



HAL
open science

Caractérisation et identification d'ARNms différentiellement recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/cycline B.

Magali Le Breton

► **To cite this version:**

Magali Le Breton. Caractérisation et identification d'ARNms différemment recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/cycline B.. Biologie cellulaire. Paris 6, 2004. Français. NNT: . tel-01117534

HAL Id: tel-01117534

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117534v1>

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)

École Doctorale Physiologie et Physiopathologie

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Spécialité Biologie cellulaire

Présentée par

Magali Le Breton

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PARIS 6

**Caractérisation et identification d'ARNms
différentiellement recrutés dans les polysomes en
fonction de l'activité du complexe CDK1/cycline B.**

Thèse codirigée par le Pr Robert Bellé et le Dr Julia Morales

Soutenue le 20 septembre 2004

devant le jury composé de :

Rapporteurs :

Dr Laurent Meijer, Directeur de recherches CNRS.

Dr Jacek Kubiak, Chargé de recherches CNRS.

Examineurs :

Pr. René Ozon, Professeur à l'Université PARIS 6.

Pr. Joëlle Sobczak-Thépot, Professeur à l'Université PARIS 6

Pr. Robert Bellé, Professeur à l'Université PARIS 6.

Dr Julia Morales, Chargé de recherches CNRS.

Je remercie en premier lieu les Dr. Laurent Meijer et Jacek Kubiak d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi que les Pr. Joëlle Sobczak-Thépot et René Oxon d'avoir accepté d'en être examinateurs.

Je tiens à remercier Robert Bellé et Odile Mulner-Lorillon de m'avoir accueillie aussi chaleureusement dans leur équipe « Cycle Cellulaire et Développement » à la Station Biologique de Roscoff. Merci pour votre confiance et votre soutien pendant ces quatre années.

Je remercie tout particulièrement Julia Morales qui a encadré ce travail. Nous avons passé quatre années à nous battre ensemble contre ARNs, PCR et gradient de polysomes et northern... Merci pour tout Julia, j'ai beaucoup appris à ton contact, merci pour ta disponibilité et ta gentillesse. Un grand merci aussi pour l'aide que tu m'as apportée pendant la rédaction de ce document.

Merci à l'ensemble de l'équipe CED pour tous les moments agréables passés ensemble. Un grand merci à Patrick Cormier pour nos discussions amicales et scientifiques, ses conseils, sa gentillesse et sa patience. Merci à Sandrine pour sa bonne humeur quotidienne, à Julie et petit Patrick, le duo brestois, quatre années à partager les difficultés et joies de la vie d'un thésard du laboratoire CED, à la relève, Fred et Aurélie, bon courage à vous ! Merci

aux boulangers de Roscoff pour les nombreux croissants et pains au chocolat qu'ils nous ont fournis.

Ce manuscrit est l'aboutissement de quatre merveilleuses années passées à la Station Biologique de Roscoff. Je ne partirai pas sans regretter un grand nombre de personnes qui font de la station un lieu de travail et de vie exceptionnel. Alors merci à l'ensemble du personnel.

Un clin d'œil spécial à Susanna & Moby, Erwan & Anne, Cat & Jeff, Didier & Sylvie, Nath & Sylvain, Fabrice & Manue, à grande Marie, Rahel, Vincent, Isa, Laurence, Marie-Cécile & Guillaume, à Marco, Carole, Frank et bien d'autres pour les petits et grand moments passés ensemble.

Un grand merci à mes parents, merci pour tout ce que vous avez fait et faites encore.

Et pour finir, merci à toi Matthieu, de m'avoir soutenue et réconfortée lorsque j'en ai eu besoin, d'avoir eu la patience d'écouter mes discours interminables sur mes fameux gradients de polysome et mes super clones etc....

Merci pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour. Jean-François, Christiane merci de l'avoir si bien réussi. Merci à toi petit Armand, de toutes mes manip tu es la plus belle.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
ABRÉVIATIONS	3
TABLE DES FIGURES	5
INTRODUCTION	7
A- LA MITOSE ET LE COMPLEXE CDK1/CYCLINE B.	11
<i>1- Généralités sur le cycle cellulaire.</i>	<i>11</i>
<i>2- La phase M et le complexe CDK1/Cycline B.</i>	<i>12</i>
2-1- Quelques étapes clefs de la découverte de CDK1/cycline B.....	13
2-2- Activation et inactivation de CDK1.....	14
2-2-1- La synthèse et la destruction de la cycline B sont respectivement nécessaires à l'activation et inactivation de CDK1.	14
2-2-2- Schéma du mécanisme d'activation et d'inactivation de CDK1 nécessaire à l'entrée et la sortie de phase M.	15
2-3-4- Généralités sur les substrats de CDK1.....	17
B- LA TRADUCTION.	19
<i>1- La régulation de l'expression des gènes.</i>	<i>19</i>
<i>2- La traduction : mécanismes et facteurs impliqués.</i>	<i>20</i>
2-1- L'initiation.....	20
2-2- L'élongation.....	22
2-3- La terminaison.	22
C- RÉGULATION TRADUCTIONNELLE EN AVAL DE L'ACTIVATION DE CDK1.	24
<i>1- Diminution de synthèse protéique observée en phase M.</i>	<i>24</i>
1-1- Régulation de l'initiation en phase M.....	25
1-1-1- Régulation du facteur eIF2.....	25
1-1-2- Régulation du facteur eIF4F.	25

a- Modification post-traductionnelle d'eIF4E.....	26
b- La liaison eIF4E/eIF4G en phase M.....	26
c- Intervention de répresseurs.....	27
1-2- Régulation de l'élongation en phase M.....	28
2- Mécanisme de régulation traductionnelle impliqué dans le maintien de la traduction de certains messagers spécifiques en phase M.....	30
2-1- Modulation de la polyadénylation cytoplasmique de messagers spécifiques en mitose.....	30
2-1-1- Le mécanisme de polyadénylation cytoplasmique.....	30
2-1-2- Polyadénylation de messagers spécifiques en phase M.....	33
2-2- Recrutement de messagers spécifiques en phase M par un mécanisme IRES-dépendant.....	34
3- Bilan des régulations traductionnelles observées en phase M et du rôle de CDK1 dans ces régulations.....	36
D- MODÈLE D'ÉTUDE : LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRÉCOCE DE L'OURSIN <i>SPHAERECHINUS GRANULARIS</i>	38
1- Généralités.....	38
2- Régulation de l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin.....	39
3- Avantage du modèle et adéquation avec la question posée.....	42
RESULTATS	44
LISTE DES PUBLICATIONS	44
A- IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'ARNMS DIFFÉRENTIELLEMENT RECRUTÉS DANS LES POLYSOMES EN PHASE M SOUS L'ACTION DE CDK1/CYCLINE B.....	45
1- Isolement d'ARNm différenciellement recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/Cycline B.....	45
1-1- Effet de l'aminopurvalanol sur le premier cycle de division embryonnaire de l'oursin.....	45
1-2- Criblage différentiel : obtention de clones correspondant à des ARNms différenciellement traduits en présence ou absence d'aminopurvalanol.....	46

<i>2- Identification des messagers dont le recrutement polysomal varie en fonction de l'activité de CDK1/Cycline B.....</i>	<i>47</i>
2-1- Les ARNms R1 et D2 sont dérecrutés des polysomes par CDK1.....	48
2-1-1- Le clone R1 code pour une protéine homologue à un transporteur d'acides aminés.....	48
2-1-2- Le clone D2 n'est pas identifié.....	48
2-2- Les ARNms 28, A8 et 6 sont recrutés dans les polysomes par CDK1.....	49
2-2-1- Le clone 28 code pour une cycline A.....	49
2-2-2- Le clone A8 code pour une sérine/thréonine kinase homologue des Neks.....	49
2-2-3 Le clone 6 n'est pas identifié.....	50
<i>3- Analyse de l'expression des ARNms R1 (transporteur d'acide aminé putatif), 28 (cycline A) et A8 (Sg-Nek) au cours du développement précoce... </i>	<i>51</i>
<i>4- Analyse des séquences non traduites des ARNm dont le recrutement augmente en présence d'activité CDK1.</i>	<i>52</i>
Article 1.....	53
Article 2.....	54
B- MODIFICATION DE LA LOCALISATION DU FACTEUR D'ÉLONGATION EEF1 DELTA AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE.	55
Article 3.....	56
C- RÉGULATION TRADUCTIONNELLE EN AMONT DE L'ACTIVATION DE CDK1 : LA SYNTHÈSE DE CYCLINE B POST-FÉCONDATION NÉCESSAIRE À LA PREMIÈRE DIVISION MITOTIQUE : VOIES DE TRANSDUCTION IMPLIQUÉES.....	57
Article 4.....	57
D- ANALYSE DU RÔLE DU ROUNDUP SUR LA TRANSCRIPTION GÉNÉRALE, SUR LA SYNTHÈSE DE L'ARNM CODANT POUR L'ENZYME D'ÉCLOSION ET SUR L'ÉCLOSION.	57
Article 5.....	59
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	60
1- La diminution de synthèse protéique globale en phase M : rôle de CDK1.....	60

<i>2- Le maintien de la synthèse de protéines spécifiques en phase M : rôle de CDK1.....</i>	<i>61</i>
<i>3- Rôle de la cycline A et de Sg-Nek dans le contrôle du cycle cellulaire.....</i>	<i>63</i>
3-1- La cycline A.....	63
3-2- Sg-Nek.....	63
<i>4- Hypothèse quant aux mécanismes de régulation traductionnelle impliqués dans le maintien de la synthèse de protéines en phase M.....</i>	<i>65</i>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	68
ANNEXES.....	83
1 - Clonage et séquençage de l'ODC de <i>Sphaerechinus granularis</i>	83
2 - Clonage et séquençage de l'actine cytoplasmique de <i>Sphaerechinus granularis</i>	84

RÉSUMÉ

Le complexe CDK1/cycline B joue un rôle central dans l'organisation et l'accomplissement de la phase M du cycle cellulaire. Des modifications de l'activité traductionnelle sont observées en parallèle de l'activation de CDK1. Ainsi la synthèse protéique globale est inhibée en phase M dans de nombreux types cellulaires. En revanche la traduction de certains messagers spécifiques est maintenue ou augmentée. En plus de la corrélation temporelle entre ces modifications et l'activité de CDK1, certaines cibles de CDK1 sont impliquées dans la machinerie de traduction. D'autre part, un rôle de CDK1 dans la synthèse de protéines spécifiques a été montré au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle de CDK1 dans la régulation de l'activité traductionnelle et plus particulièrement sur le recrutement de messagers dans les polysomes. Nous avons ainsi réalisé un criblage différentiel des ARNms présents dans les polysomes en présence ou absence d'un inhibiteur de CDK1 : l'aminopurvalanol. Nous avons montré que l'activité CDK1 augmente le recrutement des messagers correspondant aux clones 28, A8 et 6 alors qu'elle diminue celui des clones R1 et D2. Ces résultats, en accord avec diverses données bibliographiques, suggèrent que CDK1 participe à l'inhibition de synthèse protéique globale en phase M et est aussi impliqué dans le maintien de la synthèse de protéines spécifiques en phase M. La synthèse de ces protéines spécifiques en phase M pourrait être nécessaire à l'accomplissement correct de la mitose. En effet, les messagers 28 et A8 codent respectivement pour une cycline A et une homologue des « NIMA related Kinases », molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Ce travail, par l'obtention de messagers modèles, permettra d'étudier les mécanismes de régulation traductionnelle dépendant de CDK1. D'autre part, La découverte de ces mécanismes permettra d'identifier de nouvelles cibles de CDK1, sources potentielles d'intervention thérapeutique.

ABRÉVIATIONS

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

AP : AminoPurvalanol

bp : base pair

CAK : CDK Activating Kinase

CDC : Cell Division Cycle

CDKs : Cyclin Dependant Kinase

CPE : Cytoplasmic Polyadenylation Element

CPEB : CPE Binding Protein

4E-BP : eIF4E Binding Protein

eEF : eucaryotic Elongation Factor

eIF : eucaryotic Initiation Factor

eRF : eucaryotic Releasing Factor

GTP : Guanosine TriPhosphate

IRES : Internal Ribosome EnterSite

kb : kilo-base

kDa : Kilo Dalton

MPF : Maturation Promoting Factor

m⁷GTP : 7 methyl Guanosine TriPhosphate = CAP

Nek : Nima related kinase

ODC : Ornithine DeCarboxylase

ORF : Open Reading Frame

PAP : Poly(A) Polymerase

PABP : Poly(A) Binding Protein

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

UTR : UnTranslated Region

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Comparaison des cycles de division de cellules somatiques, de cellules embryonnaires et du cycle de division méiotique	11
Figure 2 : Le cycle cellulaire	12
Figure 3 : La mitose	13
Figure 4 : L'activation et inactivation de CDK1.....	16
Figure 5 : La régulation de l'expression des gènes.....	19
Figure 6 : L'initiation.....	21
Figure 7 : L'élongation	22
Figure 8 : La terminaison.....	23
Figure 9 : Activité traductionnelle en aval de l'activité CDK1/cycline B.....	24
Figure 10 : Le facteur eIF2 en phase M.	25
Figure 11 : Le facteur eIF4F en phase M.....	26
Figure 12 : Action du répresseur 4E-BP sur la modulation de l'initiation.....	28
Figure 13 : Inhibition de l'élongation en mitose.....	29
Figure 14 : Le mécanisme de Polyadénylation.....	32
Figure 15 : Régulation de la synthèse protéique en phase M et implication de CDK1.	36
Figure 16 : Différents stades du développement embryonnaire de l'oursin <i>Sphaerechinus granularis</i>	38
Figure 17 : L'accumulation des protéines néosynthétisées post-fécondation n'est pas modifiée par l'aminoprivalanol.....	45
Figure 18 : Amplification par RT-PCR des clones 28 et R1 issus du premier criblage différentiel sur les banques d'ADNc M et AP obtenues au cours du second criblage différentiel.....	46

Figure 19 : L'activité CDK1 modifie le recrutement d'ARNm spécifiques en phase M	47
Figure 20 : Représentation schématique de la séquence du clone R1 obtenue après extension RACE-PCR	48
Figure 21 : Le clone R1 code pour une protéine homologue à un transporteur d'acides aminés.....	48
Figure 22 : Représentation schématique de la séquence du clone 28 obtenue après extension RACE-PCR	48
Figure 23 : Le clone 28 code pour la cycline A.....	49
Figure 24 : Représentation schématique de la séquence du clone A8 obtenue après extension RACE-PCR.....	49
Figure 25 : Le clone A8 code pour une sérine/thréonine kinase homologue des "NIMA related kinases"	50
Figure 26 : Représentation schématique de la séquence du clone 6 obtenue après extension RACE-PCR.....	50
Figure 27 : Les ARNms A8 (Sg-Nek) et 28 (Cycline A) sont exprimés au cours des stades précoces du développement.....	51
Figure 28 : Comparaison des séquences 3' UTR des clones 28 (Cycline A), A8 (Sg-Nek) et 6 (non identifié)	53
Figure 29 : Clonage de l'enzyme d'éclosion de <i>Sphaerechinus granularis</i> (Sg-HE)..	58
Figure 30 : L'ARNm codant pour Sg-HE est exprimé transitoirement avant l'éclosion.....	58
Figure 31 : Caractérisation et identification d'ARNm différenciellement recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/Cycline B	61

Introduction

INTRODUCTION

De nombreuses études montrent un lien entre la régulation de la synthèse protéique et la phase M du cycle cellulaire. D'une part, la synthèse protéique est nécessaire à l'entrée en mitose (Wagenaar, 1983 ; Meijer et Pondaven, 1988 ; Arion et Meijer, 1989 ; Hunt et al., 1992 ; Dorée et Hunt, 2002). D'autre part, chez de nombreux eucaryotes supérieurs, la synthèse protéique globale est inhibée en phase M du cycle cellulaire (Fan et Penman, 1970 ; Howell et Baumgartel, 1978 ; Tarnowka et Baglioni, 1979 ; Bonneau et Sonnenberg, 1987 ; Kanki et Newport, 1991 ; Pyronnet et al., 2001 ; Qin et Sarnow, 2004) alors que la traduction de certains ARNms spécifiques échappe à cette inhibition (Cornelis et al., 2000 ; Pyronnet et al., 2000 ; Kim et al., 2003 ; Qin et Sarnow, 2004).

Chez les eucaryotes supérieurs, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases, G1, S, G2 et M, survenant selon un ordre établi, chaque phase ne pouvant débiter qu'après l'achèvement complet et correct de la précédente. Parmi les molécules régulant le cycle cellulaire, les CDKs (Cyclin Dependent Kinase) sont des acteurs universels jouant un rôle central dans l'initiation et l'organisation des évènements du cycle cellulaire chez tous les eucaryotes (Morgan, 1997 ; Nigg, 2001 ; Meijer, 2003 ; Murray, 2004). Les CDKs, sérine/thréonine kinases, exercent leur fonction en phosphorylant des protéines clefs impliquées dans les transitions du cycle cellulaire, qu'il est important de mettre en évidence.

La corrélation temporelle entre l'activation de CDK1, qui contrôle la transition G2/M du cycle cellulaire, et les modifications de traduction observées en phase M, suggère un rôle de CDK1 dans la régulation de l'activité traductionnelle. Cette hypothèse est étayée par le fait que certaines cibles de CDK1 sont impliquées dans la machinerie de traduction comme les facteurs

d'élongation 1-delta et gamma, la S6 kinase, 4E-BP1 (eIF4E Binding Protein 1), CPEB (CPE Binding Protein) ou encore la polyA polymérase (PAP) (Bellé et al., 1989 ; Colgan et al., 1996 ; Heesom et al., 2001 ; Mendez et al., 2002 ; Shah et al., 2003). La phosphorylation par CDK1 de certains d'entre eux entraîne leur inhibition et suggère que cette kinase pourrait intervenir au moins partiellement dans la diminution de synthèse protéique globale observée (Colgan et al., 1996 ; Shah et al., 2003). D'autre part CDK1 pourrait intervenir dans la traduction d'ARNms spécifiques en phase M via la phosphorylation d'autres facteurs comme la CPEB (Mendez et al., 2002). Cette hypothèse est étayée par le fait qu'un rôle direct de CDK1 dans la régulation de la synthèse de plusieurs protéines a été montré au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope (Culp et Musci, 1999 ; Frank-Vaillant et al., 1999).

Après une brève description du cycle cellulaire et plus particulièrement de la phase M, nous envisagerons le mécanisme général de la traduction, processus important dans la régulation de l'expression des gènes. Ces données nous permettront d'aborder les relations existant entre la phase M et la traduction. Dans ce cadre, nous nous pencherons sur les modulations de l'activité traductionnelle observées en mitose. Nous analyserons par la suite les différents mécanismes susceptibles d'être impliqués dans cette régulation. Le rôle de CDK1 dans ces modifications sera d'autre part discuté. Enfin nous terminerons cette introduction en décrivant le développement embryonnaire précoce de l'oursin *Sphaerechinus granularis*, modèle d'étude utilisé au cours de ce travail, qui constitue un des modèles de choix à la fois dans l'étude de la régulation du cycle cellulaire (Nasmyth, 2001) et dans celle de la régulation de l'expression des gènes (Mathews, 2000).

Dans un second chapitre, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus au cours de cette thèse. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes

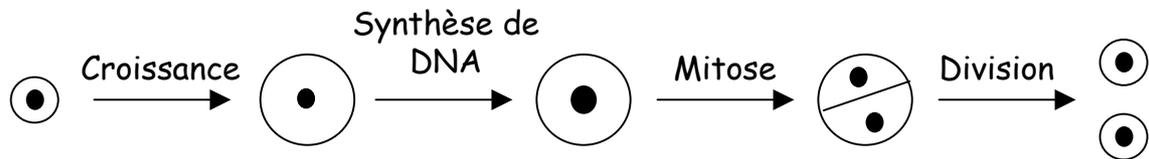
d'action de CDK1 au niveau de l'activité traductionnelle par l'analyse du recrutement de messagers dans les polysomes en fonction de l'activité de CDK1. Nous avons ainsi isolé par criblage différentiel des ARNm dont le recrutement varie en fonction de l'activité de CDK1. Nous avons mis en évidence que l'activité de CDK1 modifie le profil de recrutement polysomal de certains messagers (Le Breton et al., 2003). Ainsi, CDK1 favorise : 1) le relarguage de certains messagers des polysomes, suggérant son implication dans la diminution de synthèse protéique globale en phase M et 2) le recrutement d'autres messagers, ce qui suggère un rôle de cette kinase dans le maintien ou l'augmentation de la synthèse de protéines spécifiques en phase M. De manière intéressante, deux des messagers dont le recrutement augmente en présence d'activité CDK1 codent pour une cycline de type A et une protéine homologue des Nek (Nima related kinase) (Le Breton et al., soumis et résultats non publiés). Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et les ARNm correspondants sont exprimés exclusivement au cours des stades de développement précoce (Le Breton et al., soumis et résultats non publiés).

Les résultats obtenus dans le cadre d'autres projets de recherche en cours dans le laboratoire seront rapidement présentés. Ainsi, nous avons cloné une 2^{ème} isoforme du facteur d'élongation eEF1 δ , participé à l'analyse de la localisation du facteur eEF1- δ et montré son changement de localisation en mitose (Boulben et al., 2003). Nous avons d'autre part participé à l'analyse du contrôle de la synthèse protéique nécessaire à la synthèse de cycline B en amont de l'activation de CDK1 au cours de la première division embryonnaire précoce de l'oursin (Salaün et al., 2004). Enfin, nous avons mis en évidence un effet du Roundup, herbicide à base de glyphosate, sur la synthèse de l'ARNm codant pour l'enzyme d'éclosion de *Sphaerechinus granularis* (Marc et al., soumis).

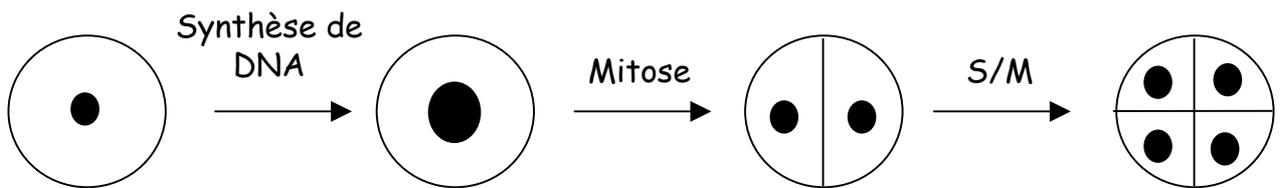
Ce manuscrit se terminera sur quelques conclusions et perspectives quant

aux résultats obtenus sur le rôle de CDK1 dans la régulation de l'activité traductionnelle.

(1) Cellules somatiques



(2) Cellules embryonnaires



(3) Cycle méiotique ovocytaire

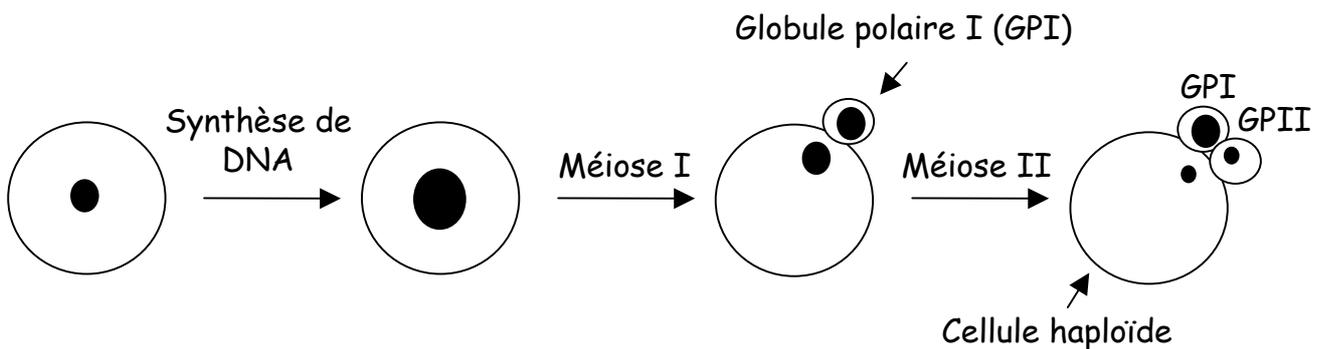


Figure 1 : Comparaison des cycles de division de cellules somatiques, de cellules embryonnaires et du cycle de division méiotique.

A- La mitose et le complexe CDK1/Cycline B.

1- Généralités sur le cycle cellulaire.

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. Ce mécanisme de division cellulaire est complexe et fait intervenir un ensemble d'évènements coordonnés, dont le bon déroulement est extrêmement contrôlé. Le cycle cellulaire est traditionnellement divisé en deux phases, l'interphase et la mitose. L'interphase correspond soit à l'état de quiescence où s'exprime le potentiel fonctionnel d'une cellule différenciée, soit à l'ensemble des étapes de préparation de la mitose comprenant trois phases : la phase G1 préreplicative, la phase S pendant laquelle a lieu la synthèse d'ADN et la phase G2 post-réplivative. Durant la mitose ou phase M s'accomplit la ségrégation des chromosomes dupliqués entre les deux cellules filles (Nigg, 2001 ; O'Farrell, 2001 ; Dorée et Hunt, 2002 ; Nurse, 2002 ; Meijer, 2003 ; Murray, 2004).

Cependant, les détails de ce cycle varient selon le type cellulaire. Ainsi, un cycle de cellule somatique est caractérisé par : une phase de croissance, une phase de réplication de l'ADN, la phase M et la division cellulaire (**Figure 1 (1)**). Le cycle de division embryonnaire consiste en une succession de phases S/M sans phases de croissance intermédiaires (**Figure 1 (2)**). Ainsi ces cellules sont extrêmement synchrones et se divisent très vite sans accroissement de la taille de l'embryon. Le cycle de division méiotique est plus spécifique puisqu'il présente une phase de duplication de l'ADN suivit de deux cycles de ségrégation des chromosomes (**Figure 1 (3)**). Ce qui permet la production de cellules haploïdes spécialisées dans la reproduction sexuée. Ces différences impliquent des mécanismes de régulations spécifiques, cependant dans tous les cas, le

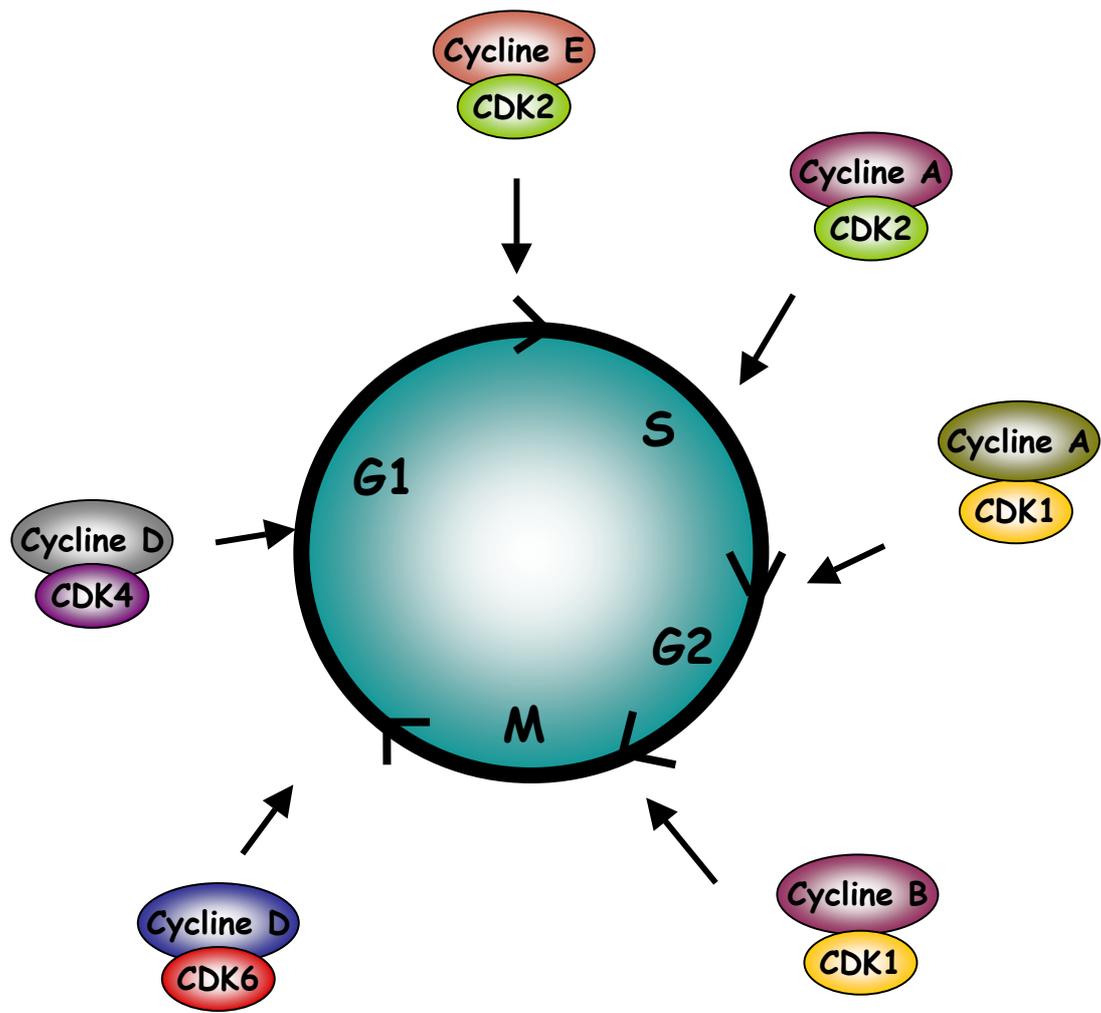


Figure 2 : Le cycle cellulaire

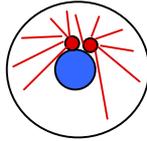
déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle sont contrôlés par l'activation transitoire et séquentielle d'une famille de protéines kinases dépendantes des cyclines ou CDKs (Cyclin Dépendent Kinases). Elles sont actives uniquement sous forme d'un dimère composé d'une sous-unité catalytique CDK associée à une sous-unité régulatrice : la cycline. En plus de l'association aux cyclines, l'activité des CDKs est régulée par des processus de phosphorylation et déphosphorylation, par protéolyse et par interaction avec des petites protéines inhibitrices (Morgan, 1997 ; O'Farrell 2001 ; Meijer, 2003 ; Murray, 2004).

Sur la base de l'homologie de séquence, il existe 13 CDKs et 25 cyclines différentes chez l'homme (Morgan, 1997 ; Meijer, 2003). Parmi ces CDKs, 6 sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Schématiquement au cours du cycle cellulaire (**Figure 2**), CDK4 et 6, associées aux cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis CDK2/cycline E prend le relais et assure la transition G1/S suivit par CDK2/cycline A qui assure le bon déroulement de la phase S. CDK1/cycline B régule ensuite la transition G2/M et l'entrée en mitose (Morgan, 1997 ; Meijer, 2003 ; Murray, 2004). Il faut noter que CDK2/cycline A est aussi un facteur limitant de l'entrée en mitose et intervient vraisemblablement en amont de l'activation de CDC25 et de CDK1 dans des cellules humaines (Pagano et al., 1992 ; Furuno et al., 1999 ; Voronina et al., 2003 ; Mitra et Enders, 2004). CDK1/cycline A est aussi active en G2/M, mais ses fonctions demeurent inconnues (Yam et al., 2002).

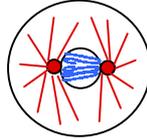
Nos travaux portant sur les régulations traductionnelles en aval de l'activité du complexe CDK1/cycline B, nous nous attacherons à centrer cette introduction sur la phase M du cycle cellulaire.

2- La phase M et le complexe CDK1/Cycline B.

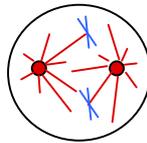
Interphase



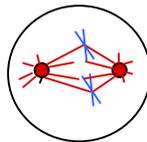
Prophase



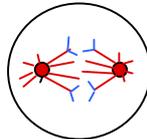
Prométaphase



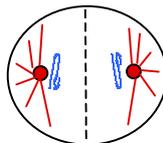
Métaphase



Anaphase



Télophase



M
I
T
O
S
E

Interphase

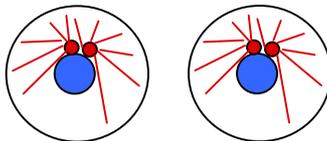


Figure 3 : La mitose

La phase M est sub-divisée en 5 phases (**Figure 3**): la **prophase** correspond à la fin de la condensation de la chromatine et à la rupture de l'enveloppe nucléaire ; la **prométaphase** est la période de formation du fuseau mitotique et le début de l'alignement des chromosomes ; pendant la **métaphase**, les chromosomes s'alignent le long de la plaque métaphasique à équidistance des deux pôles de la cellule ; pendant l'**anaphase**, ils se disjoignent ; et, au cours de la **télophase**, ils migrent vers les pôles, le fuseau disparaît, la chromatine se décondense et la cytokinèse commence (Nigg 2001 ; Meijer, 2003).

2-1- Quelques étapes clefs de la découverte de CDK1/cycline B.

C'est la convergence d'approches expérimentales différentes réalisées sur divers modèles d'études comme les levures (approches génétiques), la maturation méiotique des ovocytes d'étoile de mer et de xénope, le développement embryonnaire de l'oursin ou les cellules humaines en culture (approches biochimiques), qui a permis d'identifier les molécules et mécanismes de régulation impliqués au cours du cycle cellulaire et en particulier à la transition G2/M (Dorée et Hunt, 2002 ; Nurse, 2002). Ainsi, une approche de génétique chez deux levures, en utilisant des mutants thermosensibles bloqués en phase G1 et M du cycle cellulaire, a permis d'identifier les gènes *cdc2* et *CDC28* respectivement chez *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, codant pour une protéine de 34 kDa indispensable à l'entrée en mitose (Hartwell et al., 1970 ; Nurse et al., 1976). Par la suite les protéines homologues chez d'autres organismes comme l'homme (CDK1) ont été obtenues par complémentation fonctionnelle (Lee et Nurse, 1987) montrant l'universalité de l'action de cette protéine et suggérant son rôle fondamental dans la régulation du cycle cellulaire.

En parallèle, des expériences de transfert de cytoplasme au cours de la maturation méiotique d'ovocyte d'amphibien ont montré l'existence d'un facteur

cytoplasmique, capable d'induire l'entrée en méiose (Dettlaff et al., 1964 ; Masui et Markert, 1971) appelé alors MPF (Maturation Promoting Factor) (Masui et Markert, 1971), dont l'activité varie avec le cycle (Gerhart et al., 1984). Il a été mis en évidence que le MPF est composé d'une sérine/thréonine kinase de 34 kDa, correspondant à *cdc2/CDC28* isolé chez la levure (Arion et al., 1988 ; Dunphy et al., 1988 ; Gautier et al., 1988 ; Labbé et al., 1988) associée à une sous unité régulatrice (Labbé et al., 1989 ; Meijer et al., 1989), la cycline, initialement identifiée au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin (Evans et al., 1983).

2-2- Activation et inactivation de CDK1.

L'entrée en phase M dépend de l'activation de la kinase universelle CDK1 ou p34cdc2. L'activation de CDK1 nécessite la fixation de la sous-unité régulatrice cycline et des modifications post-traductionnelles (phosphorylation et déphosphorylation) de CDK1. Des modifications post-traductionnelles de la cycline B ainsi qu'un changement de la localisation cellulaire du complexe activé sont aussi des évènements clefs intervenant dans cette activation.

2-2-1- La synthèse et la destruction de la cycline B sont respectivement nécessaires à l'activation et inactivation de CDK1.

Dans une grande variété d'organismes, la synthèse protéique est requise pour l'entrée en mitose et en méiose. Ainsi, l'inhibition de la synthèse protéique inhibe à la fois l'activité du complexe CDK1/cycline B et l'entrée en phase M (Wagenaar, 1983 ; Meijer et Pondaven., 1988 ; Arion et Meijer, 1989 ; Hunt et al., 1992). Le taux de CDK1 est constant au cours du cycle cellulaire (Arion et Meijer, 1989). Le taux de cycline B augmente en interphase pour atteindre un pic en mitose puis la cycline B est rapidement dégradée en fin de mitose (Evans et

al., 1983 ; Wagenaar, 1983 ; Standart et al., 1987 ; Meijer et al., 1989 ; Murray et Kirshner, 1989 ; Hunt et al., 1992) alors que sa synthèse est constante au cours du cycle (Evans et al., 1983 ; Wagenaar, 1983 ; Standart et al., 1987 ; Hunt et al., 1992). Ainsi, la synthèse et la destruction de la cycline B sont respectivement nécessaires pour l'entrée et la sortie de mitose (Murray et Kirshner 1989 ; Minshull et al., 1989). Ceci démontre un rôle primordial de la synthèse protéique pour l'entrée en mitose. Il faut cependant noter que dans les cellules somatiques, l'augmentation du taux de cycline dépend de sa traduction mais est aussi corrélée à l'augmentation de transcription et de la stabilité de l'ARNm codant pour la cycline B (Porter et Donoghue, 2003).

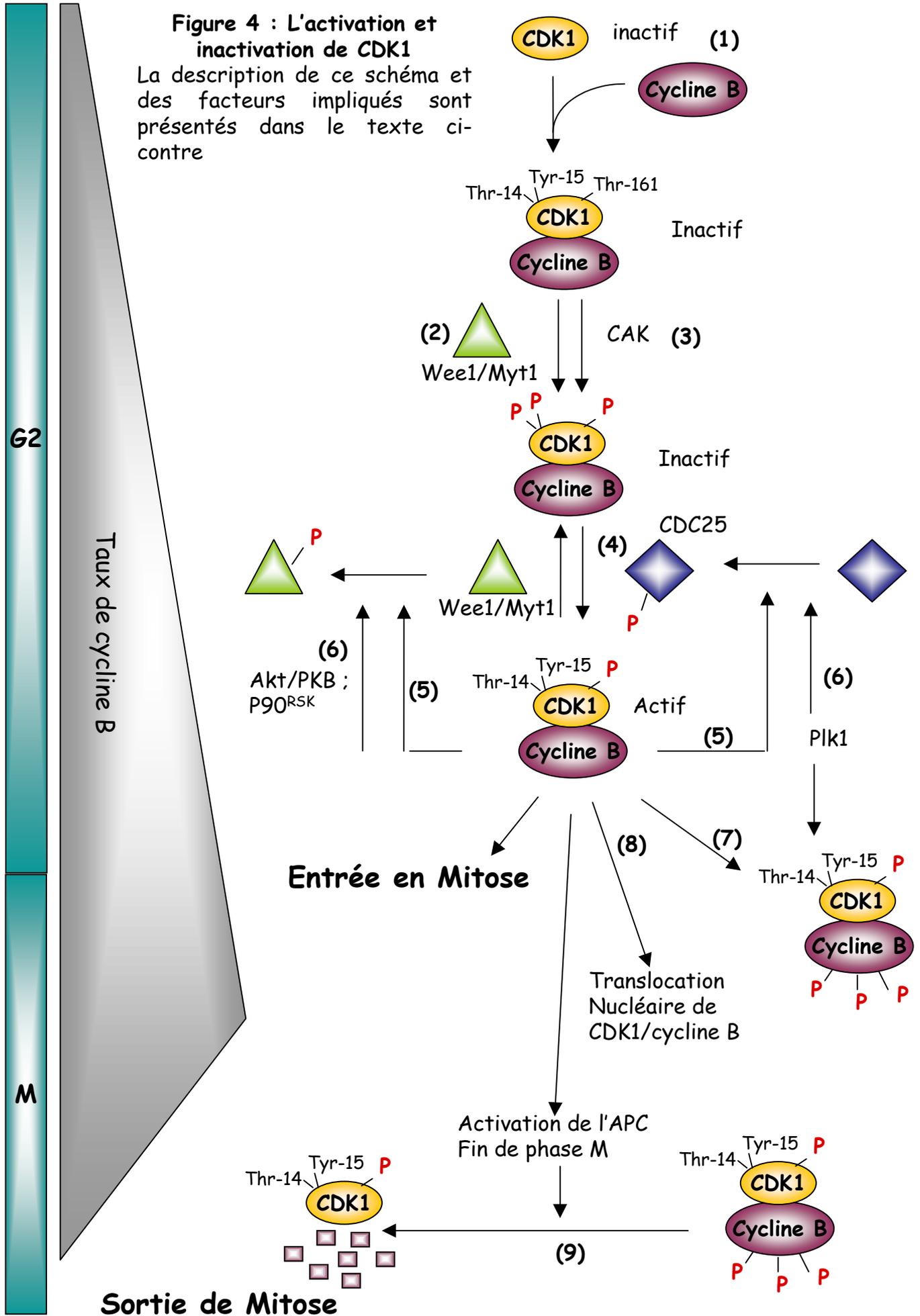
2-2-2- Schéma du mécanisme d'activation et d'inactivation de CDK1 nécessaire à l'entrée et la sortie de phase M.

En interphase, les cellules synthétisent la cycline B (Evans et al., 1983 ; Standart et al., 1987 ; Minshull et al., 1989 ; Murray et Kirschner, 1989 ; Hunt et al., 1992) qui se complexe alors à CDK1 présent sous forme monomérique non actif (**Figure 4 (1)**). L'association avec la cycline est une condition indispensable à l'activation de CDK1 (Meijer et al., 1989 ; Arion et Meijer, 1989 ; Minshull et al., 1989 ; Hunt et al., 1992).

Ces complexes sont inactivés au fur et à mesure de leur formation par la phosphorylation des résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 de CDK1 catalysée par Wee1/Myt1 (Parker et al., 1991 ; Lundgren et al., 1991 ; Mueller et al., 1995b) (**Figure 4 (2)**). Parallèlement, la CAK (CDK Activating Kinase) complexe trimérique composé de la cycline H, MAT1 et CDK7 chez les mammifères, phosphoryle CDK1 sur Thr-161, ce qui est indispensable à son activité (Solomon et al., 1993 ; Fesquet et al., 1997) (**Figure 4 (3)**). C'est la déphosphorylation des deux résidus Thr-14 et Tyr-15 par la phosphatase à double spécificité CDC25-C

Figure 4 : L'activation et inactivation de CDK1

La description de ce schéma et des facteurs impliqués sont présentés dans le texte ci-contre



qui va permettre l'activation de CDK1 (Gautier et al., 1991 ; Kumagai et Dunphy, 1991 ; Strausfeld et al., 1991) (**Figure 4 (4)**).

En interphase, l'activité de Wee1/Myt1 est supérieure à celle de CDC25-C alors qu'en phase M la situation s'inverse et l'activité de CDC25-C devient dominante. Le mécanisme de ce basculement n'est pas encore élucidé. L'activation de CDK1/cycline B actif va entraîner la phosphorylation de Wee1/Myt1 et CDC25-C ce qui respectivement inhibe et active ces enzymes (Kumagai et Dunphy, 1992 ; Hoffmann et al., 1993 ; Izumi et Maller, 1993 ; Mueller et al., 1995a) (**Figure 4 (5)**). Une boucle d'autoamplification va ainsi conduire à l'activation brutale de l'ensemble des complexes CDK1/cycline B présents. Il faut noter que le basculement du rapport de l'activité des kinases Wee1/Myt1 et de la phosphatase CDC25-C en rapport avec leur état de phosphorylation ne dépend pas uniquement de l'activation de CDK1. Ainsi, par exemple, l'activation de CDC25 par phosphorylation implique non seulement CDK1/cycline B mais aussi Plk1 (Polo like kinase 1) (Kumagai & Dunphy, 1996 ; Karaïskou et al., 1998 ; Karaïskou et al., 1999 ; Qian et al., 2001) (**Figure 4 (6)**). De même, l'inactivation de Wee1/Myt1 par phosphorylation implique l'intervention des kinases PKB/AKT (Okumura et al., 2002) et p90^{RSK} (Palmer et al., 1998) (**Figure 4 (6)**).

D'autre part, l'activation du complexe est associée à la phosphorylation de la cycline B sur plusieurs sites (Meijer et al., 1989 ; Izumi et Maller, 1991). Cette phosphorylation catalysée par CDK1 (Borgne et al., 1999) et Plk (Peter et al., 2002) est indispensable à l'activation de CDK1 (Peter et al., 2002). (**Figure 4 (7)**).

Le complexe CDK1/cycline B actif est transporté dans le noyau (Ookata et al., 1992 ; Porter et Donague, 2003) en début de prophase. Cette translocation est nécessaire à l'activité du complexe et lui permet de phosphoryler ces

substrats nucléaires (Dorée, 2003 ; Meijer, 2003 ; Porter et Donague, 2003 ; Murray, 2004) (**Figure 4 (8)**).

En fin de phase M, l'APC (Anaphase Promoting Complex) va être activée par phosphorylation catalysée par CDK1 et Plk (Hershko, 1999 ; Golan et al., 2002 ; Kraft et al., 2003). Ceci va entraîner la dégradation par protéolyse de la cycline B qui induit donc l'inactivation de CDK1 et la sortie de mitose (**Figure 4 (9)**).

Il faut noter que le schéma décrit ci-dessus est simplifié par certains aspects. En effet, les événements et facteurs impliqués dans l'activation de CDK1 sont plus étendus que ceux présentés ici (d'autres protéines que celles citées sont impliquées dans l'activation/inhibition de Wee1/Myt1 et CDC25 comme les protéines de la famille 14-3-3 ou encore les phosphatase 2A et B) (Dorée, 2003 ; Porter et Donague, 2003). D'autre part, des modifications de ce schéma sont à envisager en fonction de l'espèce étudiée. Ainsi, par exemple, la synthèse de cycline B n'est pas nécessaire à la première division méiotique des ovocytes de xénope ou d'oursin qui contiennent déjà en G2 un pool de pré-MPF (complexe CDK1/Cycline B inactif) suffisant pour promouvoir l'entrée en phase M (Minshull et al 1991 ; Dorée, 2003 ; Voronina et al., 2003).

Ce schéma permet néanmoins de comprendre globalement 1) la régulation temporelle de l'activité de CDK1/cycline B, 2) l'irréversibilité de cette activation et 3) de mettre en exergue certains facteurs indispensables à cette activation.

2-3-4- Généralités sur les substrats de CDK1.

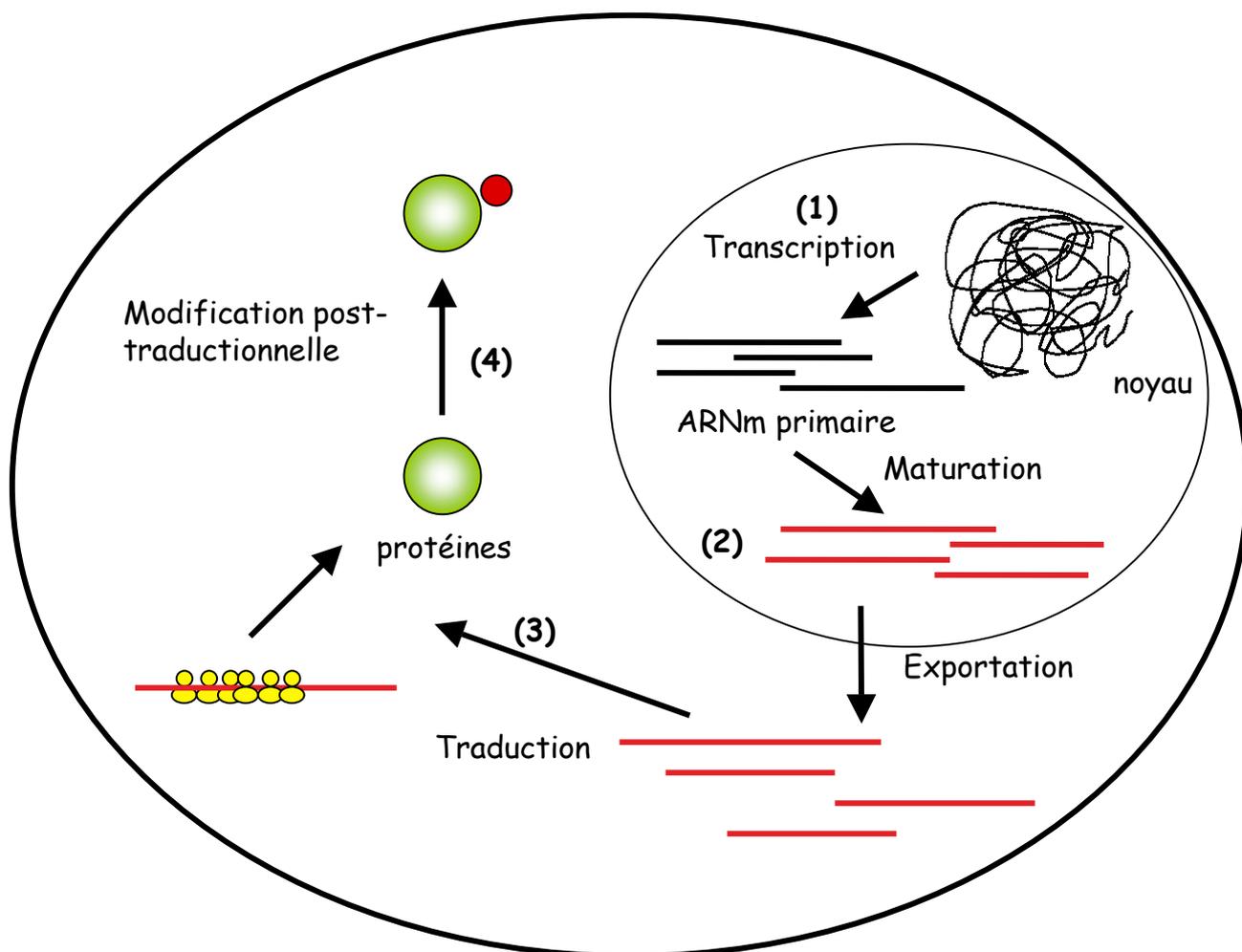
La diversité des substrats connus ou proposés de CDK1 lui confère un rôle avéré ou potentiel dans de nombreux processus cellulaires. CDK1 joue un rôle important dans le contrôle de l'entrée et la sortie de mitose en intervenant

dans : la rupture de l'enveloppe nucléaire (phosphorylation des lamines tapissant la membrane interne de l'enveloppe nucléaire); dans la condensation de la chromatine (par la phosphorylation des histones); la ségrégation des chromosomes ; la formation du fuseau ; et dans la cytokinèse (Nigg, 1991 ; Nigg, 1993 ; Stukenberg et al., 1997 ; Ubersax et al., 2003). D'autres cibles de CDK1 interviennent dans d'autre processus comme la transcription et la traduction (Nigg, 1991 ; Nigg, 1993 ; Stukenberg et al., 1997 ; Ubersax et al., 2003). CDK1 a de nombreux autres rôles et en particulier comme nous le verrons ultérieurement, dans la régulation de l'activité traductionnelle.

Le site consensus de phosphorylation de CDK1 est K/R-S/T-P-X-K/R (Nigg, 1991). Certains de ces substrats, comme la PAP (Poly(A)polymérase possèdent de nombreux sites, consensus et non-consensus, phosphorylés par CDK1 (Colgan et al., 1998). Colgan montre que la phosphorylation de l'ensemble des sites présents dans la PAP est nécessaire à son inactivation. Elle émet l'hypothèse qu'un fort taux de CDK1 actif, en permettant de dépasser un niveau seuil de phosphorylation, est nécessaire pour induire l'inhibition de la PAP contrairement à d'autres substrats possédant moins de sites de phosphorylation et ainsi sensibles à une plus faible quantité de CDK1 actif. Ce modèle suggère l'existence de phosphorylation séquentielle et donc d'activation ou inactivation séquentielle de substrat de CDK1 qui expliquerait la coordination des évènements au cours de la mitose.

Afin de vous présenter les modifications de l'activité traductionnelle observées en phase M et les mécanismes susceptibles d'intervenir dans ces modifications, une introduction sur la traduction et les facteurs impliqués est tout d'abord nécessaire.

Figure 5 : La régulation de l'expression des gènes
La description de ce schéma est présentée dans le texte ci-contre



B- La traduction.

1- La régulation de l'expression des gènes.

Les protéines ou polypeptides représentent 44 % de la masse sèche chez l'homme, elles assurent des rôles de structure, de transport, de régulation et bien d'autres dans tout organisme vivant. La production des protéines, spécifiquement dans un type cellulaire ou à un moment précis de la vie de la cellule, implique l'existence de mécanismes de contrôle. L'expression d'un gène depuis l'ADN jusqu'à la production d'une protéine active peut être régulée à plusieurs niveaux (**Figure 5**).

1- Au niveau transcriptionnel : ce premier niveau de contrôle détermine si un gène particulier est transcrit et si oui en quelle quantité (**Figure 5 (1)**).

2- Au niveau post-transcriptionnel : plusieurs étapes sont en effet nécessaires à la maturation de l'ARN messenger primaire, présent dans le noyau, à un ARN messenger (ARNm) traduisible en polypeptide, présent dans le cytoplasme. Ce niveau de régulation inclus : l'épissage ; l'ajout en 5'UTR d'une structure particulière appelé CAP ou coiffe composée d'une 7 méthyle guanosine triphosphate (m7GTP) ; l'ajout en 3'UTR de l'ARNm d'une queue poly(A) ; le transport de l'ARNm mature du noyau vers le cytoplasme et la stabilité de l'ARN messenger (**Figure 5 (2)**).

3- Au niveau traductionnel. Ce niveau détermine si un ARNm donné est effectivement traduit en protéines et avec quelle efficacité (**Figure 5 (3)**).

4- Au niveau post-traductionnel. Des modifications post-traductionnelles telles que clivage, phosphorylation, glycosylation, ubiquitination et protéolyse, sont en effet impliquées dans l'activation ou l'inactivation des protéines ainsi que dans

leur localisation (**Figure 5 (4)**).

2- La traduction : mécanismes et facteurs impliqués.

Après transcription, épissage et exportation nucléocytoplasmique, les ARNms sont potentiellement prêts à être traduits. Cependant deux ARNms en quantité équivalente peuvent être traduits à des niveaux différents en fonction des conditions. Ainsi, la régulation traductionnelle d'un ARNm joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression des gènes. Le contrôle traductionnel permet une régulation fine, directe, rapide et localisée du taux de protéine et ainsi l'adaptation immédiate et directe de la quantité de protéine indépendamment de la voie nucléaire. La traduction joue ainsi un rôle crucial dans le développement, la différenciation, la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose (Matthews et al., 2000). La traduction fait intervenir une machinerie biologique extrêmement élaborée. Elle comprend trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

2-1- L'initiation.

L'initiation permet le recrutement et la spécification de la phase de lecture d'un ARNm. Cette étape implique l'intervention d'au moins 11 facteurs d'initiation eIFs (eucaryotic Initiation Factors). L'initiation est composée de plusieurs étapes décrites ci-dessous et dans la **Figure 6** : (Clemens and Bommer, 1999 ; Gingras et al., 1999 ; Raught et Gingras, 1999 ; Hershey et Merrick, 2000 ; Jackson, 2000) :

La dissociation du ribosome 80 S : Les sous-unités 40 et 60 S du ribosome 80 S doivent être dissociées pour que l'initiation puisse avoir lieu (1). Les facteurs d'initiation eIF3 et eIF1A lient la sous-unité ribosomale 40 S et le facteur eIF6 lient la sous-unité 60 S interviennent pour empêcher l'association

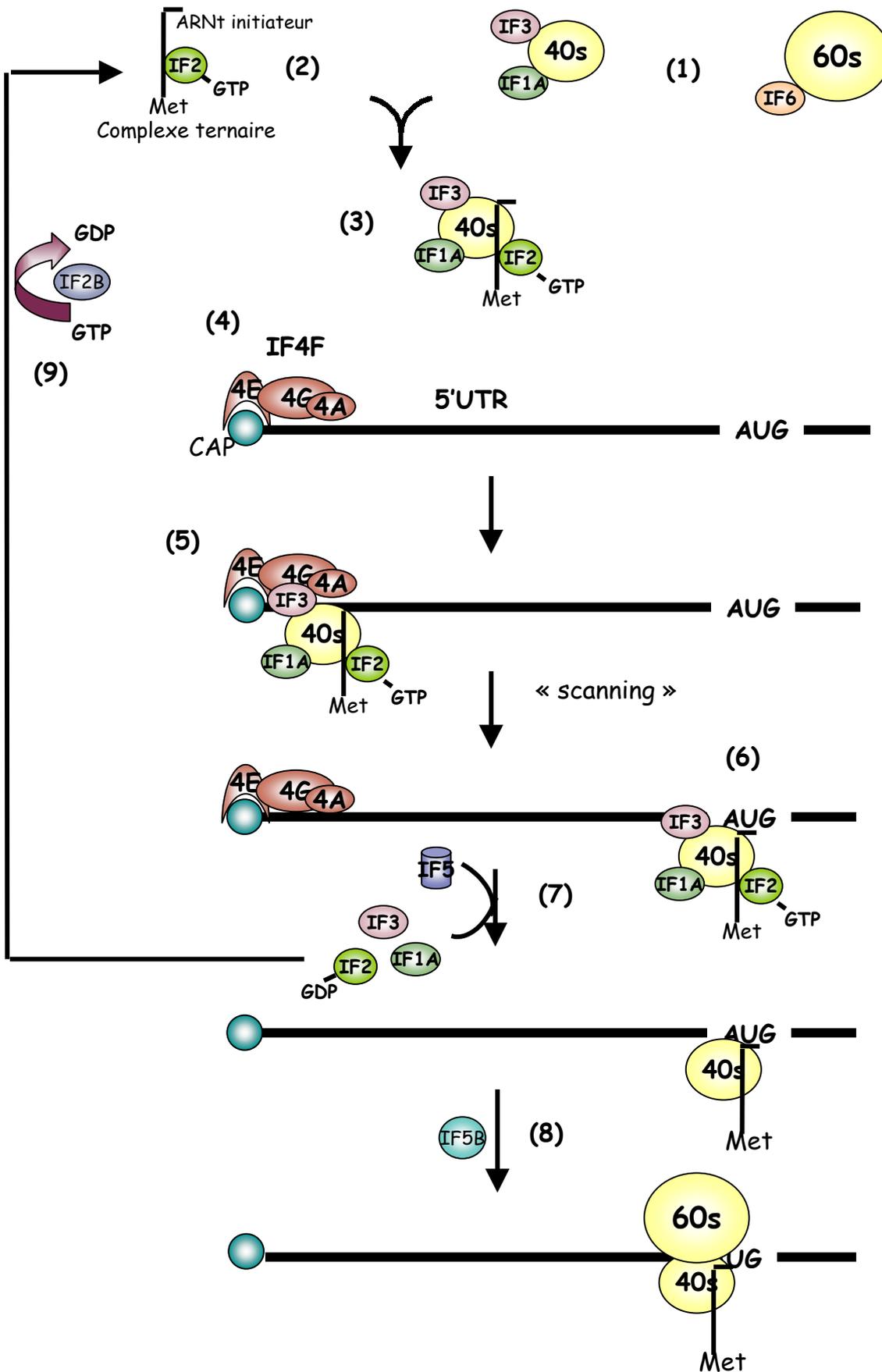


Figure 6 : L'initiation

La description de ce schéma et des facteurs impliqués sont présentés dans le texte ci-contre

des deux sous-unités ribosomales.

Formation du complexe de préinitiation : liaison ARNt-Méthionine initiateur à la sous-unité ribosomale 40 S : Le facteur eIF2-GTP lie l'ARNt-Méthionine initiateur pour former un complexe ternaire (2). Celui-ci s'associe à la sous-unité ribosomale 40 S pour former un complexe de préinitiation 43 S stabilisé par eIF3 et eIF1A (3).

Liaison du complexe de préinitiation à l'ARNm : mécanisme cap-dépendant : La coiffe 7mGTP de l'ARNm est reconnue par eIF4E présent dans un complexe hétérotrimérique eIF4F composé de : eIF4E, eIF4A et eIF4G (4). L'activité hélicase ATP-dépendante du facteur eIF4A permet le dépliement des structures secondaires de l'ARNm indispensable à la liaison du complexe de préinitiation. Cette activité est augmentée par l'action d'eIF4B et eIF4H. Une fois les structures secondaires dépliées, une interaction eIF4G-eIF3 (lié à la sous-unité ribosomale 40 S) conduit le ribosome vers l'ARNm. Ainsi, un pont protéique est formé entre la coiffe m7GTP de l'ARNm et le ribosome (m7GTP-eIF4E-eIF4G-eIF3-40 S) (5).

« Scanning » de l'ARNm, reconnaissance du codon initiateur et fixation de la sous-unité ribosomale 60 S : Après la fixation du complexe d'initiation à l'ARNm par l'intermédiaire de la coiffe, le ribosome va rechercher le codon initiateur en glissant le long de l'ARNm par un mécanisme dit de « Scanning » (6). Dans certains cas, le ribosome 40 S ne migre pas de manière continue, mais saute d'une région à l'autre par un mécanisme appelé « shunting ». Une fois la liaison ribosome/codon initiateur stable, les facteurs d'initiation seront libérés (7). Ceci est médié par l'activité GTPase d'eIF5 qui stimule l'hydrolyse du GTP lié à eIF2. La dissociation des facteurs d'initiation ainsi que l'activité du facteur eIF5B permet ensuite la fixation de la sous-unité 60 S et le début de l'élongation (8).

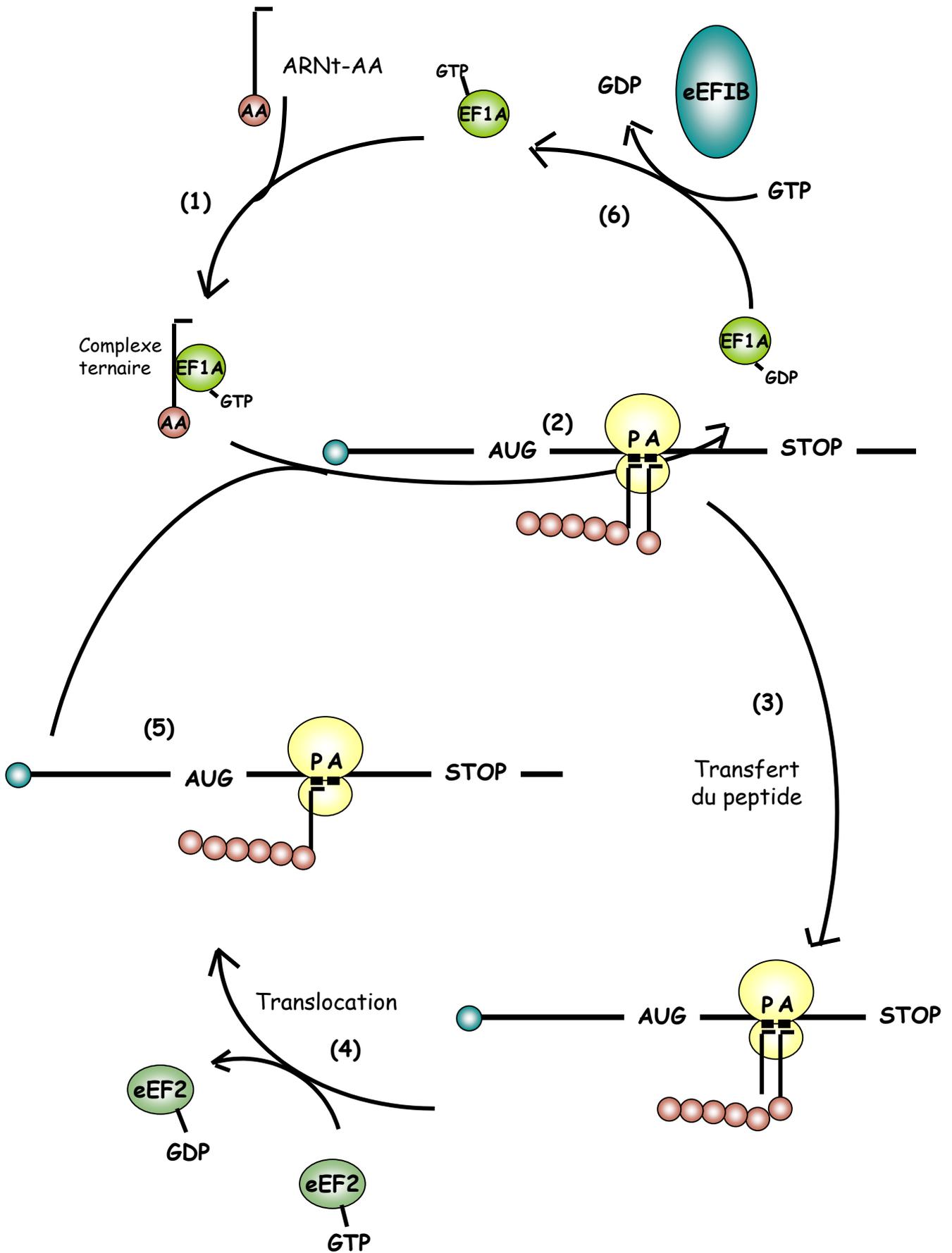


Figure 7 : L'élongation

La description de ce schéma et des facteurs impliqués sont présentés dans le texte ci-contre

Le facteur eIF2B est requis pour l'échange GTP/GDP afin de régénérer le complexe actif eIF2-GTP (9).

2-2- L'élongation.

L'élongation consiste en l'allongement de la chaîne polypeptidique naissante par ajouts successifs d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale de la chaîne polypeptidique naissante en accord avec la séquence de l'ARNm. Elle fait intervenir un certain nombre de facteurs appelés eEFs (eucaryotics E_longation F_actors) (Figure 7) (Merrick et Nyborg, 2000 ; Browne et Proud, 2002).

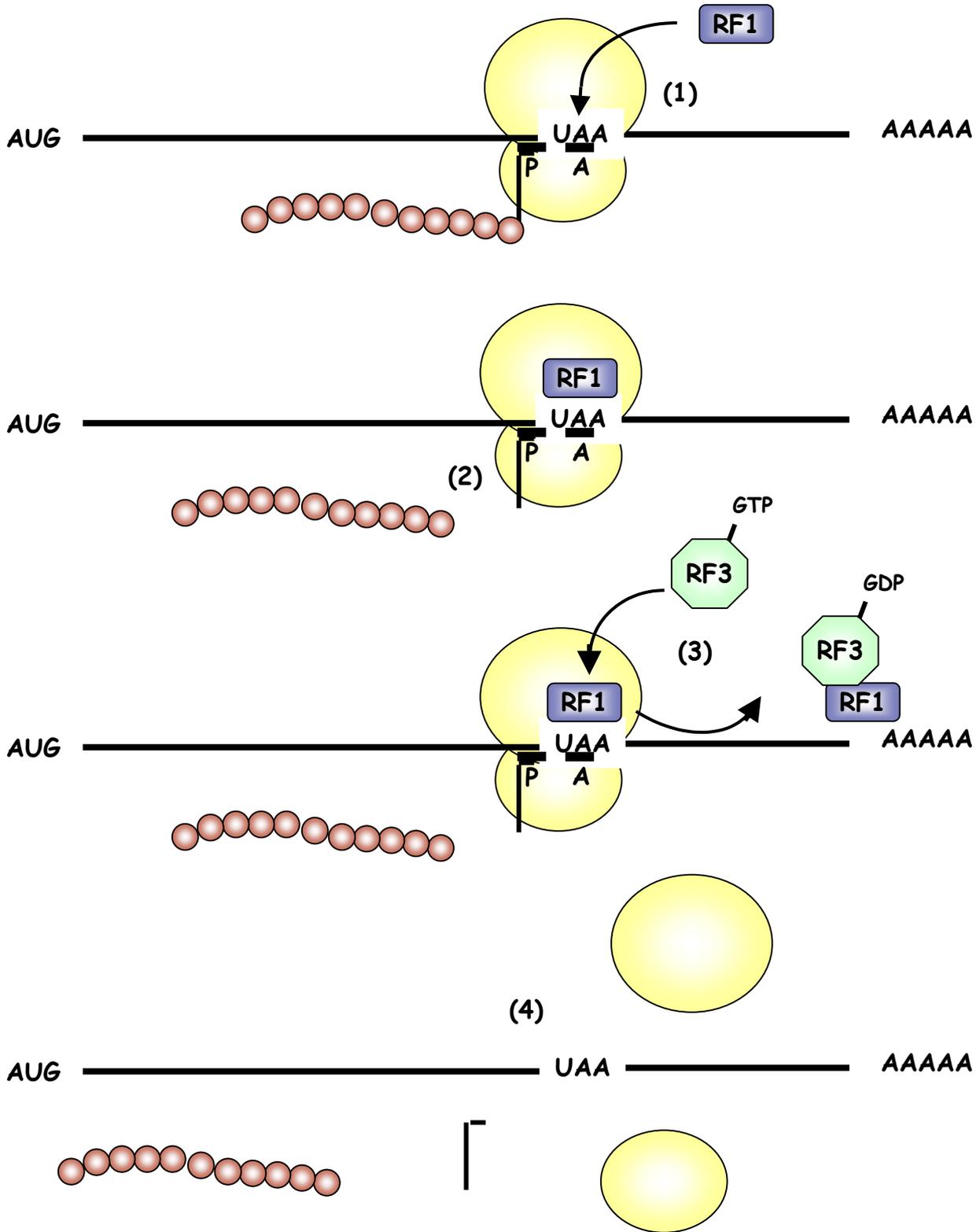
Ce processus requiert les facteurs eEF1A et eEF1B intervenant dans le recrutement de l'ARNt-acide aminé au site A du ribosome et eEF2 pour médier l'étape de translocation pendant laquelle le ribosome se déplace d'un codon sur l'ARNm.

L'élongation débute par la formation d'un complexe ternaire entre l'ARNt-AA et eEF1A lié au GTP (1). Ce complexe entre au niveau du ribosome, se fixe au site A du ribosome et le GTP lié à eEF1A est hydrolysé en GDP, eEF1A-GDP est alors libéré (2). L'activité peptidyl transférase de la sous-unité ribosomale 60 S permet la formation d'une liaison peptidique entre la chaîne polypeptidique naissante, située au site P, et le nouvel acide aminé (3). eEF2 va ensuite catalyser la translocation du peptidyl-ARNt du site A vers le site P (4). Après hydrolyse du GTP, eEF2-GDP quitte le ribosome et le site A est de nouveau libre pour la fixation d'un nouvel ARNt-acide aminé (5). eEF1A est rechargé en GTP par l'intervention du facteur eEF1B, complexe trimérique composé d'eEF1 β , δ et γ qui possède une activité d'échange de nucléotide (6) (Merrick et Nyborg, 2000 ; Brown et Proud, 2002).

2-3- La terminaison.

Figure 8 : La terminaison

La description de ce schéma et des facteurs impliqués sont présentés dans le texte ci-contre



La terminaison est l'étape finale de la traduction d'un ARNm. Elle est catalysée par des facteurs de type « Releasing Factors » (eRFs) (**Figure 8**). La présence de l'un des trois codons stop (UAA, UAG ou UGA) au site A du ribosome entraîne la fixation et la reconnaissance du facteur eRF1 (**1**) suivi de l'hydrolyse de la liaison ester liant l'ARNt localisé au site P et la chaîne polypeptidique (**2**). Le facteur eRF3 est nécessaire pour promouvoir la dissociation d'eRF1 et libérer le site A de manière dépendante du GTP (**3**). Par la suite, la dissociation des sous-unités ribosomales et de l'ARNt intervient (**4**) par l'intervention des facteurs RF4 (Ribosome recycling factor 4), eEF2 et eIF3, facteurs aussi impliqués dans le recyclage des sous-unités ribosomales (Mugnier et Tuite, 1999 ; Welch et al., 2000).

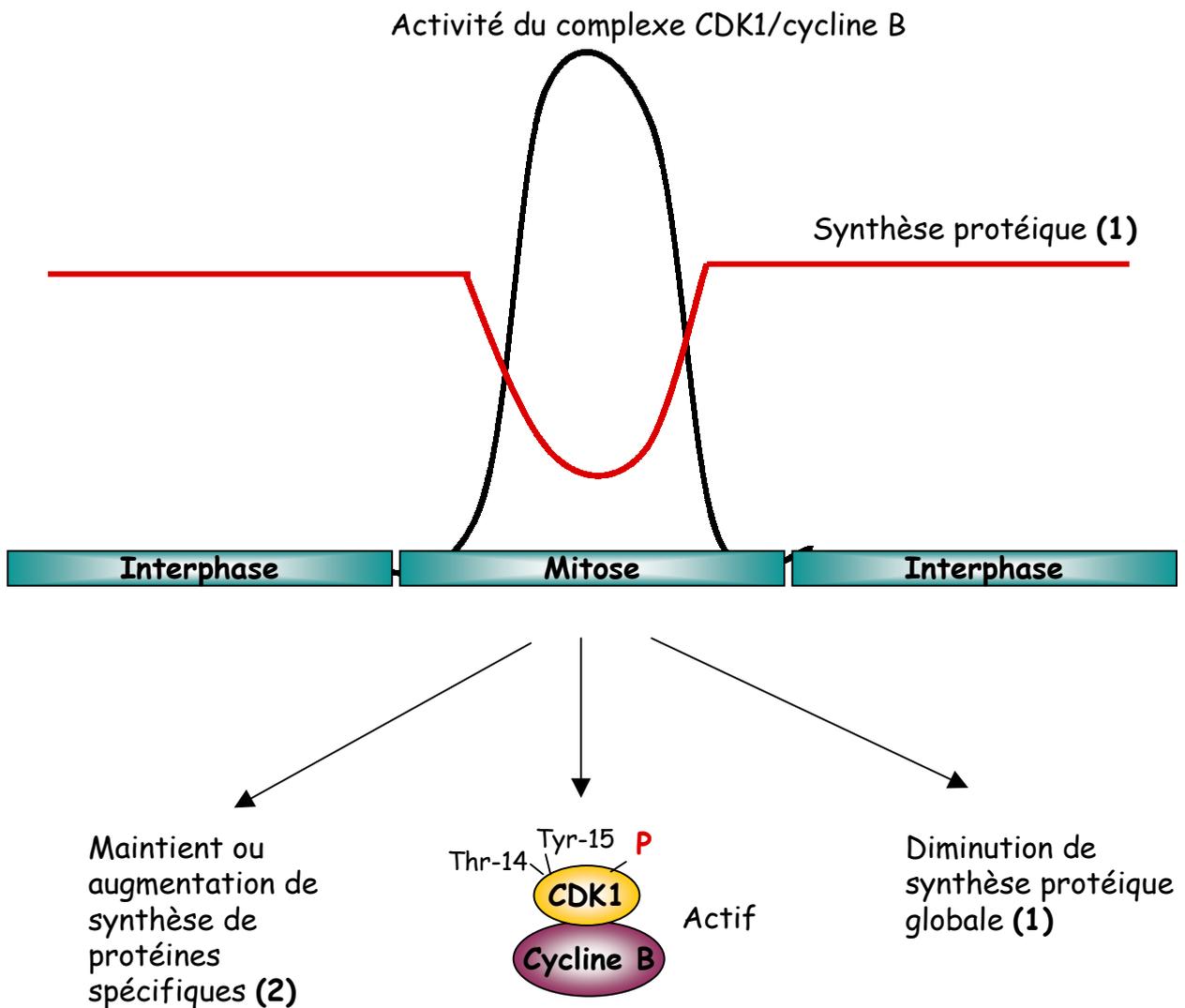


Figure 9 : Activité traductionnelle en aval de l'activité CDK1/cycline B

C- Régulation traductionnelle en aval de l'activation de CDK1.

Le taux de synthèse protéique de cellules en G2/M ou en mitose représente 25-30 % du taux de synthèse de cellules interphasiques (**Figure 9 (1)**) (Fan and Penman, 1970 ; Howell et Baumgartel, 1978 ; Bonneau et Sonenberg, 1987 ; Kanki et Newport, 1991 ; Pyronnet et al., 2001). En revanche, la traduction de certains messagers échappe à cette inhibition puisque leur synthèse est maintenue ou augmentée en mitose (**Figure 9 (2)**). Ainsi, il semble qu'environ 3 % des ARNms restent associés aux polysomes et sont donc activement traduits en phase M (Qin et Sarnow, 2004). C'est le cas de l'ornithine decarboxylase (ODC) (Pyronnet et al., 2001), de p58^{PITSLRE} (Cornelis et al., 2000) ou de c-myc (Kim et al., 2003) dans des cellules humaines en culture et des cyclines A et B en phase M du cycle embryonnaire précoce du xénope (Groisman et al., 2002). D'autre part, lors d'une infection virale, les ARNm de poliovirus sont activement traduits en phase M et échappent ainsi à l'inhibition globale de synthèse protéique (Bonneau et Sonenberg, 1987).

1- Diminution de synthèse protéique observée en phase M.

Alors que l'inhibition de la synthèse protéique en phase M est bien documentée (Fan et Penman, 1970 ; Howell et Baumgartel, 1978 ; Tarnowka et Baglioni, 1979 ; Bonneau et Sonenberg, 1987 ; Kanki et Newport, 1991 ; Pyronnet et al., 2001 ; Qin et Sarnow, 2004), les mécanismes entraînant une telle inhibition sont controversés. Dans la plupart des études, une dissociation des ARNms des polysomes a été observée (Fan et Penman, 70 ; Tarnowka et Baglioni, 1979 ; Bonneau et Sonenberg, 1987 ; Qin et Sarnow, 2004) et l'inhibition de l'étape d'initiation proposée comme le mécanisme responsable de cette régulation. Dans d'autres études, la dissociation des ARNms des polysomes n'a

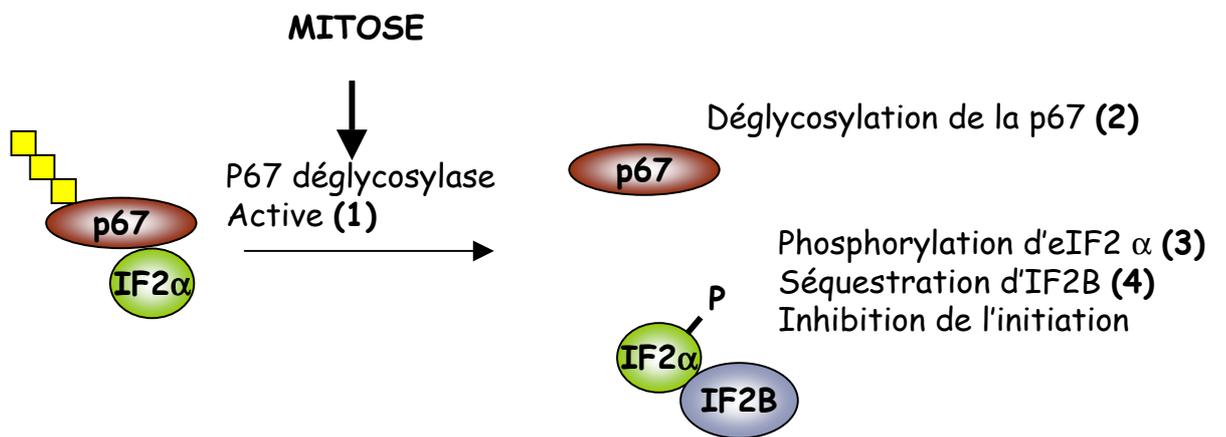


Figure 10 : La facteur eIF2 en phase M

pas été observée (Eremenko et Volpe 1975) et dans deux cas, l'inhibition de l'élongation a été démontrée (Howell et Baumgartel, 1978 ; Monnier et al., 2001b). Il semble alors probable que les deux mécanismes interviennent afin de diminuer la synthèse protéique globale en phase M. Différents facteurs impliqués dans l'initiation et l'élongation voient leur activité changer en mitose ce qui confirme cette hypothèse.

1-1- Régulation de l'initiation en phase M.

L'initiation est composée comme nous l'avons vu de deux étapes clefs ; la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt-Met-40 S et le recrutement de la machinerie de traduction à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm par le complexe eIF4F. Ces deux mécanismes sont susceptibles d'être régulés et d'ainsi modifier le taux de synthèse protéique globale de la cellule (Gingras et al., 1999 ; Hinnebusch, 2000).

1-1-1- Régulation du facteur eIF2.

La p67 (eIF2-associated 67-kDa glycoprotein) est une glycoprotéine qui protège eIF2 α de la phosphorylation (Datta et al., 1989 ; Ray et al., 1992). La glycosylation de p67 est nécessaire à son activité protectrice (Ray et al., 1993). En phase M, la p67-déglycosylase est activée (**Figure 10 (1)**), et p67 est déglycosylée (**2**) en parallèle de la phosphorylation d'eIF2 α (**3**) (Datta et al., 1999). eIF2 α phosphorylé séquestre d'eIF2B (**4**) et entraîne l'inhibition de la synthèse protéique (Kimball, 1999 ; Hinnebusch, 2000). Ceci pourrait au moins partiellement expliquer la diminution de synthèse protéique globale observée.

1-1-2- Régulation du facteur eIF4F.

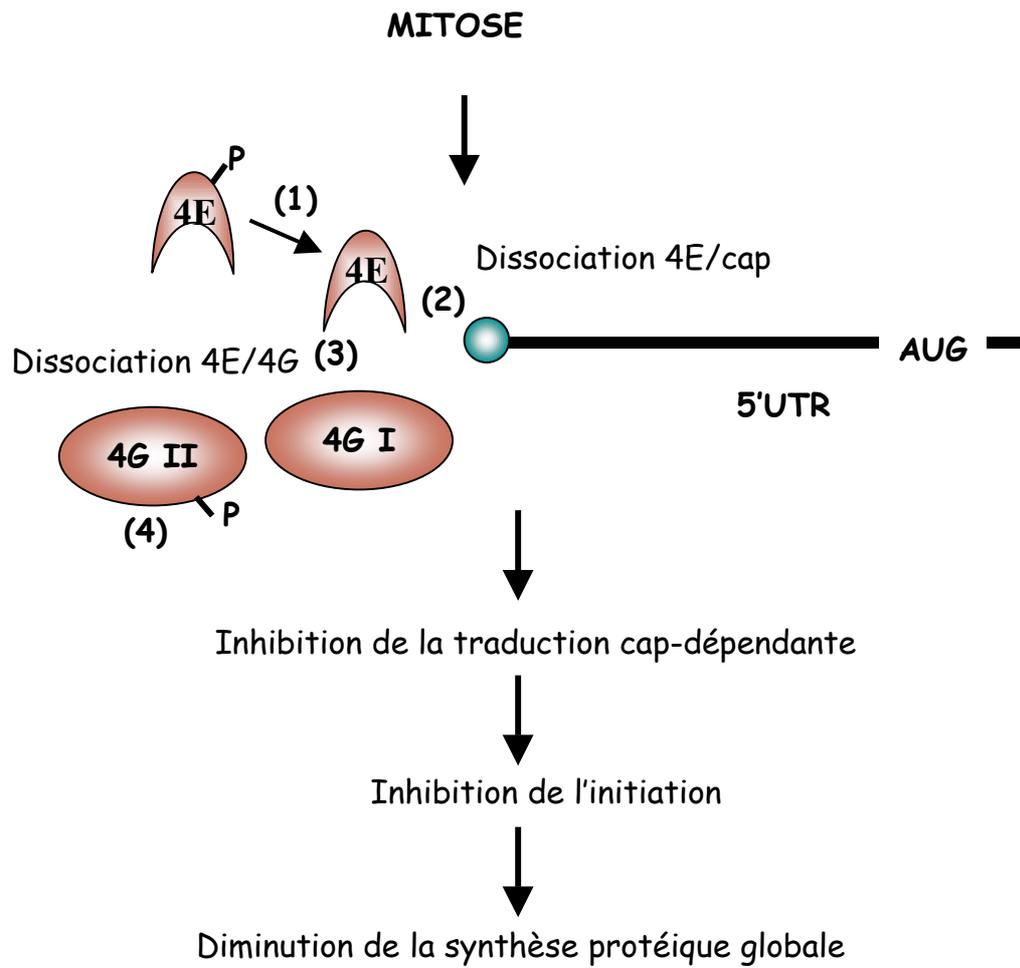


Figure 11 : Le facteur eIF4F en phase M

Le recrutement de la machinerie de traduction à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm par l'intervention du complexe eIF4F est lui aussi altéré en mitose (Fan et Penman, 70 ; Tarnowka et Baglioni, 1979 ; Bonneau et Sonenberg, 1987 ; Pyronnet et al., 2001 ; Qin et Sarnow, 2004).

a- Modification post-traductionnelle d'eIF4E.

eIF4E est le facteur d'initiation limitant dans la plupart des types cellulaires (Hiremath et al., 1985 ; Duncan et al., 1987). Ainsi eIF4E est la cible courante du contrôle traductionnel. L'activité d'eIF4E peut être régulée par phosphorylation et liaison de répresseur (Gingras et al., 1999). En phase M, il a été montré qu'eIF4E est hypophosphorylé en parallèle d'une diminution de sa capacité de liaison à la structure CAP (**Figure 11 (1 et 2)**) (Bonneau et Sonenberg, 1987 ; Pyronnet et al., 2001). La conséquence de la phosphorylation d'eIF4E n'est cependant pas clairement établie. Certaines études montrent que cette phosphorylation entraîne la formation d'un complexe plus stable avec le CAP (Minich et al., 1994). Ceci est controversé puisque d'autres études montrent à l'inverse qu'eIF4E phosphorylé a moins d'affinité pour des analogues du CAP (Scheper et al., 2002 ; Zuberek et al., 2003). Chez les mammifères, le candidat le plus probable responsable de la phosphorylation d'eIF4E est Mnk1 (MAP Kinase-interacting protein kinase 1) activée par la voie MAP kinase (Mitogen Activated Protein kinase) (Pyronnet et al., 1999). Mnk1 interagit avec eIF4G et phosphoryle eIF4E (Pyronnet et al., 1999 ; Waskiewicz et al., 1999 ; Pyronnet et al., 2001). Ce mode de recrutement permet de limiter la phosphorylation d'eIF4E à sa forme complexée. L'intervention d'autres kinases n'est cependant pas à exclure. En effet, la PKC (Proteine Kinase C) par exemple est aussi capable de phosphoryler eIF4E *in vitro* (Whalen et al., 1996).

b- La liaison eIF4E/eIF4G en phase M.

Il existe deux isoformes d'eIF4G : eIF4GI et eIF4GII chez les mammifères (Gradi et al., 1998). La capacité de liaison d'eIF4GI et eIF4GII à eIF4E est diminuée en mitose (**Figure 11 (3)**) impliquant une diminution de la traduction CAP-dépendante (Pyronnet et al., 2001).

Dès lors, deux hypothèses peuvent être posées : 1) l'hypophosphorylation d'eIF4E diminue sa capacité de liaison à la structure cap entraînant une inhibition de la traduction cap dépendante et/ou 2) La dissociation eIF4E/eIF4G entraîne non seulement l'inhibition de la traduction cap-dépendante mais aussi l'hypophosphorylation d'eIF4E puisque MnK1 ne peut plus interagir avec eIF4E.

eIF4G peut être phosphorylé (Gingras et al., 1999). Il a notamment été montré qu'eIF4GII est phosphorylé en mitose en parallèle de sa dissociation d'avec eIF4E (Pyronnet et al., 2001) (**Figure 11 (4)**). Cependant, la conséquence fonctionnelle de la phosphorylation d'eIF4G n'est pas encore déterminée.

La dissociation eIF4G/eIF4E peut aussi être régulée par clivage protéolytique d'eIF4G (Gingras et al., 1999). Certaines infections virales ou encore l'apoptose induisent le clivage d'eIF4GI et/ou eIF4GII empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F et la traduction cap-dépendante (Gingras et al., 1999 ; Belsham et Jackson, 2000 ; Schneider et Mohr, 2003). Or, aucun clivage d'eIF4G n'est observé en mitose (Pyronnet et al., 2001).

La question laissée ici sans réponse est pourquoi ces deux facteurs se dissocient en phase M. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant cette interaction peut être régulée par l'association de répresseurs à eIF4E.

c- Intervention de répresseurs.

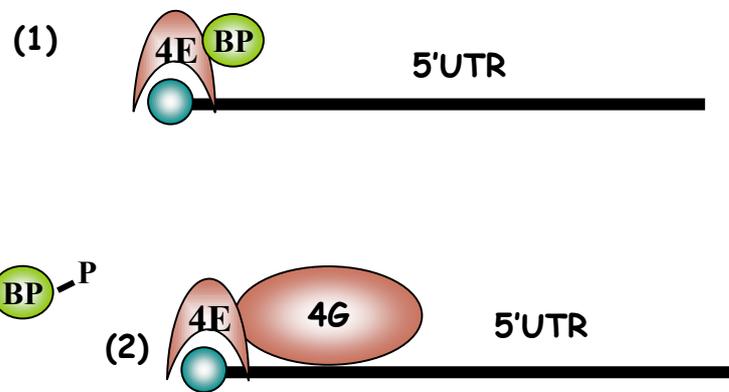


Figure 12 : Action du répresseur 4E-BP sur la modulation de l'initiation

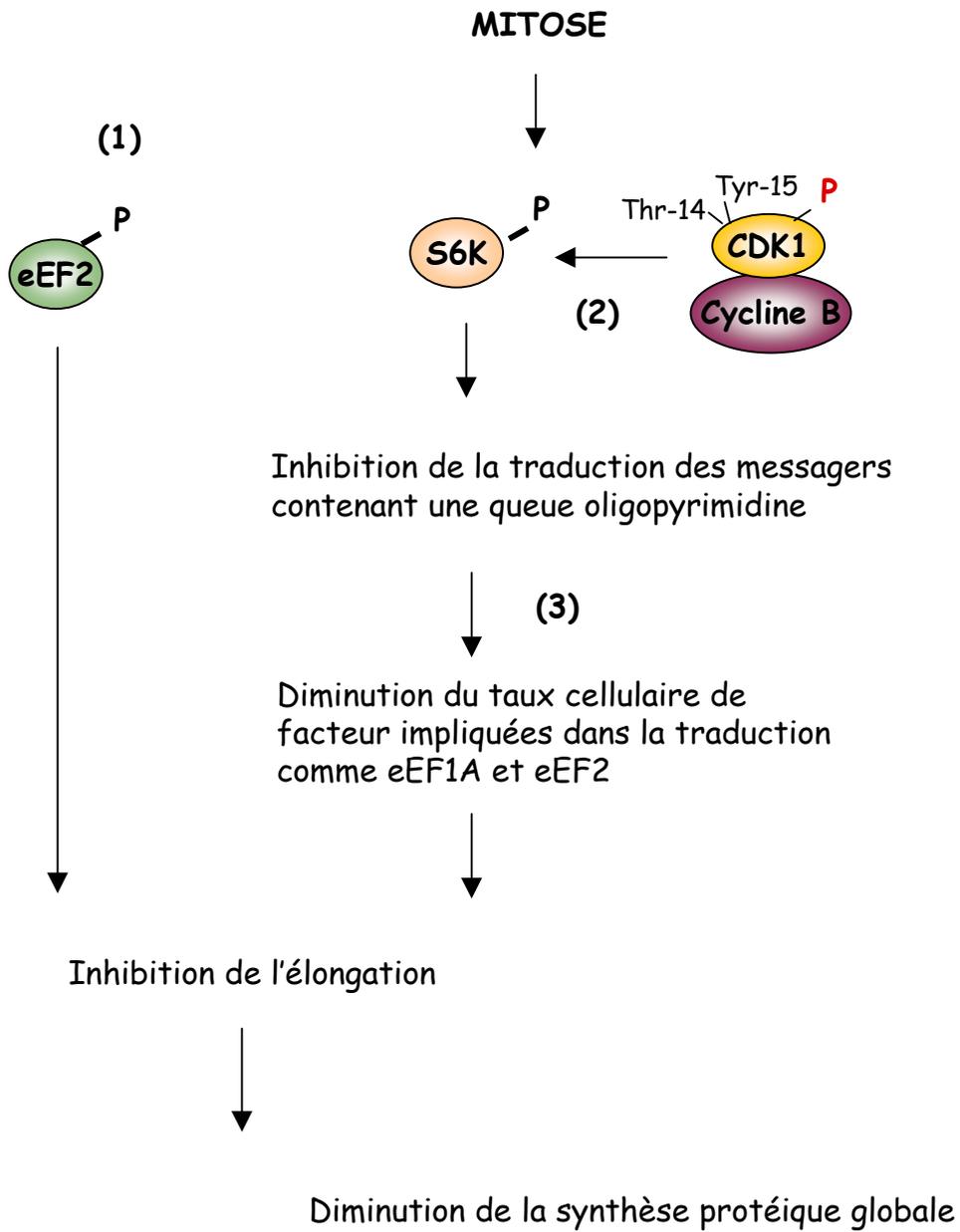
Le facteur eIF4F peut être régulé par une famille de répresseurs traductionnels, les eIF4E binding proteins (4E-BPs) (Dever, 1999 ; Gingras et al., 1999 ; Raught et al., 2000 ; Cormier et al., 2003). 4E-BP est un petit polypeptide de 16 kDa qui possède le même site de liaison à eIF4E qu'eIF4G (Mader et al., 1995). Ceci induit une compétition entre 4E-BP et eIF4G pour la liaison à eIF4E. La fixation de 4E-BP à eIF4E séquestre donc eIF4E, empêche la liaison eIF4E-eIF4G et ainsi inhibe la traduction cap dépendante (Haghighat et al., 1995). La liaison eIF4E/4E-BP est réversible et son affinité est affectée par l'état de phosphorylation de 4E-BP. La forme hypophosphorylée de 4E-BP lie fortement eIF4E (**Figure 12(1)**), alors que l'hyperphosphorylation de 4E-BP abroge cette interaction (**Figure 12 (2)**) (Pause et al., 1994).

Il a été montré que 4E-BP1 est hypophosphorylé en mitose en parallèle d'une augmentation de son affinité avec eIF4E (Pyronnet et al., 2001). Ce résultat suggère qu'en mitose, 4E-BP se fixe à eIF4E et induit une diminution de la traduction cap-dépendante. Ceci expliquerait la dissociation eIF4E/eIF4G et la diminution de synthèse protéique globale observée en mitose. Cependant, ce résultat est controversé puisque d'autres études ont montré que 4E-BP1 est phosphorylé en mitose (Heesom et al., 2001 ; Cormier et al., communication personnelle). Cette phosphorylation est catalysée par CDK1 et entraîne la libération du facteur eIF4E (Heesom et al., 2001). Dans ce cas, 4E-BP n'interviendrait pas dans la diminution de synthèse protéique en phase M. Ainsi la question de l'intervention de 4E-BP dans la diminution de synthèse protéique en phase M reste sans réponse claire pour le moment.

1-2- Régulation de l'élongation en phase M.

L'inhibition de l'étape d'élongation peut, elle aussi, être impliquée dans la diminution de synthèse protéique globale observée en phase M. Différents

Figure 13 : Inhibition de l'élongation en mitose



mécanismes et facteurs sont connus pour changer l'efficacité de l'élongation, ce qui peut être nécessaire dans des situations de grande demande énergétique, l'inhibition de l'élongation libérant une grande quantité d'énergie alors disponible pour des évènements cellulaires primordiaux.

L'activité de certains des facteurs impliqués dans l'élongation change en mitose (**Figure 13**). Ainsi, le facteur d'élongation eEF2 est hyperphosphorylé en mitose (**1**) dans des cellules AMA en parallèle de l'inhibition de la synthèse protéique (Celis et al., 1990). Or il a été montré que la phosphorylation d'eEF2, inhibe son activité (Nairn et Palfrey, 1987 ; Ryazanov et al., 1988 ; Carlberg et al., 1990 ; Redpath et al., 1993 ; Proud, 2000). Ainsi il est possible qu'en mitose, l'inhibition de l'activité de ce facteur soit impliquée dans la diminution de synthèse protéique globale.

D'autre part, CDK1 phosphoryle la p70 S6 kinase (p70^{S6k}) en mitose dans des cellules humaines en culture (**2**) (Papst et al., 1998 ; Shah et al., 2003). Ceci induit l'inactivation de la p70^{S6k} et la déphosphorylation de la protéine ribosomale RPS6 (Shah et al., 2003). La p70^{S6k} est impliquée dans la traduction spécifique d'une population d'ARNm dit « TOP ARNm » dont font partie les facteurs eEF1 α , eEF2 et un grand nombre de protéines ribosomales (Meyuhas, 2000 ; Meyuhas et Hornstein, 2000). Ces ARNms sont caractérisés par la présence d'une région 5'UTR riche en oligopyrimidine. Ainsi CDK1 pourrait, par la phosphorylation de la p70^{S6k} entraîner une diminution de la traduction des « TOP mRNAs et ainsi diminuer le taux cellulaire des facteurs eEF1 α et eEF2. Ce qui, par la modulation de l'efficacité de l'élongation, pourrait participer à l'inhibition de synthèse protéique globale observée en phase M (**4**).

Les facteurs eEF1 δ et γ sont également phosphorylés par CDK1 au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope (Bellé et al., 1989 ; Janssen et al.,

1991 ; Mulner-Lorillon et al., 1994). L'effet de ces phosphorylations *in vivo* sur la traduction n'est pas caractérisé mais suggère une fois de plus une relation importante entre la machinerie de traduction et le cycle cellulaire. D'autre part, l'ajout du complexe CDK1/cycline B dans un lysat de réticulocyte, est corrélé à la phosphorylation d'eEF1 δ et γ et à la diminution du taux d'élongation de messagers synthétiques poly(valine), alors que le taux d'élongation de messagers synthétiques poly(phénylalanine) et poly(sérine) augmente (Monnier et al 2001a).

2- Mécanisme de régulation traductionnelle impliqué dans le maintien de la traduction de certains messagers spécifiques en phase M.

Le contrôle traductionnel est sélectif lorsqu'il module la synthèse d'un nombre limité d'ARNm dans la cellule. La traduction d'un ARNm spécifique est un processus extrêmement important dans la régulation de l'expression des gènes et contribue à divers processus cellulaires. Les éléments contrôlant la traduction d'un ARNm spécifique, appelés séquences cis, sont généralement localisés dans les régions 5' ou 3' non traduites de l'ARNm et vont interagir avec des éléments trans. Ainsi, la caractéristique d'un ARNm donné peut imposer des formes de contrôle spécifique.

2-1- Modulation de la polyadénylation cytoplasmique de messagers spécifiques en mitose.

2-1-1- Le mécanisme de polyadénylation cytoplasmique.

Un haut degré de corrélation existe entre polyadénylation et recrutement dans les polysomes (McGrew et al., 1989 ; Rosenthal et Ruderman, 1987 ; Jacobson, 1996 ; Sachs, 2000). La queue poly(A) en 3'UTR stimule efficacement la traduction en synergie avec la structure CAP (Gallie, 1991 ; Gallie et Tanguay,

1994 ; Iizuka et al., 1994). Ceci a conduit à poser l'hypothèse d'une circularisation de l'ARNm par l'interaction de la queue poly(A) et du CAP (Jacobson, 1996). La découverte de l'interaction du facteur d'initiation eIF4G avec les PABPs (poly(A) Binding proteins) liant la queue poly(A) de l'ARNm (Tarun and Sachs, 1996 ; Tarun et al., 1997) a permis de valider l'hypothèse de la circularisation de l'ARNm par l'interaction ARN-5'UTR-eIF4E-eIF4G-PABP-ARN 3'UTR. Ceci a été directement montré par microscopie atomique (Wells et al., 1998). Depuis lors, ce système a été largement décrit et admis, il explique l'influence que peut avoir la région 3'UTR dans la régulation de l'initiation de la traduction.

La polyadénylation cytoplasmique est médiée par deux séquences en 3'UTR : l'hexanucléotide AAUAAA proche d'une séquence riche en U appelée CPE pour Cytoplasmic Polyadenylation Element dont la séquence consensus est U₄₋₆AU (Fox et al., 1989 ; McGrew et al., 1989 ; Paris et Richter, 1990 ; Richter, 2000 ; Mendez et al., 2001). La séquence précise du CPE, le nombre de CPE, la distance entre le CPE et l'hexanucléotide ou les séquences adjacentes au CPE, régulent temporellement la mise en place de la polyadénylation (De Moor et Richter, 1999 ; Mendez et al., 2001 ; Charlesworth, 2004). Le mécanisme de polyadénylation cytoplasmique fait intervenir différents facteurs : une protéine se liant aux CPEs : la CPEB (CPE binding protein) (Paris et al., 1991 ; Hake et Richter, 1994 ; Stebbins-Boaz et al., 1996) ; le CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) liant l'hexanucléotide, et recrutant la PAP (poly(A) polymerase) (Dickson et al., 1999) ; la PAP, enzyme permettant l'élongation de la queue poly(A) (Fox et al., 1992 ; Ballantyne et al., 1995 ; Gebauer et Richter, 1995) ; la maskin qui interagit d'une part avec eIF4E sur le même site de liaison que celui d'eIF4G et d'autre part avec CPEB (Gingras et al., 1999 ; Stebbins-Boaz et al., 1999).

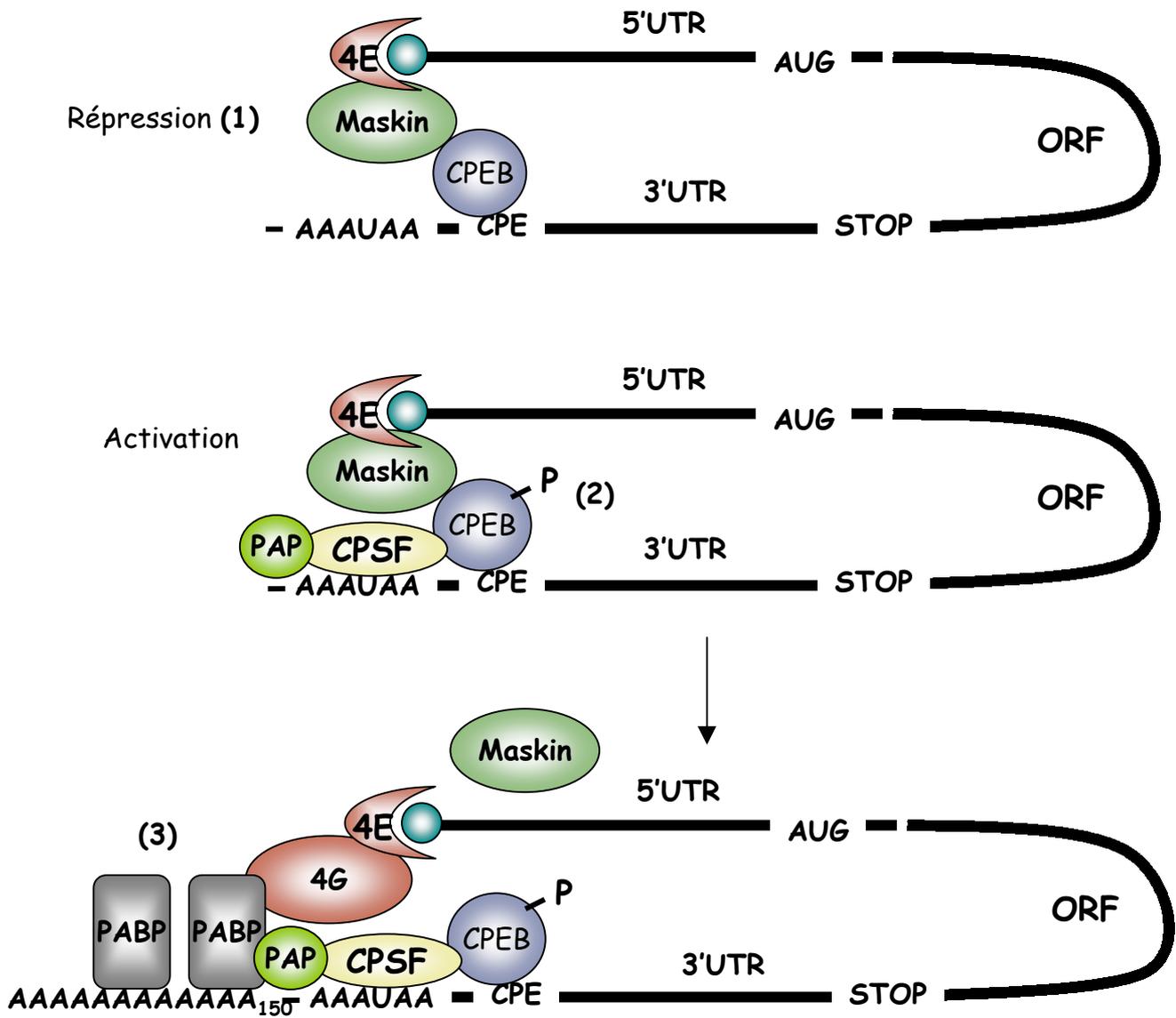


Figure 14 : Le mécanisme de Polyadénylation cytoplasmique

La description de ce schéma et des facteurs impliqués sont présentés dans le texte ci-contre

Les CPEBs sont impliqués aussi bien dans la répression de la traduction, ou masquage, que dans la polyadénylation (**Figure 14**) (Stebbins-Boaz et al., 1996 ; Walker et al., 1996 ; De Moor et Richter, 1999 ; Minshall et al., 1999). L'interaction de la CPEB avec différents partenaires explique ces rôles opposés (Stebbins-Boaz et al., 1999). Ainsi, dans l'ovocyte de xénope immature, la CPEB interagit avec la maskin qui en retour se lie au facteur d'initiation eIF4E et empêche la fixation du complexe d'initiation eIF4F et la traduction **(1)** (Stebbins-Boaz et al., 1999 ; Cao et Richter, 2002). Le messenger est alors sous forme dormante non traduite. Des modifications post-traductionnelles interviennent et modulent les interactions entre les différents partenaires. Ainsi, la phosphorylation de la CPEB augmente son affinité pour CPSF qui va recruter la PAP et induire la polyadénylation **(2)** (Mendez et al., 2000b). Cette polyadénylation va permettre la fixation efficace des PABPs qui vont interagir avec eIF4G et favoriser la liaison eIF4E-eIF4G au dépend de la liaison eIF4E-maskin et induire la traduction **(3)** (Mendez, 2001 ; Cao et Richter 2002). La phosphorylation de CPEB est catalysée par les kinases Eg2 (Aurora) et CDK1 (Mendez et al., 2000a ; Mendez et al., 2000b ; Mendez et al., 2002).

Le mécanisme d'induction de la traduction par polyadénylation cytoplasmique joue un rôle extrêmement important lors du développement précoce de nombreux organismes comme la souris, le xénope, la drosophile ou la palourde. Ainsi, par exemple, la polyadénylation de l'ARNm c-mos est nécessaire à la synthèse de la protéine c-mos et à la maturation de l'ovocyte de xénope (Stebbins-Boaz et al., 1996). Cependant ce mécanisme ne semble pas restreint au développement. En effet, il a été montré que la stimulation synaptique induit la polyadénylation et la traduction de messagers contenant des CPEs (Wu et al., 1998 ; Sachs, 2000). D'autre part, une CPEB possédant une capacité de liaison à l'ARN et dont l'ARNm est exprimé dans le cerveau et le coeur a été isolée chez

l'homme (Welk et al., 2001). De plus, une polyadénylation des messagers codant pour les cyclines A et B a été montrée dans des cellules humaines en culture (Groisman et al., 2002).

2-1-2- Polyadénylation de messagers spécifiques en phase M.

Il a été montré que les messagers codant pour les cyclines A et B sont polyadénylés en corrélation avec une augmentation de leur synthèse en phase M du cycle embryonnaire précoce du xénope (Groisman et al., 2002). L'augmentation de polyadénylation de ces messagers est corrélée à une diminution de la quantité de maskin alors que le taux de CPEB reste constant au cours du cycle (Groisman et al., 2002). Ces deux messagers sont aussi polyadénylés en phase M dans des cellules humaines en culture (Groisman et al., 2002).

D'autre part, il a été montré que la CPEB lors de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope et p82, l'homologue de CPEB, lors de la maturation méiotique de l'ovocyte de palourde sont phosphorylées par CDK1 (Walker et al., 1996 ; Walker et al., 1999 ; Mendez et al., 2002 ; Thom et al., 2003). Cette phosphorylation est nécessaire à la maturation méiotique et permet la polyadénylation et donc la traduction de certains messagers comme la cycline B (Walker et al., 1996 ; Walker et al., 1999 ; Mendez et al., 2002 ; Thom et al., 2003). La phosphorylation de CPEB par CDK1 induit sa dégradation partielle par ubiquitination et favorise la traduction de la cycline B en induisant un changement de ratio CPE/CPEB (Mendez et al., 2002). Cependant il est aussi possible que cette phosphorylation induise des changements d'interaction de CPEB avec des protéines réprimant la traduction de la cycline B. Ainsi, dans l'ovocyte de xénope immature, la protéine pumilio se lie à la région 3'UTR de la cycline B, par sa liaison à CPEB, et réprime sa traduction (Nakahata et al., 2001). En revanche, dans l'ovocyte mature, pumilio ne se fixe plus à la forme

phosphorylée de CPEB ce qui permet la traduction de la cycline B (Nakahata et al., 2001).

Il a été montré que les PAP I et II nucléaires bovines sont phosphorylées *in vitro* par CDK1 (Colgan et al., 1996 ; Colgan et al., 1998). Une phosphorylation de PAP en phase M dans des cellules HeLa et pendant la maturation méiotique du xénope a été observée (Ballantyne et al., 1995 ; Colgan et al., 1996). L'hyperphosphorylation des PAPs réduit fortement leur activité (Colgan et al., 1996). Ces résultats suggèrent qu'en phase M, CDK1 phosphoryle certaines PAPs et inhibe ainsi leur activité. Il semble ici y avoir un paradoxe entre phosphorylation de PAPs corrélée à leur inhibition (Colgan et al., 1996) et la polyadénylation de certains messagers spécifiques en phase M (Groisman et al., 2002). Ces résultats sont paradoxaux si l'on considère l'existence d'un seul type de PAP. Or plusieurs PAPs ont été observés dans de nombreux types cellulaires (Ballantyne et al., 1995 ; Gebauer et Richter, 1995 ; Zhao et Manley, 1996). Certaines PAPs pourraient ainsi rester actives en mitose et catalyser la polyadénylation cytoplasmique de certains messagers spécifiques. En accord avec cette hypothèse, le site consensus de phosphorylation de CDK1 manque dans une PAP cytoplasmique chez le xénope (Gebauer et Richter, 1995). D'autre part, une autre PAP : Neo-PAP n'est pas phosphorylée contrairement à la PAP II dans des cellules humaines (Topalian et al., 2001). De plus, les isoformes de PAPs phosphorylées en phase M sont nucléaires (Colgan et al., 1996 ; Ballantyne et al., 1995) et leur intervention dans le mécanisme de polyadénylation cytoplasmique n'est pas démontrée. L'inhibition de PAPs nucléaires en phase M pourrait être nécessaire afin que ces enzymes ne jouent pas de rôle dans la polyadénylation de messagers cytoplasmiques au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire.

2-2- Recrutement de messagers spécifiques en phase M par un mécanisme IRES-dépendant.

Nous avons vu que la traduction cap-dépendante est inhibée en mitose, en revanche lors d'une infection virale, la traduction des ARNm de poliovirus n'est pas affectée par cette inhibition (Bonneau et Sonenberg, 1987). Certains virus utilisent un mode alternatif de recrutement de la petite sous unité ribosomale 40 S, dit initiation interne de la traduction, ou traduction cap-indépendante. Ce mécanisme a été découvert lors de l'étude des ARNs de picornavirus et d'EMCV (encephalomyocarditis virus) (Jang et al., 1988 ; Pelletier et Sonenberg, 1988). L'initiation interne de la traduction est médiée par des éléments de séquence appelés IRES (Internal Ribosome Entry Site). Ces séquences sont présentes dans la plupart des cas dans la région 5'UTR de l'ARNm et recrutent la machinerie de traduction indépendamment du CAP. La structure tridimensionnelle plus que la séquence primaire est le déterminant majeur de la fonction des IRES viraux (Vagner et al., 2001 ; Jackson, 2000 ; Martinez-Salas, 2002). Les virus utilisent ainsi différents mécanismes comme le clivage protéolytique d'eIF4G ou l'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP afin d'empêcher la formation du complexe eIF4F, de bloquer la traduction cap-dépendante et favoriser l'expression de leurs transcripts au dépend de la cellule hôte (Belsham et Jackson, 2000).

De la même manière, la traduction de certains messagers cellulaires échappe à l'inhibition de synthèse observée en mitose puisque leur synthèse est maintenue ou augmentée. Ainsi, environ 3 % des ARNm restent associés aux polysomes et sont donc activement traduits pendant la mitose. Certains d'entre eux utilisent un mécanisme de traduction IRES-dépendant afin d'échapper à la diminution de traduction cap-dépendante en phase M (Qin et Sarnow 2004). C'est le cas de l'Ornithine décarboxylase (ODC) (Pyronnet et al., 2001), de p58^{PITSLRE} (Cornelis et al., 2000) ou de c-myc (Kim et al., 2003). Pour le moment, les mécanismes moléculaires intervenant dans la traduction IRES dépendante

Maintien de la synthèse de messagers spécifiques

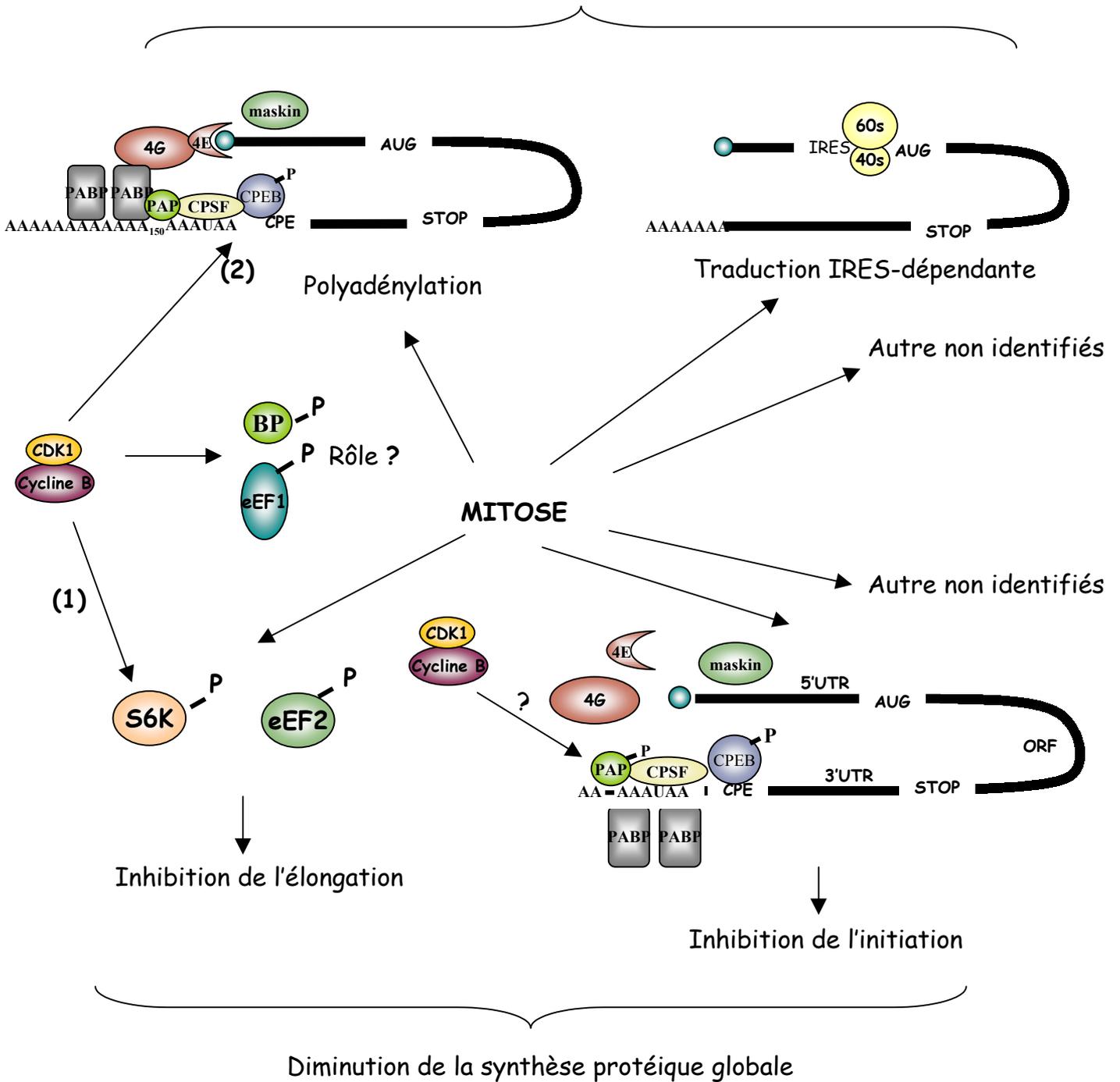


Figure 15 : Régulation de la synthèse protéique en phase M et implication de CDK1

restent flous. L'inhibition du mécanisme cap-dépendant pourrait libérer les facteurs d'initiation alors disponibles pour médier la traduction IRES dépendante (Vagnier, 2001 ; Martinez-Salas, 2002).

3- Bilan des régulations traductionnelles observées en phase M et du rôle de CDK1 dans ces régulations.

La corrélation temporelle entre modifications traductionnelles et activation du complexe CDK1/cycline B suggère un rôle de cette kinase dans la régulation de la traduction. Hypothèse d'autant plus vraisemblable que, comme nous l'avons vu, plusieurs cibles de CDK1 sont impliquées dans la machinerie de traduction. Ainsi, l'ensemble des données mentionnées (**Figure 15**) ci-dessus suggère d'une part que CDK1 pourrait être impliqué, au moins partiellement, dans la diminution de synthèse protéique globale en phase M en modulant l'activité de facteurs de la machinerie de traduction comme le S6 kinase **(1)** (Papst et al., 1998 ; Shah et al., 2003). D'autre part, CDK1 pourrait être impliqué dans la synthèse de messagers spécifiques en phase M via la phosphorylation de la CPEB (Mendez et al., 2002) **(2)**.

L'implication de CDK1 dans le contrôle de la traduction de messagers spécifiques en mitose est étayée par le fait qu'un rôle de CDK1 a été montré dans la synthèse de protéines spécifiques au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope. Ainsi, l'activation du MPF au cours de la première division méiotique stimule la synthèse de la protéine c-mos (Franck-vaillant et al., 1999) et induit la polyadénylation de certains messagers comme la cycline B via la phosphorylation de la CPEB (Ballantyne et al., 1997 ; De Moor et Richter, 1997 ; De Moor et Richter, 1999 ; Mendez et al., 2002). D'autre part, CDK1 et c-mos coopèrent aussi afin de permettre la synthèse du récepteur 1 au FGF (Fibroblast Growth Factor) (Culp et Musci, 1999).

Avant de vous présenter les résultats obtenus, nous terminerons ce chapitre introductif par la description du modèle utilisé et son adéquation avec la question posée.

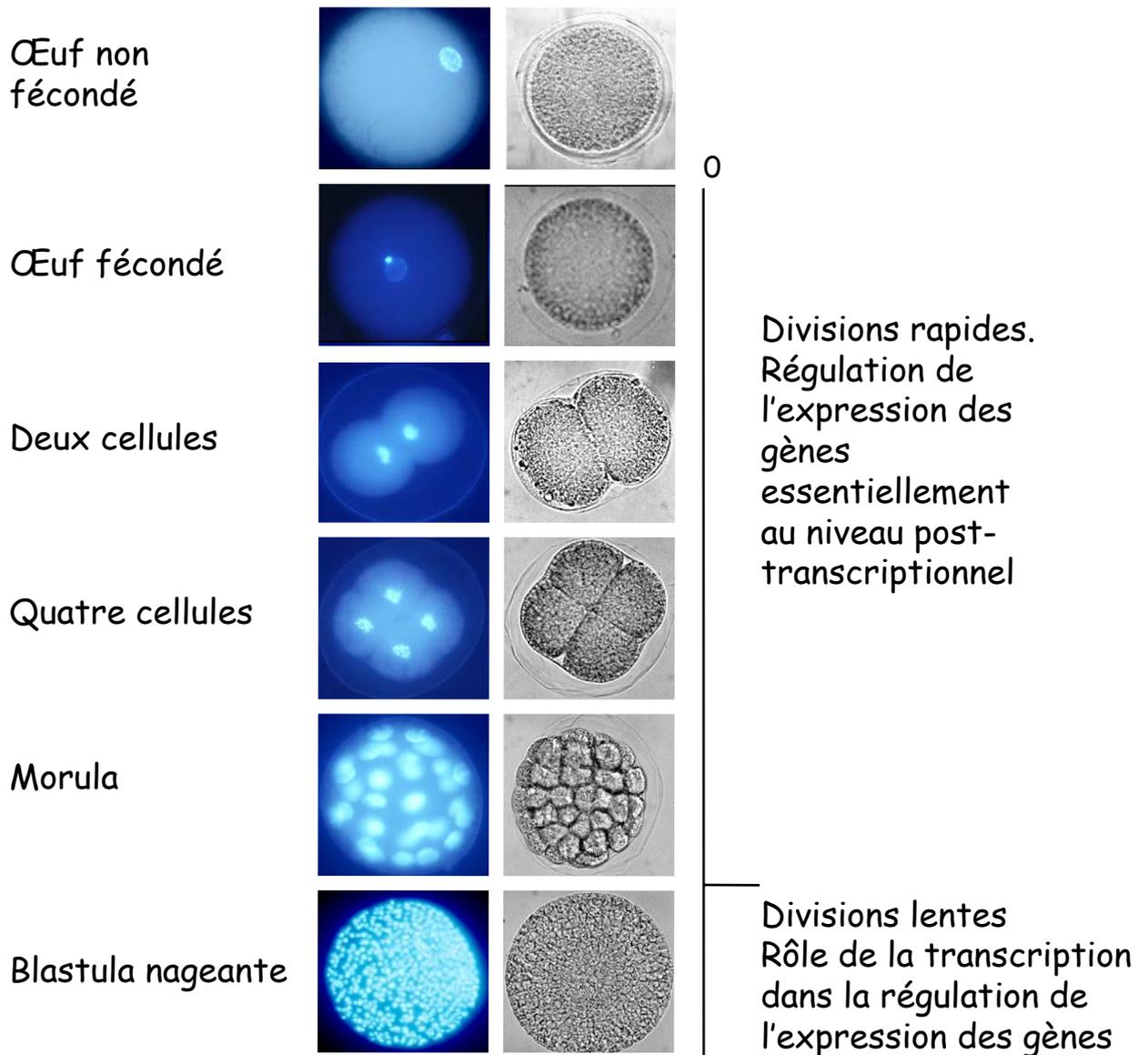


Figure 16 : Différents stades du développement embryonnaire de l'oursin *Sphaerechinus granularis*.

Les embryons ont été observés par contraste de phase (à droite) et par microscopie à fluorescence après coloration de la chromatine en Hoechst (à gauche)

D- Modèle d'étude : le développement embryonnaire précoce de l'oursin *Sphaerechinus granularis*.

1- Généralités.

L'oursin est un invertébré marin appartenant au phylum des échinodermes. Les oursins sont gonochoriques et la fécondation est externe. En laboratoire, la ponte induite par l'injection de KCL ou d'acétylcholine à travers le péristome ou encore par choc électrique (Guidice, 1973) permet d'obtenir aisément une grande quantité de gamètes mâles ou femelles. Les espèces généralement utilisées sont *Strongylocentrotus purpuratus*, *Lytechinus pictus*, *Arbacia punctulata* et *Paracentrotus lividus*. Nous avons choisi dans le cadre de nos études, *Sphaerechinus granularis* pour des raisons de disponibilité de gamètes fécondables toute l'année. L'œuf mature d'un diamètre de 100 μm , a achevé sa maturation méiotique et est bloqué en phase G1 de la première division mitotique. La fécondation provoque d'autre part l'exocytose de granules corticaux qui aboutit à la levée de la membrane de fécondation (**Figure 16**) participant au blocage de la polyspermie et à la protection de l'embryon (Davidson et al., 1982 ; Guidice, 1973 ; Epel, 1990). Le suivi de cette étape en laboratoire est facilité par l'ajout de glycine dans la culture. La fécondation restaure la diploïdie et va libérer l'œuf de son blocage, induire l'activation des CDKs, l'entrée dans le cycle cellulaire (transition G1/S) puis les divisions mitotiques synchrones successives (Epel, 1990). Les premières divisions (jusqu'au stade blastula) (**Figure 16**) sont extrêmement rapides et correspondent schématiquement à une succession de phases S/M, les cellules présentent alors un taux de division 10 fois plus élevé qu'au stade blastula (Parisi et al., 1978 ; Epel, 1990). Ainsi, la première division s'effectue en 2h/2h30, la seconde en 1h30 et les suivantes en 30 minutes. Le retour à des divisions plus lentes à partir du stade blastula correspond à

l'acquisition des phases G1 et G2. Au stade blastula (400 cellules), les embryons sécrètent une protéase qui dissout la membrane de fécondation ce qui permet à l'embryon de se mouvoir librement. Cette étape est nommée éclosion. La gastrulation caractérisée par la formation de l'archentéron est complète vers 46h puis la morphogenèse a lieu. Finalement 72h après fécondation, la larve nommée pluteus est suffisamment développée pour se nourrir et exister sous forme pélagique libre.

2- Régulation de l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin.

La fécondation s'accompagne d'une forte augmentation de la synthèse protéique globale (Gross et Fry, 1966 ; Epel, 1967 ; Humphrey, 1969 ; Humphrey, 1971 ; Brandhorst, 1976 ; Grainger, 1979). L'inhibition de la synthèse protéique par l'émétine se traduit par une inhibition du développement dès la première division (Wagenaar, 1983). Ainsi la synthèse protéique est absolument nécessaire au développement embryonnaire de l'oursin. En revanche, la présence d'actinomycine D, inhibiteur de la transcription, n'arrête le développement embryonnaire qu'au stade 8/16 cellules montrant que la transcription bien que présente tout au long du développement n'a pas de rôle primordial lors des premiers cycles de divisions embryonnaires (Gross et Cousineau, 1963 ; Gross et Cousineau, 1964, Guidice, 1973). Ainsi, la régulation de l'expression des gènes au cours des premières divisions se fait essentiellement au niveau traductionnel et post-traductionnel. En revanche à partir du stade blastula (8/16 cellules) une forte activité de transcription est observée. Certains ARNm spécifiques, importants pour le développement et la différenciation, sont alors transcrits à partir du génome zygotique. L'expression des gènes devient alors aussi dépendante de la transcription.

L'œuf non fécondé contient un pool d'ARNm stockés dont la traduction va être activée et régulée après fécondation. Certains ARNm sont ainsi stockés sous forme non traduite dans des complexes ribonucléoprotéiques ou mRNP et sont dits masqués. D'autre part, certains messagers incomplètement matures représentent jusqu'à 70 % de la masse des ARNs poly(A)⁺ dans l'œuf non fécondé (Costantini et al., 1978 ; Davidson et al., 1983 ; Flytzanis et al., 1982 ; Posakony et al., 1983 ; Davidson, 1986). Ces messagers de très grande taille (5/15 Kb) possèdent une queue poly(A) de 50-120 nts et des séquences répétées et intercalées nommées « interspersed repetitive sequences » (Costantini et al., 1978 ; Posakony et al., 1983 ; Davidson, 1986). La présence de telles séquences, aussi observée chez d'autres organismes comme le xénope, pourrait intervenir dans la régulation de la traduction (Davidson, 1986 ; Guttridge et Smith, 1995 ; Zearfoss et al., 2003). Ce type de messagers représente encore 15 % des messagers au stade gastrula (Davidson et al., 1983 ; Davidson, 1986).

La fécondation induit l'augmentation de la synthèse protéique en augmentant le recrutement polysomal des messagers dormants, ce qui fait intervenir le démasquage et la polyadénylation des messagers (Rinaldi et Monroy, 1969 ; Wilt, 1977 ; Grainger et Winkler, 1987) ainsi que l'augmentation et l'activation de la machinerie de traduction au niveau de l'initiation et de l'élongation (Brandis et Raff, 1978 ; Hille et Albert, 1979).

Au niveau de l'initiation, il a récemment été mis en évidence que 4E-BP est associé à eIF4E dans l'œuf non fécondé. La fécondation entraîne une dissociation 4E-BP/eIF4E corrélée à une dégradation de 4E-BP en parallèle d'un changement de son état de phosphorylation (Cormier et al., 2001 ; Salaün et al., 2003). Cette dissociation contrôlée par la voie Frap/mTor (FKBP12 and rapamycin-associated protein/mammalian Target of rapamycin) permet l'augmentation de la synthèse protéique globale et en particulier la synthèse de cycline B (Salaün et al., 2003).

La PI3 kinase (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase), dont l'activité augmente fortement après fécondation (De Nadai et al., 1998), est aussi impliquée dans l'augmentation de synthèse ainsi que dans l'activation de CDK1 post fécondation (voir chapitre résultats, C ; Salaün et al., 2004).

D'autre part, des variations cycliques de la synthèse protéique en association avec le cycle cellulaire ont été observées au cours des divisions embryonnaires précoces de l'oursin (Mano, 1970 ; Monnier et al., 2001b).

Le profil des protéines synthétisées au cours du développement a été examiné. Malgré la forte augmentation de synthèse protéique après fécondation, le profil des protéines synthétisées est relativement similaire sauf pour certaines protéines comme les cyclines ou la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase (Evans et al., 1983 ; Grainger et al., 1986). En revanche, le profil d'expression des ARNs change plus fortement à la transition blastula/gastrula avec l'apparition des transcrits zygotiques qui vont peu à peu remplacer les transcrits maternels (Grainger et al., 1986). Kelso-Winemiller (1993) et collaborateurs ont ainsi défini deux classes de messagers selon leur profil d'expression : les ARNs CSS (Cleavage-Stage-Specific) exprimés spécifiquement lors du stade de division rapide et les PCS (Post Cleavage Specific) faiblement présent ou absent au cours du stade de divisions rapides et augmentant au stade blastula avec l'apparition des transcrits zygotiques. Si les messagers maternels stockés sont suffisants pour assurer le stade de clivage rapide, l'apparition des transcrits zygotiques est nécessaire pour le développement ultérieur et la différenciation. Ainsi, par exemple, la synthèse et la sécrétion de l'enzyme d'éclosion sont extrêmement contrôlées. Il a été montré que cette enzyme est sécrétée transitoirement environ 2h avant le début de l'éclosion (Roe et Lennarz, 1990). De plus l'ARNm codant pour cette enzyme est transcrit transitoirement et de manière localisée quelques heures avant

l'éclosion (Lepage et Gache, 1990 ; Lepage et al., 1992b ; voir résultats D, Marc et al., soumis). Un autre ARNm BP10 présente le même profil d'expression et correspond à une metalloprotéase impliquée dans la morphogenèse de l'embryon (Lepage et al., 1992a).

3- Avantage du modèle et adéquation avec la question posée.

Le développement embryonnaire de l'oursin présente ainsi de nombreux avantages : la grande quantité de gamètes disponibles toute l'année permet des études quantitatives ; la fécondation in vitro est facile et rapide ; les divisions mitotiques sont hautement synchrones, ainsi, contrairement aux cellules en culture, l'ajout de drogue n'est pas nécessaire ; les œufs et embryons sont facilement homogénéisés et fractionnés ; la membrane est perméable, ce qui facilite le marquage des cellules ; la transparence des œufs permet d'observer sous microscope le stade de développement ; leur taille permet d'effectuer des expériences de microinjection.

Les désavantages de ce modèle sont le manque d'outils génétiques et génomiques à disposition. Le séquençage du génome de *Strongylocentrotus purpuratus* est en cours (<http://sugp.caltech.edu/>) et devrait rapidement permettre de combler le manque d'information génomique.

Le développement embryonnaire précoce de l'oursin est couramment utilisé en embryogenèse afin de comprendre les mécanismes liés à la différenciation et à l'organogenèse. Ce modèle permet en outre d'étudier la régulation de l'expression des gènes aussi bien au niveau traductionnel et post-traductionnel au cours des premiers cycles de division qu'au niveau transcriptionnel à partir du stade blastula. L'intérêt de ce modèle dans l'étude du cycle cellulaire n'est plus à démontrer (Nurse, 2000 ; Nigg, 2001). De plus, le développement embryonnaire de l'oursin est un bon modèle pour l'évaluation des risques toxiques de composés

chimiques (Marc et al., 2002 ; voir résultats, D ; Marc et al., soumis).

De ce fait, ce modèle nous est apparu un choix judicieux pour l'analyse du rôle de CDK1 dans la régulation du recrutement de messagers dans les polysomes.

Résultats

RESULTATS

Liste des publications

- 1- **Le Breton M.**, Bellé R., Cormier P., Mulner-Lorillon O., Morales J. (2003) M-Phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **306**, 880-886.
- 2- **Le Breton M.**, Salaün P., Bellé R., Mulner-Lorillon O., Cormier P., Morales J. (2004). Identification of a M-phase translated mRNA as a type A cyclin mRNA. (soumis)
- 3- Boulben S., Monnier A., **Le Breton M.**, Morales J., Cormier P., Bellé R. and Mulner-Lorillon O. (2003). Sea urchin elongation factor 1 δ (EF1 δ) and evidence for cell cycle-directed localization changes of sub-fraction of the protein in M-phase. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2178-2188.
- 4- Salaun P., **Le Breton M.**, Pyronnet S., Morales J., Bellé R., Boulben S., Mulner-Lorillon O., and Cormier P. (2004). Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin. *Exp. Cell. Res.* **296**, 347-357.
- 5- Marc J., **Le Breton M.**, Cormier P., Morales J., Bellé R., and Mulner-Lorillon O. (2004). The glyphosate-based pesticide Roundup impinges on transcription. (soumis)

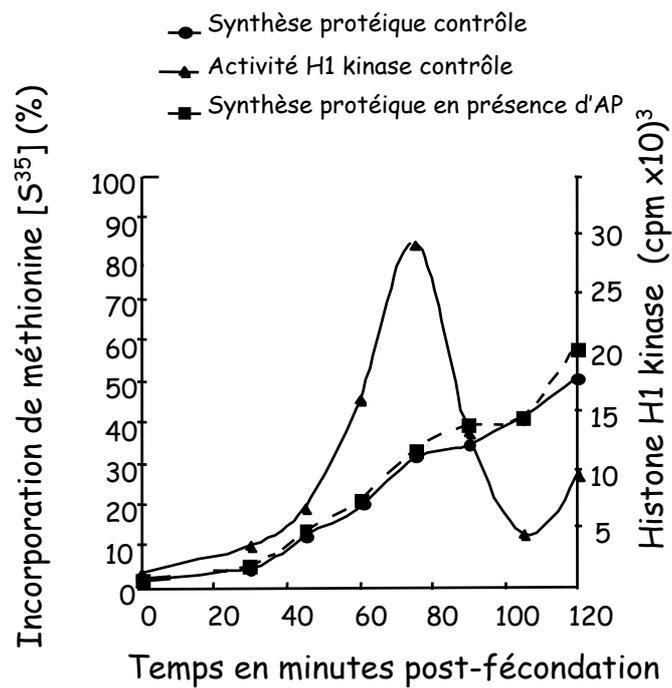


Figure 17 : L'accumulation des protéines néosynthétisées post-fécondation n'est pas modifiée par l'aminopurvalanol.
 L'accumulation des protéines synthétisées post-fécondation en présence ou absence d'aminopurvalanol (1 μ M) a été mesurée par le pourcentage d'incorporation de méthionine [S^{35}] dans les protéines néosynthétisées.

A- Identification et caractérisation d'ARNms différemment recrutés dans les polysomes en phase M sous l'action de CDK1/Cycline B.

1- Isolement d'ARNm différemment recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/Cycline B.

L'ensemble des données présentées en introduction suggère un rôle important de la kinase CDK1 dans la régulation de l'activité traductionnelle. Afin de discriminer le rôle de CDK1 sur le recrutement de messagers dans les polysomes, nous avons utilisé un inhibiteur relativement sélectif de CDK1 : l'aminopurvalanol, dérivé de purine, analogue de l'ATP, connu pour inhiber la transition prophase/métaphase lors de la maturation méiotique d'ovocytes d'étoile de mer (Knockaert et al., 2000).

1-1- Effet de l'aminopurvalanol sur le premier cycle de division embryonnaire de l'oursin.

Chez l'oursin, nous avons montré que l'aminopurvalanol inhibe l'activité du complexe CDK1/cycline B et le premier cycle de division de manière dose dépendante (article 1). L'utilisation de cet inhibiteur permet donc de comparer des embryons témoins possédant une activité CDK1 et des embryons traités par l'aminopurvalanol, sans activité CDK1. Comme le montre la **Figure 17**, l'accumulation des protéines néosynthétisées post-fécondation n'est pas modifiée par l'aminopurvalanol. En revanche, le profil des protéines néosynthétisées en phase M est modifié de manière subtile en fonction de l'activité CDK1 ce qui suggère un rôle de cette kinase dans la synthèse de certaines protéines spécifiques (article 1).

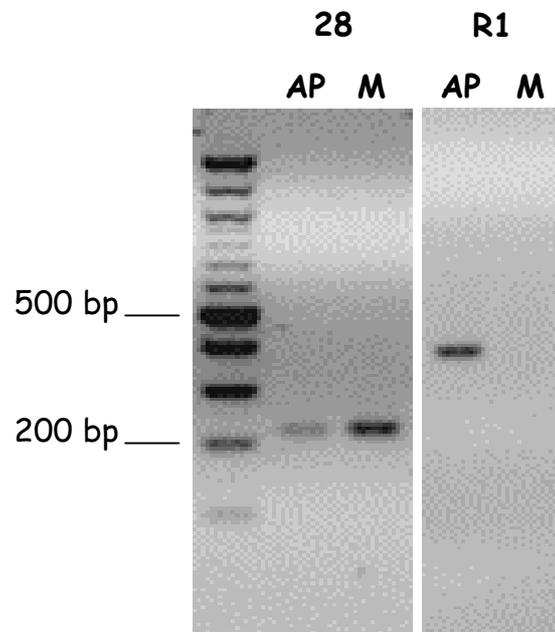


Figure 18 : Amplification par RT-PCR des clones 28 et R1 issus du premier criblage différentiel sur les banques d'ADNc M et AP obtenues au cours du second criblage différentiel.

1-2- Criblage différentiel : obtention de clones correspondant à des ARNms différenciellement traduits en présence ou absence d'aminopurvalanol.

Nous avons isolé les ARNms présents dans les polysomes, et donc en cours de traduction, d'embryons témoins prélevés en phase M du cycle cellulaire (Pic d'activité CDK1) et d'embryons traités par l'aminopurvalanol, prélevés au même temps. Nous avons réalisé un criblage différentiel, par hybridation soustractive, des ARNms présents dans les polysomes dans ces deux conditions afin d'identifier et caractériser les ARNms dont le recrutement polysomal varie en fonction de l'activité de CDK1 (article 1). Ces ARNm sont subdivisés en deux banques. Une banque dite M, contenant les ADNcs correspondant à des messagers spécifiques de la fraction polysomale d'embryons en phase M ; et une banque dite AP, contenant des ADNcs correspondants à des messagers polyomax spécifiques de la fraction polysomale d'embryons traités par l'aminopurvalanol. Deux criblages différentiels indépendants ont ainsi été réalisés. Un certain nombre de clones, appelés CDM97, a été séquencé (séquences EMBL : AJ519410-AJ519440). De manière intéressante, les clones 6, 31 et 2 ont été obtenus dans les deux criblages indépendants réalisés. Nous avons d'autre part analysé l'expression de certains clones issus du premier criblage différentiel sur les banques M et AP obtenus lors du second criblage. Ainsi le clone 28 issu de la banque M et le clone R1 issu de la banque AP ont été respectivement amplifiés par RT-PCR à partir des banques d'ADNc M et AP du second criblage confirmant leur possible expression différentielle (**Figure 18**). Les fragments d'ADNc obtenus sont courts (190-851 bp), sans homologie de séquence, ni phase de lecture continue dans la plupart des cas. Or, les ARNms d'oursins sont connus pour contenir des régions 3'UTR extrêmement longues (Pines et Hunt, 1987). Les cDNAs obtenus par criblage différentiel étant

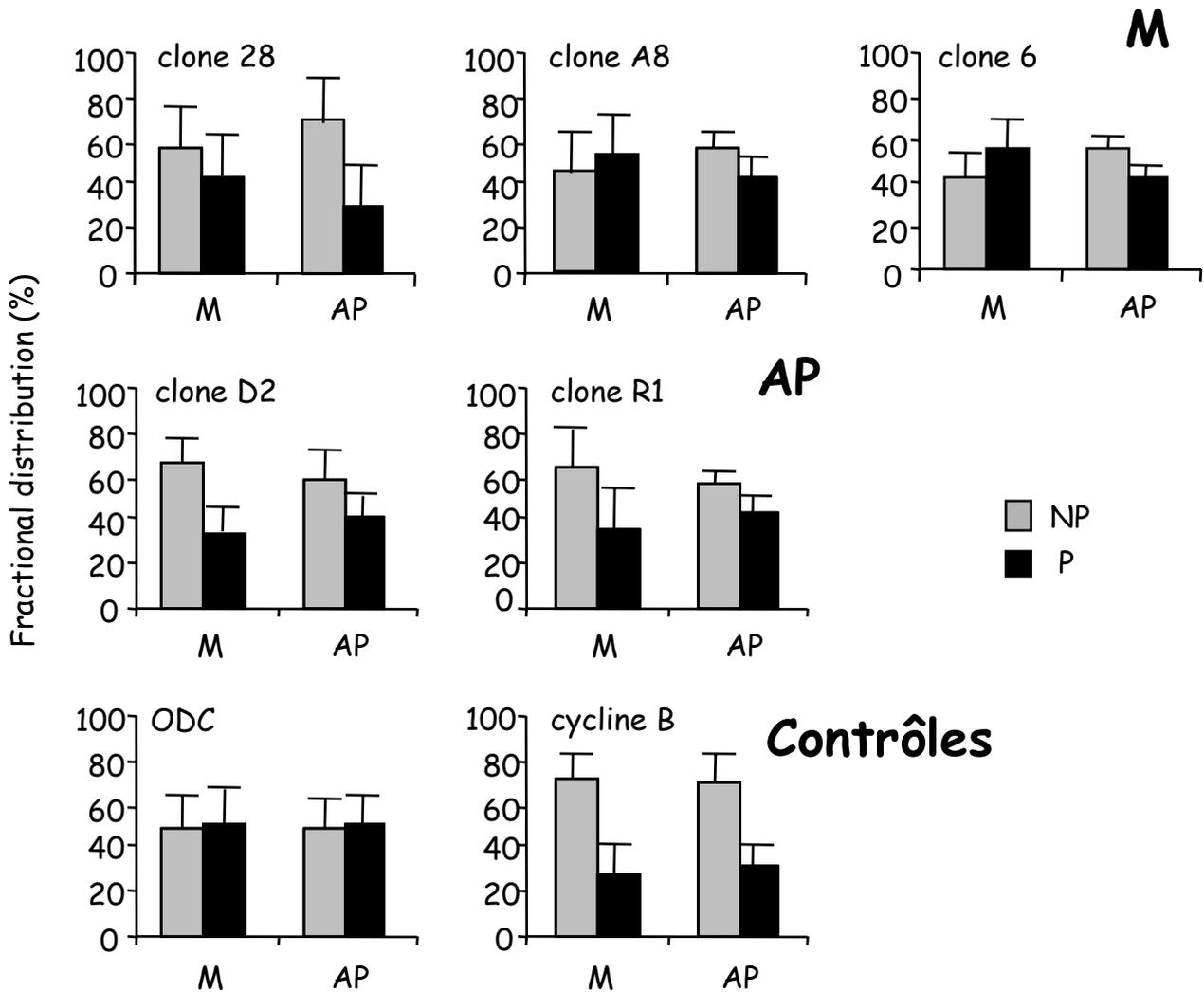


Figure 19 : L'activité CDK1 modifie le recrutement d'ARNms spécifiques en phase M.

Ces graphiques représentent la répartition polysomale des ARNm 28, A8, 6, D2 et R1 issus du criblage différentiel, de la cycline B et de l'ODC dans des embryons en phase M (M) ou traités par l'aminopurvalanol (AP). Les résultats sont exprimés en tant que % du signal total obtenu entre les deux fractions polysomale (P) et non polysomale (NP) (Le Breton et al., 2003).

obtenus à partir d'amorce oligo(dT), la technique a probablement favorisé l'obtention de clones correspondant aux régions 3' non traduites de messagers.

N'ayant pas obtenu de signaux détectables en northern-blot, nous avons vérifié l'expression différentielle de nos clones en étudiant leur répartition polysomale par des mesures semi-quantitatives en RT-PCR. Ce travail a permis de mettre pour la première fois en évidence que le recrutement d'ARNms spécifiques change en fonction de l'activité de CDK1. Ainsi le recrutement polysomale des clones 28, A8 et 6, issus de la banque M, est plus important en présence qu'en absence d'activité CDK1. En revanche le recrutement polysomal des clones R1 et D2, issus de la banque AP, est plus important en absence qu'en présence d'activité CDK1. Comme le montre la **Figure 19**, les régulations mises en évidence sont de petite amplitude, suggérant que CDK1/cycline B module l'intégration ou la libération de ces messagers de façon subtile (article 1). Ces résultats suggèrent un rôle de CDK1 dans la régulation traductionnelle via le recrutement de messagers dans les polysomes. Nous avons, en parallèle, analysé le recrutement polysomal de deux messagers non issus du criblage : la cycline B et l'ODC dont l'expression est régulée au cours du cycle cellulaire (Groisman et al., 2002 ; Pyronnet et al., 2000). Nous avons montré que leur recrutement était identique dans les deux conditions suggérant que l'activité CDK1 ne modifie pas le recrutement de ces deux messagers au cours du premier cycle de division embryonnaire précoce de l'oursin (**Figure 19**, article 1). L'analyse de séquence de l'ODC clonée et utilisée pour cette étude est présentée en annexe 1.

2- Identification des messagers dont le recrutement polysomal varie en fonction de l'activité de CDK1/Cycline B.

Ainsi nous avons isolé des ARNms modèles pouvant maintenant permettre l'étude des mécanismes de régulation traductionnelle dépendant de CDK1. L'obtention des séquences entières de ces clones était important. Ceci

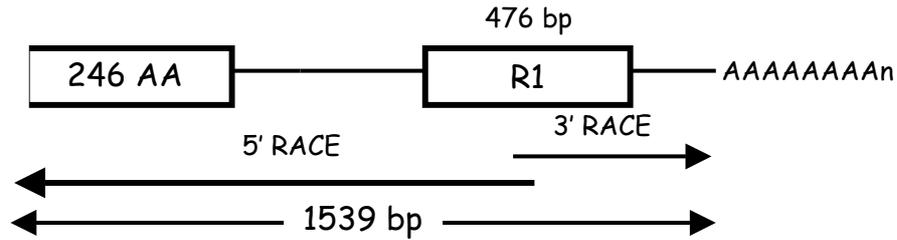


Figure 20 : Représentation schématique de la séquence du clone R1 obtenue après extension RACE-PCR.

R1	-----SSGINAEYAGSPLWAILFFMLLTLG
h-ATBO+	AGFAIFSI LGHMAHISGKEVSVVVKSGFDLAFIAYPEALAQLPGGPFWSILFFMLLTLG
R1	LDSQFTIMETVVTAIIVDEFFGTLRKKKTIVMLIACSIMYLLGLTCVTEAGPYWISLMDSY
h-ATBO+	LDSQFASIEITITTTIQDLFPKVMKKMRVPITLGCCLVLFLLGLVCVTQAGIYVHLLIDHF
R1	GAGFALILFGLCETIGLSWFFYGVRRFNSDIRTMIGNGVVDCFMFYWWPLMWSAVTPGLLL
h-ATBO+	CAGWGILIAAILELVGIIWIYGGNRFIEDTEMMIG--AKRWIFWLWWRACWFVITPILLI
R1	FVLIFNWMNWSEPEY-NGPYPTWGRIIGWLMITSSIIWIPFVMI FEFLRAEGNLAERWRS
h-ATBO+	AIFIWSLVQFHRPNYGAIPYPDWGVALGWCMI VFCIIWIPIMAIKI IQAKGNIFQRLIS
R1	MSNPREK WGPALKKHRIEAAEVHQRHFTSMGGSTKFGTVTEPQVAYVAADNNAYEHPL
h-ATBO+	CCRPASNWGPYLEQHRGE-----RYKDMVDPKKEADHEIETVSGSRKPE-----

Figure 21 : Le clone R1 code pour une protéine homologue à un transporteur d'acides aminés.

Alignement de la séquence protéique déduite du clone R1, avec la séquence protéique du transporteur d'acide aminé ATBO+ humain ([Q9UN76](#)) (Sodium- and chloride-dependent neutral and basic amino acid transporter B(O+) (Amino acid transporter ATBO+) (Solute carrier family 6 member 14)).

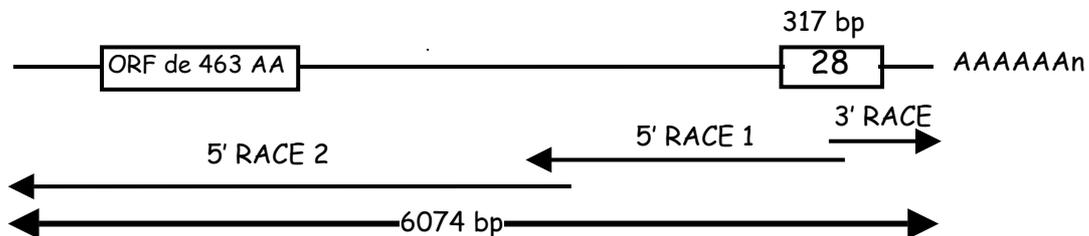


Figure 22 : Représentation schématique de la séquence du clone 28 obtenue après extension RACE-PCR.

permettant, non seulement d'identifier les protéines codées par ces messagers, mais aussi d'analyser les régions 3' et 5' UTR susceptibles d'intervenir dans la régulation de leur traduction. En effet, la comparaison des séquences non traduites de messagers dont le recrutement polysomal est similaire pourrait permettre, par la mise en évidence de séquences cis semblables, d'orienter les recherches des mécanismes impliqués dans leur régulation.

2-1- Les ARNms R1 et D2 sont dérecrutés des polysomes par CDK1.

2-1-1- Le clone R1 code pour une protéine homologue à un transporteur d'acides aminés.

Après 3' et 5' RACE-PCR, le clone R1 a été étendu de 476 à 1539 bp (**Figure 20**). Le messenger partiel obtenu contient une phase ouverte de lecture partielle de 789 bp. La séquence protéique partielle déduite de 249 acides aminés a été identifiée, par comparaison aux banques de données, comme étant une protéine trans-membranaire possiblement impliquée dans le transport d'acides aminés (**Figure 21**, article 1). Ce type de transporteur semble impliqué dans l'osmorégulation et la régulation du volume cellulaire au cours du stade de clivage du développement embryonnaire de la souris (Baltz, 2001) et dans l'augmentation d'acide aminé observée à la fécondation chez l'oursin (Epel, 1972).

2-1-2- Le clone D2 n'est pas identifié.

Le clone D2 (335 bp) présente 98 % d'identité sur 70 nt avec la région 3'UTR de l'histone H3.3 de *P.lividus* ([X76081](#)) et un clone EST de *Strongylocentrotus purpuratus* ([AI478075](#)), similaire à la région 3'UTR de l'histone H3-3 (article 1). L'identité étant restreinte à 70 pb sur 335 bp l'identification de ce clone reste incertaine.

AJ224985	MAFSIGSSNAGND-MTNMAQGVQQFGGRKTKRDDIASRNGPQACKRAALGTITNTSSTRV
AJ634048	MAFSIGSSNTGNDIMTNMAQGVQQFGGRKTKRDDIASRNGSQACKRAALGTITNTSSTRV
AJ224985	QPARAAKQFRVSGENPFVVFQDENAHSRIPQGKPFGLPSAAAAPAFSIHVDPTSTYVQPQ
AJ634048	QPARAAKQFRVSGENPFVVFQDENAHSRIPQKSGFLPSAAAAPAFSIHVDTTSTYVQPQ
AJ224985	TASTSIKSTDKENEHILLDTALSLPVPQAQRIPLRSSGPDVEDNNVSLNEESLTSSEYS
AJ634048	TASTSIKSTDKENEHILLDTALSLPVPQAQRIPLRSSVPDVEDNNVSLNEESLTSSEYS
AJ224985	PMLLDTSLDAKCISPQTVVAERDLSLGEPEYSEEIYQYLKTAELKHRPKHGVMRKQPDIT
AJ634048	PMLLDTSLDAKCISPQTVVAERDLSLGEPEYSEEIYQYLKTAELKHRPKHGVMRKQPDIT
AJ224985	NNMRCILIDWLVEVSEEYRLHNETLYLAAAFIDRFLSQMSVLRACLQLVGTASMFVASKY
AJ634048	NNMRCILIDWLVEVSEEYRLHNDTLYLAAAFIDRFLSQMSVLRACLQLVGTASMFVASKY
AJ224985	EEIYPPDVKEFIYITDDTYSIKQVLRMEHLILKVLVFDLAAPTINCFPRFLKAAQANSK
AJ634048	EEIYPPDVKEFVYITDDTYSIKQVLRMEHLILKVLVFDLAAPTINCFPRFLKAAQANSK
AJ224985	TEHLTQYLAELTLQKYDFIKYVPSMIAASRVCLANHTLNNEGWTPTMAHYTDYQLADIYV
AJ634048	TEHLTQYLAELTLQKYDFIKYVPSMIAASAVCLANHTLNNEGWTPTMAHYTDYQLADIYV
AJ224985	CT-DLHQLFIKAPTMDQQAVREKYKSQKYSGASSTPVPTSLPTL
AJ634048	CVQDLHQLFIKAPTMDQQAVREKYKSQKYSGASSTPVPTSLPTL

Figure 23 : Le clone 28 code pour la cycline A.

Alignement des protéines cycline A de *Sphaerechinus granularis* obtenue par RACE-PCR à partir du clone 28 (AJ634048) ou obtenue par Genevière et al en 1998 (AJ224048).

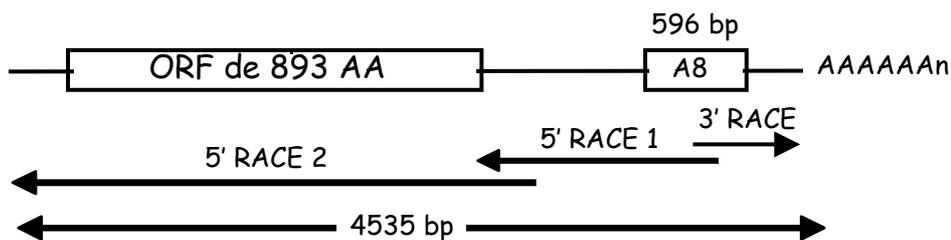


Figure 24 : Représentation schématique de la séquence du clone A8 obtenue après extension RACE-PCR.

2-2- Les ARNms 28, A8 et 6 sont recrutés dans les polysomes par CDK1.

2-2-1- Le clone 28 code pour une cycline A.

La séquence du clone 28 a été étendue par RACE-PCR de 317 à 6074 bp. Elle possède 342 bp de 5'UTR, 1395 bp de région codante et 4335 pb de 3'UTR (**Figure 22**, article 2). La protéine déduite de 463 acides aminés présente 97 % d'identité avec la cycline A de *Sphaerechinus granularis* (**Figure 23**). La cycline A est une des molécules clefs de la progression du cycle cellulaire. Elle s'associe à la fois à CDK2 et CDK1. Le complexe CDK2/cycline A intervient dans le contrôle de la réplication en phase S (Yam et al., 2002). Il a d'autre part été récemment montré que ce complexe est nécessaire à l'entrée en mitose en amont de l'activation de CDC25 et CDK1 dans des cellules humaines (Mittra et Enders, 2004). CDK1/cycline A interviendrait quant à lui en G2/M même si son rôle exact reste à définir (Yam et al., 2002).

2-2-2- Le clone A8 code pour une sérine/thréonine kinase homologue des Neks.

La séquence du clone A8 a été étendue par RACE-PCR de 596 à 4535 bp (**Figure 24**, résultats non publiés). La région 5'UTR contenant deux codons stop en phase avant la méthionine initiatrice est suivie de 2679 bp de région codante et 1751 pb de 3'UTR. La protéine déduite de 893 acides aminés présente un pHi de 10, et une masse théorique de 100 kDa. Les 267 premiers acides aminés présentent 48 % d'identité avec la protéine Nek1 humaine (NIMA related kinase 1) et 30 % avec la protéine NIMA d'*Aspergillus nidulans* (**Figure 25**, résultat non publié). Les protéines de la famille des « NIMA related kinase » sont homologues au niveau de leur domaine catalytique situé en N-terminal et divergent dans leur extrémité C-terminale. L'extrémité C-terminale est cependant généralement basique, possède dans de nombreux cas des signaux de localisation nucléaire, des

```

A8          -----MEKYSYQKVLGMNFGKAWLVRSRASRRPYVIKEINVVGMGEKERERAVNEVA
NEK1_HUMAN -----MEKYVRLQKI GEGSFGKAILVKSTEDGRQYVIKEINISRMSSKEREESRREVA
NIMA       MAIALAEADKYEVLEKICGGSFGIIRKVKRKSDFILCRKEINYIKMSTKEREQLTAEFN

A8          ILGRLRHVNIIRYREAFVAGGGGILSIVMEYGDGGDLAEKIEEAKSSGQSFNAPQILKWF
NEK1_HUMAN VLANKHPNIVQY--RESFEENGSLYIVMDYCEGGDLFKRIN--AQKGVLFQEDQILDWF
NIMA       ILSLRLHPNIVAYYHREHLKASQDLYLYMEYCGGGDLSMVTKNLKRTNKYAEEDFVWRIL

A8          VQLCLALYIHS-----EKVLHRDLKPSNLFLTSKGI I
NEK1_HUMAN VQICLALKHVD-----RKILHRDIKSONIFLTKDGTV
NIMA       SQLVTALYRCHYGTDPAEVGSNLLGPAPKPSGLKKGQAQMTILHRDLKPENIFLGSNDTV

A8          KVGDFGI AKMLHNTMDHANTTIGTPYYLSPEICQRQPYNQKSDMWAAGCILYELVTLTRP
NEK1_HUMAN QLGDFGIARVLNSTVELARTICIGTPYYLSPEICENKPYNNKSDIWALGCVLYELCTLKHA
NIMA       KLGDFGLSKLMHS-HDFASTYVGTPLYMSPEICAAEKYTLRSDIWAVGCI MYELCQREPP

A8          FEGHELSTLIMRILRGLYTPIPKTYGTAIEELVAVLLSVSPGMRPSAHAILTSHNIRPFVK
NEK1_HUMAN FEAGSMKNLVLKIIISGFFPPVSLHYSYDLRSLVSQLFKRNPRDRPSVNSILEKGFIAKRIE
NIMA       FNARTHIQLVQKIREGKFAPLPDFYSSELKNVIASCLRVNEDHRPDTATLINTPVIR----

```

Figure 25 : Le clone A8 code pour une sérine/thréonine kinase homologue des "NIMA related kinases".

Alignement des domaines catalytique déduit de la séquence du clone A8, de Nek1 humaine (Q96PY6) et de NIMA (P11837).

Gris : Identité ; Bleu : Acides aminés partagés par les Ser/thr kinases ; Rouge : Acides aminés identiques ou hautement conservés chez les Nrks « NIMA related kinases » mais distinctes des autres sous-famille de protéines kinase ; Souligné : domaine signature potentiel des Nrks (Lu et Hunter 1995).

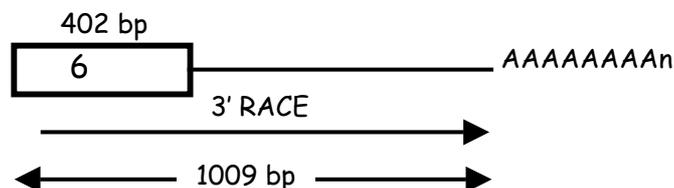


Figure 26 : Représentation schématique de la séquence du clone 6 obtenue après extension RACE-PCR.

séquences de destruction comme des domaines PEST et des domaines coiled-coil (O'Connell et al., 2003). Le domaine catalytique potentiel (1-267) du clone A8 possède des motifs conservés de sérine/thréonine kinases ainsi que les domaines signatures des Neks (**Figure 25**, résultat non publié). D'autre part nous avons observé la présence d'un NLS bipartite potentielle et d'un domaine coiled-coil potentiel dans la région C-terminal très basique. Il semble donc que le clone A8 isolé lors du criblage corresponde à une nouvelle protéine kinase appartenant à la famille des Nek : Sg-Nek (*Sphaerechinus granularis*-Nek) dont le rôle physiologique reste à définir. Chez *Aspergillus nidulans* NIMA est essentielle à la transition G2/M (Osmani et al., 1988 ; Osmani et al., 1991). De nombreuses Neks ont été mises en évidence d'après leur homologie de séquence, et ce dans de nombreuses espèces. Même si le rôle physiologique de ces kinases n'est pas toujours bien défini, il semble qu'elles jouent un rôle important dans la formation du fuseau microtubulaire, la ségrégation des chromosomes et/ou l'organisation des centrosomes (Lu et Hunter, 1995 ; O'connell et al., 2003).

2-2-3 Le clone 6 n'est pas identifié.

Une extension par 3'RACE-PCR de ce clone a permis d'étendre la séquence de 402 pb à 1009 bp (**Figure 26**). Cette séquence se termine par une queue poly(A) et aucune homologie dans les banques de données n'a été observée.

L'ensemble des résultats présentés est résumé dans le tableau suivant.

Clones	Banque d'origine	Recrutement en présence d'activité CDK1	Identification
R1	AP	diminué	Transporteur d'acide aminé putatif
D2	AP	diminué	Non identifié
28	M	augmenté	Cycline A

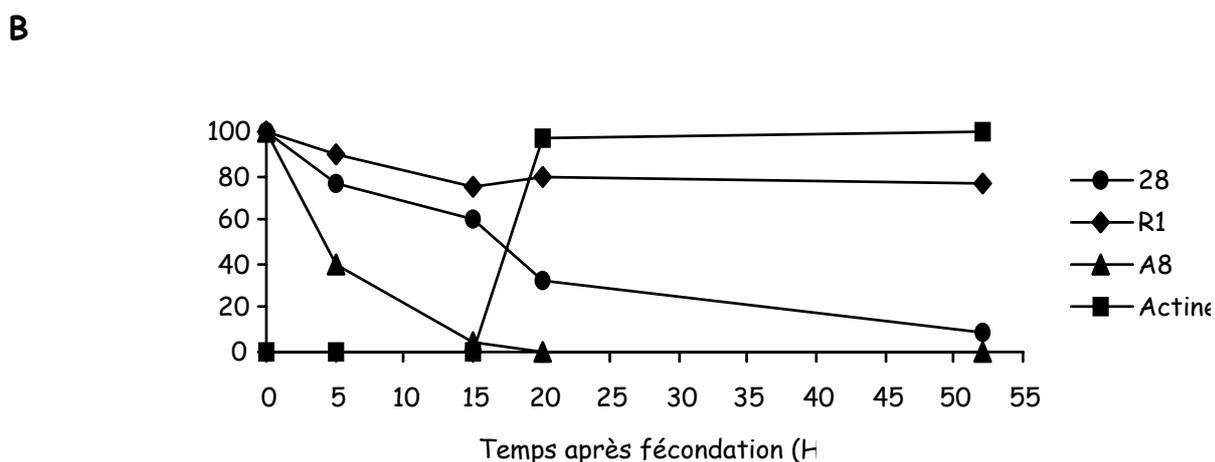
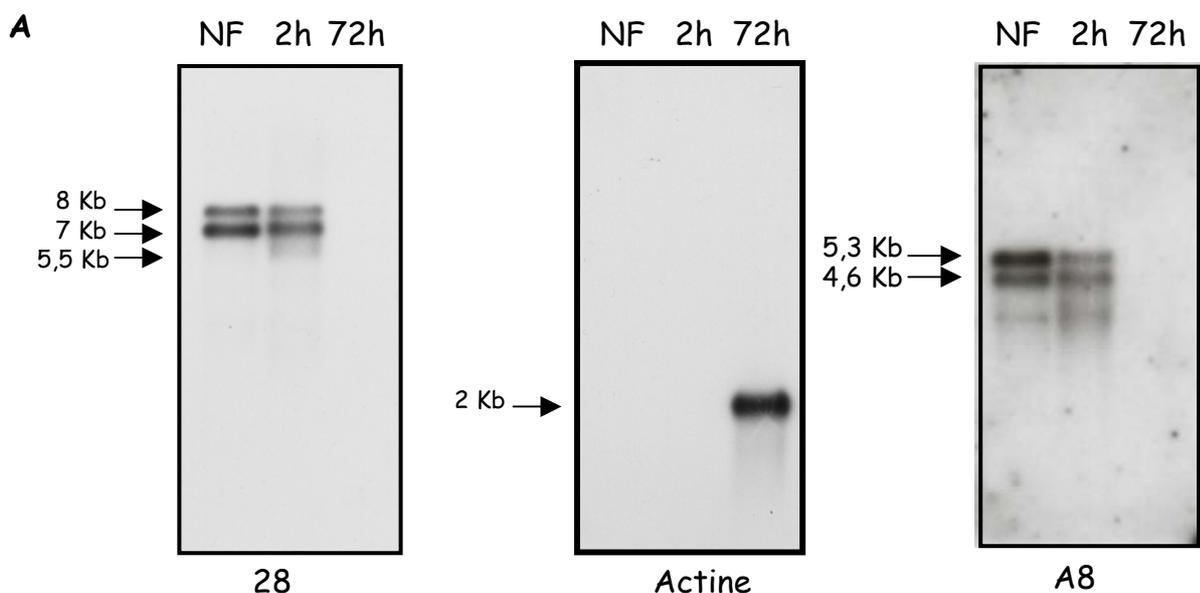


Figure 27 : Les ARNm A8 (Sg-Nek) et 28 (Cycline A) sont exprimés au cours des stades précoces du développement.

A- Analyse de l'expression des messagers A8, 28 et actine au cours du développement par northern blot. 2 μ g d'ARN poly(A+) d'embryons prélevés aux temps indiqués ont été analysés par northern blot avec des sondes spécifiques de la région codante de la cycline A, de la partie C-terminale de la région codante du clone A8 et de l'ORF de partielle de l'actine cytoplasmique.

B- Analyse de l'expression des messagers A8, 28, actine et R1 au cours du développement par RT-PCR. Après extraction des ARNs totaux d'embryons aux stades indiqués, la présence des différents messagers à été étudiée par RT-PCR.

A8	M	augmenté	Sg-Nek
6	M	augmenté	Non identifié

3- Analyse de l'expression des ARNms R1 (transporteur d'acide aminé putatif), 28 (cycline A) et A8 (Sg-Nek) au cours du développement précoce.

Afin de déterminer si des messagers de 6 Kb pour le clone 28 (cycline A) et de 4,7 Kb pour le clone A8 (Sg-Nek) étaient présents dans la cellule, nous avons analysé leur expression par northern blot. Nous avons montré l'existence de 2 messagers d'environ 7 et 8 Kb correspondant au clone 28 dans les œufs non fécondés et l'apparition d'un messager supplémentaire de 5,5 Kb après fécondation (à 2h de développement). Ces messagers ne sont plus détectés à 72h de développement alors que la même quantité d'ARN polyA+ a été déposée sur gel (**Figure 27, A** ; article 2). Ce résultat est obtenu quelle que soit la sonde utilisée (région codante ou région 3'UTR).

L'utilisation d'une sonde correspondant à la partie C-terminale de la région codante du clone A8 (nts 1408-2823) montre l'existence de deux messagers d'environ 5,3 et 4,6 Kb dans les œufs non fécondés et embryons précoces. Ces messagers ne sont plus détectés à 72h de développement (**Figure 27, A** ; résultat non publié). Nous avons utilisé comme contrôle une sonde dirigée contre l'actine cytoplasmique connue pour être exprimée tardivement au cours du développement, l'analyse de séquence de l'actine clonée et utilisée pour cette étude est présentée en annexe 2. Contrairement aux clones 28 (cycline A) et A8 (Sg-Nek), l'actine cytoplasmique est fortement exprimée dans les embryons à 72h de développement mais indétectable dans des œufs non fécondés et embryons précoces (**Figure 27, A** ; article 2). Nous avons analysé l'expression des ARNms A8(Sg-Nek), 28 (cycline A) et R1 (transporteur d'acides aminés

putatif) au cours du développement par RT-PCR sur ARNm totaux d'embryons à différents stades de développement. Le profil d'expression des messagers A8 (Sg-Nek) et 28 (cycline A) est similaire. Ces ARNm sont présents dans les stades précoces jusqu'à 15/20h et sont très peu détectables après (**Figure 27, B**). Le profil d'amplification de l'actine cytoplasmique réalisée en parallèle montre que ce messager apparaît à partir de 20 h de développement et est donc fortement exprimé au cours des stades de développement tardif (**Figure 27, B** et Kelso-Winemiller et al., 1983). Le clone R1 est exprimé à la fois au cours des stades précoces et tardifs. (**Figure 27, B** ; résultat non publié). Ainsi de manière intéressante, les clones A8 (Sg-Nek) et 28 (cycline A) recrutés en phase M sous l'action de CDK1 correspondent tous deux à des messagers de type CSS exprimés au cours des stades précoces du développement (Kelso-Winemiller et al., 1993) ce qui n'est pas le cas du clone R1 (transporteur d'acides aminés putatif) dont le recrutement est diminué sous l'influence de CDK1.

4- Analyse des séquences non traduites des ARNm dont le recrutement augmente en présence d'activité CDK1.

Nous avons analysé les séquences 5' et 3' non traduites obtenues afin d'orienter la recherche des mécanismes de régulation dépendants de CDK1 impliqués en phase M. Nous avons vu en introduction que la traduction de certains messagers spécifiques en phase M implique l'intervention d'un mécanisme de traduction IRES-dépendant. Les séquences 5'UTR obtenues pour les clones A8 (Sg-Nek) et 28 (cycline A), respectivement de 105 et 317 pb, ne présentent pas les caractéristiques observées pour les IRES viraux puisqu'elle contiennent 43 % de GC, ne sont pas très structurés et ne présentent pas de codon initiateur potentiel en amont de la méthionine initiatrice.

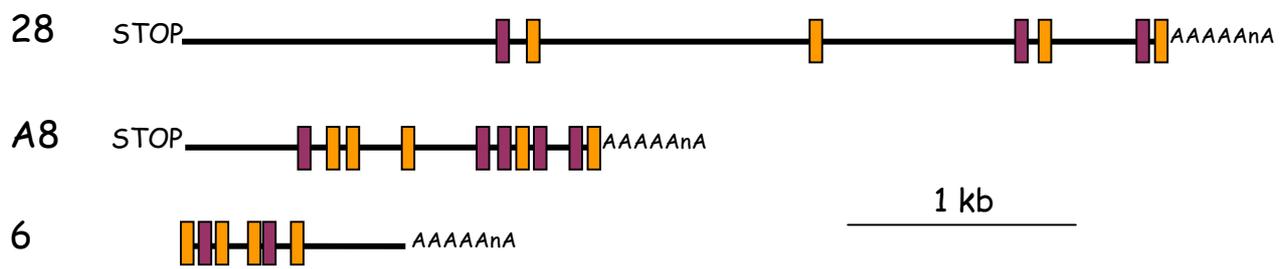


Figure 28 : Comparaison des séquences 3' UTR des clones 28 (Cycline A), A8 (Sg-Nek), 6 (non identifié).
 Orange : Site de polyadénylation potentiel ; Bordeaux : CPE potentiel.

La polyadénylation cytoplasmique pourrait-elle aussi être impliquée dans le contrôle de la traduction en phase M ? Nous avons alors recherché les CPEs potentiels proches (0 à 100 bp) des signaux de polyadénylation AAUAAA. Nous avons ainsi trouvé 3 CPEs potentiels dans la séquence 3'UTR du clone 28, 5 dans celle du clone A8 et 2 dans les 1000 bp de 3'UTR du clone 6 (**Figure 28**). En revanche aucun n'est présent dans celle du clone R1.

En conclusion, nous avons isolé et identifié des ARNm dont le recrutement polysomal varie en fonction de l'activité de CDK1. Deux des messagers, dont le recrutement augmente en présence d'activité CDK1, correspondent à des CSS (Cleavage Stage Specific), présentent plusieurs CPEs potentiels et codent pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Les conclusions et perspectives inhérentes à ce travail sont présentées chapitre III.

Article 1

« M-Phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol »

Article 2

« Identification of a M-phase translated mRNA as a type A cyclin mRNA »

B- Modification de la localisation du facteur d'élongation eEF1δ au cours du cycle cellulaire.

Le facteur eEF1δ est cible de CDK1 (Bellé et al., 1989 ; Jansen et al., 1991 ; Mulner-Lorillon et al., 1994). Nous avons étudié eEF1δ au cours de la première division mitotique de l'embryon d'oursin. Nous avons mis en évidence par RT-PCR l'existence d'un 2^{ème} ARNm codant pour eEF1δ : eEF1δ2 possédant une insertion de 80 bp (article 3). De manière intéressante, deux isoformes protéiques d'eEF1δ différant de 26 acides aminés ont aussi été observées par western-blot (article 3). Ainsi, au cours du stade embryonnaire précoce de l'oursin, il existe deux isoformes d'eEF1δ codées par deux ARNm différents. Leur rôle respectif reste à déterminer. Ils sont tous deux associés à un complexe de haut poids moléculaire contenant eEF1-β et eEF1-γ. (article 3) Nous avons d'autre part montré par immunolocalisation, que chez l'oursin, la majeure partie d'eEF1-δ est distribuée de manière homogène dans le cytoplasme. Cependant une partie de la population d'eEF1-δ est visualisée sous forme d'un anneau nucléaire au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire puis au niveau des pôles du fuseau microtubulaire plus tardivement (article 3). Ainsi, la localisation de cette sous-population change au cours du cycle cellulaire. Il serait intéressant de déterminer si les deux isoformes sont concernées par cette relocalisation. Le rôle de la présence de ce facteur au pôle du fuseau microtubulaire en mitose reste à déterminer. Il pourrait intervenir afin de favoriser la synthèse de protéines à cet endroit précis. La relocalisation de ce pool d'eEF1δ en phase M pourrait diminuer l'efficacité de l'élongation en diminuant la quantité de ce facteur disponible pour la traduction dans le cytoplasme. Si cela était le cas, il serait possible que ceci participe à la

modulation de synthèse protéique globale observée au cours du cycle cellulaire chez l'oursin (Mano, 1970 ; Monnier et al., 2001b).

Article 3

« Sea urchin elongation factor 1 δ (EF1 δ) and evidence for cell cycle-directed localization changes of sub-fraction of the protein in M-phase »

**C- Régulation traductionnelle en amont de l'activation de CDK1 :
La synthèse de cycline B post-fécondation nécessaire à la
première division mitotique : voies de transduction impliquées.**

Nous avons analysé les régulations traductionnelles existant en amont de l'activation de CDK1/cycline B au cours du premier cycle de division. Ainsi l'implication des facteurs d'initiation et les voies de transduction impliquées dans les mécanismes d'activation de la traduction après fécondation ont été analysées en particulier au niveau de la synthèse de cycline B nécessaire à la première division mitotique (Salaün et al., 2003 ; article 4). Chez l'oursin, la fécondation entraîne une rapide augmentation de synthèse protéique nécessaire à l'activation du complexe CDK1/Cycline B. FRAP/mTOR est impliquée dans la dissociation du complexe 4E-BP/eIF4E nécessaire à la synthèse de cycline B et donc à l'activation du complexe CDK1/Cycline B (Salaün et al., 2003, article 4). Nous avons étudié l'implication de la PI3 kinase (Phosphatidyl Inositol 3 kinase) dans ce mécanisme en utilisant un inhibiteur spécifique : la wortmannin. Cet inhibiteur inhibe partiellement la synthèse de cycline B (article 4) et la dissociation du complexe 4E-BP/eIF4E post-fécondation. Cependant il inhibe complètement le premier cycle de division mitotique en empêchant la déphosphorylation de CDK1 sur tyrosine nécessaire à son activation (article 4). Ceci montre que la voie PI3 kinase contrôle l'activation de CDK1/cycline B à deux niveaux : 1) Au niveau de la synthèse de cycline B et 2) au niveau de l'activation du complexe CDK1/Cycline B par phosphorylation.

Article 4

« Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin »

S.granularis	HINY TSAIMEYQH NAGINQ T GILD TET SEL LNAS RCGF PDVV P YVTSSV TWTR NE PVTYS
H.pulcherrinus	NINY TSAILEYQQ NNGGINQ T GILDAETAAL LDTPRCGVPD ILPYVTGGIAWPRNVAVVYS
P.lividus	NLNY TSAILD FQEHGGINQ T GILDADTAELLSTPRCGVPDVL PFTVSSITW SRNQPVVYS
S.granularis	FGALSNDLNRDAIKNEMRRAFQVWDEV SGLTFRE EADS P SVDIRIKFGSFDHGDG ISFDG
H.pulcherrinus	FGTLSNDLSQTAIKNELRRAFQVWDDVSSLTFREVVDDSSVDIRIKFGSYEHGDG ISFDG
P.lividus	FGALTSDLNQNDVKDEIRRAFVRVWDDVSGLSFREVPD TTSVDIRIKFGSYDHGDG ISFDG
S.granularis	RGGVLAHAFLPRNGDAHFDSETWTIGTYSGTNLFQVA AHEFGHSLGLYHSDVQSALMYP
H.pulcherrinus	QGGVLAHAFLPRNGDAHFDSE RWTIGTNSGTNLFQVA AHEFGHSLGLYHSDVQSALMYP
P.lividus	RGGVLAHAFLPRNGDAHFDSETWTEGTRSGTNLFQVA AHEFGHSLGLYHSTVRSALMYP
S.granularis	YYRGYNPNFSLSDDIAGIRSLYGGNIERPTPSTTRGPTTTTQRAT TQQSP TTTQQTTT
H.pulcherrinus	YYRGYNPNFNLD RDDIAGITSLYGRNTGSTTTTTRR--PTITR TTRRTTRTTTQLAT
P.lividus	YYQGYVFNFR LNDNDIAGIRSLYGSNSGSGT TTTTRRPTTTRATTTRRTTTRATTTRAT
S.granularis	TQQTPTTTAPYPTPPSQACTGSFDAILKDSSGRLYAL TGPYWRLDQTPSSWGEVHRFEG
H.pulcherrinus	TQTTTIRPPTYPTPPRQACTGSFD AVIKDNSDRIYALAGRYWRLDQASP SWGVVRNRFEG
P.lividus	TTTTTS--PSRPSPPRRACSGSFD AVVRDSSNRIYAL TGPYFWQLDQPSPSWGLVSNRFEG
S.granularis	FNLPDNDV DAFQNGIFAYFFSECYYYYQTSTRYFPRIPI NRRYVGLPCDIDAAYKSGSN
H.pulcherrinus	FDLPENVDAS FQNGIFS YFFSGCYYYYQTSTRRRFPRT PFNRRWVGLPCDIDAVYKSGDS
P.lividus	FGLPQNDIAS FQRGVVTYFFSECYYYYQTSTQRNFPRIPVNRKWWGLPCNIDAVYRS-SR
S.granularis	GPTFFFKGGFVYKFSSTNQLLRRSRIYNI FWNVPNALRDGXEA VMPVDGGVYVHFXRDRGR
H.pulcherrinus	GTTYFFKGRFVYKFSSSNQ LQRSP ISSYFRNTPYALRDGVEAVVRVDD-VYLHFYRDGR
P.lividus	GPTYFFKDSFVYKFNSNNRLQRRTRISSLFNDVPSALHDGVEAVVRADR-NYIHFYRDGR

Figure 29 : Clonage de l'enzyme d'éclosion de *Sphaerechinus granularis* (Sg-HE).

Alignement de la séquence protéique déduite putative de l'enzyme d'éclosion de *Sphaerechinus granularis* avec les séquences protéiques des enzymes d'éclosion de *Paracentrotus lividus* (P22757) et d'*Hemicentrotus pulcherrinus* (P91953).

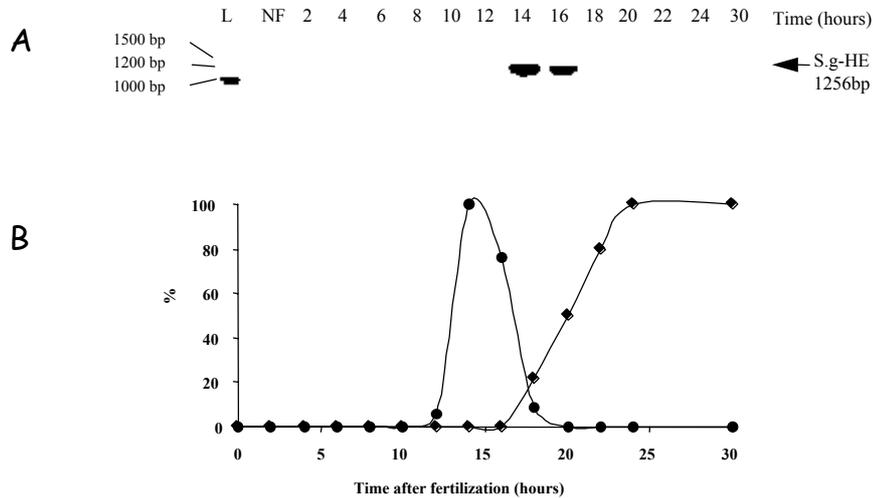


Figure 30 : L'ARNm codant pour Sg-HE est exprimé transitoirement avant l'éclosion.

Accumulation de l'ARNm codant pour l'enzyme d'éclosion de *Sphaerechinus granularis* (Sg-HE) au cours du développement. A : Analyse par RT-PCR de l'accumulation de l'ARNm Sg-HE au cours du temps. B : Représentation graphique de l'accumulation de l'ARNm Sg-HE et de l'éclosion au cours du temps. (◆) Éclosion (%); (●) abondance de l'ARNm Sg-HE mesuré en tant que pourcentage de la valeur maximale.

D- Analyse du rôle du Roundup sur la transcription générale, sur la synthèse de l'ARNm codant pour l'enzyme d'éclosion et sur l'éclosion.

Il a été mis en évidence que le Roundup, herbicide à base de glyphosate, induit un dysfonctionnement du cycle cellulaire en touchant l'activation de la kinase CDK1/cycline B au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin (Marc et al., 2002). Nous avons constaté que ce composé inhibe de manière réversible et dose dépendante l'éclosion des embryons au stade blastula (article 5). La fenêtre d'action du Roundup correspond à la transition morula/blastula pendant laquelle la transcription du génome zygotique devient indispensable. D'autre part, l'effet obtenu est comparable à celui de l'actinomycine D, inhibiteur de la transcription (Gross et Cousineau, 1963 ; Gross et Cousineau, 1964), connu pour affecter l'éclosion. Nous avons alors montré que le Roundup inhibe de 50 % la transcription post-fécondation (article 5). Comme nous l'avons vu en introduction, l'éclosion nécessite l'expression transitoire de l'enzyme d'éclosion (Lepage et Gache, 1990 ; Lepage et al., 1992-b). Nous avons cloné l'enzyme d'éclosion de *Sphaerechinus granularis* par RT-PCR. L'analyse de la séquence par BLAST et par comparaison avec les séquences de *Paracentrotus lividus* et d'*Hemicentrotus pulcherinus* (**Figure 29**) ainsi que le profil d'expression de l'ARNm (**Figure 30**) similaire à celui obtenu par Lepage et al., sur *P.lividus* montrent que le fragment cloné correspond à l'ARNm codant pour l'enzyme d'éclosion de *Sphaerechinus granularis*. Nous avons montré que le Roundup entraîne un délai d'environ deux heures de la transcription de cette enzyme (article 5). Ainsi, le Roundup inhibe partiellement la transcription globale post-fécondation ainsi que la transcription spécifique de l'enzyme d'éclosion en corrélation avec le processus d'éclosion.

Article 5

« The glyphosate-based pesticide Roundup impinges on transcription »

*Conclusions et
Perspectives*

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

La plupart des données présentées en introduction sont relativement récentes. De ce fait l'hypothèse d'un rôle de CDK1 dans la traduction d'ARNms spécifiques en phase M posée en début de ce travail était novatrice. Cette hypothèse s'est trouvée confortée au cours de cette thèse par d'autres travaux de recherche. Nous avons cependant été les premiers à montrer une régulation de l'activité traductionnelle par le recrutement de messagers dans les polysomes par CDK1 en phase M par une approche de criblage systématique.

1- La diminution de synthèse protéique globale en phase M : rôle de CDK1.

Nous avons montré que l'inhibition de l'activité CDK1 entraîne l'augmentation du recrutement des messagers R1 (codant pour une protéine transmembranaire homologue à un transporteur d'acides aminés) et D2 (non identifié) suggérant que CDK1 est impliqué dans le relargage de certains messagers des polysomes (article 1). Ce résultat est cohérent avec les données bibliographiques impliquant CDK1 dans la diminution de synthèse protéique globale par la phosphorylation de la P70^{S6K} (Papst et al., 1998 ; Shah et al., 2003). Le relargage de ces messagers pourrait participer à la modulation de synthèse protéique observée au cours du cycle cellulaire chez l'oursin (Mano, 1970 ; Monnier et al., 2001b).

Nous avons vu en introduction que différents mécanismes interviennent dans la diminution de la synthèse protéique en phase M. Il semble clair que l'inhibition de l'étape d'initiation par l'inhibition de la fixation d'eIF4E au CAP joue un rôle majeur dans la diminution de synthèse protéique en mitose (Bonneau et Sonenberg, 1987 ; Pyronnet et al., 2001). La régulation de l'étape d'élongation est moins documentée. Certains facteurs comme la S6K ou eEF2 voient leur

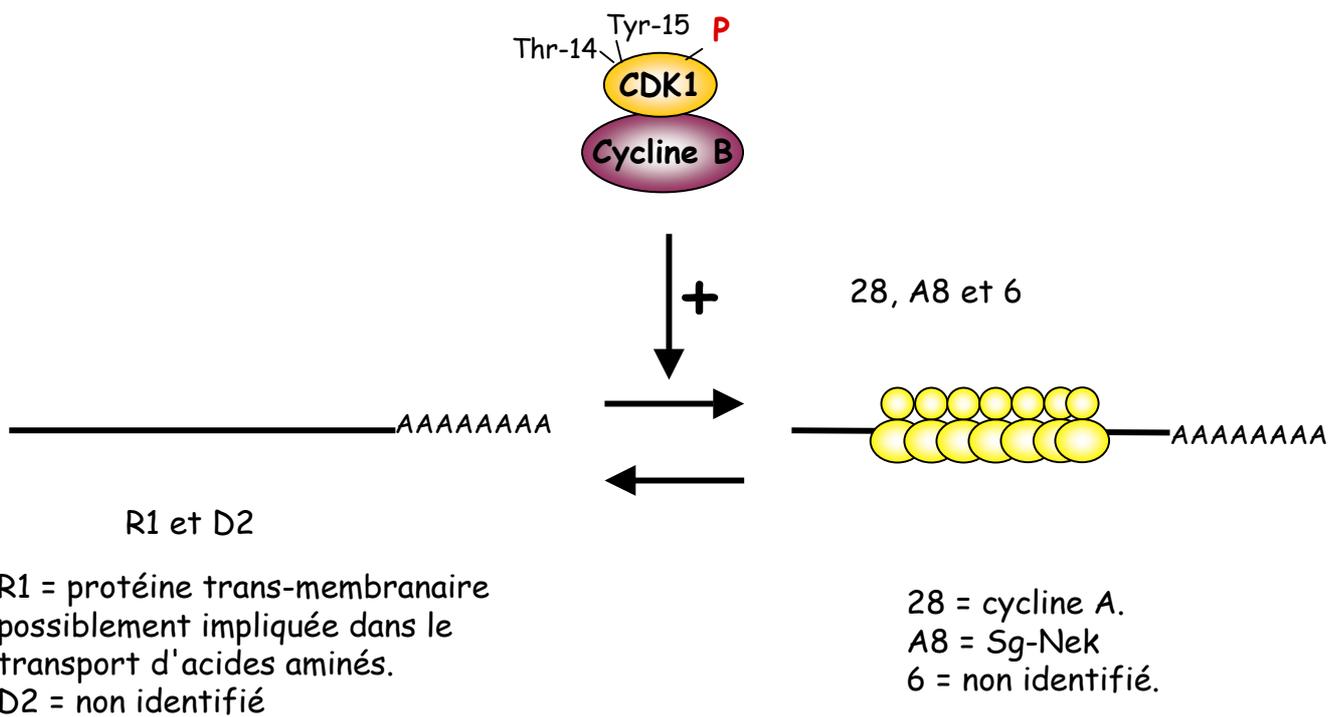


Figure 31 : Caractérisation et identification d'ARNms différemment recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/Cycline B

activité diminuer en mitose et ceci pourrait induire l'inhibition de cette étape (Celis et al., 1990 ; Papst et al., 1998 ; Shah et al., 2003). Nous avons mis en évidence un changement de localisation cellulaire du facteur d'élongation eEF1-delta en mitose (article 3). Ceci pourrait diminuer la quantité d'eEF1- δ disponible pour la traduction et participer à la diminution de synthèse protéique globale en phase M.

2- Le maintien de la synthèse de protéines spécifiques en phase M : rôle de CDK1.

Nous avons montré que l'activité CDK1 entraîne l'augmentation du recrutement des messagers 28, A8 et 6. Ces résultats montrent pour la première fois un rôle de CDK1 dans le recrutement d'ARNms spécifiques en mitose et suggèrent que CDK1 pourrait être important pour le maintien ou l'augmentation de la synthèse de certaines protéines spécifiques en phase M (article 1). Ce résultat est cohérent avec des données bibliographiques montrant que CDK1 est capable de promouvoir la synthèse de protéines spécifiques au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope (Culp et Musci, 1999 ; Franck-vaillant et al., 1999). Ainsi la synthèse constante de certaines protéines pourrait être nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire, et CDK1 participer à ce maintien en augmentant le recrutement polysomale des ARNms correspondants. En cohérence avec cette hypothèse nous avons déterminé que les clones 28 et A8 codent respectivement pour une cycline A (article 2) et une kinase homologue des Neks (Sg-Nek) (résultat non publié), deux protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Nigg, 2001). Ces résultats sont d'autant plus cohérents qu'il a été montré que l'ARNm codant pour la cycline A est polyadénylé en phase M (Groisman et al., 2002) et que le taux de synthèse de cette protéine est constant au cours du cycle chez certains invertébrés et en particulier chez l'oursin (Evans et al., 1983 ; Hunt et al., 1992). Ces résultats

sont à mettre en parallèle avec les différents messagers dont la synthèse est maintenue ou augmentée en mitose que sont c-myc, ODC et p58, qui sont aussi des molécules clefs impliquées dans le cycle cellulaire (Cornelis et al., 2000 ; Pyronnet et al., 2000 ; Kim et al., 2003). Ainsi l'implication de CDK1 en phase M afin que la synthèse de certains messagers spécifiques importants pour le cycle échappe à la diminution de synthèse protéique globale est très probable. Le suivi de la néosynthèse des protéines cycline A et Sg-*nek* au cours du cycle cellulaire permettrait de valider cette hypothèse.

Nous avons analysé en parallèle, le recrutement des messagers codant pour l'ODC et la cycline B dont le taux de synthèse est maintenu en mitose (Pyronnet et al., 2000 ; Groisman et al., 2002). Dans notre étude, le recrutement de ces deux messagers ne change pas en fonction de l'activité CDK1. Cependant, si CDK1 n'induit pas le recrutement de ces messagers, il ne favorise pas non plus leur relarguage. Leur synthèse pourrait ainsi être maintenue ou augmentée en mitose par un autre mécanisme indépendant de CDK1. Ainsi cela suppose que plusieurs mécanismes de régulation différents coexistent pour maintenir le taux de synthèse de protéines spécifiques : un ou des mécanisme(s) dépendant(s) de CDK1 régulant le recrutement des messagers A8, 6 et 28 et un ou des mécanisme(s) indépendant(s) de CDK1 contrôlant la traduction de l'ODC et de la cycline B par exemple. Il est cependant assez surprenant de constater que le recrutement de l'ARNm codant pour la cycline B, contrairement à celui codant pour la cycline A, n'est pas modifié en présence d'activité CDK1, puisque que le rôle de CDK1 dans la polyadénylation du messager codant pour la cycline B a été montré au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope (Mendez et al., 2002). Cette opposition suggère que les mécanismes de régulation traductionnelle existant au cours des divisions mitotiques embryonnaires de

l'oursin divergent de celle existant au cours des divisions méiotiques de l'ovocyte de xénope.

3- Rôle de la cycline A et de Sg-Nek dans le contrôle du cycle cellulaire.

3-1- La cycline A

Nos résultats démontrent un rôle de CDK1 dans le recrutement polysomal du messenger codant pour la cycline A en phase M de la première division embryonnaire de l'oursin. La cycline A joue un rôle important dans le bon déroulement du cycle cellulaire. La cycline A se fixe à la fois à CDK2 et à CDK1 et joue un rôle à la fois en phase S et M (Yam et al., 2003). Le rôle précis de la cycline A en mitose reste à définir. Sa présence est nécessaire à l'entrée en mitose (Pagano et al., 1992 ; Furuno et al., 1999 ; Voronina et al., 2003 ; Mitra et Enders 2004). Une fois le complexe CDK1/cycline B activé, l'activité de la cycline A ne serait plus nécessaire. Or nos résultats suggèrent un maintien de la synthèse de la cycline A en mitose et donc un rôle possible de cette cycline dans l'accomplissement de la mitose après l'activation de CDK1 et/ou dans la sortie de mitose. Il est aussi possible que ce maintien soit nécessaire à la préparation de la phase S du cycle mitotique suivant, étant donnée l'alternance très rapide de phases S et M observée au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin.

3-2- Sg-Nek

Nous avons d'autre part démontré un rôle de CDK1 dans le recrutement polysomal d'un messenger codant pour une nouvelle sérine/thréonine kinase homologue des Neks en phase M de la première division embryonnaire de l'oursin. Ce qui suggère un rôle de Sg-Nek dans la régulation du cycle cellulaire. Nous

avons isolé la première protéine kinase de type Nek chez l'oursin. Nous pouvons maintenant étudier le rôle de cette protéine et ces régulations. La kinase NIMA d'*Apergillus nidulans* joue un rôle primordial dans l'entrée en mitose ainsi que dans la transition métaphase/anaphase (Lu et Hunter, 1995 ; Fry et Nigg, 1997 ; O'Connell et al., 2003). Chez l'homme, 14 « NIMA related kinases » ont été identifiées d'après leur homologie de séquence. Les fonctions des Neks identifiées restent à découvrir. La plupart des Neks étudiées pour le moment participent à la régulation de la dynamique des microtubules et des centrosomes (O'Connell et al., 2003). Les homologies résident essentiellement dans l'extrémité catalytique en N-terminal alors que l'extrémité C-terminal diverge. Ceci suggère des rôles divers pour ces différentes protéines. NIMA présente en C-terminal un domaine coiled-coil important pour la formation d'oligomères, une séquence PEST impliquée dans la protéolyse ubiquitine dépendante de la protéine et un NLS, signal de localisation nucléaire (Lu et hunter, 1995 ; O'Connell et al., 2003). Certaines Neks possèdent comme NIMA un domaine coiled-coil et une boîte de destruction et pourraient correspondre à des homologues capables d'assurer des fonctions similaires à celle de NIMA. L'extrémité C-terminal d'autres de ces kinases, présente des motifs différents ou ne contient pas les motifs précités. Dans ce cas, ces kinases pourraient avoir des fonctions divergentes. La Sg-Nek isolée lors de ce travail possède un NLS bipartite et un domaine coiled-coil potentiel mais pas de boîte de destruction. Ceci suggère que NIMA et Sg-Nek pourraient être régulées différemment au cours du cycle cellulaire. Ce travail ouvre ainsi de larges perspectives sur la compréhension de son rôle et de sa régulation. La production d'une protéine de fusion GST-Sg-Nek est en cours et devrait permettre de tester son activité in vitro sur la β caséine connue pour être un bon substrat de NIMA (Fry et Nigg, 1997) et de produire des anticorps pour l'étude de son expression et de sa localisation. L'obtention d'anticorps pourrait de plus permettre par immunoprécipitation de déterminer

l'activité de cette kinase in vivo et de mettre en évidence des interactions de cette kinase avec d'autres protéines. Des études de microinjection de la protéine de fusion ou d'oligonucléotides antisens devraient permettre de déterminer sa fonction au cours du cycle cellulaire.

4- Hypothèse quant aux mécanismes de régulation traductionnelle impliqués dans le maintien de la synthèse de protéines en phase M.

L'inhibition de synthèse protéique globale ainsi que le maintien de la synthèse de messagers spécifiques en mitose impliquent de multiples contrôles. Par l'isolement de messagers modèles, ce travail offre la possibilité d'analyser le rôle de CDK1 sur les mécanismes de régulation traductionnel impliqués.

Nous avons constaté par Northern blot, la présence de 3 messagers cycline A et de deux messagers Sg-Nek. Nous avons observé en 3'UTR de l'ARNm codant pour la cycline A l'existence de plusieurs sites de polyadénylation alternatif potentiels. L'utilisation de différentes sondes recouvrant l'ensemble de la séquence de cet ARNm (région codante ou région 3'UTR) donne un signal identique en northern blot montrant que l'utilisation de ces sites n'est pas responsable de l'existence des différents messagers observés.

D'après la taille des clones obtenus, il est probable que les messagers que nous avons isolés correspondent aux messagers les plus petits observés en northern blot. Les différences entre ces messagers peuvent résider en 5'UTR, dans la région codante ou en 3'UTR. Une seule protéine cycline A ayant été détectée en western blot (Genevière et al., 1995) il est peu probable que l'un des messagers possède une région codante plus importante. Il est ainsi vraisemblable que ces différences résident dans les régions non codante du messenger cycline A. Il est aussi possible que ces différents messagers correspondent au même messenger dans lequel des séquences appelées « interspersed repetitive

sequences » seraient insérées. Ces séquences pourraient être impliquées dans la régulation de la traduction de ces messagers (Davidson, 1986 ; Guttridge et Smith, 1995 ; Zearfoss et al., 2003). Ainsi, il est imaginable que dans l'œuf une partie des messagers 28 et A8 soit stockée de cette manière afin de maintenir ces messagers sous forme dormante non traduite. Ces séquences pourraient être excisées selon le besoin de la cellule au fur et à mesure du développement afin de permettre la libération d'un messager de 5,5 Kb traduisible en polypeptide. Nos résultats démontrent que CDK1 intervient dans le recrutement des messagers cycline A et Sg-Nek. L'analyse du recrutement polysomal par Northern blot au cours du cycle cellulaire de ces messagers spécifiques serait intéressante. Ceci permettrait de déterminer si le recrutement des différents messagers mis en évidence est similaire.

En analysant les séquences 5'UTR des clones A8 (Sg-nek) et 28 (cycline A) obtenus, nous avons constaté qu'elles sont peu riches en GC et ne sont pas très structurées. Ainsi, il est peu probable que ces séquences contiennent un IRES. En revanche, nous avons mis en évidence par l'analyse des séquences 3'UTR des messagers 28 (cycline A), A8 (Sg-Nek) et 6 (non identifié) l'existence de plusieurs CPE potentiels. Ces séquences sont impliquées dans la polyadénylation cytoplasmique. Ceci laisse présager que ce type de régulation puisse intervenir. De plus nous avons vu en introduction que : 1) la CPEB est cible de CDK1 chez le xénope (Mendez et al., 2002) ; 2) la phosphorylation de la CPEB modifie la polyadénylation et donc la traduction de messagers (Mendez et al., 2002) ; et 3) le taux de maskin est régulé au cours du cycle cellulaire de l'embryon de xénope (Groisman et al., 2002). Ces données suggèrent que CDK1 soit susceptible de moduler la polyadénylation spécifique de messagers en mitose. Ainsi l'analyse de la polyadénylation de ces messagers est envisagée.

Ce travail, par l'obtention de messagers modèles, devrait amener à découvrir les mécanismes de régulation impliqués. Nous pourrions déterminer les séquences en cis et facteurs en trans importants dans la régulation de ces messagers. Ceci permettrait de déterminer les mécanismes d'action de CDK1 au niveau de ces régulations. A savoir : si ces facteurs sont des cibles directes ou indirectes de CDK1 et si des modifications post-traductionnelles de ces facteurs sont observées au cours du cycle et en fonction de l'état d'activation de CDK1. D'autre part étant donnée l'implication de la dérégulation de CDK1 dans de nombreux cancers, ceci permettrait de découvrir de nouvelles cibles de CDK1, sources potentielles d'intervention thérapeutique.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arion, D., and Meijer, L. (1989). M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. *Exp Cell Res* **183**, 361-75.
- Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L., and Beach, D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55**, 371-8.
- Ballantyne, S., Bilger, A., Astrom, J., Virtanen, A., and Wickens, M. (1995). Poly (A) polymerases in the nucleus and cytoplasm of frog oocytes: dynamic changes during oocyte maturation and early development. *RNA* **1**, 64-78.
- Ballantyne, S., Daniel, D. L., Jr., and Wickens, M. (1997). A dependent pathway of cytoplasmic polyadenylation reactions linked to cell cycle control by c-mos and CDK1 activation. *Mol Biol Cell* **8**, 1633-48.
- Baltz, J. M. (2001). Osmoregulation and cell volume regulation in the preimplantation embryo. *Curr Top Dev Biol* **52**, 55-106.
- Belle, R., Derancourt, J., Poulhe, R., Capony, J. P., Ozon, R., and Mulner-Lorillon, O. (1989). 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-1 gamma and EF-1 beta. *FEBS Lett* **255**, 101-4.
- Belsham, G. J., and Jackson, R. J. (2000). Picornavirus Translational Control. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 869-900. CSHL Press, New York.
- Bonneau, A. M., and Sonenberg, N. (1987). Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* **262**, 11134-9.
- Borgne, A., Ostvold, A. C., Flament, S., and Meijer, L. (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* **274**, 11977-86.
- 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.
- Brandhorst, B. P. (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **52**, 310-317.
- Brandis, J. W., and Raff, R. A. (1978). Translation of oogenetic mRNA in sea urchin eggs and early embryos. Demonstration of a change in translational efficiency following fertilization. *Dev Biol* **67**, 99-113.
- Browne, G. J., and Proud, C. G. (2002). Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells.

- Eur J Biochem* **269**, 5360-8.
- Cao, Q., and Richter, J. D. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *Embo J* **21**, 3852-62.
- Carlberg, U., Nilsson, A., and Nygard, O. (1990). Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur J Biochem* **191**, 639-45.
- Celis, J. E., Madsen, P., and Ryazanov, A. G. (1990). Increased phosphorylation of elongation factor 2 during mitosis in transformed human amnion cells correlates with a decreased rate of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4231-5.
- Charlesworth, A., Cox, L. L., and MacNicol, A. M. (2004). CPE- and CPEB-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*.
- Clemens, M. J., and Bommer, U. A. (1999). Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1-23.
- Colgan, D. F., Murthy, K. G., Prives, C., and Manley, J. L. (1996). Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature* **384**, 282-5.
- Colgan, D. F., Murthy, K. G., Zhao, W., Prives, C., and Manley, J. L. (1998). Inhibition of poly(A) polymerase requires p34cdc2/cyclin B phosphorylation of multiple consensus and non-consensus sites. *Embo J* **17**, 1053-62.
- 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.
- 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.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., and Beyaert, R. (2000). Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* **5**, 597-605.
- Costantini, F. D., Scheller, R. H., Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1978). Repetitive sequence transcripts in the mature sea urchin oocyte. *Cell* **15**, 173-87.
- Culp, P. A., and Musci, T. J. (1999). c-mos and cdc2 cooperate in the translational activation of fibroblast growth factor receptor-1 during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Biol Cell* **10**, 3567-81.
- Datta, B., Datta, R., Mukherjee, S., and Zhang, Z. (1999). Increased phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha at the G2/M boundary in human osteosarcoma cells correlates with deglycosylation of p67 and a decreased rate of protein synthesis. *Exp Cell Res* **250**, 223-30.
- Datta, B., Ray, M. K., Chakrabarti, D., Wylie, D. E., and Gupta, N. K. (1989). Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67)

- and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 alpha-subunit. *J Biol Chem* **264**, 20620-4.
- Davidson, E. H. (1986). The nature and function of maternal transcripts. In "Gene activity in early development" (E. DAVIDSON, Ed.), pp. 46-125. Academic Press, Orlando.
- Davidson, E. H., Hough-Evans, B. R., and Britten, R. J. (1982). Molecular biology of the sea urchin embryo. *Science* **217**, 17-26.
- Davidson, E. H., Jacobs, H. T., Thomas, T. L., Hough-Evans, B. R., and Britten, R. J. (1983). Poly(A) RNA of the egg cytoplasm: structural resemblance to the nuclear RNA of somatic cells. *Ciba Found Symp* **98**, 6-24.
- De Moor, C. H., and Richter, J. D. (1997). The Mos pathway regulates cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **17**, 6419-26.
- De Moor, C. H., and Richter, J. D. (1999). Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *Embo J* **18**, 2294-303.
- De Nadai, C., Huitorel, P., Chiri, S., and Ciapa, B. (1998). Effect of wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, on the first mitotic divisions of the fertilized sea urchin egg. *J Cell Sci* **111**, 2507-18.
- Dettlaff, T. A., Nikitina, L. A., and Stroeveva, O. G. (1964). The Role of the Germinal Vesicle in Oocyte Maturation in Anurans as Revealed by the Removal and Transplantation of Nuclei. *J Embryol Exp Morphol* **12**, 851-73.
- Dever, T. E. (1999). Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci* **24**, 398-403.
- Dickson, K. S., Bilger, A., Ballantyne, S., and Wickens, M. P. (1999). The cleavage and polyadenylation specificity factor in *Xenopus laevis* oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation. *Mol Cell Biol* **19**, 5707-17.
- Dorée, M. (2003). Le déclenchement de la mitose chez les eucaryotes supérieurs. *médecine/Sciences* **19**, 299-307.
- Doree, M., and Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* **115**, 2461-4.
- Duncan, R., Milburn, S. C., and Hershey, J. W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* **262**, 380-8.
- Dunphy, W. G., and Newport, J. W. (1988). Mitosis-inducing factors are present in a latent form during interphase in the *Xenopus* embryo. *J Cell Biol* **106**, 2047-56.
- Epel, D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**, 899-906.
- Epel, D. (1972). Activation of an Na⁺-dependent amino acid transport system upon fertilization of sea urchin eggs. *Exp Cell Res* **72**, 74-89.

- Epel, D. (1990). The initiation of development at fertilization. *Cell Differ Dev* **29**, 1-12.
- Eremenko, T., and Volpe, P. (1975). Polysome translational state during the cell cycle. *Eur J Biochem* **52**, 203-10.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.
- Fan, H., and Penman, S. (1970). Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. *J Mol Biol* **50**, 655-70.
- Fesquet, D., Morin, N., Doree, M., and Devault, A. (1997). Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling Xenopus egg extracts? *Oncogene* **15**, 1303-7.
- Flytzanis, C. N., Brandhorst, B. P., Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1982). Developmental patterns of cytoplasmic transcript prevalence in sea urchin embryos. *Dev Biol* **91**, 27-35.
- Fox, C. A., Sheets, M. D., Wahle, E., and Wickens, M. (1992). Polyadenylation of maternal mRNA during oocyte maturation: poly(A) addition in vitro requires a regulated RNA binding activity and a poly(A) polymerase. *Embo J* **11**, 5021-32.
- Fox, C. A., Sheets, M. D., and Wickens, M. P. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. *Genes Dev* **3**, 2151-62.
- Frank-Vaillant, M., Jesus, C., Ozon, R., Maller, J. L., and Haccard, O. (1999). Two distinct mechanisms control the accumulation of cyclin B1 and Mos in Xenopus oocytes in response to progesterone. *Mol Biol Cell* **10**, 3279-88.
- Fry, A. M., and Nigg, E. A. (1997). Characterization of mammalian NIMA-related kinases. *Methods Enzymol* **283**, 270-82.
- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* **147**, 295-306.
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* **5**, 2108-16.
- Gallie, D. R., and Tanguay, R. (1994). Poly(A) binds to initiation factors and increases cap-dependent translation in vitro. *J Biol Chem* **269**, 17166-73.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54**, 433-9.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., and Kirschner, M. W. (1991). *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}. *Cell* **67**, 197-211.
- Gebauer, F., and Richter, J. D. (1995). Cloning and characterization of a Xenopus poly(A) polymerase. *Mol Cell Biol* **15**, 1422-30.

- Genevriere-Garrigues, A. M., Barakat, A., Doree, M., Moreau, J. L., and Picard, A. (1995). Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. *J Cell Sci* **108**, 2693-703.
- Gerhart, J., Wu, M., and Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* **98**, 1247-55.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-63.
- Giudice, G. (1973). "Developmental biology of the sea urchin embryo." Academic Press, New-York.
- Golan, A., Yudkovsky, Y., and Hershko, A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* **277**, 15552-7.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S., and Sonenberg, N. (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* **18**, 334-42.
- Grainger, J. L., Von Brunn, A., and Winkler, M. M. (1986). Transient synthesis of a specific set of proteins during the rapid cleavage phase of sea urchin development. *Develop. Biol.* **114**, 403-415.
- Grainger, J. L., and Winkler, M. M. (1987). Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3947-3954.
- Grainger, J. L., Winkler, M. M., Shen, S. S., and Steinhardt, R. A. (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchine egg and early embryo. *Dev Biol* **68**, 396-406.
- Groisman, I., Jung, M. Y., Sarkissian, M., Cao, Q., and Richter, J. D. (2002). Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* **109**, 473-83.
- Gross, P. R., and Cousineau, G. H. (1963). Effects of actinomycin D on macromolecule synthesis and early development in sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 321-326.
- Gross, P. R., and Cousineau, G. H. (1964). Macromolecule Synthesis and the Influence of Actinomycin on Early Development. *Exp Cell Res* **33**, 368-95.
- Gross, P. R., and Fry, B. J. (1966). Continuity of protein synthesis through cleavage metaphase. *Science* **153**, 749-51.
- Guttridge, K. L., and Smith, L. D. (1995). *Xenopus* interspersed RNA families, Ocr and XR, bind DNA-binding proteins. *Zygote* **3**, 111-22.
- Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J* **14**, 5701-9.
- Hake, L. E., and Richter, J. D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* **79**, 617-27.

- Hartwell, L. H. (1970). Biochemical genetics of yeast. *Annu Rev Genet* **4**, 373-96.
- Heesom, K. J., Gampel, A., Mellor, H., and Denton, R. M. (2001). Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr Biol* **11**, 1374-9.
- Hershey, J. W. B., and Merrick, W. C. (2000). Pathway and Mechanism of Initiation of Protein Synthesis. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 33-88. CSHL Press, New York.
- Hershko, A. (1999). Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1571-5; discussion 1575-6.
- Hille, M. B., and Albers, A. A. (1979). Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature* **278**, 469-471.
- Hinnebusch, A. G. (2000). Mechanism and Regulation of initiator methionyl-tRNA Binding to Ribosomes. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 185-244. CSHL Press, New York.
- Hiremath, L. S., Webb, N. R., and Rhoads, R. E. (1985). Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein. *J Biol Chem* **260**, 7843-9.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* **12**, 53-63.
- Howell, S. H., and Baumgartel, D. M. (1978). Regulation of protein Synthesis during the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardi*. In « cell cycle regulation, ed. Jeter, Jr (Academic, new York), pp.167-184..
- Humphreys, T. (1969). Efficiency of translation of messenger-RNA before and after fertilization in sea urchins. *Dev. Biol.* **20**, 435-458.
- Humphreys, T. (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **26**, 201-208.
- Hunt, T., Luca, F. C., and Ruderman, J. V. (1992). The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol* **116**, 707-24.
- Iizuka, N., Najita, L., Franzusoff, A., and Sarnow, P. (1994). Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**, 7322-30.
- Izumi, T., and Maller, J. L. (1991). Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol Cell Biol* **11**, 3860-7.
- Izumi, T., and Maller, J. L. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell* **4**, 1337-50.
- Jackson, R. J. (2000). Comparative View of Initiation Site Selection Mechanisms. In

- "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 127-183. CSHL Press, New York.
- Jacobson, A. (1996). poly(A) metabolism and Translation : The Closed-loop Model. *In* "translational Control" (J. Hershey, M. Mathews, and N. Sonenberg, Eds.). CSHL Press, New York.
- Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* **62**, 2636-43.
- Janssen, G. M., Morales, J., Schipper, A., Labbe, J. C., Mulner-lorillon, O., Belle, R., and Moller, W. (1991). A major substrate of maturation promoting factor identified as elongation factor 1 beta gamma delta in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14885-14888.
- Kanki, J. P., and Newport, J. W. (1991). The cell cycle dependence of protein synthesis during *Xenopus laevis* development. *Dev Biol* **146**, 198-213.
- Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jessus, C., and Ozon, R. (1998). MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Exp Cell Res* **244**, 491-500.
- Karaiskou, A., Jessus, C., Brassac, T., and Ozon, R. (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci* **112** (Pt 21), 3747-56.
- Kelso-Winemiller, L., Yoon, J., Peeler, M. T., and Winkler, M. M. (1993). Sea urchin maternal mRNA classes with distinct development regulation. *Dev Genet* **14**, 397-406.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Choi, K., Kim, T. D., Hahm, B., Kim, K. T., and Jang, S. K. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol Cell Biol* **23**, 708-20.
- Kimball, S. R. (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 25-9.
- Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y. T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J. F., Le Roch, K., Doerig, C., Schultz, P., and Meijer, L. (2000). Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol* **7**, 411-22.
- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., and Peters, J. M. (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *Embo J* **22**, 6598-609.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1991). The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-14.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* **70**, 139-51.
- Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* **273**, 1377-80.

- Labbe, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A., and Doree, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *Embo J* **8**, 3053-8.
- Labbe, J. C., Lee, M. G., Nurse, P., Picard, A., and Doree, M. (1988). Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene cdc2+. *Nature* **335**, 251-4.
- 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.
- Lee, M. G., and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* **327**, 31-5.
- Lepage, T., and Gache, C. (1990). Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *EMBO J.* **9**, 3003-3012.
- Lepage, T., Ghiglione, C., and Gache, C. (1992a). Spatial and temporal expression pattern during sea urchin embryogenesis of a gene coding for a protease homologous to the human protein BMP-1 and to the product of the *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene tolloid. *Development* **114**, 147-63.
- Lepage, T., Sardet, C., and Gache, C. (1992b). Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Develop. Biol.* **150**, 23-32.
- Lu, K. P., and Hunter, T. (1995). The NIMA kinase: a mitotic regulator in *Aspergillus nidulans* and vertebrate cells. *Prog Cell Cycle Res* **1**, 187-205.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111-22.
- 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.
- Mano, Y. (1970). Cytoplasmic regulation and cyclic variation in protein synthesis in the early cleavage stage of the sea urchin embryo. *Dev Biol* **22**, 433-60.
- 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**, 326-31.
- Martinez-Salas, E., Quinto, S. L., Ramos, R., and Fernandez-Miragall, O. (2002). IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**, 755-63.
- Masui, Y., and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**, 129-45.
- Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B. (2000). Origins and principles of translational control. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 1-31. CSHL Press, New York.

- McGrew, L. L., Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B., and Richter, J. D. (1989). Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev* **3**, 803-15.
- Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* **5**, 311-326.
- Meijer, L., Arion, D., Golsteyn, R., Pines, J., Brizuela, L., Hunt, T., and Beach, D. (1989). Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *Embo J* **8**, 2275-82.
- Meijer, L., and Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res* **174**, 116-29.
- Mendez, R., Barnard, D., and Richter, J. D. (2002). Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *Embo J* **21**, 1833-44.
- Mendez, R., Hake, L. E., Andresson, T., Littlepage, L. E., Ruderman, J. V., and Richter, J. D. (2000a). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* **404**, 302-7.
- Mendez, R., Murthy, K. G., Ryan, K., Manley, J. L., and Richter, J. D. (2000b). Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell* **6**, 1253-9.
- Mendez, R., and Richter, J. D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 521-9.
- Merrick, W. C., and Nyborg, J. (2000). The Protein Biosynthesis Elongation. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 89-126. CSHL Press, New York.
- Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* **267**, 6321-30.
- Meyuhas, O., and Hornstein, E. (2000). Translational Control of TOP mRNAs. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 671-693. CSHL Press, New York.
- Minich, W. B., Balasta, M. L., Goss, D. J., and Rhoads, R. E. (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**, 7668-72.
- Minshall, N., Walker, J., Dale, M., and Standart, N. (1999). Dual roles of p82, the clam CPEB homolog, in cytoplasmic polyadenylation and translational masking. *RNA* **5**, 27-38.
- Minshull, J., Blow, J. J., and Hunt, T. (1989). Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell* **56**, 947-56.
- Minshull, J., Murray, A., Colman, A., and Hunt, T. (1991). *Xenopus* oocyte maturation does not require new cyclin synthesis. *J Cell Biol* **114**, 767-72.
- Mitra, J., and Enders, G. H. (2004). Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and

- Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene*.
- Monnier, A., Belle, R., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S., and Mulner-Lorillon, O. (2001a). Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. *Nucleic Acids Res* **29**, 1453-7.
- Monnier, A., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S., Belle, R., and Mulner-Lorillon, O. (2001b). Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. *Zygote* **9**, 229-36.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**, 261-291.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1995a). Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* **6**, 119-34.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., and Dunphy, W. G. (1995b). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
- Mugnier, P., and Tuite, M. F. (1999). Translation termination and its regulation in eukaryotes: recent insights provided by studies in yeast. *Biochemistry (Mosc)* **64**, 1360-6.
- Mulner-Lorillon, O., Minella, O., Cormier, P., Capony, J. P., Cavadore, J. C., Morales, J., Poulhe, R., and Belle, R. (1994). Elongation factor EF-1 delta, a new target for maturation-promoting factor in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* **269**, 20201-7.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-34.
- Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**, 275-80.
- Nairn, A. C., and Palfrey, H. C. (1987). Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem* **262**, 17299-303.
- Nakahata, S., Katsu, Y., Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y., and Yamashita, M. (2001). Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. *J Biol Chem* **276**, 20945-53.
- Nasmyth, K. (2001). A prize for proliferation. *Cell* **107**, 689-701.
- Nigg, E. A. (1991). The substrates of the cdc2 kinase. *Semin Cell Biol* **2**, 261-70.
- Nigg, E. A. (1993). Cellular substrates of p34(cdc2) and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* **3**, 296-301.
- Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 21-32.

- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100**, 71-8.
- Nurse, P. (2002). Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem* **3**, 596-603.
- Nurse, P., Thuriaux, P., and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **146**, 167-78.
- O'Connell, M. J., Krien, M. J., and Hunter, T. (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* **13**, 221-8.
- O'Farrell, P. H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* **11**, 512-9.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* **4**, 111-6.
- Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (1992). Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Embo J* **11**, 1763-72.
- Osmani, A. H., McGuire, S. L., and Osmani, S. A. (1991). Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* **67**, 283-91.
- Osmani, S. A., Pu, R. T., and Morris, N. R. (1988). Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell* **53**, 237-44.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* **11**, 961-71.
- Palmer, A., Gavin, A. C., and Nebreda, A. R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *Embo J* **17**, 5037-47.
- Papst, P. J., Sugiyama, H., Nagasawa, M., Lucas, J. J., Maller, J. L., and Terada, N. (1998). Cdc2-cyclin B phosphorylates p70 S6 kinase on Ser411 at mitosis. *J Biol Chem* **273**, 15077-84.
- Paris, J., and Richter, J. D. (1990). Maturation-specific polyadenylation and translational control: diversity of cytoplasmic polyadenylation elements, influence of poly(A) tail size, and formation of stable polyadenylation complexes. *Mol Cell Biol* **10**, 5634-45.
- Paris, J., Swenson, K., Piwnica-Worms, H., and Richter, J. D. (1991). Maturation-specific polyadenylation: in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein. *Genes Dev* **5**, 1697-708.
- Parisi, E., Filosa, S., De Petrocellis, B., and Monroy, A. (1978). The pattern of cell division in the early development of the sea urchin. *Paracentrotus lividus*. *Dev. Biol.* **65**, 38-49.
- Parker, L. L., Atherton-Fessler, S., Lee, M. S., Ogg, S., Falk, J. L., Swenson, K. I., and Piwnica-

- Worms, H. (1991). Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a *wee1+* dependent manner. *Embo J* **10**, 1255-63.
- Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr., and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**, 762-7.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320-5.
- Peter, M., Le Peuch, C., Labbe, J. C., Meyer, A. N., Donoghue, D. J., and Doree, M. (2002). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep* **3**, 551-6.
- Pines, J., and Hunt, T. (1987). Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *Embo J* **6**, 2987-95.
- Porter, L. A., and Donoghue, D. J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 335-47.
- Posakony, J. W., Flytzanis, C. N., Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1983). Interspersed sequence organization and developmental representation of cloned poly(A) RNAs from sea urchin eggs. *J Mol Biol* **167**, 361-89.
- Proud, C. G. (2000). Control of Elongation. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 719-740. CSHL Press, New York.
- Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes and Development* **15**, 2083-2093.
- Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *Embo J* **18**, 270-9.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* **5**, 607-16.
- Qian, Y. W., Erikson, E., Taieb, F. E., and Maller, J. L. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **12**, 1791-9.
- Qin, X., and Sarnow, P. (2004). Preferential translation of IRES-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem*.
- Raught, B., Gingras, A. C., and Sonenberg, N. (2000). Regulation of Ribosomal Recruitment in Eucaryotes. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 245-294. CSHL Press, New York.
- Ray, M. K., Datta, B., Chakraborty, A., Chattopadhyay, A., Meza-Keuthen, S., and Gupta, N. K. (1992). The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 539-43.

- Redpath, N. T., Price, N. T., Severinov, K. V., and Proud, C. G. (1993). Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. *Eur J Biochem* **213**, 689-99.
- Richter, J. D. (2000). Influence of Polyadenylation-induced Translation on Metazoan Development and Neuronal Synaptic Function. *In* "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 785-806. CSHL Press, New York.
- Rinaldi, A. M., and Monroy, A. (1969). Polyribosome formation and RNA synthesis in the early post-fertilization stages of the sea urchin egg. *Dev Biol* **19**, 73-86.
- Roe, J. L., and Lennarz, W. J. (1990). Biosynthesis and secretion of the hatching enzyme during sea urchin embryogenesis. *J Biol Chem* **265**, 8704-11.
- Rosenthal, E. T., and Ruderman, J. V. (1987). Widespread changes in the translation and adenylation of maternal messenger RNAs following fertilization of *Spisula* oocytes. *Dev Biol* **121**, 237-46.
- Ryazanov, A. G., Shestakova, E. A., and Natapov, P. G. (1988). Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* **334**, 170-3.
- Sachs, A. B. (2000). Physical and Functional Interaction between the mRNA Cap Structure and the Poly(A) tail. *In* "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 447-466. CSHL Press, New York.
- 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.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, 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.
- Scheper, G. C., van Kollenburg, B., Hu, J., Luo, Y., Goss, D. J., and Proud, C. G. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* **277**, 3303-9.
- Schneider, R. J., and Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* **28**, 130-6.
- Shah, O. J., Ghosh, S., and Hunter, T. (2003). Mitotic regulation of ribosomal S6 kinase 1 involves Ser/Thr, Pro phosphorylation of consensus and non-consensus sites by Cdc2. *J Biol Chem* **278**, 16433-42.
- Solomon, M. J., Harper, J. W., and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* **12**, 3133-42.
- Standart, n. (1987). Cyclin Synthesis, modification and destruction during meiotic maturation of the starfish oocyte. *developmental biology* **124**, 248-258.
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R., and Richter, J. D. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell* **4**, 1017-27.

- Stebbins-Boaz, B., Hake, L. E., and Richter, J. D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *Embo J* **15**, 2582-92.
- Strausfeld, U., Labbe, J. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* **351**, 242-5.
- Stukenberg, P. T., Lustig, K. D., McGarry, T. J., King, R. W., Kuang, J., and Kirschner, M. W. (1997). Systematic identification of mitotic phosphoproteins. *Curr Biol* **7**, 338-48.
- Tarnowka, M. A., and Baglioni, C. (1979). Regulation of protein synthesis in mitotic HeLa cells. *J Cell Physiol* **99**, 359-67.
- Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* **15**, 7168-77.
- Tarun, S. Z., Jr., Wells, S. E., Deardorff, J. A., and Sachs, A. B. (1997). Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9046-51.
- Thom, G., Minshall, N., Git, A., Argasinska, J., and Standart, N. (2003). Role of cdc2 kinase phosphorylation and conserved N-terminal proteolysis motifs in cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB) complex dissociation and degradation. *Biochem J* **370**, 91-100.
- Topalian, S. L., Kaneko, S., Gonzales, M. I., Bond, G. L., Ward, Y., and Manley, J. L. (2001). Identification and functional characterization of neo-poly(A) polymerase, an RNA processing enzyme overexpressed in human tumors. *Mol Cell Biol* **21**, 5614-23.
- Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M., and Morgan, D. O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**, 859-64.
- Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* **2**, 893-8.
- Voronina, E., Marzluff, W. F., and Wessel, G. M. (2003). Cyclin B synthesis is required for sea urchin oocyte maturation. *Dev Biol* **256**, 258-75.
- Wagenaar, E. B. (1983). The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp Cell Res* **144**, 393-403.
- Walker, J., Dale, M., and Standart, N. (1996). Unmasking mRNA in clam oocytes: role of phosphorylation of a 3' UTR masking element-binding protein at fertilization. *Dev Biol* **173**, 292-305.
- Walker, J., Minshall, N., Hake, L., Richter, J., and Standart, N. (1999). The clam 3' UTR masking element-binding protein p82 is a member of the CPEB family. *RNA* **5**, 14-26.
- Waskiewicz, A. J., Johnson, J. C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S. R., and Cooper, J. A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor

- 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* **19**, 1871-80.
- Welch, E. M., Wang, W., and Peltz, S. W. (2000). Translation Termination : it's Not the End of the Story. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 467-486. CSHL Press, New York.
- Welk, J. F., Charlesworth, A., Smith, G. D., and MacNicol, A. M. (2001). Identification and characterization of the gene encoding human cytoplasmic polyadenylation element binding protein. *Gene* **263**, 113-20.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., and Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**, 135-40.
- Whalen, S. G., Gingras, A. C., Amankwa, L., Mader, S., Branton, P. E., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1996). Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *J Biol Chem* **271**, 11831-7.
- Wilt, F. H. (1977). The dynamics of maternal poly(A)-containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. *Cell* **11**, 673-81.
- Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M. A., Barnitt, A., Quinlan, E., Heynen, A., Fallon, J. R., and Richter, J. D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* **21**, 1129-39.
- Yam, C. H., Fung, T. K., and Poon, R. Y. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1317-26.
- Zearfoss, N. R., Chan, A. P., Kloc, M., Allen, L. H., and Etkin, L. D. (2003). Identification of new Xlsirt family members in the *Xenopus laevis* oocyte. *Mech Dev* **120**, 503-9.
- Zhao, W., and Manley, J. L. (1996). Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms. *Mol Cell Biol* **16**, 2378-86.
- Zuberek, J., Wyslouch-Cieszynska, A., Niedzwiecka, A., Dadlez, M., Stepinski, J., Augustyniak, W., Gingras, A. C., Zhang, Z., Burley, S. K., Sonenberg, N., Stolarski, R., and Darzynkiewicz, E. (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**, 52-61.

Annexes

ANNEXES

1 - Clonage et séquençage de l'ODC de *Sphaerechinus granularis*.

Après avoir dessiné des amorces d'après la séquence d'un clone de *Strongylocentrotus purpuratus* PC_0011_B1_D10_MR homologue à l'ODC, nous avons cloné le messenger codant pour l'ODC de *Sphaerechinus granularis* ([AJ541053](#)) par RT-PCR. Comme le montre la figure ci-dessous, la séquence de *S. granularis* obtenue présente de 44 à 47 % d'identité avec les ODCs de xénope, d'humain et de zebrafish et 89 % d'identité avec la séquence de *S. purpuratus*.

S.granularis	MEQLNDKSMKTELFDSSETTLKDIIVSKINDPTMREDADDAFFIGDLGDVVIQKHKWL
S.purpuratus	MEQLSADSFRTELYDSSEMTLKDIIESKINDPTMREDADDAFFIGDLGDI IQKHKWL
Xénope	MNSFSNDDFDFSFLFEEG-FSARDIVEQKINEVSL-SDDKDAFYVADFGDIVKKHVRWF
human	MNCFGNEEFDCHFLDEG-FTAkdILDQKINEVSS-SDDKDAFYVADLGDILKKHLRWL
Danio	MTACTGSDFDFAFLEEG-FCARDIVEQKINESSL-SDDKDAFYVADLGDV LKKHLRWL

S.granularis	RNLPRVEPHYAVKCNPDVHVLKLLAGLNIGFDCASKNEIQEILKIGVSPSRIIFANP
S.purpuratus	RNLPRVEPHYAVKCNPDHLVLLSGLNLGFDCASKNEIQHVLKIGVSPSRIIFANP
Xénope	KALPRVTFPFYAVKCNKGKAIKVTLSILGAGFDCASKTEIQLVQSIGVSPERI IYANP
human	KALPRVTFPFYAVKCNDSKAIKVTLAATGTGFDCASKTEIQLVQSLGVPPERI IYANP
Danio	RVLPRITFPFYAVKCNDSRAVVTTLASL GAGFDCASKTEIQIVQSVGVDPSRI IYANP

Alignement de l'ODC putative de *Sphaerechinus granularis* avec les ODC de xénope ([P27120](#)), humaine ([P11926](#)) et de zebrafish ([AAH47796](#)), ainsi qu'avec la séquence protéique déduite d'un clone de *S.purpuratus* (PC_0011_B1_D10_MR banque de davidson).

2 - Clonage et séquençage de l'actine cytoplasmique de *Sphaerechinus granularis*.

Après avoir dessiné des amorces d'après l'alignement de séquence des actines cytoplasmiques de plusieurs oursins : *Heliocidaris erythrogramma*, *Lytechinus pictus* et *Strongylocentrotus purpuratus*, nous avons cloné le messenger codant pour l'actine cytoplasmique de *Sphaerechinus granularis* par RT-PCR ([AJ541052](#)). Comme le montre la figure ci-dessous, la séquence de *S. granularis* obtenue présente de 94 à 99 % d'identité avec l'actine cytoplasmique de différents oursins au niveau protéique.

CyI-S.purpuratus	VLSLYASGRRTTGIVFDSGDGVSHSTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLDYLMKILTERGY
CyI-H.erythrogramma	VLSLYASGRRTTGIVFDSGDGVSHSTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLDYLMKILTERGY
CyI-T.gratilla	VLSLYASGRRTTGIVFDSGDGVSHSTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLDYLMKILTERGY
S.granularis	VLSLYASGRRTTGIVFDSGDGVSHSTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLDYLMKILTERGY
CyI-S.purpuratus	SFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCP
CyI-H.erythrogramma	SFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMSTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRAP
CyI-T.gratilla	SFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCP
S.granularis	SFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMQTAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCP
CyI-S.purpuratus	EALFQPSFLGMESAGIHETCYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGSTMFPGIADRMQKEIT
CyI-H.erythrogramma	ESLFQPSFLGMESAGIHETCYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGSTMFPGIADRMQKEIT
CyI-T.gratilla	ESLFQPSFLGMESAGIHETCYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGSTMFPGIADRMQKEIT
S.granularis	ESLFQPSFLGMESAGIHETCYNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGSTMFPGIADRMQKEIT
CyI-S.purpuratus	ALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILAS
CyI-H.erythrogramma	ALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILAS
CyI-T.gratilla	ALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILAS
S.granularis	ALAPPTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILAS

Figure 16 : Alignement de la séquence protéique de l'actine putative de *Sphaerechinus granularis* avec les séquences des actines CyI de 3 autres oursins (*Heliocidaris erythrogramma* ([AAA96348](#)), *Tripneustes gratilla* ([AAB31965](#)) et *Strongylocentrotus purpuratus* ([ATURS](#))).