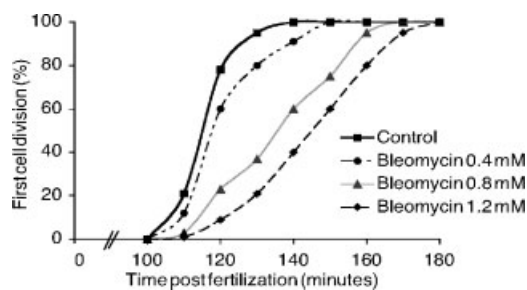


Fig. 2. Bleomycin affects the kinetic of the first cell division. Sea urchin eggs were fertilized. The embryos (5% suspension) were left in fresh seawater (control: continuous line) or treated (dotted line) after 20 min with various concentrations of bleomycin. At the indicated times, embryos (batches of one hundred) were scored by phase contrast microscopy for the first cell division.

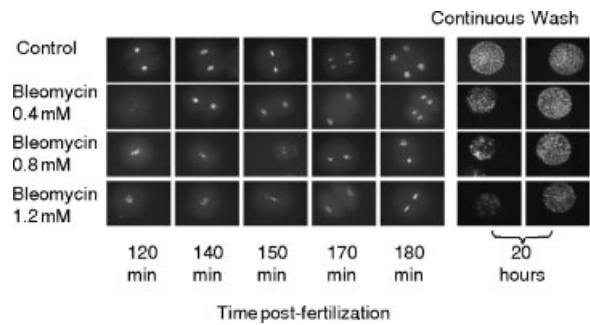


Fig. 3. Bleomycin delays early development. Sea urchin eggs were fertilized (5% suspension) and treated after 20 min with various concentrations of bleomycin. At the indicated time after fertilization, the chromatin state was observed by fluorescence microscopy of Hoechst stained embryos. Continuous: embryos treated by bleomycin during 20 h. Wash: embryos treated by bleomycin during 3 h, washed twice and transferred in fresh seawater.

fertilization, all the embryos recovered cell cycles upon further incubation in fresh seawater as shown at 20 h post-fertilization (Fig. 3; wash column compared to continuous column). The embryo recovery is indicative of a release in cell cycle inhibition due to release of the DNA-damage checkpoint effect [Lukas et al., 2004; Van Vugt et al., 2005]. As seen in Figure 3, recovered embryos conserved the initial delay induced by the radiomimetic (Fig. 3; compare 180 min evolution and 20 h evolution). Altogether, the radiomimetic bleomycin reversibly affects cell cycles of the sea urchin embryo most probably by the mobilization of the DNA-damage checkpoint of the cell cycle.

Bleomycin Induces Expression of the Protein 4E-BP

We investigated the effect of the bleomycin-induced stress on the level of 4E-BP protein. The level of 4E-BP protein was analyzed in the bleomycin-treated embryos and compared to the control embryos. As shown in Figure 4A, the disappearance of 4E-BP post-fertilization was observed (Fig. 4A; lanes b and c). Whereas the level of 4E-BP protein at 20 h was barely detectable in the control embryos, strikingly, 4E-BP was overexpressed in the bleomycin-treated (0.4 mM) embryos to a level comparable to the level in the unfertilized egg. In the embryos washed from bleomycin at 3 h post-fertilization, the level of 4E-BP protein was only slightly higher than the level in the control embryos (Fig. 4; lanes c.w and b.w). Since the embryos are released from the cell cycle

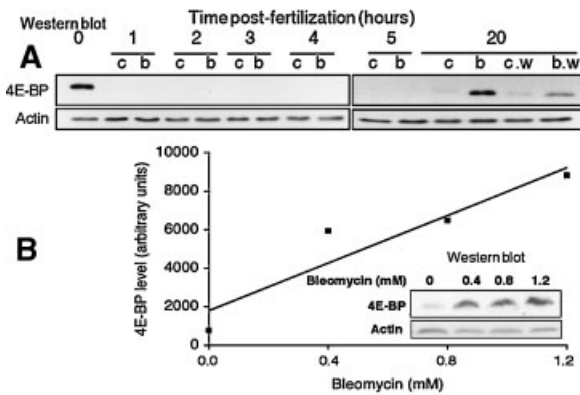


Fig. 4. Bleomycin affects expression of the protein 4E-BP. Sea urchin eggs (5% suspension) were fertilized and treated or not after 20 min with bleomycin. **A:** The embryos were treated with 0.4 mM bleomycin. Whole protein extracts from control embryos (c) or treated embryos (b) were prepared at different times and analyzed by immunoblotting with anti-4E-BP and anti-actin antibodies as described in materials and methods. Half of the embryos (w) were washed twice at 3 h post-fertilization and further incubated prior to immunoblotting analysis. **B:** The embryos were treated with 0.4, 0.8, or 1.2 mM bleomycin. Whole protein extracts were performed at 20 h and analyzed by immunoblotting with anti-4E-BP and anti-actin antibodies as described in materials and methods. The quantification of 4E-BP level from the immunoblots is indicated in arbitrary units as a function of bleomycin concentration. Insert: immunoblots.

inhibition under these conditions (see Fig. 3), high level of 4E-BP protein in the bleomycin-treated embryos is correlated with the maintenance of delayed early development. The level of 4E-BP protein was analyzed (Fig. 4B) in the embryos treated with varying concentration of bleomycin (0.4, 0.8, and 1.2 mM) by densitometric measurement of the 4E-BP signal on the immunoblots (Fig. 4B; insert). The expression of 4E-BP protein was proportional to the concentration of bleomycin (Fig. 4B), and therefore to the extent of the delay in early development (see Fig. 3). We, therefore, establish that bleomycin-induced stress of sea urchin embryos leads to expression of the protein 4E-BP.

DISCUSSION

The protein 4E-BP of sea urchin embryo was shown to be regulated at the level of its expression. First, 4E-BP decreased shortly after fertilization liberating the factor eIF4E for protein translation [Salaun et al., 2003, 2005]. Later in development, 4E-BP gradually reappeared from 10 h post-fertilization, and associated to eIF4E [Salaun et al., 2005]. We demonstrate that hypoxia induces a strong

reversible overexpression of the 4E-BP protein. Using the radiomimetic bleomycin, we show that the first cell cycles of sea urchin early development are under the control of the DNA-damage checkpoint. The action of bleomycin was reversible indicating that the checkpoint could release the cell cycle blockage, a property of the checkpoint function [review in Van Vugt et al., 2005]. In the case of prolonged bleomycin stress, the expression of the protein 4E-BP was found to be strongly induced. Expression of 4E-BP was dose-dependent on bleomycin concentration and was mostly prevented when the embryos were removed from the drug. Therefore, 4E-BP expression appears to be a common feature of the hypoxic response on the one hand and of prolonged DNA-damage checkpoint mobilization on the other hand (Fig. 5). How the protein 4E-BP is upregulated under the stress conditions of hypoxia and DNA-damage checkpoint prolonged mobilization remains to be elucidated. Hypoxia and the radiomimetic bleomycin may both induce oxidative stress via ROS production [Barzilai and Yamamoto, 2004]. This effect may be related to the dFOXO regulation of 4E-BP in *Drosophila* [Tettweiler et al., 2005]. The upregulation of 4E-BP, shown to be critical for survival under dietary restriction and oxidative stress resistance [Tettweiler et al., 2005] would function as a metabolic brake under stress conditions [Teleman et al., 2005]. Thus, the role of 4E-BP expression could be to buffer the amount of eIF4E and by that way impede cap-dependent protein translation, limiting energy spending, and assuring the survival of the cells (Fig. 5). Interestingly, in that context, 4E-BP would be a stress-induced protein necessary for cell survival. Another consequence of 4E-BP expression could be to participate in the apoptotic issue of the stressed cells (Fig. 5). It should be noted that hypoxia may lead to p53-mediated apoptosis [Hammond and Giaccia, 2005] and that DNA-damage checkpoint activation may also lead to apoptosis when DNA repair is not efficient [Hartwell and Kastan, 1994; Kastan and Bartek, 2004; Van

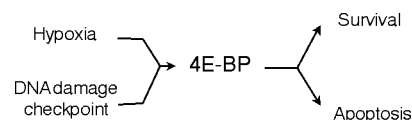


Fig. 5. Schematic model for 4E-BP implication in hypoxia and prolonged DNA-damage checkpoint mobilization (see text for details).

Vugt et al., 2005]. The apoptotic function of the protein 4E-BP through its association with eIF4E was suggested in mammalian cells [Clemens et al., 2000; Holcik and Sonenberg, 2005; Morley et al., 2005] and makes this attractive hypothesis of general concern. Whatever the role in cell survival or apoptosis, for the protein 4E-BP overexpression, its upregulation could result in preferential translation of mRNAs, which translate in a cap-independent manner, via an internal ribosome entry site (IRES) as documented under various stress conditions including irradiation and hypoxia [Holcik et al., 2000].

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Sandrine Boulben for expert technical assistance. We thank Dr. Philippe Potin (UMR 7129-Roscoff) for providing the hypoxia device. We are grateful to Dr. Jean Rosec and Dr. Christian Berthou for their precious help. We are grateful to Professor Nahum Sonenberg for the generous gift of anti-4E-BP antibody. This work was supported by Conseil Régional de Bretagne, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and Ligue Nationale contre le Cancer. RLB is doctoral research fellow financed by the Region Bretagne.

REFERENCES

- Barzilai A, Yamamoto K. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 3(8–9):1109–1115.
- Boulben S, Monnier A, Le Breton M, Morales J, Cormier P, Belle R, Mulner-Lorillon O. 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.
- Clemens MJ, Bushell M, Jeffrey IW, Pain VM, Morley SJ. 2000. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ* 7(7):603–615.
- 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(2):275–283.
- Cummins EP, Taylor CT. 2005. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450(6):363–371.
- Davidson EH. 1986. *Gene activity in early development*. Orlando: Academic Press. XIV, 670 p.
- 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.
- Gilbert SF. 2003. *Developmental biology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. XVII, 838 p.
- Guillemin K, Krasnow MA. 1997. The hypoxic response: HIF1 and HIF2. *Cell* 89(1):9–12.
- 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.
- Hammond EM, Giaccia AJ. 2005. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 331(3):718–725.
- Hartwell LH, Kastan MB. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* 266(5192):1821–1828.
- Holcik M, Sonenberg N. 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4):318–327.
- Holcik M, Sonenberg N, Korneluk RG. 2000. Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* 16(10):469–473.
- Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015):316–323.
- Kaufmann WK, Kies PE. 1998. DNA signals for G2 checkpoint response in diploid human fibroblasts. *Mutat Res* 400(1–2):153–167.
- Kupper FC, Kloareg B, Guern J, Potin P. 2001. Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol* 125(1):278–291.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J. 2004. Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3(8–9):997–1007.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Belle R. 2002. Pesticide roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem Res Toxicol* 15(3):326–331.
- Marc J, Belle R, Morales J, Cormier P, Mulner-Lorillon O. 2004a. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol Sci* 82(2):436–442.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Belle R. 2004b. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol Cell* 96(3):245–249.
- Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. 2000. Origins and principles of translational control. In: Sonenberg N, Hershey J, Mathews M, editors. *Translational control of gene expression*. New York: CSHL Press. pp 1–31.
- Morley SJ, Coldwell MJ, Clemens MJ. 2005. Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ* 12(6):571–584.
- Nurse P. 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem* 3(7):596–603.
- Papandreou I, Powell A, Lim AL, Denko N. 2005. Cellular reaction to hypoxia: Sensing and responding to an adverse environment. *Mutat Res* 569(1–2):87–100.
- 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(6500):762–767.
- Povirk LF. 1996. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: Bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* 355(1–2):71–89.

- Richter JD, Sonenberg N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433(7025):477–480.
- Rousseau D, Gingras AC, Pause A, Sonenberg N. 1996. The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* 13(11):2415–2420.
- 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(2):428–439.
- Salaun P, Le Breton M, Morales J, Belle R, Boulben S, Mulner-Lorillon O, 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(2):347–357.
- Salaun P, Boulben S, Mulner-Lorillon O, Belle R, Sonenberg N, Morales J, 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(Pt 7):1385–1394.
- Scott D, Zampetti-Bosseler F. 1985. Relationships between chromosome damage, cell cycle delay and cell killing induced by bleomycin or X-rays. *Mutat Res* 151(1):83–88.
- Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10):721–732.
- 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.
- van Vugt MA, Bras A, Medema RH. 2005. Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt. *Cancer Res* 65(16):7037–7040.
- Vernole P, Tedeschi B, Caporossi D, Maccarrone M, Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M. 1998. Induction of apoptosis by bleomycin in resting and cycling human lymphocytes. *Mutagenesis* 13(3):209–215.
- Wouters BG, van den Beucken T, Magagnin MG, Koritzinsky M, Fels D, Koumenis C. 2005. Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. *Semin Cell Dev Biol* 16(4–5):487–501.
- 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.

Article 3

Le Bouffant, R., O. Mulner-Lorillon, J. Morales, P. Cormier and R. Belle.

"Chromium(III) triggers the DNA-damaged checkpoint of the cell cycle and induces a functional increase of 4E-BP." *Under revision in Chemical Research in Toxicology*

Parmi les agents capables d'induire la mobilisation du point de surveillance du cycle cellulaire, nous avons observé que le Chrome(III), un métal lourd, connu notamment pour sa capacité à endommager l'ADN entraîne un retard (pour les doses faibles) ou un arrêt (pour les doses fortes) du cycle cellulaire, et l'apoptose dans la première division de l'embryon d'oursin. De plus, comme l'hypoxie et la bléomycine ([Article 2](#)) le chrome induit une expression de la protéine 4E-BP, de façon dépendante de la dose de chrome(III) utilisée.

Dans cet article, nous avons étudié la régulation et le rôle de la protéine 4E-BP exprimée en réponse à la mobilisation du point de surveillance induit par un métal lourd, le chrome. L'accent est mis sur l'activité fonctionnelle de 4E-BP au niveau des interactions avec ses partenaires mais également à un niveau plus général d'inhibition de la synthèse protéique.

L'expression de la protéine 4E-BP après induction des dommages cellulaires est liée à une régulation traductionnelle et non transcriptionnelle. Lorsque la protéine 4E-BP est exprimée, elle est fonctionnelle, capable de s'associer à eIF4E, induisant ainsi la dissociation de la protéine eIF4G, et donc la dissociation du complexe eIF4F, responsable de l'initiation de la plupart des ARNm. Des analyses de la synthèse protéique ont permis de montrer qu'une inhibition de la synthèse protéique est corrélée à l'expression de la protéine 4E-BP.

Ces travaux permettent de mettre en évidence la régulation et la fonctionnalité de la protéine 4E-BP dans un contexte de mobilisation du point de surveillance induite par l'exposition au chrome(III).

Chromium(III) triggers the DNA-damaged checkpoint of the cell cycle and induces a functional increase of 4E-BP.

Journal:	<i>Chemical Research in Toxicology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Le Bouffant, Ronan; UMR7150 CNRS-UPMC, Cell cycle and development Mulner-Lorillon, Odile; UMR7150 CNRS-UPMC, Cell cycle and development; UMR7150, Cell cycle control Morales, Julia; UMR7150 CNRS-UPMC, Cell cycle and development Cormier, Patrick; UMR7150 CNRS-UPMC, Cell cycle and development Bellé, Robert; UMR7150 CNRS-UPMC, Cell cycle and development



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Chromium(III) triggers the DNA-damaged checkpoint of the cell cycle and induces a functional increase of 4E-BP.

Ronan Le Bouffant, Odile Mulner-Lorillon, Julia Morales, Patrick Cormier and Robert Bellé.

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 Mer & Santé; Université Pierre et Marie
Curie-Paris6, UMR 7150; Equipe Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique, Roscoff,
F-29682 France.

e-mail: belle@sb-roscoff.fr

RECEIVED DATE

TITLE RUNNING HEAD: Chromium, cell cycle and 4E-BP

Corresponding author: Professor Robert Bellé Station Biologique, place George Teissier, BP 74,
29682 Roscoff Cedex, France. Tel: +33 (0) 2 98 29 23 46; fax: +33 (0) 2 98 29 23 06.

1
2
3
4 ABSTRACT
5
6
7

8 Using sea urchin early embryo as a pertinent model, chromium(III) provoked cell cycle arrest
9 and induced apoptosis. The molecular machinery of translation initiation was investigated. At
10 concentration inducing the apoptotic response (1mM), chromium provoked the early synthesis of
11 4E-BP, the natural regulator of the cap-dependent initiation factor 4E (eIF4E). Neosynthesized 4E-
12 BP was functional for physiological eIF4E binding, removal of eIF4E from the initiation factor
13 eIF4G and almost full inhibition of cap-dependent translation *in vivo*.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 KEYWORDS cell cycle checkpoint/apoptosis/4E-BP/sea urchin early development/translation.
25
26

27 BRIEFS: Chromium(III) induces cell cycle arrest and apoptosis associated with an early synthesis of
28 functional 4E-BP a regulator of translation.
29
30
31
32
33
34

35 Introduction
36
37

38 The heavy metal chromium is a well-known environmental and industrial pollutant for its use
39 in welding, chrome plating, chrome pigmentation, ferrochrome industry and leather tanning (1-3).
40 Adverse human health effects of chromium have been described and are abundantly documented,
41 among which carcinogenesis that can lead to cancer in humans (4-7). The primary effect of
42 chromium(III) is DNA damage (2, 8) and the carcinogenicity is initiated by affecting the DNA-
43 damage checkpoints of the cell cycle leading to genomic instability (9-12). Apoptosis, the cellular
44 response in the case of DNA repair failure (13, 14) is induced by the heavy metal (9-11, 15).
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 Marine invertebrates, among which sea urchins, have contributed to the acquisition of the
55 current concepts in the field of cell cycle regulation (16-18) and protein translation regulation (19).
56 Two concepts have emerged in cancer biology, one that failure in the DNA-damage checkpoint is
57 responsible for acquisition of genetic instability (20-24), the second that cancer first emerges in stem
58
59
60

1
2
3 cells (25-27). The sea urchin early development model appears then even more accurate since the
4
5 zygote and the first embryonic cells are the primary stem cells and the early embryonic cells possess
6
7 a functional DNA-damage checkpoint including the pathways for cell cycle arrest, DNA repair and
8
9 apoptotic pathway in the case of repair failure (28). Sea urchin early development allows
10
11 experiments in naturally highly synchronized dividing cells following fertilization and is an
12
13 alternative complementary model to stem cells which may be obtained readily (29), but whose
14
15 divisions are much longer and necessitate drugs for synchronization. Extracts for biochemical and
16
17 immunological analysis can be prepared in convenient amounts from sea urchin embryos at precise
18
19 time of cell division. After completion of the meiotic division, the female gamete is arrested in G1
20
21 phase of the cell cycle. Upon external fertilization in seawater, embryos enter synchronously into the
22
23 G1 to S transition of the first cell division. Cells undergo the G2 to M transition in 100 to 120
24
25 minutes. Rapid cell cycles occur during the rapid cleavage phase leading to the morula stage at 5-6
26
27 hours of development in a post-transcriptional independent process. The blastula stage occurs around
28
29 16-20 hours and the embryos become mobile by transcription and translation of the hatching enzyme
30
31 (30).
32
33
34
35
36
37

38
39 The sea urchin embryo has for long been used for the study of protein translation and the factors
40
41 involved in all steps of the protein synthesis machinery (31, 32). Since sea urchin early development
42
43 is independent of transcriptional control and relies on pre-existing mRNAs, the contribution of
44
45 protein synthesis regulation in gene expression can be studied in embryos independently of
46
47 transcriptional regulation (19, 32). Fertilization triggers a 10-30 fold increase in protein synthesis
48
49 (33, 34) required for the onset of the M-phase and subsequent embryonic cell cycles (35, 36) and
50
51 which involves both an increase of initiation and elongation rates of translation (37). The initiation
52
53 rate of translation relies on the binding of the protein eIF4E, eukaryotic initiation factor 4E, on the
54
55 m⁷GTP cap structure of the mRNAs (38). A stable ternary complex is formed with eIF4A,
56
57 eucaryotic initiation factor 4A, a DEAD family RNA helicase (39) and eIF4G, eucaryotic initiation
58
59 factor 4G, a scaffolding protein (38, 40). The eIF4E binding inhibitory proteins, 4E-BPs were
60

1
2
3 discovered as important regulators of translation through their regulation of eIF4E-eIF4G interaction
4 (41). They are members of an increasing family of eIF4E inhibitory proteins with immense
5 biological importance for affecting such processes as cell growth, development, repression of tumor
6 formation and for influence on axon guidance and synaptic plasticity (42). In sea urchin, the 4E-BP
7 so far characterized corresponds to the small 4E-BPs 1, 2 and 3 of mammals, closer in sequence to
8 mammalian 4E-BP2 and is encoded by a unique gene in the sea urchin *Strongylocentrotus*
9 *purpuratus* (43, 44) whose complete genome was recently obtained (45). The low level of protein
10 synthesis in sea urchin unfertilized eggs is due to repression of the translation machinery at least in
11 part by the binding of 4E-BP to eIF4E making the cap-binding protein unavailable to eIF4G (46).
12 After fertilization, 4E-BP dissociates from eIF4E and is degraded in 15 minutes (43, 47, 48). The
13 cap binding protein eIF4E then binds to eIF4G (46) allowing the increase in cap-dependent
14 translation. The level of the protein 4E-BP remains low for several hours after fertilization (47).
15 Furthermore it has been shown that 4E-BP could be induced in the sea urchin embryo upon
16 treatment with the radiomimetic bleomycin or under hypoxic stress (49). Therefore, sea urchin early
17 development offers the experimental opportunity to study translation regulation in this original
18 context.

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 Using the sea urchin early development as a pertinent experimental model, we show here
42 that chromium(III) inhibits cell cycle progression and induces the apoptotic response, two hallmarks
43 of the DNA-damaged cell cycle checkpoint. Furthermore we demonstrate that chromium provokes
44 the early synthesis of the 4E binding protein (4E-BP) functionally active as an inhibitor of cap-
45 dependent translation *in vivo*.
46
47
48
49
50
51

52 53 54 55 **Materials and Methods**

56 57 **Chemicals**

58
59
60 Chromium(III) chloride, hexahydrate (CrCl₃), Emetine, Actinomycin D were purchased from
Sigma. Acetyl-DEVD-4-methyl-coumaryl-7-amide (Ac-DEVD-MCA) and Acetyl-DEVD-aldehyde

1
2
3 (Acetyl-DEVD-CHO) were obtained from BD Bioscience. [35S]-L-methionine and 7-methylGTP-
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Handling and treatment of Eggs and Embryos

The sea urchins *Sphaerechinus granularis* were collected in the Brest area and maintained in running seawater. Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Eggs, collected in 0.22- μ m Millipore-filtered seawater, were dejellied by swirling for 30 s in acidified seawater (pH 5), rinsed twice in fresh seawater and suspended in filtered seawater at 5% (v/v) dilution. Diluted sperm was added to the eggs and withdrawn after 5 min. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization. Each experiment used gametes and eggs from a single female (49). At 20 minutes after fertilization, Chromium was added to the incubation medium at the indicated concentration from a 100 mM stock solution in seawater. When required, emetine (10 mM stock solution in seawater) and Actinomycin D (10 mg/ml in ethanol) were added to the incubation medium at 60 minutes after fertilization.

Cytological Analysis

Embryos were cultured at 16°C under constant stirring and observed at time intervals by phase contrast microscopy for developmental progression. Thousands of embryos were incubated for each experimental determination from which around 100 were scored for the developmental stage. At various times after fertilization, 0.2 ml aliquots of the embryo suspension were fixed overnight in 1

1
2
3 ml of methanol/glycerol (3:1, v/v) in the presence of the DNA dye Hoechst (bisbenzimidazole, 0.1
4
5 $\mu\text{g/ml}$), mounted in 50% glycerol and observed under fluorescence microscopy (49).
6
7
8
9

10 **Embryo extracts and protein analysis**

11
12 Whole embryo extracts were obtained by homogenization of 30 μl of pelleted cells at different
13 times following fertilization, in 100 μl of buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10%
14 glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8 (51).
15
16
17

18
19 Protein extracts for $m^7\text{GTP}$ purification and synthesis analysis were prepared as already described
20 (52) from 500 μl of pelleted control or treated embryos. Embryos were lysed in one cell volume of
21 2X binding buffer (40 mM HEPES pH 7.4, 100 mM β -glycerophosphate, 0.2 mM sodium
22 orthovanadate, 100 mM NaF, 20 mM tetrasodium pyrophosphate, 0.4 mM EDTA, 2 mM DTT, 100
23 mM NaCl, 100 mM AEBSF, and 20 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin and leupeptin).
24
25
26
27
28
29
30
31

32
33 Protein extracts for caspase activity were prepared from 1 ml of pelleted control or treated
34 embryos (28). Pellets were suspended in 500 μl ice-cold buffer A (100 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM
35 dithiothreitol) and homogenized by short sonication (5 sec, amp. 40). Embryo extracts were clarified
36 by a 14,000 x g centrifugation for 15 min at 4°C.
37
38
39
40
41
42

43 **Isolation of eIF4E and associated proteins**

44
45 Isolation of eIF4E and its partners from egg extracts was performed using $m^7\text{GTP}$ beads as
46 described previously (52). Lysates obtained as described above were centrifugated for 15 minutes at
47 14,000 x g at 4°C. Aliquots (2 mg proteins) were mixed with 25 μl of $m^7\text{GTP}$ -Sepharose beads.
48
49 After 60 minutes incubation at 4°C, the beads were washed three times with 1 ml of 1x binding
50 buffer, described above, containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was added directly to the
51 beads and purified proteins were analyzed by Western blot after electrophoretic resolution.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Protein synthesis *in vivo*

1
2
3 Batches (1 ml) of unfertilized eggs or embryos were taken at different times after fertilization and
4 incubated in the presence [³⁵S]-L- methionine during 1 hour at the final concentration of 10 μ Ci/ml.
5
6
7 Protein extracts were prepared as described upper and [³⁵S]-L-Methionine incorporation into
8
9 proteins was measured on duplicate aliquots after 10% TCA precipitation on Whatman 3M filters
10
11 and counting in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid. Qualitative analysis of the
12
13 neosynthesized proteins was performed after electrophoretic resolution by Typhoon trio imager
14
15 (Amersham Bioscience).
16
17
18
19
20
21

22 **Protein electrophoresis and Western blot analysis**

23
24 Electrophoretic resolution of proteins was performed under SDS denaturing conditions on 12 or 15
25
26 % polyacrylamide gel according to Laemmli (53).
27
28

29 For immunodetection, proteins were electro-transferred from the gel onto nitrocellulose
30
31 membranes (Schleicher and Schuell). The membranes were saturated one hour in Tris Buffer Saline
32
33 (TBS : 20 mM Tris and 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween 20 and 1% Bovine Serum Albumine
34
35 (BSA). Membranes were incubated overnight at 4°C in TBS 0.1% Tween 1% BSA in the presence
36
37 of antibodies directed against 4E-BP (1:2000), eIF4E (1:2000), eIF4G (1:5000) or actin (1:500).
38
39 Secondary peroxidase conjugated antibodies were used at 1:5000. Revelations were done by ECL
40
41 method according to the manufacturer's instructions (Amersham).
42
43
44
45
46
47

48 **Caspase activity assay**

49
50 Caspase activity was measured with the use of a fluorogenic substrate (Ac-DEVD-MCA) as
51
52 previously described (28). Caspase assays were carried out at 20°C for 3 hours on 100 μ g protein
53
54 embryo extracts in 1 ml homogenisation buffer A containing 10 μ M substrate in the presence or
55
56 absence of the caspase inhibitor, Ac-DEVD-CHO. Fluorescence was measured by excitation at 380
57
58 nm and emission at 460 nm with a luminescence spectrophotometer (LS 50 Perkin Elmer).
59
60

Results

A-Chromium impedes cell cycle progression and induces the apoptotic response.

Twenty minutes after fertilization, sea urchin embryos were incubated in seawater containing chromium at various concentrations from 0.1 mM to 1 mM. The progression of cell cycle was drastically inhibited as judged from the kinetic of the first cell cycle of early development (fig. 1A, left). Inhibition of cell cycle progression was dose-dependent with an ID₅₀ of 0.5 mM of chromium (fig. 1B, right). Cells were analyzed for DNA morphology by Hoescht staining. Chromosome segregation occurred at 90 minutes after fertilization in the control embryos and was delayed to 140 minutes in the chromium-treated embryos at chromium concentrations of 0.3 and 0.6 mM (fig. 1 B). When observed at 20 hours, the number of nuclei in the treated-embryos was around half of the number in the control embryos therefore indicating a specific effect of chromium (< 0.6 mM) which is a delay in cell cycles of early development without toxicological acute damages of the embryos (fig. 1B, see 20 hours). When chromium was applied at higher concentration (1 mM), the cell cycle was fully arrested (fig. 1A) and significant cytological changes were observed after 5 hours of development (fig. 2A). Since the cytological changes looked like the changes induced by DNA-damaging agents when cells were undergoing apoptosis (28), further characterization was performed. Cytological analysis and DNA morphology respectively showed the presence of apoptotic bodies and the fragmentation of DNA starting from 20 hours and clearly visible at 30 and 45 hours of development (fig. 2 A). Enzymatic analysis of caspase activity, an hallmark of apoptosis induction was performed. Caspase activity of embryos extracts prepared at various times after fertilization increased from 5 hours and remained high up to 30 hours (fig. 2B), therefore strengthening the conclusion that chromium 1 mM induced the apoptotic response occurring after the DNA-damaged checkpoint cell cycle arrest in the case of DNA repair failure (28). Altogether, in sea urchin early embryos, chromium activates the canonical response of the DNA-damaged checkpoint including cell cycle arrest and, at high concentration, apoptosis induction.

B- Chromium provokes an increase in the amount of 4E-BP.

When measuring the level of different proteins known to regulate protein synthesis in chromium-treated embryos, an interesting observation was made on the immunoblots. As already documented (47, 49), the level of 4E-BP decreased rapidly after fertilization and remained low for at least 20 hours. Strikingly, upon 1 mM chromium addition, the level of 4E-BP was found to increase (fig. 3 A, left). The increase in 4E-BP was detectable 3 hours post treatment and reached the amount of 4E-BP present in the unfertilized egg (fig. 3A, right). As shown in figure 3B, the increase in 4E-BP was time- and dose-dependent. Therefore, chromium induces the synthesis of 4E-BP early after the metal exposure at high concentration.

C- The 4E-BP chromium-induced increase is functional.

The eIF4E binding function of 4E-BP was tested after chromium treatment. 4E-BP was detected in the crude extracts from 1 mM chromium-treated embryos (fig. 4, left) prepared 4 hours after fertilization and was strongly increased at 6 hours. The protein was found associated to eIF4E upon m⁷GTP affinity purification (fig. 4, right) therefore demonstrating the physiological binding capacity of 4E-BP expressed in the chromium-treated cells. The role of 4E-BP was related to competition with the protein eIF4G for the cap-dependant protein eIF4E in sea urchin embryos (46). Whereas the amount of eIF4G isoforms (46) remained constant in the untreated embryos, the fraction associated to eIF4E was greatly reduced to undetectable levels in the chromium-treated embryos (fig. 4) suggesting that 4E-BP binding to eIF4E had physiologically displaced eIF4G. We further showed that the chromium-induced increase in 4E-BP was independent on transcription as judged by incubation of the embryos with the transcription inhibitor actinomycin D whereas it was fully abolished by emetine treatment of the embryos (fig. 5) ascertaining that the 4E-BP appearance was the result of a translation increase from pre-existing mRNAs.

Protein synthesis was analyzed in the chromium-treated embryos using [³⁵S] methionine labeling. Protein synthesis increased after fertilization as expected in the control embryos (43); fig.

1
2
3 6). The post-fertilization increase was notably inhibited in the chromium-treated embryos by 30 %
4 during the 20 to 80 minute pulse and by 90 % at 5 and 7 hours after fertilization (fig. 6A).
5
6 Interestingly, the translation rate at 7 hours in the chromium-treated embryos was comparable to the
7
8 level in the unfertilized embryos (fig 6, zero time) suggesting a major contribution of 4E-BP in the
9
10 control of global protein translation. The profile of the neosynthesized proteins was analyzed by
11
12 autoradiography after SDS-PAGE and corroborated the global translation measurements (fig. 6 B).
13
14 Note that, although synthesized in chromium-treated embryos (see fig. 3), 4E-BP was not detected in
15
16 the experimental conditions used for direct translational analysis. Altogether, increase in the
17
18 synthesis of 4E-BP takes place while general protein translation is strongly reduced.
19
20
21
22
23
24
25
26

27 Discussion

28
29 Chromium(III) is known as a carcinogen most probably by causing DNA damage (see
30 introduction). Our results using sea urchin embryo as a pertinent model favor this assumption since
31
32 chromium(III) inhibited cell cycle progression and induced apoptosis, two hallmarks of the DNA-
33
34 damage cell cycle checkpoint pathways (23). Chromium effect on the first cell cycle of sea urchin
35
36 embryo was comparable to the effect of DNA damaging agents such as bleomycin and MMS (28,
37
38 49), delaying or arresting cell cycle. The ID50 for chromium(III) cell cycle effect was 0.5 mM. At
39
40 higher concentration, at the millimolar range, the cell cycle was fully arrested and after a period of
41
42 20 hours, apoptosis occurred in all the cells. The concept that most cancers, if not all, originate from
43
44 acquisition of genomic instability through the DNA damage checkpoint defect occurring in stem
45
46 cells is now generally accepted (see introduction). A clonal selection would then occur to generate
47
48 the cancer stem cells, escaping apoptosis induction and acquiring all the properties of the cancerous
49
50 cells. Our results support the characterization of chromium(III) as a carcinogenetic compound of
51
52 human health concern.
53
54
55
56
57
58
59

60 Surprisingly, chromium(III) provoked at the mM range concentration an increase in the level
of the protein 4E-BP. The increase was readily detectable on the immunoblots and reached high

1
2
3 values at 3 hours after chromium treatment. Interestingly, inhibition of the global protein synthesis
4
5 was almost complete at 5 hours post treatment . Therefore while global synthesis was inhibited, the
6
7 specific synthesis of 4E-BP remained high. Since the neosynthesized 4E-BP could associate to
8
9 eIF4E and provoke the release of eIF4G, the global protein synthesis inhibition can be ascribed, at
10
11 least in part to 4E-BP. Such increase in 4E-BP has been shown using the sea urchin embryo after
12
13 radiomimetic treatment with bleomycin and in hypoxic conditions which both activated the DNA-
14
15 damage checkpoint (49). The increase in the amount of 4E-BP therefore appears like a common
16
17 consequence of the DNA-damage checkpoint activation. Changes in the phosphorylation state of 4E-
18
19 BP1 in mammalian cells (54) in comparable conditions, i.e. upon activation of the DNA-damage
20
21 checkpoint has been reported and proposed to be related to the anti-oncogenicity of 4E-BP1 (50)
22
23 towards activity of eIF4E. We conclude that two mechanisms may be involved in the mechanism of
24
25 eIF4E inhibition by 4E-BPs, one involving post-translation phosphorylation changes by the
26
27 ATM/Akt/mTOR pathway (55, 56) and the new one describe here by specific neosynthesis of 4E-
28
29 BP. Both mechanisms would lead to the global translation reduction observed in response to most,
30
31 if not all, types of cellular stress (57) with a notable saving of cellular energy which is mainly
32
33 consumed in the process of translation (58).
34
35
36
37
38
39
40

41 The switch observed in translation of a few selective mRNAs among which 4E-BP mRNA
42
43 would be of cap-independent nature such as a mechanism involving internal ribosome entry site
44
45 (IRES) translation (59) which is currently under investigation in the sea urchin embryo. In our
46
47 experiments it is interesting to note that during the course of chromium induction of apoptosis,
48
49 caspases are activated around 5 hours post-treatment when the translation main changes are almost
50
51 accomplished, therefore suggesting that the increase in 4E-BP may be part of the mechanism that
52
53 determines the cell between survival or death as already suggested (49).
54
55
56

57 **Conclusions**

58
59 Chromium(III) activates the DNA-damage checkpoint of the cell cycle and therefore may be
60
of human health concern in cancerization. The synthesis of the protein 4E-BP is selectively induced

1
2
3 by chromium and is functional to prevent global protein synthesis during the course of the apoptotic
4
5 response.
6
7
8
9

10 11 **ACKNOWLEDGMENT**

12
13
14
15 We are very grateful to Sandrine Boulben and Virginie Clippa for their expert technical
16 assistance. We thank Nahum Sonenberg (Mc Gill University, Montreal, Quebec, Canada) for the
17 generous gift of 4E-BP2 antibody. This work was supported by Conseil Général du Finistère,
18 Conseil Régional de Bretagne, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and Ligue
19 Nationale contre le Cancer (Délégations départementales du Finistère, du Morbihan, de la Vendée et
20 des Côtes-d'Armor). RLB is doctoral research fellow financed by the Region Bretagne.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legend of figures

Figure 1. Chromium affects the kinetic of the first cell division. Sea urchin eggs were fertilized and the embryos were transferred 20 min later to fresh seawater (5% suspension) in the absence (-Cr) or in the presence of Chromium (+Cr) at the indicated concentration in mM. **(A)** For each treatment, one hundred embryos were scored for the first cleavage by phase contrast microscopy as a function of time after fertilization. Left panel: each kinetic was obtained for the eggs isolated from a single female and was representative of at least three independent experiments. Right panel: semi-logarithmic representation of the dose-response effect. **(B)** The chromatin morphology was observed by fluorescence microscopy after Hoechst staining of the control, 0.3 mM and 0.6 mM chromium-treated embryos at the indicated times after fertilization. Each photograph shows an embryo representative of at least 80% of the embryo population at the related time. Bar 100 μ m

Figure 2. Chromium induces cell death in sea urchin embryos. Sea urchin eggs were fertilized and 20 min later the embryos were transferred to fresh seawater in the absence (-Cr) or presence of 1 mM Chromium (+Cr) for 5 h. Control or treated embryos were then thoroughly washed and further incubated in fresh seawater. **(A)** The cytoplasmic and DNA morphologies of the embryos were followed for 4 days under, respectively, phase contrast microscopy (left column for each condition) and fluorescence microscopy after Hoechst staining (right column for each condition). Bar 100 μ m. Right panel is a magnification (x9) of the zones highlighted by squares on the left panel. **(B)** At different times after fertilization, 50 μ l aliquots of pelleted control (-Cr) or 1 mM Chromium-treated (+Cr) embryos were processed for caspase activity assay as described in material and methods. The caspase activity was

1
2
3 performed in duplicate for each extract and is indicated in arbitrary units. The curve +caspase
4 inhibitor corresponds to the activity of chromium extracts assayed in the presence of the
5
6 inhibitor.
7
8
9

10
11 **Figure 3.** Chromium affects expression of the protein 4E-BP. Sea urchin eggs (5% suspension) were
12 fertilized and treated or not after 20 min with chromium. **(A)** The embryos were treated with
13 1 mM chromium. Whole protein extracts from control embryos (-Cr) or treated embryos
14 (+Cr) were prepared at different times (hours) and analyzed by immunoblotting with anti-4E-
15 BP and anti-actin antibodies as described in Materials and Methods. **(B)** The embryos were
16 incubated in the absence (-Cr) or presence (+Cr) of 0.3 mM, 0.6 mM, or 0.9 mM chromium.
17 Whole protein extracts were performed at 4h, 8h and 20h and analyzed by immunoblotting
18 with anti-4E-BP and anti-actin antibodies as described in Materials and Methods.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 The densitometric quantification of 4E-BP level from the immunoblots is indicated on
32 the right in arbitrary units as a function of time for each chromium concentration.
33
34
35
36
37
38
39

40 **Figure 4.** Chromium induces functional 4E-BP. Sea urchin eggs (5% suspension) were fertilized and
41 treated or not after 20 min with 1 mM chromium. Total cytosolic extracts (left) and m⁷GTP
42 affinity purified extracts (right) were performed at 2h, 4h and 6h after fertilization of control
43 embryos (-Cr) and chromium treated embryos (+Cr). Proteins were detected by
44 immunoblotting with anti-4E-BP, anti-eIF4E and anti-eIF4G antibodies as described in
45 Materials and Methods.
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **Figure 5.** Chromium-induced 4EBP increase is due to translation. Sea urchin eggs (5% suspension)
56 were fertilized and treated (+Cr) or not (-Cr) after 20 min with 1 mM chromium. The
57 embryos were treated with 300 μM emetine (+E) or with 100μg/ml actinomycin D (+A) at
58 60 minutes and 4E-BP level was analyzed by immunoblotting with anti-4E-BP and anti-actin
59
60

antibodies as described in materials and methods. The densitometric quantification of the immunoblots (lower panel) in the different experimental conditions is shown on the upper panel.

Figure 6. Chromium provokes inhibition of translation correlated with 4E-BP expression. Sea urchin eggs (5% suspension) were fertilized and treated (+Cr) or not (-Cr) after 20 min with 1 mM chromium. (A). Protein synthesis *in vivo* was measured after 1 hour pulse in [³⁵S]methionine, performed at 20 minutes, 5 and 7 hours after fertilization. (A) Quantification of protein synthesis by TCA precipitation as described in Materials and methods. (B) Qualitative determination after SDS-PAGE (12%) and radioactive detection.

References

- (1) Biasioli, M., Greman, H., Kralj, T., Madrid, F., Diaz-Barrientos, E. and Ajmone-Marsan, F. (2007) Potentially toxic elements contamination in urban soils: a comparison of three European cities. *J Environ Qual* 36, 70-79.
- (2) O'Brien, T. J., Ceryak, S. and Patierno, S. R. (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 533, 3-36.
- (3) Islam, E., Yang, X. E., He, Z. L. and Mahmood, Q. (2007) Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. *J Zhejiang Univ Sci B* 8, 1-13.
- (4) Desoize, B. (2003) Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo* 17, 529-539.
- (5) Szadkowska-Stanczyk, I., Wozniak, H. and Stroszejn-Mrowca, G. (2003) [Health effects of occupational exposure among shoe workers. A review]. *Med Pr* 54, 67-71.
- (6) Chiu, A., Katz, A. J., Beaubier, J., Chiu, N. and Shi, X. (2004) Genetic and cellular mechanisms in chromium and nickel carcinogenesis considering epidemiologic findings. *Mol Cell Biochem* 255, 181-194.
- (7) Costa, M. and Klein, C. B. (2006) Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Crit Rev Toxicol* 36, 155-163.
- (8) Bakare, A. A., Pandey, A. K., Bajpayee, M., Bhargav, D., Chowdhuri, D. K., Singh, K. P., Murthy, R. C. and Dhawan, A. (2007) DNA damage induced in human peripheral blood lymphocytes by industrial solid waste and municipal sludge leachates. *Environ Mol Mutagen* 48, 30-37.
- (9) Ding, M. and Shi, X. (2002) Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 234-235, 293-300.
- (10) Durham, T. R. and Snow, E. T. (2006) Metal ions and carcinogenesis. *Exs*, 97-130.
- (11) Shi, H., Hudson, L. G. and Liu, K. J. (2004) Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 37, 582-593.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- (12) Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- (13) Blank, M. and Shiloh, Y. (2007) Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 6, 686-695.
- (14) Roos, W. P. and Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.
- (15) Singh, J., Carlisle, D. L., Pritchard, D. E. and Patierno, S. R. (1998) Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol Rep* 5, 1307-1318.
- (16) Nurse, P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-78.
- (17) Nasmyth, K. (2001) A prize for proliferation. *Cell* 107, 689-701.
- (18) Doree, M. and Hunt, T. (2002) From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 115, 2461-2464.
- (19) Cormier, P., Pyronnet, S., Salaun, P., Mulner-Lorillon, O. and Sonenberg, N. (2003) Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 469-475.
- (20) Houtgraaf, J. H., Versmissen, J. and van der Giessen, W. J. (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* 7, 165-172.
- (21) Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. and Weinert, T. A. (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656.
- (22) Kastan, M. B. and Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- (23) Bartek, J. and Lukas, J. (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 238-245.
- (24) Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- (25) Burkert, J., Wright, N. A. and Alison, M. R. (2006) Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 209, 287-297.
- (26) Pardal, R., Clarke, M. F. and Morrison, S. J. (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 895-902.
- (27) Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Dobrowolska, H., Wanzec, J., Reza, R. and Ratajczak, J. (2006) Emerging concept of cancer as a stem cell disorder. *Central European Journal of Biology* 1, 73-87.
- (28) Le Bouffant, R., Cormier, P., Cueff, A., Belle, R. and Mulner-Lorillon, O. (2007) Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*.
- (29) Egli, D., Rosains, J., Birkhoff, G. and Eggan, K. (2007) Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *447*, 679-685.
- (30) Gilbert, S. F. (2003) *Developmental biology*, 7th ed., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- (31) Hershey, J. W. B. and Merrick, W. C. (2000) The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, In *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B. and Mathews, M. B., Eds.) pp 33-38, Cold Spring Harbor Press, New York.
- (32) Proud, C. G. (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 403, 217-234.
- (33) Epel, D. (1967) Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 899-906.

- 1
2
3 (34) Brandhorst, B. P. (1976) Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and
4 after fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* 52, 310-317.
- 5 (35) Wagenaar, E. B. (1983) The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the
6 cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp Cell Res* 144, 393-403.
- 7 (36) Dube, F. (1988) Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin
8 embryos. *J Cell Physiol* 137, 545-552.
- 9 (37) Monnier, A., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S., Belle, R. and Mulner-Lorillon, O.
10 (2001) Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at
11 the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines.
12 *Zygote* 9, 229-236.
- 13 (38) Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of
14 mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68,
15 913-963.
- 16 (39) Rogers, G. W., Jr., Komar, A. A. and Merrick, W. C. (2002) eIF4A: the godfather of the
17 DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72, 307-331.
- 18 (40) Prevot, D., Darlix, J. L. and Ohlmann, T. (2003) Conducting the initiation of protein
19 synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95, 141-156.
- 20 (41) Hahghat, A., Mader, S., Pause, A. and Sonenberg, N. (1995) Repression of cap-
21 dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to
22 eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J* 14, 5701-5709.
- 23 (42) Richter, J. D. and Sonenberg, N. (2005) Regulation of cap-dependent translation by
24 eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477-480.
- 25 (43) Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N. and Belle, R.
26 (2001) eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea
27 urchin. *Dev Biol* 232, 275-283.
- 28 (44) Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C. A.,
29 Beane, W. S. and Cormier, P. (2006) Translational control genes in the sea urchin
30 genome. *Dev Biol* 300, 293-307.
- 31 (45) Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A.,
32 Angerer, R. C., et al. (2006) The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus*
33 *purpuratus*. *Science* 314, 941-952.
- 34 (46) Oulhen, N., Salaun, P., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J. (2007) After
35 fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated
36 with the cap-binding protein eIF4E. *J Cell Sci* 120, 425-434.
- 37 (47) Salaun, P., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., Morales, J. and
38 Cormier, P. (2005) Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding
39 proteins during early development of sea urchin embryos. *J Cell Sci* 118, 1385-1394.
- 40 (48) Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N. and
41 Cormier, P. (2003) eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic
42 division of the sea urchin embryo. *Dev Biol* 255, 428-439.
- 43 (49) Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Belle, R. (2006) Hypoxia and
44 DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J*
45 *Cell Biochem* 99, 126-132.
- 46 (50) Rousseau, D., Gingras, A. C., Pause, A. and Sonenberg, N. (1996) The eIF4E-binding
47 proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene* 13, 2415-2420.
- 48 (51) Boulben, S., Monnier, A., Le Breton, M., Morales, J., Cormier, P., Belle, R. and
49 Mulner-Lorillon, O. (2003) Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence
50 for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase.
51 *Cell Mol Life Sci* 60, 2178-2188.
- 52 (52) Salaun, P., Le Breton, M., Morales, J., Belle, R., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O. and
53 Cormier, P. (2004) Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp Cell Res* 296, 347-357.
- (53) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- (54) Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R. and Sonenberg, N. (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13, 1422-1437.
- (55) Clemens, M. J. (2004) Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 23, 3180-3188.
- (56) Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O. and Sonenberg, N. (2006) mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416-6422.
- (57) Teaman, A. A., Chen, Y. W. and Cohen, S. M. (2005) 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev* 19, 1844-1848.
- (58) Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-327.
- (59) Holcik, M. (2004) Targeting translation for treatment of cancer--a novel role for IRES? *Curr Cancer Drug Targets* 4, 299-311.

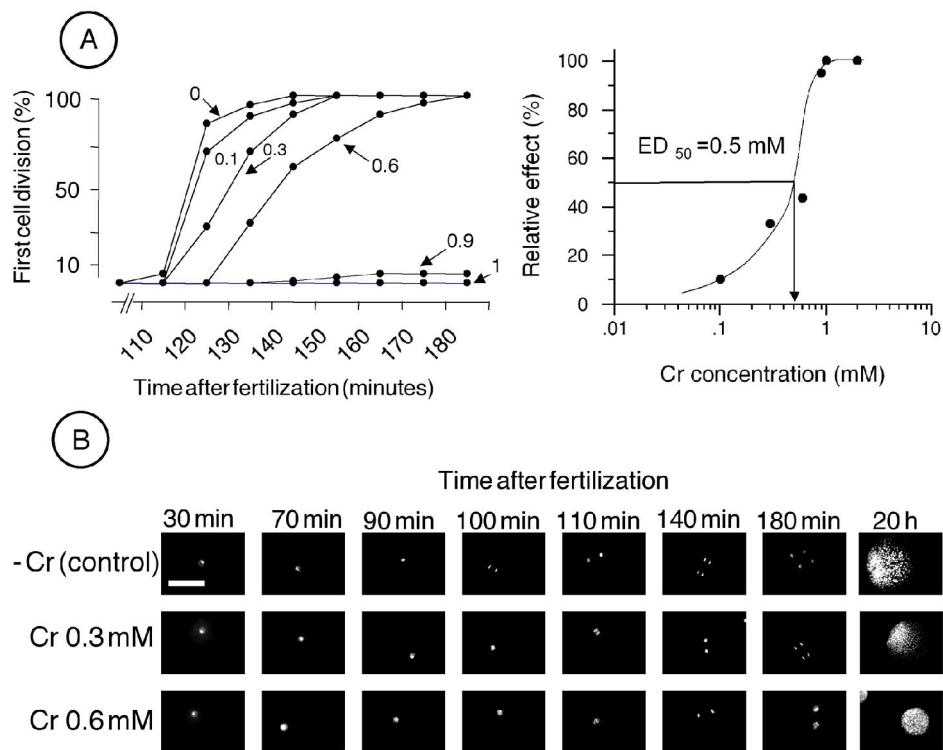


Fig. 1. Chromium affects the kinetic of the first cell division. Sea urchin eggs were fertilized and the embryos were transferred 20 min later to fresh seawater (5% suspension) in the absence (-Cr) or in the presence of Chromium (+Cr) at the indicated concentration in mM. (A) For each treatment, one hundred embryos were scored for the first cleavage by phase contrast microscopy as a function of time after fertilization. Left panel: each kinetic was obtained for the eggs isolated from a single female and was representative of at least three independent experiments. Right panel: semi-logarithmic representation of the dose-response effect. (B) The chromatin morphology was observed by fluorescence microscopy after Hoechst staining of the control, 0.3 mM and 0.6 mM chromium-treated embryos at the indicated times after fertilization. Each photograph shows an embryo representative of at least 80% of the embryo population at the related time. Bar 100 microm

150x112mm (300 x 300 DPI)

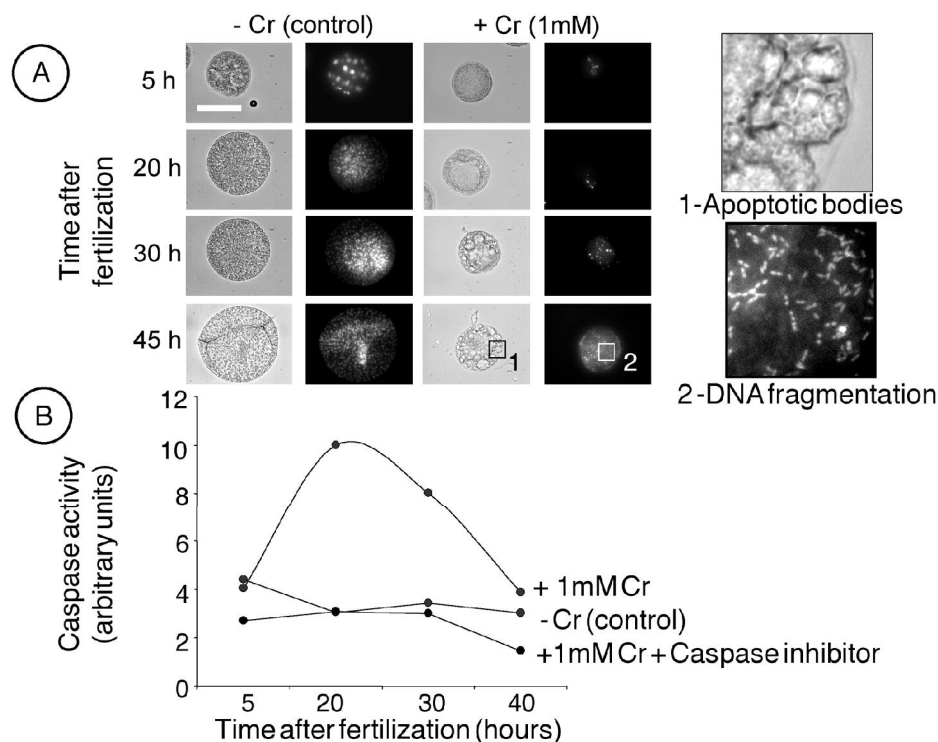


Fig. 2. Chromium induces cell death in sea urchin embryos. Sea urchin eggs were fertilized and 20 min later the embryos were transferred to fresh seawater in the absence (-Cr) or presence of 1 mM Chromium (+Cr) for 5 h. Control or treated embryos were then thoroughly washed and further incubated in fresh seawater. (A) The cytoplasmic and DNA morphologies of the embryos were followed for 4 days under, respectively, phase contrast microscopy (left column for each condition) and fluorescence microscopy after Hoechst staining (right column for each condition). Bar 100 μ m. Right panel is a magnification (x9) of the zones highlighted by squares on the left panel. (B) At different times after fertilization, 50 μ l aliquots of pelleted control (-Cr) or 1 mM Chromium-treated (+Cr) embryos were processed for caspase activity assay as described in material and methods. The caspase activity was performed in duplicate for each extract and is indicated in arbitrary units. The curve +caspase inhibitor corresponds to the activity of chromium extracts assayed in the presence of the inhibitor.

150x112mm (300 x 300 DPI)

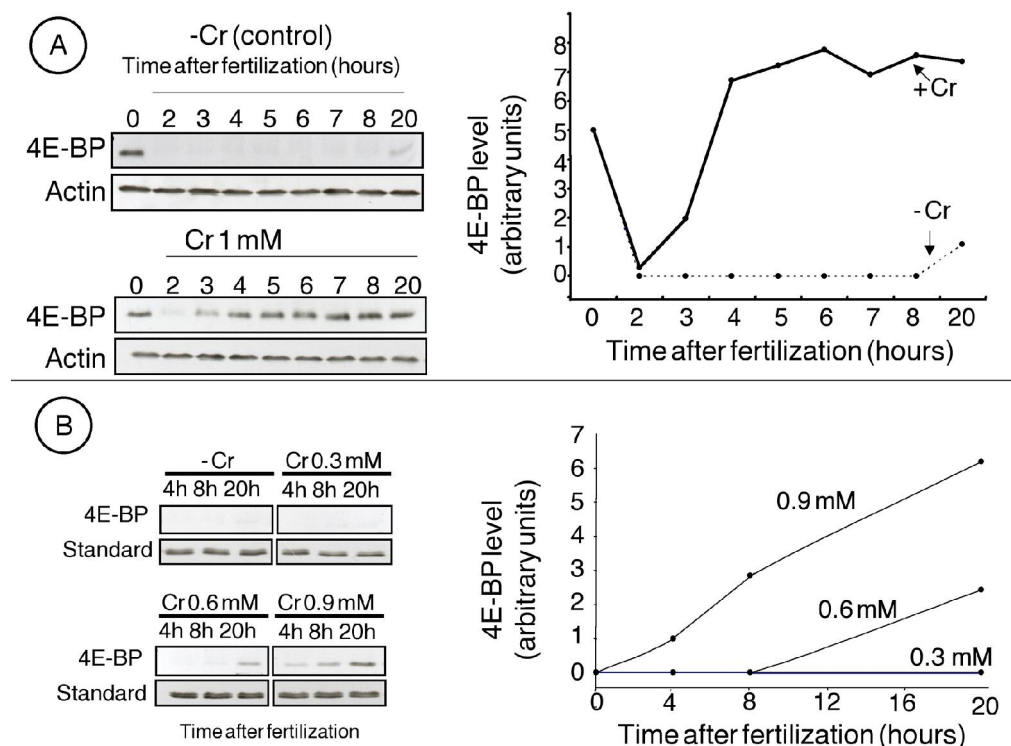


Fig.3. Chromium affects expression of the protein 4E-BP. Sea urchin eggs (5% suspension) were fertilized and treated or not after 20 min with chromium. (A) The embryos were treated with 1 mM chromium. Whole protein extracts from control embryos (-Cr) or treated embryos (+Cr) were prepared at different times (hours) and analyzed by immunoblotting with anti-4E-BP and anti-actin antibodies as described in Materials and Methods. (B) The embryos were incubated in the absence (-Cr) or presence (+Cr) of 0.3 mM, 0.6 mM, or 0.9 mM chromium. Whole protein extracts were performed at 4h, 8h and 20h and analyzed by immunoblotting with anti-4E-BP and anti-actin antibodies as described in Materials and Methods. The densitometric quantification of 4E-BP level from the immunoblots is indicated on the right in arbitrary units as a function of time for each chromium concentration.

150x112mm (300 x 300 DPI)

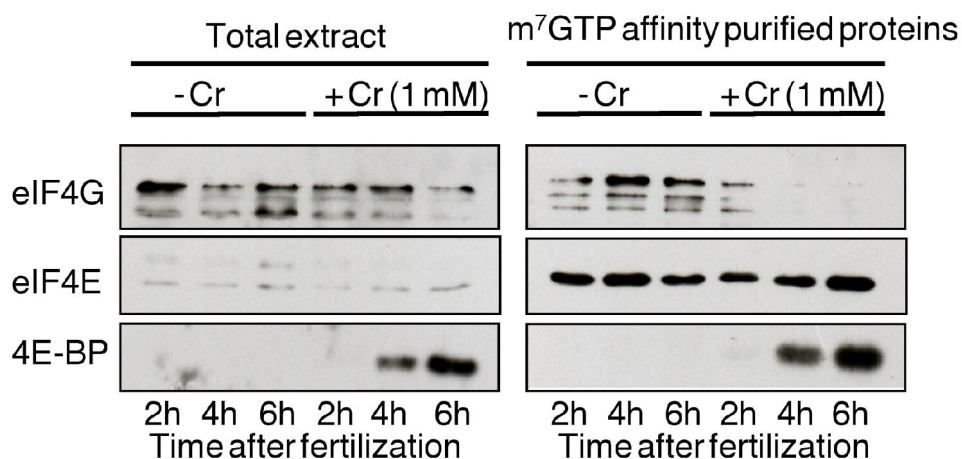


Fig. 4. Chromium induces functional 4E-BP. Sea urchin eggs (5% suspension) were fertilized or not after 20 min with 1 mM chromium. Total cytosolic extracts (left) and m⁷GTP affinity purified extracts (right) were performed at 2h, 4h and 6h after fertilization of control embryos (-Cr) and chromium treated embryos (+Cr). Proteins were detected by immunoblotting with anti-4E-BP, anti-eIF4E and anti-eIF4G antibodies as described in Materials and Methods.

150x99mm (300 x 300 DPI)

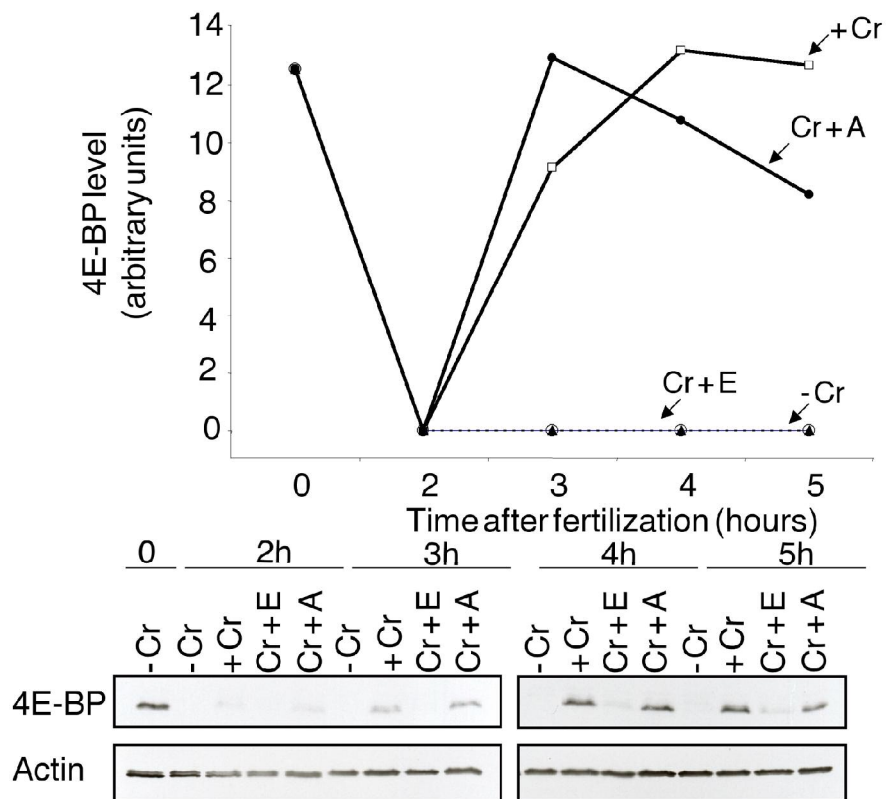


Fig. 5. Chromium-induced 4E-BP increase is due to translation. Sea urchin eggs (5% suspe
were fertilized and treated (+Cr) or not (-Cr) after 20 min with 1 mM chromium. The
embryos were treated with 300 μ M emetine (+E) or with 100 μ g/ml actinomycin D (+A)
at 60 minutes and 4E-BP level was analyzed by immunoblotting with anti-4E-BP and anti-
actin antibodies as described in materials and methods. The densitometric quantification
of the immunoblots (lower panel) in the different experimental conditions is shown on
the upper panel.

150x125mm (300 x 300 DPI)

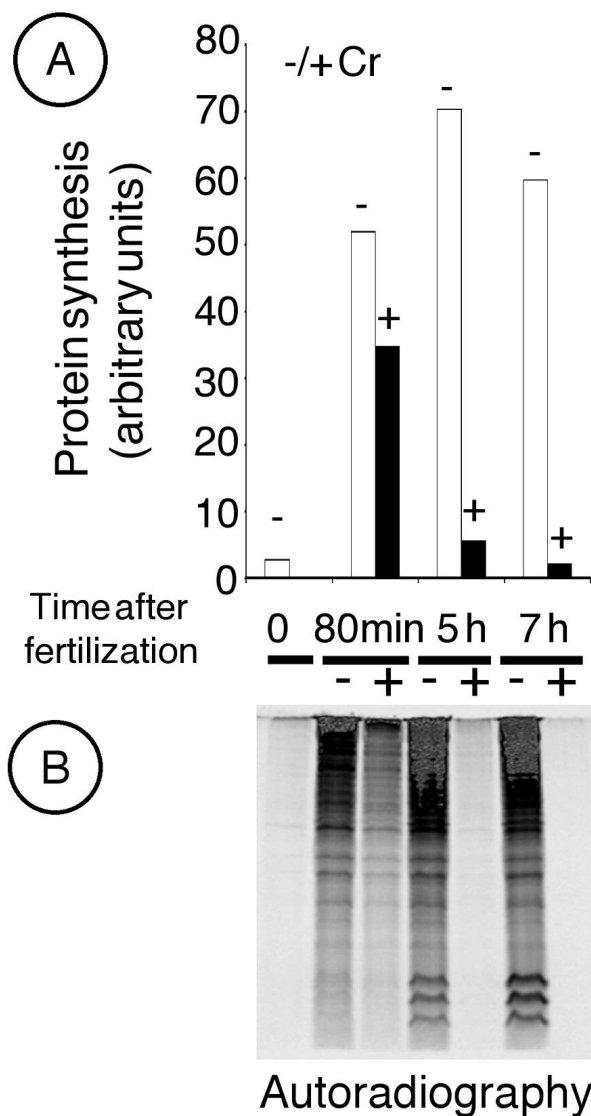


Fig. 6. Chromium provokes inhibition of translation correlated with 4E-BP expression. Sea eggs (5% suspension) were fertilized and treated (+Cr) or not (-Cr) after 20 min with 1 mM chromium. (A). Protein synthesis in vivo was measured after 1 hour pulse in [35S]methionine, performed at 20 minutes, 5 and 7 hours after fertilization. (A) Quantification of protein synthesis by TCA precipitation as described in Materials and methods. (B) Qualitative determination after SDS-PAGE (12%) and radioactive detection. 94x150mm (300 x 300 DPI)

Article 4

Le Bouffant, R., P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, R. Belle and J. Morales. "Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA damaging agent MMS in sea urchin embryos." *Submitted*

Contrairement à l'hypoxie, la bléomycine et le chrome ([Article 2 et 3](#)) le MMS qui entraîne aussi la mobilisation du point de surveillance du cycle cellulaire ([Article 1](#)) n'induit pas l'expression de 4E-BP. Le comportement d'autres facteurs d'initiation de la traduction est étudié dans ce contexte.

Ainsi, ce travail consiste en l'étude de la synthèse protéique et des facteurs de traduction lors de la mort cellulaire déclenchée après traitement par le MMS dans l'embryon d'oursin. Le traitement au MMS induit l'inhibition de synthèse protéique sans surexpression de 4E-BP, mais corrélée avec l'apparition de la forme phosphorylée de eIF2 α . Les résultats obtenus mettent aussi en évidence une régulation originale de eIF4G, dépendante de la dose de MMS utilisée. Lors de l'utilisation d'une dose de MMS (10mM) connue pour activer les caspases et induire l'apoptose ([Article 1](#)), un clivage de la protéine eIF4G est observé. En revanche, l'utilisation de fortes doses de MMS (100mM) provoque une modification rapide de la protéine eIF4G détectable par migration électrophorétique. L'isoforme observé peut toujours se lier à eIF4E alors que la synthèse protéique est inhibée. Ensuite, la protéine eIF4G est totalement dégradée, sans apparition de fragment de clivage. Dans ces conditions, aucune activité caspase n'est décelable. Enfin, le comportement de ces facteurs dans l'ovule non fécondé, contenant beaucoup de 4E-BP a été étudié afin de comprendre l'importance de la protéine 4E-BP dans ces régulations. De manière étonnante, la protéine 4E-BP est dégradée très rapidement dans l'ovule non fécondé après traitement par le MMS. Lorsque 4E-BP est dégradé dans l'ovule non fécondé traité au MMS, la protéine eIF4G est capable de s'associer

à eIF4E alors que la traduction est inhibée. La protéine eIF2 α reste phosphorylée dans ces conditions.

Ce travail montre une régulation originale des facteurs de traduction lors de l'induction de la mort cellulaire dans des embryons d'oursin traités au MMS.

Elsevier Editorial System(tm) for Experimental Cell Research

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos

Article Type: Research Article

Section/Category:

Keywords: translation factors; protein synthesis; apoptosis; sea urchin; DNA-damaging agent

Corresponding Author: Ms Julia Morales,

Corresponding Author's Institution: CNRS / Université Paris 6

First Author: Ronan Le Bouffant

Order of Authors: Ronan Le Bouffant; Patrick Cormier; Odile Mulner-Lorillon; Robert Bellé; Julia Morales

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Translational control was investigated in sea urchin eggs and embryos in response to DNA-damaging agent methyl methanesulfonate (MMS) which induces cell death. We have shown in this report that exposure of sea urchin embryos to MMS induces drastic effects on protein synthesis activity and on the level, integrity and post-translational modification of translation factors. In sea urchin, fertilization triggers rapid degradation of translation inhibitor 4E-BP. In response to MMS treatment of embryos, protein synthesis is inhibited, independently of the presence of 4E-BP, and in correlation with the phosphorylation of eIF2 α subunit. Moreover, new modification of translation initiation factor eIF4G protein is induced by MMS exposure. This eIF4G modified protein interacts with eIF4E, in a context of global protein synthesis inhibition. A striking feature of translation inhibition in response to MMS treatment is that 4E-BP is dispensable in embryos and even targeted for degradation in unfertilized eggs.

**Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis
induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos**

Ronan Le Bouffant, Patrick Cormier, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé and Julia Morales*

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

*corresponding author: Julia Morales, Equipe Cycle Cellulaire et Développement, UMR 7150
CNRS/UPMC, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff Cedex, France.

e-mail: morales@sb-roscoff.fr

keywords: translation factors / protein synthesis / apoptosis / sea urchin /DNA-damaging
agent

Running title: Translation during apoptosis in sea urchin

Abstract

Translational control was investigated in sea urchin eggs and embryos in response to DNA-damaging agent methyl methanesulfonate (MMS) which induces cell death. We have shown in this report that exposure of sea urchin embryos to MMS induces drastic effects on protein synthesis activity and on the level, integrity and post-translational modification of translation factors. In sea urchin, fertilization triggers rapid degradation of translation inhibitor 4E-BP. In response to MMS treatment of embryos, protein synthesis is inhibited, independently of the presence of 4E-BP, and in correlation with the phosphorylation of eIF2 α subunit. A striking feature of translation inhibition in response to MMS treatment is that 4E-BP is dispensable in embryos and even targeted for degradation in unfertilized eggs.

Introduction

Apoptosis is a physiological and tightly controlled process which leads to cell death [1]. Cellular damages induced by ionizing radiation and DNA damaging agents are integrated in signaling cascades that lead to caspases activation [2]. Apoptosis involves post-translational regulation of pre-existing proteins such as phosphorylation, proteolytic cleavage and intracellular translocation. De novo protein synthesis contributes also to the apoptotic process, because various apoptotic pathways require ongoing translation of specific mRNAs for their proper execution, while global translation reduction is observed in response to most types of cellular stresses as a way of energy saving [3].

Protein synthesis is mainly regulated at the level of the initiation step. Translation initiation involves a complex biological machinery [4]. The cap structure of the mRNA interacts with the cap-binding protein eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) which forms a stable ternary complex with eIF4A and eIF4G. eIF4A is a DEAD family RNA helicase, thought to unwind secondary structures of the 5' untranslated region of the mRNA in conjunction with eIF4B. eIF4G is a scaffolding protein that interacts with eIF4E and eIF4A. eIF4G binds also to the poly(A) binding protein (PABP), which interacts with the poly(A) tail, and this allows a closed loop conformation of the mRNA, thought to stabilize the interaction of the cap binding complex and to facilitate the recycling of ribosomes. eIF4E/eIF4G complex assembly is controlled by a family of translational repressors, the eIF4E binding proteins (4E-BPs) which compete with eIF4G for a common binding site on eIF4E [5]. A ternary complex comprising eIF2, GTP and initiator methionyl-tRNA, binds to the 40S ribosomal subunit to form the 43S complex. This complex is recruited to the mRNA via the interaction of the multisubunit eIF3 with eIF4G and scans the mRNA up to the start codon. Initiation codon recognition triggers eIF2-bound GTP hydrolysis, releasing of

initiation factors and joining of the large ribosomal subunit. Translation can be negatively regulated by phosphorylation of the α subunit of eIF2 on a conserved serine residue (serine 51 in mammals), which sequesters the guanine nucleotide exchange factor eIF2B in an inactive complex.

The importance of the regulation of protein synthesis during apoptosis has become increasingly prominent in the literature [3, 6]. Protein synthesis rate is controlled by a number of apoptosis inducing agents, and it is noteworthy that protein synthesis machinery modification precedes and/or is concomitant to apoptosis, involving phosphorylation modification and cleavage of components of the translational machinery including eIF2 α , eIF4G, PABP, eIF4B and 4E-BPs [6, 7]. The eIF4E family proteins were recently implicated in the mechanisms of survival and apoptosis in mammalian cells: eIF4E has been characterized as anti-apoptotic and as an oncogene [8, 9]. Conversely 4E-BP is identified as pro-apoptotic [10, 11], although some reports demonstrate that 4E-BP may be a survival factor [12-14]. While cap-dependent translation is inhibited during apoptosis due to the strong association of eIF4E with 4E-BP, an alternative translation can overcome the general inhibition of translation, and depends on the internal recruitment of the ribosomes in the vicinity of the AUG codon mediated by an IRES (internal ribosome entry site) element [3, 15].

Sea urchin early embryonic development is a very good model for translational control analysis. Fertilization triggers a 10-30 fold increase in protein synthesis rates while initiating the synchronous divisions of early development [16, 17]. In unfertilized eggs, the translation initiation eIF4E is associated to its inhibitor 4E-BP; after fertilization, 4E-BP dissociates from eIF4E and is rapidly degraded [18, 19]. eIF4E is then available to interact with eIF4G, which isoforms are post-translationally modified after fertilization [20]. The formation of the eIF4E/eIF4G complex correlates with the increase of protein synthesis [18, 20]. Moreover

gene expression regulation is controlled at a post-transcriptional level during the first divisions, which allows the study of the contribution of protein synthesis regulation in gene expression independently of transcriptional regulation [21].

Apoptosis in sea urchin is a physiological process for the remodeling of the larva and the cellular homeostasis occurring at metamorphosis [22, 23]. The apoptotic gene toolkit has been explored in the sea urchin genome [24]. The genes involved in the intrinsic pathway, activated by various intracellular signals such as DNA damage, and in the extrinsic pathway, activated by binding of secreted ligands to receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor family, are present in the genome [24]. Interestingly, DNA damaging agents like methyl methanesulfonate MMS or bleomycin induce cell cycle arrest and apoptosis in the first cell division of sea urchin embryo [25].

We reported here the analysis of translation activity and translation factors during apoptosis induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin eggs and embryos. We showed that protein synthesis is inhibited in response to MMS, in correlation with the phosphorylation of eIF2 α subunit and independently of the presence of 4E-BP. Moreover, new modification of translation initiation factor eIF4G protein is induced by MMS exposure. This eIF4G modified protein interacts with eIF4E, in a context of global protein synthesis inhibition.

Materials and methods

Chemicals

Methyl methanesulfonate (MMS, M4016), SB 203580 and rabbit polyclonal antibodies against human actin (20-33) were purchased from Sigma. BAPTA-AM was obtained from Fluka. Ac-DEVD-MCA substrate was obtained from BD Bioscience. Rabbit polyclonal antibodies against human 4E-BP2 obtained from Dr. Nahum Sonenberg, and guinea pig

polyclonal antibodies against eIF4G were previously described [20]. Rabbit polyclonal antibody directed against human full length eIF2 α (FL-315) was obtained from Santa Cruz. Mouse monoclonal antibody against human eIF4E (610269) was obtained from Transduction Laboratories. Rabbit polyclonal antibodies directed against phosphorylated Ser 51 eIF2 α (9721) and against phosphorylated Thr180/Tyr182 p38MAPK (9211) were obtained from Cell Signaling. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from DAKO.

Handling and treatment of Eggs and Embryos

Sea urchins (*Sphaerechinus granularis*) were collected in the Brest area and maintained in running seawater. Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Eggs, collected in 0.22- μ m Millipore-filtered seawater, were dejellied by swirling for 30 s in filtered seawater (pH 5), rinsed twice in fresh seawater and suspended in filtered seawater at 5% (v/v) dilution. Diluted sperm was added to the eggs and withdrawn after 5 min [12]. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than 90% fertilization. Each experiment used gametes and eggs from a single female. At 20 minutes post-fertilization, methyl methanesulfonate (MMS) was added to embryos at the indicated concentration.

Isolation of eIF4E and associated proteins

After fertilization, at the times indicated, embryos and eggs were collected by centrifugation for 2 minutes at 2000 g. The cell pellet (500 μ l) was frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Cells were lysed by passage through a 25G syringe in one cell volume of 2x 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 μ g/ml of aprotinin and leupeptin). Cell lysates were centrifuged for 15 minutes at 14,000g at 4°C. Isolation of eIF4E from cytosolic egg extracts and its partners was performed using m7GTP beads as described previously [20]. Briefly, lysates (2 mg proteins) were mixed with

25 µl of m7GTP-Sepharose beads. After 60 minutes incubation at 4°C, the beads 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 denatured at 95°C for 5 minutes before Western blot analysis.

In vivo protein synthesis

Embryos (5% suspension in seawater) were cultured in continuous presence of [³⁵S]-L-methionine at the final concentration of 5µCi/ml. [³⁵S]Methionine incorporation into proteins was measured on duplicate aliquots of cell extracts as prepared above after 10% TCA precipitation on Whatman 3M filters [17] and counting in a scintillation counter in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid.

Total embryo extracts

At different times following fertilization, whole embryos extract were obtained by homogenization of 30 µl pelleted cells in 100 µl of buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8 [26] and separated on SDS-PAGE. Note that under these experimental conditions, the modifications of eIF4G protein seen in cytosolic extract are not observable in total embryo extracts.

Western blot analyses

Electrophoretic resolution of proteins was performed under SDS denaturing conditions on a polyacrylamide gel. Proteins were electro-transferred from the gel onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). The membranes were saturated for 1 hour in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 1% Bovine Serum albumin. Membranes were incubated overnight with antibodies directed against 4E-BP (1:1000), eIF4E (1:2000), eIF4G (1:5000), full-length (FL) eIF2α (1:1000), Phospho-Ser51 eIF2α (1:1000), Phospho-Thr180/Tyr182 p38 (1:1000) and actin (1:500). Secondary peroxidase conjugated antibodies were used at 1:5000 for full length proteins and 1:2000 for phosphorylated proteins.

Revelation was done by ECL method according to the manufacturer's instructions (Amersham). Signals were quantified using the public domain ImageJ program (written by Wayne Rasband, NIH, USA).

Caspase-3 activity assay

Protein extracts for caspase-3 activity were prepared from 1 ml of pelleted control or treated embryos at the indicated times [25]. Pellets were suspended in ice-cold buffer A (100 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 10 mM dithiothreitol), homogenized by short sonication (5 second pulse, amp. 40), and centrifuged at 14,000 g for 15 min at 4°C to obtain cytosolic extracts. Proteolytic reactions were carried out in 1 ml of buffer A, containing 100µg of proteins and 10 µM of Ac-DEVD-MCA substrate (BD Bioscience) at 20°C. The fluorogenic product substrate was detected by excitation at 380 nm and emission at 460 nm with a fluorescence spectrophotometer (LS 50 Perkin Elmer).

Results

Inhibition of protein synthesis by MMS exposure.

The DNA-damaging agent MMS has been shown to induce apoptosis in sea urchin early embryos [25]. We asked whether induced apoptosis is correlated with protein synthesis modification. We analyzed the protein synthesis activity in embryos treated with the DNA damaging agent methyl methanesulfonate (MMS) by measuring the incorporation of [³⁵S] methionine into newly synthesized proteins (fig. 1). MMS was added at 20 minutes post-fertilization. Embryos were exposed to low dose (10 mM MMS) corresponding to the minimal concentration established to induce apoptosis in sea urchin [25] and to high dose (100 mM MMS) to induce massive DNA damage. Protein synthesis activity increased 10 fold after fertilization within the first 3 hours in control embryos (fig. 1). Complete inhibition of [³⁵S] methionine incorporation into proteins occurred rapidly (40 minutes after MMS

addition) in 100 mM MMS-treated embryos (fig. 1). [³⁵S] methionine incorporation into proteins was also affected by 10 mM MMS, whereas complete inhibition occurred around 120 minutes post-fertilization (fig. 1). Therefore, MMS exposure affected strongly protein synthesis activity in sea urchin early embryos.

Inhibition of protein synthesis induced by MMS occurs in the absence of 4E-BP.

Protein synthesis inhibition during apoptosis has been correlated with the strong association of eIF4E with 4E-BP [6]. In sea urchin, 4E-BP is rapidly degraded after fertilization [21]. We asked whether the inhibition of protein synthesis activity induced by MMS treatment was correlated to the reappearance of 4E-BP. Western blot analyses of embryos treated with 10 mM or 100 mM MMS showed that no 4E-BP was detected after MMS treatment (fig. 2A) despite the inhibition of protein synthesis, suggesting that other translational regulation is involved in this inhibition.

Inhibition of protein synthesis induced by MMS is correlated to phosphorylation of initiation factor eIF2 α

Inhibition of translation during apoptosis has been associated to the phosphorylation of eIF2 α [6]. Sea urchin eIF2 α possesses the conserved phosphorylatable residue equivalent to the Ser-51 [27], suggesting a possible control of translation at this level. To test this hypothesis, an antibody directed against the phospho-eIF2 α was used to analyze the phosphorylation status of eIF2 α in control and MMS treated embryos (fig. 2B). Firstly, eIF2 α was phosphorylated in unfertilized eggs, and fertilization triggered the dephosphorylation of eIF2 α . Interestingly, this result suggests that eIF2 α participates to the control of translational regulation during sea urchin early embryonic development in a physiological condition (fig. 2B). Secondly, eIF2 α re-phosphorylation occurred following MMS treatment (fig. 2C). High concentration (100 mM) of MMS treatment of embryos triggered the phosphorylation of eIF2 α rapidly within 40 minutes after exposure, whereas treatment with 10 mM MMS led to

an increase of eIF2 α phosphorylation 120 minutes after exposure (fig. 2D). In both cases, eIF2 α phosphorylation is correlated with the inhibition of translation activity.

eIF4G protein is modified following MMS treatment.

It was shown previously that fertilization triggers the formation of eIF4E/eIF4G complex and the rapid modification of the migration pattern of eIF4G proteins [20]. Since 4E-BP was still absent in the embryo after MMS treatment, we then asked whether eIF4G was associated with eIF4E in MMS treated embryos. Cap (m⁷GTP) columns were used to purify the cap binding protein eIF4E and its associated proteins. Fertilization triggered the dissociation of 4E-BP from eIF4E and the association of eIF4G with eIF4E (fig. 3A, compare NF and 1 hour lanes on control embryos), as shown previously [20]. Interestingly while eIF4G isoforms were associated to eIF4E after MMS treatment (fig. 3A), electrophoretic mobility of these eIF4E-associated eIF4G isoforms was different in 100 mM MMS treated-embryos when compared to the control. Whereas in control embryos several isoforms were associated with eIF4E after fertilization (fig. 3A), two main isoforms of ~175 kDa and ~200 kDa were associated to eIF4E after 1h of 100 mM MMS treatment, and only the ~200 kDa isoform was associated with eIF4E after 2 hours (fig. 3A; see arrow). These results suggest a drastic modification of the eIF4E/eIF4G complex in response to MMS.

We then asked whether MMS treatment modified the isoforms pattern of eIF4G in cytosolic extracts. Analysis of cytosolic proteins showed a striking modification of eIF4G electrophoretic migration pattern in 100 mM MMS treated embryos, while eIF4E and actin proteins were not affected (fig 3B). When embryos were exposed to 10 mM MMS, modification on eIF4G protein was not consistently observed, and when it was, only a fraction of eIF4G was modified (not shown), probably reflecting the sensitivity to DNA-damaging agent of embryos obtained from individual females.

eIF4G modification induced by MMS treatment is independent of p38MAPK activation

Stress-activated p38 MAPK activates Mnk1 [28], a kinase that binds to eIF4G and phosphorylates both eIF4G and eIF4E [29]. Since the stress-activated protein kinase p38MAPK is activated in response to MMS in mammalian cells [30], we asked whether p38MAPK was also activated in the sea urchin embryos after exposure to MMS, and whether it could be implicated in eIF4G isoforms modification (fig. 4). Embryos were analyzed by Western blot with an antibody against active p38 (anti-phospho-p38MAPK). Figure 4A shows the appearance of an active form of p38MAPK in embryos treated with 100 mM MMS. In contrast, phospho-p38 was not (or faintly) detected in embryos treated with 10 mM MMS. In order to test whether p38MAPK activation could be implicated in the modification of eIF4G isoforms induced by MMS, embryos were treated with SB203085, a specific inhibitor of p38MAPK and eIF4G was analyzed by Western blot. The inhibitor treatment prevented the activation of p38MAPK induced by 100 mM MMS, but did not inhibit MMS-induced eIF4G isoforms modification (fig. 4B). These data suggest that p38 activation and eIF4G modification are two unrelated downstream events induced by MMS exposure.

eIF4G protein is degraded in response to long exposure time of MMS

Since MMS treatment triggers drastic modification of the eIF4G electrophoretic mobility pattern in embryos within the first three hours, we then analyzed the level of eIF4G after longer exposure time. Total extracts from sea urchin embryos were taken at the indicated time up to 20 hours and analyzed by Western blot in control and MMS treated embryos (fig 5A). eIF4G protein was detected in control total extracts as two major bands. eIF4G protein was degraded six hours following 10 mM MMS exposure; the upper band disappeared while a lower molecular weight fragment (~100 kDa, indicated by an arrow) was detected by the anti-eIF4G antibody. This eIF4G degradation was not due to a general protein clearance, as indicated by the actin loading control. In contrast, in 100 mM MMS treated embryos eIF4G was degraded rapidly 3 hours after MMS exposure; the lower molecular weight fragment was

not detected. Again, eIF4G degradation occurred well before the general protein degradation, as indicated by the actin loading control. It has been shown that eIF4G is cleaved at specific sites during apoptosis in mammalian cell lines and that eIF4G cleavage is dependent on caspase-3 activity [7, 31]. We asked whether in MMS treated embryos, caspase-3 activity was detected when the ~100kDa eIF4G band was observed. Caspase-3 activity was monitored by cleavage of the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC, at 5 hours (no fragment) and 20 hours (fragment) following 10 mM MMS exposure, and 2 hours (eIF4G present) and 5 hours (reduced levels of eIF4G) following 100 mM MMS exposure (fig. 5B). Caspase activity was detected only in the 20 hours-time point in 10 mM MMS-treated embryos, whereas no activity was detected in 100 mM MMS treated embryos (fig. 5B). Thus caspase activity correlates with the presence of the ~100kDa eIF4G fragment.

MMS treatment of unfertilized eggs induces protein synthesis machinery modification.

All the previous experiments were conducted in sea urchin embryos, when 4E-BP was absent. We asked whether exposure to the DNA damaging agent MMS could also induce similar modifications of translation factors in unfertilized eggs, where 4E-BP was present. We examined the translation factors by Western blot in unfertilized eggs after exposure to MMS. Surprisingly, the inhibitory protein 4E-BP was no longer detected after MMS treatment (fig. 6A). The degradation of 4E-BP occurred within 10-15 minutes in 100 mM MMS-treated embryos, and between 1-2 hours in 10 mM MMS treated embryos. The translation initiation factor eIF2 α remained phosphorylated in MMS treated eggs, and global protein synthesis activity did not increase (not shown). eIF4G was degraded rapidly after MMS exposure compared to its partner eIF4E, and compared to the loading control actin (fig. 6A). As observed for embryos treated with MMS (fig. 5), the pattern of eIF4G degradation was dose-dependent in MMS-treated unfertilized eggs; a low molecular weight eIF4G protein was only

detected after 10 mM MMS exposure of unfertilized eggs, whereas 100 mM MMS induced the complete degradation of eIF4G.

Since MMS treatment of unfertilized eggs triggered the degradation of 4E-BP, we asked whether eIF4G and eIF4E were able to interact with each other after MMS exposure. Cap-column purification of eIF4E-containing complexes showed that eIF4G and eIF4E were able to interact when 4E-BP was degraded (fig. 6B).

Exposure of unfertilized eggs to 100 mM MMS induces the activation of p38MAPK and the modification of eIF4G isoforms (fig. 6C). Calcium signaling was shown to be implicated in p38MAPK activation in response to MMS treatment in mammalian cells [30]. We tested the effect of the calcium chelator BAPTA-AM on p38 MAPK phosphorylation in MMS-treated eggs. Pre-incubation with BAPTA-AM before MMS treatment inhibited the activation of p38MAPK induced by 100 mM MMS (fig 6C). We then analyzed the modification of eIF4G isoforms in presence of SB203085 or BAPTA-AM. The inhibition of p38MAPK activation by SB203085 did not reverse the eIF4G electrophoretic profile induced by MMS treatment (fig. 6C), suggesting that the modification of eIF4G isoforms was independent of p38MAPK activity also in unfertilized eggs, as observed in embryos (see above). BAPTA-AM did not prevent the eIF4G profile modification induced by MMS treatment, suggesting that calcium pathways are not implicated.

Discussion

We have shown in this report that exposure of sea urchin embryos to the DNA damaging agent methyl methanesulfonate (MMS) induces drastic effects on protein synthesis activity, and on translation factors level, integrity and post-translational modification (fig. 7). A striking feature of translation inhibition in response to MMS treatment is that 4E-BP is dispensable in embryos and even targeted for degradation in unfertilized eggs. In both unfertilized eggs and embryos, exposure to different concentrations of MMS leads to different cellular responses: phosphorylation of p38MAPK, eIF4G modification and degradation pattern.

Protein synthesis inhibition is independent of 4E-BP during MMS induced apoptosis in sea urchin

Methyl methanesulfonate (MMS) exposure of sea urchin embryos induces inhibition of protein synthesis activity (this study), cell cycle arrest following DNA damage and cell death in case of repair failure [25]. In sea urchin, fertilization leads to a rapid degradation of 4E-BP, correlated to the increase of protein synthesis activity [18, 19]. Bleomycin, a radiomimetic agent that induces cell cycle arrest and apoptosis in sea urchin [25] provokes the reappearance of 4E-BP [12]. In contrast, exposure of sea urchin embryos to the alkylating agent MMS does not induce the reappearance of 4E-BP, therefore the inhibition of translation is independent of 4E-BP/ eIF4E binding. MMS and bleomycin are two genotoxic drugs that triggers different DNA repair processes and may activate different pathways for translation inhibition. Treatment of mammalian cells with DNA-damaging agents results in severe inhibition of protein synthesis, involving dephosphorylation of 4E-BP and increase in 4E-BP binding to eIF4E [32]. In this report, we have described an original model for the study of translation regulation in apoptosis, the sea urchin embryo, where translation inhibition during apoptosis is uncoupled from the binding of 4E-BP to eIF4E.

MMS exposure induces degradation of 4E-BP in unfertilized eggs, and no protein synthesis activation is observed. Activation of PI3kinase FRAP/mTOR induces phosphorylation of 4E-BP and its degradation at fertilization, leading to activation of translation [19, 33]. PI3kinase ATM is implicated in response to DNA-damaging agents in cells [34]. 4E-BP is phosphorylated by ATM following insulin treatment of mouse culture cells [35]. Since phosphorylation of 4E-BP is correlated to degradation in sea urchin [19], we suggest that MMS could induce a signaling pathway targeting 4E-BP for its phosphorylation and its degradation.

eIF2 α phosphorylation correlates with translation inhibition during apoptosis.

We have shown that phosphorylation of initiation factor eIF2 α is a rapid response to MMS exposure and is correlated with the inhibition of protein synthesis. Phosphorylation of the α subunit of eIF2 is a widely used mechanism of translational control. Many different types of stress reduce translation activity by triggering the phosphorylation of eIF2 α at a conserved serine residue. The phosphorylation of eIF2 α is mediated by a family of eIF2 kinases, sharing sequences and structural features in their catalytic domains, but with unique flanking regulatory regions allowing for distinct control pattern, in response to different stresses [36-38]. Links between phosphorylation of eIF2 α and apoptosis have been suggested: a phosphomimetic mutant of eIF2 α induces apoptotic cell death, activation of PKR can induce or enhance apoptosis [39, 40]. Conversely, cells deleted for the PKR gene or expressing the non-phosphorylatable eIF2 α mutant or a dominant negative PKR mutant are resistant to apoptosis by inducers such as dsRNA or TNF- α [39, 41]. Three eIF2 kinases were identified in the sea urchin genome, homologous to GCN2, HRI and PERK respectively, no PKR homolog is found in the genome [27]. Whether eIF2 α phosphorylation is necessary for apoptosis induction in sea urchin and which kinase is involved in sea urchin have to be determined.

Moreover, we showed for the first time that the phosphorylation of eIF2 α decreases at fertilization, a mechanism by which translation can be activated after fertilization. Protein synthesis in sea urchin eggs increases upon fertilization, translational control is exerted through multifactorial mechanisms, including mRNA recruitment into polysomes and increased rates of translation initiation and elongation [42, 43]. The regulation through initiation factor eIF2 was suggested to be an important regulatory step of protein synthesis upon fertilization, because addition of exogenous eIF2 stimulated the rate of protein synthesis in sea urchin egg extracts [44, 45]. To date, two initiation factors have been shown to be inhibited in sea urchin eggs and activated following fertilization: eIF4E (by interaction to / release from the inhibitor 4E-BP [19]) and eIF2 α (by phosphorylation/ dephosphorylation; this study)

Translation factor eIF4G is modified following 100 mM MMS exposure

Following exposure to 100 mM MMS, eIF4G protein is rapidly modified in sea urchin eggs and embryos (1-2 hours after exposure). In yeast, MMS exposure induces different post-translational modifications of PCNA depending whether DNA repair or death pathways are activated. SUMO conjugation of PCNA is triggered by severe DNA damage, whereas lower doses of MMS leads to ubiquitination of PCNA [46]. Antibodies against human ubiquitin and SUMO proteins do not cross react with sea urchin proteins [20], it is therefore not yet possible to test whether such modifications occur on eIF4G following MMS exposure of sea urchin embryos. The nature of the modification of eIF4G remains to be determined.

The MAP kinase p38 activates Mnk1 [28], a kinase responsible for eIF4G phosphorylation [29]. p38MAPK plays a critical role in stress responses and apoptosis in mammalian cell lines, and is activated by many agents that induce apoptosis. For example, MMS treatment of U937 or PC12 cells induces the activation of p38MAPK [30]. In echinoderms, spontaneous apoptosis occurs when mature starfish eggs are left unfertilized for

more than 10 hours, and requires the activation of p38MAPK [47]. Precocious activation of p38MAPK in sea urchin embryos leads to their rapid death by a yet undetermined pathway [48]. Following MMS treatment, p38MAPK is activated only upon high MMS doses, and is not implicated in eIF4G modification induced by the DNA damaging agent.

Translation factor eIF4G is degraded during apoptosis

A later response to MMS exposure of sea urchin eggs and embryos is the degradation of eIF4G. Mammalian eIF4G is substrate for caspase cleavage during apoptosis and is dependent on caspase 3 activity [7, 31]. The cleaved products (termed Fragment of Apoptotic cleavage of eIF4G or N-FAG, M-FAG, C-FAG) can be detected by Western blot [6]. We showed that a smaller fragment of sea urchin eIF4G is detected following 10 mM MMS treatment and is concomitant with caspase activity in treated embryos. Predicted caspase sites were detected in sea urchin eIF4G sequence. In contrast, when we failed to detect caspase-3 activity in 100 mM MMS treated embryos, no additional eIF4G fragment was detected. Moreover, modified eIF4G was observed early after 100 mM MMS exposure (fig. 3). In these embryos, we observe a degradation of eIF4G protein within the first 4 hours of exposure, while the general loss of cytoplasmic content occurs within 8-10 hours of exposure, as shown by the degradation of the actin protein. Other proteases, such as calpain, were shown to be implicated in the apoptotic degradation of translation factors (e.g. PABP, [49]). Other caspases than caspase-3 may be implicated : the sea urchin genome analysis revealed the existence of new caspases, which role in apoptosis and/or other physiological process remains to be discovered [24]. In addition, excessive DNA damage following DNA alkylating agent exposure induces preferentially apoptotic death mediated by caspase independent AIF pathway [50]. Caspase activation is not a prerequisite for apoptosis [51, 52], and it has been reported the apoptosis can occur in a caspase-independent pathway involving the apoptosis inducing factor AIF [53]. This pathway could be activated in sea urchin in response to 100

mM MMS. Interestingly, AIF was shown to interact with translation initiation factor eIF3g (p44) subunit in apoptotic condition, and to inhibit translation [54]. eIF3 interacts with eIF4G in the normal translation. Whether this interaction is still possible in an apoptotic context and with a modified eIF4G remains to be determined.

Specific translation in apoptosis

We have shown in this report that the DNA-damaging agent MMS that induces apoptosis, provokes inhibition of protein synthesis and modification of translation factors (summarized in fig. 7). In mammalian cells, while apoptosis induces a inhibition of protein synthesis activity by targeting cap-dependent initiation, translation of specific mRNAs are maintained through IRES-dependent translation [3]. The translated mRNAs encode for proteins involved in the apoptotic process, such as c-myc, APAF-1 or DAP5. eIF4G cleavage products have been implicated in IRES mediated translation [55, 56]. In sea urchin, in a context of 4E-BP absence, a complex containing eIF4E and eIF4G is observed after MMS exposure. Whether this eIF4E/eIF4G complex is competent for residual cap-dependent translation or for specific translation is unknown. Later on, eIF4G is degraded rapidly in response to MMS, suggesting that the cap-dependent translation is inhibited. A search for mRNAs specifically translated in apoptosis after MMS exposure will be undertaken by polysomal profiling. This analysis will help understand the translational regulation of the apoptotic process in sea urchin and these data will contribute to the establishment of a translational regulatory network [57].

Acknowledgements

This work was supported by Conseil Régional de Bretagne, Conseil général du Finistère, Association pour la Recherche contre le Cancer and Ligue contre le Cancer (Comités

départementaux du Finistère, Morbihan, Côtes d'Armor, et Vendée). RLB is doctoral research fellow financed by the Region Bretagne.

References

- [1] Adams, J. M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-95.
- [2] Norbury, C. J., and Zivnotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 2797-808.
- [3] Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-27.
- [4] Hershey, J. W., and Merrick, W. C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. W. Hershey, and M. B. Mathews, Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [5] 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, 4990-7.
- [6] Morley, S. J., Coldwell, M. J., and Clemens, M. J. (2005). Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ* 12, 571-84.
- [7] Jeffrey, I. W., Bushell, M., Tilleray, V. J., Morley, S., and Clemens, M. J. (2002). Inhibition of protein synthesis in apoptosis: differential requirements by the tumor necrosis factor alpha family and a DNA-damaging agent for caspases and the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Cancer Res* 62, 2272-80.
- [8] Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., and Sonenberg, N. (1990). Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345, 544-7.
- [9] Mamane, Y., Petroulakis, E., Martineau, Y., Sato, T. A., Larsson, O., Rajasekhar, V. K., and Sonenberg, N. (2007). Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation. *PLoS ONE* 2, e242.
- [10] Herbert, T. P., Fahraeus, R., Prescott, A., Lane, D. P., and Proud, C. G. (2000). Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E. *Curr Biol* 10, 793-6.
- [11] 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, 2415-20.
- [12] Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., and Belle, R. (2006). Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J Cell Biochem* 99, 126-32.
- [13] Teleman, A. A., Chen, Y. W., and Cohen, S. M. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev* 19, 1844-8.
- [14] Tettweiler, G., Miron, M., Jenkins, M., Sonenberg, N., and Lasko, P. F. (2005). Starvation and oxidative stress resistance in Drosophila are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. *Genes Dev* 19, 1840-3.
- [15] Stoneley, M., and Willis, A. E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23, 3200-7.
- [16] Epel, D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 899-906.
- [17] Le Breton, M., Belle, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., and Morales, J. (2003). M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 880-6.
- [18] Salaun, 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, 428-39.

- [19] Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N., and Belle, R. (2001). eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev Biol* 232, 275-83.
- [20] Oulhen, N., Salaun, P., Cosson, B., Cormier, P., and 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.
- [21] Cormier, P., Pyronnet, S., Salaun, P., Mulner-Lorillon, O., and Sonenberg, N. (2003). Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 469-75.
- [22] Roccheri, M. C., Tipa, C., Bonaventura, R., and Matranga, V. (2002). Physiological and induced apoptosis in sea urchin larvae undergoing metamorphosis. *Int J Dev Biol* 46, 801-6.
- [23] Voronina, E., and Wessel, G. M. (2001). Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Mol Reprod Dev* 60, 553-61.
- [24] Robertson, A. J., Croce, J., Carbonneau, S., Voronina, E., Miranda, E., McClay, D. R., and Coffman, J. A. (2006). The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300, 321-34.
- [25] Le Bouffant, R., Cormier, P., Cueff, A., Belle, R., and Mulner-Lorillon, O. (2007). Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 64, 1723-34.
- [26] Boulben, S., Monnier, A., Le Breton, M., Morales, J., Cormier, P., Belle, R., and Mulner-Lorillon, O. (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, 2178-88.
- [27] Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C. A., Beane, W. S., and Cormier, P. (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* 300, 293-307.
- [28] Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16, 1909-20.
- [29] Orton, K. C., Ling, J., Waskiewicz, A. J., Cooper, J. A., Merrick, W. C., Korneeva, N. L., Rhoads, R. E., Sonenberg, N., and Traugh, J. A. (2004). Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk. *J Biol Chem* 279, 38649-57.
- [30] Pandey, P., Avraham, S., Kumar, S., Nakazawa, A., Place, A., Ghanem, L., Rana, A., Kumar, V., Majumder, P. K., Avraham, H., Davis, R. J., and Kharbanda, S. (1999). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by PYK2/related adhesion focal tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 274, 10140-4.
- [31] Bushell, M., McKendrick, L., Janicke, R. U., Clemens, M. J., and Morley, S. J. (1999). Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Lett* 451, 332-6.
- [32] Tee, A. R., and Proud, C. G. (2000). DNA-damaging agents cause inactivation of translational regulators linked to mTOR signalling. *Oncogene* 19, 3021-31.
- [33] Salaun, P., Le Breton, M., Morales, J., Belle, 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, 347-57.
- [34] Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-74.
- [35] Yang, D. Q., and Kastan, M. B. (2000). Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat Cell Biol* 2, 893-8.
- [36] Proud, C. G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16, 3-12.

- [37] Wek, R. C., Jiang, H. Y., and Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34, 7-11.
- [38] Koritzinsky, M., Magagnin, M. G., van den Beucken, T., Seigneuric, R., Savelkoul, K., Dostie, J., Pyronnet, S., Kaufman, R. J., Weppler, S. A., Voncken, J. W., Lambin, P., Koumenis, C., Sonenberg, N., and Wouters, B. G. (2006). Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *Embo J* 25, 1114-25.
- [39] Srivastava, S. P., Kumar, K. U., and Kaufman, R. J. (1998). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273, 2416-23.
- [40] Donze, O., Dostie, J., and Sonenberg, N. (1999). Regulatable expression of the interferon-induced double-stranded RNA dependent protein kinase PKR induces apoptosis and fas receptor expression. *Virology* 256, 322-9.
- [41] Der, S. D., Yang, Y. L., Weissmann, C., and Williams, B. R. (1997). A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3279-83.
- [42] Brandis, J. W., and Raff, R. A. (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilisation. *Nature* 278, 467-9.
- [43] Hille, M. B., and Albers, A. A. (1979). Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature* 278, 469-71.
- [44] Akkaraju, G. R., Hansen, L. J., and Jagus, R. (1991). Increase in eukaryotic initiation factor 2B activity following fertilization reflects changes in redox potential. *J Biol Chem* 266, 24451-9.
- [45] Dholakia, J. N., Xu, Z., Hille, M. B., and Wahba, A. J. (1990). Purification and characterization of sea urchin initiation factor 2. The requirement of guanine nucleotide exchange factor for the release of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2-bound GDP. *J Biol Chem* 265, 19319-23.
- [46] Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-41.
- [47] Sasaki, K., and Chiba, K. (2004). Induction of apoptosis in starfish eggs requires spontaneous inactivation of MAPK (extracellular signal-regulated kinase) followed by activation of p38MAPK. *Mol Biol Cell* 15, 1387-96.
- [48] Bradham, C. A., and McClay, D. R. (2006). p38 MAPK is essential for secondary axis specification and patterning in sea urchin embryos. *Development* 133, 21-32.
- [49] Marissen, W. E., Triyoso, D., Younan, P., and Lloyd, R. E. (2004). Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells and linkage to translation regulation. *Apoptosis* 9, 67-75.
- [50] Hong, S. J., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2004). Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25, 259-64.
- [51] Okuno, S., Shimizu, S., Ito, T., Nomura, M., Hamada, E., Tsujimoto, Y., and Matsuda, H. (1998). Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 273, 34272-7.
- [52] Xiang, J., Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14559-63.
- [53] Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6.

- [54] Kim, J. T., Kim, K. D., Song, E. Y., Lee, H. G., Kim, J. W., Kim, J. W., Chae, S. K., Kim, E., Lee, M. S., Yang, Y., and Lim, J. S. (2006). Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g). *FEBS Lett* 580, 6375-83.
- [55] Hundsdoerfer, P., Thoma, C., and Hentze, M. W. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4GI and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13421-6.
- [56] Nevins, T. A., Harder, Z. M., Korneluk, R. G., and Holcik, M. (2003). Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. *J Biol Chem* 278, 3572-9.
- [57] Thompson, B., Wickens, M., and Kimble, J. (2007). Translational control of development. In "Translational control in Biology and Medicine" (M. B. Mathews, N. Sonenberg, and J. W. Hershey, Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Figure legends

Figure 1: MMS inhibits protein synthesis triggered by fertilization. The rate of in vivo protein synthesis was monitored in untreated embryos (diamonds), in 10 mM MMS (squares) or 100 mM MMS (triangles) treated embryos. Incorporation of [³⁵S] labeled methionine into proteins was measured by TCA precipitation at indicated times after fertilization. The data represent the mean of 2 independent experiments.

Figure 2: Inhibition of protein synthesis induced by MMS is independent from 4E-BP and correlates with eIF2 α phosphorylation. A- MMS exposure does not induce the re-assembly of 4E-BP. Total extracts from unfertilized eggs, control and MMS-treated embryos were taken 3 hours post-fertilization and analyzed with an antibody directed against 4E-BP. An antibody against actin is used as a loading control. B- Fertilization provokes the rapid dephosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . Total extracts were prepared from unfertilized eggs and embryos at the indicated times after fertilization, and analyzed with antibodies against phospho-Ser51 eIF2 α (P-eIF2 α) or full length eIF2 α (FL eIF2 α). C- MMS treatment of sea urchin embryos induces the phosphorylation of eIF2 α . Total extracts were prepared from unfertilized eggs and embryos (control or 100mM MMS-treated) at the indicated times after fertilization, and analyzed by Western blot as above. D- The timing of phosphorylation of eIF2 α induced by MMS treatment is dose-dependent. Extracts from control or MMS treated embryos (10 mM or 100 mM MMS) were analyzed by Western blot as above. Signals were quantified and the ratio of phosphorylated eIF2 α over total eIF2 α (ratio P/FL) is indicated under each lane.

Figure 3: MMS induces the modification of eIF4G isoforms. A- Unfertilized eggs, control embryos or 100 mM MMS treated- embryos were collected at the indicated times, and the interaction of eIF4G with eIF4E was analyzed by cap-column purification. Affinity purified proteins using an m⁷GTP column were subjected to Western blot using antibodies against

eIF4G, eIF4E and 4E-BP. B- Cytosolic extracts from unfertilized eggs, control or 100 mM MMS-treated embryos collected at the indicated times were analyzed by western blot using antibodies against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. An antibody against actin was used as a loading control.

Figure 4: eIF4G modification and p38MAPK activation are two unrelated downstream events induced by 100 mM MMS treatment. A- p38 MAPK kinase is activated following exposure to 100 mM MMS. Sea urchin embryos were incubated with 10 or 100 mM MMS twenty minutes after fertilization, and collected at 3 hours. Total embryos extracts were analyzed by Western blot using an antibody against phospho Thr180/Tyr182 p38MAPK. An antibody against actin was used as a loading control. B- eIF4G modification is independent of p38MAPK. Embryos were treated with or without 100 μ M SB203580 (added 10 minutes after fertilization) before 100 mM MMS treatment, and were collected 3 hours after fertilization. Total extracts were prepared and analyzed by Western blot. An antibody against actin was used as a loading control.

Figure 5: eIF4G cleavage in 10 mM MMS treated embryos is concomitant with caspase-3 activity. A- eIF4G is degraded following MMS exposure, and the degradation pattern is dose-dependent. Total extracts from embryos were analyzed by western blot with eIF4G antibody at the indicated times after fertilization in presence of 10 mM or 100 mM MMS. An antibody against actin is used as a loading control. B- Caspase-3 activity was monitored in 10 mM and 100 mM treated embryos at 2, 5 and 20h as indicated, and expressed as a ration of activity in MMS-treated versus control embryos.

Figure 6: MMS induces translation factors modification in unfertilized eggs. Unfertilized eggs were exposed to 10 mM or 100 mM MMS and collected at indicated times. A- Total extracts were analyzed by western blot against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. Actin was used as a loading control. B- eIF4G interacts with eIF4E in MMS-treated unfertilized eggs. Using an

m⁷GTP column, affinity purified proteins from control or 10 mM MMS-treated eggs were analyzed by Western blots with antibodies against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. C- eIF4G modification in unfertilized eggs is independent of p38MAPK. Eggs were incubated 2 hours with or without 100μM SB203580 or 100μM BAPTA-AM, before 100 mM MMS treatment. Total extracts were prepared from control or treated eggs after 3 hours of MMS treatment and analyzed by western blot using antibodies against phospho-p38MAPK and eIF4G. An antibody against actin was used as a loading control.

Figure 7: Impact of DNA damaging agent MMS on translation factors in sea urchin eggs and embryos. MMS treatment induces protein synthesis inhibition, phosphorylation of translational initiation factor eIF2α and degradation of eIF4G in embryos. MMS also induces the degradation of 4E-BP in unfertilized eggs. In both eggs and embryos, exposure to different concentrations of MMS leads to different cellular responses: phosphorylation of p38MAPK, eIF4G modification and degradation pattern (cleavage intermediate or total), and cell death (caspase-dependent or independent).

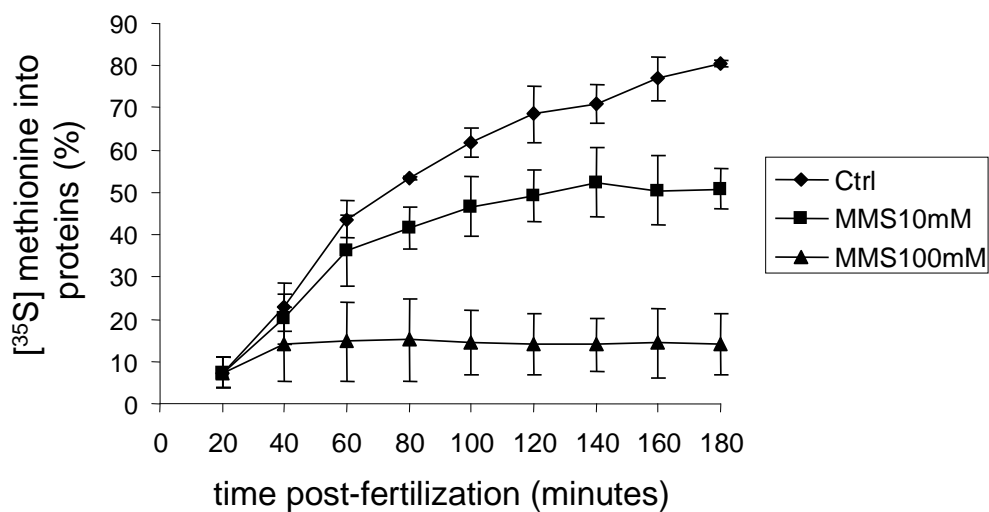


Figure 1: MMS inhibits protein synthesis triggered by fertilization. The rate of in vivo protein synthesis was monitored in untreated embryos (diamonds), in 10 mM MMS (squares) or 100 mM MMS (triangles) treated embryos. Incorporation of [35S] labeled methionine into proteins was measured by TCA precipitation at indicated times after fertilization. The data represent the mean of 2 independent experiments.

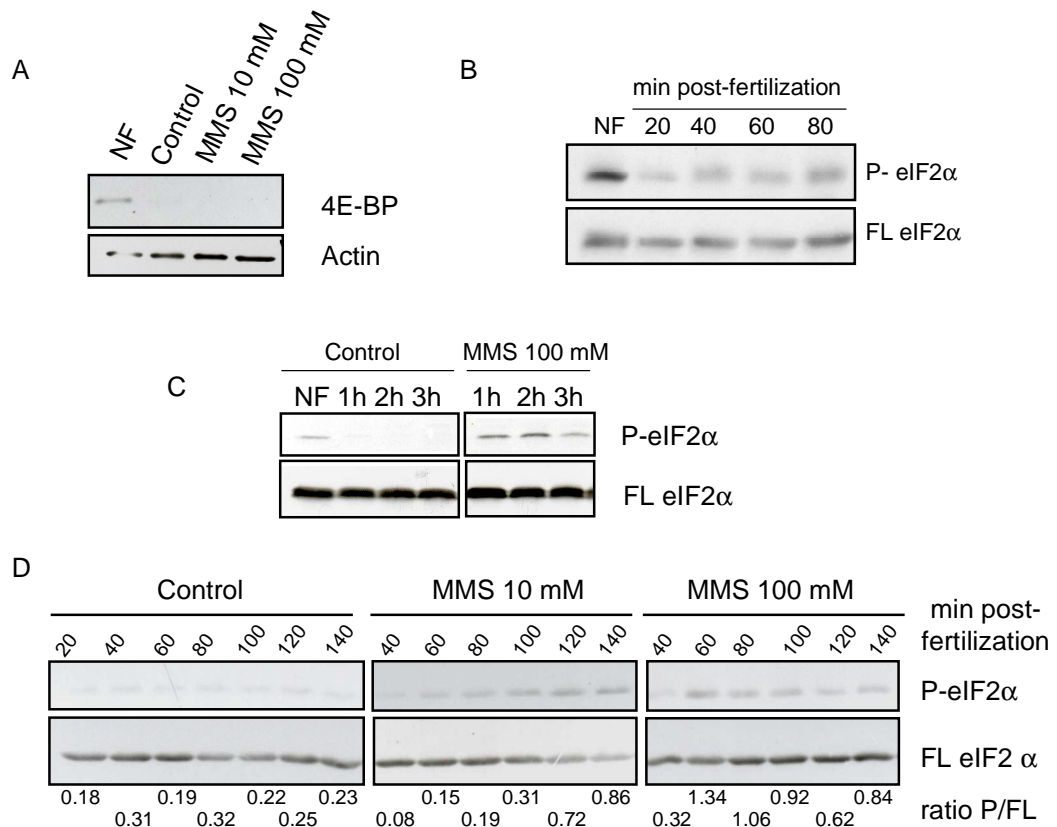


Figure 2: Inhibition of protein synthesis induced by MMS is independent from 4E-BP and correlates with eIF2 α phosphorylation. A- MMS exposure does not induce the re-appearance of 4E-BP. Total extracts from unfertilized eggs, control and MMS-treated embryos were taken 3 hours post-fertilization and analyzed with an antibody directed against 4E-BP. An antibody against actin is used as a loading control. B- Fertilization provokes the rapid dephosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . Total extracts were prepared from unfertilized eggs and embryos at the indicated times after fertilization, and analyzed with antibodies against phospho-Ser51 eIF2 α (P-eIF2 α) or full length eIF2 α (FL eIF2 α). C- MMS treatment of sea urchin embryos induces the phosphorylation of eIF2 α . Total extracts were prepared from unfertilized eggs and embryos (control or 100mM MMS-treated) at the indicated times after fertilization, and analyzed by Western blot as above. D- The timing of phosphorylation of eIF2 α induced by MMS treatment is dose-dependent. Extracts from control or MMS treated embryos (10 mM or 100 mM MMS) were analyzed by Western blot as above. Signals were quantified and the ratio of phosphorylated eIF2 α over total eIF2 α (ratio P/FL) is indicated under each lane.

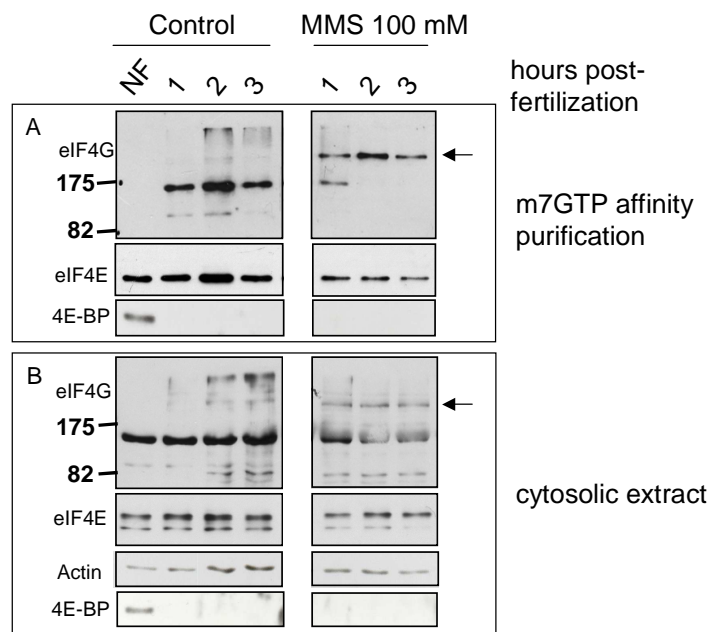


Figure 3: MMS induces the modification of eIF4G isoforms. A- Unfertilized eggs, control embryos or 100 mM MMS treated- embryos were collected at the indicated times, and the interaction of eIF4G with eIF4E was analyzed by cap-column purification. Affinity purified proteins using an m7GTP column were subjected to Western blot using antibodies against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. B- Cytosolic extracts from unfertilized eggs, control or 100 mM MMS-treated embryos collected at the indicated times were analyzed by western blot using antibodies against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. An antibody against actin was used as a loading control.

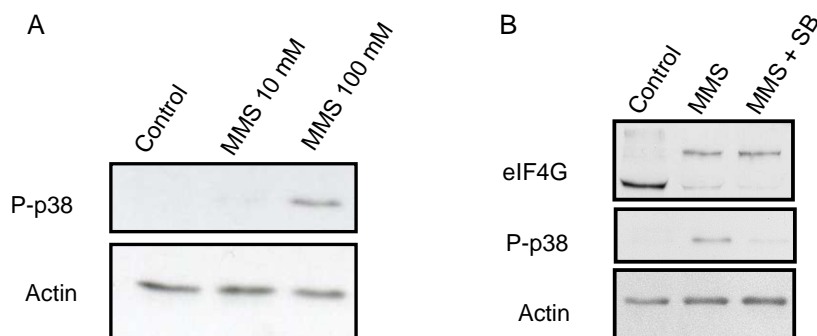


Figure 4: eIF4G modification and p38MAPK activation are two unrelated downstream events induced by 100 mM MMS treatment. A- p38 MAPK kinase is activated following exposure to 100 mM MMS. Sea urchin embryos were incubated with 10 or 100 mM MMS twenty minutes after fertilization, and collected at 3 hours. Total embryos extracts were analyzed by Western blot using an antibody against phospho Thr180/Tyr182 p38MAPK. An antibody against actin was used as a loading control. B- eIF4G modification is independent of p38MAPK. Embryos were treated with or without 100 μ M SB203580 (added 10 minutes after fertilization) before 100 mM MMS treatment, and were collected 3 hours after fertilization. Total extracts were prepared and analyzed by Western blot. An antibody against actin was used as a loading control.

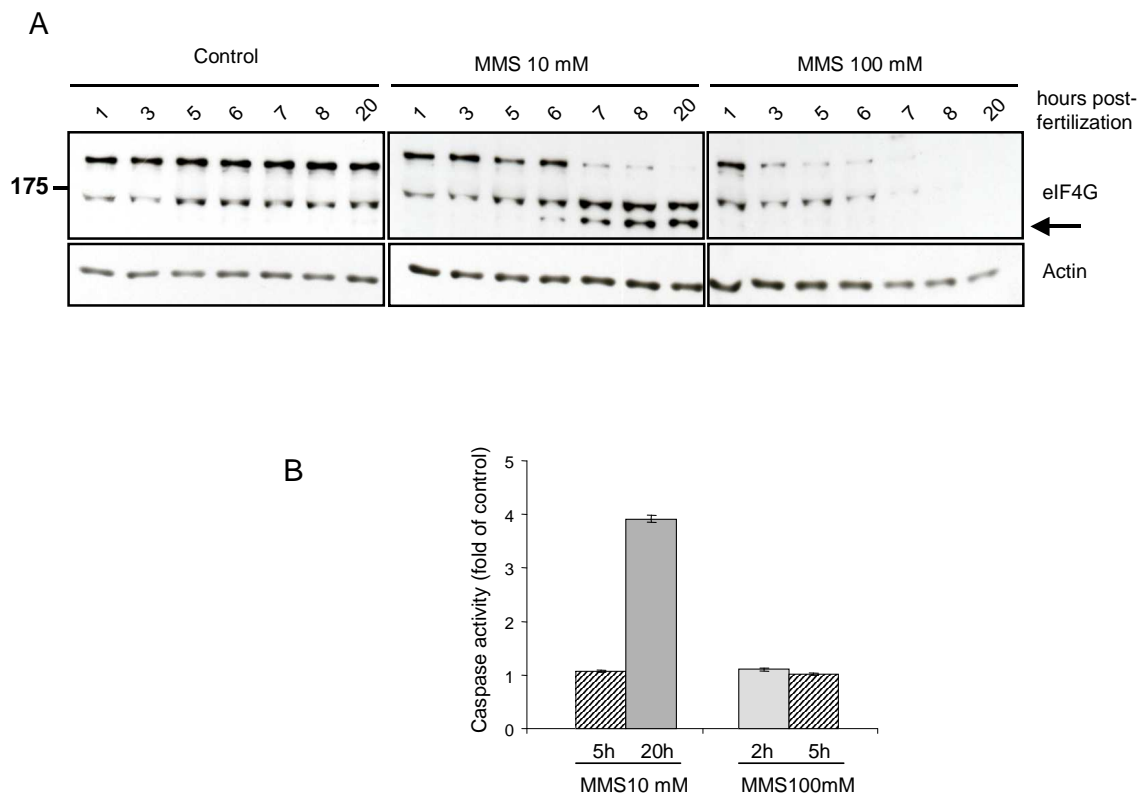


Figure 5: eIF4G cleavage in 10 mM MMS treated embryos is concomitant with caspase-3 activity. A- eIF4G is degraded following MMS exposure, and the degradation pattern is dose dependent. Total extracts from embryos were analyzed by western blot with eIF4G antibody at the indicated times after fertilization in presence of 10 mM or 100 mM MMS. An antibody against actin is used as a loading control. B- Caspase-3 activity was monitored in 10 mM and 100 mM treated embryos at 2, 5 and 20h as indicated, and expressed as a ration of activity in MMS-treated versus control embryos.

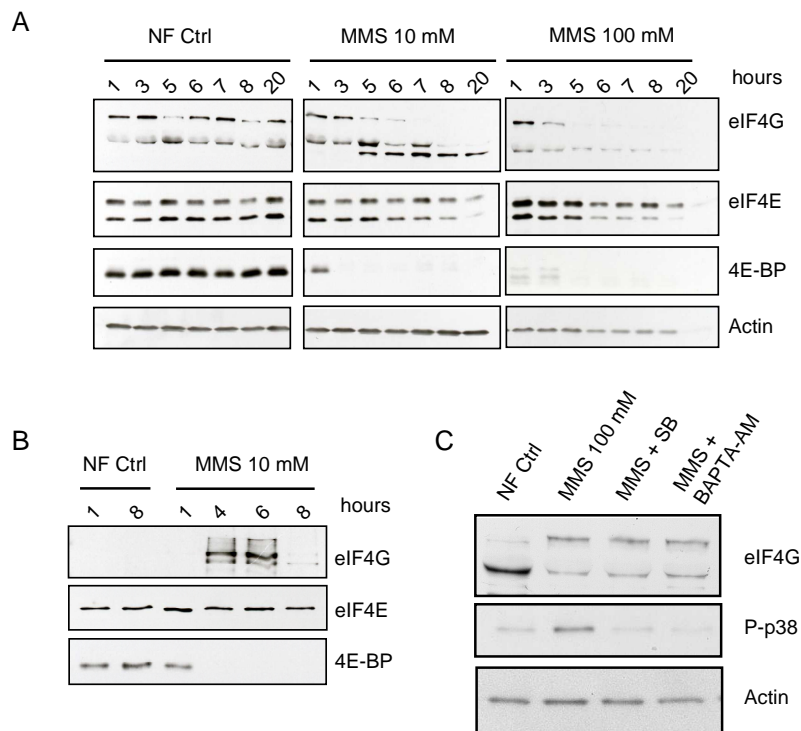


Figure 6: MMS induces translation factors modification in unfertilized eggs. Unfertilized eggs were exposed to 10 mM or 100 mM MMS and collected at indicated times. A- Total extracts were analyzed by western blot against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. Actin was used as a loading control. B- eIF4G interacts with eIF4E in MMS-treated unfertilized eggs. Using an m⁷GTP column, affinity purified proteins from control or 10 mM MMS-treated eggs were analyzed by Western blots with antibodies against eIF4G, eIF4E and 4E-BP. C- eIF4G modification in unfertilized eggs is independent of p38MAPK. Eggs were incubated 2 hours with or without 100μM SB203580 or 100μM BAPTA-AM, before 100 mM MMS treatment. Total extracts were prepared from control or treated eggs after 3 hours of MMS treatment and analyzed by western blot using antibodies against phospho-p38MAPK and eIF4G. An antibody against actin was used as a loading control.

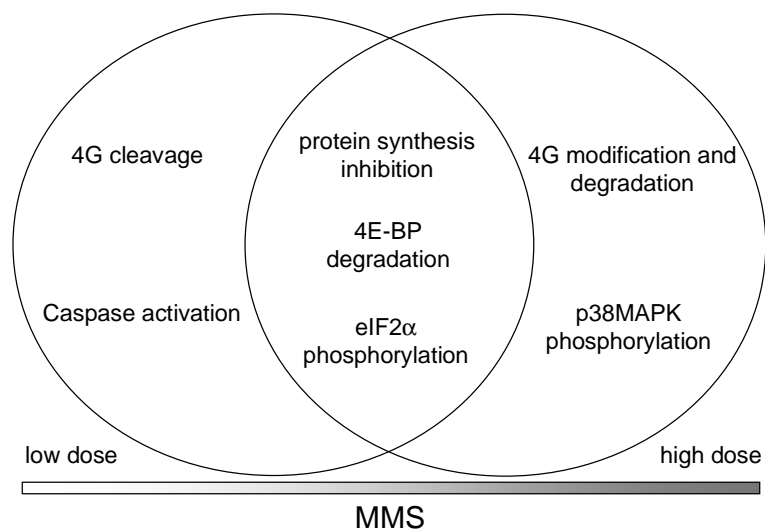


Figure 7: Impact of DNA damaging agent MMS on translation factors in sea urchin eggs and embryos. MMS treatment induces protein synthesis inhibition, phosphorylation of translational initiation factor eIF2 α and degradation of eIF4G in embryos. MMS also induces the degradation of 4E-BP in unfertilized eggs. In both eggs and embryos, exposure to different concentrations of MMS leads to different cellular responses: phosphorylation of p38MAPK, eIF4G modification and degradation pattern (cleavage intermediate or total), and cell death (caspase-dependent or independent).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre l'implication des facteurs de traduction au cours de la mobilisation de points de surveillance en réponse au traitement par des génotoxiques ou au stress cellulaire. Pour atteindre cet objectif, nous avons tiré profit du modèle que représente l'embryon d'oursin qui s'est avéré puissant pour l'étude des relations entre la régulation de la traduction et le cycle cellulaire (Wagenaar 1983; Cormier et al. 2001; Salaun et al. 2003). De façon remarquable, le génome complet de cet organisme a été obtenu dans le même temps par l'ensemble de la communauté scientifique travaillant sur l'oursin (Sodergren et al. 2006) et nous a conforté dans le choix du modèle pour notre approche expérimentale avec, en particulier, la démonstration de la non redondance des gènes codant pour les protéines d'intérêt et leur conservation au cours de l'évolution. De plus, l'embryon d'oursin s'est révélé être un modèle extrêmement original pour l'étude des modifications d'expression de la protéine 4E-BP en réponse à la fécondation dans les conditions physiologiques (Cormier et al. 2001).

Dans ce contexte scientifique dynamique, le modèle oursin nous a permis d'apporter des données nouvelles et originales dans les mécanismes de régulation traductionnelle lors du cycle cellulaire et de la mobilisation des points de surveillance. Dans un premier temps, le point de surveillance de l'ADN endommagé a été caractérisé pour la première fois dans l'embryon d'oursin et nous a permis d'identifier dans cet organisme des mécanismes de réparation de l'ADN et d'apoptose fonctionnels, associés à l'arrêt du cycle cellulaire. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les liens entre ces mécanismes moléculaires et la machinerie traductionnelle. Ce travail de thèse nous conduit à présenter des perspectives pour étendre encore les connaissances sur les régulations traduction/points de surveillance du cycle cellulaire.

1 L'embryon d'oursin et endommagements de l'ADN

L'analyse des points de surveillance (arrêt du cycle – réparation de l'ADN – apoptose) activés en réponse à des génotoxiques (bléomycine ou MMS) nous a permis de démontrer la puissance du modèle que représente l'embryon d'oursin pour étudier ces mécanismes moléculaires ([Article 1](#); [Figure 17](#)). Au cours de la première division mitotique, un endommagement de l'ADN induit l'arrêt de la division cellulaire dans l'embryon. Si les dommages ne sont pas trop importants, le système de réparation de l'embryon va être recruté de façon appropriée en fonction du type de lésion et permettre, après réparation de l'ADN, de reprendre le cycle cellulaire. En revanche, si les dommages sont trop importants, la mort cellulaire programmée ou apoptose est déclenchée dans l'embryon. En réponse aux génotoxiques, l'arrêt du cycle cellulaire est corrélé au maintien d'une phosphorylation inhibitrice de la protéine CDK1 sur un résidu tyrosine. Deux hypothèses non exclusives peuvent rendre compte de l'état de phosphorylation de CDK1 dans ces conditions. Soit la phosphatase activatrice Cdc25 est inhibée, soit les kinases inhibitrices Wee1 et/ou Myt 1 sont activées. Il faut noter qu'en réponse à l'endommagement de l'ADN, l'inhibition des phosphatases Cdc25 a souvent été rapportée (Karlsson-Rosenthal and Millar 2006).

La dissection des voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes moléculaires, devrait pouvoir tirer avantage des données génomiques récentes obtenues chez l'oursin, démontrant en particulier l'existence d'une seule isoforme de Cdc25 chez l'oursin (Fernandez-Guerra et al. 2006).

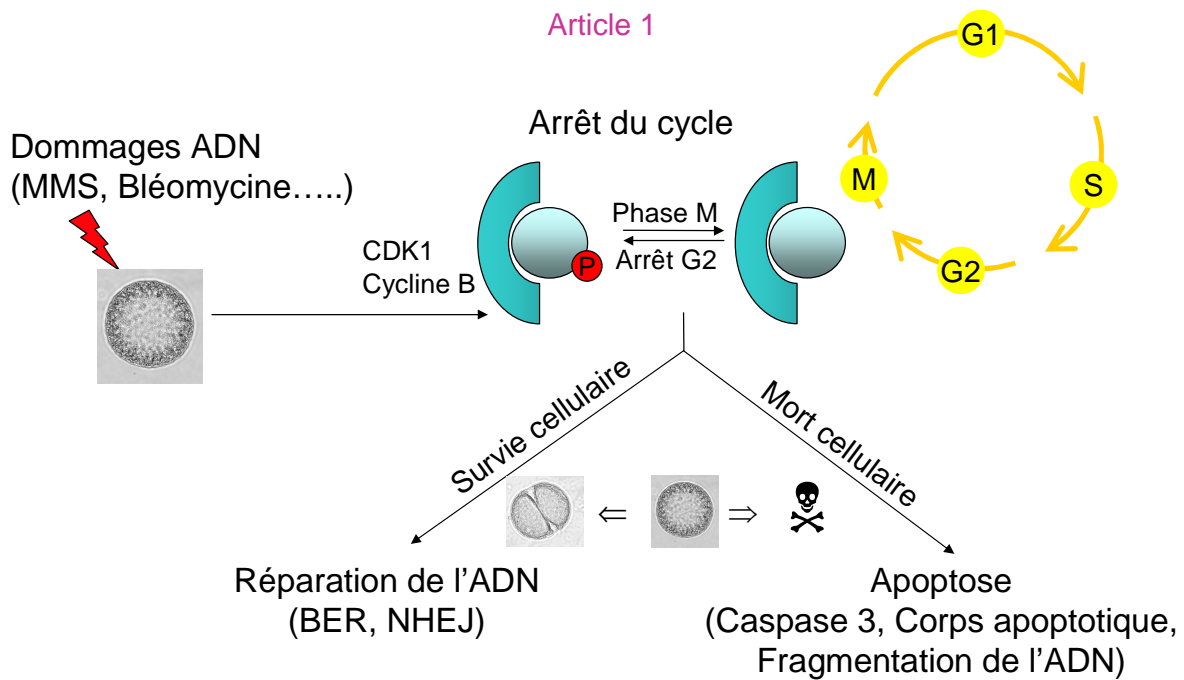


Figure 17: Activation du point de surveillance de l'embryon d'oursin traité par des molécules génotoxiques.

L'endommagement de l'ADN induit l'arrêt du cycle cellulaire, en impliquant le complexe CDK1- Cycline B, la réparation de l'ADN appropriée aux types de dommages ou l'apoptose dans l'embryon d'oursin.

2 La protéine eIF2 α , un inhibiteur de la traduction dans l'embryon d'oursin

L'état de phosphorylation du facteur eIF2 α a été impliqué dans le contrôle de l'activité traductionnelle (Gebauer and Hentze 2004). Dans les cellules de mammifères, la protéine eIF2 α est phosphorylée au niveau de la sérine 51 en réponse à un stress ce qui contribue à l'inhibition de la synthèse protéique (Wek et al. 2006). Cette sérine est conservée chez l'oursin (Morales et al. 2006). Nous avons montré, au cours de ce travail de thèse, deux points importants qui concernent la régulation de cette protéine ([Article 4](#)). Premièrement, nous avons démontré que la protéine eIF2 α est présente sous forme phosphorylée dans l'ovule et que la fécondation induit sa déphosphorylation de façon corrélée à l'augmentation de la synthèse protéique. Deuxièmement, nos travaux indiquent que la protéine eIF2 α peut

être à nouveau phosphorylée dans l'embryon d'oursin et ce, de manière corrélée à l'inhibition de synthèse protéique lors d'une exposition au MMS. Ainsi, la protéine eIF2 α participe à la régulation de l'activité traductionnelle de l'embryon lors de la fécondation et lors de la mobilisation du point de surveillance de l'ADN endommagé par le MMS. Il serait intéressant d'étudier la voie de signalisation responsable de la phosphorylation de eIF2 α , d'une part en réponse à la fécondation et d'autre part, lors du traitement par le MMS. Les résultats de l'annotation du génome de l'oursin ont permis de prédire que trois des quatre eIF2-kinases sont présentes chez l'oursin. Les kinases GCN2, PERK et HRI ont été annotées dans cet organisme alors que la kinase PKR est absente. La kinase GCN2, impliquée dans la réponse cellulaire engagée après des endommagements de l'ADN (Deng et al. 2002; Jiang and Wek 2005) est la candidate la plus prometteuse dans l'action du MMS.

3 La protéine 4E-BP, entre survie et apoptose

3-1 Expression de la protéine 4E-BP

La petite protéine 4E-BP est un répresseur extrêmement efficace de la synthèse protéique dépendante de la coiffe m⁷GTP (Salaun et al. 2003; Gebauer and Hentze 2004). Le niveau d'expression de ce régulateur traductionnel est contrôlé dans l'embryon d'oursin (Oulhen and Cormier 2006). Depuis la découverte dans cet organisme de la dégradation de 4E-BP comme nouveau mécanisme de contrôle de la disponibilité d'eIF4E pour ses partenaires (Salaun et al. 2003), des études récentes ont montré que cette régulation est également présente chez les mammifères et participe à la régulation traductionnelle (Elia et al. 2007). De plus, le niveau d'expression de la protéine 4E-BP est intimement lié à la réponse

cellulaire induite après un stress dans l'embryon de drosophile (Teleman et al. 2005; Tettweiler et al. 2005).

Au cours de cette thèse, nous avons montré que l'expression de 4E-BP varie en réponse à un stress hypoxique, à la mobilisation prolongée du point de surveillance de l'ADN endommagé (Article 2) ou à l'action endommageante du chrome (Article 3). Il est remarquable que dans ces conditions de stress, la protéine 4E-BP soit néo-synthétisée alors que la synthèse protéique globale est inhibée (Figure 18). Comprendre comment le niveau d'expression de 4E-BP est spécifiquement contrôlé dans ces conditions est maintenant un challenge important. En effet, dans de nombreux autres systèmes, la production de protéines régulatrices est modulée en réponse aux agents endommageant l'ADN dans un contexte de survie ou de mort cellulaire. Certains mécanismes de contrôle impliquent des séquences cis-régulatrices telles que les IRES (Holcik and Sonenberg 2005). Il serait donc maintenant très intéressant d'analyser le mode de régulation du messenger codant pour la protéine 4E-BP en recherchant la présence éventuelle d'une séquence IRES dans la région 5' non traduite de son ARNm.

Parallèlement, l'analyse du ratio entre les activités de synthèse et de dégradation de la protéine 4E-BP est une étape importante pour comprendre comment est contrôlée cette protéine dans l'embryon d'oursin dans les conditions physiologiques et / ou dans un contexte de stress et de survie cellulaire.

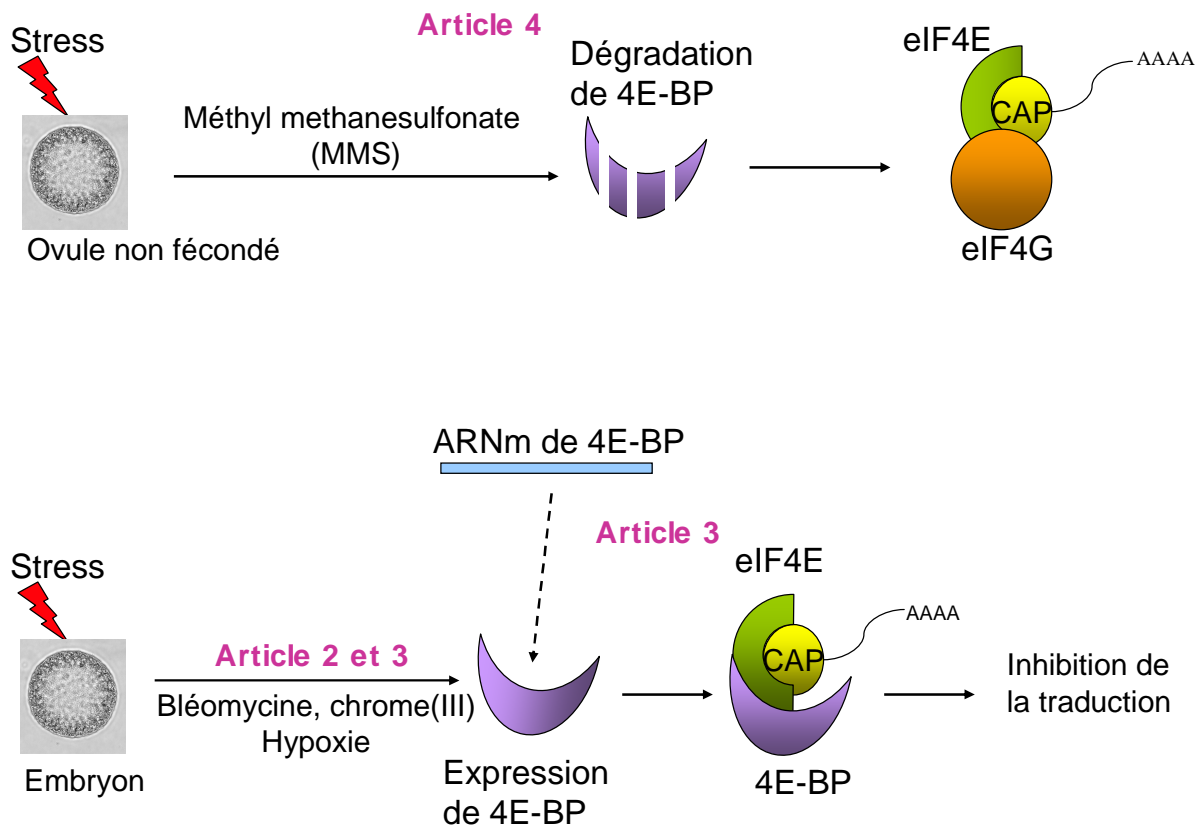


Figure 18: Comportement de la protéine 4E-BP en réponse à l'action de molécules génotoxiques.

La protéine 4E-BP (violet) est dégradée en réponse à une molécule alkylant l'ADN, le méthyl methanesulfonate (MMS) dans l'ovule non fécondé (en haut) entraînant la liaison de eIF4G (orange) avec eIF4E (vert). La protéine 4E-BP est exprimée en réponse à différents stress, induits par une molécule radiomimétique (Bléomycine), le chrome(III) ou encore l'hypoxie dans l'embryon (en bas) entraînant la dissociation du complexe eIF4E-eIF4G et l'inhibition de la synthèse protéique.

3-2 Dégradation de la protéine 4E-BP

L'utilisation du modèle embryonnaire précoce de l'oursin pour l'étude des mécanismes impliqués dans la dégradation de la protéine 4E-BP est extrêmement prometteuse. Ceci d'autant plus que nous avons démontré que nous pouvions induire rapidement sa dégradation dans l'ovule non fécondé en utilisant une molécule alkylant

l'ADN, le MMS (Article 4). Il a été montré que la protéine 4E-BP est dégradée en réponse à la fécondation, de manière dépendante de l'activité FRAP/mTOR sensible à la rapamycine (Salaun et al. 2003). Ainsi, il serait maintenant intéressant d'analyser l'effet de la rapamycine sur la dégradation de 4E-BP induite par le MMS dans l'ovule, ce qui permettrait de savoir si la kinase FRAP/mTOR contrôle aussi la dégradation dans ces conditions. Cette donnée serait d'autant plus intéressante que, dans le cas où la rapamycine bloquerait la dégradation de 4E-BP induite par le MMS, elle impliquerait ainsi la kinase FRAP/mTOR dans la voie de signalisation induite par un agent endommagement l'ADN. L'implication de la kinase ATM, précédemment impliquée dans la régulation de 4E-BP (Yang and Kastan 2000) chez la souris pourra aussi être étudiée chez l'embryon d'oursin grâce à l'utilisation d'un inhibiteur, la caféine.

Le mécanisme responsable de la dégradation de la protéine 4E-BP dans le modèle oursin reste encore à identifier. De manière intéressante, des travaux récents ont montré que la phosphorylation de la protéine 4E-BP provoque son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome dans des cellules humaines (Elia et al. 2007). Cette voie de dégradation pour 4E-BP est susceptible d'être conservée chez l'oursin et doit donc être étudiée.

3-3 Implication du niveau d'expression de 4E-BP : survie ou mort cellulaire ?

Nos travaux démontrent que la protéine 4E-BP est surexprimée lorsque les embryons d'oursin sont placés en condition d'hypoxie. Cette surexpression est corrélée à un arrêt du développement embryonnaire. Lorsque les embryons sont remis en condition normale d'oxygène dissous, une reprise du développement ainsi qu'une disparition de la protéine 4E-BP est observée. Nous associons le rôle de la surexpression de la protéine 4E-BP à la survie cellulaire, comme cela a déjà été proposé dans d'autres modèles (Teleman et al. 2005;

Tettweiler et al. 2005). La protéine 4E-BP serait nécessaire à l'inhibition de la synthèse protéique, permettant ainsi une grande économie d'énergie pour la cellule (Holcik and Sonenberg 2005) et facilitant la mise en latence de l'embryon. Nous proposons maintenant, par des approches d'inactivation de gènes, de déterminer le rôle de 4E-BP qui réapparaît dans l'embryon d'oursin dans les conditions hypoxiques. Ainsi, des tests de survie effectués sur des embryons ne pouvant plus exprimer la protéine 4E-BP indiqueront son implication dans ce phénomène. Ces études pourront aussi être menées avec les différents stress entraînant la surexpression de 4E-BP comme l'addition de drogue endommageant l'ADN telle que la bléomycine ou le traitement par le chrome (Articles 2 et 3).

Il est intéressant de noter que les variations d'expression de la protéine 4E-BP sont spécifiques du type de stress. Si les conditions hypoxiques, la bléomycine et le chrome provoquent une surexpression de 4E-BP au cours du développement embryonnaire de l'oursin, en revanche le MMS ne provoque pas d'augmentation de production de cette protéine. Au contraire, cette molécule est capable, dans l'ovule non fécondé, d'induire la dégradation de la protéine 4E-BP, permettant ainsi la formation du complexe eIF4E-eIF4G alors que la synthèse globale reste inhibée. Après fécondation et au cours du développement embryonnaire, l'addition de MMS provoque l'entrée en apoptose de l'embryon précoce. Savoir si l'absence de surexpression de 4E-BP dans ces conditions peut être impliquée dans l'orientation de la mort cellulaire, induite par le MMS, dans l'embryon reste un point important à déterminer. Une voie possible d'analyse serait d'imposer la surexpression de la protéine 4E-BP dans l'embryon d'oursin et de le traiter par le MMS. La réponse de l'embryon vers une voie de survie plutôt qu'une voie de mort cellulaire permettrait d'associer définitivement le rôle de ce suppresseur de la traduction à la survie cellulaire. La variation d'expression de 4E-BP dans ces différentes conditions pose naturellement la question de la disponibilité de la protéine eIF4E liant la coiffe m⁷GTP. Nous nous sommes donc intéressés,

au cours de ces travaux de thèse, au facteur eIF4G dont l'association à la protéine eIF4E est largement sous contrôle de 4E-BP.

4 La protéine eIF4G dans tous ses états

4-1 Modification de la protéine eIF4G

Très récemment, il a été montré que la protéine eIF4G est modifiée en réponse à la fécondation dans l'embryon d'oursin (Oulhen et al. 2007), en effet après fécondation, il apparaît des formes de eIF4G migrant au dessus de la protéine native (~ 175 kDa). Ces modifications ressemblent à une ubiquitination (échelle de poly-ubiquitine). Au cours de nos travaux de thèse, nous avons observé que la protéine eIF4G est modifiée, en réponse à une forte dose de MMS (Figure 19), avec une forme haute (~ 200 kDa) qui apparaît alors que la forme basse (~ 175 kDa) disparaît proportionnellement. La forme de 200 kDa de eIF4G est capable de s'associer à eIF4E (Article 4), pourtant la synthèse protéique globale est inhibée (voir paragraphe eIF2 α). L'apparition de la forme de 200 kDa augmente au cours du temps après traitement au MMS, parallèlement les formes hautes liées à la fécondation semblent disparaître (Article 4). Or il est connu qu'un petit peptide appelé SUMO est capable de se fixer sur les mêmes résidus (lysine) que l'ubiquitine (Hoegge et al. 2002). Ce type de modification post-traductionnelle doit donc être étudié dans notre système. Ceci est d'autant plus important que, chez la levure, la protéine PCNA est ubiquitinylée après traitement par de faibles doses de MMS (permettant la survie cellulaire) et sumoylée après traitement par de fortes doses léthales de MMS (Hoegge et al. 2002). D'autres modifications ne sont pas exclues pour expliquer les variations de mobilité électrophorétique observées. Ainsi, un traitement de la protéine modifiée à la phosphatase par exemple permettra de dire s'il s'agit d'une

phosphorylation. Dans tous les cas, une analyse en spectrométrie de masse, bien qu'encore délicate pour l'étude des modifications post-traductionnelles, est envisageable.

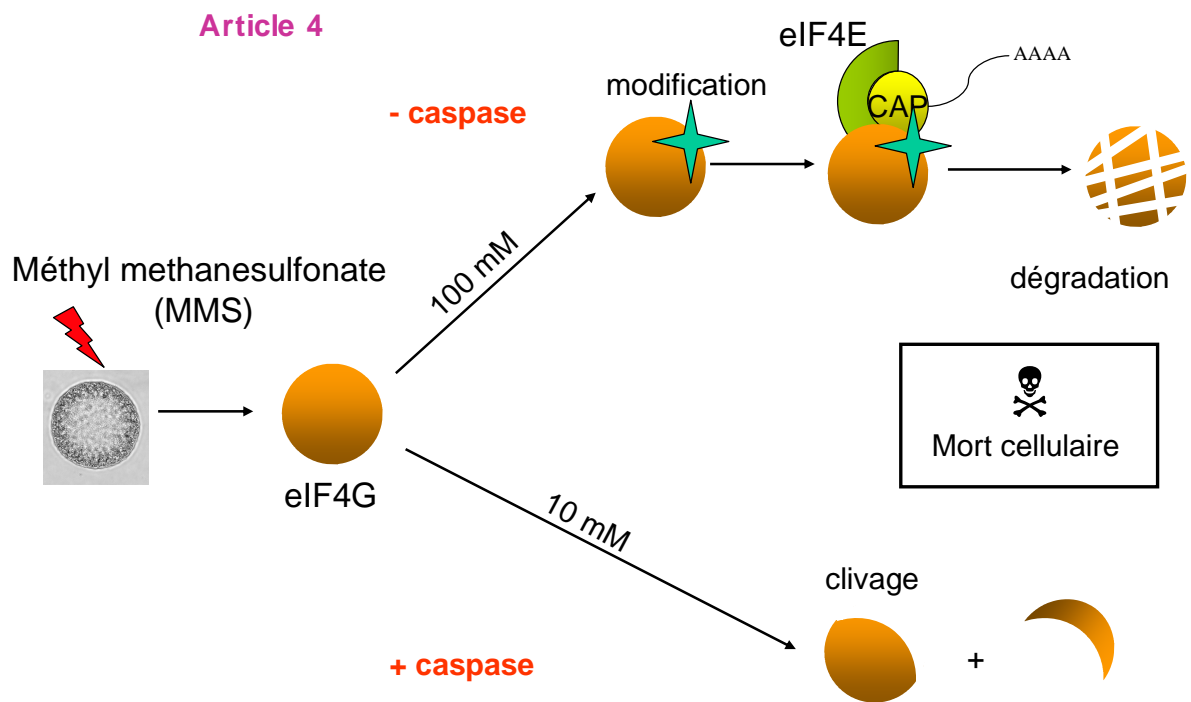


Figure 19 : Comportement de la protéine eIF4G en réponse à l'action de molécules génotoxiques.

La protéine eIF4G (orange) est modifiée en réponse à de fortes doses de méthyl méthanesulfonate (MMS). La protéine eIF4G modifiée se lie à eIF4E (vert) puis est dégradée. La protéine eIF4G est clivée en réponse à de faibles doses de MMS et de façon corrélée à l'activation des caspases.

4-2 Clivage de la protéine eIF4G

Nous avons montré qu'un fragment de la protéine eIF4G apparaît (fragment ~ 100 kDa) après traitement des embryons avec du MMS à 10 mM. L'apparition de cette bande de clivage est corrélée à une activité caspase. Chez les mammifères, la protéine eIF4G est clivée

par la caspase 3 en apoptose (Holcik and Sonenberg 2005). Ces clivages génèrent trois fragments (N-FAG, M-FAG et C-FAG). Des sites potentiels de clivage par les caspases sont observés dans la protéine eIF4G d'oursin. Afin de vérifier si le fragment est bien le produit du clivage de eIF4G par les caspases, les embryons traités aux MMS devront être incubés avec un inhibiteur de caspase. Un essai de clivage *in vitro* pourra également être réalisé en incubant la protéine eIF4G avec des caspases actives. L'identité du peptide clivé devra aussi être définie afin de comprendre le rôle potentiel de ce fragment dans les mécanismes étudiés.

4-3 Dégradation de eIF4G

Enfin, nous avons montré que lorsque les embryons sont traités par des fortes doses de MMS (100mM), la protéine eIF4G est dégradée précocement alors qu'aucune activité caspase n'est détectée. Cette observation laisse supposer que la cellule meurt par une autre voie (Article 4) indépendante des caspases. De manière intéressante, il a déjà été publié que l'induction de dommages par un agent alkylant l'ADN peut induire une apoptose caspase indépendante faisant intervenir le facteur AIF (Yu et al. 2002). La protéine AIF peut interagir avec eIF3 (Kim et al. 2006), un partenaire de eIF4G. La dégradation de eIF4G peut se faire par d'autres protéases que les caspases. Afin de vérifier cette éventualité chez l'oursin, des inhibiteurs de protéases pourront être utilisés.

5 Endommagement de l'ADN et synthèse protéique spécifique

Les résultats obtenus durant cette thèse démontrent que des facteurs de traduction, reconnus comme étant des régulateurs de la synthèse protéique, sont modifiés de façon importante et spécifique en fonction des conditions d'étude. Ces modifications permettent de penser que des traductions spécifiques de certains messagers sont réalisées en fonction des

conditions de stress utilisées (Figure 20) car elles sont observées dans un contexte où la synthèse globale des protéines est inhibée (soit par 4E-BP, soit par eIF2 α). Ainsi, afin de savoir si des messagers spécifiques sont synthétisés, il serait intéressant de purifier les fractions polysomales, contenant les messagers traduits d'embryons non traités, afin de les comparer à des fractions polysomales d'embryons traités. Une telle approche post-génomique est dorénavant envisageable depuis l'annotation du génome de l'oursin et l'accumulation d'outils moléculaires tels que des banques EST de différents stades larvaires et des puces à ADN. L'analyse des ARNm différenciellement recrutés dans les fractions polysomales dans différentes conditions de développement embryonnaire (conditions physiologiques) ou en condition de stress devrait se révéler riche en informations pour les mécanismes de régulation traductionnelle.

Les messagers recrutés dans les polysomes d'embryons traités pourront être caractérisés après un traitement au chrome(III) lorsque 4E-BP est présent (Article 3). Le messenger codant pour la protéine 4E-BP devrait par exemple être retrouvé au niveau des polysomes, car il est exprimé malgré l'inhibition globale de la traduction. D'autres protéines impliquées dans la survie ou/et la mort cellulaire sont attendues. Les expérimentations pourront également être réalisées dans les autres conditions entraînant l'expression de 4E-BP, c'est-à-dire après un traitement à la bléomycine ou lors d'un stress hypoxique.

La purification des fractions polysomales pourra également être réalisée sur des embryons traités par le MMS utilisé à des concentrations de 10 ou 100 mM, afin de comparer les profils obtenus lorsque la protéine eIF4G est modifiée, dégradée ou clivée. La protéine eIF4G modifiée étant capable de s'associer à eIF4E bien que la synthèse protéique globale soit inhibée (Article 4), nous suspectons que cette modification permette une traduction de messagers spécifiques. De même, le fragment de eIF4G est observé lorsque les caspases sont actives. Or, chez les mammifères, un fragment de clivage de eIF4G joue un rôle important

dans la traduction spécifique des messagers contenant des séquences IRES. Le rôle du fragment de clivage sur le recrutement d'IRES fonctionnels chez l'oursin devrait être étudié. Enfin, lorsque la protéine eIF4G est dégradée ou clivée après traitement des embryons par du MMS, des messagers spécifiques de la mort cellulaire peuvent avoir été recrutés dans les polysomes. L'identification de ces messagers serait intéressante à obtenir et permettrait de faire le lien entre les mécanismes traductionnels induits par le génotoxique et l'engagement de la cellule vers la mort.

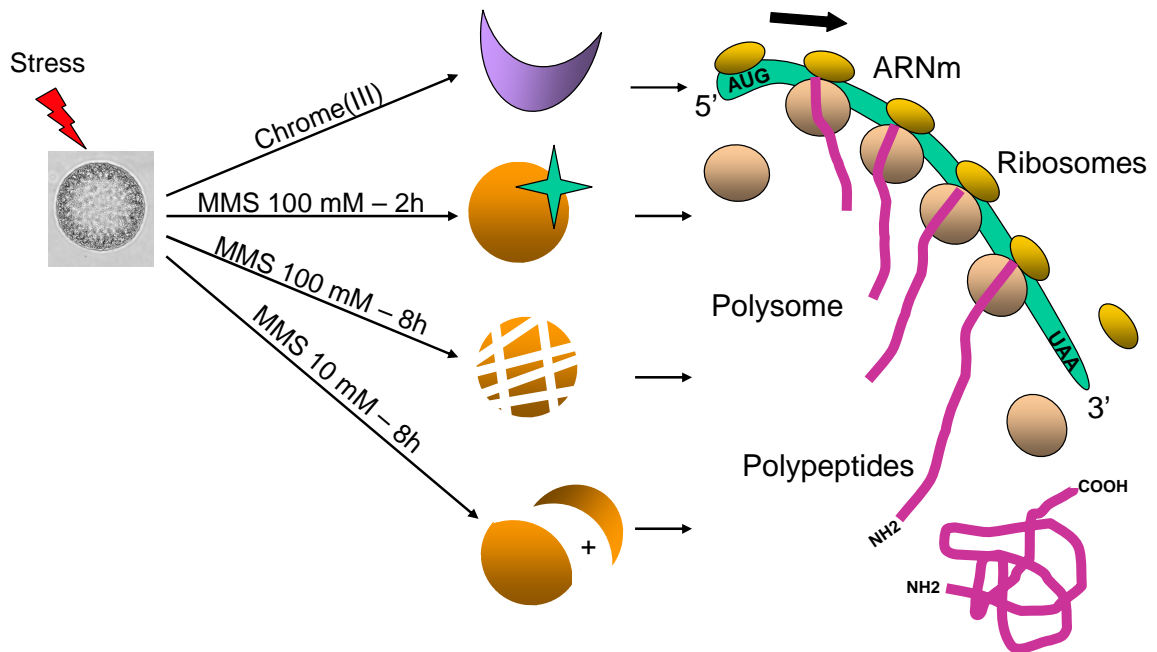


Figure 20 : Analyse de messagers recrutés dans les polysomes d'embryons d'oursin traités avec des molécules génotoxiques.

Les protéines 4E-BP (violet) et eIF4G (orange) sont exprimées, modifiées, dégradées ou clivées dans un contexte d'inhibition globale de la synthèse protéique. L'analyse des messagers recrutés au niveau des polysomes permettra de mettre en évidence la synthèse de messagers spécifiques dans les conditions entraînant les modifications de ces facteurs.

6 Conclusions générales

La régulation traductionnelle est hautement contrôlée dans l'embryon d'oursin, dans les conditions physiologiques et au cours de différents stress. De plus, l'embryon d'oursin se révèle être un modèle prometteur pour l'étude des points de surveillance en réponse à l'endommagement de l'ADN. En utilisant ce modèle, nous avons pu souligner différentes relations entre les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire, de réparation de l'ADN, de l'apoptose et des modulations de régulateurs traductionnels. Les observations importantes que nous avons faites sont intéressantes pour comprendre la régulation de l'expression des gènes, non seulement dans l'embryon d'oursin, mais aussi d'une manière générale dans un contexte cellulaire. Nos observations sont une première étape dans l'analyse du réseau complexe de l'ensemble des acteurs susceptibles d'intervenir dans ces régulations. Le réseau traductionnel, dans son intégralité, n'a encore jamais été abordé par une approche systémique telle que décrite pour le réseau transcriptionnel chez l'oursin (Levine and Davidson 2005). Ainsi, nos résultats vont servir de base à un projet ambitieux porté par l'équipe, qui consiste en l'établissement du premier réseau des régulateurs traductionnels au cours du développement embryonnaire précoce en condition physiologique et en condition de stress induit par l'endommagement de l'ADN.

ANNEXES

Review

eEF1B: At the dawn of the 21st century[☆]

Frédéric Le Sourd, Sandrine Boulben, Ronan Le Bouffant, Patrick Cormier,
Julia Morales, Robert Belle, Odile Mulner-Lorillon*

Equipe Cycle Cellulaire et Développement, Unité Mer and Santé, UMR 7150 CNRS/UPMC, Station Biologique de Roscoff, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

Received 29 November 2005; received in revised form 21 February 2006; accepted 22 February 2006

Available online 24 March 2006

Abstract

Translational regulation of gene expression in eukaryotes can rapidly and accurately control cell activity in response to stimuli or when rapidly dividing. There is increasing evidence for a key role of the elongation step in this process. Elongation factor-1 (eEF1), which is responsible for aminoacyl-tRNA transfer on the ribosome, is comprised of two entities: a G-protein named eEF1A and a nucleotide exchange factor, eEF1B. The multifunctional nature of eEF1A, as well as its oncogenic potential, is currently the subject of a number of studies. Until recently, less work has been done on eEF1B. This review describes the macromolecular complexity of eEF1B, its multiple phosphorylation sites and numerous cellular partners, which lead us to suggest an essential role for the factor in the control of gene expression, particularly during the cell cycle.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Elongation factor; Gene expression regulation; Protein translation; Cancer; Virus

1. Introduction

This article is dedicated to Professor Wim Moller (Fig. 1) who passed away on the 28th of March 2005. A molecular biologist at the University of Leiden, Wim Moller's main interest was to elucidate the translation mechanism that leads to the synthesis of proteins, the real actors of the living world. While our understanding of the pathways of translation is based on experiments that began in the 1950s, Wim Moller contributed as early as 1962 [1] to the identification of ribosome structure and characterization of the factors involved in the elongation step of translation in eukaryotes using, as early as 1975, acellular extracts derived from cysts of the brine shrimp *Artemia salina* [2]. This paper highlights the important contribution of Wim Moller in the elucidation of the molecular mechanism of peptide chain elongation. Our collaboration started in 1988 and, from the beginning, it was a very friendly and kind relationship in Leiden, Paris or at his family house in Manobre, Dordogne.

Biosynthesis of proteins, the real actors of cell life, relies on a highly regulated process that begins with the transcription of DNA, the depository of genetic information, into messenger RNAs (mRNA), and ends at the level of ribosomes where the genetic information contained in mRNAs, is translated into proteins. Each step of this essential process is under strict control in order to produce the specifically required protein, in the correct amount, at the right time and in the right place. Although the regulation of gene expression is largely achieved through transcriptional control, cells have developed mechanisms of fine regulation at the level of translation to ensure direct, rapid, reversible and spatial control of protein concentration [3]. An important area of study is the regulation of translation at the initiation level, i.e., mRNA recruitment on ribosomes. On the one hand, there are reports of modifications in the amount and/or activity of translation initiation factors leading to global changes in protein synthesis. On the other hand, regulation at the level of a specific mRNA has been shown to be driven by regulatory protein complexes that recognize particular structures usually present in the 5' and/or 3' untranslated regions (UTRs) of mRNAs, allowing their specific recruitment for translation (reviews in [4,5]).

Although less explored, there is growing evidence of additional regulation at the level of elongation. The first

[☆] This review was written in memory of Professor Wim Moller.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 29 23 37; fax: +33 2 98 29 23 24.

E-mail address: mulner@sb-roscoff.fr (O. Mulner-Lorillon).



Fig. 1. Dr. Wim Möller, Emerit Professor in Molecular Biology at Leiden University, 1935–2005.

indication for control of the elongation step came from the consideration that any increase in initiation activity must obviously occur in coordination with an increase in the elongation rate to avoid ribosome blockage at the level of the initiation codon. Moreover, since increases in elongation rate have been linked with increasing translational errors [6,7], it is necessary for a cell to keep elongation at the lowest rate consistent with initiation. Furthermore, there have been several reports of control of protein synthesis via the elongation rate in physiological processes such as serum or insulin stimulation (review in [8]), heat shock [9], fertilization [10,11] or morphogenesis [12]. It has been proposed that transitory inhibition of the elongation rate could be a way to globally regulate the level of short-lived proteins and to specifically favor the translation of mRNAs with weak initiation constants [13]. Although actively investigated, the mechanism(s) of translational control during the cell cycle has not yet been fully elucidated. It is well established that a number of regulatory proteins must be synthesized as required for entry and progression through the cell cycle, whereas the synthesis of the majority of proteins decreases at entry in the M-phase (review in [5]). Elongation was demonstrated to significantly contribute to protein synthesis regulation during the cell cycle [11]. In parallel, it was proposed that polyadenylation of specific mRNAs and/or translation at the level of internal ribosome entry site (IRES)-containing mRNA specifically regulate mitotic protein synthesis, although the actors involved have not all been identified (review in [14]).

Translation elongation in eukaryotes requires a set of non-ribosomal proteins called eukaryotic elongation factors or eEFs (review in [15]). They include the factors eEF1A and eEF1B, which are involved in recruitment of aminoacyl-tRNAs onto the ribosome, and the factor eEF2, which mediates ribosomal translocation. A number of reviews have recently addressed the regulation of translation by eEF1A and eEF2 [16–19]. In this report, we focus on the eukaryotic partner of eEF1A, the

nucleotide exchange factor, eEF1B. The discovery of its increasingly complex macromolecular structure as well as its implication in a number of physiological processes led us to attribute a pivotal role for eEF1B in the regulation of multiple cellular functions.

2. eEF1B structure and its canonical role

In prokaryotes, EF1, the soluble factor catalyzing the transfer of aminoacyl-tRNA to ribosomes in the first step of elongation, was shown a long time ago [20] to contain two reversibly interacting components, EF-Tu (elongation factor thermo-unstable) and EF-Ts (elongation factor thermo-stable). The structural and functional properties of each subunit have been extensively studied (reviews in [15,21]). EF-Tu is a G-protein that associates in a ternary complex with GTP and aminoacyl-tRNA, to catalyze the binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the ribosome via codon–anticodon interaction (Fig. 2A). Upon ribosome-dependent hydrolysis of GTP, EF-Tu is released from the ribosome under its GDP-bound form and interacts with the nucleotide exchange factor EF-Ts, which exchanges GDP for GTP to regenerate active EF-Tu. This active EF-Tu is then able to perform another round of elongation. The requirement for a guanine nucleotide exchange factor, EF-Ts, to reactivate EF-Tu is due to the 100-fold higher affinity of EF-Tu for GDP compared to GTP [22], resulting from a large structural change between the two forms of EF-Tu (review in [15]).

The characterization of eukaryotic EF1 (eEF1) has been a long process. Early purifications of the factor responsible for the transfer of aminoacyl-tRNA onto ribosomes from rat liver [23], rabbit reticulocytes [24], yeast [25], bombyx [26], calf brain

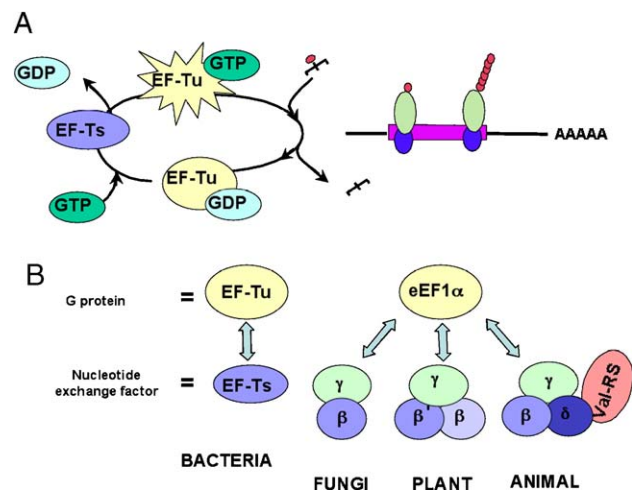


Fig. 2. First step of protein synthesis elongation. (A) Schematic representation of peptide chain elongation. The guanine nucleotide exchange factor (EF-Ts) reloads GTP on the G-protein EF-Tu which catalyzes the binding of aminoacyl (red circle)-tRNA to the A site of the ribosome (green and blue circles) associated with the messenger RNA (right) at each elongation cycle. (B) Schematic subunit composition of prokaryotic (left) and eukaryotic (right) forms of elongation factor 1. The different complexes are depicted according to the subunit composition independently from the stoichiometry. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

[27], wheat germ [28,29] or *Artemia* [30], led to the isolation of macromolecular complexes of variable molecular weight (ranging from 50 to several hundred kDa), depending on the species or the isolation procedure. The higher-molecular-weight forms, referred to as EF1H, were initially considered to be aggregates, containing, as a main component, a polypeptide chain of 50–60 kDa, referred to as EF1L (review in [31]). It was then proposed that EF1L protein represented the functional counterpart of bacterial EF-Tu, which catalyzes the binding of aminoacyl-tRNA to the ribosome. Further confirmation came from the high degree of similarity between the primary sequences of EF-Tu and the 50-kDa protein [32]. Initially designed as EF1L, the eukaryotic G-protein was then called eEF1 α , and must now be referred to as eEF1A according to Merrick's nomenclature (Table 1).

A eukaryotic equivalent of EF-Ts was initially thought not to be necessary, since it was reported that eEF1 from calf brain had a nearly equal affinity for GDP and GTP [33]. However, it rapidly became clear that factors stimulating eEF1 activity in a manner analogous to EF-Ts do exist in mammals [34,35], in invertebrates [36,37] and in plants [38]. It was shown that the eEF1 heavy form, EF1H, arises from a reversible interaction between eEF1A and a macromolecular complex, referred to as eEF1B, which contains nucleotide exchange activity. It has been demonstrated that eEF1B enhances the recycling rate constant of eEF1A-GDP to eEF1A-GTP by a factor of 1000 [39]. The interactions between the various eEF1B subunits are stronger than those between eEF1A and eEF1B leading to the different purified forms of eEF1. The different subunits constituting eEF1B were reported to depend on the species (Fig. 2B). The yeast eEF1B is made of two subunits, a guanine nucleotide exchange protein (formerly eEF1 β) and a structural protein (formerly eEF1 γ) [40], the plant eEF1B is a trimer of the structural protein (formerly eEF1 γ) plus two nucleotide exchange subunits (formerly eEF1 β and eEF1 β') [41], whereas the metazoan complex is a heteromer of at least four subunits: the structural protein (formerly eEF1 γ), two exchange factors

(formerly eEF1 β and eEF1 δ), plus a unique tRNA synthetase, the valine-tRNA synthetase (Val-RS) (review in [42]).

Much confusion arose in the naming of the different nucleotide exchange subunits, among the different kingdoms. A unifying nomenclature had been proposed by Merrick ([15], and see Table 1). The G-protein was referred to as eEF1A instead of eEF1 α and the guanine nucleotide exchange complex was referred to as eEF1B. The light guanine nucleotide exchange protein, formerly eEF1 β' in plants and eEF1 β in yeasts and animals, was named eEF1B α in all kingdoms, whereas the heavy guanine nucleotide exchange protein, formerly eEF1 β in plants and eEF1 δ in animals, was named eEF1B β . The structural protein name became eEF1B γ in place of eEF1 γ . However, using the same name, eEF1B β , for the heavy guanine nucleotide exchange protein in both plants and animals is not appropriate since the protein of animals has clearly specific structural and phylogenetic features, as described below. We therefore propose a new terminology presented in Table 1, which takes into account Merrick's nomenclature for the G-protein eEF1A, for the structural protein eEF1B γ and for the light guanine nucleotide exchange protein, eEF1B α in all eukaryotic kingdoms, but which differentiates the names for the heaviest guanine nucleotide exchange proteins regarding the kingdom, eEF1B β (formerly eEF1 β) in plants and eEF1B δ (formerly eEF1 δ) in animals (Table 1).

2.1. The eukaryotic specific EF1B protein: eEF1B γ

The eEF1B complex from eukaryotes contains a 47–52 kDa protein named eEF1B γ (formerly eEF1 γ). The primary structure of eEF1B γ was initially characterized in the invertebrate, *Artemia salina* [43]. The first vertebrate sequence was published for an amphibian, *Xenopus laevis* [44], and was followed by the human sequence [45,46]. The shrimp, amphibian and human sequences showed a high (58%) degree of similarity. An eEF1B γ encoding gene, absent from known prokaryotic genomes, was then characterized in all eukaryotes from

Table 1
A new clarified nomenclature of eEF1B components

Canonical function	Former nomenclature	Merrick's nomenclature	Proposed new nomenclature	Apparent MW
G-protein	eEF1 α	eEF1A		50 kDa
guanine nucleotide exchange proteins	animal and yeast eEF1 β	eEF1B	eEF1B α	24–28 kDa
	plant eEF1 β'			28 kDa
	plant eEF1 β		eEF1B β	30 kDa
	animal eEF1 δ		eEF1B δ	32–36 kDa
structural protein	plant, animal and yeast eEF1 γ	eEF1B γ		47–52 kDa
aminoacyl t-RNA synthetase	animal Val-RS	-	Val-RS	140 kDa

Eukaryotic elongation factor 1 (eEF1) is composed of a G-protein, now eEF1A, and the guanine-nucleotide exchange factor, now eEF1B. The composition of eEF1B depends on the living kingdom; the structure and function of each subunit is detailed in the text. The nomenclature of Merrick and Nyborg [15] is revisited to take into account the specific structure/function relationship of the eEF1B δ present in animal eEF1B. Val-RS corresponds to valyl-tRNA synthetase.

unicellular species (trypanosomes, leishmania and plasmodial parasites, and *Giardia lamblia*), to fungi (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*), plants and metazoans (from cnidarians to mammals).

Two eEF1B γ genes, encoding highly homologous proteins (92%), are expressed in *Xenopus* oocytes and embryos, and this duplicity had been attributed to the known genome duplication in this species [47]. Similarly, two genes could be found in polyploid plants, as *Arabidopsis thaliana* (GenBank AAM62488, GenBank AAB60721) or *Oryza sativa* (DBJ BAA34206, DBJ BAD61828). On the other hand, two genes (TEF3 and TEF4) encoding the yeast homologue of eEF1B γ have been described in *Saccharomyces cerevisiae*, neither gene being essential for growth. The deduced protein sequences from the two genes showed 64.5% identity [48]. Similarly, two eEF1B γ homologues were found in the fungi, *Yarrowia lipolytica* (EMBL CAG82547, EMBL CAG83057) and in the euglenozoa, *Crithidia fasciculata* (GenBank AAS55634, GenBank AAS55635). The identity at the level of the related encoding proteins from the same species was 77.4 and 85.5%, respectively. About 20 human sequences referred to as “human elongation factor gamma” were found while screening the protein databases using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) resources. All these sequences were 100% identical at the protein level. On the other hand using BLAST [49] on the human genome, several loci encoding for the human eEF1B γ sequence were found on chromosomes 3, 7, X and 11. However, only one human eEF1B γ gene located on chromosome 11 has been identified (location 11q12.3). It is not known if other loci correspond to pseudogenes or paralogs.

In conclusion, eEF1B γ protein is universal in the eukaryotic kingdom and appears to be encoded by more than one gene.

2.1.1. eEF1B γ structure

Eukaryotic eEF1B γ proteins (Fig. 3) are comprised of two rather hydrophobic domains of approximately 200 amino acids each (domain I and domain II), which are connected through a highly polar central lysine-rich stretch of about 60 residues [43,50,51]. The interaction sites in eEF1B γ (Fig. 3) which allow the protein to associate with the other subunits present in the eEF1B complex, were mapped by the use of limited tryptic digestion of the complex [52,53], by the study of interactions between the different recombinant proteins [54–56] or by using the yeast two hybrid system [57]. No direct interactions of eEF1B γ with eEF1A or with Val-RS were detected. The interaction domains of eEF1B γ with eEF1B α and eEF1B δ were localized in the N-terminal region (domain I) of the protein. The studies further demonstrate that specific binding sites must exist for each exchange subunit on eEF1B γ domain I, since it can bind eEF1B α and eEF1B δ simultaneously but not two identical subunits [57].

Multiple alignment analysis, sequence motif searching as well as tertiary structure modeling revealed that the eEF1B γ N-terminal region (domain I) shares two conserved sequence motifs with the theta family of glutathione *S*-transferases (GST)

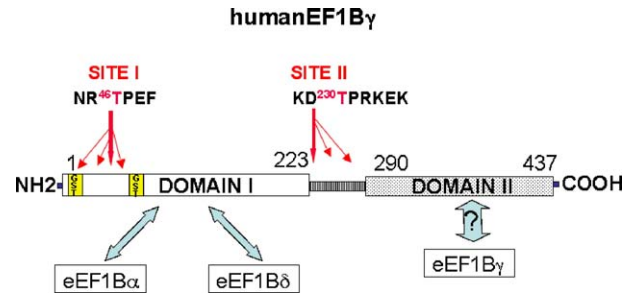


Fig. 3. Schematic structure of the eEF1B γ protein component of elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation sites detailed in one letter amino acids and their position arrowed in the sequence (red) according to the different species, and the localization of the binding domain (blue arrow) to the associated partners. Phosphorylation site I should be considered as putative. Amino acid numbering refers to the human sequence. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

[58] and Fig. 3). Furthermore, it was shown that the eEF1B γ protein binds glutathione sepharose [59,60]. Recently, the crystal structure of the N-terminal region of *Saccharomyces cerevisiae* eEF1B γ confirmed the existence of a highly structural homologous pocket between eEF1B γ -domain I and the theta class of GSTs [51].

The sequence of eEF1B γ domain II, the C-terminal domain (Fig. 3), is highly conserved between species (57%) and contains a high number of aromatic residues (20% of all residues). The high level of identity indicates a conserved function. However, no sequence or structural homology with known functional domains has so far been described for this domain. The three-dimensional structure of the recombinant domain II from human eEF1B γ as resolved by NMR [50] showed a contact lens shape with a concave face that could be the site of interaction between two eEF1B γ molecules and thus participate in the quaternary arrangement of the whole eEF1B complex. Such interaction between eEF1B γ subunits has been proposed by Bellé et al. and by Sheu et al. to support the structural models described for eEF1B [8,42].

The eEF1B γ subunit is a substrate for CDK1/cyclinB, the cell cycle protein kinase that controls entry into M-phase. eEF1B γ was actually the first reported physiological target for maturation promoting factor (MPF, the early name for CDK1/cyclinB) during the resumption of meiosis in amphibian oocytes [61]. The phosphorylation site was identified as a threonine in the *Xenopus* sequence ²³⁰TPKK [62]. This site, referred to in this paper as Site II, was found conserved in all identified mammalian sequences (Table 2). Site II is located between domains I and II in the hydrophilic part of the subunit (Fig. 3). An identical, or very similar CDK phosphorylatable motif (Table 2), was present in this region of the eEF1B γ sequences of other deuterostomes (chicken *Gallus gallus*, dipneust, hagfish, cephalochordata and urochordata), as well as cnidarians, the majority of fungi and a number of protists (*Trypanosoma cruzi*, plasmodia and *Giardia lamblia*). However, Site II was not found in the eEF1B γ sequences of many teleost fish or the majority of plants (Table 2). Nevertheless, goldfish eEF1B γ has

been reported to be substrate for CDK1/cyclin B in vitro and in vivo [63]. A number of (S/T)-P motifs fitting the known consensus site for CDK phosphorylation [64] were found in the goldfish sequence and in particular a serine residue in the motif NKSP, in the N-terminal region of domain I. The same motif is conserved at the same position in all fish and plant sequences. It was designed Site I (Fig. 3). Finally, when all the available eEF1B γ sequences in the databases were screened, it was found that almost all the sequences from protists to human presented a CDK phosphorylatable motif, either at Site I, at Site II or at both sites (Table 2).

The conservation through evolution of a CDK site in eEF1B γ is highly indicative of a conserved function. Considering the location of the two phosphorylatable domains, on each side of domain I, which is the binding site(s) for the nucleotide exchange proteins, one can hypothesize for a structural role in eEF1B complex. As shown in Table 2, the only notable exceptions for a CDK site were the proteins from the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (EMBL AJ973179), and the annelid, *Lumbricus rubellus* (GenBank CO047839), most probably the cartilaginous fish, some fungi and the majority of arthropods eEF1B γ . However, as described in Section 2.2.1, these species appear to possess a conserved CDK phosphorylation site on another subunit of the complex, namely eEF1B α .

Although the eEF1B γ sequences present other putative consensus phosphorylation sites for a number of kinases, none of them have yet been demonstrated as a physiological target. For example, protein kinase C does not phosphorylate eEF1B γ either in vitro or in vivo [65,66].

2.1.2. eEF1B γ function

The contribution of eEF1B γ to the nucleotide exchange activity of eEF1B complex was difficult to test since in almost all eEF1B biochemical purifications, eEF1B γ was found tightly associated with eEF1B α . It has been possible, using strong denaturing conditions, to isolate the eEF1B γ subunit from the eEF1B complex [54,67,68]. It was thus reported that eEF1B γ has no nucleotide exchange activity by itself and that eEF1B α alone has either the same [54], or a slightly lower nucleotide exchange activity than the eEF1B $\alpha\gamma$ complex [67,68], suggesting a stimulatory function for eEF1B γ . However, it cannot be assumed that either protein, eEF1B α or eEF1B γ , was recovered in its full active form after the isolation procedure. On the other hand, studies of complex reconstitutions from purified recombinant proteins did not lead to conclusive evidence [55]. Thus, a regulatory role for eEF1B γ through reversible interaction with eEF1B α remains unlikely considering that both subunits are always found associated in a cell. In addition, no effect on the exchange activity of the complex was observed after eEF1B γ -phosphorylation by CDK, supporting the presumption that eEF1B γ does not directly act on the catalytic exchange function of the complex [62].

The usual assumption is that eEF1B γ serves to anchor the eEF1B complex to the membrane or the cytoskeleton. Supporting this assumption: (i) co-purification of eEF1B γ with tubulin has often been reported [39]; (ii) the *Saccharomy-*

ces cerevisiae eEF1B γ homologue was identified through a screen for calcium dependent membrane-binding protein [69]; and (iii) immunofluorescence studies localized the eEF1B complex to the reticulum endoplasmic membrane [70,71].

Finally, as predicted by the presence of a domain homologous to a typical glutathione transferase motif (see Section 2.1.1), it was reported that a recombinant rice eEF1B γ protein possessed GST activity although it is about one-fiftieth the activity of authentic GST [72]. Furthermore, a purification of the trypanothione (a derivate of glutathione) transferase activity of *Leishmania* led to a parasite eEF1B complex, with the S-transferase activity associated with the eEF1B γ subunit [73,74]. Furthermore, it was shown that *Trypanosoma cruzi* over-expressing TcEF1B γ presented a strong resistance to clomipramine, a lipophilic compound [75]. Since GST enzymes are known to play a central role in the mechanism of drug resistance (review in [76]), it was suggested that the GST activity of eEF1B γ would be implicated in the protection of parasites from lipid peroxidation. Such a detoxification role for eEF1B γ in other species remains to be demonstrated. Interestingly, it was reported that loss of eEF1B γ in yeast resulted in constitutive resistance to oxidative stress, without significant changes in translation [77]. This could also explain why the overexpression of eEF1B γ in a number of tumors is linked to the aggressiveness of the tumors [78].

In conclusion, we propose that the main role for eEF1B γ is to ensure the proper scaffolding of the different subunits in the eEF1B complex as well as to direct its intracellular localization. Furthermore, owing to the conservation of the CDK phosphorylation motif on this protein throughout evolution, it is suggested that macromolecular structure and complex localization are regulated by CDK phosphorylation in order to ensure efficient protein synthesis at the right place, at the right time.

2.2. The guanine nucleotide exchange protein family: eEF1B α , eEF1B β and eEF1B δ

2.2.1. eEF1B α , the eukaryotic canonical nucleotide exchange subunit

The lightest subunit (MW ranging from 24 to 28 kDa) characterized in the eEF1B complex was initially named eEF1 β in metazoans and yeasts and eEF1B β' in plants, and should now be designated as eEF1B α (Table 1). eEF1B α was shown to support the canonical function of GTP/GDP exchange on the eEF1A protein [41,79–82]. The eEF1B α protein is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. Gene disruption experiments in yeast showed that eEF1B α is essential for cellular growth [83]. In addition, eEF1B α was shown to play a critical role in translational fidelity [84].

The C-terminus part of the protein (from amino acids 116 to 224 as numbered in the human eEF1B α sequence, Fig. 4) is both necessary and sufficient for normal cell growth [84]. This region has been demonstrated to possess the nucleotide exchange activity [85,86] and to interact with eEF1A [52,57,84,87] (Fig. 4). The crystal structure of a complex between yeast eEF1A and a C-terminal catalytic fragment of yeast eEF1B α has been performed (review in [21]). The tri-dimensional structure

Table 2
CDK1/cyclinB phosphorylation sites in eEF1B γ among phyla

		SITE I	SITE II	
D E U T E R O S T O M E S	Mammals	<i>Homo sapiens</i>	+	+
		<i>Pan troglodytes</i>	?	+
		<i>Bos taurus</i>	+	+
		<i>Sus scrofa</i>	+	+
		<i>Oryctolagus cuniculus</i>	+	+
		<i>Rattus norvegicus</i>	+	+
		<i>Mus musculus</i>	+	+
	Dipsids	<i>Gekko japonicus</i>	?	+
		<i>Bothrops insularis</i>	+	?
		<i>Gallus gallus</i>	+	+
	Amphibians	<i>Xenopus laevis</i>	+	+
		<i>Xenopus tropicalis</i>	+	+
		<i>Rana sylvatica</i>	+	+
		<i>Ambystoma mexicanum</i>	+	-
	Coelacanth	<i>Latimeria chalumnae</i>	+	?
	Dipneusts	<i>Protopterus dolloi</i>	+	+
	Teleost fishes	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	+	?
		<i>Paralichthys olivaceus</i>	?	+
		<i>Fundulus heteroclitus</i>	?	+
<i>Takifugu rubripes</i>		+	+	
<i>Tetraodon nigroviridis</i>		+	-	
<i>Oryzias latipes</i>		+	?	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		+	+	
<i>Salmo salar</i>		+	?	
<i>Danio rerio</i>		+	-	
<i>Carassius auratus</i>		+	-	
<i>Ictalurus furcatus</i>		+	+	
Cartilaginous fishes		<i>Scyliorhinus canicula</i>	?	-
	<i>Squalus acanthias</i>	-	?	
Agnathes	<i>Petromyzon marinus</i>	+	-	
Hagfish	<i>Myxine glutinosa</i>	?	+	
Cephalochordates	<i>Branchiostoma lanceolatum</i>	+	+	
Urochordates	<i>Ciona intestinalis</i>	-	+	
Echinoderms	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	-	-	
S c o r p i o n s	<i>Mesobuthus gibbosus</i>	+	?	
	Crustaceans	<i>Artemia salina</i>	-	-
		<i>Artemia franciscana</i>	-	?
		<i>Penaeus monodon</i>	?	+
		<i>Callinectes sapidus</i>	-	-
	Insects	<i>Drosophila melanogaster</i>	-	-
		<i>Drosophila yakuba</i>	?	-
		<i>Bombyx mori</i>	-	-
		<i>Anopheles gambiae</i>	+	-
		<i>Aedes aegypti</i>	-	?
<i>Locusta migratoria</i>		-	-	
Tartigrada	<i>Hypsibius dujardini</i>	-	?	
Mollusks	<i>Argopecten irradians</i>	+	-	
	<i>Crassostrea gigas</i>	+	?	
Annelids	<i>Lumbricus rubellus</i>	-	-	
A C C O E L O M A T E S	Nematodes	<i>Ascaris suum</i>	+	-
		<i>Toxocara canis</i>	+	?
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	+	-
		<i>Haemonchus contortus</i>	+	?
		<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	+	?
		<i>Strongyloides stercoralis</i>	?	-
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	+	?
		<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	+	?
		<i>Ancylostoma caninum</i>	?	+
		<i>Meloidogyne chitwoodii</i>	+	?
		<i>Meloidogyne incognita</i>	?	+
		<i>Meloidogyne arenaria</i>	-	+
		<i>Heterodera glycines</i>	-	?
		<i>Globodera rostochiensis</i>	-	?
		<i>Xiphinema index</i>	?	-
		<i>Trichinella spiralis</i>	-	-
		Platyhelminthes	<i>Schistosoma japonicum</i>	+
	<i>Echinococcus granulosus</i>		?	-
	<i>Schmidtea mediterranea</i>		?	-
	Cnidarians	<i>Hydra magnipapillata</i>	?	+
		<i>Hydractinia echinata</i>	-	+

		SITE I	SITE II	
P L A N T S	Eudicotyledons	<i>Prunus avium</i>	+	-
		<i>Malus x domestica</i>	+	-
		<i>Glycine max</i>	+	+
		<i>Euphorbia esula</i>	+	?
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+
		<i>Ricinus communis</i>	+	?
		<i>Gossypium hirsutum</i>	+	-
		<i>Ipomoea batatas</i>	+	?
		<i>Solanum tuberosum</i>	+	+
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	?
		<i>Capsicum annuum</i>	+	?
		<i>Phaseolus coccineus</i>	+	?
		<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	+	?
	Monocotyledons	<i>Oryza sativa</i>	+	-
		<i>Hordeum vulgare</i>	+	-
		<i>Zea mays</i>	+	?
	Mosses	<i>Physcomitrella patens</i>	+	+

		SITE I	SITE II	
F U N G I	Ascomycetes	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	-
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+
		<i>Candida albicans</i>	+	+
		<i>Candida glabrata</i>	+	+
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	?	+
		<i>Eremothecium gossypii</i>	-	-
		<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	+
		<i>Neurospora crassa</i>	-	+
		<i>Aspergillus nidulans</i>	-	+
		<i>Gibberella zeae</i>	-	-
		<i>Magnaporthe grisea</i>	+	+
		Basidiomycetes	<i>Cryptococcus neoformans</i>	+
	<i>Ustilago maydis</i>		-	-
	<i>Pisolithus tinctorius</i>		-	?

		SITE I	SITE II	
A l v e o l a t e s		<i>Plasmodium falciparum</i>	+	-
		<i>Plasmodium yoelii</i>	+	+
		<i>Plasmodium berghei</i>	+	+
		<i>Plasmodium chabaudi</i>	+	-
		<i>Cryptosporidium parvum</i>	+	-
		<i>Cryptosporidium hominis</i>	+	-
		<i>Neospora caninum</i>	+	+
		<i>Toxoplasma gondii</i>	+	+
		<i>Tetrahymena pyriformis</i>	+	-
		Kinetoplasts	<i>Trypanosoma cruzi</i>	+
<i>Leishmania infantum</i>	+		-	
<i>Leishmania major</i>	+		-	
	<i>Crithidia fasciculata</i>	+	-	
	<i>Laminaria digitata</i>	+	-	
Diplomonads	<i>Giardia lamblia</i>	+	+	
Pelobionta	<i>Mastigamoeba balamuthi</i>	?	-	

revealed the essential role and location of two residues in eEF1B α for interaction with eEF1A and for the exchange mechanism, namely ¹⁶³F and ²⁰⁵K (review in [21]). Both residues are highly conserved in all eukaryotes, in the C-terminal motifs P–(V/L/I)–(A/G)–(Y/F)–G–I and (F/M/W)–(N/Q)–K–(I/L/V). The protein eEF1B α is the functional equivalent of the bacterial nucleotide exchange factor EF-Ts. Both proteins, although poorly comparable in their primary sequence [88,89], possess common tri-dimensional features as judged by NMR [90] and crystallography [21]. The crystal structure of the complex between eEF1A and the C-terminal of eEF1B α indicates that these factors interact in a way that is quite distinct from that observed with the prokaryotic factors. These structural differences between the eukaryotic complex compared to the prokaryotic complex likely correlate with the differences in the enzymatic properties [39].

Much less is known about the structure of the N-terminal region of eEF1B α . Primary sequence identity between species in this region is weaker than for the C-terminal region. The N-terminal region was demonstrated to strongly interact with the N-terminal half of eEF1B γ [52,56,57,85] and therefore to have a role in the structure of the eEF1B complex. It may, therefore, be speculated that conservation will be found at the level of tertiary structure rather than in the primary sequence. Confirmation of this hypothesis is waiting for the elucidation of the structure of this region of the protein.

The N- and C-terminal regions of eEF1B α are connected by a hinge containing stretches of aspartic (E) and glutamic acid (D), surrounded by numerous lysines (K) (Fig. 4). A phosphorylation site for CK2 is located in this hydrophilic stretch, FG¹⁰⁶SDDEEE (numbered according to the human sequence). Indeed, it has been demonstrated that CK2 could phosphorylate the eEF1B α subunit in vitro on this serine residue in *Artemia* [91], *Xenopus* [92] and rabbit [93]. An alignment of more than 100 sequences in this region showed that this site is highly conserved in all metazoans as well as in fungi and even in some protists including *Giardia lamblia* and *Plasmodium yoelii* (alignment is presented as Supplementary material; data 1). Interestingly, the plant sequences contained a slightly modified motif, although fitting as well the CK2 phosphorylation consensus site [94], with a threonine residue in the acid stretch (plant consensus: FG–(E/D)–ETEE). However, an early report suggested that neither wheat nor rice eEF1B α could be phosphorylated in vitro by CK2 [95] suggesting that the site is not accessible.

The functional role for the phosphorylation of eEF1B α by CK2 is not clear since Moller's group reported that it leads to a decrease in the nucleotide exchange activity of the complex [91], while Traugh et al. showed that it had no effect on the rate of elongation [55]. Since this site is not essential for yeast

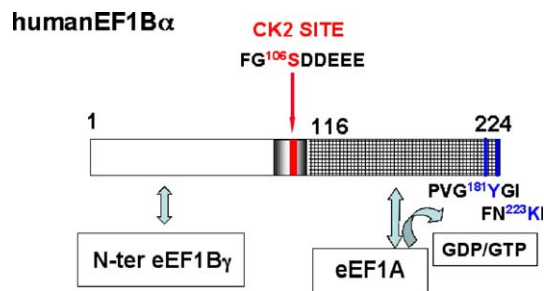


Fig. 4. Schematic structure of the eEF1B α protein component of elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation site position arrowed in red, and the localization of the binding domain (blue arrow) to the associated partners. The squaring area corresponds to the guanine nucleotide exchange domain activity. Amino acid numbering refers to the human sequence. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

growth [84], a possible role of its phosphorylation could be to regulate the interaction of eEF1B α with its partners and/or with subcellular structures.

The purified eEF1 complex from rabbit was reported to be phosphorylated in vitro by PKC and the multifunctional S6 kinase, as well as in vivo following stimulation of these kinases with phorbol ester or insulin. This phosphorylation was demonstrated to affect three subunits of eEF1, namely eEF1A, eEF1B α and eEF1B δ . Phosphorylation on all three subunits was accompanied by a twofold enhancement of the rate of elongation over the non-phosphorylated controls, although individual contributions could not be assigned [65,66,96–98].

The sequence of eEF1B α from *Strongylocentrotus purpuratus*, a sea urchin, has recently been obtained (EMBL AJ973180). Interestingly, a CDK phosphorylation site (⁵⁷TPAA) was detected upstream of the CK2 site in the sea urchin sequence. We analyzed all the known eEF1B α (formerly eEF1 β) sequences from metazoans and found that a CDK phosphorylation site was present in eEF1B α sequences from a cartilaginous fish (*Squalus acanthias*, GenBank CX197134) and the majority of arthropods (*Drosophila melanogaster*, Refseq NP_524808; *Bombyx mauri*, DBJ BAA02602; *Plutella xylostella*, DBJ BAD26687; *Heliconius melpomene*, GenBank CX700548; *Antheraea yamamai*, DBJ BAD22537; *Lonomia obliqua*, GenBank CX816635 and *Callinectes sapidus*, GenBank CV527425). It is important to note that a number of species from the same families (namely echinoderms, cartilaginous fish and arthropods) lacked the CDK phosphorylation site in their eEF1B γ sequence (see Table 2). The in vivo CDK phosphorylation of those eEF1B α proteins remains to be demonstrated. Nevertheless, we speculate that eEF1B

Notes to Table 2:

The eEF1B γ proteins from different species were extracted from the nucleic or proteic databases using NCBI resources and searched for the presence (+) or absence (–) of consensus phosphorylation motifs for the protein kinase CDK1/cyclinB. Site I refers to the phosphorylation motif present in the N-terminal region of the protein in the neighborhood of threonine 46 of the human sequence; site II refers to the motif present in the hydrophilic central stretch of the protein, in the neighborhood of threonine 230 of the human sequence. The species devoid (–) of site I and site II are highlighted in yellow. (?) refers to unknown site sequences.

phosphorylation by CDK at the level of the eEF1B γ subunit or of the eEF1B α subunit depending on the species, is universal and suggestive of a conserved function through the eukaryotic kingdom.

Related to the “essential” nature of the eEF1B α gene [83], yeast genome contains a unique gene EFB1 corresponding to yeast eEF1B α (GenBank AAC04954) located on chromosome 1. As expected from their polyploidy, two highly similar isoforms for eEF1B α exists in rice (DBJ D12821 and Refseq NP_910927) and in thale cress (EMBL AJ249596 and EMBL AJ249597). Surprisingly, two expressed eEF1B α sequences were found in blue crab (GenBank CV527893 and GenBank CV527425). Analysis of the human genes encoding eEF1B α suggested that there are at least three functional loci in the human genome [99]. Searches in the human genome revealed a single identified EEF1B gene located on chromosome 2 (location: 2q33–q34); the other loci (chromosomes 5, 6, 7, 15, X) most probably correspond to tissue specific intronless paralogues (as demonstrated for locus on chromosome 5 [100]) or to processed pseudogenes (as demonstrated for locus on chromosome 15 [100]). The data suggest that a unique essential gene encodes the eukaryotic EF1B α subunit.

In addition to the protein eEF1B α , the eEF1B complex of plants on the one hand and metazoans on the other, contains a second nucleotide exchange protein formerly named eEF1 β in plants and eEF1 δ in metazoans. Although it was proposed to give the same name, i.e., eEF1B β to the second nucleotide exchange protein whatever its origin (review in [17]), we recommend maintaining the differentiation of the two subunits since, as we explain below, obvious structural differences exist between the two specific subunits. Thus, the plant subunit should be designated eEF1B β and the metazoan subunit, eEF1B δ (see Table 1).

2.2.2. eEF1B β : the plant-specific second nucleotide exchange protein

The first evidence for the existence of at least two different proteins for the exchange nucleotide protein came from studies on the eEF1B complex in plants. After purification from wheat embryos, two subunits of low molecular weight were co-purified with eEF1B γ , both having nucleotide exchange activity and sharing common tryptic peptides, as shown by microsequencing [41]. Subsequently, three beta-type isoforms were cloned from rice embryos, called eEF1 β' , eEF1 β and eEF1 β_2 [89,101,102]. Searches in the plant sequence database revealed a number of sequences in each species matching the rice sequences. We performed a full-length alignment of the 40 plant “beta-type” sequences using CLUSTAL X [103] and a neighbor-joining tree using % identity [104] was calculated (Fig. 5). The analysis confirmed and extended an early report [105] that the plant nucleotide exchange protein sequences separated into two groups named the “ α type” and the “ β type” with respect to Merrick’s nomenclature (see Table 1). Note that the “ α type” clusters are the sequences formerly referred to as β' while the “ β type” clusters are the sequences formerly referred to as β (Fig. 5). Each species contains a guanine nucleotide exchange protein of the “ α type” and one of the “ β type”,

supporting the hypothesis that gene duplication occurred before speciation.

In addition, in some cases (rice or thale cress), the same species contains two closely related isoforms for each type probably corresponding to two copies that have slightly diverged in these polyploid organisms.

At the level of protein primary sequence (Fig. 6), eEF1B α (formerly eEF1 β') and eEF1B β (formerly eEF1 β) from the same species showed around 60% similarity, the highest similarity being in the C-terminal domain, in concordance with the location of the nucleotide catalytic exchange activity of both proteins and their interaction with eEF1A. The N-terminal domains of the eEF1B α and eEF1B β proteins from the same species were more divergent although they showed good conservation probably in relation to the property to bind eEF1B γ . Notably, both proteins contained the same conserved CK2 phosphorylatable motif FG–(E/D)–DTEE at the level of the hydrophilic hinge of the glutamate and aspartate stretch (Fig. 6). It has been reported that wheat and rice eEF1B β were phosphorylated in vitro by CK2 [101,106]. The most evident difference between eEF1B β and eEF1B α resides in the presence in eEF1B β sequences of a conserved putative CDK phosphorylation site (^{89}TP –(P/S)–(V/A), as numbered in the rice sequence), just ahead of the CK2 site. In vitro, pea eEF1B β was shown to be phosphorylated by CDK1 [107]. Interestingly, Kinzy et al. demonstrated that cDNAs coding for plant eEF1B β subunits failed to complement a yeast mutant deleted for the eEF1B α gene (whereas the plant eEF1B α did complement) unless the CDK phosphorylation site was replaced by a non-phosphorylatable site [107].

A surprising feature when one compares the data from eEF1B α and eEF1B β is the effect of CK2 in vitro, which was unable to phosphorylate wheat and rice eEF1B α , whereas it easily phosphorylated eEF1B β [101]. We hypothesize that, in both proteins, the CK2 site (which is slightly modified in relation to the site found in metazoans) is not accessible to the kinase and that in eEF1B β it may be unmasked upon phosphorylation of the neighbor CDK site. Such regulation by “cooperative phosphorylation” was already demonstrated in the combined action of CK2 and GSK3 onto glycogen synthase or protein phosphatase 1–inhibitor 2 (review in [108]).

Thus, it can be assumed that the two nucleotide exchange subunits, eEF1B α and eEF1B β , which have been identified in plants, possess specialized functions, one of which is regulated by cooperative CK2 and CDK phosphorylations.

2.2.3. eEF1B δ : the metazoan-specific second nucleotide exchange protein

The eEF1B δ (formerly eEF1 δ) protein was discovered during screening for MPF substrates in maturing amphibian oocytes. It always co-purified as a complex with two other proteins, which were identified as eEF1B γ (formerly eEF1 γ) and eEF1B α (formerly eEF1 β) [61,109]. Such additional components observed earlier in other eEF1B purifications were usually considered as contaminants [68] or breakdown products [81,82]. The complete sequence of eEF1B δ protein was described in

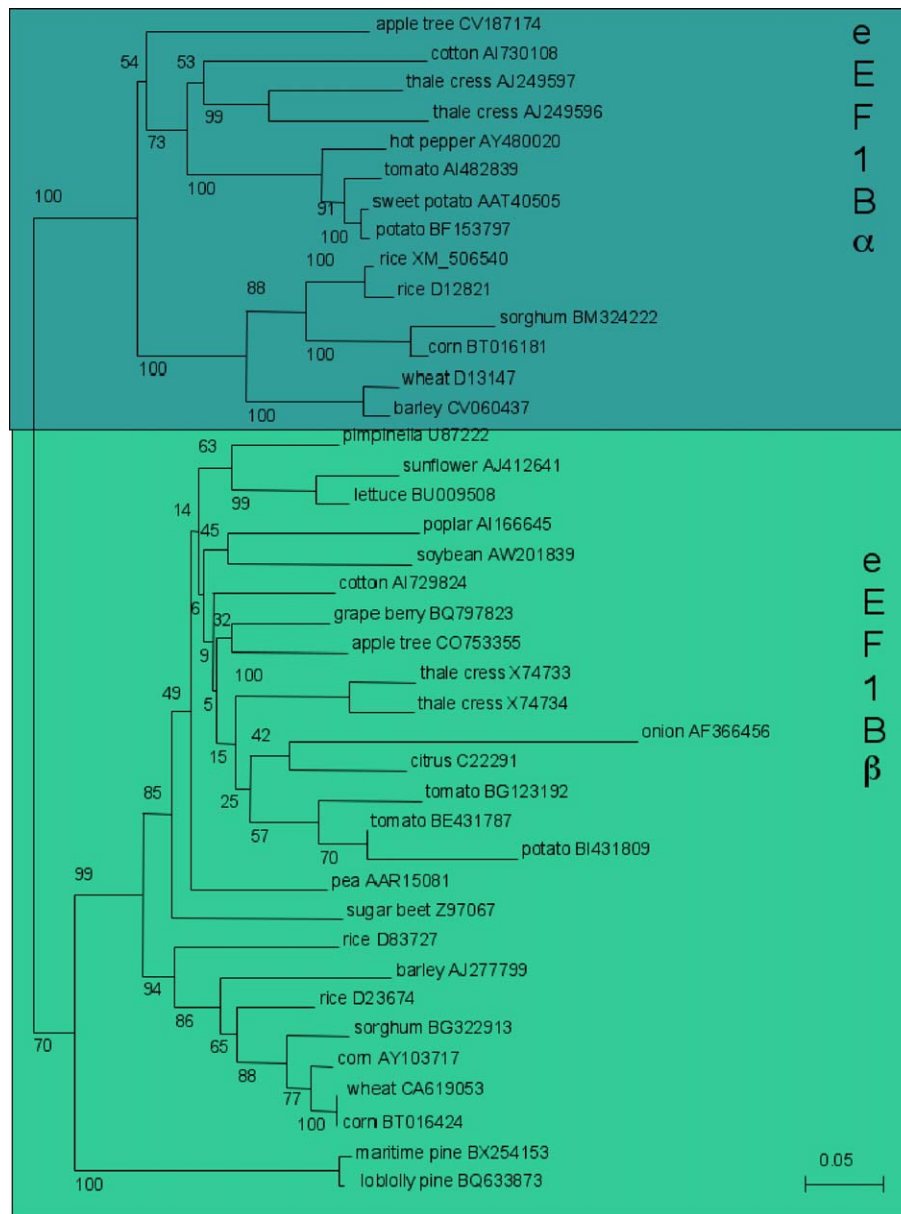


Fig. 5. Consensus tree inferred from the full-length sequences of 40 eEF1B α (formerly eEF1B β') and eEF1B β (formerly eEF1B β) proteins from plants as described in the text. Sequences were extracted from nucleic and proteic data banks using NCBI resources via the Internet. The tree is unrooted. The common names of organisms are used for convenience. Scientific binomials can be obtained from the accession numbers associated with the names of the organisms. The two clusters corresponding to proteins of α and β type are boxed in color. Branch lengths are scaled and correspond to mean substitution values per site as obtained from njplot. Numbers are the bootstrap values.

Xenopus and the protein was shown definitively to be an intrinsic part of the eEF1B complex [110]. The eEF1B δ protein was purified and characterized from *Artemia* [85,111], human [112], rabbit [55] and sea urchin [113].

The protein comprises two domains (Fig. 7). The C-terminal domain shows significant similarity to the C-terminal region of eEF1B α proteins, the catalytic domain of the exchange factor and, as expected, the protein was demonstrated to have nucleotide exchange activity on eEF1A [54–56,85]. The hydrophilic hinge of acidic residues containing the CK2 phosphorylation site described for eEF1B α was also found in the eEF1B δ sequence, and eEF1B δ proteins were actually

shown to be phosphorylated by CK2 [92,114,115]. Interestingly, it was demonstrated that binding of eEF1A to eEF1B α resulted in masking of the CK2 phosphorylation site, whereas this is not the case upon binding of eEF1A to eEF1B δ [55]. This result suggests that, although the eEF1B α and eEF1B δ C-terminal domains present high sequence similarity, the interaction site with eEF1A must differ between the two exchange proteins.

Analysis of the N-terminal primary sequences revealed that eEF1B δ differs greatly from eEF1B α and did not show any identity with other proteins [105,111]. The eEF1B δ N-terminal is characterized by the presence of a leucine zipper motif

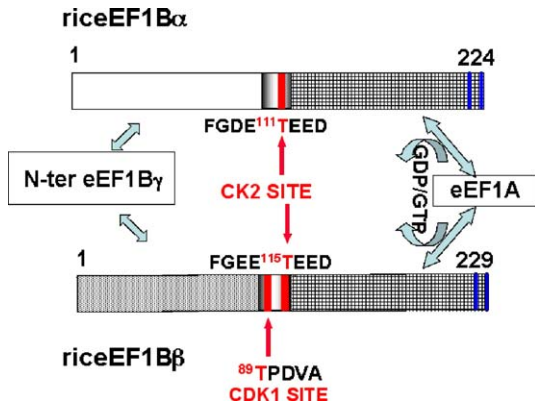


Fig. 6. Schematic structure of the eEF1B α (upper) and eEF1B β (lower) protein components of rice elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation sites position arrowed in red, and the localization of the binding domain (blue arrow) to the associated partners. The squaring area corresponds to the guanine nucleotide exchange domain activity. Amino acid numbering refers to the rice sequences. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

[110–112]. A leucine zipper motif consists of a periodical repetition of leucine (or other hydrophobic) residues in an amphiphatic α -helix conformation, at the secondary structure level, with leucines (and other hydrophobic residues) clustered at one side. Importantly, two zippers can dimerize to form a parallel two-stranded α -helical coiled coil, in which the hydrophobic residues create the dimer interface [116]. It must be noted that the leucine zipper in eEF1B δ is of unusual length (5–6 repeats), twice that reported in other leucine zipper proteins.

Based on the presence of the two characteristic domains, the leucine zipper motif and the highly conserved catalytic C-terminal domain, we searched in the databases for the presence of eEF1B δ protein across species. We identified eEF1B δ in all metazoans from cnidarians to mammals (alignment is presented in the Supplementary material; data 2). No eEF1B δ equivalents were found in the available sequences from fungi and plants. It is essential to note that, although they have been reported to be homologues [17], the plant eEF1B β proteins are clearly different from the metazoan eEF1B δ in that they do not present a leucine zipper domain and cluster separately upon sequence analysis (see below and Fig. 9). Thus, the eEF1B δ subunit appeared during evolution at the same time as the emergence of metazoans. It has been proposed to be the result of a fusion of a B α -type ancestral gene with a leucine zipper N-terminal domain [105].

Interestingly, in protists, we identified three sequences containing the consensus C-terminal catalytic domain of the nucleotide exchange proteins together with a repeat of four or five hydrophobic residues (L/V/M) at every seven amino acids in their N-terminal domain. This was found in three euglenozoa, *Leishmania major* (designated elongation factor 1B beta, GenBank AY677168) *Leishmania guyanensis* (designated putative elongation factor 1 beta, GenBank AY763288), and *Trypanosoma brucei* (designated putative elongation factor 1-

beta, GenPept AAX79212). Moreover, in *Leishmania major*, two different nucleotide exchange proteins were found, designated elongation factor 1B alpha (GenBank AY677167) and elongation factor 1B beta (GenBank AY677168) reminiscent of the situation found in metazoans, two nucleotide exchange proteins, one of which possesses a leucine zipper motif. We therefore hypothesized that duplication of the gene encoding the nucleotide exchange protein occurred early and that through evolution, the leucine zipper motif independently appeared by fusion from one of the duplicated genes in the animal and protist phyla. The duplicated gene then disappeared in fungi.

The presence of a leucine zipper motif in a protein is correlated with the existence of protein dimerization [117]. Using reconstitution experiments with recombinant proteins [55,57], it was shown that the N-ter domain of eEF1B δ interacts with the N-terminal domain of eEF1B γ . Due to the lack of similarity in the N-ter sequences of eEF1B α and eEF1B δ , one must suppose that eEF1B γ has two different binding sites for the two exchange proteins, which correlates with the fact that eEF1B γ can simultaneously bind eEF1B α and eEF1B δ but not two eEF1B α or two eEF1B δ proteins (see above). It was also demonstrated that the eEF1B δ subunit was responsible for the binding of the Val-RS to the eEF1B complex [54,118], in relation to the absence of the enzyme in eEF1B complexes of species that do not have the eEF1B δ subunit, i.e., plants or fungi. Interestingly, the human Val-RS displays an N-terminal extension that bears strong sequence similarity to the N-terminal moiety of eEF1B γ [119]. However, no leucine zipper motif was found in Val-RS or in eEF1B γ sequences. Therefore the zipper might be involved in the interaction with, as yet unidentified, partners for eEF1B δ . Furthermore, it was shown that eEF1B δ protein is able to dimerize [57] and actually has a propensity to form high

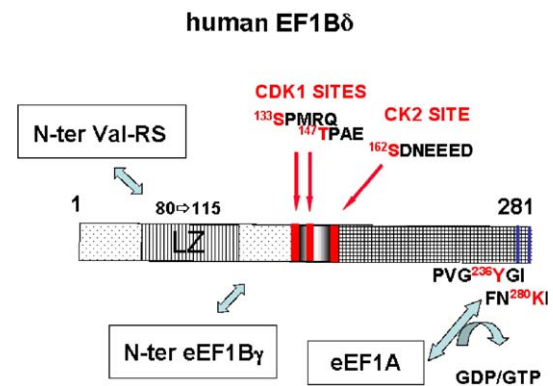


Fig. 7. Schematic structure of the eEF1B δ protein component of human elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation sites indicated in one letter amino acids and their position arrowed in the sequence (red) according to the different species, and the localization of the binding domain (blue arrow) to the associated partners. The leucine zipper motif is indicated LZ in a striated box. The squaring area corresponds to the guanine nucleotide exchange domain activity. Amino acid numbering refers to the human sequence. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

molecular aggregates, which assemble in ordered quaternary complexes in the presence of eEF1B γ and eEF1B α [54]. A role for eEF1B δ might, therefore, be to generate the assembly of a defined eEF1B quaternary structure through the dimerization of two or more eEF1B δ molecules (due to the long size of the leucine zipper) fitting the models proposed [42,57].

Studies performed in amphibian oocytes, revealed that two highly identical eEF1B δ proteins are present in the same complex of the same cell [120]. The two isoforms came from two different messengers (EMBL X66837 and EMBL X85096), one of them, containing an internal initiation codon, encoded for a slightly shorter protein (34 kDa vs. 36 kDa). Further complexity in the structure of eEF1B came from recent studies on eEF1B δ in sea urchin embryos. Two eEF1B δ isoforms, designated as eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2, were found to be present in the same purified fraction of eEF1B complex from sea urchin embryos [121]. The primary sequences of eEF1B δ 1 (EMBL Y14235) and eEF1B δ 2 (EMBL AJ973181) were 100% identical except for a 26 amino acid insertion in the N-terminal domain of eEF1B δ 2 upstream of the leucine zipper motif (Fig. 8). Searches in the NCBI resources revealed that each of the *Xenopus* eEF1B δ isoforms were also found under an insert-containing isoform and an insert-free isoform. In the *Xenopus* sequences, the 25 length insert was present at the same position as in the sea urchin sequence, i.e., upstream of the zipper. In human, the gene *EEF1D* was characterized on chromosome 8. It is transcribed into two mRNAs (Refseq NM_001960, Refseq NM_032378) issued from the same precursor by alternative splicing. The two encoded proteins, eEF1B δ -iso1 and eEF1B δ -iso2, are of highly different MWs, 30 kDa and 66 kDa, and are 100% identical over their 275 amino acid

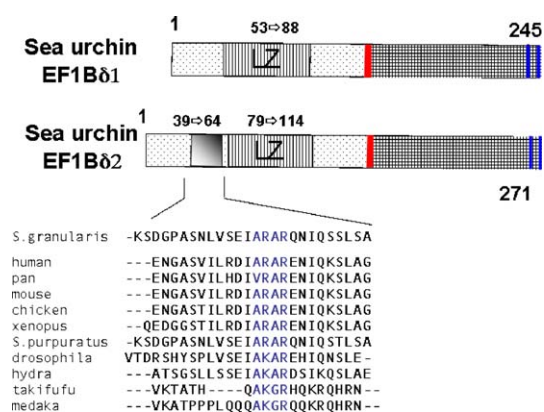


Fig. 8. Schematic structure of the eEF1B δ 1 and 2 proteins components of sea urchin elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed) and the phosphorylation site (red). The leucine zipper motif is indicated LZ in a striated box. The squaring area corresponds to the guanine nucleotide exchange domain activity. Amino acid numbering refers to the sea urchin sequence. The insert of 26 amino acids is boxed in gray and its sequence in different organisms expanded after CLUSTAL X alignment, the highly conserved amino acids are indicated in blue. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

C-terminus. We further found that the databases contain four different cDNAs encoding for human eEF1B δ , each mRNA being present under an insertion-containing form (Refseq NM_001960 and Refseq NM_032378) and an insertion-free form (GenBank BC094806 and GenBank BC000678); the insertion encodes for a 24 amino acid sequence located before the leucine zipper motif.

Of interest, an insertion motif was recovered in sequences from mammals, amphibians, fishes and hydra. In those species, two identical sequences, apart from the insertion, were found in the databases. Sequence comparisons further showed high similitude at the level of the insertion motif between species (Fig. 8). It must be noted that three species, zebrafish, takifugu and blue crab, although they possess two eEF1B δ isoforms differing only by the presence of a short sequence insertion at the N-terminus, do not show conservation in the insertion sequence either between them or with that of other species. Nevertheless, the conservation in the amino acid sequence as well as in the localization of the insert, found in almost all eEF1B δ sequences, indicates a functional relevance for this motif.

As stated above, the eEF1B δ subunit was discovered by screening for CDK substrates during amphibian oocyte maturation. Two phosphorylation sites have been found in the *Xenopus* eEF1B δ sequences, a threonine residue in the sequence ¹³¹TPA-(A)-K and a serine residue which has not been identified and which was responsible for a “shift” in protein mobility when phosphorylated [122]. The threonine-containing phosphorylation motif was conserved in primates, amphibians, chicken, mouse and rat but no other mammals. On the other hand, a serine residue in motif ¹³³SPMR (numbered as in the human sequence), a consensus CDK target, was found in the sequences of most vertebrates (except amphibians) and was actually demonstrated to be the site of CDK phosphorylation (see Fig. 7) in human eEF1B δ [123]. The presence of a conserved phosphorylation site in vertebrates would be related to the acquisition of a regulated function for the protein eEF1B δ in these species (see Section 3).

A full-length alignment of all the nucleotide exchange proteins found in the databases was done using CLUSTAL X [103] and a neighbor-joining tree using % identity [104] was calculated (Fig. 9). It clearly separates the metazoan eEF1B δ sequences from all the eEF1B α and plant eEF1B β sequences. Noteworthy, no clustering could be seen between metazoan eEF1B δ s and plant eEF1B β s. When comparable analysis were performed using the C-terminus of the sequences that contain the guanine nucleotide exchange domain, highly comparable results were obtained in concordance with previous accurate analysis obtained with a narrower set of sequences [105]. Therefore this justifies our proposal to designate the heaviest guanine nucleotide exchange protein differently in plants and in metazoans, namely eEF1B β and eEF1B δ , and fits with monophyly for eEF1B α and eEF1B β in plants and monophyly for eEF1B α and eEF1B δ in metazoans as already proposed [105].

As for eEF1B α and eEF1B β in plants, the presence in the same complex (eEF1B) of two proteins, namely eEF1B α and eEF1B δ , sharing the same function (GTP/GDP exchange activity) raised the question of their respective physiological

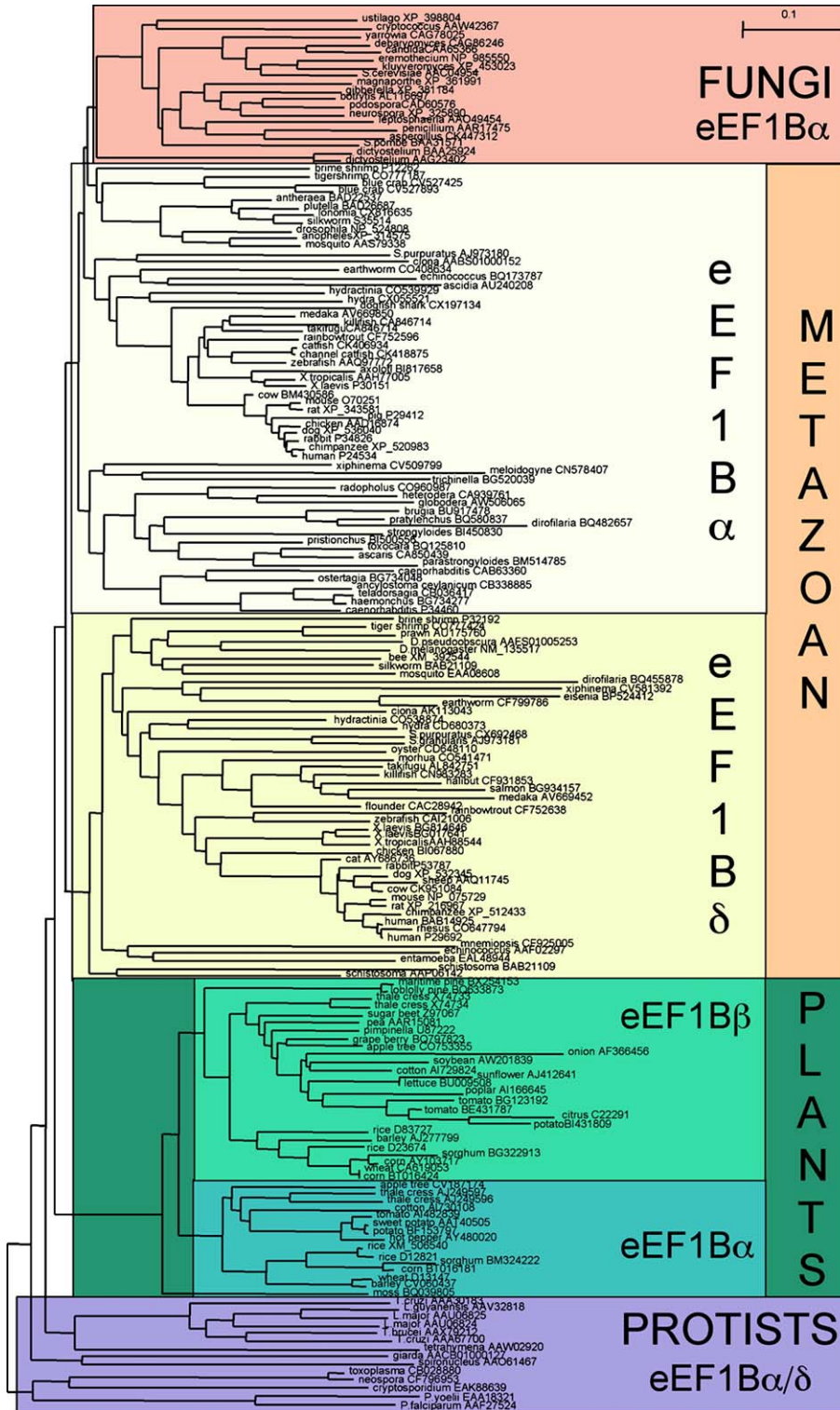


Fig. 9. Consensus tree inferred from the full-length sequences of 179 eEF1B α , eEF1B β , eEF1B δ proteins from all organisms as described in the text. Sequences were extracted from nucleic and proteic data banks using NCBI resources via the Internet. The tree is unrooted. The common names of organisms are used for convenience. Scientific binomials can be obtained from the accession numbers associated with the names of the organisms. The clusters corresponding to protein types are boxed in color. Branch lengths are scaled and correspond to mean substitution values per site as obtained from njplot. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

role in metazoans. As for plant eEF1B β , it was demonstrated that eEF1B δ from metazoan (human) could not complement eEF1B α -deficient yeasts, whereas the human eEF1B α was

functional in the same complementation test. Complementation could not be obtained even if the highly identical C-ter domain of eEF1B δ was used [84]. This clearly demonstrated

that although both proteins show high sequence similarity, they assume different physiological functions.

Taken together, the data demonstrate that the nucleotide exchange component of elongation factor-1B (eEF1B) comprises a family where the exchange function is achieved primarily by the eEF1B α isoform, although it can also be assumed by eEF1B β in plants or eEF1B δ in metazoans under certain experimental conditions. The proper physiological function(s) of eEF1B β and eEF1B δ , is(are) not yet known.

3. eEF1B, a multifunctional regulator

3.1. eEF1B, cell cycle and tumorigenesis

The cell cycle is made up of several highly regulated and synchronized phases, which are controlled by survey mechanisms known as checkpoints [124]. Key effectors of the checkpoints are the cyclin dependent kinases (CDKs), responsible for entry, progression and coupling of these phases (review in [125]). The activity of the CDKs is regulated mainly by cyclical proteolysis of their partners (cyclins) and by phosphorylation cascades [126,127]. The first evidence for a possible implication of elongation control in the cell cycle was the discovery that eEF1B is a physiological target for MPF (CDK1/cyclinB, prototype of the CDKs family) during the maturation of amphibian oocyte [61]. Interestingly, the two targets for CDK phosphorylation in eEF1B are the two subunits for which a function in the complex is still largely unknown, namely eEF1B γ and eEF1B δ [62,122]. Each eEF1B subunit is also substrate for one or another kinases implicated in mitotic signaling, i.e., PKC, CK2, S6 kinase, PKA (see Fig. 10 and [42]).

The function(s) of eEF1B phosphorylation and its implication in mitotic signaling has not been elucidated although some clues are beginning to emerge (Fig. 11). On the one hand, it can be proposed that eEF1B phosphorylation by CDK1 has a global inhibitory effect on elongation. It has been reported that the protein synthesis rate significantly decreases at the time of M-phase. Such a decrease was initially attributed to the inhibition of initiation [128,129], however it was demonstrated that it also

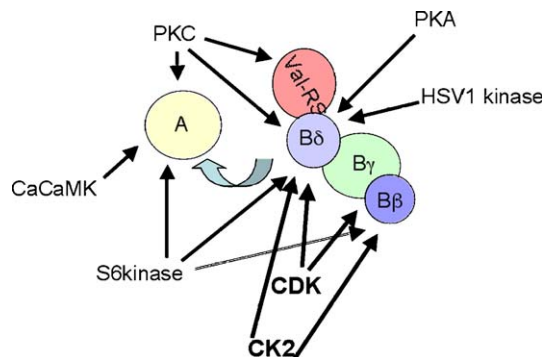


Fig. 10. Schematic representation of eEF1 showing various protein kinases subunit targets in the G-protein subunit eEF1A (left) and the different components (right) of the guanine-nucleotide exchange factor eEF1B. See text for details.

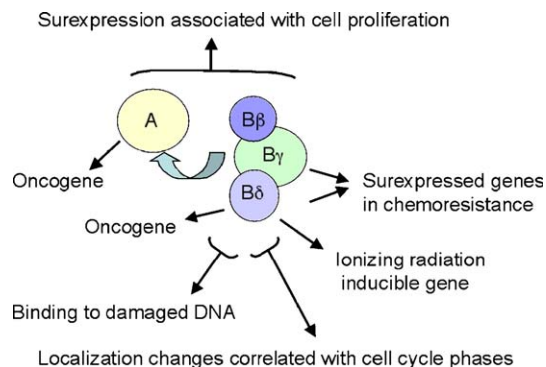


Fig. 11. Schematic representation of the known biological implications in the cell cycle of the different components of eEF1. See text for details.

results from pauses at the elongation level in synchrony with CDK1 activation [11]. Furthermore, a plant eEF1B β failed in complementing a yeast mutant deleted for the eEF1B α gene unless the CDK phosphorylation site was mutated to an unphosphorylatable residue, indicating a phosphorylation inhibitory role at this level [107].

On the other hand, it was demonstrated that, in a reticulocyte lysate, the phosphorylation of eEF1B (both eEF1B δ and eEF1B γ subunits) by CDK decreased the synthesis of valine-rich proteins to the benefit of the others. This effect was correlated to the presence of Val-RS in association with the complex [130]. This result indicates that the eEF1B complex was able to promote the translation of a specific set of mRNAs. It was further shown that eEF1B γ protein could bind to a highly conserved element in the 3' untranslated region of vimentin RNA and therefore could target this mRNA for translation [131]. Although Siegal et al. suggested that binding of eEF1B γ to a nucleotide could be artefactually obtained with any type of RNA molecules [50], it may be postulated that physiological binding could be specified by another eEF1B subunit, i.e., eEF1B δ . In fact, the lysine-rich domain in eEF1B γ together with the leucine zipper motif in eEF1B δ constitutes a structure reminiscent of transcription factors that bind specific DNA regions [132]. Binding of the eEF1B complex to mRNA, possibly regulated by CDK phosphorylation, could lead to the specific translation of one type of mRNA.

Another link implicating the eEF1B complex in the cell cycle came from cellular immunolocalization experiments of the eEF1 components during the cell cycle. In cultured cells the major fraction of the complex localized at the level of the endoplasmic reticulum, related to its role in peptide chain elongation [70,71]. In sea urchin embryos, a pool of eEF1B was shown to exhibit specific localization changes correlated with progression through the cell cycle. At the time of S-phase and just before nuclear membrane breakdown, part of eEF1B complex concentrated as a ring around the nucleus; thereafter in M-phase when the mitotic spindle is formed, eEF1B localized as two large diffuse spheres around the spindle pole [121]. These data indicate a role for the eEF1B complex during the cell cycle.

An interesting hypothesis might be an implication of eEF1B in the mechanisms of checkpoints control, responsible for the

fidelity of DNA replication and the accuracy of chromosome segregation [124]. Two additional data actually support the possibility that eEF1B plays a role in DNA damage checkpoint during the cell cycle. First, under exposure to ionizing radiation that induced double strand DNA breaks or base oxidations, cells arrested at the G2/M transition and showed an overexpression of eEF1B δ [133]. Second, it was reported that the eEF1B complex displayed DNA binding activity on chromium- and transplatin-damaged DNA [134]. Although one possibility could be that elongation factors act by targeting efficient and, possibly specific, protein synthesis where it is required, more direct yet still putative, function could be expected in the mechanisms of checkpoint.

Further evidence for a connection between elongation factors and checkpoints came from studies of the expression of the different eEF1 subunits in tumor cells (Fig. 11). “Anarchic” cell divisions, a hallmark of cancer, are known to result from the disruption of cell cycle checkpoint control mechanisms (review in [135,136]). It is now well established that the level of cellular eEF1A is correlated with the senescence or longevity of the cells as well as their apoptotic and proliferative state (review in [19]). Overexpression of eEF1A mRNA and/or protein has been associated with numerous carcinomas (review in [137]). The levels of eEF1B α and eEF1B γ mRNA were 20 times higher in transformed culture cells compared with tissue, as was the level of eEF1A mRNA [45]. Correlatively, eEF1B γ mRNA was shown to be highly overexpressed in a number of esophageal, gastrointestinal, pancreatic and colorectal carcinomas [138–141]. The level of eEF1B γ expression has also been related to the aggressiveness of the tumor [78]. An abnormal, elevated level of the protein was also observed in colorectal carcinomas [142]. A number of transformed cellular lines from ovarian, breast or lung origins exhibited a high level of eEF1B δ expression [143–145]. Clinical studies from patients suffering from esophageal carcinomas showed overexpression of eEF1B δ mRNA [146]. Overexpression of eEF1B δ was associated with the chemoresistance of malignant melanoma [147]. These data demonstrate the existence of a tight connection between deregulation of elongation factor expression and cell cycle disorders, even if causal/effect relationships cannot be established at this point. More direct evidence of elongation factor implication in cell cycle regulation came from the discovery that some of them are true oncogenes. This was first demonstrated for a mutated and truncated form of eEF1A, named PTI-1 (prostatic carcinoma tumor inducing gene) (review in [148]). More recently eEF1A2 was recognized as an important ovarian oncogene [149]. Since eEF1A activity is dependent on its GTP loading, eEF1B, the oncogenic effect of the exchange factor, could be through its ability to increase GTP exchange on eEF1A. Evidence for an oncogenic role for the eEF1B subunits by themselves is accumulating. Thus, studies from Joseph et al. demonstrated that the eEF1B δ protein was a true oncogene. They identified eEF1B δ as an overexpressed gene in cadmium transformed mouse fibroblasts. Transfection of eEF1B δ was sufficient to transform 3T3 fibroblasts and make them tumorigenic in nude mice. The effect was reversed by co-transfection with antisense mRNA (review in [150]).

Thus, eEF1B as well as eEF1A appear to be involved in regulation of the cell cycle, normal and pathological, although the precise mechanism of their action remains to be elucidated (Fig. 11).

3.2. eEF1B and virus

Viruses appropriate the translational machinery of the eukaryotic cells they infect, to achieve the production of large amounts of viral proteins. This strategy leads to the optimal translation of the viral mRNAs at the expense of the host mRNAs. The eEF1B δ protein has long been recognized as the target of a number of viral proteins.

Thus, the second coding exon for Tat, a lentivirus (HIVs and SIVs) conserved protein, was shown to interact with eEF1B δ leading to a dramatic reduction in the efficiency of the translation of cellular, but not viral mRNAs [151].

In the same way, in herpes simplex virus 1 (HSV-1) infected cells, one of the earliest expressed viral proteins, named infected-cell protein 0 (ICP0), was demonstrated to bind to eEF1B δ and to affect the translational efficiency of viral mRNAs [152]. Moreover, in infected cells eEF1B δ accumulated in a hyperphosphorylated form, due to the phosphorylation of the protein by the U_L13 viral gene encoded kinase [153]. This post-translational modification is conserved in alpha-, beta- or gamma-herpes viruses that contain UL13 homologues [154], like the BGLF4 kinase of Epstein–Barr virus [155]. The site phosphorylated by the viral kinases in eEF1B δ has been mapped and was reported to correspond to the site phosphorylated by the CDK1/cyclin B kinase, serine residue in the sequence S¹³³PMR (as numbered after the human sequence). The authors raised the possibility that the viral kinases mimic CDK in infected cells [123]. These data lead to the conclusion that eEF1B δ , upon binding to a viral protein and phosphorylation by a viral kinase, could be responsible for the global protein synthesis inhibition of the host cell, and/or allow the specific translation of viral RNA.

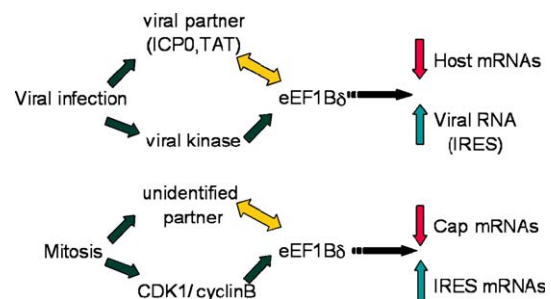


Fig. 12. Schematic representation of the speculative role of eEF1B δ in the regulation of protein synthesis during viral infection (upper) and during mitosis (lower). The protein eEF1B δ would favor (green arrow) translation initiated at the internal ribosome entry site (IRES) and inhibit (red arrow) cap-dependent translation, through ICP0/TAT binding and viral kinase phosphorylation of eEF1B δ in the case of viral infection, and through binding of a yet unidentified partner and phosphorylation of eEF1B δ by CDK1/cyclinB in the case of mitosis. See text for details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

A distinctive feature of viral mRNAs is the presence of an internal ribosome entry site (IRES) in the 5'UTR, allowing efficient viral protein synthesis in infected cells in spite of a severe modification of translation initiation factors induced by viral proteases that leads to a fast inhibition of cellular protein synthesis by the canonical cap-dependent pathway (reviews in [156,157]). The existence of cellular mRNAs containing functional IRES has become increasingly clear even if their associated items (IRES trans activating factors) have not always been characterized (review in [158]). It is noteworthy that these IRES elements were generally found on mRNA encoding for proteins whose translation is required when the vast majority of cellular mRNAs is significantly impaired, i.e., stress conditions, G2/M transition, and apoptosis. Such situations are reminiscent of what happens in infected cells when the translation of host cellular mRNAs is repressed to the benefit of viral IRES-containing RNA. As viruses act by hijacking the normal protein synthesis machinery of their host cells, an attractive speculative hypothesis would be that, in normal uninfected cells, one (or the) cellular role of eEF1B δ is to regulate the translation of mRNAs, depending on its interaction with an as yet unidentified cellular homologue of Tat or ICP0 and its phosphorylation by CDKs in relation to the stage of the cell cycle (Fig. 12).

4. Conclusion

As shown in this report, eukaryotes have evolved into a sophisticated complex to, at first glance, merely achieve the exchange of nucleotides on eEF1A for the elongation step of protein biosynthesis. Compared to the bacterial apparatus, for which nucleotide exchange is ensured by a single subunit EF-Ts, eukaryotic EF1B is a high macromolecular complex comprising various numbers of subunits depending on species. Containing two subunits (eEF1B α and eEF1B γ) in yeast, eukaryotic EF1B reaches its highest complexity in higher vertebrates where at least five subunits are present: eEF1B α , eEF1B δ 1, eEF1B δ 2, eEF1B γ and the Val-RS. The question of considering Val-RS as a true subunit and not an associated protein is currently under investigation although it seems to be clearly the case in the mammalian factor [54,118].

The most striking characteristic is the occurrence of a family of nucleotide exchange proteins in the same complex. Whereas eEF1B α would be sufficient to ensure the exchange function, as it appears to be in fungi, the plant complex contains two exchange subunits (eEF1B α and eEF1B β), and the metazoan factor, three subunits (eEF1B α , eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2).

There is no doubt that eEF1B δ and eEF1B β have specific function(s), even in their nucleotide exchange domain, since they cannot supplement nucleotide exchange deficient yeast. The major challenge in the coming years will be the discovery of the physiological function(s) of these subunits as well as their regulation through phosphorylation. Towards this aim, structural data would certainly be of help.

Clues for the specific role of the eEF1B δ subunits should come from further studies on the specification of translation

during viral infections through binding to ICP0 and phosphorylation. Identification of a cellular functional homologue to ICP0 is now a challenge. Furthermore, it would seem valuable to analyze the implication of eEF1B in IRES regulation during the cell cycle, specifically during the M-phase.

The key issue is whether elongation rates and elongation factors have causal roles in regulating the cell cycle. Whatever the case, the accumulation of information on elongation factors will ultimately lead to the identification of cancer markers and/or to targets for cancer therapy.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Association contre le Cancer (ARC) and the Ligue Nationale contre le Cancer (Finistère). F.L.S. and R.L.B. are doctoral research fellows financed by the Ligue Nationale contre le Cancer (Côtes d'Armor) and the Région Bretagne, respectively. We thank Dr. M.-A. Guerrucci (Université Pierre et Marie Curie, Paris) for valuable discussions on the field of phylogeny. We are grateful to Dr. M. Cock (Génomique Fonctionnelle des Algues Marines, UMR CNRS/UPMC 7139, Roscoff) for critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.bbaexp.2006.02.003](https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2006.02.003).

References

- [1] H. Boedtker, W. Moller, E. Klemperer, On the validity of the evidence for sub-units of high molecular weight ribonucleic acids, *Nature* 194 (1962) 444–446.
- [2] W. Moller, L.I. Slobin, R. Amons, D. Richter, Isolation and characterization of two acidic proteins of 60s ribosomes from *Artemia salina* cysts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 4744–4748.
- [3] M.B. Mathews, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, Origins and principles of translational control, in: N. Sonenberg, J. Hershey, M. Mathews (Eds.), *Translational Control of Gene Expression*, CSHL Press, New York, 2000, pp. 1–31.
- [4] F. Gebauer, M.W. Hentze, Molecular mechanisms of translational control, *Nat. Rev. Mol., Cell Biol.* 5 (2004) 827–835.
- [5] P. Cormier, S. Pyronnet, P. Salaun, O. Mulner-Lorillon, N. Sonenberg, Cap-dependent translation and control of the cell cycle, *Prog. Cell Cycle Res.* 5 (2003) 469–475.
- [6] A. Carr-Schmid, N. Durko, J. Cavallius, W.C. Merrick, T.G. Kinzy, Mutations in a GTP-binding motif of eukaryotic elongation factor 1A reduce both translational fidelity and the requirement for nucleotide exchange, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 30297–30302.
- [7] J.M. Song, S. Picologlou, C.M. Grant, M. Firoozan, M.F. Tuite, S. Liebman, Elongation factor EF-1 alpha gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 4571–4575.
- [8] J.A. Traugh, Insulin, phorbol ester and serum regulate the elongation phase of protein synthesis, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 26 (2001) 33–48.
- [9] N.G. Theodorakis, S.S. Banerji, R.I. Morimoto, HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 14579–14585.
- [10] R.A. Raff, J.W. Brandis, C.J. Huffman, A.L. Koch, D.E. Leister, Protein

- synthesis as an early response to fertilization of the sea urchin egg: a model, *Dev. Biol.* 86 (1981) 265–271.
- [11] A. Monnier, J. Morales, P. Cormier, S. Boulben, R. Belle, O. Mulner-Lorillon, 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 (2001) 229–236.
- [12] M. Orlowski, P.S. Sypherd, Regulation of translation rate during morphogenesis in the fungus *Mucor*, *Biochemistry* 17 (1978) 569–575.
- [13] A.G. Ryazanov, B.B. Rudkin, A.S. Spirin, Regulation of protein synthesis at the elongation stage. New insights into the control of gene expression in eukaryotes, *FEBS Lett.* 285 (1991) 170–175.
- [14] M. Le Breton, P. Cormier, R. Belle, O. Mulner-Lorillon, J. Morales, Translational control during mitosis, *Biochimie* 87 (2005) 805–811.
- [15] W.C. Merrick, J. Nyborg, The protein synthesis elongation cycle, in: N. Sonenberg, J. Hershey, M. Mathews (Eds.), *Translational Control of Gene Expression*, CSHL Press, New York, 2000, pp. 89–125.
- [16] A.G. Ryazanov, Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives, *FEBS Lett.* 514 (2002) 26–29.
- [17] S. Ejiri, Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 1–21.
- [18] C.G. Proud, mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 429–436.
- [19] A. Lamberti, M. Caraglia, O. Longo, M. Marra, A. Abbruzzese, P. Arcari, The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article, *Amino Acids* 26 (2004) 443–448.
- [20] J. Lucas-Lenard, F. Lipmann, Separation of three microbial amino acid polymerization factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55 (1966) 1562–1566.
- [21] G.R. Andersen, P. Nissen, J. Nyborg, Elongation factors in protein biosynthesis, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 434–441.
- [22] D.L. Miller, H. Weissbach, Interactions between the elongation factors: the displacement of GPD from the TU–GDP complex by factor Ts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38 (1970) 1016–1022.
- [23] E. Gasior, K. Moldave, Resolution of aminoacyl-transferring enzymes from rat liver by molecular sieve chromatography, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 3346–3352.
- [24] W. McKeenan, P. Sepulveda, S.Y. Lin, B. Hardesty, Two distinct transfer enzymes from rabbit reticulocytes with ribosome dependent guanosine triphosphate phosphohydrolase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34 (1969) 668–672.
- [25] D. Richter, F. Lipmann, Separation of mitochondrial and cytoplasmic peptide chain elongation factors from yeast, *Biochemistry* 9 (1970) 5065–5070.
- [26] S.I. Ejiri, H. Taira, K. Shimura, Three factors for amino acid polymerization from silkworm silkglands, *J. Biochem. (Tokyo)* 67 (1970) 329–331.
- [27] H.M. Moon, B. Redfield, S. Millard, F. Vane, H. Weissbach, Multiple forms of elongation factor 1 from calf brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70 (1973) 3282–3286.
- [28] B. Golinska, A.B. Legocki, Purification and some properties of elongation factor 1 from wheat germ, *Biochim. Biophys. Acta* 324 (1973) 156–170.
- [29] A. Tarrago, J.E. Allende, B. Redfield, H. Weissbach, The effect of guanosine nucleotides on the multiple forms of protein synthesis elongation factor 1 from wheat embryos, *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 353–361.
- [30] L.I. Slobin, W. Moller, Changes in form of elongation factor during development of *Artemia salina*, *Nature* 258 (1975) 452–454.
- [31] H. Weissbach, S. Ochoa, Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976) 191–216.
- [32] R. Amons, W. Pluijms, K. Roobol, W. Moller, Sequence homology between EF-1 α , the α -chain of elongation factor 1 from *Artemia salina* and elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 153 (1983) 37–42.
- [33] H.M. Moon, H. Weissbach, Interaction of brain transferase I with guanosine nucleotides and aminoacyl-tRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 254–262.
- [34] N. Prather, J.M. Ravel, B. Hardesty, W. Shive, Evidence for activities of rabbit reticulocyte elongation factor 1 analogous to bacterial factors EF-Ts and EF-Tu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57 (1974) 578–583.
- [35] K. Iwasaki, K. Mizumoto, M. Tanaka, Y. Kaziro, A new protein factor required for polypeptide elongation in mammalian tissues, *J. Biochem. (Tokyo)* 74 (1973) 849–852.
- [36] S. Ejiri, H. Taira, K. Shimura, Characterization of an additional factor for amino acid polymerization from silk glands of silkworms, *J. Biochem. (Tokyo)* 74 (1973) 195–197.
- [37] L.I. Slobin, W. Moller, The heavy form of elongation factor 1 in *Artemia salina* embryos is functionally analogous to a complex of bacterial factors EF-Tu and EF-Ts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74 (1977) 356–365.
- [38] G.A. Lanzani, E. Caldirelli, L.A. Manzocchi, R. Bollini, L. Albertie, The translational system from wheat embryos: some properties of the polypeptides associated in EF1H, *FEBS Lett.* 64 (1976) 102–106.
- [39] G.M.C. Janssen, W. Moller, Kinetic studies on the role of elongation factors 1 β and 1 γ in protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1773–1778.
- [40] M. Miyazaki, M. Uritani, K. Fujimura, H. Yamakatsu, T. Kageyama, K. Takahashi, Peptide elongation factor 1 from yeasts: purification and biochemical characterization of peptide elongation factors 1 α and 1 β (γ) from *Saccharomyces carlsbergensis* and *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biochem.* 103 (1988) 508–521.
- [41] S.I. Ejiri, N. Ebata, R. Kawamura, T. Katsumata, Occurrence of four subunits in high molecular weight forms of polypeptide chain elongation factor 1 from wheat embryo, *J. Biochem.* 94 (1983) 319–322.
- [42] O. Minella, O. Mulner-Lorillon, G. Bec, P. Cormier, R. Belle, Multiple phosphorylation sites and quaternary organization of guanine–nucleotide exchange complex of elongation factor-1 (EF-1 β gd/ValRS) control the various functions of EF-1 α , *Biosci. Rep.* 18 (1998) 119–127.
- [43] G.D.F. Maessen, R. Amons, R. Zeelen, W. Moller, Primary structure of elongation factor 1 γ from *Artemia*, *FEBS Lett.* 223 (1987) 181–186.
- [44] P. Cormier, H.B. Osborne, J. Morales, T. Bassez, R. Pouhle, A. Mazabraud, O. Mulner-Lorillon, R. Belle, Molecular cloning of *Xenopus* elongation factor 1 γ , major M-phase promoting factor substrate, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 6644.
- [45] J. Sanders, J.A. Maassen, W. Moller, Elongation factor-1 messenger RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 5907–5910.
- [46] T. Kumabe, Y. Sohma, T. Yamamoto, Human cDNAs encoding elongation factor 1 γ and the ribosomal protein L19, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 2598.
- [47] J. Morales, T. Bassez, P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, R. Belle, H.B. Osborne, Expression of elongation factor 1 α (EF-1 α) and 1 β γ (EF-1 β γ) are uncoupled in early *Xenopus* embryos, *Dev. Genet.* 14 (1993) 440–448.
- [48] T.G. Kinzy, T.L. Ripmaster, J.L. Woolford Jr., Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 γ in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2703–2707.
- [49] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [50] S. Vanwetswinkel, J. Kriek, G.R. Andersen, P. Guntert, J. Dijk, G.W. Canters, G. Siegal, Solution structure of the 162 residue C-terminal domain of human elongation factor 1 β γ , *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43443–43451.
- [51] M.G. Jeppesen, P. Ortiz, W. Shepard, T.G. Kinzy, J. Nyborg, G.R. Andersen, The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1 β γ from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47190–47198.

- [52] H. Van Damme, R. Amons, G. Janssen, W. Moller, Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1beta gamma, *Eur. J. Biochem.* 197 (1991) 505–511.
- [53] G.M.C. Janssen, H.T.F. Van Damme, J. Kriek, R. Amons, W. Moller, The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*—Why two alpha-chains in this complex? *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 31410–31417.
- [54] G. Bec, P. Kerjan, J.P. Waller, Reconstitution in vitro of the valyl-transfer RNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex—Essential roles of the NH₂-terminal extension of valyl-transfer RNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2086–2092.
- [55] G.T. Sheu, J.A. Traugh, Recombinant subunits of mammalian elongation factor 1 expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 33290–33297.
- [56] K. Kamiie, T. Yamashita, H. Taira, S. Kidou, S. Ejiri, Interaction between elongation factors 1beta and 1gamma from *Bombyx mori* silk gland, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 1522–1529.
- [57] F. Mansilla, I. Friis, M. Jadidi, K.M. Nielsen, B.F. Clark, C.R. Knudsen, Mapping the human translation elongation factor eEF1H complex using the yeast two-hybrid system, *Biochem. J.* 365 (2002) 669–676.
- [58] E.V. Koonin, A.R. Mushegian, R.L. Tatusov, S.F. Altschul, S.H. Bryant, P. Bork, A. Valencia, Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain—Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling, *Protein Sci.* 3 (1994) 2045–2054.
- [59] O. Billaut-Mulot, R. Schoneck, R. Fernandez-Gomez, A. Taibi, A. Capron, V. Pommier, B. Plumas-Marty, M. Loyens, A. Ouaisi, Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1 gamma, *Biol. Cell* 82 (1994) 39–44.
- [60] K. Kamiie, Y. Nomura, S. Kobayashi, H. Taira, K. Kobayashi, T. Yamashita, S. Kidou, S. Ejiri, Cloning and expression of *Bombyx mori* silk gland elongation factor 1gamma in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 558–565.
- [61] R. Belle, J. Derancourt, R. Poulhe, J.P. Capony, R. Ozon, O. Mulner-Lorillon, A purified complex from *Xenopus* oocytes contains a p47 protein, an in vivo substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1gamma and EF-1beta, *FEBS Lett.* 255 (1989) 101–104.
- [62] O. Mulner-Lorillon, P. Cormier, J.-C. Cavadore, J. Morales, R. Poulhe, R. Belle, Phosphorylation of *Xenopus* elongation factor-1 gamma by cdc2 protein kinase: identification of the phosphorylation site, *Exp. Cell Res.* 202 (1992) 549–551.
- [63] M. Tokumoto, Y. Nagahama, T. Tokumoto, A major substrate for MPF: cDNA cloning and expression of polypeptide chain elongation factor 1 gamma from goldfish (*Carassius auratus*), *DNA Seq.* 13 (2002) 27–31.
- [64] J. Zhang, R.J. Sanchez, S. Wang, C. Guarnaccia, A. Tossi, S. Zahariev, S. Pongor, Substrate specificity of CDC2 kinase from human HeLa cells as determined with synthetic peptides and molecular modeling, *Arch. Biochem. Biophys.* 315 (1994) 415–424.
- [65] R.C. Venema, H.I. Peters, J.A. Traugh, Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12574–12580.
- [66] R.C. Venema, H.I. Peters, J.A. Traugh, Phosphorylation of valyl-tRNA synthetase and elongation factor 1 in response to phorbol esters is associated with stimulation of both activities, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 11993–11998.
- [67] K. Motoyoshi, K. Iwasaki, Resolution of the polypeptide chain elongation factor-1 beta gamma into subunits and some properties of the subunits, *J. Biochem. (Tokyo)* 82 (1977) 703–708.
- [68] G.M.C. Janssen, W. Moller, Elongation factor 1beta gamma from *Artemia*. Purification and properties of its subunits, *Eur. J. Biochem.* 171 (1988) 119–129.
- [69] N.G. Kambouris, D.J. Burke, C.E. Creutz, Cloning and genetic characterization of a calcium-binding and phospholipid-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae* that is homologous to translation elongation factor-1gamma, *Yeast* 9 (1993) 151–163.
- [70] J. Sanders, M. Brandsma, G.M.C. Janssen, J. Dijk, W. Moller, Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.* 109 (1996) 1113–1117.
- [71] O. Minella, O. Mulner-Lorillon, V. Desmedt, S. Hourdez, P. Cormier, R. Belle, Major intracellular localization of elongation factor-1, *Cell. Mol. Biol.* 42 (1996) 805–810.
- [72] S. Kobayashi, S. Kidou, S. Ejiri, Detection and characterization of glutathione S-transferase activity in rice EF-1betabeta'gamma and EF-1gamma expressed in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 509–514.
- [73] T.J. Vickers, A.H. Fairlamb, Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27246–27256.
- [74] T.J. Vickers, S. Wyllic, A.H. Fairlamb, Leishmania major elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 49003–49009.
- [75] O. Billaut-Mulot, R. Fernandez-Gomez, A. Ouaisi, Phenotype of recombinant *Trypanosoma cruzi* which overexpress elongation factor 1-gamma: possible involvement of EF-1gamma GST-like domain in the resistance to clomipramine, *Gene* 198 (1997) 259–267.
- [76] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 51–88.
- [77] O. Olarewaju, P.A. Ortiz, W.Q. Chowdhury, I. Chatterjee, T.G. Kinzy, The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway, *RNA Biol.* 1 (2004) 89–94.
- [78] K. Mimori, M. Mori, H. Inoue, H. Ueo, K. Mafune, T. Akiyoshi, K. Sugimachi, Elongation factor 1 gamma mRNA expression in oesophageal carcinoma, *Gut* 38 (1996) 66–70.
- [79] K. Murakami, S. Ejiri, T. Katsumata, Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Effect of EF-1b on EF-1a- and ribosome-dependent GTPase activity, *FEBS Lett.* 92 (1978) 255–257.
- [80] L.I. Slobin, W. Moller, Purification and properties of an elongation factor functionally analogous to bacterial elongation factor Ts from embryos of *Artemia salina*, *Eur. J. Biochem.* 84 (1978) 69–77.
- [81] J.F. Carvalho, M.G.C. Carvalho, W.C. Merrick, Purification of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 234 (1984) 591–602.
- [82] M.G.C. Carvalho, J.F. Carvalho, W.C. Merrick, Biochemical characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 234 (1984) 603–611.
- [83] K. Hiraga, K. Suzuki, E. Tsuchiya, T. Miyakawa, Cloning and characterization of the elongation factor ef-1beta homologue of *Saccharomyces cerevisiae*-ef-1beta is essential for growth, *FEBS Lett.* 316 (1993) 165–169.
- [84] A. Carr-Schmid, L. Valente, V.I. Loik, T. Williams, L.M. Starita, T.G. Kinzy, Mutations in elongation factor 1 beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5257–5266.
- [85] W.T.F. Van Damme, R. Amons, R. Karssies, C.J. Timmers, G.M.C. Janssen, W. Moller, Elongation factor 1beta of *Artemia*: localization of functional sites and homology to elongation factor 1delta, *Biochim. Biophys. Acta* 1050 (1990) 241–247.
- [86] J.M. Perez, J. Kriek, J. Dijk, G.W. Canters, W. Moller, Expression, purification, and spectroscopic studies of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor, EF-1beta, *Protein Expr. Purif.* 13 (1998) 259–267.
- [87] K. Kamiie, H. Taira, K. Kobayashi, T. Yamashita, S. Kidou, S. Ejiri, Expression of elongation factor 1 beta' in *Escherichia coli* and its interaction with elongation factor 1 alpha from silk gland, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 666–671.
- [88] G.D.F. Maessen, R. Amons, J.A. Maessen, W. Moller, Primary structure of elongation factor 1beta from *Artemia*, *FEBS Lett.* 208 (1986) 77–83.
- [89] S. Matsumoto, N. Oizumi, H. Taira, S. Ejiri, Cloning and sequencing of the cDNA encoding rice elongation factor-1beta', *FEBS Lett.* 311 (1992) 46–48.
- [90] J.M. Perez, G. Siegal, J. Kriek, K. Hard, J. Dijk, G.W. Canters, W. Moller, The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1beta reveals a striking resemblance to

- that of EF-Ts from *Escherichia coli*, Structure Fold. Des. 7 (1999) 217–226.
- [91] G.M.C. Janssen, G.D.F. Maessen, R. Amons, W. Moller, Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity, J. Biol. Chem. 263 (1988) 11063–11066.
- [92] R. Belle, O. Minella, P. Cormier, J. Morales, R. Poulhe, O. Mulner-Lorillon, Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase, Prog. Cell Cycle Res. 1 (1995) 265–270.
- [93] C.J. Chen, J.A. Traugh, Expression of recombinant elongation factor 1 beta from rabbit in *Escherichia coli*. Phosphorylation by casein kinase II, Biochim. Biophys. Acta 1264 (1995) 303–311.
- [94] F. Meggio, L.A. Pinna, One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? FASEB J. 17 (2003) 349–368.
- [95] S. Matsumoto, T. Mizoguchi, N. Oizumi, M. Tsuruga, K. Shinozaki, H. Taira, S. Ejiri, Analysis of phosphorylation of wheat elongation factor-1 beta and factor-beta(′) by casein kinase-II, Biosci. Biotechnol. Biochem. 57 (1993) 1740–1742.
- [96] Y.W. Chang, J.A. Traugh, Phosphorylation of elongation factor 1 and ribosomal protein S6 by multipotential S6 kinase and insulin stimulation of translational elongation, J. Biol. Chem. 272 (1997) 28252–28257.
- [97] H.I. Peters, Y.W.E. Chang, J.A. Traugh, Phosphorylation of elongation factor 1(EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity, Eur. J. Biochem. 234 (1995) 550–556.
- [98] Y.W.E. Chang, J.A. Traugh, Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity, Eur. J. Biochem. 251 (1998) 201–207.
- [99] A. Pizzuti, M. Gennarelli, G. Novelli, A. Colosimo, S. Locicero, C.T. Caskey, B. Dallapiccola, Human elongation factor-EF-1 beta-cloning and characterization of the Efl beta 5a gene and assignment of EF-1 beta isoforms to chromosome-2, chromosome-5, chromosome-15 and chromosome-X, Biochem. Biophys. Res. Commun. 197 (1993) 154–162.
- [100] D.M. Chambers, G.A. Rouleau, C.M. Abbott, Comparative genomic analysis of genes encoding translation elongation factor 1B(alpha) in human and mouse shows EEF1B1 to be a recent retrotransposition event, Genomics 77 (2001) 145–148.
- [101] S. Matsumoto, Y. Terui, S.X. Xi, H. Taira, S. Ejiri, Cloning and characterization of the cDNA encoding rice elongation factor 1 beta, FEBS Lett. 338 (1994) 103–106.
- [102] Y. Terui, K. Tsutsumi, S. Kidou, T. Sawazaki, Y. Kuroiwa, M. Yamaki, S. Ejiri, A novel variant of translation elongation factor 1 beta: isolation and characterization of the rice gene encoding EF-1beta2, Biochim. Biophys. Acta 1442 (1998) 369–372.
- [103] F. Jeanmougin, J.D. Thompson, M. Gouy, D.G. Higgins, T.J. Gibson, Multiple sequence alignment with Clustal X, Trends Biochem. Sci. 23 (1998) 403–405.
- [104] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4 (1987) 406–425.
- [105] M.A. Guerrucci, A. Monnier, C. Delalande, R. Belle, The elongation factor-1 delta (EF-1 delta) originates from gene duplication of an EF-1 beta ancestor and fusion with a protein-binding domain, Gene 233 (1999) 83–87.
- [106] E. Palen, T.T. Huang, J.A. Traugh, Comparison of phosphorylation of elongation factor 1 from different species by casein kinase II, FEBS Lett. 274 (1990) 12–14.
- [107] J.R. Pomeroy, L. Valente, T.G. Kinzy, T.W. Jacobs, Mutation of a conserved CDK site converts a metazoan elongation factor 1Bbeta subunit into a replacement for yeast eEF1Balpha, Mol. Genet. Genomics 269 (2003) 776–788.
- [108] R.S. Jope, G.V. Johnson, The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3, Trends Biochem. Sci. 29 (2004) 95–102.
- [109] O. Mulner-Lorillon, R. Poulhe, P. Cormier, J.C. Labbe, M. Doree, R. Belle, Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate, FEBS Lett. 251 (1989) 219–224.
- [110] J. Morales, P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, R. Poulhe, R. Belle, Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1delta, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 4091.
- [111] R. Amons, M.A. Guerrucci, R.H. Karssies, J. Morales, P. Cormier, W. Moller, R. Belle, The leucine-zipper in elongation factor EF-1 delta, a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus*, Biochim. Biophys. Acta 1218 (1994) 346–350.
- [112] J. Sanders, R. Raggiaschi, J. Morales, W. Moller, The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1-delta, Biochim. Biophys. Acta 1174 (1993) 87–90.
- [113] C. Delalande, A. Monnier, O. Minella, A.M. Geneviere, O. Mulner-Lorillon, R. Belle, P. Cormier, 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 (1998) 228–234.
- [114] C. Delalande, R. Belle, P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266 (1999) 425–431.
- [115] G.T. Sheu, J.A. Traugh, A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII, Mol. Cell. Biochem. 191 (1999) 181–186.
- [116] T. Alber, Structure of the leucine zipper, Curr. Opin. Genet. Dev. 2 (1992) 205–210.
- [117] T. Abel, T. Maniatis, Gene regulation. Action of leucine zippers, Nature 341 (1989) 24–25.
- [118] J. Sang Lee, S. Gyu Park, H. Park, W. Seol, S. Lee, S. Kim, Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex, Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (2002) 158–164.
- [119] S.-L. Hsieh, R.D. Campbell, Evidence that gene G7a in the human major histocompatibility complex encodes valyl-tRNA synthetase, Biochem. J. 278 (1991) 809–816.
- [120] O. Minella, O. Mulner-Lorillon, R. Poulhe, R. Belle, P. Cormier, The guanine-nucleotide-exchange complex (EF-1 beta gamma delta) of elongation factor-1 contains two similar leucine-zipper proteins EF-1 delta, p34 encoded by EF-1 delta 1 and p36 encoded by EF-1 delta 2, Eur. J. Biochem. 237 (1996) 685–690.
- [121] S. Boulben, A. Monnier, M. Le Breton, J. Morales, P. Cormier, R. Belle, O. Mulner-Lorillon, 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 (2003) 2178–2188.
- [122] O. Mulner-Lorillon, O. Minella, P. Cormier, J.P. Capony, J.C. Cavadore, J. Morales, R. Poulhe, R. Belle, Elongation factor EF-1 delta, a new target for maturation-promoting factor in *Xenopus* oocytes, J. Biol. Chem. 269 (1994) 20201–20207.
- [123] Y. Kawaguchi, K. Kato, M. Tanaka, M. Kanamori, Y. Nishiyama, Y. Yamanashi, Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta, J. Virol. 77 (2003) 2359–2368.
- [124] L.H. Hartwell, Nobel lecture. Yeast and cancer, Biosci. Rep. 22 (2002) 373–394.
- [125] A.W. Murray, Recycling the cell cycle: cyclins revisited, Cell 116 (2004) 221–234.
- [126] P.M. Nurse, Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control, Biosci. Rep. 22 (2002) 487–499.
- [127] T. Hunt, Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions, Biosci. Rep. 22 (2002) 465–486.
- [128] H. Fan, S. Penman, Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis, J. Mol. Biol. 50 (1970) 655–670.
- [129] J.P. Kanki, J.W. Newport, The cell cycle dependence of protein synthesis during *Xenopus laevis* development, Dev. Biol. 146 (1991) 198–213.
- [130] A. Monnier, R. Belle, J. Morales, P. Cormier, S. Boulben, O. Mulner-Lorillon, Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 1453–1457.
- [131] M. Al-Maghrebi, H. Brule, M. Padkina, C. Allen, W.M. Holmes, Z.E.

- Zehner, The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1 γ and HAX-1, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 5017–5028.
- [132] W. Keller, P. Konig, T.J. Richmond, Crystal structure of a bZIP/DNA complex at 2.2 Å: determinants of DNA specific recognition, *J. Mol. Biol.* 254 (1995) 657–667.
- [133] M. Jung, D. Kondratyev, A. Dritschilo, Elongation factor 1 δ is enhanced following exposure to ionizing radiation, *Cancer Res.* 54 (1994) 2541–2543.
- [134] J.F. Wang, B.N. Engelsberg, S.W. Johnson, C. Witmer, W.C. Merrick, H. Rozmiarek, P.C. Billings, DNA binding activity of the mammalian translation elongation complex: recognition of chromium- and transplatin-damaged DNA, *Arch. Toxicol.* 71 (1997) 450–454.
- [135] J. Massague, G1 cell-cycle control and cancer, *Nature* 432 (2004) 298–306.
- [136] M.B. Kastan, J. Bartek, Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature* 432 (2004) 316–323.
- [137] S. Thornton, N. Anand, D. Purcell, J. Lee, Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis, *J. Mol. Med.* 81 (2003) 536–548.
- [138] Y. Lew, D.V. Jones, W.M. Mars, D. Evans, D. Byrd, M.L. Frazier, Expression of elongation factor-1 γ -related sequence in human pancreatic cancer, *Pancreas* 7 (1992) 144–152.
- [139] K. Chi, D.V. Jones, M.L. Frazier, Expression of elongation factor-1 γ -related sequence in adenocarcinomas of the colon, *Gastroenterology* 103 (1992) 98–102.
- [140] B. Ender, P. Lynch, Y.H. Kim, N.V. Inamdar, K.R. Cleary, M.L. Frazier, Overexpression of an elongation factor-1 γ -hybridizing RNA in colorectal adenomas, *Mol. Carcinogen.* 7 (1993) 18–20.
- [141] K. Mimori, M. Mori, S. Tanaka, T. Akiyoshi, K. Sugimachi, The overexpression of elongation factor 1 γ mRNA in gastric carcinoma, *Cancer* 75 (1995) 1446–1449.
- [142] S. Mathur, K.R. Cleary, N. Inamdar, Y.H. Kim, P. Steck, M.L. Frazier, Overexpression of elongation factor-1 γ protein in colorectal carcinoma, *Cancer* 82 (1998) 816–821.
- [143] A.N. Jacob, G. Kandpal, R.P. Kandpal, Isolation of expressed sequences that include a gene for familial breast cancer (BRCA2) and other novel transcripts from a five megabase region on chromosome 13q12, *Oncogene* 13 (1996) 213–221.
- [144] E. Kolettas, M. Lymboura, K. Khazaie, Y. Luqmani, Modulation of elongation factor-1 δ (EF-1 δ) expression by oncogenes in human epithelial cells, *Anticancer Res.* 18 (1998) 385–392.
- [145] Y. Liu, Q. Chen, J.T. Zhang, Tumor suppressor gene 14-3-3 σ is down-regulated whereas the proto-oncogene translation elongation factor 1 δ is up-regulated in non-small cell lung cancers as identified by proteomic profiling, *J. Proteome Res.* 3 (2004) 728–735.
- [146] K. Ogawa, T. Utsunomiya, K. Mimori, Y. Tanaka, F. Tanaka, H. Inoue, S. Murayama, M. Mori, Clinical significance of elongation factor-1 δ mRNA expression in oesophageal carcinoma, *Br. J. Cancer* 91 (2004) 282–286.
- [147] P. Sinha, S. Kohl, J. Fischer, G. Hutter, M. Kern, E. Kottgen, M. Dietel, H. Lage, M. Schnolzer, D. Schadendorf, Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis* 21 (2000) 3048–3057.
- [148] R.V. Gopalkrishnan, Z.Z. Su, N.I. Goldstein, P.B. Fisher, Translational infidelity and human cancer: role of the PTI-1 oncogene, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 151–162.
- [149] J.M. Lee, The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (2003) 69.
- [150] P. Joseph, Y.X. Lei, T.M. Ong, Up-regulation of expression of translation factors—A novel molecular mechanism for cadmium carcinogenesis, *Mol. Cell. Biochem.* 255 (2004) 93–101.
- [151] H. Xiao, C. Neuveut, M. Benkirane, K.T. Jeang, Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 δ delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1998) 384–389.
- [152] Y. Kawaguchi, R. Bruni, B. Roizman, Interaction of herpes simplex virus 1 α regulatory protein ICP0 with elongation factor 1 δ : ICP0 affects translational machinery, *J. Virol.* 71 (1997) 1019–1024.
- [153] Y. Kawaguchi, C. Van Sant, B. Roizman, Eukaryotic elongation factor 1 δ is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the U(L)13 gene of herpes simplex virus 1, *J. Virol.* 72 (1998) 1731–1736.
- [154] Y. Kawaguchi, T. Matsumura, B. Roizman, K. Hirai, Cellular elongation factor 1 δ is modified in cells infected with representative α -, β -, or γ herpesviruses, *J. Virol.* 73 (1999) 4456–4460.
- [155] K. Kato, Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Igarashi, A. Yokoyama, G. Matsuda, M. Kanamori, K. Nakajima, Y. Nishimura, M. Shimojima, H.T. Phung, E. Takahashi, K. Hirai, Epstein–Barr virus-encoded protein kinase BGLF4 mediates hyperphosphorylation of cellular elongation factor 1 δ (EF-1 δ): EF-1 δ is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses in mammalian cells, *J. Gen. Virol.* 82 (2001) 1457–1463.
- [156] S.R. Thompson, P. Sarnow, Regulation of host cell translation by viruses and effects on cell function, *Curr. Opin. Microbiol.* 3 (2000) 366–370.
- [157] E. Martinez-Salas, O. Fernandez-Miragall, Picornavirus IRES: structure function relationship, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 3757–3767.
- [158] A.A. Komar, M. Hatzoglou, Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 23425–23428.

L'embryon d'oursin, le point de surveillance de l'ADN endommagé de la division cellulaire et les mécanismes à l'origine de la cancérisation.

Robert Bellé¹, Ronan Le Bouffant, Julia Morales, Bertrand Cosson, Patrick Cormier et Odile Mulner-Lorillon.

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 Mer & Santé; Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR 7150; Equipe Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique, Roscoff, F-29682 France.

(1) Correspondance : Professeur Robert Bellé Station Biologique, place George Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tel: +33 (0) 2 98 29 23 46; fax: +33 (0) 2 98 29 23 06. e-mail: belle@sb-roscoff.fr.

Titre courant : L'embryon d'oursin, modèle d'étude des anomalies du cycle cellulaire

Mots clefs : cycle cellulaire/ point de surveillance /ADN endommagé/ glyphosate/cancérisation

Présenté à la Société de Biologie réunion du 22 Juin 2007

Summary

Sea urchin embryo, DNA-damaged cell cycle checkpoint and the mechanisms at the origin of cancer development.

Cell division is an essential process for heredity, maintenance and evolution of all living kingdom. The sea urchin early development represents an excellent experimental model for the analysis of cell cycle checkpoint mechanisms since embryonic cells contain a functional DNA-damage checkpoint and since the whole sea urchin genome is available. The DNA-damaged checkpoint is responsible for the arrest in the cell cycle when the DNA is damaged or incorrectly replicated, for the activation of DNA repair mechanism, and for commitment to cell death by apoptosis in the case of failure to repair. New insights in cancer biology lead to two fundamental concepts at the very first origin of cancerogenesis. Cancers originate from dysfunction of the DNA-damaged checkpoints and cancers appear as a result of normal stem cell (NCS) transformation into cancer stem cell (CSC). The second one suggests a new definition of "cancer", when CSC can be detected, far before any clinical evidence. Since early development starts from the zygote, the primary stem cell, sea urchin early development allows analysis of the early steps of the cancerization process. Although sea urchins don't develop cancers, the model is alternative and complementary to stem cells which are not of easy isolation, don't divide in a short time and don't divide in synchrony. In the field of toxicology and incidence on human health, the sea urchin experimental model allows assessment of cancer risk of molecules alone or in combination long before any epidemiologic evidence. Sea urchin embryos were used for the testing of the worldwide used pesticide Roundup that contains glyphosate as the active herbicide agent and that was shown to activate the DNA-damage checkpoint of the first cell cycle of

development. The model therefore allows considerable increase in risk evaluation of new products in the field of cancer and offers a tool for the discovery of molecular markers for early diagnostic in cancer biology. Prevention and early diagnostic are two decisive elements of human cancer therapy.

Résumé

La division cellulaire est essentielle pour l'hérédité, le maintien et l'évolution du monde vivant. Lors d'une lésion de l'ADN au cours de la division cellulaire, les « points de surveillance (=checkpoints) de l'ADN endommagé » exécutent les fonctions d'arrêt du cycle, de la réparation de l'ADN et de l'orientation vers la mort cellulaire par apoptose lorsqu'une réparation est impossible. A l'origine des cancers, deux concepts majeurs se renforcent de jour en jour : les cancers s'initient par un dysfonctionnement des points de surveillance de l'ADN endommagé et les cancers naissent de la transformation de cellules souches « normales » en cellules souches « cancéreuses ». Ce dernier concept modifie la définition même des cancers puisqu'il est démontré qu'une cellule souche « cancéreuse » suffit pour générer la tumeur, bien avant les signes cliniques de la maladie.

Le développement précoce de l'oursin représente un excellent modèle expérimental pour appréhender l'analyse du fonctionnement des points de surveillance (checkpoints) du cycle de division et présente l'ensemble des éléments de régulation comme le montrent l'analyse du génome complet et l'existence d'un point de surveillance de l'ADN endommagé tout à fait opérationnel. Le modèle biologique du développement précoce de l'oursin, dont l'œuf constitue une cellule souche par excellence, permet d'aborder l'étude de l'origine de la cancérisation. Dans le domaine de la toxicologie et de l'implication de nouvelles molécules en matière de santé, le modèle peut être utilisé pour prédire le risque de cancer de molécules ou de combinaisons de molécules, bien avant

le moindre signe clinique de la maladie. C'est ainsi que le risque en matière de cancer d'un herbicide d'usage intensif dans le monde, le Roundup^a, dont le glyphosate est l'élément actif, a pu être démontré. Le modèle expérimental de l'embryon d'oursin permet ainsi de progresser considérablement dans la prévention des cancers par la connaissance des produits à risques et d'envisager de nouvelles formes de diagnostic précoce de la maladie par la mise en évidence de marqueurs moléculaires. Prévention et diagnostic précoce sont deux des éléments décisifs de la lutte contre le cancer.

Introduction

Parmi les modèles marins, l'embryon d'oursin est un modèle de choix pour l'étude du cycle cellulaire, de sa régulation et de son dysfonctionnement. L'objet de cette revue est d'exposer les concepts récents en matière de points de surveillance (checkpoints) de la division cellulaire, et de la pathologie essentielle de leur dérégulation dans les mécanismes initiaux conduisant aux cancers. Le modèle biologique de l'embryon d'oursin permet de répondre à des questions fondamentales de la biologie et ouvre des perspectives nouvelles pour comprendre les mécanismes à l'origine des cancers. Il procure des outils moléculaires de prévention des risques et de diagnostic précoce. Les résultats scientifiques étant très abondants dans les différents domaines, nous avons choisi de référencer le texte avec des articles scientifiques de revues, en français s'ils existent, qui relatent les travaux originaux et les connaissances approfondies des fonctionnements des processus biologiques traités. La dernière partie montre l'intérêt du modèle expérimental en matière de toxicologie et de santé humaine, et en particulier les effets et leurs conséquences en matière de santé, de l'herbicide à base de glyphosate, le Roundup, très largement employé dans le monde.

1- La division cellulaire essentielle pour l'hérédité, le maintien et l'évolution du monde vivant.

Une des découvertes biologiques majeures du XIX^e siècle réside dans le fait que les cellules constituent les unités structurales et fonctionnelles de tous les organismes vivants et qu'elles prolifèrent par croissance et division. Il est admis que toutes les cellules du monde vivant actuel ont pour origine une cellule ancestrale, apparue il y a environ 0,9 milliard d'années, qui a conduit par un continuum de divisions cellulaires aux organismes actuels dont l'homme (Cavalier-Smith, 2006). L'unité cellulaire du vivant, « *ex ovo omnia* », (fig.1) sert de

fondement conceptuel à la théorie de Darwin de l'évolution et est la base des grandes découvertes de la biologie cellulaire et de l'embryologie du XX^e siècle. La division cellulaire est un processus biologique universel aussi ancien que l'existence des cellules et probablement le mieux conservé au cours de l'évolution. Ainsi, la division cellulaire, qui à chaque cycle de division d'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles, se perpétue depuis la cellule ancestrale (fig.1). Elle permet à partir d'une cellule unique, l'œuf, de former les dix mille milliards de cellules qui constituent un être vivant tel que l'homme (Nasmyth, 2001). Parmi les cellules des organismes parents, les cellules germinales, spermatozoïdes et ovocytes, fusionnent pour la continuité de l'espèce (fig.1). Dans l'organisme humain adulte, un milliard de cellules sont renouvelées quotidiennement par autant de divisions cellulaires pour maintenir l'intégrité de l'individu (Meijer, 2003).

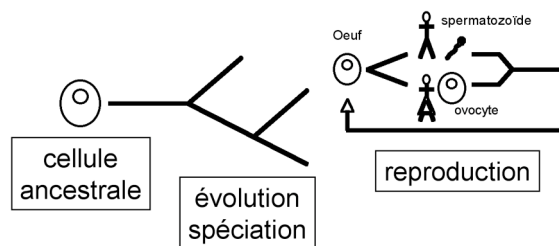


Figure 1. *Ex ovo omnia*, toute cellule actuelle provient d'une cellule ancestrale.

La division cellulaire permet ainsi la croissance, le développement et le maintien de tous les organismes vivants. Cependant, elle est aussi la source de pathologies graves, dont les cancers, deuxième cause de mortalité dans les populations des pays développés (Kanavos, 2006). Les grandes avancées de la génétique, de la biologie cellulaire, de la biochimie, de la biologie moléculaire et plus récemment de la génomique permettent d'appréhender les mécanismes de la division cellulaire en termes de gènes, de protéines codées par ces gènes, de fonctions cellulaires complexes et de réseaux de régulations dans lesquels les protéines kinases/protéines phosphatases jouent un rôle prépondérant (Alberts *et al.*, 2002). L'étude de ces mécanismes, dont nous ne sommes qu'à l'aube de leur compréhension, est essentielle à notre entendement du monde vivant et à l'analyse de l'influence de l'environnement sur celui-ci. Elle est aussi nécessaire pour la mise en œuvre de stratégies de prévention et de thérapie

pour empêcher ou traiter les pathologies issues des dérèglements des processus biologiques.

2- Le cycle cellulaire et les points de surveillance du cycle (=checkpoints).

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne naissance à deux cellules filles, identiques entre elles et à la cellule mère dont elles dérivent. La réplication des chromosomes (phase S) et leur ségrégation dans chacune des cellules filles (phase M) constituent les deux événements clés du cycle cellulaire. Ces phases, S (synthèse de l'ADN) et M (mitose), sont séparées par des phases G (gap) : G1 qui précède la phase S et G2 qui prépare la phase M. Les cellules quiescentes, en phase G0, entrent dans un cycle cellulaire sous l'action de facteurs mitogènes. La découverte des concepts fondamentaux de fonctionnement du cycle cellulaire, concrétisée par l'attribution du prix Nobel de physiologie et médecine en 2001 est exemplaire et issue des différentes approches cellulaires et génétiques de l'étude du cycle (Nasmyth, 2001). Le prix Nobel a récompensé Lee Hartwell, pionnier de l'approche génétique chez la levure, Paul Nurse, découvreur du gène *cdc2* (cell cycle control 2) de la transition G2-M du cycle chez la levure de fission et Timothy Hunt pour la découverte de la protéine régulatrice de *cdc2*, la cycline, au cours des divisions précoces embryonnaires chez la palourde et l'oursin (Nasmyth, 2001). Par l'utilisation de quelques modèles biologiques de choix, tels que les levures, les embryons d'oursins, les ovocytes d'étoile de mer et de xénope, ou les cellules de mammifères en culture, les mécanismes moléculaires de l'orchestration du cycle cellulaire par la famille des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDKs, cyclin dependent kinases) ont été élucidés. Ces protéines kinases jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle. Elles sont constituées d'une sous unité catalytique, la kinase, associée à une sous unité régulatrice, la cycline, et s'activent séquentiellement pour assurer le bon déroulement du cycle. Les détails de leur activité et de leur activation ont fait l'objet de nombreuses revues (Nasmyth, 2001; Meijer, 2003; Nurse, 2000; Murray, 2004). Le complexe CDK1 (initialement dénommé *cdc2*) associé à la cycline B, s'active pour assurer la transition G2-M du cycle cellulaire, et représente l'archétype des CDKs. Dès la découverte de CDK1, le concept de point de contrôle du cycle (checkpoint) a émergé, comme le mécanisme permettant aux cellules de ne s'engager dans la phase suivante

du cycle que lorsque la précédente est correctement exécutée. Rapidement, le concept s'est affiné en « points de surveillance » du cycle cellulaire dans lesquels s'intègrent non seulement les éléments effecteurs sur le cycle (CDKs), mais aussi les éléments de détection des anomalies, de la transduction du signal et des effecteurs comme les éléments de réparation des erreurs de division ou l'engagement des cellules vers l'apoptose, la mort programmée des cellules (fig. 2). Il est à noter cependant que plusieurs auteurs restreignent le point de surveillance au mécanisme de l'arrêt du cycle cellulaire. Nous privilégions le concept qui englobe l'ensemble des voies de signalisation entre le stress initial et les différents acteurs, dont les mécanismes de détection des erreurs, de leur médiation vers les voies de transduction qui activent les différents effecteurs des processus biologiques concernés (fig.2).

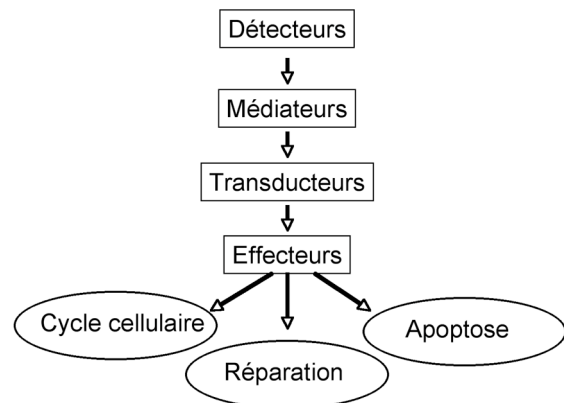


Figure 2. Les étapes schématisées des voies des points de surveillance du cycle cellulaire.

Les effecteurs des CDKs assurent le bon déroulement du cycle alors que l'ensemble des constituants des points de surveillance est mobilisé en cas d'erreurs, soit dans les phases de duplication des chromosomes (ADN non répliqué ou endommagé), soit au moment de leur ségrégation (points de surveillance du fuseau de division). Les cellules étant soumises en permanence à des agents lésant l'ADN, tels que les radiations ionisantes ou des molécules issues du métabolisme cellulaire lui-même, et la réplication à chaque cycle de division des trois milliards de bases que constitue le génome humain ne s'effectuant pas sans erreurs inhérentes à tout processus biologique, les points de surveillance sont les mécanismes fondamentaux du maintien de l'intégrité du génome. A ce jour, plus de cent acteurs protéiques des points de surveillance du cycle cellulaire sont identifiés et font l'objet de nombreuses publications. Les acteurs et

mécanismes des points de surveillance de l'ADN endommagé ou non répliqué sont les plus documentés (Kastan & Bartek, 2004; Sancar *et al.*, 2004), non seulement pour leur rôle biologique fondamental, mais aussi pour leur rôle dans la genèse de pathologies comme les cancers (Kastan & Bartek, 2004; Hartwell & Kastan, 1994). La figure 3 présente les acteurs moléculaires identifiés des points de surveillance de l'ADN endommagé, classés selon leur fonction et les cibles terminales dans le déroulement du cycle cellulaire. La mobilisation des points de surveillance de l'ADN endommagé provoque un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire et active la machinerie très sophistiquée de réparation de l'ADN (Sancar *et al.*, 2004; Wang & Cho, 2004; Houtgraaf *et al.*, 2006; Lisby & Rothstein, 2004). Les mécanismes de la réparation sont multiples et dépendent du type de l'endommagement (Sancar *et al.*, 2004). Lorsque la réparation est effective, l'inhibition de la progression dans le cycle cellulaire est levée. Lorsque la réparation échoue, par excès de dommages ou défaut génétique de la machinerie de réparation, l'arrêt du cycle peut être permanent et conduire à la sénescence, l'apoptose ou la cancérisation (Kastan & Bartek, 2004; Schultz *et al.*, 2000; Massague, 2004; Liu *et al.*, 2003).

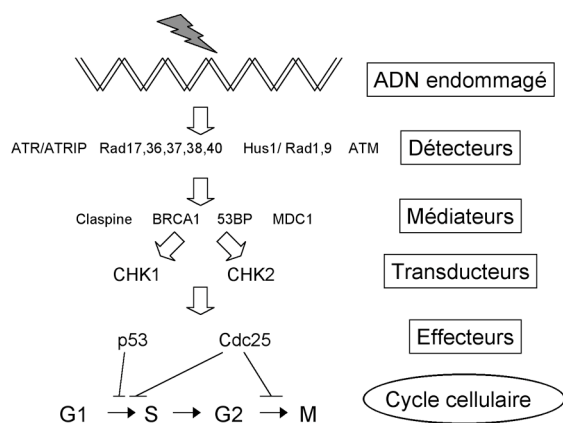


Figure 3. Les composants du point de surveillance de l'ADN endommagé et les phases d'inhibition du cycle cellulaire (d'après Sancar *et al.*, Annu. Rev. Biochem, 2004).

L'apoptose, la mort programmée des cellules, permet l'élimination de la très grande majorité des cellules dont l'ADN est endommagé et non réparé (Norbury & Zivotovsky, 2004). Ainsi, lorsque le point de surveillance de l'ADN endommagé est mobilisé, les protéines kinases ATM/ATR orchestrent la réponse (voir fig. 3). Elles inhibent la progression du cycle cellulaire

par une voie de phosphorylation impliquant les protéines kinases Chk1/Chk2, engagent la réparation par les protéines RPA, BRCA1 et la phosphorylation de H2AX et activent la voie apoptotique des caspases par l'intermédiaire de la protéine p53 (Nyberg *et al.*, 2002). L'acquisition par les cellules de la résistance à l'apoptose favorise l'instabilité génétique et ses conséquences au cours du processus de la cancérisation (Kastan & Bartek, 2004; Sawyers, 2004).

La découverte des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, gènes cellulaires dont la surexpression ou une altération génétique favorise ou même, comme dans le cas de c-myc est suffisante pour conduire au cancer, a fourni une base au concept de l'origine génétique du cancer dans les dernières décennies. La relation entre les oncogènes et les mécanismes de la surveillance du cycle cellulaire, soit parce que les oncogènes sont des éléments des points de surveillance, soit parce qu'ils agissent sur ceux-ci par des voies de signalisation cellulaire, mène au nouveau concept de l'instabilité génétique des cellules permettant le processus de la cancérisation (Blanchard, 2003).

3- Points de surveillance et cellules souches à l'origine des cancers.

Deux concepts fondamentaux ont progressivement émergé au cours des deux dernières décennies. Le premier est le rôle des points de surveillance du cycle cellulaire à l'origine des cancers, et le deuxième plus récent, est que les cancers ont pour origine des cellules souches.

Bien que l'aneuploïdie, une mauvaise répartition des chromosomes, caractérise beaucoup de cellules tumorales et résulte du dysfonctionnement du point de surveillance du fuseau mitotique, il paraît de plus en plus évident que l'aneuploïdie est la conséquence de la cancérisation plutôt que son origine (Malmanche *et al.*, 2006; Lopes & Sunkel, 2003; Kops *et al.*, 2005). En revanche (fig. 4), l'implication des points de surveillance de l'ADN endommagé ou non correctement répliqué est généralement reconnue comme la source initiale de la cancérisation (Kastan & Bartek, 2004; Massague, 2004). La genèse d'un cancer nécessite 6 à 8 mutations qui confèrent aux cellules cancéreuses leur propriétés : l'instabilité génétique, l'échappement au contrôle par les facteurs externes, l'induction de l'angiogenèse et la propriété de migration pour former les métastases. Les points de surveillance de l'ADN endommagé ou incorrectement répliqué assurent le maintien de l'intégrité du génome. Ainsi, les

cellules qui échappent au contrôle des points de surveillance, soit parce qu'un mécanisme de surveillance est affecté par l'erreur de division, soit parce que l'ADN n'a pas été correctement réparé, acquièrent l'instabilité génétique qui permet par un processus de sélection de conduire aux tumeurs et aux cancers (Kastan & Bartek, 2004; Massague, 2004). Au cours de cette sélection, elles acquièrent la possibilité d'échapper à l'apoptose (fig. 4). Trois à quatre décennies peuvent s'écouler entre le stress initial et les signes cliniques de cancers, à l'exception de cancers à évolution rapide pour lesquels un ou plusieurs éléments de la machinerie des points de surveillance est génétiquement affecté. Par exemple, dans le cas du rétinoblastome, la protéine Rb est génétiquement affectée et provoque une tumeur hautement maligne de la rétine chez le nourrisson et l'enfant. La protéine Rb est l'un des effecteurs du point de surveillance de la transition G1/S (Wang *et al.*, 2001). Puisque 80 % des cancers sont considérés de source non génétique, c'est-à-dire sans prédisposition génétique initiale (Kanavos, 2006), les mécanismes endogènes ou environnementaux qui lèsent l'ADN génèrent les mutations nouvelles qui rendent les points de surveillance inefficaces et induisent l'instabilité génétique transmissible aux cellules filles.

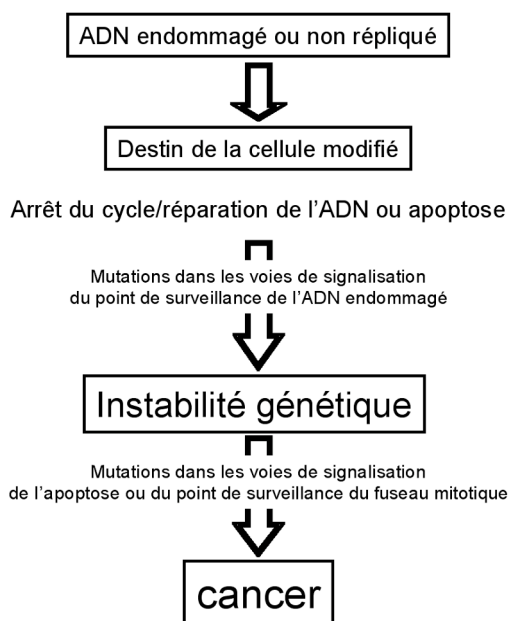


Figure 4. Schéma général de la réponse à l'ADN endommagé ou non répliqué sur la destinée de la cellule. Les cellules réparent leur ADN ou s'orientent vers l'apoptose. Les cellules acquièrent l'instabilité génétique par les dommages dans les voies de signalisation des points de surveillance. Celles qui échappent au contrôle de l'apoptose par de nouveaux

dommages génèrent le cancer (d'après Kastan et Bartek, nature, 2004).

L'origine du cancer au niveau des cellules souches constitue le deuxième concept émergeant depuis quelques années (fig. 5).

Relations cellules souches et cancer.

Cellules souches cancéreuses	Tumeur correspondante
Hématopoïétiques	Leucémies
Neurales	Tumeurs du cerveau
Endocriniennes bronchiales	Cancer bronchique à petites cellules (SCLC)
Epithéliales bronchiques	Cancer bronchique
Epithéliales mammaires	Cancer du sein
Hépatiques ovales	Hépatoblastome
Epithéliales ovariennes	Cancer de l'ovaire
Epithélium cervicales	Cancer du col utérin
Epithéliales des tubules rénaux*	Néphroblastome (tumeur de Willms)
Epithéliales de la rétine*	Rétinoblastome
Neuroectodermiques*	Neuroblastome
Musculaires satellites squelettiques*	Rhabdomyosarcome
Très petites cellules de type embryonnaire (VSEL)*	Tératocarcinome

*tumeurs pouvant avoir pour origine les très petites cellules de type embryonnaire.

Figure 5. Relations entre les cellules souches identifiées et des cancers avérés (d'après Ratajczak *et al.*, 2006).

Ainsi, les cellules souches sont à l'origine de cancers (fig. 5). Lors des anomalies de leurs divisions ou lorsqu'elles sont affectées au niveau de leur ADN, soit par le métabolisme naturel, soit par les agents carcinogènes, elles acquièrent l'instabilité génétique. Elles sont alors des cellules pré-cancéreuses et se transforment progressivement par un mécanisme de sélection, en cellules souches cancéreuses qui génèrent alors le(s) cancer(s). A partir de l'oeuf, l'embryon est constitué de cellules souches totipotentes, capables de se différencier en tous les tissus d'un organisme, qui deviennent progressivement multipotentes aptes à se différencier en un ou quelques types cellulaires (fig. 6 ; gauche). Les cellules souches normales sont multipotentes indifférenciées et capables de se renouveler indéfiniment, elles sont retrouvées dans la plupart des tissus humains et en assurent le maintien (Reya *et al.*, 2001; Sell, 2004; Pardal *et al.*, 2003) grâce à leur propriété d'auto renouvellement (fig. 6; gauche). Elles sont alors des cellules souches adultes progénitrices des différentes cellules des tissus différenciés (fig. 6). Dans un nombre croissant de cancers, des cellules souches dites « cancéreuses » sont découvertes et caractérisées, renforçant le concept que les cancers prennent naissance dans les cellules souches (Sell, 2004; Pardal *et al.*, 2003; Ratajczak *et al.*, 2006; Beachy *et al.*, 2004). Les tumeurs se développent et sont entretenues par l'auto renouvellement des cellules souches cancéreuses qu'elles contiennent (fig. 6; droite). De nombreuses données expérimentales récentes, dont des exemples sont illustrés la figure 5, viennent renforcer le concept des cellules souches cancéreuses à l'origine de nombreux cancers. Cependant, il n'est pas exclu qu'un

cancer puisse aussi être généré à partir de la dédifférenciation de cellules tissulaires ou progénitrices (fig. 6 droite). Les propriétés de migration des cellules souches cancéreuses expliquent les métastases et le développement des tumeurs secondaires (Sell, 2004; Pardal *et al.*, 2003; Ratajczak *et al.*, 2006; Beachy *et al.*, 2004).

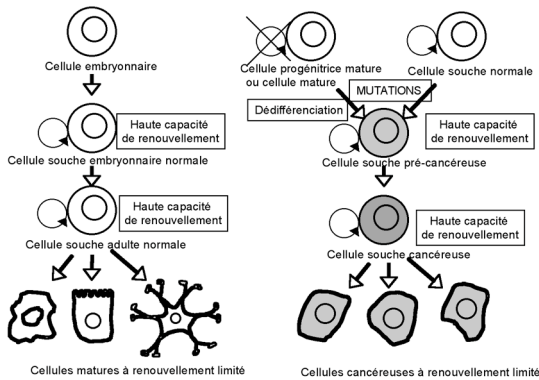


Figure 6. Les cellules souches à l'origine des cancers. Gauche : Les cellules souches embryonnaires donnent naissance aux cellules souches progénitrices qui assurent le renouvellement tissulaire en se différenciant en cellules matures. Droite: par mutations, en particulier par endommagement de l'ADN, les cellules souches normales donnent naissance aux cellules souches précancéreuses puis par évolution clonale aux cellules souches cancéreuses. Les dernières forment les tumeurs et assurent leur renouvellement (d'après Pardal *et al.*, Nature reviews, 2003). Il n'est pas exclu que des cellules matures à faible taux de renouvellement puissent se dédifférencier pour donner des cellules souches précancéreuses.

Ces concepts ont deux implications importantes. D'une part, dans la définition même du « cancer », terme jusqu'alors utilisé lorsque les signes cliniques apparaissent, et qu'il faut maintenant reconsidérer dans la mesure où, les cellules souches elles-mêmes sont « cancéreuses » dès lors qu'elles ont acquis les propriétés pour générer un cancer. D'autre part, ces concepts changent radicalement les perspectives thérapeutiques, non seulement pour la prévention, car tout agent qui agit sur l'un des mécanismes des points de surveillance est potentiellement cancérogène, mais aussi pour la détection précoce de cancers pour laquelle la détection des cellules souches cancéreuses serait un excellent critère, et enfin pour les stratégies de traitement qui doivent s'orienter vers l'élimination ciblée de ces cellules souches cancéreuses (Sell, 2004; Pardal *et al.*, 2003; Ratajczak *et al.*, 2006; Beachy *et al.*, 2004).

4- L'oursin, un modèle biologique de choix pour étudier les relations entre les éléments des points de surveillance de l'ADN endommagé.

La complémentarité des approches, génétiques chez les levures, biochimiques et cellulaires dans des extraits ovocytaires ou embryonnaires précoces (xénope, oursin, étoile de mer, palourde), a permis l'explosion rapide des connaissances dans le domaine des acteurs du cycle cellulaire et de leur régulation (cf. partie 2). Parmi les modèles biologiques de choix, les ovocytes des invertébrés marins se sont révélés pertinents pour aboutir aux concepts actuels de la régulation du cycle cellulaire (Nurse, 2000; Dorée, 2003). L'abondance du matériel biologique et la disponibilité d'ovocytes et de gamètes arrêtés physiologiquement à des stades précis, et pouvant poursuivre le cycle cellulaire de façon synchrone par stimulation naturelle, constituent les raisons majeures de la pertinence des modèles ovocytaires. La fécondation provoque de manière naturelle l'entrée des gamètes dans le cycle cellulaire et des divisions synchrones des cellules sans qu'il soit nécessaire d'y adjoindre des drogues ou des facteurs de croissance. Le fait que les gamètes d'oursin aient achevé leur méiose avant la fécondation et soient arrêtés en phase G1 du cycle cellulaire (fig. 7) confère au modèle un avantage particulier par rapport aux autres métazoaires dont les gamètes sont arrêtés en métaphase de la seconde division méiotique. La fécondation de l'oursin (fig. 7) permet l'analyse des voies biochimiques de régulation du cycle cellulaire sans interférence avec les mécanismes d'achèvement de la méiose comme c'est le cas dans les modèles alternatifs des embryons, dont le xénope ou la souris (Gilbert, 2003).

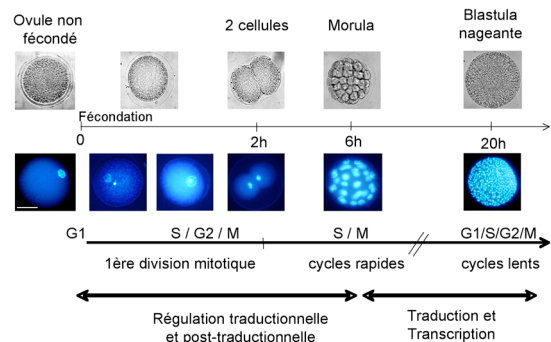


Figure 7. Le développement précoce de l'oursin.

L'obtention récente du génome complet de *Strongylocentrotus purpuratus* (Sodergren *et al.*, 2006) montre que l'oursin possède les gènes orthologues impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, dans les points de surveillance, la réparation de l'ADN endommagé et l'apoptose (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2006). La disponibilité du génome complet

donne accès aux approches de génomique fonctionnelle facilitant les études des mécanismes moléculaires du cycle cellulaire et des voies reliant la détection, la transduction et les effecteurs des points de surveillance, en particulier des points de surveillance de l'ADN endommagé.

L'œuf étant la cellule souche par excellence qui conduit à un organisme complet (Sell, 2004), le développement précoce de l'oursin (fig. 7) offre un modèle de choix pour comprendre les premières étapes de la transformation de la cellule souche en cellule souche « cancéreuse ». Les divisions précoces offrent l'avantage d'être rapides. La première division est complète en 2 heures avec les transitions G1-S et G2-M. Les 4 ou 5 divisions suivantes sont rapides avec une succession des phases S et M puis plus lentes avec l'apparition des phases G1 et G2. Les premières divisions jusqu'au stade morula obtenu en 6 heures sont régulées par des modifications traductionnelles et post-traductionnelles sans nécessité de nouvelles transcriptions. Le stade d'une blastula nageante est observé à 20 heures et poursuit le développement jusqu'au stade adulte (Glibert, 2003). Les embryons sont observés au microscope et la coloration de l'ADN permet de suivre par fluorescence l'évolution nucléaire, d'abord de la tête du spermatozoïde et du noyau de l'ovule puis des cycles de division nucléaire (Marc *et al.*, 2002 ; fig. 7). Bien évidemment, et puisque les oursins ne développent pas de cancers, le modèle complète celui constitué par les cellules souches humaines, le plus approprié mais dont l'isolement est difficile du fait de leurs présences en très faible quantité, et dont les divisions sont longues et naturellement asynchrones (Sell, 2004), même si il est possible de les obtenir à partir de cellules différenciées (Egli *et al.*, 2007). Dans le modèle de l'oursin, la régulation du cycle cellulaire est bien documentée, en revanche, les acteurs des points de surveillance n'en sont qu'à leur premières caractérisations fonctionnelles. L'existence même de points de surveillance était controversée. Les premières évidences de leur existence dans les cellules embryonnaires précoces proviennent des expériences montrant l'inhibition du premier cycle cellulaire par une action inhibitrice de l'activation de CDK1/ cycline B ayant pour effet un blocage de la transition G2 -M du cycle (Marc *et al.*, 2002). Cet effet a été obtenu sous l'action d'un pesticide d'usage courant (voir partie 5). La voie de transduction passant par la protéine phosphatase CDC25 pour empêcher l'activation de CDK1/ cycline B, s'est révélée fonctionnelle (Marc *et al.*, 2004a). Par l'utilisation d'agents

lésant l'ADN, la fonctionnalité du point de surveillance G2 -M en réponse à l'endommagement de l'ADN a été établie (Le Bouffant *et al.*, 2006, 2007, fig. 8). Et récemment, par l'utilisation de génotoxiques, la fonctionnalité de la voie apoptotique a été démontrée ainsi que celle de la réparation de l'ADN (Le Bouffant *et al.*, 2007, fig. 8). Ainsi le modèle oursin permet l'étude fonctionnelle de l'ensemble des voies de signalisation du point de surveillance de l'ADN endommagé. Cette étude est d'autant plus prometteuse que des extraits *in vitro* reproduisant des événements observés *in vivo* à différentes phases du cycle et/ou de l'activation des points de surveillance peuvent être préparés et ont été expérimentalement probants pour des études antérieures du cycle cellulaire. Des extraits interphasiques ont permis l'analyse de la re-formation du noyau (Collas, 2000), de la synthèse d'ADN en phases G1 et S (Zhang & Ruderman, 1993), des événements de la phase M (Collas, 1998). Les études fonctionnelles dans de tels extraits sont réalisables par des expériences de déplétion/complémentation de protéines, facilitées par la connaissance du génome complet, et par addition d'effecteurs spécifiques des voies de signalisation.

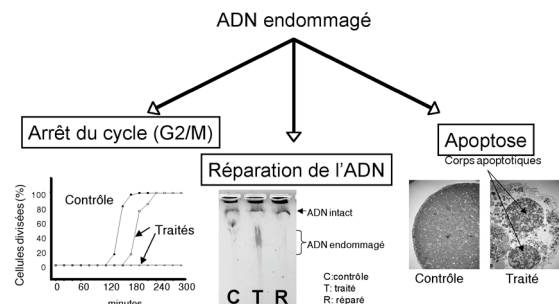


Figure 8. Le point de surveillance de l'ADN endommagé fonctionnel dans les embryons d'oursin (d'après Le Bouffant *et al.*, CMLS, 2007)

Le modèle des embryons précoces d'oursin devrait permettre l'étude fonctionnelle des voies de signalisation du point de surveillance de l'ADN endommagé, et de son dérèglement pouvant conduire aux propriétés des cellules souches « cancéreuses ». Ces recherches sont complémentaires des approches génétiques, et nous postulons que cette convergence d'approches sera aussi fructueuse que celle qui a permis l'identification et la caractérisation fonctionnelle des acteurs du cycle cellulaire (Nasmyth, 2001).

5- Le modèle de l'embryon d'oursin et la toxicité du Roundup

Un des challenges majeurs de la toxicologie est la détermination des risques en matière de santé d'une exposition à un ou plusieurs produits apparemment sans conséquence immédiate (de Rosa *et al.*, 2004). En particulier, la question se pose pour l'emploi de pesticides (Barr *et al.*, 1999) dont certains, comme le Roundup sont utilisés à très grande échelle dans le monde dans des applications domestiques, de services ou agricoles. L'emploi du Roundup s'intensifie du fait du développement mondial des organismes génétiquement modifiés (OGM) rendus tolérants au Roundup (Blackburn & Boutin, 2003). Depuis les premières mises sur le marché du Roundup en 1975, les risques sur l'environnement et la santé publique étaient considérés comme négligeables (Williams *et al.*, 2000).

Le Roundup contient le glyphosate, molécule active comme désherbant, associé à des produits de formulation jouant le rôle de surfactants et de perméabilisants (Williams *et al.*, 2000). Lors de l'exposition d'embryons d'oursin à différents cocktails de pesticides, le Roundup, d'usage courant et disponible aisément dans les commerces, a été choisi initialement comme contrôle non toxique pour sa réputation de sécurité, largement entretenue par les campagnes de publicité. De façon inattendue, le Roundup s'est révélé agir sur le déroulement de la division cellulaire, à des doses bien inférieures (500 à 2500 fois) à celles recommandées par le fabricant en usage herbicide (Marc *et al.*, 2002 ; 2003 ; 2004a ; 2004b). L'analyse de l'action du produit sur la première division de l'embryon d'oursin montre que le Roundup inhibe l'activation du complexe CDK1/ cycline B, complexe protéique terminal du point de surveillance de l'ADN endommagé (cf. partie 3). L'effet du Roundup s'explique par son contenu en glyphosate et nécessite la présence de produits de formulation qui permettent son entrée dans les cellules (Marc *et al.*, 2002). La connaissance de l'universalité des mécanismes des points de surveillance du cycle cellulaire a permis de suggérer qu'il pouvait y avoir un risque en santé humaine (Marc *et al.*, 2002) et a justifié l'alerte des autorités de tutelles en 2002. L'effet est analogue pour différentes formulations contenant le glyphosate (Marc *et al.*, 2004b). Le pesticide affecte la synthèse de l'ADN et aboutit à l'inhibition de l'activation de CDK1/ cycline B par la voie de transduction impliquant la protéine phosphatase CDC25 (Marc *et al.*, 2004a).

La toxicité du Roundup a aussi été démontrée au niveau de la transcription dans le modèle de l'oursin (Marc *et al.*, 2005), au niveau d'enzymes du métabolisme des hormones stéroïdes dans des modèles cellulaires humains (Richard *et al.*, 2005) y compris des cellules embryonnaires en culture (Benachour *et al.*, 2007), et dans des écosystèmes reconstitués (Relyea, 2005). Des effets sur le cycle cellulaire et le point de surveillance de l'ADN endommagé ont été démontrés dans un modèle *in vivo* de poissons (Cavas & Konen, 2007). Le Roundup est toxique sur des cultures de cellules de kératinocytes humaines (Gehin *et al.*, 2006) probablement en relation avec le point de surveillance de l'ADN endommagé. Le Roundup est déversé massivement par voie aérienne sur des cultures en Amérique du Sud (Solomon *et al.*, 2007), touchant avec évidence l'ADN et le point de surveillance de l'ADN endommagé chez l'homme (Paz-y-Mino *et al.*, 2004).

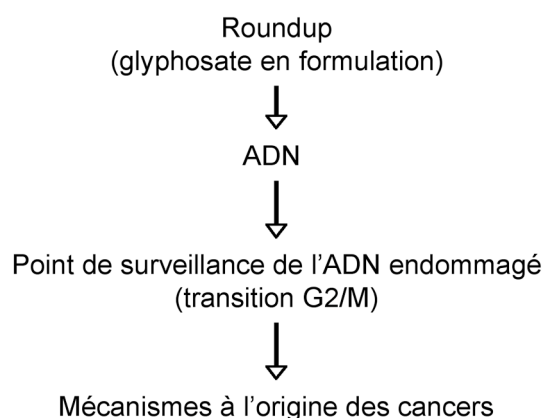


Figure 9. Représentation schématique des effets du Roundup, herbicide à base de glyphosate, sur l'ADN, le point de surveillance de l'ADN endommagé et par voie de conséquence sur les mécanismes à l'origine des cancers (cf. texte).

Avec l'accumulation des évidences expérimentales liant l'origine des cancers avec l'acquisition de l'instabilité génétique des cellules qui échappent au point de surveillance du cycle cellulaire et affectent des cellules souches (cf. partie 3), les résultats obtenus sur le modèle pertinent du développement précoce de l'oursin (cf. partie 4) sont révélateurs de conséquences en matière de santé humaine. En prenant en compte la définition émergente du cancer, dès le début de la tumorigenèse (cf. partie 3), le Roundup est incontestablement un agent cancérigène (fig. 9). Lorsqu'elles seront possibles, les études épidémiologiques permettront d'estimer l'incidence du produit sur les différents types de cancers, en particulier les cancers des

voies respiratoires puisque le produit pulvérisé contient la formulation à des concentrations très supérieures à celles qui activent le point de surveillance de l'ADN endommagé.

Le modèle biologique de l'embryon d'oursin permet d'évaluer les risques de toxicologie à long terme en matière de cancer. Il peut donc être à la base d'une méthode cellulaire et moléculaire fiable de la mesure du potentiel cancérogène de substances ou de combinaisons de substances, un problème majeur de la toxicologie actuelle, fournissant une évaluation beaucoup plus précoce que les études épidémiologiques qui ne peuvent s'effectuer qu'a posteriori (Marc *et al.*, 2003). Dans une perspective d'application à grande échelle, la mise au point d'extraits acellulaires mimant *in vitro* le point de surveillance de l'ADN endommagé, parfaitement réalisables à partir des embryons, sera d'un intérêt majeur (Marc *et al.*, 2003).

Conclusions

Après un apport important du modèle du développement précoce de l'oursin dans les connaissances et concepts du cycle cellulaire et de sa régulation, le modèle apparaît prometteur pour l'étude des voies biochimiques des points de surveillance (checkpoint) dont celui de l'ADN endommagé. Il permet d'étudier les mécanismes de détection de l'ADN lésé, leur transduction jusqu'aux effecteurs du cycle cellulaire, de la réparation et de l'apoptose. Les perspectives importantes se situent dans la compréhension des mécanismes initiaux de la cancérisation, de la prévention et du diagnostic précoce de la maladie. Le modèle offre également la perspective de criblage à haut débit et surtout en temps très court de produits à potentiel cancérogène, bien avant les signes cliniques de la maladie, et ceci, avant même le développement et l'utilisation industrielle de ces produits.

Remerciements

La revue est référencée par une sélection d'articles scientifiques de revue publiés dans les journaux à comité de lecture. Nous nous excusons de ne pouvoir citer l'ensemble considérable des travaux sur les différents aspects traités, qui peuvent cependant être retrouvés dans les références citées.

Les travaux de l'équipe ont été soutenus par les financements des tutelles (CNRS et l'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 de la Station Biologique de Roscoff, ainsi que France Le Rue pour ses commentaires et suggestions. L'article est dédié à Stéphanie.

Bibliographie

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). "Molecular Biology of the Cell." Garland Science, New York and London. 4th edition,
- Barr, D. B., Barr, J. R., Driskell, W. J., Hill, R. H., Jr., Ashley, D. L., Needham, L. L., Head, S. L., & Sampson, E. J. (1999). Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides. *Toxicol Ind Health* **15**, 168-79.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., & Berman, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**, 324-31.
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., & Seralini, G. E. (2007). Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells. *Arch Environ Contam Toxicol. Sous presse*
- Bharadwaj, R., & Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016-27.
- Blackburn, L. G., & Boutin, C. (2003). Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup). *Ecotoxicology* **12**, 271-85.
- Blanchard, J. M. (2003). [Oncogenes and mitotic regulators: a change in perspective of our view of neoplastic processes]. *Med Sci (Paris)* **19**, 187-99.
- Cavalier-Smith, T. (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 969-1006.
- Cavas, T., & Konen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis. Sous presse*.
- Collas, P. (1998). Nuclear envelope disassembly in mitotic extract requires functional nuclear pores and a nuclear lamina. *J Cell Sci* **111 (Pt 9)**, 1293-303.
- Collas, P. (2000). Formation of the sea urchin male pronucleus in cell-free extracts. *Mol Reprod Dev* **56**, 265-70.
- De Rosa, C. T., El-Masri, H. A., Pohl, H., Cibulas, W., & Mumtaz, M. M. (2004). Implications of chemical mixtures in public health practice. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **7**, 339-50.
- De Rosa, C. T., Nickle, R., Faroon, O., & Jones, D. E. (2003). The impact of toxicology on public health policy and service: an update. *Toxicol Ind Health* **19**, 115-24.
- Deng, C. X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* **34**, 1416-26.
- Doree, M. (2003). [Triggering cell mitosis in higher eukaryotes]. *Med Sci (Paris)* **19**, 299-307.
- Egli, D., Rosains, J., Birkhoff, G., & Eggan, K. (2007). Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. **447**, 679-685.
- Fernandez-Guerra, A., Aze, A., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Cormier, P., Bradham, C., Adams, N., Robertson, A. J., Marzluff, W. F., Coffman, J. A., & Genevieve, A. M. (2006). The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Dev Biol* **300**, 238-51.
- Gehin, A., Guyon, C., & Nicod, L. (2006). Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22**, 27-34.
- Gilbert, S. F. (2003). "Developmental biology." Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 7th edition.
- Hartwell, L. H., & Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-8.
- Houtgraaf, J. H., Versmissen, J., & van der Giessen, W. J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* **7**, 165-72.
- J Burkert, N. W., MR Alison., (2006). Stem cells and cancer: an intimate relationship. *The Journal of Pathology* **209**, 287-297.

- Kanavos, P. (2006). The rising burden of cancer in the developing world. *Ann Oncol* **17 Suppl 8**, viii15-viii23.
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-23.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773-85.
- Le Bouffant, R., Cormier, P., Cuff, A., Belle, R., & Mulner-Lorillon, O. (2007). Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Cell Mol Life Sci. Sous presse*
- 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.
- Lisby, M., & Rothstein, R. (2004). DNA repair: keeping it together. *Curr Biol* **14**, R994-6.
- Liu, S. T., van Deursen, J. M., & Yen, T. J. (2003). The role of mitotic checkpoint in maintaining genomic stability. *Curr Top Dev Biol* **58**, 27-51.
- Lopes, C. S., & Sunkel, C. E. (2003). The spindle checkpoint: from normal cell division to tumorigenesis. *Arch Med Res* **34**, 155-65.
- Malmanche, N., Maia, A., & Sunkel, C. E. (2006). The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* **580**, 2888-95.
- Marc, J., Belle, R., Morales, J., Cormier, P., & Mulner-Lorillon, O. (2004a). Formulated Glyphosate Activates the DNA-Response Checkpoint of the Cell Cycle Leading to the Prevention of G2/M Transition. *Toxicol Sci* **82**, 436-442.
- Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Belle, R., & Mulner-Lorillon, O. (2005). A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicol Appl Pharmacol* **203**, 1-8.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., & Belle, R. (2004b). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell* **96**, 245-249.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., & Belle, R. (2002). Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. *Chem Res Toxicol* **15**, 326-331.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G., & Belle, R. (2003). Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environnemental Chemistry Letters* **1**, 8-12.
- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.
- Meijer, I. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* **5**, 311-326.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-34.
- Nasmyth, K. (2001). A prize for proliferation. *Cell* **107**, 689-701.
- Norbury, C. J., & Zivnotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**, 2797-808.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100**, 71-8.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., & Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**, 617-56.
- Osada, H., & Takahashi, T. (2002). Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**, 7421-34.
- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 895-902.
- Paz-y-Mino, C., Arevalo, M., Sanchez, M. E., & Leone, P. E. (2004). Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutat Res* **562**, 77-89.
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Dobrowolska, H., Wanzeck, J., Reza, R., & Ratajczak, J. (2006). Emerging concept of cancer as a stem cell disorder. *Central European Journal of Biology* **1**, 73-87.
- Relyea, R. A. (2005). The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol* **48**, 351-7.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., & Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* **113**, 716-20.
- Robertson, A. J., Croce, J., Carbonneau, S., Voronina, E., Miranda, E., McClay, D. R., & Coffman, J. A. (2006). The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **300**, 321-34.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39-85.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature* **432**, 294-7.
- Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., DiTullio, R. A., Jr., Stavridi, E. S., & Halazonetis, T. D. (2000). The DNA damage checkpoint and human cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 489-98.
- Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **51**, 1-28.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Belle, R., Cormier, P., Cosson, B., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., & al., e. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**, 941-52.
- Solomon, K. R., Anadon, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A. L., Marshall, J., & Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Rev Environ Contam Toxicol* **190**, 43-125.
- Taylor, S. S., Scott, M. L., & Holland, A. J. (2004). The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res* **12**, 599-616.
- Wang, J. Y., & Cho, S. K. (2004). Coordination of repair, checkpoint, and cell death responses to DNA damage. *Adv Protein Chem* **69**, 101-35.
- Wang, J. Y., Naderi, S., & Chen, T. T. (2001). Role of retinoblastoma tumor suppressor protein in DNA damage response. *Acta Oncol* **40**, 689-95.
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* **31**, 117-65.
- Zhang, H., & Ruderman, J. V. (1993). Differential replication capacities of G1 and S-phase extracts from sea urchin eggs. *J Cell Sci* **104**, 565-72.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Akkaraju, G. R., L. J. Hansen and R. Jagus (1991). "Increase in eukaryotic initiation factor 2B activity following fertilization reflects changes in redox potential." J Biol Chem **266**(36): 24451-9.
- Ando, T., T. Kawabe, H. Ohara, B. Ducommun, M. Itoh and T. Okamoto (2001). "Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage." J Biol Chem **276**(46): 42971-7.
- Anthony, B., P. Carter and A. De Benedetti (1996). "Overexpression of the proto-oncogene/translation factor 4E in breast-carcinoma cell lines." Int J Cancer **65**(6): 858-63.
- Antonsson, B., S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes and J. C. Martinou (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." Biochem J **345 Pt 2**: 271-8.
- Bachmann, F., R. Banziger and M. M. Burger (1997). "Cloning of a novel protein overexpressed in human mammary carcinoma." Cancer Res **57**(5): 988-94.
- Baird, S. D., M. Turcotte, R. G. Korneluk and M. Holcik (2006). "Searching for IRES." Rna **12**(10): 1755-85.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.
- Barber, G. N., S. Thompson, T. G. Lee, T. Strom, R. Jagus, A. Darveau and M. G. Katze (1994). "The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4278-82.
- Barr, F. A., H. H. Sillje and E. A. Nigg (2004). "Polo-like kinases and the orchestration of cell division." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 429-40.
- Barragan, M., B. Bellosillo, C. Campas, D. Colomer, G. Pons and J. Gil (2002). "Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." Blood **99**(8): 2969-76.
- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage." FEBS Lett **490**(3): 117-22.

- Benkirane, M., C. Neuveut, R. F. Chun, S. M. Smith, C. E. Samuel, A. Gatignol and K. T. Jeang (1997). "Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR." Embo J **16**(3): 611-24.
- Blier, P. R., A. J. Griffith, J. Craft and J. A. Hardin (1993). "Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks." J Biol Chem **268**(10): 7594-601.
- Bonneau, A. M. and N. Sonenberg (1987). "Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis." J Biol Chem **262**(23): 11134-9.
- Boutros, R., C. Dozier and B. Ducommun (2006). "The when and wheres of CDC25 phosphatases." Curr Opin Cell Biol **18**(2): 185-91.
- Boutros, R., V. Lobjois and B. Ducommun (2007). "CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?" Nat Rev Cancer **7**(7): 495-507.
- Brandhorst, B. P. (1976). "Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs." Dev Biol **52**(2): 310-7.
- Bratton, S. B., G. Walker, S. M. Srinivasula, X. M. Sun, M. Butterworth, E. S. Alnemri and G. M. Cohen (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." Embo J **20**(5): 998-1009.
- Brozovic, A., G. Fritz, M. Christmann, J. Zisowsky, U. Jaehde, M. Osmak and B. Kaina (2004). "Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance." Int J Cancer **112**(6): 974-85.
- Bugler, B., M. Quaranta, B. Aressy, M. C. Brezak, G. Prevost and B. Ducommun (2006). "Genotoxic-activated G2-M checkpoint exit is dependent on CDC25B phosphatase expression." Mol Cancer Ther **5**(6): 1446-51.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." Nature **411**(6833): 102-7.
- Burnett, P. E., R. K. Barrow, N. A. Cohen, S. H. Snyder and D. M. Sabatini (1998). "RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1432-7.
- Busino, L., M. Chiesa, G. F. Draetta and M. Donzelli (2004). "Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis." Oncogene **23**(11): 2050-6.

- Byrnes, K. W., A. DeBenedetti, N. T. Holm, J. Luke, J. Nunez, Q. D. Chu, C. Meschonat, F. Abreo, L. W. Johnson and B. D. Li (2007). "Correlation of TLK1B in elevation and recurrence in doxorubicin-treated breast cancer patients with high eIF4E overexpression." J Am Coll Surg **204**(5): 925-33; discussion 933-4.
- Calsou, P., C. Delteil, P. Frit, J. Drouet and B. Salles (2003). "Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment." J Mol Biol **326**(1): 93-103.
- Cao, Q. and J. D. Richter (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**(14): 3852-62.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-21.
- Cazales, M., E. Schmitt, E. Montembault, C. Dozier, C. Prigent and B. Ducommun (2005). "CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage." Cell Cycle **4**(9): 1233-8.
- Chen, C. R., Y. C. Li, J. Chen, M. C. Hou, P. Papadaki and E. C. Chang (1999). "Moe1, a conserved protein in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a Ras effector, Scd1, to affect proper spindle formation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 517-22.
- Chen, G., S. S. Yuan, W. Liu, Y. Xu, K. Trujillo, B. Song, F. Cong, S. P. Goff, Y. Wu, R. Arlinghaus, D. Baltimore, P. J. Gasser, M. S. Park, P. Sung and E. Y. Lee (1999). "Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl." J Biol Chem **274**(18): 12748-52.
- Child, E. S. and D. J. Mann (2006). "The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability." Cell Cycle **5**(12): 1313-9.
- Childs, A. C., D. J. Mehta and E. W. Gerner (2003). "Polyamine-dependent gene expression." Cell Mol Life Sci **60**(7): 1394-406.
- Clemens, M. J. (2001). "Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins." J Cell Mol Med **5**(3): 221-39.
- Clemens, M. J., M. Bushell, I. W. Jeffrey, V. M. Pain and S. J. Morley (2000). "Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells." Cell Death Differ **7**(7): 603-15.

- Coldwell, M. J., S. A. Mitchell, M. Stoneley, M. MacFarlane and A. E. Willis (2000). "Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry." Oncogene **19**(7): 899-905.
- Constantinou, C. and M. J. Clemens (2005). "Regulation of the phosphorylation and integrity of protein synthesis initiation factor eIF4GI and the translational repressor 4E-BP1 by p53." Oncogene **24**(30): 4839-50.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" Trends Cell Biol **13**(2): 65-70.
- Cormier, P., S. Pyronnet, J. Morales, O. Mulner-Lorillon, N. Sonenberg and R. Belle (2001). "eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin." Dev Biol **232**(2): 275-83.
- Cornelis, S., Y. Bruynooghe, G. Denecker, S. Van Huffel, S. Tinton and R. Beyaert (2000). "Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site." Mol Cell **5**(4): 597-605.
- Cregan, S. P., V. L. Dawson and R. S. Slack (2004). "Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death." Oncogene **23**(16): 2785-96.
- de Klein, A., A. G. van Kessel, G. Grosveld, C. R. Bartram, A. Hagemeijer, D. Bootsma, N. K. Spurr, N. Heisterkamp, J. Groffen and J. R. Stephenson (1982). "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia." Nature **300**(5894): 765-7.
- Deng, J., H. P. Harding, B. Raught, A. C. Gingras, J. J. Berlanga, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ron and N. Sonenberg (2002). "Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation." Curr Biol **12**(15): 1279-86.
- Derry, M. C., A. Yanagiya, Y. Martineau and N. Sonenberg (2006). "Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 537-43.
- Dholakia, J. N., Z. Xu, M. B. Hille and A. J. Wahba (1990). "Purification and characterization of sea urchin initiation factor 2. The requirement of guanine nucleotide exchange factor for the release of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2-bound GDP." J Biol Chem **265**(31): 19319-23.
- Ding, H. F., Y. L. Lin, G. McGill, P. Juo, H. Zhu, J. Blenis, J. Yuan and D. E. Fisher (2000). "Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53." J Biol Chem **275**(49): 38905-11.

- Dobashi, Y. (2005). "Cell cycle regulation and its aberrations in human lung carcinoma." Pathol Int **55**(3): 95-105.
- Donze, O., R. Jagus, A. E. Koromilas, J. W. Hershey and N. Sonenberg (1995). "Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells." Embo J **14**(15): 3828-34.
- Dostie, J., M. Ferraiuolo, A. Pause, S. A. Adam and N. Sonenberg (2000). "A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E." Embo J **19**(12): 3142-56.
- Downs, J. A. and S. P. Jackson (2004). "A means to a DNA end: the many roles of Ku." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 367-78.
- Durocher, D. and S. P. Jackson (2001). "DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?" Curr Opin Cell Biol **13**(2): 225-31.
- Dutertre, S., M. Cazales, M. Quaranta, C. Froment, V. Trabut, C. Dozier, G. Mirey, J. P. Bouche, N. Theis-Febvre, E. Schmitt, B. Monsarrat, C. Prigent and B. Ducommun (2004). "Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition." J Cell Sci **117**(Pt 12): 2523-31.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.
- Eastman, A. (1994). "Deoxyribonuclease II in apoptosis and the significance of intracellular acidification." Cell Death Differ **1**(1): 7-9.
- Ekholm, S. V. and S. I. Reed (2000). "Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 676-84.
- Elia, A., C. Constantinou and M. J. Clemens (2007). "Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1." Oncogene.
- Enari, M., H. Hug and S. Nagata (1995). "Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis." Nature **375**(6526): 78-81.
- 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. (2003). "Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences." Evol Dev **5**(1): 83-8.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-96.

- Fadden, P., T. A. Haystead and J. C. Lawrence, 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): 10240-7.
- Falck, J., J. Coates and S. P. Jackson (2005). "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage." Nature **434**(7033): 605-11.
- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuasen, J. Bartek and J. Lukas (2001). "The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis." Nature **410**(6830): 842-7.
- Fernandez-Guerra, A., A. Aze, J. Morales, O. Mulner-Lorillon, B. Cosson, P. Cormier, C. Bradham, N. Adams, A. J. Robertson, W. F. Marzluff, J. A. Coffman and A. M. Genevriere (2006). "The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*." Dev Biol **300**(1): 238-51.
- Fletcher, C. M., A. M. McGuire, A. C. Gingras, H. Li, H. Matsuo, N. Sonenberg and G. Wagner (1998). "4E binding proteins inhibit the translation factor eIF4E without folded structure." Biochemistry **37**(1): 9-15.
- Franke, T. F. and L. C. Cantley (1997). "Apoptosis. A Bad kinase makes good." Nature **390**(6656): 116-7.
- Fukuchi-Shimogori, T., I. Ishii, K. Kashiwagi, H. Mashiba, H. Ekimoto and K. Igarashi (1997). "Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G." Cancer Res **57**(22): 5041-4.
- Gao, C. and N. Tsuchida (1999). "Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis." Jpn J Cancer Res **90**(2): 180-7.
- Gebauer, F. and M. W. Hentze (2004). "Molecular mechanisms of translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 827-35.
- Gingras, A. C., S. P. Gygi, B. Raught, R. D. Polakiewicz, R. T. Abraham, M. F. Hoekstra, R. Aebersold and N. Sonenberg (1999). "Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism." Genes Dev **13**(11): 1422-37.
- Gingras, A. C., S. G. Kennedy, M. A. O'Leary, N. Sonenberg and N. Hay (1998). "4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway." Genes Dev **12**(4): 502-13.
- Greenberg, V. L. and S. G. Zimmer (2005). "Paclitaxel induces the phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 through a Cdk1-dependent mechanism." Oncogene **24**(30): 4851-60.

- Gross, P. R. and G. H. Cousineau (1963). "Effects of actinomycin D on macromolecule synthesis and early development in sea urchin eggs." Biochem Biophys Res Commun **10**: 321-6.
- Gross, P. R. and G. H. Cousineau (1964). "Macromolecule Synthesis and the Influence of Actinomycin on Early Development." Exp Cell Res **33**: 368-95.
- Groth, A., J. Lukas, E. A. Nigg, H. H. Sillje, C. Wernstedt, J. Bartek and K. Hansen (2003). "Human Tausled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint." Embo J **22**(7): 1676-87.
- Gu, Y., J. Rosenblatt and D. O. Morgan (1992). "Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15." Embo J **11**(11): 3995-4005.
- Hara, K., K. Yonezawa, M. T. Kozlowski, T. Sugimoto, K. Andrabi, Q. P. Weng, M. Kasuga, I. Nishimoto and J. Avruch (1997). "Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR." J Biol Chem **272**(42): 26457-63.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-108.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**(4930): 629-34.
- Heesom, K. J., A. Gampel, H. Mellor and R. M. Denton (2001). "Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1)." Curr Biol **11**(17): 1374-9.
- Henis-Korenblit, S., G. Shani, T. Sines, L. Marash, G. Shohat and A. Kimchi (2002). "The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5400-5.
- Henis-Korenblit, S., N. L. Strumpf, D. Goldstaub and A. Kimchi (2000). "A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation." Mol Cell Biol **20**(2): 496-506.
- Herbert, T. P., R. Fahraeus, A. Prescott, D. P. Lane and C. G. Proud (2000). "Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E." Curr Biol **10**(13): 793-6.
- Hermeking, H. and A. Benzinger (2006). "14-3-3 proteins in cell cycle regulation." Semin Cancer Biol **16**(3): 183-92.

- Hoegge, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." Nature **419**(6903): 135-41.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-74.
- Holcik, M., C. Lefebvre, C. Yeh, T. Chow and R. G. Korneluk (1999). "A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection." Nat Cell Biol **1**(3): 190-2.
- Holcik, M. and N. Sonenberg (2005). "Translational control in stress and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 318-27.
- Holcik, M., N. Sonenberg and R. G. Korneluk (2000). "Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death." Trends Genet **16**(10): 469-73.
- Hong, S. J., T. M. Dawson and V. L. Dawson (2004). "Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling." Trends Pharmacol Sci **25**(5): 259-64.
- Huang, W. I., L. J. Hansen, W. C. Merrick and R. Jagus (1987). "Inhibitor of eukaryotic initiation factor 4F activity in unfertilized sea urchin eggs." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(18): 6359-63.
- Humphrey, T. and T. Enoch (1998). "Sum1, a highly conserved WD-repeat protein, suppresses S-M checkpoint mutants and inhibits the osmotic stress cell cycle response in fission yeast." Genetics **148**(4): 1731-42.
- Hutchins, A. P., G. R. Roberts, C. W. Lloyd and J. H. Doonan (2004). "In vivo interaction between CDKA and eIF4A: a possible mechanism linking translation and cell proliferation." FEBS Lett **556**(1-3): 91-4.
- Jan, E. (2006). "Divergent IRES elements in invertebrates." Virus Res **119**(1): 16-28.
- Jeffrey, P. D., L. Tong and N. P. Pavletich (2000). "Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors." Genes Dev **14**(24): 3115-25.
- Jeggo, P. A., A. M. Carr and A. R. Lehmann (1998). "Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia." Trends Genet **14**(8): 312-6.
- Jiang, H., J. Coleman, R. Miskimins and W. K. Miskimins (2003). "Expression of constitutively active 4EBP-1 enhances p27Kip1 expression and inhibits proliferation of MCF7 breast cancer cells." Cancer Cell Int **3**(1): 2.
- Jiang, H. Y. and R. C. Wek (2005). "GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation." Biochem J **385**(Pt 2): 371-80.

- Jin, S. and A. J. Levine (2001). "The p53 functional circuit." J Cell Sci **114**(Pt 23): 4139-40.
- Johannes, G., M. S. Carter, M. B. Eisen, P. O. Brown and P. Sarnow (1999). "Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13118-23.
- Johannes, G. and P. Sarnow (1998). "Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites." Rna **4**(12): 1500-13.
- Kanungo, J., R. M. Empson and H. Rasmussen (1999). "Microinjection of an antibody to the Ku protein arrests development in sea urchin embryos." Biol Bull **197**(3): 341-7.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2." J Mol Biol **335**(4): 923-36.
- Karlsson-Rosenthal, C. and J. B. Millar (2006). "Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery." Trends Cell Biol **16**(6): 285-92.
- Kastan, M. B. and J. Bartek (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." Nature **432**(7015): 316-23.
- Kawahara, H., R. Philipova, H. Yokosawa, R. Patel, K. Tanaka and M. Whitaker (2000). "Inhibiting proteasome activity causes overreplication of DNA and blocks entry into mitosis in sea urchin embryos." J Cell Sci **113** (Pt 15): 2659-70.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kharbanda, S., Z. M. Yuan, R. Weichselbaum and D. Kufe (1998). "Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage." Oncogene **17**(25): 3309-18.
- Kim, J. T., K. D. Kim, E. Y. Song, H. G. Lee, J. W. Kim, J. W. Kim, S. K. Chae, E. Kim, M. S. Lee, Y. Yang and J. S. Lim (2006). "Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g)." FEBS Lett **580**(27): 6375-83.
- Kim, R., M. Emi and K. Tanabe (2005). "Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review)." Oncol Rep **14**(3): 595-9.
- Kimball, S. R. (2001). "Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells." Prog Mol Subcell Biol **26**: 155-84.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.

- Klein, J. A., C. M. Longo-Guess, M. P. Rossmann, K. L. Seburn, R. E. Hurd, W. N. Frankel, R. T. Bronson and S. L. Ackerman (2002). "The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor." Nature **419**(6905): 367-74.
- Koh, D. W., T. M. Dawson and V. L. Dawson (2005). "Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1." Pharmacol Res **52**(1): 5-14.
- Koritzinsky, M., M. G. Magagnin, T. van den Beucken, R. Seigneuric, K. Savelkouls, J. Dostie, S. Pyronnet, R. J. Kaufman, S. A. Wepler, J. W. Voncken, P. Lambin, C. Koumenis, N. Sonenberg and B. G. Wouters (2006). "Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control." Embo J **25**(5): 1114-25.
- Koritzinsky, M., K. M. Rouschop, T. van den Beucken, M. G. Magagnin, K. Savelkouls, P. Lambin and B. G. Wouters (2007). "Phosphorylation of eIF2alpha is required for mRNA translation inhibition and survival during moderate hypoxia." Radiother Oncol.
- Koromilas, A. E., S. Roy, G. N. Barber, M. G. Katze and N. Sonenberg (1992). "Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase." Science **257**(5077): 1685-9.
- Kovarik, P., J. Hasek, L. Valasek and H. Ruis (1998). "RPG1: an essential gene of *saccharomyces cerevisiae* encoding a 110-kDa protein required for passage through the G1 phase." Curr Genet **33**(2): 100-9.
- Lamphear, B. J., R. Kirchweger, T. Skern and R. E. Rhoads (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): 21975-83.
- Lazaris-Karatzas, A., K. S. Montine and N. Sonenberg (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." Nature **345**(6275): 544-7.
- Lazaris-Karatzas, A., M. R. Smith, R. M. Frederickson, M. L. Jaramillo, Y. L. Liu, H. F. Kung and N. Sonenberg (1992). "Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation." Genes Dev **6**(9): 1631-42.
- Lazaris-Karatzas, A. and N. Sonenberg (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): 1234-8.

- Le Bouffant, R., P. Cormier, A. Cueff, R. Belle and O. Mulner-Lorillon (2007). "Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis." Cell Mol Life Sci **64**(13): 1723-34.
- Le Bouffant, R., P. Cormier, O. Mulner-Lorillon and R. Belle (2006). "Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP." J Cell Biochem **99**(1): 126-32.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2004). "Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex." Science **304**(5667): 93-6.
- Lesser, M. P., V. A. Kruse and T. M. Barry (2003). "Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos." J Exp Biol **206**(Pt 22): 4097-103.
- Levine, M. and E. H. Davidson (2005). "Gene regulatory networks for development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 4936-42.
- Li, B. D., L. Liu, M. Dawson and A. De Benedetti (1997). "Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma." Cancer **79**(12): 2385-90.
- Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-9.
- Ling, J., S. J. Morley and J. A. Traugh (2005). "Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2." Embo J **24**(23): 4094-105.
- Longthorne, V. L. and G. T. Williams (1997). "Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis." Embo J **16**(13): 3805-12.
- Luo, Y., J. Hurwitz and J. Massague (1995). "Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1." Nature **375**(6527): 159-61.
- Maddika, S., S. R. Ande, S. Panigrahi, T. Paranjothy, K. Weglarczyk, A. Zuse, M. Eshraghi, K. D. Manda, E. Wiechec and M. Los (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." Drug Resist Updat **10**(1-2): 13-29.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, Y. Martineau, T. A. Sato, O. Larsson, V. K. Rajasekhar and N. Sonenberg (2007). "Epigenetic Activation of a Subset of mRNAs by eIF4E Explains Its Effects on Cell Proliferation." PLoS ONE **2**: e242.
- Manzella, J. M. and P. J. Blackshear (1990). "Regulation of rat ornithine decarboxylase mRNA translation by its 5'-untranslated region." J Biol Chem **265**(20): 11817-22.
- Marc, J., O. Mulner-Lorillon, S. Boulben, D. Hureau, G. Durand and R. Belle (2002). "Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation." Chem Res Toxicol **15**(3): 326-31.

- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, N. Sonenberg and S. K. Burley (1999). "Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G." Mol Cell **3**(6): 707-16.
- Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." Nature **432**(7015): 298-306.
- Mate, M. J., M. Ortiz-Lombardia, B. Boitel, A. Haouz, D. Tello, S. A. Susin, J. Penninger, G. Kroemer and P. M. Alzari (2002). "The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF." Nat Struct Biol **9**(6): 442-6.
- Matsuo, H., H. Li, A. M. McGuire, C. M. Fletcher, A. C. Gingras, N. Sonenberg and G. Wagner (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein." Nat Struct Biol **4**(9): 717-24.
- Melino, G., F. Bernassola, M. Ranalli, K. Yee, W. X. Zong, M. Corazzari, R. A. Knight, D. R. Green, C. Thompson and K. H. Vousden (2004). "p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation." J Biol Chem **279**(9): 8076-83.
- Meurs, E. F., J. Galabru, G. N. Barber, M. G. Katze and A. G. Hovanessian (1993). "Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(1): 232-6.
- Michaels, M. L., C. Cruz, A. P. Grollman and J. H. Miller (1992). "Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7022-5.
- Millar, J., C. McGowan, R. Jones, K. Sadhu, A. Bueno, H. Richardson and P. Russell (1991). "cdc25 M-phase inducer." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **56**: 577-84.
- Mimori, T. and J. A. Hardin (1986). "Mechanism of interaction between Ku protein and DNA." J Biol Chem **261**(22): 10375-9.
- Minich, W. B., M. L. Balasta, D. J. Goss and R. E. Rhoads (1994). "Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7668-72.
- Miskimins, W. K., G. Wang, M. Hawkinson and R. Miskimins (2001). "Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation." Mol Cell Biol **21**(15): 4960-7.
- Mitchell, J. R., J. H. Hoeijmakers and L. J. Niedernhofer (2003). "Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing." Curr Opin Cell Biol **15**(2): 232-40.

- Mitra, J. and G. H. Enders (2004). "Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells." Oncogene **23**(19): 3361-7.
- Miyagi, Y., A. Sugiyama, A. Asai, T. Okazaki, Y. Kuchino and S. J. Kerr (1995). "Elevated levels of eukaryotic translation initiation factor eIF-4E, mRNA in a broad spectrum of transformed cell lines." Cancer Lett **91**(2): 247-52.
- Moerke, N. J., H. Aktas, H. Chen, S. Cantel, M. Y. Reibarkh, A. Fahmy, J. D. Gross, A. Degtarev, J. Yuan, M. Chorev, J. A. Halperin and G. Wagner (2007). "Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G." Cell **128**(2): 257-67.
- Moll, U. M. and O. Petrenko (2003). "The MDM2-p53 interaction." Mol Cancer Res **1**(14): 1001-8.
- Moll, U. M. and A. Zaika (2001). "Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53." FEBS Lett **493**(2-3): 65-9.
- Morales, J., O. Mulner-Lorillon, B. Cosson, E. Morin, R. Belle, C. A. Bradham, W. S. Beane and P. Cormier (2006). "Translational control genes in the sea urchin genome." Dev Biol **300**(1): 293-307.
- Moreau, J. L., F. Marques, A. Barakat, P. Schatt, J. C. Lozano, G. Peaucellier, A. Picard and A. M. Geneviere (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): 182-97.
- Morley, S. J., M. J. Coldwell and M. J. Clemens (2005). "Initiation factor modifications in the preapoptotic phase." Cell Death Differ **12**(6): 571-84.
- Mueller, P. R., T. R. Coleman, A. Kumagai and W. G. Dunphy (1995). "Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15." Science **270**(5233): 86-90.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." Cell **116**(2): 221-34.
- Nigg, E. A. (1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle." Bioessays **17**(6): 471-80.
- Nupponen, N. N., K. Porkka, L. Kakkola, M. Tanner, K. Persson, A. Borg, J. Isola and T. Visakorpi (1999). "Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer." Am J Pathol **154**(6): 1777-83.
- Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-phase." Nature **344**(6266): 503-8.

- Nurse, P. and P. Thuriaux (1980). "Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Genetics **96**(3): 627-37.
- Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam and T. A. Weinert (2002). "Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints." Annu Rev Genet **36**: 617-56.
- Orton, K. C., J. Ling, A. J. Waskiewicz, J. A. Cooper, W. C. Merrick, N. L. Korneeva, R. E. Rhoads, N. Sonenberg and J. A. Traugh (2004). "Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk." J Biol Chem **279**(37): 38649-57.
- Oulhen, N. and P. Cormier (2006). "[eIF4E and developmental decisions: when translation drives the development]." Med Sci (Paris) **22**(5): 507-13.
- Oulhen, N., P. Salaun, B. Cosson, P. Cormier and J. Morales (2007). "After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E." J Cell Sci **120**(Pt 3): 425-34.
- Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, E. Kruzel and et al. (1995). "Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression." Mol Cell Biol **15**(6): 3032-40.
- Parker, L. L., S. Atherton-Fessler and H. Piwnicka-Worms (1992). "p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2917-21.
- Patel, R., E. M. Wright and M. Whitaker (1997). "Caffeine overrides the S-phase cell cycle block in sea urchin embryos." Zygote **5**(2): 127-38.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert and W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Curr Biol **10**(15): 886-95.
- Pause, A., G. J. Belsham, A. C. Gingras, O. Donze, T. A. Lin, J. C. Lawrence, Jr. and N. Sonenberg (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." Nature **371**(6500): 762-7.
- Pestova, T. V., C. U. Hellen and I. N. Shatsky (1996). "Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry." Mol Cell Biol **16**(12): 6859-69.

- Petretti, C., M. Savoian, E. Montembault, D. M. Glover, C. Prigent and R. Giet (2006). "The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation." EMBO Rep **7**(4): 418-24.
- Prigent, C. and T. Hunt (2004). "Oocyte maturation and cell cycle control: a farewell symposium for Pr Marcel Doree." Biol Cell **96**(3): 181-5.
- Proud, C. G. (2006). "Regulation of protein synthesis by insulin." Biochem Soc Trans **34**(Pt 2): 213-6.
- Pyronnet, S., J. Dostie and N. Sonenberg (2001). "Suppression of cap-dependent translation in mitosis." Genes Dev **15**(16): 2083-93.
- Pyronnet, S., H. Imataka, A. C. Gingras, R. Fukunaga, T. Hunter and N. Sonenberg (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." Embo J **18**(1): 270-9.
- Pyronnet, S., L. Pradayrol and N. Sonenberg (2000). "A cell cycle-dependent internal ribosome entry site." Mol Cell **5**(4): 607-16.
- Pyronnet, S. and N. Sonenberg (2001). "Cell-cycle-dependent translational control." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 13-8.
- Qin, X. and P. Sarnow (2004). "Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells." J Biol Chem **279**(14): 13721-8.
- Robertson, A. J., J. Croce, S. Carbonneau, E. Voronina, E. Miranda, D. R. McClay and J. A. Coffman (2006). "The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*." Dev Biol **300**(1): 321-34.
- Roccheri, M. C., G. Barbata, F. Cardinale, C. Tipa, L. Bosco, O. A. Oliva, D. Cascino and G. Giudice (1997). "Apoptosis in sea urchin embryos." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 359-66.
- Roig, J. and J. A. Traugh (1999). "p21-activated protein kinase gamma-PAK is activated by ionizing radiation and other DNA-damaging agents. Similarities and differences to alpha-PAK." J Biol Chem **274**(44): 31119-22.
- Roll-Mecak, A., P. Alone, C. Cao, T. E. Dever and S. K. Burley (2004). "X-ray structure of translation initiation factor eIF2gamma: implications for tRNA and eIF2alpha binding." J Biol Chem **279**(11): 10634-42.
- Rolli-Derkinderen, M., F. Machavoine, J. M. Baraban, A. Grolleau, L. Beretta and M. Dy (2003). "ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1." J Biol Chem **278**(21): 18859-67.

- Ron, D. (2002). "Translational control in the endoplasmic reticulum stress response." J Clin Invest **110**(10): 1383-8.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." Trends Mol Med **12**(9): 440-50.
- Rotman, G. and Y. Shiloh (1998). "ATM: from gene to function." Hum Mol Genet **7**(10): 1555-63.
- Rousseau, D., A. C. Gingras, A. Pause and N. Sonenberg (1996). "The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth." Oncogene **13**(11): 2415-20.
- Rousseau, D., R. Kaspar, I. Rosenwald, L. Gehrke and N. Sonenberg (1996). "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): 1065-70.
- Rudolph, J. (2007). "Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism." Biochemistry **46**(12): 3595-604.
- Rudra, D. and J. R. Warner (2004). "What better measure than ribosome synthesis?" Genes Dev **18**(20): 2431-6.
- Russo, A. A., P. D. Jeffrey, A. K. Patten, J. Massague and N. P. Pavletich (1996). "Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex." Nature **382**(6589): 325-31.
- Salaun, P., M. Le Breton, J. Morales, R. Belle, S. Boulben, O. Mulner-Lorillon and P. Cormier (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): 347-57.
- Salaun, P., S. Pyronnet, J. Morales, O. Mulner-Lorillon, R. Belle, N. Sonenberg and P. Cormier (2003). "eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo." Dev Biol **255**(2): 428-39.
- Sarkaria, J. N., E. C. Busby, R. S. Tibbetts, P. Roos, Y. Taya, L. M. Karnitz and R. T. Abraham (1999). "Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine." Cancer Res **59**(17): 4375-82.
- Sarnow, P. (1989). "Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5795-9.

- Scheper, G. C., B. van Kollenburg, J. Hu, Y. Luo, D. J. Goss and C. G. Proud (2002). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA." *J Biol Chem* **277**(5): 3303-9.
- Schnackenberg, B. J., R. E. Palazzo and W. F. Marzluff (2007). "Cyclin E/Cdk2 is required for sperm maturation, but not DNA replication, in early sea urchin embryos." *Genesis* **45**(5): 282-91.
- Shangary, S., K. D. Brown, A. W. Adamson, S. Edmonson, B. Ng, T. K. Pandita, J. Yalowich, G. E. Taccioli and R. Baskaran (2000). "Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process." *J Biol Chem* **275**(39): 30163-8.
- Shantz, L. M., R. Viswanath and A. E. Pegg (1994). "Role of the 5'-untranslated region of mRNA in the synthesis of S-adenosylmethionine decarboxylase and its regulation by spermine." *Biochem J* **302** (Pt 3): 765-72.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-12.
- Shi, J., Y. Feng, A. C. Goulet, R. R. Vaillancourt, N. A. Sachs, J. W. Hershey and M. A. Nelson (2003). "The p34cdc2-related cyclin-dependent kinase 11 interacts with the p47 subunit of eukaryotic initiation factor 3 during apoptosis." *J Biol Chem* **278**(7): 5062-71.
- Silvera, D., N. Koloteva-Levine, S. Burma and O. Elroy-Stein (2006). "Effect of Ku proteins on IRES-mediated translation." *Biol Cell* **98**(6): 353-61.
- Slee, E. A., M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green and S. J. Martin (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *J Cell Biol* **144**(2): 281-92.
- Smits, V. A., R. Klompaker, L. Arnaud, G. Rijksen, E. A. Nigg and R. H. Medema (2000). "Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint." *Nat Cell Biol* **2**(9): 672-6.
- Smits, V. A., R. Klompaker, T. Vallenius, G. Rijksen, T. P. Makela and R. H. Medema (2000). "p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint." *J Biol Chem* **275**(39): 30638-43.
- Sodergren, E., G. M. Weinstock, E. H. Davidson, R. A. Cameron, R. A. Gibbs, R. C. Angerer, L. M. Angerer, M. I. Arnone, D. R. Burgess, R. D. Burke, J. A. Coffman, M. Dean, M.

R. Elphick, C. A. Etensohn, K. R. Foltz, A. Hamdoun, R. O. Hynes, W. H. Klein, W. Marzluff, D. R. McClay, R. L. Morris, A. Mushegian, J. P. Rast, L. C. Smith, M. C. Thorndyke, V. D. Vacquier, G. M. Wessel, G. Wray, L. Zhang, C. G. Elsik, O. Ermolaeva, W. Hlavina, G. Hofmann, P. Kitts, M. J. Landrum, A. J. Mackey, D. Maglott, G. Panopoulou, A. J. Poustka, K. Pruitt, V. Sapojnikov, X. Song, A. Souvorov, V. Solovyev, Z. Wei, C. A. Whittaker, K. Worley, K. J. Durbin, Y. Shen, O. Fedrigo, D. Garfield, R. Haygood, A. Primus, R. Satija, T. Severson, M. L. Gonzalez-Garay, A. R. Jackson, A. Milosavljevic, M. Tong, C. E. Killian, B. T. Livingston, F. H. Wilt, N. Adams, R. Belle, S. Carbonneau, R. Cheung, P. Cormier, B. Cosson, J. Croce, A. Fernandez-Guerra, A. M. Genevriere, M. Goel, H. Kelkar, J. Morales, O. Mulner-Lorillon, A. J. Robertson, J. V. Goldstone, B. Cole, D. Epel, B. Gold, M. E. Hahn, M. Howard-Ashby, M. Scally, J. J. Stegeman, E. L. Allgood, J. Cool, K. M. Judkins, S. S. McCafferty, A. M. Musante, R. A. Obar, A. P. Rawson, B. J. Rossetti, I. R. Gibbons, M. P. Hoffman, A. Leone, S. Istrail, S. C. Materna, M. P. Samanta, V. Stolc, W. Tongprasit, Q. Tu, K. F. Bergeron, B. P. Brandhorst, J. Whittle, K. Berney, D. J. Bottjer, C. Calestani, K. Peterson, E. Chow, Q. A. Yuan, E. Elhaik, D. Graur, J. T. Reese, I. Bosdet, S. Heesun, M. A. Marra, J. Schein, M. K. Anderson, V. Brockton, K. M. Buckley, A. H. Cohen, S. D. Fugmann, T. Hibino, M. Loza-Coll, A. J. Majeske, C. Messier, S. V. Nair, Z. Pancer, D. P. Terwilliger, C. Agca, E. Arboleda, N. Chen, A. M. Churcher, F. Hallbook, G. W. Humphrey, M. M. Idris, T. Kiyama, S. Liang, D. Mellott, X. Mu, G. Murray, R. P. Olinski, F. Raible, M. Rowe, J. S. Taylor, K. Tessmar-Raible, D. Wang, K. H. Wilson, S. Yaguchi, T. Gaasterland, B. E. Galindo, H. J. Gunaratne, C. Juliano, M. Kinukawa, G. W. Moy, A. T. Neill, M. Nomura, M. Raisch, A. Reade, M. M. Roux, J. L. Song, Y. H. Su, I. K. Townley, E. Voronina, J. L. Wong, G. Amore, M. Branno, E. R. Brown, V. Cavalieri, V. Duboc, L. Duloquin, C. Flytzanis, C. Gache, F. Lapraz, T. Lepage, A. Locascio, P. Martinez, G. Matassi, V. Matranga, R. Range, F. Rizzo, E. Rottinger, W. Beane, C. Bradham, C. Byrum, T. Glenn, S. Hussain, G. Manning, E. Miranda, R. Thomason, K. Walton, A. Wikramanayake, S. Y. Wu, R. Xu, C. T. Brown, L. Chen, R. F. Gray, P. Y. Lee, J. Nam, P. Oliveri, J. Smith, D. Muzny, S. Bell, J. Chacko, A. Cree, S. Curry, C. Davis, H. Dinh, S. Dugan-Rocha, J. Fowler, R. Gill, C. Hamilton, J. Hernandez, S. Hines, J. Hume, L. Jackson, A. Jolivet, C. Kovar, S. Lee, L. Lewis, G. Miner, M. Morgan, L. V. Nazareth, G. Okwuonu, D. Parker, L. L. Pu, R. Thorn and R. Wright (2006). "The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*." *Science* **314**(5801): 941-52.

- Soussi, T. and G. Lozano (2005). "p53 mutation heterogeneity in cancer." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 834-42.
- Southgate, R. J., B. Neill, O. Prelovsek, A. El-Osta, Y. Kamei, S. Miura, O. Ezaki, T. J. McLoughlin, W. Zhang, T. G. Unterman and M. A. Febbraio (2007). "FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle." J Biol Chem.
- Srivastava, S. P., K. U. Kumar and R. J. Kaufman (1998). "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **273**(4): 2416-23.
- Stephan, H., B. Polzar, F. Rauch, S. Zanotti, C. Ulke and H. G. Mannherz (1996). "Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis." Histochem Cell Biol **106**(4): 383-93.
- Stewart, Z. A., M. D. Westfall and J. A. Pietenpol (2003). "Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy." Trends Pharmacol Sci **24**(3): 139-45.
- Sumerel, J. L., J. C. Moore, B. J. Schnackenberg, J. A. Nichols, J. C. Canman, G. M. Wessel and W. F. Marzluff (2001). "Cyclin E and its associated cdk activity do not cycle during early embryogenesis of the sea Urchin." Dev Biol **234**(2): 425-40.
- Sunavala-Dossabhoy, G., S. K. Balakrishnan, S. Sen, S. Nuthalapaty and A. De Benedetti (2005). "The radioresistance kinase TLK1B protects the cells by promoting repair of double strand breaks." BMC Mol Biol **6**: 19.
- Sunavala-Dossabhoy, G., M. Fowler and A. De Benedetti (2004). "Translation of the radioresistance kinase TLK1B is induced by gamma-irradiation through activation of mTOR and phosphorylation of 4E-BP1." BMC Mol Biol **5**: 1.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger and G. Kroemer (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Tee, A. R. and C. G. Proud (2000). "DNA-damaging agents cause inactivation of translational regulators linked to mTOR signalling." Oncogene **19**(26): 3021-31.
- Teleman, A. A., Y. W. Chen and S. M. Cohen (2005). "4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth." Genes Dev **19**(16): 1844-8.

- Tettweiler, G., M. Miron, M. Jenkins, N. Sonenberg and P. F. Lasko (2005). "Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP." Genes Dev **19**(16): 1840-3.
- Tinton, S. A., B. Schepens, Y. Bruynooghe, R. Beyaert and S. Cornelis (2005). "Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha." Biochem J **385**(Pt 1): 155-63.
- Trembley, J. H., D. Hu, L. C. Hsu, C. Y. Yeung, C. Slaughter, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2002). "PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity." J Biol Chem **277**(4): 2589-96.
- Tvegard, T., H. Soltani, H. C. Skjølberg, M. Krohn, E. A. Nilssen, S. E. Kearsey, B. Grallert and E. Boye (2007). "A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition." Genes Dev **21**(6): 649-54.
- Ueda, T., R. Watanabe-Fukunaga, H. Fukuyama, S. Nagata and R. Fukunaga (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): 6539-49.
- Unbehaun, A., S. I. Borukhov, C. U. Hellen and T. V. Pestova (2004). "Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP." Genes Dev **18**(24): 3078-93.
- Ungureanu, N. H., M. Cloutier, S. M. Lewis, N. de Silva, J. D. Blais, J. C. Bell and M. Holcik (2006). "Internal ribosome entry site-mediated translation of Apaf-1, but not XIAP, is regulated during UV-induced cell death." J Biol Chem **281**(22): 15155-63.
- van den Beucken, T., M. Koritzinsky and B. G. Wouters (2006). "Translational control of gene expression during hypoxia." Cancer Biol Ther **5**(7): 749-55.
- van Diest, P. J., E. van der Wall and J. P. Baak (2004). "Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review." J Clin Pathol **57**(7): 675-81.
- van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers and R. Kanaar (2001). "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection." Nat Rev Genet **2**(3): 196-206.
- van Loo, G., M. van Gorp, B. Depuydt, S. M. Srinivasula, I. Rodriguez, E. S. Alnemri, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, W. Declercq and P. Vandenabeele (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts

- with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity." Cell Death Differ **9**(1): 20-6.
- van Vugt, M. A., V. A. Smits, R. Klompaker and R. H. Medema (2001). "Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion." J Biol Chem **276**(45): 41656-60.
- Vanasse, G. J., P. Concannon and D. M. Willerford (1999). "Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage." Blood **94**(12): 3997-4010.
- Vega Thurber, R. and D. Epel (2007). "Apoptosis in early development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*." Dev Biol **303**(1): 336-46.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Voronina, E. and G. M. Wessel (2001). "Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos." Mol Reprod Dev **60**(4): 553-61.
- Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 275-83.
- 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**(2): 393-403.
- Wang, J. Y. (2000). "Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase." Oncogene **19**(49): 5643-50.
- Wang, S., I. B. Rosenwald, M. J. Hutzler, G. A. Pihan, L. Savas, J. J. Chen and B. A. Woda (1999). "Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas." Am J Pathol **155**(1): 247-55.
- Warner, J. R. (1999). "The economics of ribosome biosynthesis in yeast." Trends Biochem Sci **24**(11): 437-40.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud and J. A. Cooper (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." Embo J **16**(8): 1909-20.
- Wek, R. C., H. Y. Jiang and T. G. Anthony (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." Biochem Soc Trans **34**(Pt 1): 7-11.
- Wilker, E. W., M. A. van Vugt, S. A. Artim, P. H. Huang, C. P. Petersen, H. C. Reinhardt, Y. Feng, P. A. Sharp, N. Sonenberg, F. M. White and M. B. Yaffe (2007). "14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis." Nature **446**(7133): 329-32.

- Wilson, J. E., T. V. Pestova, C. U. Hellen and P. Sarnow (2000). "Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome." Cell **102**(4): 511-20.
- Wouters, B. G., T. van den Beucken, M. G. Magagnin, M. Koritzinsky, D. Fels and C. Koumenis (2005). "Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation." Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): 487-501.
- Wu, G. S., T. F. Burns, E. R. McDonald, 3rd, W. Jiang, R. Meng, I. D. Krantz, G. Kao, D. D. Gan, J. Y. Zhou, R. Muschel, S. R. Hamilton, N. B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu and W. S. el-Deiry (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet **17**(2): 141-3.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." Nature **284**(5756): 555-6.
- Xu, B., S. Kim and M. B. Kastan (2001). "Involvement of Brc1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation." Mol Cell Biol **21**(10): 3445-50.
- Xu, B., A. H. O'Donnell, S. T. Kim and M. B. Kastan (2002). "Phosphorylation of serine 1387 in Brc1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation." Cancer Res **62**(16): 4588-91.
- Yam, C. H., T. K. Fung and R. Y. Poon (2002). "Cyclin A in cell cycle control and cancer." Cell Mol Life Sci **59**(8): 1317-26.
- Yan, Y., J. W. Shay, W. E. Wright and M. C. Mumby (1997). "Inhibition of protein phosphatase activity induces p53-dependent apoptosis in the absence of p53 transactivation." J Biol Chem **272**(24): 15220-6.
- Yang, D., G. J. Brunn and J. C. Lawrence, Jr. (1999). "Mutational analysis of sites in the translational regulator, PHAS-I, that are selectively phosphorylated by mTOR." FEBS Lett **453**(3): 387-90.
- Yang, D. Q. and M. B. Kastan (2000). "Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1." Nat Cell Biol **2**(12): 893-8.
- Yang, J., Y. Yu, H. E. Hamrick and P. J. Duerksen-Hughes (2003). "ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses." Carcinogenesis **24**(10): 1571-80.
- Yu, S. W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2002). "Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor." Science **297**(5579): 259-63.
- Zhang, H. and J. V. Ruderman (1993). "Differential replication capacities of G1 and S-phase extracts from sea urchin eggs." J Cell Sci **104** (Pt 2): 565-72.

- Zhang, L., X. Pan and J. W. Hershey (2007). "Individual overexpression of five subunits of human translation initiation factor eIF3 promotes malignant transformation of immortal fibroblast cells." J Biol Chem **282**(8): 5790-800.
- Zhao, S., Y. C. Weng, S. S. Yuan, Y. T. Lin, H. C. Hsu, S. C. Lin, E. Gerbino, M. H. Song, M. Z. Zdzienicka, R. A. Gatti, J. W. Shay, Y. Ziv, Y. Shiloh and E. Y. Lee (2000). "Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products." Nature **405**(6785): 473-7.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-8.
- Zuberek, J., A. Wyslouch-Cieszynska, A. Niedzwiecka, M. Dadlez, J. Stepinski, W. Augustyniak, A. C. Gingras, Z. Zhang, S. K. Burley, N. Sonenberg, R. Stolarski and E. Darzynkiewicz (2003). "Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein." Rna **9**(1): 52-61.

RESUME

La division cellulaire est un processus physiologique extrêmement régulé et la moindre anomalie entraîne la mobilisation de points de surveillance. Lorsque qu'un problème survient dans le contrôle de la division, cela peut entraîner l'apparition de pathologie grave comme le cancer. L'étude de l'implication des facteurs de traduction lors de la mobilisation des points de surveillance a été réalisée en profitant des atouts du modèle de l'embryon d'oursin.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse, ont montré que le point de surveillance de l'ADN endommagé (arrêt du cycle-réparation-apoptose) était fonctionnel dès le premier cycle suivant la fécondation dans l'embryon d'oursin. Nous avons également mis en évidence que dans les embryons d'oursin, la phosphorylation de la protéine eIF2 α est impliquée dans l'augmentation de synthèse protéique induite par la fécondation et dans l'inhibition de synthèse protéique induite par un traitement avec une molécule alkylant l'ADN, le MMS.

Nos études montrent que la protéine 4E-BP, un inhibiteur de la traduction, est surexprimée et fonctionnelle en réponse à la mobilisation du point de surveillance de l'ADN endommagé par une molécule radiomimétique (bléomycine), à un stress hypoxique ou lors de l'exposition à un métal lourd (ChromIII) dans l'embryon d'oursin. Enfin, nous démontrons que lors du traitement des embryons par le MMS, qui n'induit pas de surexpression de 4E-BP, la protéine eIF4G est modifiée, dégradée ou clivée selon la dose de drogue utilisée.

Nos études renforcent l'intérêt et les connaissances sur l'implication des facteurs de traduction lors de la mobilisation des points de surveillance du cycle cellulaire dans l'embryon d'oursin mis en situation de stress et/ou d'endommagement de l'ADN. Ainsi les résultats obtenus permettent de poser les bases de nouvelles régulations des facteurs de traduction eIF4E et eIF4G et de leur inhibiteur 4E-BP permettant de contrôler la synthèse protéique lorsque la cellule va s'engager dans la voie de survie ou de mort cellulaire.

ABSTRACT

Cell division is a highly regulated process and when a problem occurs, the cell cycle checkpoints are activated. When cell cycle checkpoints are defective, pathological disease, as cancer, can occur. The implication of translation factors during checkpoints activation was studied in sea urchin embryo model.

The work realized during this PhD demonstrated a functional DNA damage checkpoint during the first cell division of sea urchin embryo. The eIF2 α phosphorylation was shown to be implicated in translational activation after fertilization and in translation inhibition after MMS treatment, a DNA alkylating molecule.

This study shows an expression of functional 4E-BP protein, a translational inhibitor, after induction of DNA damages by radiomimetic drug (bleomycin), hypoxic stress or heavy metal (ChromiumIII) treatment in sea urchin embryo. We demonstrated that, after MMS treatment, which doesn't induced 4E-BP expression, the eIF4G protein was modified, degraded or cleaved as a function of drug dose.

Our work support interest and knowledge on translational factors implication when checkpoint was mobilised after DNA damages or cellular stress in sea urchin embryo. These results are a starting point to study new regulations of translational factors eIF4E, eIF4G and 4E-BP when cell is directed toward survival or cell death pathways.