



HAL
open science

Le facteur d'élongation de la traduction eEF1B : structure macromoléculaire et relation avec le cycle cellulaire

Frédéric Le Sourd

► **To cite this version:**

Frédéric Le Sourd. Le facteur d'élongation de la traduction eEF1B : structure macromoléculaire et relation avec le cycle cellulaire. Biologie cellulaire. Rennes 1, 2006. Français. NNT : . tel-01117560

HAL Id: tel-01117560

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117560>

Submitted on 17 Feb 2015

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

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

Avertissement

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

**N° ORDRE : 3447
de la THÈSE**

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : *DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1*
Mention : Biologie

Par

Frédéric LE SOURD

Équipe d'accueil : "Cycle Cellulaire et Développement"
École Doctorale : "Vie-Agro-Santé"
Composante universitaire : Unité Mixte de Recherche CNRS/UPMC 7150
"Mer & Santé", Station Biologique de Roscoff

TITRE DE LA THÈSE :

Le facteur d'élongation de la traduction, eEF1B :
Structure macromoléculaire et
Relation avec le cycle cellulaire

SOUTENUE **LE 21 DÉCEMBRE 2006** devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY

Dr Anne-Marie GENEVIÈRE, rapporteur
Pr Jean-Pierre ROUSSET, rapporteur
Pr Olivier SIRE, examinateur
Dr Daniel THOMAS, examinateur
Pr Gilles SALBERT, examinateur
Dr Odile MULNER-LORILLON, directrice de thèse

SOMMAIRE GENERAL

SOMMAIRE GENERAL	1
SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX	3
LISTE DES ABBREVIATIONS	4
LISTE DES PUBLICATIONS	6
AVANT PROPOS	7
INTRODUCTION	11
I - Le facteur eEF1B et la synthèse protéique	11
A - Les trois étapes de la synthèse protéique	11
1 - L'étape d'initiation de la synthèse protéique	13
2 - L'étape d'élongation de la synthèse protéique	15
3 - L'étape de terminaison de la synthèse protéique	15
B - L'élongation et ses acteurs protéiques	16
1 - Les phases de l'élongation	16
2 - Fidélité de la traduction, "recoding" et régulation de l'élongation	20
3 - Structure du complexe eEF1B	23
a) La sous-unité eEF1B γ	26
b) Les sous-unités d'échange de GDP/GTP : eEF1B α , eEF1B β et eEF1B δ	31
i) eEF1B α	31
ii) eEF1B β , le deuxième facteur d'échange spécifique des plantes	34
iii) eEF1B δ , le deuxième facteur d'échange spécifique des animaux	35
c) La Valyl-ARNt Synthétase	41
d) Structure quaternaire du complexe eEF1B	43
C - eEF1B : une cible multiple de phosphorylation	48
1 - La protéine eEF1B γ , substrat de CDK1/cycline B	48
2 - Phosphorylation de la protéine eEF1B α	53
3 - Phosphorylation des protéines d'échange de nucléotides chez les plantes	55
4 - La protéine eEF1B δ , cible de nombreuses kinases	56
5 - Rôle des phosphorylations du complexe eEF1B sur l'élongation	59
D - Le facteur eEF1B : vers une multifonctionnalité cellulaire	65
1 - Du cycle cellulaire au cancer	65
2 - eEF1B, un facteur impliqué dans la détoxification et/ou dans l'équilibre redox de la cellule ?	70
3 - eEF1 et virus	73

II - Le modèle biologique : le développement précoce de l'embryon d'oursin	77
A - Un modèle reconnu pour l'étude du cycle cellulaire et du développement	77
1- Présentation de l'oursin <i>Sphaerechinus granularis</i>	78
2- La reprise du cycle cellulaire chez <i>Sphaerechinus granularis</i>	80
B - Un modèle de choix pour l'étude de la régulation de la traduction	84
C - Conclusions sur le modèle	87
RESULTATS	89
I - Mise en évidence de l'expression simultanée de diverses populations du complexe eEF1B dans la cellule	91
II - Le facteur eEF1B : une cible universelle de CDK	99
III - Revue des connaissances sur le complexe eEF1B	120
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	141
I - Structure du complexe eEF1B	141
II - Fonction du complexe eEF1B	144
III - eEF1B : un complexe plein d'avenir	148
BIBLIOGRAPHIE	149
ANNEXES	166
Annexe 1 : alignement ClustalX sur EF1Bα (données supplémentaires de l'article 3)	166
Annexe 2 : alignement ClustalX sur eEF1Bδ (données supplémentaires de l'article 3)	175
Annexe 3 : Séquences protéiques des protéine eEF1Bα (partielle), eEF1Bδ et eEF1Bγ chez l'oursin	179

SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes _____	8
Figure 2 : Les trois phases de la synthèse des protéines : l'initiation, l'élongation et la terminaison _____	12
Figure 3 : Les étapes de la phase d'élongation de la synthèse protéique _____	16
Figure 4 : Composition schématique des facteurs d'élongation selon les espèces ____	24
Figure 5 : La protéine eEF1B γ du complexe eEF1B _____	27
Figure 6 : La protéine eEF1B α du complexe eEF1B _____	31
Figure 7 : La protéine eEF1B δ du complexe eEF1B chez les animaux _____	36
Figure 8 : Les deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 du complexe eEF1B chez l'oursin _____	39
Figure 9 : Evolution de la Valyl-ARNt synthétase au cours de l'évolution _____	41
Figure 10 : Les différents modèles structuraux publiés à ce jour pour le complexe eEF1B _____	45
Figure 11 : Les sites de phosphorylation sur eEF1B γ _____	48
Figure 12 : Comparaisons des sites de phosphorylation sur les protéines eEF1B γ (partie haute de la figure) et eEF1B α (partie basse de la figure) entre l'homme et l'oursin <i>S.purpuratus</i> _____	51
Figure 13 : Universalité de la phosphorylation par CDK1/Cycline B sur le complexe eEF1B. _____	52
Figure 14 : Comparaison des sites de phosphorylation sur eEF1B α et eEF1B β chez le riz. _____	54
Figure 15 : Les sites de phosphorylation sur eEF1B δ _____	57
Figure 16 : Le facteur eEF1B et ses composants, cibles de phosphorylations multiples. _____	59
Figure 17 : Suivi en immunofluorescence de la localisation des sous-unités du facteur eEF1B au cours de la première division mitotique de l'embryon d'oursin ____	67
Figure 18 : L'oursin <i>Sphaerechinus granularis</i> _____	78
Figure 19 : Représentation schématique de l'évolution des espèce à partir de l'embranchement des bilatériens _____	79
Figure 20 : Fécondation et première division mitotique chez l'oursin _____	80
Figure 21 : Les premiers stades du développement précoce de l'oursin <i>Sphaerechinus granularis</i> (extrait du manuscrit de thèse d'Anabelle Monnier, 2001) _____	81
Tableau 1 : Proposition d'une nomenclature clarifiée des composants d'eEF1B ____	26

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN :	Acide Ribo-Nucléique
ARNm :	Acide Ribo-Nucléique messenger
ARNt :	Acide Ribo-Nucléique de transfert
ATP :	Adénosine Tri-Phosphate
CDKs :	Kinases dépendantes des cyclines ("Cyclin-Dependent Kinases")
CK2 :	Caséine Kinase 2
coiffe m7GTP :	coiffe méthyle 7 Guanosine Tri Phosphate
EF-Tu :	Facteur d'élongation non-thermostable bactérien ("Elongation Factor Thermo-unstable")
EF-Ts :	Facteur d'élongation thermostable bactérien ("Elongation Factor Thermo-stable")
eEFs :	Facteur d'élongation eucaryote ("eukaryotic Elongation Factors")
eEF1A :	Facteur d'élongation 1A eucaryote ("eukaryotic Elongation Factor 1A")
eEF1B :	Facteur d'élongation 1B eucaryote ("eukaryotic Elongation Factor 1B")
eIFs :	Facteur d'initiation eucaryote ("eukaryotic Initiation Factors")
eRFs :	Facteur de terminaison eucaryote ("eukaryotic Releasing Factors")
GDP :	Guanosine Di-Phosphate
GTP :	Guanosine Tri-Phosphate

GST :	Glutathion S-Transférase
IRES :	Site interne d'entrée du ribosome ("Internal Ribosome Entry Site")
ITAF :	Facteur de trans-activation des IRES ("IRES Trans-Activating Factor")
MAP kinase :	Protéine kinase activée par les mitogènes ("Mitogen Activated Protein kinase")
MPF :	Facteur promouvant la maturation puis Facteur de phase M ("Maturation Promoting Factor" puis "M-Phase Factor")
mTOR :	Cible de la rapamycine chez les mammifères ("mamalian Target Of Rapamycin")
PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
PKC :	Protéine Kinase C
S6K :	Kinase de la sous-unité ribosomale S6 ("S6-Kinase")
ValRS :	Valyl-ARNt synthétase

LISTE DES PUBLICATIONS

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

Le Sourd, F., Cormier, P., Bach, S., Boulben, S., Bellé, R., and Mulner-Lorillon, O. (2006b). Cellular coexistence of two high molecular subsets of eEF1B complex. *FEBS Lett* **580**, 2755-60.

Le Sourd, F., Bellé, R., Cormier, P., and Mulner-Lorillon, O. (2006c). Molecular cloning of sea urchin eEF1B α and eEF1B γ puts forward the universal presence of a CDK phosphorylation site on one or the other eEF1B components. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, Accepted

Avant propos

AVANT PROPOS

Les protéines, macromolécules organiques, sont des "machines" moléculaires majeures indispensables à la vie d'une cellule. A la fois ouvrières et maîtres d'oeuvre, elles permettent la mise en place de l'organisation de la cellule, le maintien et la régulation de son bon fonctionnement.

La synthèse d'une protéine dans un type cellulaire spécifique ou à un moment précis de la vie de la cellule nécessite une régulation extrêmement fine de l'expression des gènes. Cette régulation commence par la transcription de l'ADN (porteur de l'information génétique) en ARN messagers (ARNm) et se concrétise au niveau des ribosomes où les ARNm sont traduits en protéines (figure 1).

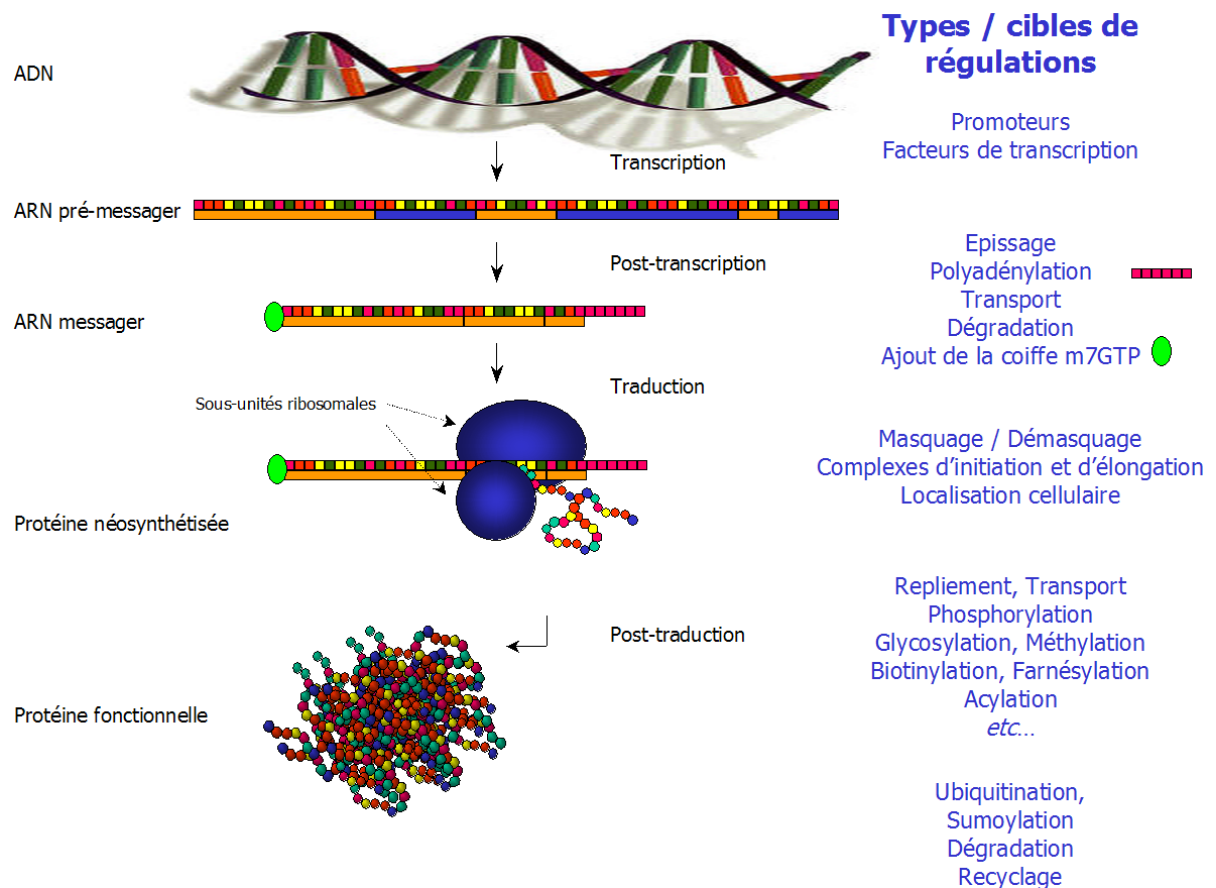


Figure 1 : Les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes

Le rôle fondamental des régulations aux niveaux traductionnel et post-traductionnel est de plus en plus avéré. Les petits carrés sur l'ARN schématisent les ribonucléotides de la séquence primaire du messenger. Les rectangles oranges et bleus schématisent respectivement les exons et les introns. Les ronds multicolores correspondent aux acides aminés de la séquence primaire de la protéine.

Chacune de ces étapes est un processus finement régulé permettant une synthèse protéique ciblée dans le temps et dans l'espace. Les premières études ont montré que la régulation de l'expression des gènes se situait à l'étape de la transcription. Plus tard, l'importance d'une régulation au niveau de la traduction a également été montrée, étayé par le fait qu'il existe une disparité majeure entre les niveaux des messagers et des protéines. Ainsi, un patrimoine génétique simple peut s'exprimer au travers d'un protéome complexe du fait de régulations au niveau transcriptionnel mais également aux niveaux traductionnels et post-traductionnels.

Depuis une décennie, la régulation de l'expression des gènes au niveau de la traduction (lecture des messagers) est devenue le sujet de recherches actives (Mathews *et al.*, 2000). Le processus de traduction des protéines est classiquement divisé en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les études de la régulation au niveau de l'initiation ont permis la mise en évidence de mécanismes complexes encore largement explorés [revue dans (Sonenberg et Dever, 2003)]. Le contrôle de la synthèse protéique au niveau de l'élongation suscite de plus en plus d'intérêt. Il a d'ailleurs fait l'objet d'une session au congrès "Translational Control" à Cold Spring Harbor en septembre 2006. En effet, l'afflux croissant d'études rapportant les nombreuses implications des facteurs d'élongation de la traduction dans divers processus physiologiques (Proud, 2000) ou encore la complexité macromoléculaire et structurale de ces facteurs (Minella *et al.*, 1998), supposent l'existence d'une régulation fine de l'activité de traduction au niveau de la phase de l'élongation et suggèrent leur implication dans d'autres fonctions cellulaires.

Il est important de souligner l'intérêt d'une régulation de la traduction au niveau de l'élongation. En effet, une régulation coordonnée de l'initiation et de l'élongation est indispensable pour l'expression harmonieuse des protéines en fonction des besoins cellulaires. De plus, l'élongation a la capacité de faire des pauses, sans dissociation des ribosomes, ce qui permet une régulation rapide, réversible et peu consommatrice d'énergie (Proud, 2000).

L'objet de ce travail de thèse a été l'étude du facteur d'élongation de la synthèse protéique eEF1B, des points de vue structural et fonctionnel. Les recherches ont été menées sur l'embryon précoce de l'oursin, modèle d'excellence

pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes aux niveaux traductionnels et post-traductionnels (Mathews *et al.*, 2000).

Nous allons introduire ce mémoire de thèse par une rapide description des différentes étapes et des facteurs impliqués dans la synthèse des protéines, puis nous présenterons un bilan approfondi des connaissances actuelles sur l'étape d'élongation et ceci en décrivant les facteurs impliqués, leurs structures, rôles et régulations au sein de la cellule. Nous aborderons ensuite le modèle expérimental, le développement précoce des embryons d'oursin. Dans une deuxième partie, nous exposerons nos résultats qui ont concerné la structure et la fonction du complexe eEF1B en relation avec le contrôle du cycle cellulaire. Nous terminerons par une conclusion sur ce travail de thèse et quelques perspectives.

Introduction

Chapitre I :

Le facteur eEF1B et la synthèse protéique

INTRODUCTION

I - Le facteur eEF1B et la synthèse protéique

A - Les trois étapes de la synthèse protéique

Les différentes étapes de la synthèse des protéines impliquent de nombreux acteurs moléculaires parmi lesquels sont recensés les ARN messagers (ARNm), les ribosomes, les ARN de transfert (ARNt), les synthétases et les facteurs de traduction [revue dans (Merrick et Hershey, 1996)]. Ces acteurs sont successivement sollicités au cours des trois phases majeures de la traduction (figure 2).

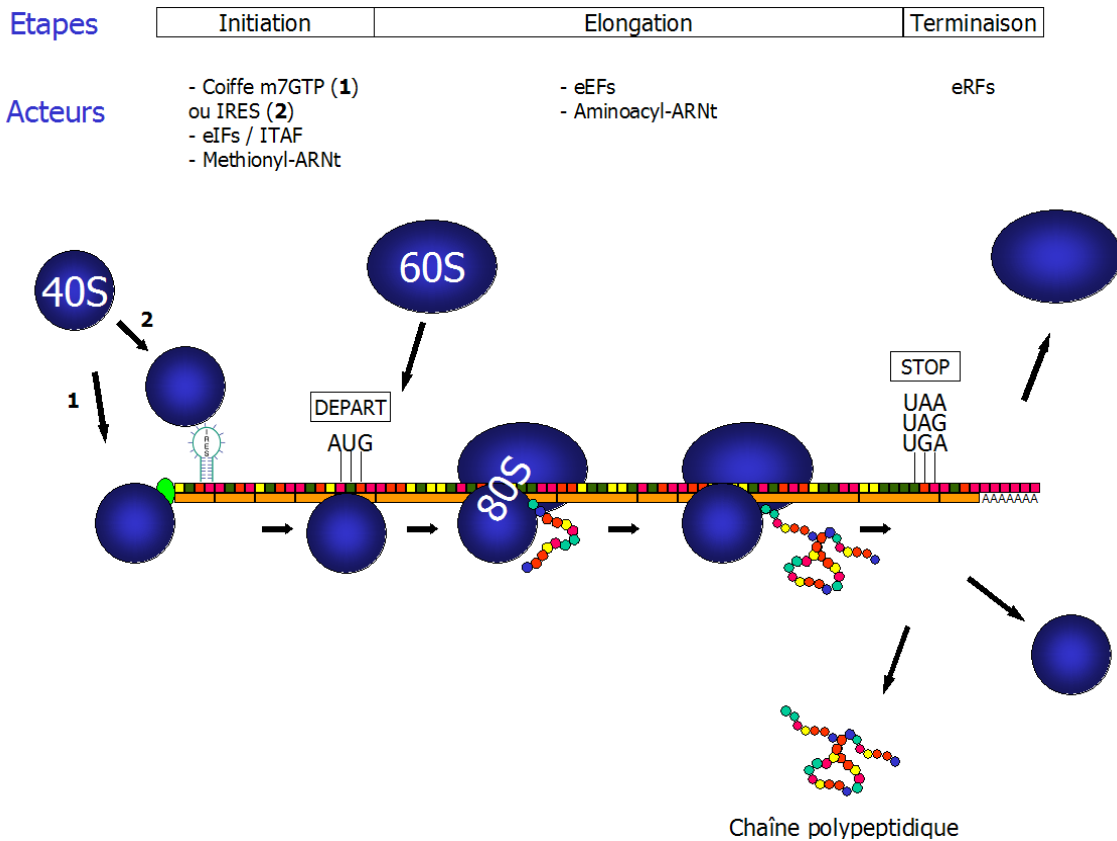


Figure 2 : Les trois phases de la synthèse des protéines : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chaque étape implique des acteurs spécifiques, notamment les facteurs d'initiation eIFs ("eukaryotic Initiation Factors"), les facteurs d'élongation eEFs ("eukaryotic Elongation factors") et les facteurs de terminaison eRFs ("eukaryotic releasing factors"). Voir le texte pour les détails.

L'initiation consiste au recrutement d'un ARNm au niveau du ribosome et à la reconnaissance du codon AUG d'initiation. La phase d'élongation consiste en l'ajout un à un des acides aminés à l'extrémité de la chaîne polypeptidique naissante et ceci en assurant une lecture fidèle de la séquence de l'ARNm scanné. Enfin, la terminaison a lieu lorsqu'un codon stop est atteint et conduit au relargage du polypeptide néosynthétisé.

1 - L'étape d'initiation de la synthèse protéique

L'initiation (figure 2) correspond au recrutement d'un ARNm et à sa préparation à la traduction et met en oeuvre les facteurs d'initiation (eIFs: "eukaryotic Initiation Factors"). Deux mécanismes d'initiation ont été principalement décrits :

- l'initiation dépendante de la coiffe (Richter et Sonenberg, 2005)
- l'initiation dépendante des IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Pelletier et Sonenberg, 1988)

L'initiation dépendante de la coiffe est un mécanisme plutôt général de traduction des protéines, alors que l'initiation dépendante des IRES est un mécanisme mis en oeuvre dans des situations physiologiques particulières (mitose, stress,...) (Holcik *et al.*, 2000; Le Breton *et al.*, 2005).

L'initiation coiffe dépendante met en jeu une structure particulière, appelée la coiffe m⁷GTP, que possède la plupart des ARNm. Un ARNm possédant cette coiffe pourra être recruté sur la petite sous-unité ribosomique (40S) grâce à l'interaction avec les facteurs de la famille eIF4 (Richter et Sonenberg, 2005). Parallèlement un aminoacyl-ARNt spécifique appelé méthionyl-ARNt initiateur forme un complexe ternaire avec le facteur d'initiation eIF2 et le GTP qui va se joindre à la sous-unité ribosomique 40S porteuse du messager, conduisant à la formation d'un complexe de pré-initiation 43S. Ce complexe va ensuite "scanner" l'ARNm dans le sens 5' → 3' jusqu'au codon initiateur (AUG). A ce stade l'anticodon du méthionyl-ARNt initiateur interagit avec le codon d'initiation.

Il existe un autre mécanisme permettant la reconnaissance du codon initiateur. Celui-ci passe par la reconnaissance d'une structure appelée IRES, en amont du codon initiateur. Ainsi, dans ce mécanisme, la reconnaissance de la coiffe n'est pas nécessaire et le complexe de pré-initiation se forme directement sur cette structure IRES. Cette structure a été initialement découverte chez les picornavirus (Pelletier et Sonenberg, 1988). Les virus à ARN ne possèdent en effet pas de coiffe m⁷GTP à l'extrémité 5' de leurs messagers. Ce mécanisme d'initiation n'est pas restreint aux picornavirus, et la liste des ARN messagers cellulaires pour lesquels il a été décrit est grandissante [revue dans (van der Velden et Thomas, 1999)]. Le mécanisme d'initiation dépendante des IRES nécessite la fixation de certains facteurs d'initiation et des protéines appelées ITAF ("IRES TransActivating Factor") dont la caractérisation est encore à l'étude [revues dans (Vagner *et al.*, 2001; Komar et Hatzoglou, 2005)].

Lors de ces deux mécanismes, initiation dépendante de la coiffe ou dépendante des IRES, lorsque que l'anticodon du méthionyl-ARNt initiateur interagit avec le codon d'initiation, les facteurs d'initiation se détachent de la petite sous-unité ribosomale 40S. La grande sous-unité ribosomale (60S) s'associe alors à la petite sous-unité, conduisant à la formation du complexe 80S [revue dans (Merrick et Hershey, 1996)]. C'est à partir de ce stade que la phase d'élongation de la traduction intervient.

2 - L'étape d'élongation de la synthèse protéique

L'élongation, (figure 3) consiste en l'ajout successif des acides aminés à l'extrémité C-terminale de la chaîne polypeptidique naissante et donc en son allongement. Cette phase importante de la synthèse des protéines sera détaillée dans le paragraphe B.

3 - L'étape de terminaison de la synthèse protéique

A la fin de l'élongation de la synthèse protéique, le ribosome arrive au niveau d'un codon de terminaison "stop" UAA, UAG ou UGA (figure 2). À ce stade, des facteurs de terminaison (eRFs : "eukaryotic releasing factors") interviennent en provoquant l'hydrolyse de la liaison ester entre le peptide et l'ARNt du dernier peptidyl-ARNt localisé dans le site P (site de liaison du peptidyl-ARNt). La libération du polypeptide néosynthétisé nécessite l'hydrolyse de GTP et deux facteurs : une protéine G eRF3 (Kisselev et Frolova, 1999) et eRF1 qui reconnaît quatre nucléotides adjacents, dont le codon stop au niveau du site A (site de liaison de aminoacyl-ARNt) du ribosome (Brown *et al.*, 1990). Les sous-unités ribosomiques sont ensuite dissociées de l'ARNm. Pour la plupart des messagers eucaryotes qui sont monocistroniques, la réinitiation après la terminaison n'a pas lieu [revue dans (Merrick et Hershey, 1996)].

B - L'élongation et ses acteurs protéiques

1 - Les phases de l'élongation

L'élongation correspond au recrutement des acides aminés et leur intégration au sein de la chaîne polypeptidique naissante par la formation d'une liaison peptidique. Elle se déroule en trois étapes (figure 3) faisant intervenir des facteurs d'élongation eEFs pour "eukaryotic elongation factors" [revue dans (Merrick et Nyborg, 2000)].

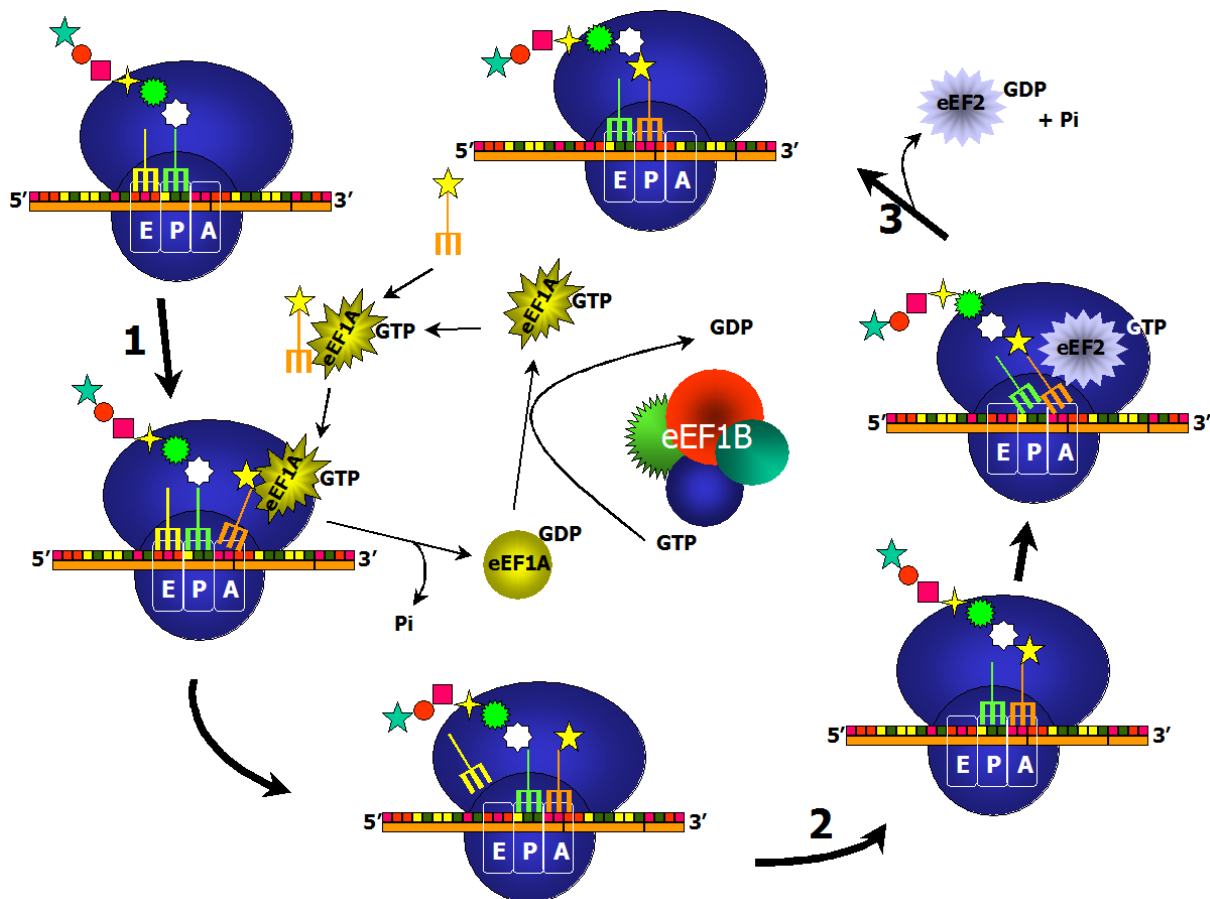


Figure 3 : Les étapes de la phase d'élongation de la synthèse protéique

Les chiffres de 1 à 3 indiquent la succession des étapes clés de l'élongation.

1) liaison de l'aminocyl-ARNt sur le site A du ribosome *via* eEF1A (après la formation d'un complexe ternaire : eEF1A/aminocyl-ARNt/GTP). Cette liaison nécessite l'hydrolyse du GTP lié à eEF1A. Le facteur eEF1B recharge eEF1A en GTP en déplaçant le GDP.

2) formation de la liaison peptidique

3) translocation du peptidyl-ARNt au site P du ribosome (intervention du facteur eEF2)

- Première étape : le positionnement de l'acide aminé sous forme d'aminocyl-ARNt dans le site A du ribosome (site de liaison de aminocyl-ARNt) : intervention de eEF1A et eEF1B (figure 3, étape 1). Le codon détermine l'anticodon qui va se fixer, et donc l'aminocyl-ARNt adéquat.

Cette étape débute par la formation d'un complexe ternaire entre l'aminocyl-ARNt, eEF1A et une molécule de GTP avant l'interaction avec le ribosome. Le rôle d'eEF1A est de fixer l'aminocyl-ARNt dans le site A du ribosome. Cette fixation nécessite l'hydrolyse du GTP, réaction catalysée par eEF1A après sa liaison au ribosome. Cette étape d'hydrolyse est fondamentale, car elle permet la fidélité de la traduction, c'est-à-dire l'incorporation de l'aminocyl-ARNt adéquat. En effet, si l'interaction codon-anticodon est imparfaite (pas de complémentarité codon-anticodon), il y a une dissociation de l'aminocyl-ARNt plus rapide que l'hydrolyse du GTP. Dans le cas contraire où il y a interaction stable (complémentarité codon-anticodon), le complexe ternaire eEF1A/GTP/aminocyl-ARNt se maintient au niveau du site A suffisamment longtemps pour permettre l'étape d'hydrolyse. Dans ces conditions, l'aminocyl-ARNt reste au niveau du site A du ribosome alors que eEF1A-GDP le quitte. Le facteur eEF1B a pour rôle de recharger eEF1A en GTP, lui permettant ainsi de réaliser un nouveau cycle d'élongation. La structure du facteur eEF1B sera largement détaillée dans le paragraphe 3 ci-après.

- Deuxième étape: formation d'une liaison peptidique (figure 3, étape 2).

Cette étape se caractérise par la formation d'une liaison peptidique entre le nouvel acide aminé porté par l'aminocyl-ARNt et l'extrémité C-terminale du

polypeptide en cours d'élongation. Elle est possible grâce au centre peptidyl-transférase de la sous-unité 60S, centre catalytique du ribosome. Les dernières études cristallographiques de la grande sous-unité du ribosome ont montré que la peptidyl-transférase est une enzyme ARN, encore appelée ribozyme. La liaison peptidique se fait par une attaque nucléophile du groupe amine NH_2 de l'aminocyl-ARNt sur le groupement carbonyle COO^- du peptidyl-ARNt. Ceci induit la formation d'un intermédiaire de réaction qui engendre la séparation entre l'extrémité carboxylée de la chaîne polypeptidique naissante et l'ARNt du site P et la liaison de la chaîne à l'aminocyl-ARNt situé au site A, ce qui laisse l'ARNt déacétylé libre au site P (site de liaison du peptidyl-ARNt) [revue dans (Polacek et Mankin, 2005)].

La formation de cette liaison peptidique ne demande pas d'énergie sous forme de GTP mais utilise celle résultant de l'hydrolyse de la liaison ester du peptidyl-ARNt.

Il est intéressant de noter que ce même centre peptidyl-transférase est mis à contribution dans l'étape de terminaison de la traduction. Dans ce cas le peptidyl-ARNt n'est pas transféré sur le nouvel aminocyl-ARNt mais sur une molécule d'eau. Ce changement dans le mode d'action de l'activité peptidyl-transférase est médiée par eRF1 [revue dans (Polacek et Mankin, 2005)].

- Troisième étape: la translocation (figure 3, étape 3).

Dans cette étape, le ribosome se déplace d'un cran sur l'ARNm dans la direction $5' \rightarrow 3'$. Ceci correspond à un déplacement de trois nucléotides (donc d'un codon). Ainsi le peptidyl-ARNt est déplacé du site A vers le site P. Un nouveau codon se trouve alors en face du site A. Cette translocation est catalysée par le facteur eEF2 et dépend de l'hydrolyse du GTP complexé à eEF2. L'avancée du ribosome sur

l'ARNm doit être unidirectionnelle, et ceci se fait grâce à la différence d'affinité entre les sites A, P et E (site de sortie, "exit") du ribosome et le messager (Proud, 1994). La translocation du peptidyl-ARNt au site P libère alors le site A qui peut accueillir un nouvel aminoacyl-ARNt. L'ARNt deacétylé restant est transféré au site E, puis est libéré (Nierhaus, 1984).

2 - Fidélité de la traduction, "recoding" et régulation de l'élongation

La fidélité de la traduction est essentielle pour la production de protéines pleine taille et fonctionnelles. Ainsi, la machinerie de traduction exerce des contrôles au niveau des différentes étapes de la synthèse des protéines pour maintenir cette fidélité de la traduction [revue dans (Valente et Kinzy, 2003)]. Au niveau de l'étape de l'élongation, de nombreux éléments sont susceptibles d'affecter la fidélité. Ainsi, après la sélection du codon initiateur AUG, la bonne phase de lecture doit être maintenue. Un décalage du cadre de lecture pourra en effet faire apparaître un codon stop "prématurément". De plus, il existe un contrôle au niveau du recrutement de chaque aminoacyl-ARNt au site A du ribosome pour que le bon acide aminé soit incorporé dans la chaîne polypeptidique naissante. L'incorporation d'un mauvais acide aminé peut avoir lieu lorsque le ribosome accepte une interaction codon-anticodon imparfaite ou encore lorsqu'un ARNt est aminoacylé avec le mauvais acide aminé. Dans les cas de mauvais appariement codon-anticodon, le maintien de la fidélité est assuré par la cinétique d'hydrolyse du GTP par eEF1A. En effet, un mauvais appariement entraînera l'éjection du nouvel aminoacyl-ARNt du ribosome avant même que l'hydrolyse du GTP n'ait lieu. Au contraire, lorsque l'appariement codon-anticodon est idéal, l'aminoacyl-ARNt reste en place suffisamment longtemps pour permettre l'hydrolyse du GTP et donc la poursuite de l'élongation.

Au niveau de la terminaison, des erreurs sont également possibles. Ce sont les cas où le codon stop est ignoré (translecture), résultant ainsi en l'extension de la chaîne polypeptidique.

Les facteurs d'élongation de la traduction exercent des rôles prépondérants dans la fidélité de traduction. Ils assurent la maintenance de la bonne phase de lecture, le placement correct des acides aminés et la bonne reconnaissance du codon stop. La levure s'est avérée être un excellent modèle pour étudier l'implication de ces facteurs sur la fidélité. Ainsi, des études chez la levure ont permis de démontrer que certaines mutations des facteurs eEF1A, eEF1B α ou encore eEF1B γ ou encore leurs niveaux d'expression ont un effet direct sur la fidélité de traduction [revue dans (Valente et Kinzy, 2003)].

Il est intéressant de noter que dans certains cas, les mécanismes cités ci-dessus à l'origine d'erreurs dans la traduction, sont utilisés de manière physiologique comme moyen de réguler la traduction au niveau de l'élongation. Ces mécanismes, baptisés "recoding" par Atkins et collaborateurs (Gesteland *et al.*, 1992) englobent les décalages du cadre de lecture, des translectures de codons stop ou encore des sauts du ribosome. Les cas de décalage du cadre de lecture ont été initialement décrits pour les virus. On peut citer l'exemple de l'expression différentielle des gènes gag et pol chez les rétrovirus. Les rétrovirus possèdent en effet un seul messageur pour l'expression des deux protéines gag et pol. L'expression différentielle se fait par un décalage d'une base dans le sens 5' [revue dans (Stahl et Rousset, 1999)]. Le mécanisme de décalage de phase a également été décrit pour la régulation de l'expression de certains gènes cellulaires. On peut citer comme exemple le cas du messageur codant pour l'ornithine décarboxylase et l'antizyme1. L'antizyme régule le taux d'expression de l'ornithine décarboxylase, enzyme responsable de la conversion de l'ornithine en putrescine lors de la synthèse des polyamines. La synthèse de

l'antizyme requiert un décalage de phase +1 lors du décodage du messenger qui code sinon pour l'ornithine décarboxylase. Ce décalage est stimulé par une forte concentration en polyamines issues de l'activité de l'ornithine décarboxylase. Réciproquement, lorsque l'activité de l'ornithine décarboxylase est faible, le décalage du cadre de lecture n'est plus activé, et donc l'expression de l'antizyme fait place à celle de l'ornithine décarboxylase [revue dans (Namy *et al.*, 2004)].

La translecture du codon stop permet d'ajouter une extension C-terminale à la protéine d'origine. Ce mécanisme a été décrit chez la drosophile chez laquelle il possède un rôle régulateur lors du développement [revue dans (Namy *et al.*, 2004)]. Il a été également découvert pour le messenger codant pour une phosphodiesterase capable de se lier et de dégrader l'AMP cyclique. L'extension C-terminale engendrée permet de cibler la protéine vers la voie de dégradation par le protéasome (Namy *et al.*, 2002).

Enfin, une autre possibilité de régulation de l'élongation existe par un mécanisme impliquant un "saut" du ribosome. Ce mécanisme a été montré pour l'expression du gène *60* du bactériophage T4. Dans ce cas, le ribosome ignore une partie de l'information génétique en effectuant un "saut" d'environ 50 nucléotides avant de se remettre à décoder le messenger. Ce "saut" permet d'éviter un codon stop. Ce mécanisme a également été étudié chez la bactérie, ce qui a d'ailleurs permis de montrer que pendant ce "saut", le ribosome ne se détache pas totalement du messenger, mais glisse le long de celui-ci jusqu'au site d'atterrissage. Cette acrobatie effectuée par le ribosome pour éviter un codon stop sur le messenger en cours de traduction est un mécanisme encore peu étudié à ce jour [revue dans (Namy *et al.*, 2004)].

3 - Structure du complexe eEF1B

Chez les eucaryotes, la première étape de l'élongation nécessite deux acteurs: la protéine eEF1A et le complexe eEF1B.

La protéine eEF1A catalyse le transfert de l'aminoacyl-ARNt sur le ribosome lors de la phase d'élongation de la synthèse protéique [revues dans (Nygard et Nilsson, 1990; Riis *et al.*, 1990; Merrick et Hershey, 1996)]. C'est une protéine G membre de la superfamille des GTPases. La protéine eEF1A lie le GTP et son hydrolyse fournit l'énergie nécessaire à l'élongation [revues dans (Bourne *et al.*, 1991; Sprinzl, 1994)]. La protéine eEF1A présente la même affinité pour le GTP et le GDP [revue dans (Negrutskii et El'skaya, 1998)] et donc sa réactivation est régulée par un facteur d'échange de GDP/GTP, le complexe eEF1B. Chez les procaryotes, les facteurs équivalents à eEF1A et eEF1B ont été décrits il y a déjà quarante ans (Lucas-Lenard et Lipmann, 1966), nommés respectivement EF-Tu (pour "elongation Factor Thermo-unstable") et EF-Ts (pour "Elongation Factor Thermostable"). La protéine eEF1A et son homologue EF-Tu ont été isolées et séquencées dans de nombreuses espèces. Ce sont des protéines ubiquitaires, très conservées, et fréquemment utilisées pour l'élaboration d'arbres phylogéniques [(Nordnes *et al.*, 1994) et revue dans (Ejiri, 2002)].

Le rôle universellement attribué au complexe eEF1B est de recharger eEF1A en GTP et ainsi de régénérer son activité [revue dans (Merrick et Nyborg, 2000)]. Il n'existe pas de liaison forte entre eEF1A et eEF1B mais seulement une interaction transitoire.

Chez les eucaryotes, eEF1B est un complexe dont la composition en sous-unités diffère en nature et en nombre selon les espèces (figure 4).

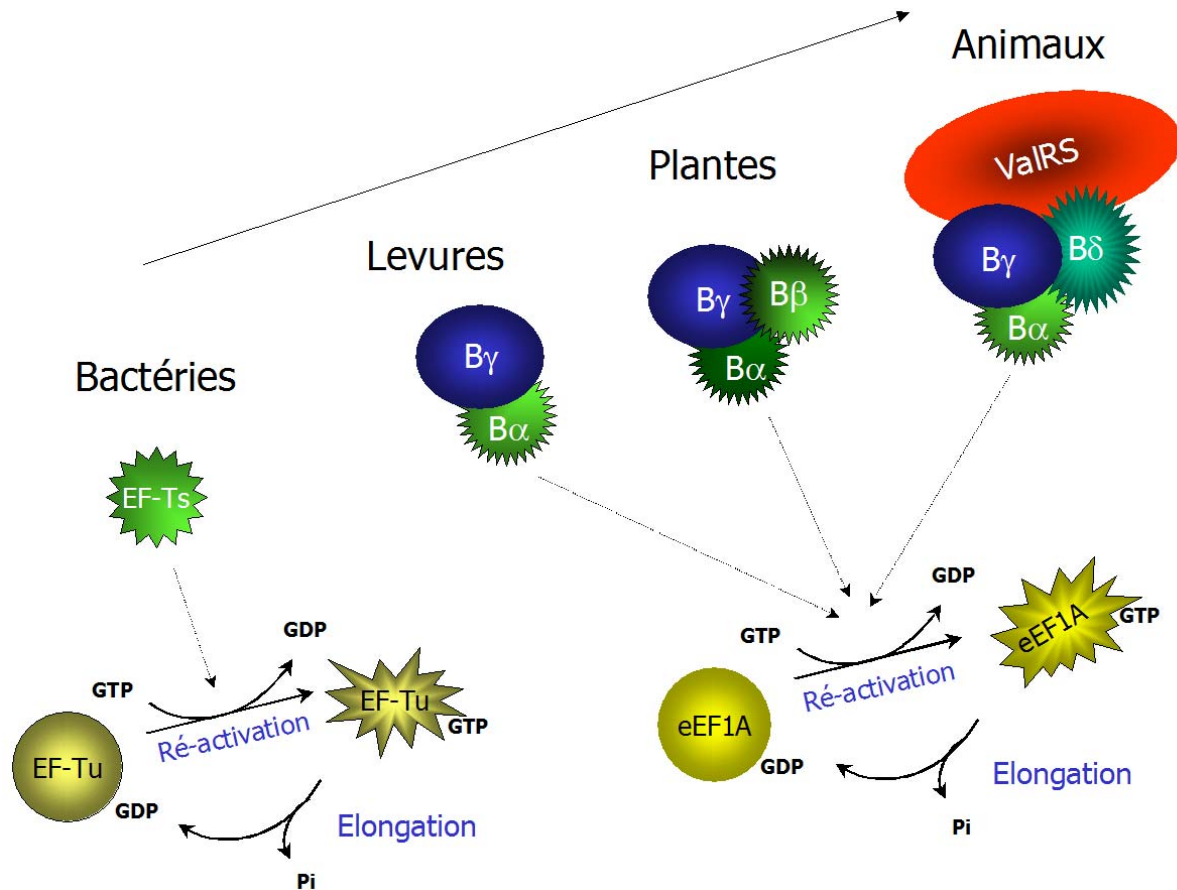


Figure 4 : Composition schématique des facteurs d'élongation selon les espèces

Les facteurs EF-Tu et eEF1A correspondent respectivement aux protéines G chez les procaryotes et chez les eucaryotes.

Le complexe d'échange de GDP/GTP est constitué du facteur EF-Ts chez les procaryotes et de divers autres facteurs eEF1B γ (B γ), eEF1B α (B α), eEF1B δ (B δ) et Valyl-ARNt synthétase (ValRS) chez les eucaryotes. Il réactive la protéine G en la rechargeant en GTP.

Le facteur eEF1B de levure est constitué de deux sous-unités, une protéine d'échange de GDP/GTP initialement nommée eEF1 β et une protéine de structure initialement nommée eEF1 γ (Miyazaki *et al.*, 1988). Chez les plantes, eEF1B est un trimère entre eEF1 γ et deux protéines d'échange de GDP/GTP, eEF1 β et la seconde initialement nommée eEF1 β' (Ejiri *et al.*, 1983). Enfin, chez les animaux, eEF1B est

constitué d'au moins quatre sous-unités : eEF1 γ , eEF1 β , une autre protéine d'échange de GDP/GTP initialement nommée eEF1 δ , associé à une seule ARNt synthétase, la valyl-ARNt synthétase (Minella *et al.*, 1998).

Dans la littérature, les nomenclatures respectives de ces différentes sous-unités selon les différents organismes étaient souvent confuses. C'est pourquoi Merrick et Nyborg ont proposé une nouvelle nomenclature en changeant eEF1 γ pour eEF1B γ , eEF1 β d'animal et de levure ainsi qu'eEF1 β ' de plante pour eEF1B α , et enfin eEF1 β de plante et eEF1 δ d'animal pour eEF1B β [table 1, revue dans (Merrick et Nyborg, 2000)]. Pourtant, la même terminologie, eEF1B β pour les protéines eEF1 β de plante et eEF1 δ d'animal, n'est pas appropriée car ces deux protéines présentent des caractéristiques structurales et phylogéniques bien distinctes comme décrit plus loin (*cf* page 36). Pour bien différencier les deux protéines, nous proposons d'utiliser une nomenclature différente, c'est à dire eEF1B β pour la protéine eEF1B β chez les plantes et eEF1B δ pour la protéine eEF1B β chez les animaux (tableau 1 et revue dans article 3).








	Fonction reconnue	Nomenclature initiale	Nomenclature de Merrick	Nomenclature proposée	Masse Moléculaire (kDa)	
	Protéine G	eEF1 α	eEF1A		50	
	Protéines d'échange de GTP/GDP	eEF1 β levure et animal	e E F 1 B	eEF1Bα		24-28
		eEF1 β' plante				28
		eEF1 β plante		eEF1B β	eEF1Bβ	30
		eEF1 δ animal			eEF1Bδ	32-36
	Protéine de structure	eEF1 γ	eEF1Bγ		47-52	
	Aminoacyl-ARNT synthétase	ValRS animal	-	ValRS	140	

Tableau 1 : Proposition d'une nomenclature clarifiée des composants d'eEF1B

La nomenclature en bleue est celle que nous proposons et qui sera retenue tout au long de ce manuscrit. Elle est essentiellement basée sur la nomenclature de Merrick et Nyborg [revue dans (Merrick et Nyborg, 2000)], mais apporte une précision en distinguant clairement le facteur d'échange spécifique des animaux eEF1B δ du deuxième facteur d'échange eEF1B β de plante. Voir le texte pour les explications.

a) La sous-unité eEF1B γ

La présence de la protéine eEF1B γ au sein du complexe d'échange de GDP/GTP est une spécificité des organismes eucaryotes (figure 4). La protéine a été clonée pour la première fois chez un invertébré, l'artémie (Maessen *et al.*, 1987). Elle a ensuite été caractérisée chez plusieurs espèces notamment le xénope (Cormier *et al.*, 1991) et l'humain (Kumabe *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992) puis chez tous les eucaryotes, des organismes unicellulaires aux animaux en passant par les levures et les végétaux.

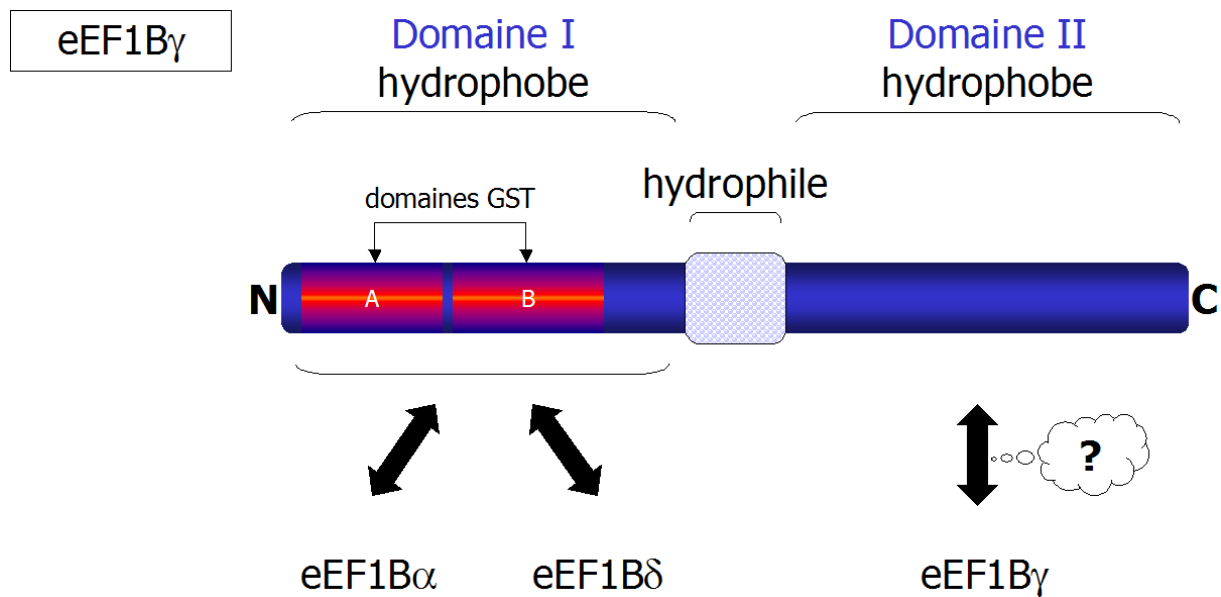


Figure 5 : La protéine eEF1B γ du complexe eEF1B. Elle se caractérise par deux domaines hydrophobes (en bleu, domaines I et II) séparés par une région centrale hydrophile (en pointillés bleu) riche en lysines. La région N-terminale de la protéine se caractérise en plus par un motif conservé de type GST (en rouge) se divisant en deux sous-domaines, GST N-terminal (A) et GST C-terminal (B). Les flèches représentent les interactions physiques d'eEF1B γ avec les autres partenaires du complexe eEF1B. La dimérisation d'eEF1B γ reste une supposition.

La protéine eEF1B γ (figure 5) présente un poids moléculaire compris entre 47 et 50 kDa selon les espèces, et se caractérise par deux domaines plutôt hydrophobes d'environ 200 acides aminés chacun (appelés domaines I et II) et séparés par une petite région très hydrophile d'environ 60 résidus et riche en lysines (Maessen *et al.*, 1987; Jeppesen *et al.*, 2003; Vanwetswinkel *et al.*, 2003).

Ses interactions avec les autres sous-unités du complexe eEF1 ont été étudiées par diverses méthodes, notamment par digestion tryptique limitée du complexe (Van Damme *et al.*, 1991; Janssen *et al.*, 1994), par étude des interactions entre les protéines recombinantes (Sheu et Traugh, 1997; Kamiie *et al.*, 2003) ou encore par la technique du double-hybride (Mansilla *et al.*, 2002). Ainsi, l'interaction d'eEF1B γ avec eEF1B α et eEF1B δ a été localisée au niveau de la partie N-terminale de la protéine (domaine I). Ces interactions semblent impliquer des sites spécifiques

pour l'accrochage de ces deux facteurs d'échange de GDP/GTP puisque la protéine eEF1B γ peut lier simultanément les deux mais pas deux facteurs identiques (Mansilla *et al.*, 2002). Concernant la protéine eEF1A et la ValRS, leur interaction directe avec eEF1B γ n'a pas été montrée.

La partie N-terminale d'eEF1B γ se caractérise par la présence d'un motif présentant une similitude avec la classe théta des glutathion S-transférases (GST) (Koonin *et al.*, 1994). Si certaines équipes ont montré que eEF1B γ pouvait effectivement se lier à des résines de glutathion sépharose (Billaut-Mulot *et al.*, 1994; Kamiie *et al.*, 2002), nous n'avons pas pu l'observer dans nos expériences (article 2). La structure cristalline de la région N-terminale d'eEF1B γ de levure a confirmé une forte homologie de structure du domaine I avec les protéines GST de la classe théta (Jeppesen *et al.*, 2003). Cette signature est connue pour exercer un rôle régulateur dans les assemblages de complexes multimériques (Koonin *et al.*, 1994) et suggère également une autre fonction cellulaire de détoxification qui sera discutée plus loin (*cf* paragraphe I-D-2, page 70).

La partie C-terminale d'eEF1B γ (domaine II) est une séquence très conservée parmi les espèces avec une forte proportion de résidus aromatiques. Ceci suggère une fonction conservée. Cependant, à ce jour, aucune homologie de séquence ou de structure avec un domaine fonctionnel avéré n'a été mise en évidence. L'hypothèse majeure est que ce domaine est une interface de dimérisation entre deux molécules d'eEF1B γ et donc aurait un rôle dans l'arrangement global du complexe eEF1B. Cette hypothèse est suggérée par la résolution tridimensionnelle en résonance magnétique nucléaire (RMN) du domaine II d'eEF1B γ recombinant d'humain montrant un repliement concave de ce domaine (Vanwetswinkel *et al.*, 2003). Par ailleurs, une

interaction entre les molécules d'eEF1B γ avait déjà été proposée par Bellé et collaborateurs ainsi que par Traugh et collaborateurs pour expliquer les modèles structuraux décrits pour le complexe eEF1B (Minella *et al.*, 1998; Sheu et Traugh, 1999) (figure 10, page 41). Ces derniers ont d'ailleurs parlé d'un rôle de "ciment" pour eEF1B γ au sein du complexe, en maintenant eEF1B α et eEF1B δ , et donc le complexe entier dans une position stable (Sheu et Traugh, 1999).

L'implication de la protéine eEF1B γ sur l'activité proprement dite d'échange de GDP/GTP du complexe eEF1B reste obscure. Des expériences ont montré qu'elle ne possède pas à elle seule d'activité d'échange (Bec *et al.*, 1994) mais qu'elle stimulerait celle d'eEF1B α en y étant associée (Motoyoshi et Iwawaki, 1977; Janssen et Moller, 1988a). Étant donné que les deux protéines sont difficilement dissociables sinon en utilisant des conditions de dénaturation drastiques (Motoyoshi et Iwawaki, 1977; Janssen et Moller, 1988a; Bec *et al.*, 1994), elles sont vraisemblablement toujours associées dans la cellule. Il est par conséquent peu probable qu'eEF1B γ exerce un rôle régulateur de l'activité d'eEF1B α par le biais d'une interaction réversible, mais plutôt en aidant au repliement correct de cette dernière et plus généralement en stabilisant le complexe eEF1B.

Il a été proposé que la fonction d'eEF1B γ soit d'ancrer le complexe eEF1B aux membranes et squelette cellulaires. Ainsi, la copurification d'eEF1B γ avec la tubuline a souvent été rapportée (Janssen et Moller, 1988b). La protéine eEF1B γ de levure a été identifiée lors d'un criblage de protéines liées à la membrane de manière dépendante du calcium (Kambouris *et al.*, 1993). Des études d'immunofluorescence ont permis de montrer la localisation du complexe eEF1B au niveau du réticulum endoplasmique (Minella *et al.*, 1996a; Sanders *et al.*, 1996), ce qui concorde avec

son implication dans la synthèse protéique. De plus, le complexe eEF1B, notamment eEF1B γ , ont été localisés au niveau des pôles du fuseau microtubulaire lors de la mitose [(Boulben *et al.*, 2003) et article 1].

En conclusion, de par ses propriétés structurales, il est fort probable que le rôle majeur de la protéine eEF1B γ est d'assurer une bonne conformation du complexe eEF1B. Sa fonction d'ancrage semble par ailleurs être déterminante pour la localisation cellulaire du complexe eEF1B. Enfin, des éléments suggèrent l'implication de la protéine eEF1B γ dans des mécanismes de détoxification cellulaire grâce à son domaine GST (*cf* paragraphe I-D-2, page 70).

b) Les sous-unités d'échange de GDP/GTP : eEF1B α , eEF1B β et eEF1B δ

i) eEF1B α

La sous-unité eEF1B α (figure 6) est la plus petite du complexe eEF1B avec des tailles allant de 24 à 28 kDa selon les espèces.

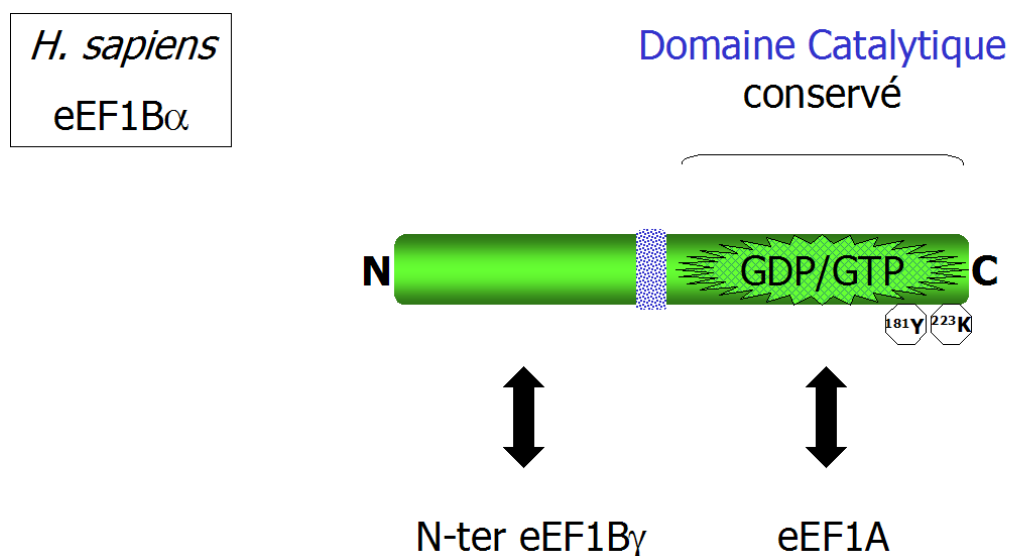


Figure 6 : La protéine eEF1B α du complexe eEF1B

Cette protéine se caractérise par deux régions N et C-terminales (en vert) séparées par une région centrale (pointillés bleus) riche en résidus acides (D et E) et basiques (K). La région C-terminale est très conservée parmi les espèces et est le siège de l'activité catalytique d'échange de GDP/GTP sur eEF1A. Les résidus indiqués ¹⁸¹Y et ²²³K sont numérotés selon la séquence humaine. Les flèches représentent les interactions physiques d'eEF1B α avec les autres partenaires du complexe eEF1B. Voir le texte pour les détails.

Elle a été d'abord appelée eEF1 β chez les métazoaires et chez les levures et eEF1 β' chez les plantes. C'est elle qui possède l'activité fondamentale d'échange de GDP/GTP sur eEF1A (Murakami *et al.*, 1978; Slobin et Moller, 1978; Ejiri *et al.*, 1983; Carvalho *et al.*, 1984a; Carvalho *et al.*, 1984b). Elle a été clonée pour la première fois chez l'artémie (Maessen *et al.*, 1986). Elle ne possède pas de similitude au niveau de sa séquence primaire avec son homologue fonctionnel procaryotique EF-Ts

(Maessen *et al.*, 1986; Janssen et Moller, 1988a; Matsumoto *et al.*, 1994). En revanche, l'analyse par RMN révèle une ressemblance de structure tridimensionnelle entre ces deux facteurs (Perez *et al.*, 1999). Cette protéine est hautement conservée chez les eucaryotes. En effet, une comparaison de la séquence humaine sur toute sa longueur avec les séquences accessibles dans les banques de données montre des identités allant d'environ 40% avec les plantes jusque plus de 90% avec les autres vertébrés. Des délétions fonctionnelles de eEF1B α chez la levure ont montré que cette protéine est essentielle pour la croissance cellulaire (Hiraga *et al.*, 1993; Carr-Schmid *et al.*, 1999). De plus, les expériences de mutation montrent qu'eEF1B α régule non seulement l'activité d'eEF1A au cours de l'élongation, mais assure également la fidélité de la traduction (Kinzy et Woolford Jr, 1995; Carr-Schmid *et al.*, 1999).

La plus forte similitude existant entre les protéines eEF1B α se situe dans sa partie C-terminale, ce qui coïncide avec l'activité catalytique d'échange de GDP/GTP qui réside dans ce domaine (Van Damme *et al.*, 1990; Van Damme *et al.*, 1991; Carr-Schmid *et al.*, 1999). La région hydrophile en position centrale de la protéine semble exercer un rôle régulateur car son absence entraîne une diminution de l'activité d'échange (Van Damme *et al.*, 1990). Par ailleurs, c'est la région C-terminale qui interagit avec eEF1A (Van Damme *et al.*, 1991; Carr-Schmid *et al.*, 1999; Kamiie *et al.*, 1999; Mansilla *et al.*, 2002). La structure cristalline du complexe entre eEF1A et la partie C-terminale d'eEF1B α (les deux de levure) a été obtenue [revue dans (Andersen *et al.*, 2003)]. La structure tridimensionnelle obtenue chez la levure a permis d'identifier le rôle et la localisation de deux résidus dans le facteur eEF1B α , essentiels pour l'interaction de ce dernier avec eEF1A ainsi que pour l'activité

d'échange. Ce sont une phenylalanine en position 163 ainsi qu'une lysine en position 205 [revue dans (Andersen *et al.*, 2003)], les deux résidus étant très conservés chez tous les eucaryotes [(Perez *et al.*, 1999) ; figure 6].

La structure de la région N-terminale d'eEF1B α est moins bien documentée. Contrairement à la région C-terminale, la séquence est moins conservée parmi les différentes espèces. En effet, alors que l'alignement de la région C-terminale de la protéine eEF1B α d'humain montre des identités allant d'environ 60% avec les plantes jusque près de 100% avec les autres vertébrés, l'alignement de la région N-terminale de la même protéine montre de 30% à 90% d'identités pour la même échelle d'espèces. La région N-terminale est le siège d'une interaction forte avec eEF1B γ (Van Damme *et al.*, 1990; Van Damme *et al.*, 1991; Mansilla *et al.*, 2002; Kamiie *et al.*, 2003). Cette fonction d'accrochage d'eEF1B γ suppose une conservation de la structure au niveau tertiaire, il serait donc intéressant d'en étudier la structure tridimensionnelle.

Enfin, comme mentionné plus haut, les parties N et C-terminales d'eEF1B α sont séparées par une région caractérisée par des répétitions d'acide aspartique et d'acide glutamique entourées par de nombreuses lysines. Nous verrons plus loin que cette charnière semble être une région stratégique pour la régulation de l'activité d'eEF1B α notamment par la présence de sites de phosphorylation conservés (*cf* paragraphe I-C-2, page 53).

ii) eEF1B β , le deuxième facteur d'échange spécifique des plantes

L'existence d'un autre facteur d'échange de GDP/GTP a initialement été mis en évidence en étudiant le complexe eEF1B chez les plantes. En effet, chez le blé, deux protéines présentant une activité d'échange de nucléotides ont été co-purifiées avec eEF1B γ (Ejiri *et al.*, 1983). Ces deux protéines initialement appelées eEF1 β' et eEF1 β correspondent respectivement à eEF1B α et eEF1B β . Plus tard ces protéines ont été également clonées chez le riz (Matsumoto *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1994) de plus qu'une troisième protéine homologue appelée eEF1 β 2 (Terui *et al.*, 1998). Cette dernière résulte certainement de la polypléidie de cette espèce.

Les deux familles de protéines nommées eEF1B α et eEF1B β ont des similarités au sein de la même espèce de l'ordre de 60% avec une plus grande conservation dans le domaine C-terminal, domaine portant l'activité d'échange de nucléotide et le site d'interaction avec eEF1A. Un alignement de toutes les séquences connues de ces protéines chez les plantes et l'établissement d'un arbre phylogénique d'après les pourcentages d'identité montrent que ces protéines sont séparées suivant deux groupes distincts, l'un du type β et l'autre du type α (revue dans article 3). De plus, l'existence pour chaque espèce d'une protéine appartenant au groupe β et une protéine appartenant au groupe α semble indiquer que ces deux types de protéine proviennent d'une duplication de gène apparue avant la spéciation des plantes [(Guerrucci *et al.*, 1999) et (revue dans article 3)]. En conclusion, les complexes eEF1B de plantes contiennent les deux types de protéines eEF1B α et eEF1B β dont les fonctions respectives restent à élucider. Il est d'ailleurs intéressant de signaler qu'elles pourraient être différenciellement régulées par phosphorylation (*cf* paragraphe I-C-3, page 55).

iii) eEF1B δ , le deuxième facteur d'échange spécifique des animaux

Cette protéine a initialement été considérée comme étant un contaminant des purifications du complexe eEF1B (Janssen et Moller, 1988a) ou encore un produit de dégradation (Carvalho *et al.*, 1984a; Carvalho *et al.*, 1984b). Son appartenance au complexe eEF1B a ensuite été démontrée lors de la recherche des cibles du MPF dans des ovocytes d'amphibiens en maturation, où elle co-purifiait systématiquement avec eEF1B γ et eEF1B α (Belle *et al.*, 1989; Mulner-Lorillon *et al.*, 1989; Janssen *et al.*, 1991). Sa séquence complète a été publiée chez le xénope (Morales *et al.*, 1992). Elle a été identifiée chez l'homme (Sanders *et al.*, 1993), l'artémie (Van Damme *et al.*, 1990; Amons *et al.*, 1994), le lapin (Sheu et Traugh, 1997) et l'oursin (Delalande *et al.*, 1998).

La protéine eEF1B δ , de poids moléculaire compris entre 28 et 36 kDa, est constituée de deux domaines (figure 7).

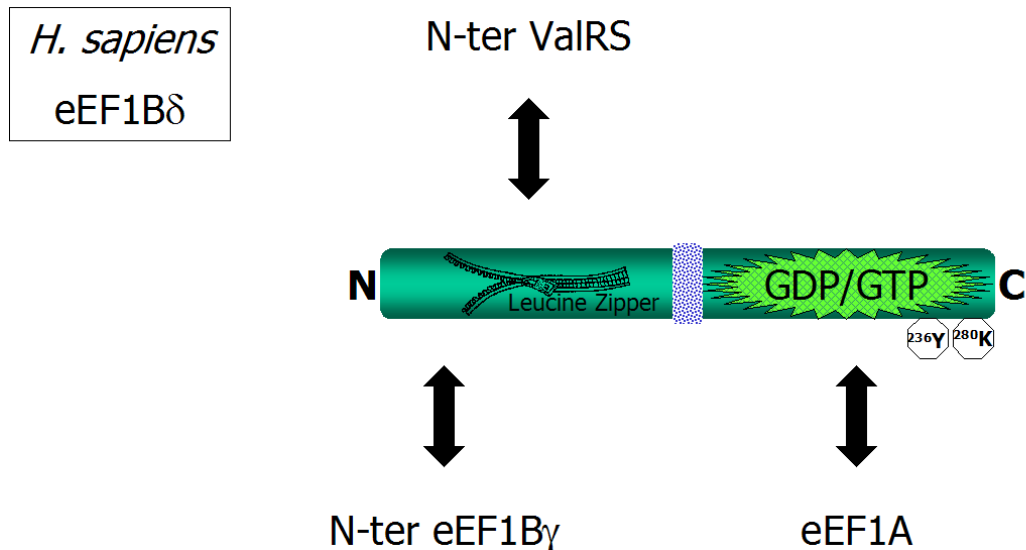


Figure 7 : La protéine eEF1B δ du complexe eEF1B chez les animaux

Cette protéine se caractérise par deux régions N et C-terminales (en vert marin) séparées par une région centrale (pointillés bleus) riche en résidus acides (D et E) et basiques (K). La région C-terminale est très conservée avec celle d'eEF1B α et possède également le domaine d'échange de GDP/GTP. La région N-terminale se caractérise par la présence d'un motif "leucine zipper" (fermeture éclair). Les résidus indiqués ²³⁶Y et ²⁸⁰K sont numérotés selon la séquence humaine. Ils sont très conservés au travers le règne eucaryote et correspondent au résidu ¹⁸¹Y et ²²³K conservés dans la séquence d'eEF1B α . Les flèches représentent les interactions physiques d'eEF1B δ avec les autres partenaires du complexe eEF1B. Voir le texte pour les détails.

Son domaine C-terminal présente une forte similitude avec le domaine d'échange de GDP/GTP des protéines de type eEF1B α . D'ailleurs une activité d'échange de nucléotide sur eEF1A a été montrée pour eEF1B δ (Van Damme *et al.*, 1990; Bec *et al.*, 1994; Sheu et Traugh, 1997; Kamiie *et al.*, 2003). Pourtant, la protéine eEF1B δ d'humain (entier ou sa partie C-terminale) ne peut pas compléter une souche de levure déficiente en eEF1B α , alors que le domaine C-terminal d'eEF1B α d'humain peut le faire (Carr-Schmid *et al.*, 1999). Cette observation suggère donc des fonctions spécifiques pour eEF1B δ et eEF1B α .

La différence majeure existant entre les deux facteurs eEF1B α et eEF1B δ réside dans leurs régions N-terminales. Cette région dans eEF1B δ ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines (Amons *et al.*, 1994; Guerrucci *et al.*, 1999). Elle se caractérise par la présence d'un motif "leucine zipper" (Morales *et al.*, 1992;

Sanders *et al.*, 1993; Amons *et al.*, 1994), motif consistant en une répétition périodique de résidus leucine (ou autre résidu hydrophobe) tous les 7 acides aminés, ceci dans une conformation en hélice amphipathique de type "coiled-coil" avec les résidus leucine repartis sur un côté. Un tel motif est connu pour être une interface d'interaction protéine-protéine (Alber, 1992). Il est intéressant de noter que le motif "leucine zipper" de la protéine eEF1B δ est particulièrement long (5-6 résidus), ce qui pourrait permettre sa multimérisation (Minella *et al.*, 1998), en relation avec sa propriété de s'agréger *in vitro* (Bec *et al.*, 1994; Sheu et Traugh, 1997). Une recherche dans les bases de données a montré qu'eEF1B δ est présente chez tous les métazoaires alors que cette protéine n'a pas pu être identifiée parmi les séquences disponibles pour les champignons et les plantes (revue dans article 3). Contrairement à ce qui a été proposé (Ejiri, 2002), il est important de clairement distinguer les protéines eEF1B δ des métazoaires et les protéines eEF1B β de plantes. En effet, les protéines eEF1B β ne présentent pas de motif "leucine zipper" dans leur région N-terminale. De plus, ces deux familles de protéines sont séparées en deux groupes distincts lors de l'analyse phylogénique (revue dans article 3). Il découle par ailleurs de cette analyse que eEF1B δ est apparue en même temps que l'émergence des métazoaires. Une étude propose qu'eEF1B δ proviendrait d'un gène ancestral de type eEF1B α fusionné avec un motif "leucine zipper" (Guerrucci *et al.*, 1999).

La protéine eEF1B δ interagit avec eEF1B γ mais pas avec eEF1B α (Sheu et Traugh, 1997). L'interaction avec eEF1B γ se fait *via* les domaines N-terminaux des deux protéines (Sheu et Traugh, 1997; Mansilla *et al.*, 2002). De plus, les acides aminés 1 à 45 d'eEF1B δ sont suffisants pour permettre l'interaction avec eEF1B γ (article 2). Cette interaction ne nécessite donc pas le motif "leucine zipper", ce qui

concorde avec l'absence d'un tel motif sur eEF1B γ . De plus, les protéines eEF1B δ et eEF1B α ne semblent pas partager le(s) même(s) site(s) d'interaction avec eEF1B γ . En effet, les régions N-terminales respectives d'eEF1B δ et eEF1B α ne présentent pas d'homologies d'une part, et d'autre part, eEF1B γ peut fixer simultanément eEF1B α et eEF1B δ , mais pas deux protéines eEF1B α ni deux protéines eEF1B δ comme rapporté ci-dessus.

L'analyse de la protéine eEF1B δ chez diverses espèces a montré que cette protéine est exprimée sous différentes isoformes dans une même espèce. Les ovocytes de xénope expriment deux protéines eEF1B δ codées à partir de deux messages différents. Un des deux messages contient un codon d'initiation interne, permettant ainsi l'expression d'une protéine plus petite (34 kDa contre 36 kDa) (Minella *et al.*, 1996b). L'analyse des séquences chez l'humain montre qu'au moins deux messages codant pour la protéine eEF1B δ sont exprimés (revue dans article 3). Ils résultent d'un épissage alternatif d'un pré-messager unique et codent pour des protéines de poids moléculaires de 30 kDa et 66 kDa. L'isoforme la plus longue consiste en une extension N-terminale en amont d'une région C-terminale présentant 100% d'identité avec les 275 acides aminés de l'isoforme courte (revue dans article 3).

Par ailleurs, des études récentes menées sur le complexe eEF1B d'oursin ont démontré l'existence d'un autre épissage alternatif induisant l'expression d'une nouvelle isoforme de la protéine eEF1B δ . Les deux isoformes nommées eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 sont retrouvées dans la même fraction purifiée du complexe (article 1). Les séquences primaires des deux protéines eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 (respectivement, n°

accession emb Y14235 et emb AJ973181) sont 100% identiques exception faite d'une insertion de 26 acides aminés pour eEF1B δ 2 dans la région N-terminale en amont du motif "leucine zipper" (figure 8).

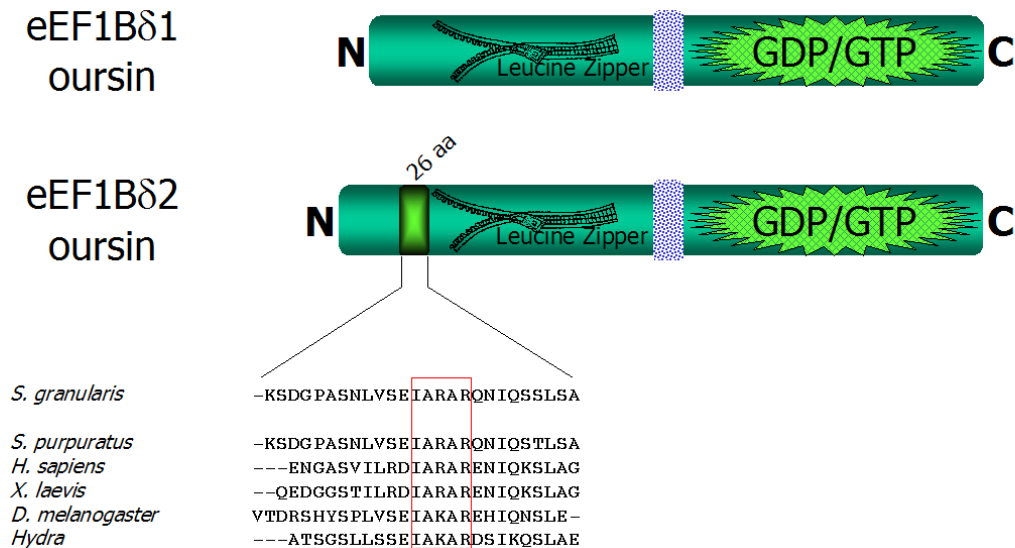


Figure 8 : Les deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 du complexe eEF1B chez l'oursin. Ces deux protéines sont strictement identiques (*cf* annotation sur la figure 6) exception faite d'une insertion de 26 acides aminés en amont du motif "leucine zipper" pour l'isoforme eEF1B δ 2. La partie basse de la figure indique un alignement CLUSTAL X des séquences de cette insertion entre diverses espèces. Les résidus hautement conservés sont encadrés en rouge.

Une analyse *in silico* du génome complet d'oursin récemment obtenu (Morales *et al.*, 2006; Weinstock *et al.*, 2006) a montré l'existence d'un gène unique codant pour eEF1B δ et contenant un exon de 78 pb codant pour l'insert présent dans eEF1B δ 2. L'existence dans la banque d'oursin de deux EST correspondant à deux messagers codant pour les deux isoformes d'eEF1B δ semble indiquer que ces deux messagers et donc les protéines eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 proviennent de l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager unique (article 1). Une analyse des banques de séquences exprimées (banque EST) a montré que cette caractéristique est conservée chez de nombreux métazoaires qui expriment les deux formes de messagers et

potentiellement ainsi les deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2, cette dernière présentant un insert de séquence et de taille hautement conservées et à la même position dans la protéine (figure 8). Ainsi, l'humain pourrait exprimer quatre isoformes pour eEF1B δ , une isoforme longue (66 kDa) et une isoforme courte (30 kDa), chacune avec ou sans insert.

En conclusion, l'expression de ces deux isoformes d'eEF1B δ , l'une avec, et l'autre sans, le motif d'insertion, est une caractéristique universelle chez les métazoaires. Le rôle de cette insertion n'est pas élucidé. Elle n'est en tout cas pas indispensable pour l'interaction entre eEF1B δ et eEF1B γ puisque eEF1B δ 1 est capable d'interagir directement avec eEF1B γ (article 2).

Il a également été montré que la sous-unité eEF1B δ chez les vertébrés était responsable de l'accrochage de la ValRS sur le complexe eEF1B (Bec *et al.*, 1994; Sang Lee *et al.*, 2002). Ceci est à corrélérer avec l'absence de cette enzyme dans les complexes des espèces n'ayant pas non plus de protéine eEF1B δ . Cette interaction n'implique pas de motif "leucine zipper", motif également absent de la ValRS. En revanche, elle implique sans doute un motif analogue à celui qui est présent dans la protéine eEF1B γ et qui est utilisé pour son interaction avec eEF1B δ . En effet, il a été montré chez l'humain une forte homologie de séquence entre le domaine N-terminal de la protéine eEF1B γ et le domaine N-terminal de la ValRS (Hsieh et Campbell, 1991).

c) La Valyl-ARNt Synthétase

La Valyl-ARNt Synthétase (figure 9) est la seule de cette famille de protéines à être associée au complexe eEF1B chez le xénope (Belle *et al.*, 1995), les cellules de mammifères (Bec *et al.*, 1989; Motorin *et al.*, 1991) et chez l'artémie (Brandsma *et al.*, 1995). La ValRS s'associe au complexe eEF1B *via* son interaction avec la sous-unité eEF1B δ (Bec *et al.*, 1994). Ainsi, en accord avec l'absence de la protéine eEF1B δ dans ces organismes, la ValRS n'a jamais été retrouvée dans les complexes eEF1B de plantes ni de levures (Minella *et al.*, 1998).

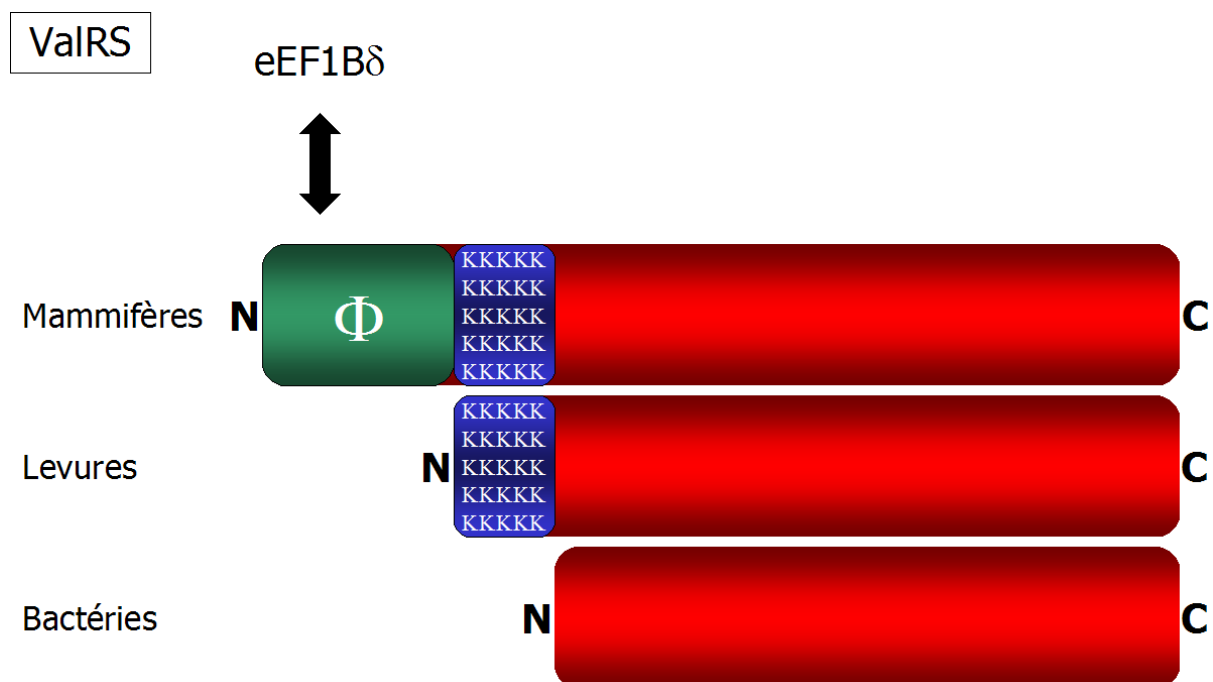


Figure 9 : Evolution de la Valyl-ARNt synthétase au cours de l'évolution

La région indiquée en bleu indique une extension riche en lysines (K) apparue chez les levures. La région verte correspond à une extension hydrophobe (Φ) supplémentaire acquise chez les mammifères. Cette extension est nécessaire à l'intégration de la ValRS dans le complexe eEF1B *via* son interaction avec eEF1B δ [flèche, (Bec *et al.*, 1994)].

Une comparaison entre les séquences des ValRS de bactérie, de levure et de mammifère a été faite (Bec et Waller, 1989). Cette étude montre que la ValRS de levure se différencie de la ValRS de bactérie par la présence d'une extension N-terminale riche en lysines d'environ 100 acides aminés. Cette extension polycationique est conservée dans la séquence de la ValRS des mammifères et cette dernière possède en plus une région hydrophobe d'environ 200 acides aminés en amont de la région riche en lysines (Bec *et al.*, 1994). L'extension hydrophobe spécifique de la ValRS des mammifères présente une homologie structurale avec la partie N-terminale de la protéine eEF1B γ d'artémie ou d'humain (Hsieh et Campbell, 1991; Bec *et al.*, 1994). Il a été démontré que cette extension est nécessaire à l'intégration de la ValRS au sein du complexe eEF1B *via* son interaction avec la protéine eEF1B δ (Bec *et al.*, 1994).

Chez les mammifères et chez le xénope, toute l'activité de l'enzyme est retrouvée dans le complexe eEF1B (Motorin *et al.*, 1988; Bec et Waller, 1989; Minella *et al.*, 1998) alors que chez l'artémie il existerait également une forme de l'enzyme non associée (Brandsma *et al.*, 1995). Réciproquement, chez le lapin (Bec *et al.*, 1989) ou le xénope (Minella *et al.*, 1998), une fraction du complexe eEF1B est dépourvue de la ValRS et de eEF1B δ . Les complexes eEF1B associés à la ValRS doivent être minoritaires par rapport aux complexes dépourvus de la ValRS puisque la concentration cellulaire de la ValRS est bien inférieure à celle des protéines eEF1B γ et eEF1B α (Bec *et al.*, 1989). La présence de la ValRS dans une population du complexe eEF1B permettrait une régulation puissante de l'élongation par le contrôle de la disponibilité d'une enzyme indispensable.

Une observation intéressante a été faite chez l'oursin. Son génome complet contient deux gènes codant pour deux protéines proches (47% d'identité) et présentant 48% et 59% d'identité avec la ValRS2 humaine. Cependant, l'extension hydrophobe, domaine potentiel d'association avec eEF1B δ , n'a été retrouvée dans aucune de ces deux séquences, ni même dans l'assemblage complet du génome d'oursin (Morales *et al.*, 2006; Weinstock *et al.*, 2006). Même si l'absence d'homologie au niveau des séquences primaires n'exclue pas des structures similaires dans l'espace, ceci pourrait suggérer que l'oursin se positionne comme un "intermédiaire" dans l'évolution en exprimant déjà la sous-unité eEF1B δ au sein du complexe eEF1B mais pas encore son interaction avec la ValRS. Cette particularité de l'oursin pourrait être utilisée pour étudier la fonction spécifique de la protéine eEF1B δ et de la présence de la ValRS au sein du complexe eEF1B.

d) Structure quaternaire du complexe eEF1B

Le complexe eEF1B a été purifié dans divers organismes et par diverses méthodes (Minella *et al.*, 1998). De plus comme nous l'avons vu ci-dessus (figure 4), ce complexe présente des structures différentes selon les espèces. Chez les vertébrés, il est constitué de quatre sous-unités : eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ et la ValRS. À ce jour, différents modèles ont été proposés pour sa structure quaternaire (Bec *et al.*, 1994; Janssen *et al.*, 1994; Minella *et al.*, 1998; Sheu et Traugh, 1999; Mansilla *et al.*, 2002) (figure 10). Ce travail de thèse a permis d'apporter des précisions sur la structure du complexe eEF1B grâce à la mise en évidence chez l'oursin des deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2. Nous proposons l'existence de deux

populations du complexe eEF1B, distinctes par leurs compositions en sous-unités eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 (article 1, figure 10). Certains des modèles proposés impliquent la protéine G eEF1A. D'autres comme celui que nous proposons ou celui de Minella et collaborateurs ne le font pas. En effet, il faut rappeler que l'interaction entre le complexe eEF1B et la protéine eEF1A est moins forte que les interactions des différentes sous-unités du complexe eEF1B entre elles (*cf* introduction). Ces différents modèles ont été obtenus par diverses méthodes expérimentales. Certains résultent de reconstitutions *in vitro* à partir des protéines purifiées (Bec *et al.*, 1994; Janssen *et al.*, 1994), ou des sous-unités recombinantes (Sheu et Traugh, 1999). Un autre modèle a été obtenu par cartographie des interactions en double-hybride des sous-unités recombinantes exprimées chez la levure (Mansilla *et al.*, 2002). Le modèle de Minella (Minella *et al.*, 1998) et le notre repose sur la purification des complexes existants *in vivo*, plus spécifiquement par co-précipitation avec la sous-unité eEF1B δ (article 1), permettant de leur attribuer une réalité physiologique.

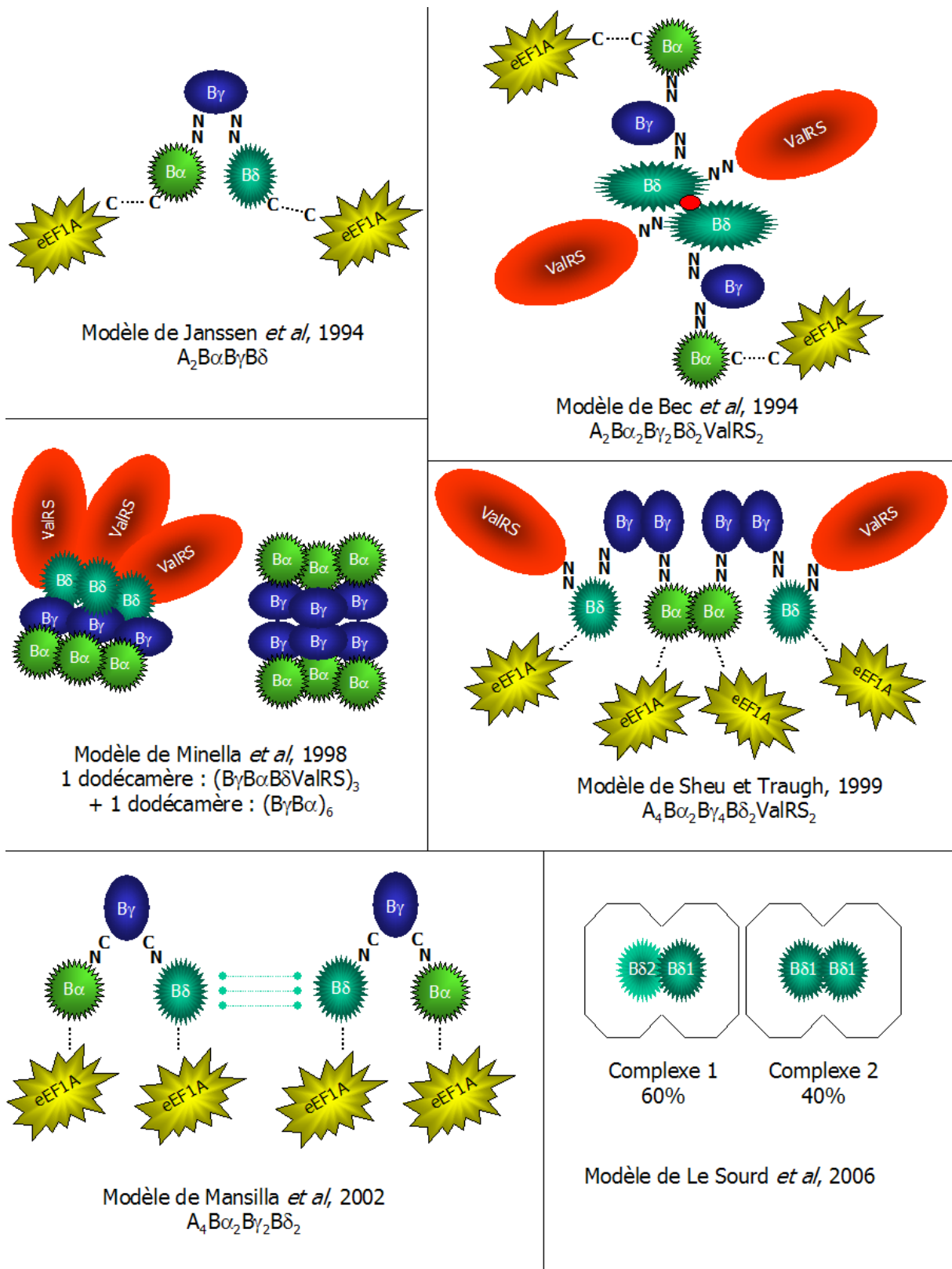


Figure 10 : Les différents modèles structuraux publiés à ce jour pour le complexe eEF1B. Les lettres N et C correspondent respectivement aux domaines N et C-terminaux des protéines et indiquent l'orientation des interactions entre les différentes protéines. Les pointillés noirs indiquent les interactions transitoires entre le complexe eEF1B et la protéine eEF1A. Le point rouge dans le modèle de Bec, 1994 et les connecteurs pointillés verts dans celui de Mansilla, 2002, indiquent une dimérisation entre les sous-unités eEF1Bδ.

Les modèles proposent que la base du complexe eEF1B soit composée d'un hétéromère dans lequel sont associées quatre sous-unités, eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ (et la ValRS) avec une stœchiométrie de 1:1:1(:1) (Bec *et al.*, 1994; Janssen *et al.*, 1994; Minella *et al.*, 1998; Mansilla *et al.*, 2002) ou 1:2:1 (Sheu et Traugh, 1999). Parmi ces modèles, plusieurs proposent une dimérisation de cet hétéromère (Bec *et al.*, 1994; Sheu et Traugh, 1999; Jeppesen *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005). Notre modèle est en accord avec une dimérisation d'un hétéromère contenant au moins les protéines eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ (1:1:1). Il est intéressant de noter que la ValRS pourrait être absente du complexe eEF1B chez l'oursin (*cf* paragraphe I-B-3, page 41). Notre modèle apporte par ailleurs une précision nouvelle. Nous proposons l'existence de deux populations du complexe eEF1B. Une première résultant de la dimérisation entre un hétéromère d'au moins les protéines eEF1B γ , eEF1B α , et eEF1B δ 1 et un hétéromère d'au moins les protéines eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ 2, alors que la deuxième résulte de la dimérisation de l'hétéromère eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ 1. De plus, notre étude nous a permis de quantifier ces deux populations, à savoir respectivement 60% et 40% de la population totale du complexe eEF1B. Notre étude n'exclue pas l'existence possible de multimères eEF1B γ /eEF1B α , comme proposé par Minella et collaborateurs (Minella *et al.*, 1998).

En conclusion, des expériences supplémentaires permettant notamment de résoudre les stœchiométries (spectrométrie de masse) des différents complexes, ainsi que des expériences de cristallographie seront nécessaires pour résoudre la structure supramoléculaire du complexe eEF1B. Il serait particulièrement intéressant d'aborder l'étude de l'évolution de la structure macromoléculaire du complexe eEF1B

en fonction des différents états physiologiques de la cellule. Nos résultats apportent des notions nouvelles sur le complexe eEF1B. Il serait intéressant de vérifier la présence possible ou non de la ValRS au sein des complexes eEF1B chez l'oursin. De plus, la mise en évidence de l'existence de populations différentes, pose la question de leurs spécificités d'action et de régulation au sein de la cellule.

C - eEF1B : une cible multiple de phosphorylation

Chacune des protéines du complexe eEF1B est phosphorylable par diverses kinases. Ces phosphorylations sont susceptibles d'exercer des rôles régulateurs sur le complexe en modifiant sa structure tridimensionnelle ce qui agirait sur son activité d'échange de GDP/GTP sur eEF1A. Ainsi, la régulation va agir *via* la protéine eEF1A et porter sur son activité d'élongation, mais pourrait également réguler d'autres *processi* liés au caractère multifonctionnel de eEF1A [revue dans (Ejiri, 2002)]. Il est également possible que ces phosphorylations exercent des rôles sur d'autres fonctions cellulaires encore inconnues du complexe eEF1B, notamment portées par les protéines eEF1B γ et eEF1B δ . Ceci sera abordé dans le paragraphe D.

1 - La protéine eEF1B γ , substrat de CDK1/cycline B

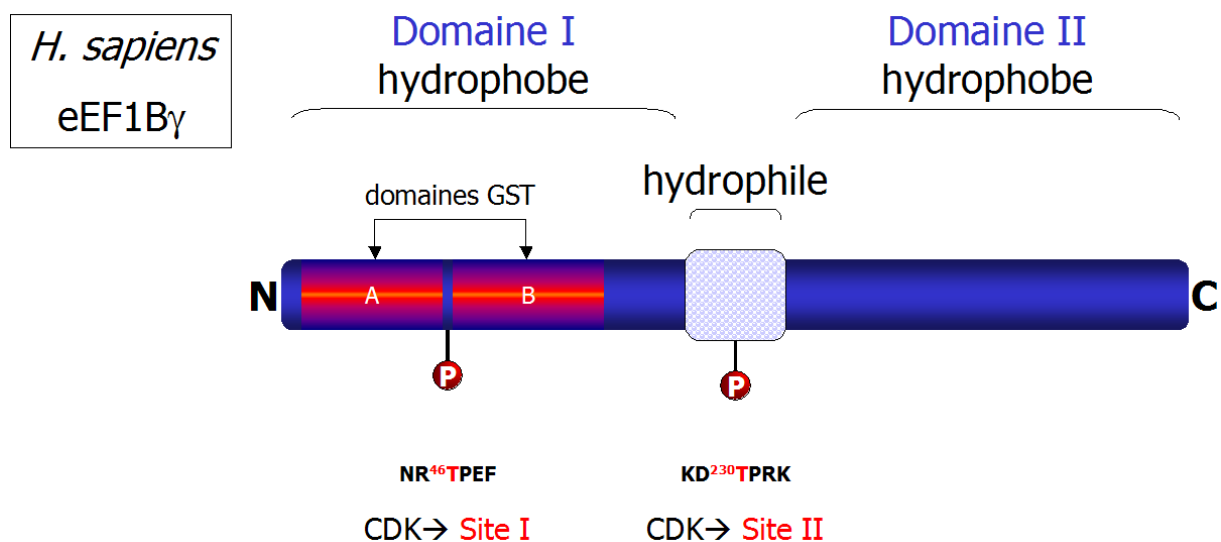


Figure 11 : Les sites de phosphorylation sur eEF1B γ

Les résidus phosphorylables sont numérotés selon la séquence humaine. Le site II est effectivement phosphorylable par CDK1/Cycline B. Le site I doit être considéré comme un site potentiel de phosphorylation par CDK.

La protéine eEF1B γ est phosphorylée par la CDK1/cyclineB, kinase initialement appelée MPF pour "Maturation Promoting Factor" puis "M-Phase factor" et contrôlant l'entrée en phase M. Cette phosphorylation a été initialement montrée *in vivo* dans les ovocytes de xénope en meiose (Belle *et al.*, 1989; Mulner-Lorillon *et al.*, 1989) puis plus tard dans les cellules de mammifères *in vitro* (Minella *et al.*, 1998).

Chez le xénope, un site de phosphorylation de CDK1/CyclineB sur eEF1B γ a été identifié, correspondant à la thréonine en position 230 dans le motif ²³⁰TPKK (Mulner-Lorillon *et al.*, 1992). Un alignement des séquences d'eEF1B γ de mammifère a montré que ce site est conservé, site de phosphorylation que nous avons appelé site II (revue dans article 3, KD²³⁰TPRK chez l'humain, figure 11). Ce site se situe à un endroit intéressant de la protéine eEF1B γ , précisément dans la région hydrophile séparant les domaines I et II cités plus haut. Nous avons retrouvé un site identique ou équivalent dans d'autres espèces de deutérostomes, tout comme chez les cnidaires, la plupart des champignons et dans quelques protistes. En revanche, il est absent de la plupart des plantes ainsi que de nombreux poissons osseux (revue dans article 3). Cependant, il a été montré que, chez le poisson rouge, la protéine eEF1B γ est un substrat de CDK1/CyclineB *in vitro* et *in vivo* (Tokumoto *et al.*, 2002). D'ailleurs, l'analyse approfondie de la séquence d'eEF1B γ de ce poisson montre l'existence de plusieurs motifs correspondant au site consensus optimal de phosphorylation par les CDK, (K/R)(**S/T**)PX(K/R) (Nigg, 1991), et notamment la présence d'une sérine au sein du motif NK**SP**, dans la région N-terminale du domaine I de la protéine. En fait, il est intéressant de noter que le même motif est retrouvé au même endroit dans toutes les séquences d'eEF1B γ de poissons et de plantes. Nous avons appelé ce motif, le site I. Finalement, en analysant la totalité des séquences

d'eEF1B γ disponibles dans les bases de données, il se trouve que la quasi-totalité de celles-ci, des protistes à l'humain, présentent un site phosphorylable soit au site I (NR⁴⁶TPEF chez l'humain), soit au site II (KD²³⁰TPRK chez l'humain), voire aux deux (revue dans article 3).

Il reste à déterminer si ces divers sites sont réellement phosphorylés par CDK de manière physiologique dans ces différentes espèces et si la phosphorylation du site I ou celle du site II sont fonctionnellement équivalentes ou non. Néanmoins, la conservation de ces sites de phosphorylation par les CDK dans la protéine eEF1B γ au cours de l'évolution indique une fonction conservée importante.

De manière surprenante, la séquence d'eEF1B γ d'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*, article 2, emb AJ973179), ne présente aucun des deux motifs de phosphorylation (figure 13). Parallèlement, nous avons observé que la protéine eEF1B α de l'oursin (n° accession emb AJ973180) possédait un site potentiel de phosphorylation par CDKs au niveau du motif ⁵⁷TPAAAKK (article 2) (figure 12).

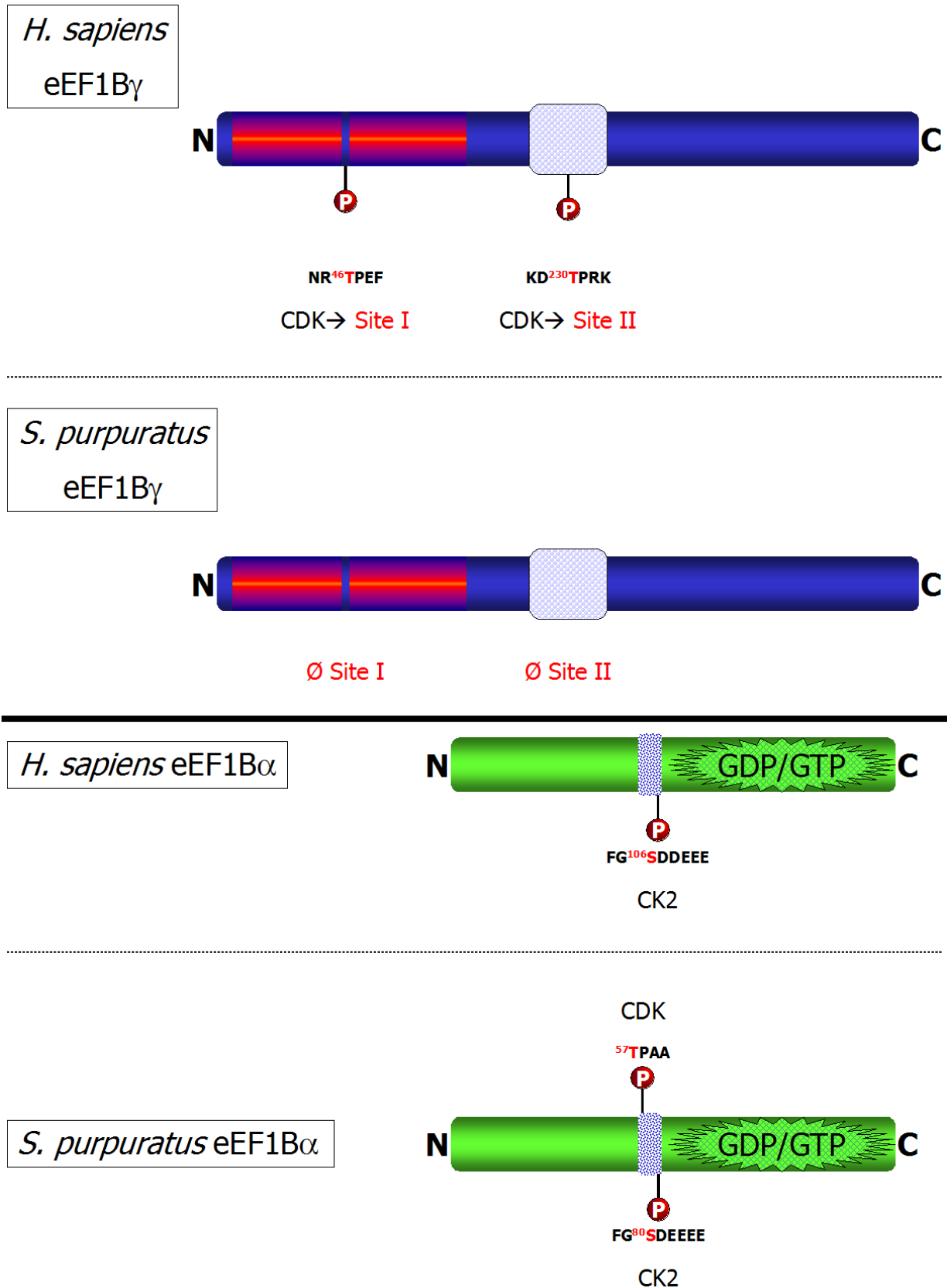


Figure 12 : Comparaisons des sites de phosphorylation sur les protéines eEF1B γ (partie haute de la figure) et eEF1B α (partie basse de la figure) entre l'homme et l'oursin *S. purpuratus*. La protéine eEF1B γ d'oursin ne possède aucun des deux sites I ni II de phosphorylation par CDK. En revanche, la protéine eEF1B α d'oursin possède en plus, en amont du site CK2, un site potentiel de phosphorylation par CDK. Voir le texte pour les détails.

Un site similaire a été retrouvé dans les séquences d'eEF1B α de l'aiguillat commun (petit requin) ainsi que chez la majorité des arthropodes (revue dans article 3). En parallèle, nous avons remarqué que comme l'oursin, nombre de ces espèces (poissons cartilagineux et arthropodes) étaient dépourvues du site de phosphorylation par les CDKs dans leurs séquences d'eEF1B γ (figure 13, et revue dans article 3).

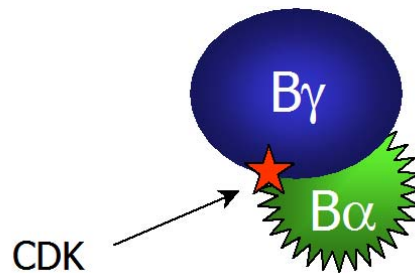
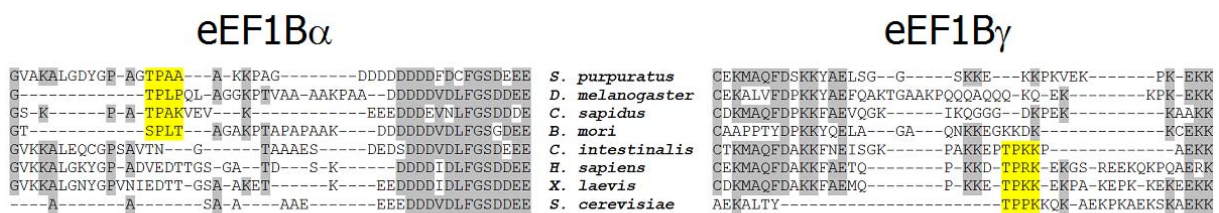


Figure 13 : Universalité de la phosphorylation par CDK1/Cycline B sur le complexe eEF1B. La partie haute présente un alignement partiel des régions voisines des sites potentiels de phosphorylation par CDK1/Cycline B pour les protéines eEF1B α (gauche) et eEF1B γ (droite). La partie basse schématise la conservation de la phosphorylation par CDK1/Cycline B soit sur la protéine eEF1B α , soit sur la protéine eEF1B γ .

En conclusion, la phosphorylation par CDK1/Cycline B sur le complexe eEF1B, soit sur eEF1B γ , soit sur eEF1B α , est une caractéristique conservée au cours de l'évolution (figure 13). Cette conservation supporte l'existence d'une fonction cellulaire importante chez les eucaryotes (*cf* paragraphe 5 ci-dessous, page 59).

2 - Phosphorylation de la protéine eEF1B α

La protéine eEF1B α est phosphorylable dans divers organismes par plusieurs kinases.

Comme décrit ci-dessus, la séquence de la protéine eEF1B α de l'oursin présente un site potentiel de phosphorylation par CDK1/Cycline B (⁵⁷T \overline{P} A \overline{A} AKK). Ce site de phosphorylation est spécifique des protéines eEF1B α d'espèces qui n'ont pas le site dans eEF1B γ (*cf* page précédente). Il faut désormais démontrer la réalité physiologique de cette phosphorylation.

La protéine eEF1B α possède, au niveau de sa région charnière hydrophile, un site consensus de phosphorylation par la caséine kinase 2 (CK2) sur la sérine du motif FG¹⁰⁶S \overline{D} DEE (numérotée selon la séquence humaine, figure 12, partie basse). Cette sérine est phosphorylée *in vitro* chez l'artémie (Janssen *et al.*, 1988) et chez le lapin (Chen et Traugh, 1995), ou encore *in vivo* chez le xénope (Belle *et al.*, 1995). En fait un alignement de cette région d'eEF1B α pour de nombreuses espèces a montré une fidèle conservation de ce site consensus de phosphorylation chez tous les métazoaires ainsi que chez les champignons et quelques protistes (revue dans article 3). Chez les plantes, ce site est présent sous une séquence légèrement modifiée avec une thréonine dans le motif FG(E/D)ETEE, ce qui reste en accord avec le site consensus de phosphorylation par CK2 (Meggio et Pinna, 2003) (figure 14, eEF1B α de riz). Pourtant, les protéines eEF1B α de riz et de blé ne sont pas phosphorylées *in vitro* par la CK2 (Ejiri et Honda, 1985; Matsumoto *et al.*, 1993), alors que chez ces espèces, le deuxième facteur d'échange de nucléotide eEF1B β qui

possède un site consensus de phosphorylation par la CK2 quasi identique est phosphorylé sur ce site par cette kinase (Matsumoto *et al.*, 1993), (figure 14, eEF1B β de riz et cf paragraphe 3 ci-dessous, page 55).

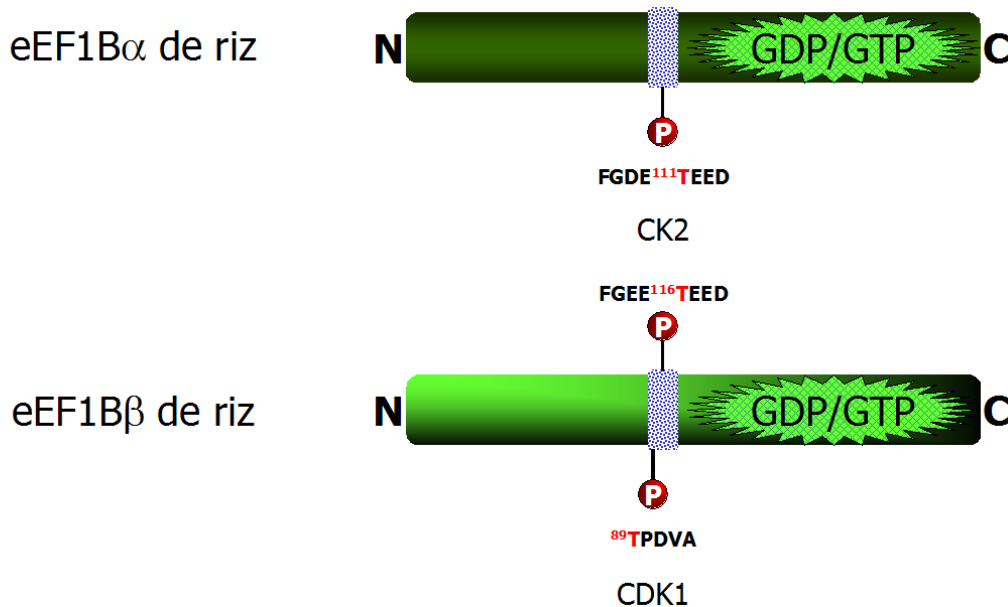


Figure 14 : Comparaison des sites de phosphorylation sur eEF1B α et eEF1B β chez le riz. Les deux protéines sont phosphorylées par la CK2 en des sites similaires sur une thréonine. La protéine eEF1B β se distingue par la présence supplémentaire d'un site phosphorylable par la CDK1 en amont du site CK2.

Enfin, chez le lapin, le complexe eEF1B et notamment eEF1B α est phosphorylable par la protéine kinase C ainsi que par la S6 kinase. Ces phosphorylations ont été montrées *in vitro* mais également *in vivo* après stimulation des cellules au PMA ou à l'insuline (Venema *et al.*, 1991b; Venema *et al.*, 1991a; Chang et Traugh, 1997).

3 - Phosphorylation des protéines d'échange de nucléotides chez les plantes

Les plantes ont la particularité d'exprimer un complexe eEF1B contenant en plus d'eEF1B α un deuxième facteur d'échange de nucléotide appelé eEF1B β [paragraphe 2-b, page 31]. Tout comme la protéine eEF1B α , elle présente le site conservé de phosphorylation par CK2 dans sa région charnière hydrophile (figure 14). Alors que les protéines eEF1B α de blé et de riz ne sont pas phosphorylées par la CK2, les protéines eEF1B β de ces mêmes espèces le sont *in vivo* (Palen *et al.*, 1990; Matsumoto *et al.*, 1994). Les protéines eEF1B α et eEF1B β de plantes diffèrent par la présence dans la séquence de cette dernière d'un site de phosphorylation par les CDK1/Cycline B sur la thréonine du motif conservé ⁸⁹TP(P/S)(V/A) (numéroté selon la séquence du riz) et qui se trouve en amont du site CK2 (figure 14). Etant donné que chez les plantes eEF1B β est phosphorylable par CK2 alors que eEF1B α ne l'est pas (Matsumoto *et al.*, 1994), il est probable que le site CK2 sur eEF1B α ne soit pas accessible alors que sur eEF1B β , la phosphorylation par CDK1 permette de le démasquer. Ce type de régulation par "phosphorylation coopérative" a déjà été démontré pour la phosphorylation combinée par la CK2 et la GSK3 de la glycogène synthase et l'inhibiteur 2 de la protéine phosphatase 1 (Jope et Johnson, 2004).

Une étude intéressante réalisée par l'équipe de Kinzy démontre que la protéine eEF1B β de plante est capable de compléter une souche de levure déficiente pour son facteur eEF1B α à condition que le site de phosphorylation par CDK1 sur eEF1B β de plante soit muté en un site non phosphorylable (Pomerening *et*

al., 2003). Ceci montre que les protéines eEF1B α et eEF1B β peuvent exercer la même fonction d'échange de nucléotide au niveau de l'élongation. La fonction de la protéine eEF1B β semble posséder une régulation supplémentaire dévoilée par la phosphorylation par CDK1/Cycline B (*cf* paragraphe 5 ci-dessous, page 59).

4 - La protéine eEF1B δ , cible de nombreuses kinases

La protéine eEF1B δ , spécifique des métazoaires (*cf* paragraphe I-B-3, page 35) est phosphorylée par de nombreuses kinases.

Comme pour son homologue eEF1B α , eEF1B δ présente en amont de son domaine d'échange de nucléotide (en C-terminal) une région charnière hydrophile riche en résidus acides. Cette région possède également un motif de phosphorylation par la CK2 et, en effet, des études ont montré la phosphorylation *in vivo* d'eEF1B δ par cette kinase (Belle *et al.*, 1995; Delalande *et al.*, 1999; Sheu et Traugh, 1999). Parallèlement, des expériences ont démontré que l'interaction de la protéine G eEF1A avec eEF1B α masque le site de phosphorylation de eEF1B α par CK2, ce qui n'est pas le cas pour eEF1B δ lors de son interaction avec eEF1A (Sheu et Traugh, 1997). Ces résultats supposent que eEF1B α et eEF1B δ interagissent différemment avec eEF1A.

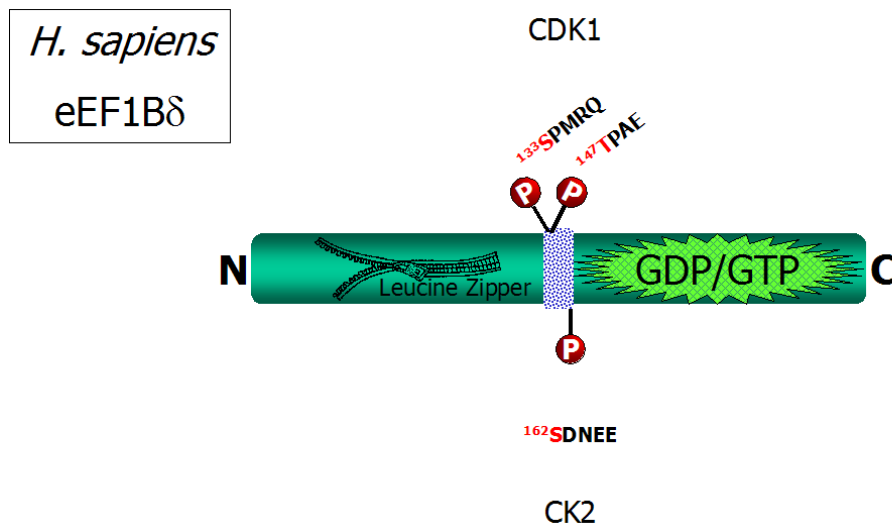


Figure 15 : Les sites de phosphorylation sur eEF1B δ
 Les sites de phosphorylation sont numérotés selon la séquence humaine.

La protéine eEF1B δ présente des sites de phosphorylation par CDK1/Cycline B. Ceci a été mis en évidence lors de la recherche des cibles de cette kinase lors de la maturation méiotique d'ovocytes de xénope (Belle *et al.*, 1995). Deux sites de phosphorylation ont été identifiés, l'un sur une thréonine dans le motif ¹²²TPA(A)K et l'autre sur une sérine non identifiée (Mulner-Lorillon *et al.*, 1994). Le premier motif contenant la thréonine a été retrouvé conservé chez les primates, les amphibiens, le poulet, la souris et le rat mais pas chez les autres animaux. En revanche, un autre site consensus de phosphorylation par CDK1/Cycline B sur une sérine (motif ¹³³SPMR, numéroté selon la séquence humaine) a été retrouvé chez la plupart des vertébrés excepté chez les amphibiens (revue dans article 3). Ce site est phosphorylé *in vivo* par CDK1/Cycline B chez l'humain (Kawaguchi *et al.*, 2003).

La protéine eEF1B δ est par ailleurs phosphorylable par la PKC (Venema *et al.*, 1991b; Venema *et al.*, 1991a) et par la S6K *in vitro* et *in vivo* en réponse à l'insuline (Chang et Traugh, 1997; Chang et Traugh, 1998).

Enfin, la protéine eEF1B δ chez l'oursin est phosphorylée par la protéine kinase A (PKA) (Delalande *et al.*, 1999). Il est également intéressant de noter qu'eEF1B δ est phosphorylée par la protéine kinase virale UL13 lors de l'infection par le virus de l'herpès. Dans ce cas, un des sites de phosphorylation correspond au même site de phosphorylation de eEF1B δ par CDK1/Cycline B (Kawaguchi *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 2003) (*cf* paragraphe I-D-3, page 73).

5 - Rôle des phosphorylations du complexe eEF1B sur l'élongation

En conclusion, il apparaît que le complexe eEF1B et ses constituants sont des cibles de multiples phosphorylations par diverses kinases (figure 16).

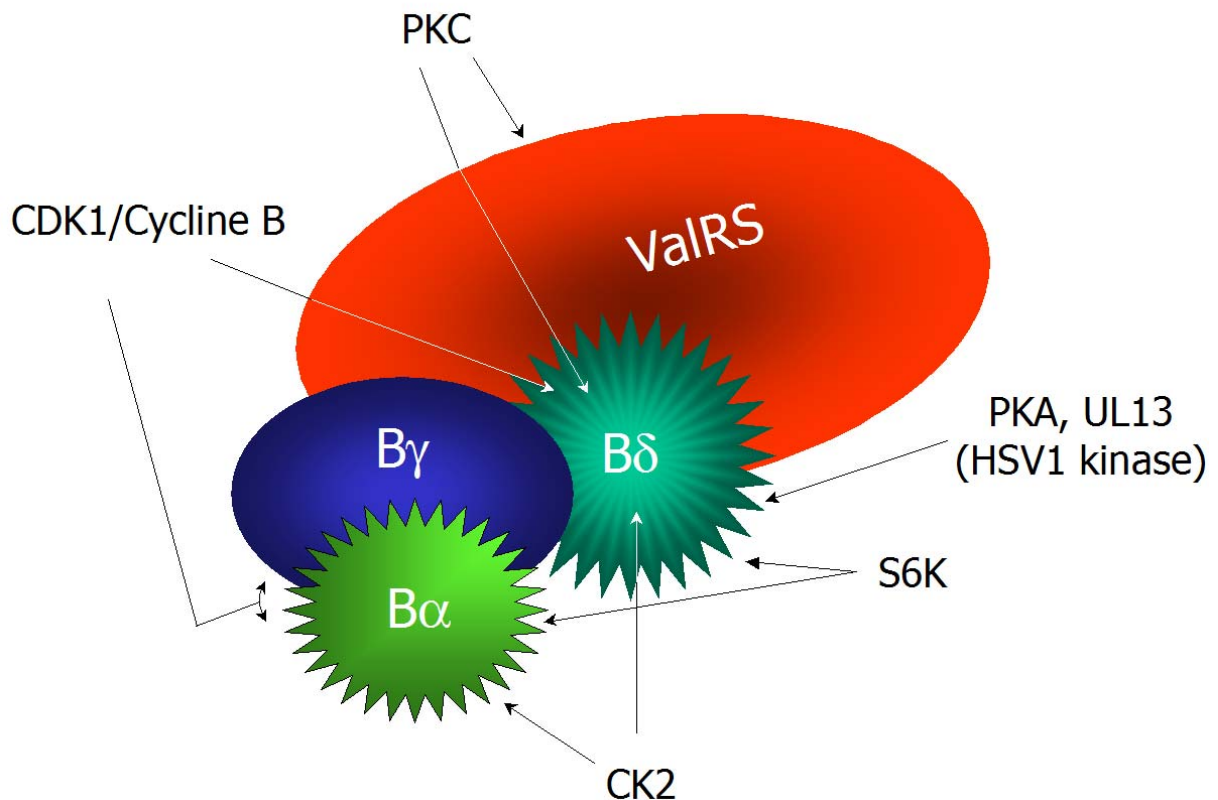


Figure 16 : Le facteur eEF1B et ses composants, cibles de phosphorylations multiples. Voir le texte pour les détails.

Les conséquences de ces phosphorylations sur la traduction en général ou plus précisément sur l'activité d'échange de nucléotide du complexe eEF1B ne sont pas toutes élucidées à ce jour. Si on considère la localisation des sites de phosphorylation par CDK1/Cycline B et CK2 sur leurs substrats du complexe eEF1B, à savoir au niveau de régions charnières séparant distinctement des domaines fonctionnels ou structuraux avérés, il est fort probable que les phosphorylations

modifient significativement la structure de ces protéines. De telles modifications structurales pourraient certainement se traduire par des modulations voire des changements importants de fonctions.

La CK2 a pour cible les protéines du complexe possédant une activité d'échange de nucléotides, *i.e.* eEF1B α de tous les eucaryotes sauf des plantes, eEF1B β de plantes et eEF1B δ de métazoaires. La conservation du site de phosphorylation de eEF1B α par CK2 au cours de l'évolution suggère une fonction importante de cette phosphorylation, même si une étude a montré qu'il n'était pas essentiel pour la croissance des levures (Carr-Schmid *et al.*, 1999). Pourtant, les effets de la phosphorylation de la protéine eEF1B α par la kinase CK2 sur son activité d'échange de nucléotides ne sont pas définitivement établis.

Des travaux ont montré que la phosphorylation d'eEF1B par CK2 était stimulée *in vitro* par le GDP (Palen *et al.*, 1994). Cette phosphorylation pourrait donc avoir lieu efficacement quand eEF1A-GDP interagit avec eEF1B soit au moment précis du cycle d'élongation où eEF1A nécessite d'être rechargé en GTP par eEF1B, suggérant implicitement un effet stimulateur sur l'activité d'échange. Cependant, comme décrit ci-dessus (*cf* paragraphe I-C-4, page 56), le site de phosphorylation sur eEF1B α par CK2 est masqué par la présence de eEF1A. Ainsi, la réalité physiologique de l'hypothèse avancée par Palen et collaborateurs doit être démontrée.

En revanche, Moller et collaborateurs (Janssen *et al.*, 1988) ont montré que la phosphorylation de eEF1B α par CK2 induisait une diminution de son activité d'échange de nucléotide alors que Traugh et collaborateurs (Sheu et Traugh, 1997) n'ont pas observé de modification de cette activité d'échange après phosphorylation.

Quel est alors le rôle de cette phosphorylation par CK2 sur eEF1B α ? Un élément de réponse est apporté par les études de Kinzy et collaborateurs (Pomerening *et al.*, 2003). En effet, une souche de levure déficiente pour sa protéine eEF1B α peut être complémentée par une protéine eEF1B α de plante non phosphorylable par CK2 mais pas par la protéine eEF1B β de la même espèce qui est phosphorylable par CK2 grâce la phosphorylation préalable de la protéine par CDK1/Cycline B (*cf* paragraphe I-C-3, page 55). Ce résultat suggère que la phosphorylation d'eEF1B β par la CK2 inhibe son activité d'échange de GDP/GTP sur eEF1A, expliquant ainsi son incapacité à compléter eEF1B α de levure. Ces résultats seraient alors en accord avec ceux de Moller et collaborateurs concluant à un effet inhibiteur de la phosphorylation de la protéine eEF1B α par la CK2 (Janssen *et al.*, 1988).

Les protéines eEF1B α et eEF1B δ du complexe eEF1B sont également phosphorylées par la PKC ainsi que par la S6 kinase en réponse à la stimulation mitogénique par l'insuline ou par les esters de phorbol. Ces phosphorylations sont associées à une augmentation de l'activité d'échange de GDP/GTP résultant en une stimulation de l'élongation impliquée dans l'augmentation de synthèse protéique en réponse au signal mitogène (Venema *et al.*, 1991b; Venema *et al.*, 1991a; Peters *et al.*, 1995; Chang et Traugh, 1998). La Valyl ARNt-synthétase est également substrat de la PKC *in vitro et in vivo* en réponse à une stimulation mitogène. Cette phosphorylation provoque un accroissement de son activité d'aminacylation (Venema *et al.*, 1991b; Venema *et al.*, 1991a). Il apparaît donc que les kinases PKC et S6K sont capables de stimuler de façon coordonnée la synthèse protéique au niveau de la phase d'élongation comme elles le font au niveau de la phase d'initiation

par la phosphorylation des facteurs d'élongation et d'initiation et éviter ainsi un encombrement des ribosomes au niveau des messagers (Traugh, 2001; Proud, 2006). Il est intéressant de noter que la même régulation semble mise en jeu lors de la fécondation. En effet, les deux kinases sont activées en réponse à la fécondation chez l'oursin (Ballinger *et al.*, 1984; Olds *et al.*, 1995) en corrélation avec une augmentation drastique de la synthèse protéique (Epel, 1967; Humphreys, 1969; Brandhorst, 1976), impliquant à la fois une stimulation de l'activité d'initiation (Epel, 1990) et de l'activité d'élongation (Monnier *et al.*, 2001b).

La phosphorylation du complexe eEF1B par CDK1/cyclineB n'a pas d'effet direct sur l'activité d'échange de nucléotide de eEF1B testé *in vitro* (Mulner-Lorillon *et al.*, 1992). Pourtant des résultats expérimentaux supportent l'existence d'une régulation de l'élongation par phosphorylation du complexe eEF1B par CDK1/Cycline B. Lors du développement précoce de l'oursin, l'activité d'élongation de la synthèse protéique marque des pauses à chaque mitose, de manière synchrone avec les pics d'activation de la CDK1/Cycline B (Monnier *et al.*, 2001b). Ces pauses participeraient à la diminution globale de l'activité de synthèse des protéines observée à chaque mitose [(Fan et Penman, 1970; Kanki et Newport, 1991) et revue dans (Le Breton *et al.*, 2005)]. Il a d'autre part été montré que dans un lysat de réticulocytes, la phosphorylation d'eEF1B par CDK1/Cycline B se traduisait par une diminution de synthèse des protéines riches en l'acide aminé valine et au profit de la synthèse des autres protéines (Monnier *et al.*, 2001a). D'après cette étude, la phosphorylation de la protéine eEF1B γ au sein de complexes eEF1B γ -eEF1B α augmenterait globalement l'activité d'élongation du complexe alors que l'inhibition spécifique de l'élongation des

protéines riche en valine serait due à la phosphorylation de la protéine eEF1B δ au sein de complexes contenant la ValRS. Cette phosphorylation aurait pour effet d'inhiber l'activité enzymatique de la ValRS. Ces résultats suggèrent une régulation potentielle de la traduction des protéines riches en valine par rapport aux autres, ceci en fonction de l'état d'activation de la kinase CDK1/Cycline B. Dans un cycle de division cellulaire, la CDK1/Cycline B est inactive durant les phases G1 et S, phases de croissance pour les cellules, et devient active quand la cellule atteint la phase G2/M (Nurse, 1992). La croissance cellulaire est associée à une synthèse majoritaire de protéines de structures. Etant donné que nombre de protéines de structure contiennent des motifs "coiled-coil" riches en valine (Conway et Parry, 1990), leur synthèse serait favorisée quand CDK1/CyclineB est inactive pendant la phase de croissance, et au contraire serait inhibée lorsque cette kinase est activée lors de la transition G2/M. Ces résultats ne sont pas contradictoires avec la baisse globale de l'activité d'élongation lors de la mitose si l'on considère que les protéines de structure sont quantitativement majoritaires dans la cellule.

Il est également intéressant de noter que lors de la division méiotique des oeufs de xénopes, le complexe eEF1B est phosphorylé par CDK1/Cycline B, et que cette phosphorylation (au moins sur eEF1B δ) perdure après la fécondation (Minella *et al.*, 1994). Le développement précoce se caractérise par une succession rapide de division des cellules, ceci sans augmentation globale de la masse de l'embryon, et donc où il est peu nécessaire de produire des protéines de structure. Ces résultats supposent donc que la phosphorylation permette une synthèse accrue des protéines régulatrices au dépend des protéines structurales pendant le développement précoce.

En conclusion, ces résultats suggèrent que CDK1/Cycline B, en phosphorylant eEF1B, a pour effet d'orienter la traduction de messagers spécifiques. Dans ce contexte, il faut remarquer que le domaine riche en lysine d'eEF1B γ ainsi que le motif "leucine zipper" d'eEF1B δ rappellent les signatures d'accrochage à l'ADN des facteurs de transcription (Keller *et al.*, 1995). Ces caractéristiques, potentiellement régulées par la phosphorylation par CDK1/cycline B, permettraient un accrochage à l'ARN, spécifiant la traduction de messagers particuliers.

Finalement, une attention particulière doit être portée sur la sous unité eEF1B δ . Bien qu'elle présente un domaine d'activité d'échange de nucléotides et qu'elle soit effectivement capable d'assurer la réactivation d'eEF1A, sa phosphorylation par CK2 ou CDK1 ne paraît pas modifier cette activité (Mulner-Lorillon *et al.*, 1992; Sheu et Traugh, 1997). Comme décrit plus haut, la phosphorylation de eEF1B δ par CDK1/Cycline B pourrait conduire à une régulation spécifique de l'élongation *via* la ValRS. La protéine eEF1B δ est le constituant du complexe pour lequel il n'existe que peu de données, tant du point de vue de sa structure que de sa ou ses fonction(s). Compte tenu de la multiplicité des kinases qui la phosphorylent, cette protéine joue vraisemblablement un rôle régulateur majeur et central au sein du complexe eEF1B et sans doute même au-delà de sa simple fonction de facteur de traduction.

D - Le facteur eEF1B : vers une multifonctionnalité cellulaire

La complexité structurale du complexe eEF1B et le fait que celui-ci soit une cible multiple de phosphorylation suggèrent qu'au-delà d'un simple facteur de ménage permettant la synthèse des protéines, le complexe eEF1B soit un régulateur notable de la vie des cellules en induisant la synthèse de protéines spécifiques à la fois ciblée dans le temps et dans l'espace. Il existe d'ailleurs des connections directes entre le dérèglement de l'élongation de la traduction et certaines pathologies cellulaires, notamment divers cas de cancers. De nombreuses questions subsistent quant aux fonctions des constituants du complexe eEF1B, pourtant, diverses données énoncées ci-après vont dans ce sens, et supposent une multifonctionnalité pour le complexe eEF1B au sein de la cellule.

1 - Du cycle cellulaire au cancer

Le cycle cellulaire est l'ensemble des processus par lesquels une cellule croît et se divise en deux cellules filles. Il se caractérise par la succession de quatre phases, la phase S (synthèse d'ADN) et la phase M (ségrégation des chromosomes dupliqués dans les deux cellules filles), séparées par deux phases intermédiaires G1 et G2 [revue dans (Nurse, 1994)]. Le bon déroulement de ces phases est assuré par des mécanismes de contrôle appelés les "checkpoints" (Hartwell, 2002). Ces mécanismes de surveillance agissent sur des acteurs clés, les "cyclin dependent kinases (CDKs)" qui font entrer la cellule dans les différentes phases du cycle [revue dans (Murray, 2004)]. Comme leur nom l'indique, l'activité des CDKs est essentiellement régulée par l'expression cyclique de leurs partenaires, les cyclines [revue dans (Murray,

2004)]. L'activité des CDKs est également régulée par des cascades de phosphorylations [revues dans (Hunt, 2002; Nurse, 2002)], activatrices [revue dans (Morgan, 1997)] et inhibitrices [revue dans (Nigg, 1995)]. Enfin, l'association des CDKs avec certaines protéines appelées CKIs ("Cyclin Dependent Kinases inhibitors") conduit à l'inhibition de l'activité des CDKs [revues dans (Sherr et Roberts, 1999; Pommier et Kohn, 2003)].

La première évidence d'une relation entre cycle cellulaire et facteurs d'élongation vient de la découverte que le complexe eEF1B est une cible physiologique de CDK1/Cycline B, la kinase induisant l'entrée des cellules en phase M (*cf* paragraphe I-C, page 48). Le complexe eEF1B est un des effecteurs de CDK1/Cycline B nécessaires à la réalisation de la mitose, par son implication dans l'inhibition globale de la synthèse protéique et la lecture de messagers spécifiques.

Des expériences d'immunolocalisation du complexe eEF1B au cours du cycle renforcent le lien entre cycle cellulaire et facteurs élongation. Alors que la majeure fraction du complexe se localise au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui est corrélé avec sa fonction de synthèse protéique comme déjà décrit (*cf* paragraphe I-B-3, page 23), nos travaux ont montré qu'une fraction du complexe eEF1B présentait des localisations spécifiques en fonction de la progression dans le cycle [(Boulben *et al.*, 2003) et article 1] (figure 16). Ainsi, au moment de la phase S et avant la rupture de l'enveloppe nucléaire, une partie du complexe se concentre tout autour du noyau, (figure 17 à 60-90 minutes). Plus tard, en entrant dans la phase M, le complexe est

localisé sous forme de deux larges sphères autour des pôles du fuseau mitotique [(Boulben *et al.*, 2003) et article 1].

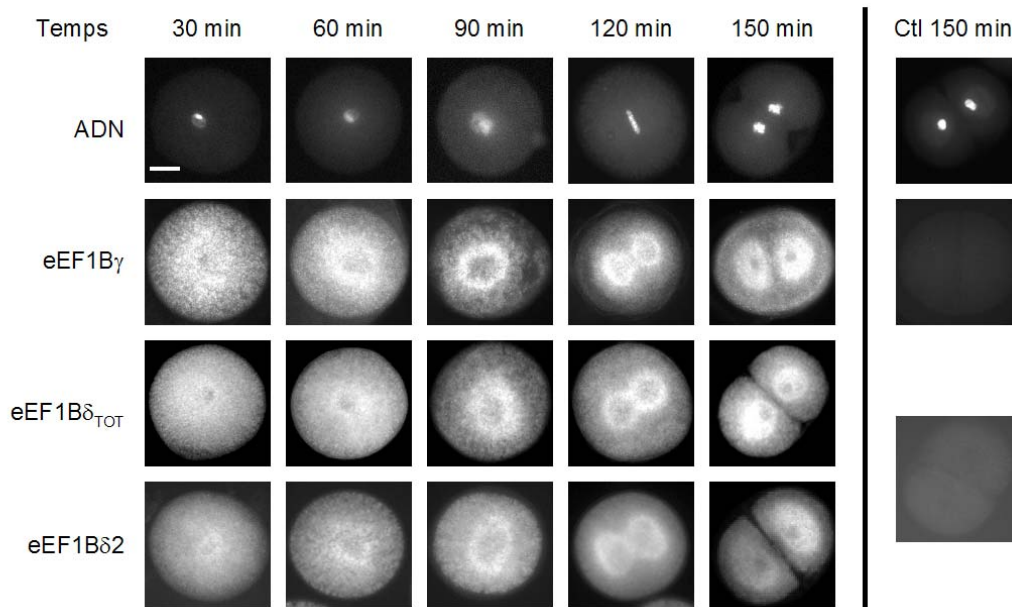


Figure 17 : Suivi en immunofluorescence de la localisation des sous-unités du facteur eEF1B au cours de la première division mitotique de l'embryon d'oursin
 La progression de la division cellulaire est suivie par le marquage de l'ADN au bis-benzimide (ADN). Les embryons en cours de développement ont été prélevés au temps indiqués post-fécondation puis employés pour l'immunolocalisation des sous-unités eEF1B γ (eEF1B γ), eEF1B δ 1 et δ 2 (eEF1B δ_{TOT}), et eEF1B δ 2 (eEF1B δ 2). La colonne de droite correspond aux embryons contrôles incubés avec les anticorps secondaires seuls (Ctl 150 min). Echelle : 30 μ m.

L'interprétation la plus simple de ces résultats est que, lors du cycle cellulaire, la régulation de la localisation du complexe eEF1B permettrait de déplacer celui-ci à certains niveaux cellulaires pour y effectuer une traduction de messagers spécifiques. Cette relocalisation permettrait ainsi de cibler la synthèse de protéines particulières dans l'espace et dans le temps au cours du cycle. Une hypothèse séduisante supplémentaire serait que certaines sous-populations du complexe eEF1B soient spécialisées dans des fonctions surveillance ("checkpoints") énoncées plus haut, pour s'assurer de la fidélité de la réplication lors de la phase S, ou du bon déroulement de

la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Cette hypothèse découle de travaux montrant que le complexe eEF1B présentait une capacité à se lier à de l'ADN endommagé par le chrome ou le transplatine (Wang *et al.*, 1997). Parallèlement, d'autres expériences ont mis en évidence la surexpression de la protéine eEF1B δ dans des cellules arrêtées en G2/M à la suite d'une exposition aux radiations ionisantes entraînant des cassures double brin sur l'ADN (Jung *et al.*, 1994). Aussi, dans les mécanismes de surveillance de l'ADN, le complexe eEF1B pourrait avoir un rôle de senseur par sa liaison à l'ADN endommagé et/ou d'effecteur en stimulant la synthèse de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et/ou dans l'arrêt du cycle.

Le lien entre le complexe eEF1B et la régulation du cycle cellulaire est renforcé par l'existence de relations entre des taux anormaux d'expression des protéines du facteur d'élongation eEF1 et de nombreux cas de cancers. Ces cancers se caractérisent par des divisions cellulaires anarchiques résultant de dérèglements des mécanismes de contrôle ("checkpoints") du cycle cellulaire (Kastan et Bartek, 2004; Massague, 2004). Ainsi, une surexpression du messenger et/ou de la protéine eEF1A est observée dans de nombreux carcinomes (Thornton *et al.*, 2003). Il est clairement montré que le niveau d'expression cellulaire d'eEF1A est corrélé avec la sénescence ou la longévité des cellules tout comme à leur état apoptotique ou prolifératif (Lamberti *et al.*, 2004). Concernant le complexe eEF1B et ses constituants, il a été montré des niveaux des messagers d'eEF1B α et eEF1B γ vingt fois supérieurs dans des cellules transformées en culture comparés à ceux mesurés dans des tissus. Ceci est également vrai pour le messenger d'eEF1A (Sanders *et al.*, 1992). De plus eEF1B γ

est hautement surexprimé dans nombre de cancers oesophagiens, gastrointestinaux, pancréatiques, et colorectaux (Chi *et al.*, 1992; Lew *et al.*, 1992; Ender *et al.*, 1993; Mimori *et al.*, 1995; Mathur *et al.*, 1998). Cette protéine est, de fait, considérée comme un véritable marqueur de cancer puisque son taux d'expression indique le caractère agressif des tumeurs (Mimori *et al.*, 1996), et permet ainsi de décider des orientations thérapeutiques. Parallèlement, un taux d'expression élevé de la protéine eEF1B δ est observé dans plusieurs lignées cellulaires issues de cellules ovariennes, mammaires ou encore pulmonaires transformées (Jacob *et al.*, 1996; Kolettas *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004). Une surexpression du messager d'eEF1B δ a également été observée lors d'une étude clinique de patients souffrant de carcinomes oesophagiens (Ogawa *et al.*, 2004). La surexpression de la protéine est associée à la chemorésistance de mélanomes malins (Sinha *et al.*, 2000).

Ainsi, il existe des connections entre dérégulation de l'expression des facteurs d'élongation et anomalies du cycle cellulaire même si les relations de causalité entre les deux ne sont pas encore élucidées.

Il existe dans certains cas une implication directe de l'expression des facteurs d'élongation dans la régulation du cycle cellulaire, puisqu'ils s'avèrent parfois être de véritable oncogènes. Ceci a été démontré pour une forme tronquée et mutée d'eEF1A nommée PTI-1 ("prostatic carcinoma tumor inducing gene") (Gopalkrishnan *et al.*, 1999). La protéine eEF1A2 est un oncogène ovarien significatif (Lee, 2003). De même, eEF1B δ est un oncogène avéré (Joseph *et al.*, 2002). Le gène eEF1B δ est surexprimé dans les fibroblastes murins transformés par le cadmium. De plus, la transfection de cellules 3T3 par eEF1B δ est suffisante pour les transformer et les

rendre tumorigènes dans les souris "nude", effet réversé par la co-transfection de messenger antisens (Joseph *et al.*, 2004).

Pour conclure, les facteurs d'élongation eEF1A et eEF1B sont certainement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, normal et pathologique. Sont-ils acteurs ou plutôt effecteurs ? Agissent-ils uniquement par le biais de leur activité de traduction où encore en exerçant d'autres fonctions cellulaires inconnues ? Autant de questions qui montrent qu'à ce jour, les mécanismes précis de leur action nécessitent d'être élucidés.

2 - eEF1B, un facteur impliqué dans la détoxification et/ou dans l'équilibre redox de la cellule ?

Une étude bioinformatique a montré que la séquence consensus nécessaire à l'activité glutathion S-transférase (GST) est conservée chez la protéine eEF1B γ de plusieurs organismes eucaryotes (Koonin *et al.*, 1994). Venant appuyer ce résultat, la structure cristalline de la partie N-terminale d'eEF1B γ de levure a montré une forte homologie avec la GST (Jeppesen *et al.*, 2003). La GST est une enzyme de détoxification cellulaire, qui intervient dans la biotransformation des xénobiotiques en catalysant leur conjugaison avec le glutathion. Cette détoxification joue un rôle dans la protection cellulaire contre les stress environnementaux et oxydatifs, et est également impliquée dans la résistance cellulaire aux drogues [(revue dans (McIlwain *et al.*, 2006)].

L'existence d'une activité GST a été rapportée à la fois pour un complexe eEF1B $\alpha\beta\gamma$ purifié à partir de l'embryon de riz (Kobayashi *et al.*, 2001) ainsi que pour la protéine eEF1B γ recombinante de riz exprimé chez la bactérie. Cette activité était 50 fois moindre que celle obtenue avec la GST authentique de riz (Kobayashi *et al.*, 2001). En parallèle, une activité trypanothione S-transférase (activité dérivée de l'activité GST) a été imputée à eEF1B γ dans le complexe eEF1B d'un protozoaire (Vickers et Fairlamb, 2004; Vickers *et al.*, 2004).

Des études suggèrent fortement l'implication du complexe eEF1B et plus spécifiquement d'eEF1B γ dans les mécanismes de détoxification cellulaire. Ainsi, il a été montré que la surexpression d'eEF1B γ chez le trypanozome entraînait une forte résistance à la clomipramine, un composé lipophile (Billaut-Mulot *et al.*, 1997). Cette résistance pourrait être le résultat d'une protection du parasite contre la peroxydation lipidique par le biais de l'activité GST d'eEF1B γ . Par ailleurs, une fonction GST potentiellement portée par la protéine eEF1B γ pourrait également expliquer pourquoi la surexpression de cette protéine dans de nombreuses tumeurs est liée à leur capacité de résistance aux traitements et ainsi à leur caractère agressif (Mimori *et al.*, 1996; McIlwain *et al.*, 2006).

Ejiri pose l'hypothèse selon laquelle la fonction GST d'eEF1B γ permettrait à la protéine de se comporter comme un senseur signalant l'état redox de la cellule à la machinerie traductionnelle. En effet, la traduction est activée par le glutathion réduit et inversement, inhibée par le glutathion oxydé (Ejiri, 2002). Si l'on considère l'implication du domaine GST d'eEF1B γ dans les interactions avec les autres protéines du complexe eEF1B, on peut supposer que l'état redox de la cellule module l'équilibre

structural du complexe eEF1B et ainsi régule son activité de traduction. L'équipe de Kinzy a montré que la perte d'eEF1B γ chez la levure entraînait une forte résistance au stress oxydatif (Olawaju *et al.*, 2004). Cette étude montre par ailleurs que la résistance est accrue par la perte concomitante de la protéine eEF1B α , ce qui indique que c'est l'ensemble du complexe eEF1B qui serait impliqué dans la résistance au stress, peut-être par son activité d'échange de nucléotide sur eEF1A. De manière concordante, une autre équipe a montré que la répression d'eEF1A par un ADNc antisens protégeait les cellules humaines de la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (Chen *et al.*, 2000). Au vu de ces résultats, Kinzy suggère donc comme Ejiri (Ejiri, 2002) qu'eEF1B γ agirait comme un senseur du stress par l'intermédiaire de son domaine GST, ne requérant pas d'activité catalytique, mais plutôt en modulant la structure du complexe eEF1B et potentiellement ainsi son activité d'échange de GDP/GTP.

L'implication du facteur eEF1B et son mode d'action dans la réponse au stress et la prévention des dommages cellulaires restent encore inexpliqués. Il est notamment important de répondre à cette question: eEF1B agit-il *via* une modulation de son activité d'échange de nucléotide sur eEF1A, et donc sur la synthèse spécifique de protéines de détoxification ou agit-il plutôt *via* une activité catalytique du domaine GST d'eEF1B γ et donc directement dans la voie de métabolisme des xénobiotiques?

3 - eEF1 et virus

Les virus ont la faculté de favoriser la synthèse de leurs propres protéines au dépend de la synthèse de celles de la cellule infectée. Les virus s'approprient ainsi la machinerie traductionnelle de la cellule hôte, ce qui permet la synthèse de grandes quantités de protéines virales en vue de l'assemblage des futurs virions (Gale *et al.*, 2000). L'élongation de la synthèse protéique et ses effecteurs sont particulièrement sollicités lors de l'infection virale. En effet, il a été démontré que la traduction était affectée à la suite de l'interaction de facteurs d'élongations avec des composants viraux. Ainsi, la protéine eEF1B δ est capable d'interagir avec le deuxième exon codant de Tat, une protéine conservée chez les lentivirus (VIH et VIS), ce qui a pour conséquence une réduction manifeste de l'efficacité de traduction des messagers de la cellule hôte au profit de ceux du virus (Xiao *et al.*, 1998). Cette observation était d'ailleurs la première évidence de la participation du complexe eEF1B à la traduction sélective de messagers spécifiques (*cf* paragraphe I-C-5, page 59). Par ailleurs, dans les cellules infectées par le virus de l'herpès de type 1 (HSV-1), la protéine eEF1B δ interagit avec l'une des protéines du virus les plus précocement exprimées, la protéine ICP0 (infected-cell protein 0) (Kawaguchi *et al.*, 1997). Cette interaction induit des modifications post-traductionnelles de la protéine eEF1B δ qui pourraient affecter l'activité de la machinerie traductionnelle [(Kawaguchi *et al.*, 1997); revues dans (Gale *et al.*, 2000) et article 3]. Lors de l'infection à divers virus de type herpès, les cellules accumulent des formes hyperphosphorylées de la protéine eEF1B δ (Kawaguchi *et al.*, 1998). Une partie des phosphorylations est imputée à la protéine kinase codée par le gène viral UL13 et à ses homologues, comme la kinase BGLF4 du

virus de l'Epstein-Barr (Kawaguchi *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2001). Il est très intéressant de noter qu'un des sites de phosphorylation par ces kinases sur eEF1B δ correspond en fait au même site de phosphorylation de la protéine par la kinase CDK1/CyclineB, c'est-à-dire la serine 133 au sein du motif ¹³³SPMR de la séquence d'eEF1B δ humaine (Kawaguchi *et al.*, 2003). L'hypothèse serait que les kinases virales exercent leur rôle régulateur sur eEF1B δ en mimant celui de CDK1/CyclineB. Nous avons vu dans le paragraphe C que la phosphorylation de eEF1B δ par CDK1/Cycline en phase G2/M du cycle de division pouvait orienter la synthèse spécifique de certains messagers à ce stade précis de la division. Ainsi il est tentant de spéculer que les modifications post-traductionnelles engendrées sur eEF1B δ par certains composants viraux auraient pour fonction également de traduire des messagers spécifiques, en l'occurrence dans le cas d'infection virale, les messagers viraux, et ceci au dépend des messagers de la cellule hôte. Une caractéristique de beaucoup d'ARN messagers viraux est la présence dans leur partie 5' non traduite d'une structure IRES ("Internal Ribosome Entry Site") [revue dans (van der Velden et Thomas, 1999)]. La traduction IRES-dépendante est une alternative au processus d'initiation de la traduction (*cf* paragraphe I-A-1, page 13). De plus en plus d'études ont montré la traduction physiologique de messagers spécifiques dépendante de leur IRES au cours de la mitose, ceci dans un contexte de synthèse protéique globale diminuée [revue dans (Le Breton *et al.*, 2005)]. Ainsi, il est intéressant de faire le parallèle entre le cas de l'infection virale d'une part et celui de la mitose d'autre part. En effet, dans les deux la cellule nécessite la synthèse de protéines spécifiques au dépend de la synthèse protéique globale. Une hypothèse séduisante serait que dans les deux cas de figures, mitose ou infection virale, les

modifications post-traductionnelles affectant eEF1B δ soient impliquées dans la traduction dépendante des IRES de messagers spécifiques. Une question reste cependant en suspens : comment se fait la connexion entre le facteur d'élongation eEF1B δ et l'initiation de la traduction au niveau des IRES ? La protéine eEF1B δ agirait-elle comme une ITAF ? Existe-t-il par ailleurs un homologue physiologique de la protéine virale ICPO dans les cellules ?

Pour conclure, il apparaît que la cellule a développé au cours de l'évolution un système très élaboré pour exercer l'activité d'échange de GDP/GTP sur la protéine G eEF1A : le complexe d'élongation de la traduction eEF1B. A ce jour, le complexe eEF1B connu le plus sophistiqué est décrit chez les animaux où il se compose d'au minimum 5 entités englobant sous unité eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2, et la Valyl-ARNt synthétase. En comparaison, chez la bactérie, l'activité fondamentale de transfert de l'aminoacyl-ARNt est portée par deux uniques protéines, EF-Tu (protéine G) et EF-Ts (échange de nucléotide). Cette augmentation dans la complexité de eEF1B au cours de l'évolution indique une régulation très élaborée de l'activité de ce complexe. Cette complexité structurale suggère par ailleurs l'acquisition de fonctions spécifiques pour chacune des protéines constitutives du complexe. Alors que pendant longtemps l'activité propre d'échange de GDP/GTP a été attribuée aux protéines de type eEF1B α (anciennement eEF1 β), il apparaît indéniable que les protéines constitutives de ce groupe, à savoir eEF1B α , eEF1B β (spécifique des plantes) et eEF1B δ (spécifique des animaux), participent également à cette activité d'échange tout en possédant d'autres fonctions bien spécifiques encore à élucider.

Il est donc évident qu'au-delà qu'un simple facteur de ménage, le complexe eEF1 doit aujourd'hui être clairement inscrit parmi les facteurs multiples impliqués dans la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel et notamment en relation directe ou indirecte avec le cycle cellulaire et ses dysfonctionnements. Il faut maintenant déterminer dans quelles mesures ces facteurs sont activement ou passivement impliqués dans ces régulations.

Des avancées remarquables ont été effectuées dans la compréhension des rôles précis de ces divers facteurs, notamment par l'étude de divers cas pathologiques, cancers ou infections virales, impliquant une altération de leurs activités. Ainsi, ces divers facteurs se posent comme des marqueurs de cancers ou encore des cibles thérapeutiques potentielles, dont l'étude doit assurément être approfondie pour espérer un jour pouvoir envisager des thérapies ciblées au niveau de l'élongation de la traduction.

Chapitre II :

Le modèle biologique,
le développement précoce
de l'embryon d'oursin

II - Le modèle biologique : le développement précoce de l'embryon d'oursin

A - Un modèle reconnu pour l'étude du cycle cellulaire et du développement

L'identification des molécules clés et des mécanismes régulant la division des cellules provient de la convergence d'approches expérimentales différentes faites sur des modèles biologiques variés : les levures, les embryons d'oursin, les ovocytes d'étoiles de mer et d'amphibiens ou encore les cellules de mammifères en culture. La conservation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire au cours de l'évolution parmi ces différents modèles biologiques a permis d'établir le modèle général de contrôle du cycle cellulaire [revue dans (Nurse, 2000)]. Tous ces travaux ont été à l'origine de la nobélisation en 2001 des personnages principaux ayant décrypté les mécanismes régulant le cycle cellulaire, Tim Hunt, Paul Nurse et Leyland Hartwell. Les premières divisions mitotiques après la fécondation de l'oeuf d'oursin font donc aujourd'hui partie des modèles reconnus pour l'étude du cycle cellulaire. C'est d'ailleurs dans ce modèle qu'a été initialement identifiée la cycline B (Evans *et al.*, 1983). L'embryon d'oursin a permis à Theodor Boveri dès le début du XXème siècle d'élaborer la théorie chromosomique du cancer en particulier par la répartition anormale des chromosomes due aux mitoses multipolaires (Nigg, 2006). De plus, il faut noter que les échinodermes, incluant l'oursin, ont toujours occupé une place importante parmi les modèles utilisés dans l'étude du développement embryonnaire [revues dans (Giudice, 1973; Hörstadius, 1973)].

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons utilisé comme modèle le développement précoce des embryons d'oursin *Sphaerechinus granularis*.

1- Présentation de l'oursin *Sphaerechinus granularis*



Figure 18 : L'oursin *Sphaerechinus granularis*

L'oursin *Sphaerechinus granularis* (figure 18) est un invertébré marin appartenant à l'embranchement des échinodermes chez les deutérostomes. Parmi les invertébrés marins, on trouve également les étoiles de mer, les concombres de mer, les lis de mer, et les ophiures (Kato et Schroeter, 1985). Le génome complet de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* est désormais disponible [<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/seaurchin> ; (Weinstock *et al.*, 2006)] et a permis de montrer que les échinodermes sont les invertébrés les plus proches des chordés (figure 19).

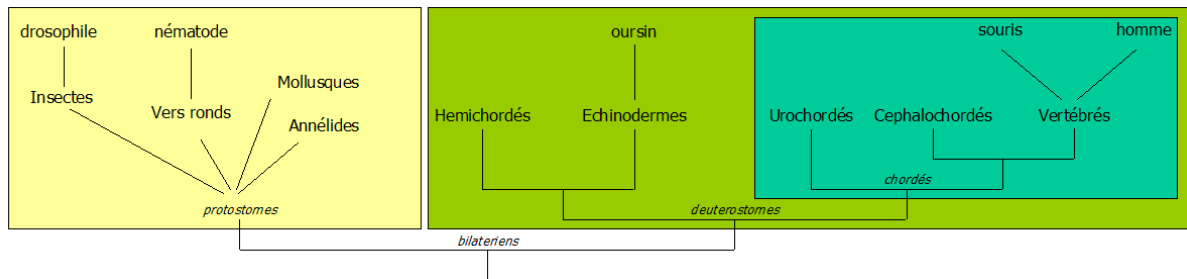


Figure 19 : Représentation schématique de l'évolution des espèces à partir de l'embranchement des bilatériens
 D'après (Weinstock *et al.*, 2006)

Les oursins ont un mode de reproduction sexué et gonochorique. La fécondation se fait sans accouplement. Lors de la ponte, les oeufs et les spermatozoïdes sont expulsés et la fécondation se fait dans le milieu extérieur. Le spermatozoïde restaure la diploïdie en fournissant son ADN et provoque la réactivation de l'oeuf qui se traduit par l'augmentation du métabolisme cellulaire (Epel, 1978; Swann et Whitaker, 1990). Il existe plusieurs espèces d'oursin. L'espèce *Sphaerechinus granularis* a été choisie au sein de notre laboratoire pour des raisons d'accessibilité au large de Brest, de la mer d'Iroise jusqu'aux abers de la Côte des Légendes.

2- La reprise du cycle cellulaire chez *Sphaerechinus granularis*

Le cycle cellulaire à l'origine de la prolifération des cellules est composé des quatre phases : S (synthèse d'ADN), M (ségrégation des chromosomes), séparées par les phases intermédiaires G1 et G2. L'enchaînement de ces phases est orchestré par une famille de kinases, les CDKs ("Cyclin Dependent Kinases"), sous le contrôle de mécanismes de surveillance, les "checkpoints" (cf paragraphe I-D-1, page 65).

Chez l'oursin, les gamètes femelles fécondables sont naturellement bloqués en phase G1 du cycle cellulaire. La fécondation lève ce blocage et provoque une transition G1/S suivie de la première division mitotique (figure 20).

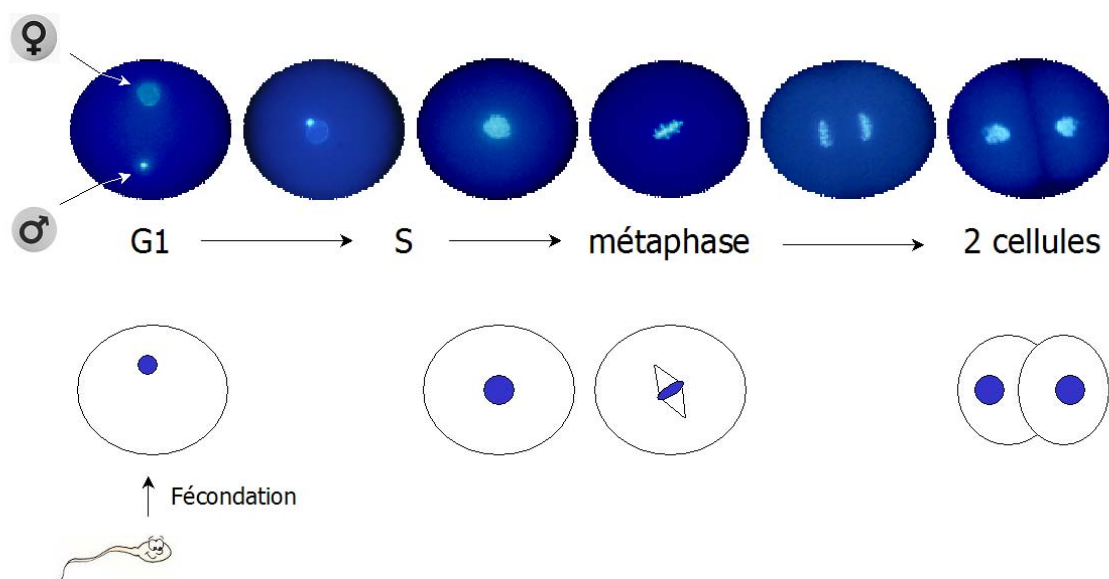


Figure 20 : Fécondation et première division mitotique chez l'oursin

La fécondation de l'ovule d'oursin provoque une transition G1/S suivie d'une succession de divisions mitotiques rapides (S/M). Le cycle mitotique des chromosomes est suivi ici par microscopie en fluorescence après coloration de l'ADN au bis-benzimide. Les sigles mâle et femelle indiquent respectivement les pronuclei mâle et femelle qui vont migrer et fusionner au centre de la cellule. Après la phase de synthèse d'ADN (S), les chromosomes vont se condenser et s'aligner sur la plaque métaphasique (métaphase). La division se termine à l'anaphase lorsque les deux cellules filles ont hérité chacune d'un lot identique de chromosomes et se séparent (2 cellules).

Les cellules embryonnaires se divisent ensuite par une succession rapide de phases S et M sans phases G1 ni G2 (figure 21). Pendant cette période, le taux de division est dix fois plus élevé qu'au stade blastula atteint après la huitième division (Parisi *et al.*, 1978). La première division s'effectue en 2 heures à 2h30 environ, la deuxième requiert environ 1h30 et les suivantes ont lieu toutes les 30 minutes. Plus tard, quand le stade blastula est atteint (entre huit et douze heures après fécondation), on observe un ralentissement des divisions. Ce ralentissement correspond à l'acquisition des phases intermédiaires G1 et G2.

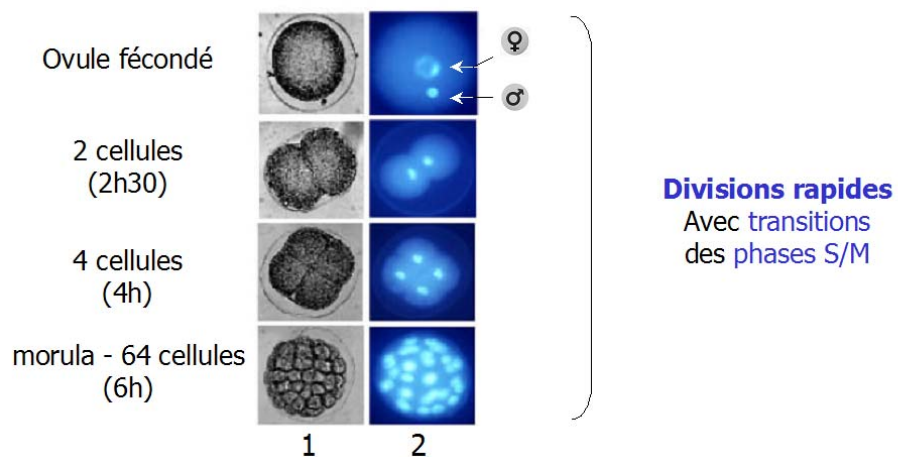


Figure 21 : Les premiers stades du développement précoce de l'oursin *Sphaerechinus granularis* (extrait du manuscrit de thèse d'Anabelle Monnier, 2001)

1- suivi par microscopie à contraste de phase

2- suivi par microscopie à fluorescence après coloration de l'ADN au bis-benzimide

Ainsi les premières divisions de l'embryon permettent l'étude des mécanismes d'entrée dans le cycle cellulaire et plus particulièrement de la phase M dans des cellules qui sont physiologiquement arrêtées à la même phase du cycle et reprennent de façon synchrone un cycle cellulaire normal. C'est ainsi que pour les kinases actives après la fécondation, il a été démontré que la kinase CDK1/Cycline B présente un pic

d'activation dès la première mitose puis à chaque phase mitotique suivante, et ceci 20 minutes avant chaque cytokinèse (Schatt *et al.*, 1983; Meijer et Pondaven, 1988). Des travaux récents ont démontré que les mécanismes de surveillance contrôlant l'activité de CDK1/Cycline B sont présents et fonctionnels dans l'embryon d'oursin dès la première division (Marc *et al.*, 2004) ; Le Bouffant, communication personnelle). Ceci implique l'existence dans l'embryon d'oursin des acteurs moléculaires des "checkpoints" et en particulier des kinases et phosphatases impliquées dans les phosphorylations de CDK1/Cycline B (*cdc25*, *myt1/wee1*) en accord avec la présence de ces acteurs dans le génome complet de l'oursin (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006).

Les voies de signalisation conduisant à l'activation de CDK1/Cycline B après fécondation font l'objet de nombreuses recherches qui ont mis en évidence l'implication de plusieurs kinases. Ainsi, la fécondation induit très rapidement l'activation de la protéine kinase C (PKC) résultant de l'augmentation du calcium intracellulaire (Olds *et al.*, 1995; de Barry *et al.*, 1997). Cette activation est responsable de l'augmentation du pH intracellulaire [revue dans (Swann et Whitaker, 1990)] et est impliquée dans l'activation du métabolisme oxydatif de l'embryon (Heinecke *et al.*, 1990).

Parmi les inhibiteurs de kinases capables d'empêcher l'activation de CDK1/Cycline B après la fécondation, il faut citer la rapamycine et la wortmanine (De Nadai *et al.*, 1998; Salaun *et al.*, 2004). Ceci démontre l'implication des kinases mTOR et PI3K dans les voies de signalisation activées lors de la fécondation. Il est important de rappeler que ces deux kinases appartiennent à la voie de régulation de la S6K (Fumagalli et Thomas, 2000). Il a été démontré qu'une activité MAP kinase

diminue très rapidement après fécondation d'une manière calcium dépendante (Carroll *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Un pool de la MAP kinase est ensuite réactivé et participe au contrôle de la phase M (Philipova et Whitaker, 1998; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

Par ailleurs, des variations d'activité de la PKA ont été observées au cours de la première division mitotique. L'activité de la PKA augmente après la fécondation et diminue juste avant le premier clivage. L'inhibition de l'activité PKA empêche la formation du fuseau mitotique (Browne *et al.*, 1990).

L'embryon d'oursin possède une activité caséine kinase 2 (CK2) qui reste constante de la fécondation jusqu'à la blastula (Delalande *et al.*, 1999).

En conclusion, l'embryon d'oursin présente les principaux acteurs et voies de signalisation impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et permet d'étudier les mécanismes d'activation de CDK1/Cycline B ainsi que les mécanismes d'action de cette kinase au cours du cycle cellulaire.

B - Un modèle de choix pour l'étude de la régulation de la traduction

La fécondation provoque une augmentation de 5 à 15 fois de la synthèse protéique qui intéresse l'ensemble des protéines cellulaires (Bedard et Brandhorst, 1983; Grainger *et al.*, 1986). Des expériences de fécondation en présence d'un inhibiteur de la traduction démontrent que la synthèse protéique est nécessaire pour la reprise du cycle cellulaire (Hultin, 1961; Wagenaar, 1983; Grainger *et al.*, 1986). Parmi les protéines synthétisées, la cycline B est en fait la seule protéine indispensable pour l'entrée en mitose (Arion et Meijer, 1989), les autres protéines prépareraient quant à elles, le développement ultérieur.

L'augmentation de la synthèse protéique au cours des premières divisions rapides est basée uniquement sur des *processi* traductionnels, indépendamment de la transcription. Ainsi ni l'ajout d'un inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D, (Gross et Cousineau, 1964), ni l'énucléation des oeufs (Brachet et Denis, 1963; Denny et Tyler, 1964) n'empêchent les divisions embryonnaires après fécondation, jusqu'au stade blastula.

Quels sont les mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation rapide de la synthèse protéique post-fécondation ? Bien que non totalement élucidée, la voie de signalisation activée par la fécondation fait intervenir une augmentation du pH et du calcium intracellulaire. Ces deux événements sont indispensables à la stimulation de la synthèse protéique (Brandis et Raff, 1979). Ainsi, une augmentation du pH active de l'ordre de 25 fois le recrutement des ARN messagers sur les ribosomes (Johnson et Epel, 1976; Winkler *et al.*, 1980). Une augmentation du pH est d'ailleurs capable d'augmenter la synthèse protéique dans des oeufs non

fécondés (Grainger *et al.*, 1979). L'élévation du calcium, quant à elle, est suffisante et nécessaire pour induire l'augmentation de synthèse protéique. Le calcium agirait comme un second messenger dans la voie de signalisation impliquant les activités PI3K et la PKC (Whitaker et Larman, 2001).

L'augmentation de la synthèse protéique post-fécondation repose sur deux mécanismes complexes : le recrutement des ARN messagers dans les polysomes et l'activation de la machinerie de traduction. Le démasquage des ARN messagers maternels à la fécondation se traduit par un relarguage des protéines associées aux messagers dans les mRNPs (maternal Ribo Nucleo Proteins) (Grainger et Winkler, 1987). L'activation de la machinerie de traduction résulte d'une levée de l'inhibition au niveau de l'initiation par la phosphorylation/dégradation de 4E-BP, l'inhibiteur spécifique du facteur d'initiation eIF4E (Cormier *et al.*, 2001; Salaun *et al.*, 2003). Il a été démontré que la hausse d'activité de l'initiation s'accompagne d'une augmentation coordonnée de l'activité d'élongation. Celle-ci est en effet stimulée de 2 à 3 fois (Brandis et Raff, 1978; Brandis et Raff, 1979; Hille et Albers, 1979; Raff *et al.*, 1981; Monnier *et al.*, 2001b). Le mécanisme de la stimulation de la phase d'élongation n'est pas encore élucidé, mais pourrait faire intervenir la phosphorylation des facteurs d'élongation par les différentes kinases stimulées après la fécondation.

L'augmentation globale de la synthèse protéique est le résultat de l'activation des voies de signalisation en réponse à la fécondation. Il est important de remarquer que cette augmentation générale s'accompagne de modifications transitoires corrélées à la phase M des cycles cellulaires successifs. Cette observation est en

accord avec l'existence d'une inhibition de synthèse protéique globale lors de la mitose des cellules (Fan et Penman, 1970; Kanki et Newport, 1991), probablement associée à la lecture spécifique de certains messagers, en partie par une initiation dépendante des IRES [revues dans (Vagner *et al.*, 2001; Le Breton *et al.*, 2005)]. Les mécanismes à l'origine de cette régulation spécifique de la synthèse protéique au moment de la phase M ne sont pas totalement élucidés. Les études réalisées dans l'embryon démontrent une corrélation entre un ralentissement de l'activité d'élongation et le pic d'activation du complexe CDK1/Cycline B (Monnier *et al.*, 2001b), ce qui permet d'impliquer directement le complexe eEF1B dans cette régulation. Cette hypothèse est détaillée plus haut (*cf* paragraphe I-D-1, page 65).

En conclusion, il apparaît qu'après la fécondation, et au cours des premiers cycles cellulaires de l'embryon d'oursin, la traduction des protéines est régulée par des mécanismes élaborés impliquant des acteurs et des voies moléculaires conservés au cours de l'évolution. Le développement précoce de l'oursin se présente ainsi comme un modèle privilégié pour approfondir la connaissance de ces mécanismes. En particulier, l'embryon d'oursin est un excellent modèle pour l'étude des relations entre traduction et cycle cellulaire.

C - Conclusions sur le modèle

En conclusion le modèle du développement précoce de l'oursin présente plusieurs atouts :

Les gamètes sont accessibles tout au long de l'année et ceci en grande quantité. En laboratoire, la ponte est induite par injection intrapéristomale de chlorure de potassium ou d'acétylcholine ou par choc électrique (Hinegardner, 1969; Giudice, 1973). La fécondation est réalisable dans des conditions de laboratoire. Elle est facilement observable au microscope grâce à la levée d'une enveloppe de fécondation (Epel, 1977; Epel, 1978). Le développement rapide (stade larvaire pluteus atteint en 3 jours) peut se dérouler en laboratoire dans un milieu salin sans apport de nutriments ni de facteurs de croissance. Les embryons sont obtenus en grande quantité, ce qui permet de réaliser des études biochimiques à partir des embryons en culture ou à partir d'extraits acellulaires .

Il faut également noter que la taille (100 μm de diamètre) et la transparence des oeufs permet une observation microscopique aisée du développement dont les différentes étapes ont été largement décrites au niveau morphologique. De plus, la taille des oeufs rend possible des expériences de microinjections.

Enfin, et ce sont les atouts majeurs du modèle, les cellules aux premiers stades embryonnaires sont naturellement synchrones, et la régulation de la synthèse protéique est indépendante de la transcription (*cf* paragraphe II-B, page 84). De plus, la place occupée à l'échelle de l'évolution par les échinodermes et donc l'oursin fait de ce dernier un modèle simple où les acteurs (du gène à la protéine) et les voies biochimiques sont conservés par rapport à l'homme. Ces différents acteurs sont

dorénavant faciles d'accès grâce à l'obtention récente du génome complet de l'oursin *S. purpuratus* (Weinstock *et al.*, 2006).

La thèse présentée ici concerne l'étude du facteur d'élongation de la traduction, eEF1B, sa structure macromoléculaire et sa relation avec le cycle cellulaire. Nos résultats concernent notamment la structure du complexe eEF1B avec la mise en évidence de différentes sous-populations co-exprimées dans la cellule. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence un changement de localisation de ces complexes dépendant du cycle cellulaire. Des analyses de séquences nous permettent de suggérer que le complexe est une cible universelle de la kinase CDK1/Cycline B. Ces résultats montrent l'importance des régulations du complexe eEF1B et plus généralement de l'élongation au cours du cycle cellulaire. Ils sont détaillés ci-dessous.

Résultats

RESULTATS

Nos résultats ont fait l'objet de la publication de trois articles. Voici ce qu'ils apportent de nouveau sur le complexe eEF1B.

Article 1:

Le Sourd, F., Cormier, P., Bach, S., Boulben, S., Bellé, R., and Mulner-Lorillon, O. (2006b). Cellular coexistence of two high molecular subsets of eEF1B complex. *FEBS Lett* **580**, 2755-60.

Les résultats exposés dans cet article apportent de nouvelles évidences quant à la complexité structurale du complexe eEF1B exprimé dans la cellule. Nous montrons ici que la protéine eEF1B δ , est présente sous deux isoformes dans la cellule, ce qui conduit à l'existence de deux populations différentes du complexe eEF1B. Nous mettons également en évidence des changements de localisations cellulaires du complexe eEF1B corrélés avec les différentes phases du cycle cellulaire.

Article 2:

Le Sourd, F., Bellé, R., Cormier, P, and Mulner-Lorillon, O. (2006c). Molecular cloning of sea urchin eEF1B α and eEF1B γ puts forward the universal presence of a CDK phosphorylation site on one or the other eEF1B components. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, *Accepted*

Nous renforçons dans cet article l'hypothèse d'une relation étroite entre le complexe eEF1B et le cycle cellulaire. En effet, nous montrons la conservation d'un motif potentiel de phosphorylation sur eEF1B par CDK1/Cycline B, soit sur eEF1B α , soit sur eEF1B γ . Nous proposons que l'universalité de la phosphorylation du complexe eEF1B par CDK1/Cycline B implique une fonction conservée en rapport avec le cycle cellulaire. D'un point de vue structural, nous apportons également des

précisions quant aux domaines impliqués dans l'interaction entre les protéines eEF1B γ et eEF1B δ .

Article 3:

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

Cet article fait un bilan structural et fonctionnel du complexe eEF1B au cours de l'évolution. Nous proposons qu'au-delà du rôle classique d'échange de nucléotides, le complexe eEF1B joue un rôle régulateur important au cours du cycle cellulaire et de ses dysfonctionnements en exerçant un contrôle sur l'élongation ou tout autre *processus* cellulaire majeur.

Article 1

I - Mise en évidence de l'expression simultanée de diverses populations du complexe eEF1B dans la cellule

Article 1 :

Le Sourd, F., Cormier, P., Bach, S., Boulben, S., Bellé, R., and Mulner-Lorillon, O. (2006b). Cellular coexistence of two high molecular subsets of eEF1B complex. *FEBS Lett* **580**, 2755-60.

La protéine eEF1B δ se présente comme un acteur régulateur majeur par sa structure et ses sites multiples de phosphorylation. Pourtant sa fonction spécifique au sein du complexe reste inconnue. Pour tenter d'élucider la fonction de eEF1B δ , nous avons recherché ses partenaires par criblage en double hybride d'une banque d'oursin. Nous avons ainsi obtenu 40 clones positifs qui codaient tous pour la protéine eEF1B γ , confirmant l'appartenance des deux protéines au complexe eEF1B, par une interaction directe.

Nous rapportons le clonage et la caractérisation d'une nouvelle isoforme de la sous-unité eEF1B δ chez l'oursin. Celle-ci, nommée eEF1B δ 2 est 100% identique à eEF1B δ 1 à l'exception d'un insert de 26 acides aminés dans sa région N-terminale. Nous démontrons que ces deux isoformes résultent de l'épissage différentiel d'un ARN pré-messager unique et qu'elles sont co-exprimées dans la cellule. Nous rapportons que cette caractéristique n'est pas spécifique de l'oursin mais est conservée chez de nombreuses espèces métazoaires.

Nous avons étudié le profil des partenaires respectifs des deux isoformes au sein d'une cellule par des expériences d'immunoprécipitations. Nous avons mis ainsi en évidence que les deux isoformes étaient associées avec les protéines eEF1B α et eEF1B γ au sein de deux sous-populations différentes du complexe eEF1B.

Nous proposons un modèle structural du complexe eEF1B, où l'une des sous-populations comprend les deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 et représente 60% de la population totale d'eEF1B, et l'autre ne comporte que la protéine eEF1B δ 1 sous forme dimérique et représente les 40% restants de la population totale d'eEF1B. Des expériences d'immunolocalisation montrent que les deux sous-populations de complexe présentent des changements comparables de localisation au cours du cycle cellulaire.

Ces résultats, originaux par la mise en évidence de deux isoformes de la protéine eEF1B δ différemment réparties au sein de diverses sous-populations du complexe eEF1B, mettent en lumière la complexité structurale de ce facteur. D'autre part, la conservation fort probable de cette caractéristique parmi les métazoaires suppose des fonctions spécifiques et importantes pour chacune des différentes sous-population d'eEF1B, et ceci en rapport ou non avec l'élongation de la traduction.

Cellular coexistence of two high molecular subsets of eEF1B complex

Frédéric Le Sourd^a, Patrick Cormier^a, Stéphane Bach^b, Sandrine Boulben^a,
Robert Belle^{a,*}, Odile Mulner-Lorillon^a

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

^b *Molécules et Cibles Thérapeutiques, Unité Propre de Service, UPS 2682, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, Cedex, France*

Received 28 February 2006; revised 5 April 2006; accepted 12 April 2006

Available online 24 April 2006

Edited by Gianni Cesareni

Abstract The elongation factor eEF1B involved in protein translation was found to contain two isoforms of the eEF1B δ subunit in sea urchin eggs. The eEF1B δ 2 isoform differs from eEF1B δ 1 by a specific insert of 26 amino acids. Both isoforms are co-expressed in the cell and likely originate from a unique gene. The feature appears universal in metazoans as judged from in silico analysis in EST-databanks. The eEF1B components were co-immunoprecipitated by specific eEF1B δ 2 antibodies. Quantification of the proteins in immunoprecipitates and on immunoblots demonstrates that eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 proteins are present in two subsets of eEF1B complex. We discuss and propose a model for the different subsets of eEF1B complex concomitantly present in the cell.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Protein translation; Elongation factor; eEF1B; Sea urchin egg

1. Introduction

The first step of peptide chain elongation during eukaryotic translation is catalyzed by eEF1A, a G-protein responsible for delivering aminoacyl-tRNA to the ribosome on the A-site. The guanine nucleotide exchange activity upon eEF1A is supported by a macromolecular complex, eEF1B, which consists in an assembly of several subunits, the specific function of each being not fully elucidated (reviews in [1,2]). The canonical guanine nucleotide exchange subunit, eEF1B α , was early demonstrated to be tightly associated to a protein named eEF1B γ in the eEF1B complex of all eukaryotes from yeast to mammals review in [2]. The protein eEF1B γ is usually considered as a structural subunit playing a role in the cellular localization of eEF1B. Noteworthy, eEF1B γ has been the first identified physiological substrate [3] for CDK1, the kinase controlling entry into M-phase during the cell cycle (reviews in [4–6]). Surprisingly, it was found that, in addition to eEF1B α , a second nucleotide exchange protein is present in the eEF1B complex of metazoans and plants (review in [1]). Strikingly, the supplementary exchange subunits of plants (eEF1B β) or of metazoans

(eEF1B δ), although they have guanine nucleotide exchange activity in their C-terminal domain, are not capable to functionally complement eEF1B α deficient yeasts [7,8]. The most exciting feature came from the studies on metazoan eEF1B δ . (i) The N-terminal domain of eEF1B δ , which has no homology with any proteins present in the databanks, possesses a leucine zipper motif, a conserved secondary structure related to a protein–protein interaction [9]. (ii) The eEF1B δ protein from vertebrates is a physiological substrate for CDK1 (reviews in [1,10]). Although physiological relevant function for this phosphorylation is not documented, a clue came from the finding that, in herpes virus infected cells, the eEF1B δ protein is phosphorylated on the CDK1 site by the viral kinase in relation to the host protein synthesis shut-off and the viral mRNA preferential translation (review in [1]). (iii) The eEF1B δ protein is responsible for the association of the valyl-tRNA synthetase in the eEF1B complex [11]. The presence of valyl-tRNA synthetase has been correlated to an inhibition of the valine encoding codon translation when the eEF1B complex was phosphorylated by CDK1 [12]. (iv) Finally, eEF1B δ was reported to be a true oncogene in mammalian cells [13].

Considering the high structural complexity of eEF1B and the multiple potential regulation sites existing in the different subunits, eEF1B may have additional physiological roles besides the housekeeping nucleotide exchange function on eEF1A (review in [1]). Using the sea urchin embryo we have characterized a new isoform of eEF1B δ , eEF1B δ 2 that coexists in the cell with eEF1B δ 1, increasing the known sophisticated physiological structure of the eEF1B complex. We demonstrate the concomitant presence of two subsets of eEF1B complex that differ in their eEF1B δ composition. This feature, discovered in sea urchin may be universal among metazoans.

2. Materials and methods

2.1. Handling of animals and gametes

Sphaerechinus granularis sea urchins were collected in the Brest area (west Brittany). Animals and gametes were prepared and handled as already described [14].

2.2. Cloning of sea urchin eEF1B δ 2 and eEF1B γ

Full length *S. granularis* EF1B δ 2 (SgEF1B δ 2) was cloned by RT-PCR from total RNA prepared from unfertilized eggs. The primers used for amplification, forward primer 5'CCGGAATTCATGGCA-CACCCACTGATGC3' and reverse primer 5'CGCGGATCCC-GGGAGGGTTGATGGGG3', were designed from, respectively, the N-ter and the C-ter coding sequences of the already characterized

*Corresponding author. Fax: +33 2 98 29 23 06.
E-mail address: belle@sb-roscoff.fr (R. Belle).

cDNA of *S. granularis* EF1B δ (SgEF1B δ ; EMBL No. Y14235) [15]. The PCR products were visualized by electrophoresis on 1% agarose/TBE gel. Two distinct bands were resolved around 800 and 880 bp. The upper band was excised from the gel, purified on Genelute column (Sigma), cloned in pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced on both strands at the Genomer sequencing platform (Roscoff).

2.3. Cytoplasmic egg extracts

Egg extracts were prepared [14] from batches of packed unfertilized eggs (10–20 ml) homogenized in 2 vol of buffer containing 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 75 mM KCl, 50 mM sodium fluoride, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 10 mM ATP, 5 mM paranitrophenylphosphate, 100 μ M orthovanadate, 0.3 mM Na-benzoyl-L-arginine methyl ester (BAME), 1 mM benzamidine, 5 μ M soybean trypsin inhibitor, 0.3 mM *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzene sulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF), in the presence of 100 mM NaCl. Homogenates were clarified by centrifugation (4000 \times g for 20 min). The cytoplasmic extracts were obtained by further centrifugation at 100000 \times g for 1 h. All steps were carefully carried out at 4 °C.

2.4. Antibodies generation

Guinea pig polyclonal antibodies against recombinant GST-SgEF1B δ (anti-eEF1B δ _{TOT}) were obtained and used as already described [14]. Polyclonal specific antibodies against SgEF1B δ 2 were obtained in guinea pig by the DoubleXP immunization protocol (Eurogentec) using the co-injection of two synthetic peptides designed from the 26 aminoacids insert specific sequence of SgEF1B δ 2 (H₂N-CVQKSDGPASNLVSE-CONH₂ and H₂N-EIARARQNIQSSLSC-CONH₂). Antibodies against sea urchin eEF1B γ were generated from the protein sequence determined from *Strongylocentrotus purpuratus* cDNA sequence obtained by two-hybrid (EMBL AJ973179). Two peptides designed from the coding sequence of *S. purpuratus* EF1B γ (H₂N-KVPAFENGSGDTLFEES-CONH₂ and H₂N-SNEQLRGTDL-LSKAQC-CONH₂) were synthesized and used to raise polyclonal antibodies in both guinea pig and rabbit by DoubleXP immunization protocol as above (Eurogentec). Two eEF1B γ antibodies were obtained, a guinea pig serum and an affinity purified rabbit serum. Both antibodies were efficient for SgEF1B γ recognition (data not shown).

2.5. Western blot analysis

Proteins from the cytoplasmic extracts were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred onto 0.22 μ m nitrocellulose membranes as already described [14]. After Ponceau Red staining of the proteins, membranes were saturated for 1 h in Tris buffer saline (TBS) containing 1% bovine serum albumin and 0.1% Tween and probed with the indicated antibodies diluted 1:4000. After 2 h of incubation at room temperature and washing, the bound antibodies were revealed by chemiluminescence (ECL; Pharmacia Biotech) using HRP-conjugated secondary antibodies (Dako) diluted 1:5000 in TBS/BSA/Tween.

2.6. Immunoprecipitation experiments

Immunoprecipitations were performed in 1 ml with the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ _{TOT}) recognizing both eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 proteins at a dilution of 1:200 and with the specific eEF1B δ 2 antibodies (anti-eEF1B δ 2) at a dilution of 1:1000 in buffer containing 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 1% IGEPAL (Sigma), 1% BSA, 50 mM sodium fluoride, 10 mM pyrophosphate, 100 μ M orthovanadate, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzene sulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF) for at least 2 h at 4 °C. The immune complex was recovered after 1 h incubation with 1% BSA-saturated Protein A-Sepharose CL-4B beads (Sigma). The bound proteins were washed three times in BSA free buffer and twice in 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl. Proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by silver staining (Amersham Biosciences kit) or by immunodetection as described above.

2.7. Protein quantification by densitometry

Proteins revealed by silver nitrate staining or ECL detection were quantified after digitization of the gels or the films, using the ImajeJ 1.34s program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Results are expressed as mean of *n* experiments with standard deviation (S.D.).

2.8. Immunofluorescence experiments

Eggs and embryos were first extracted with buffer containing 10 mM EGTA, 25 mM MES, 0.55 mM MgCl₂, 1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzene sulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF), 1% IGEPAL (Sigma), 25% glycerol, pH 6.8, for 1 h at 4 °C and subsequently fixed in cold 90% methanol, 50 mM EGTA overnight at –20 °C as described [14]. After rehydration in PBS containing 0.05% Tween and saturation for 1 h in the presence of 1% BSA, cells were incubated, at room temperature, for 2 h with primary antibodies, followed by incubation for 1 h with fluorescent secondary antibodies. After washing, cells were mounted in Citifluor AF3 (Citifluor Ltd., London) and observed under a fluorescence microscope (Olympus BX61) using a 40 \times objective (UplanApo, numerical aperture 1.0, Olympus). Pictures were taken using a room temperature monochrome CCD camera (Diagnostic Instrument Inc.). Primary antibodies were used at a 1:100 dilution. FITC-linked secondary antibodies were diluted 1:100. When required, DNA staining was performed by addition of the dye bis-benzimide (1 μ g/ml) during the last rinse after secondary antibodies incubation [14].

3. Results

3.1. Characterization of eEF1B δ 2 a new isoform of eEF1B δ subunit

We have cloned and sequenced the full length of a sea urchin cDNA, referred as EMBL AJ973181, encoding for a protein identified to eEF1B δ by sequence homology, including presence of a leucine zipper motif characteristic of the δ subunit of eEF1B complex [16]. The new form of eEF1B δ identified here was compared to a previous form obtained by screening a cDNA sea urchin library [15] (EMBL Y14235). The new form contains an insert of 78 bp encoding for a 26 amino acid sequence while the 5' and 3' regions flanking the insert were 100% identical to the sequence previously reported. The corresponding two mRNAs therefore encode for two proteins that differ in 2 kDa in their molecular weights. We name eEF1B δ 1 the mRNA and the protein encoded by the shortest sequence and eEF1B δ 2 the mRNA and the protein encoded by the longest mRNA. The two proteins correspond to the doublet detected by Western blotting and arbitrary named eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 according to their molecular weights [14]. Additionally, the identification and nomenclature of the two proteins, match with the peptides found by microsequencing of the 35 and 37 kDa proteins and with the partial mRNAs previously obtained by RT-PCR [14]. The sequence identity of the two mRNAs encoding for eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 suggests that the two eEF1B δ isoforms originate from alternative splicing of a unique pre-mRNA. A complete genome of the sea urchin *S. purpuratus* [17] is available at the National Human Genome Research Institute of Baylor College of Medicine-Houston, USA. The sequence from *S. purpuratus* shared 81.5% identity with the cognate sequence from *S. granularis* at the nucleotides level and 80.3% identity at the protein level. The analysis in silico of the sea urchin genome, using the Human Genome Sequencing resources (Baylor College of Medicine-Houston, USA), showed existence of a unique gene encoding for eEF1B δ and containing the 78 bp insert specific for eEF1B δ 2 as a predicted full exon. Furthermore, two EST-sequences were found in *S. purpuratus* corresponding to each of the two mRNAs produced by alternative splicing. The sequence analysis in the complete genome thus supports that the two eEF1B δ isoforms originate from alternative splicing of a unique pre-mRNA.

To determine whether existence of two eEF1B δ isoforms, one of them containing the insert, was restricted to the sea urchin, we performed in silico searches using NCBI resources. In several metazoan organisms both forms of mRNAs were found. This was the case in hydra (Genbank CD680373 and CF780242), fishes (Takifugu; Genbank CA844665 and AL842751), amphibians (Xenopus; EMBL X66837 and Genbank BG017641), arthropods (Drosophila; RefSeq NP_723536 and NP_609361) and mammals (Mouse; dbj BAB

30841 and RefSeq NP_075729), strongly suggesting universality of the feature. Furthermore, accurate analysis in the human genome showed existence of a unique gene eEF1B δ (named EEF1D) encoding for two pairs of mRNAs, as judged from EST search, with in each pair, one corresponding to the insert-containing form (RefSeq NM_001960 and NM_032378), and one corresponding to the insert-free form (Genbank BC094806 and BC000678). Therefore, existence of the two isoforms of eEF1B δ , an insert-containing form and an insert-free form that originate from a unique gene appears to be a metazoan universal feature.

We have produced antibodies specific for eEF1B δ 2, using synthetic peptides matching the 26 amino acid insert of the *S. granularis* sequence and analyzed the proteins of cytoplasmic egg extracts by immunoblotting (Fig. 1). Comparable amounts of proteins were loaded on the immunoblots as judged by Ponceau red staining (Fig. 1 left). While a 35/37 kDa doublet was visualized with the polyclonal eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ _{TOT}; Fig. 1 right; lane 1) as previously shown [14], the eEF1B δ 2 antibodies recognized specifically the band at 37 kDa (Fig. 1 right; lane 2). When the eEF1B δ 2 antibodies were incubated with an excess of eEF1B δ 2-related peptide, the 37 kDa signal was totally abolished whereas an unrelated peptide had no effect (Fig. 1 right; lanes 3 and 4). Therefore, the eEF1B δ 2 antibodies appear to be highly specific for the eEF1B δ 2 protein allowing its analysis in the cells that contain both eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 proteins.

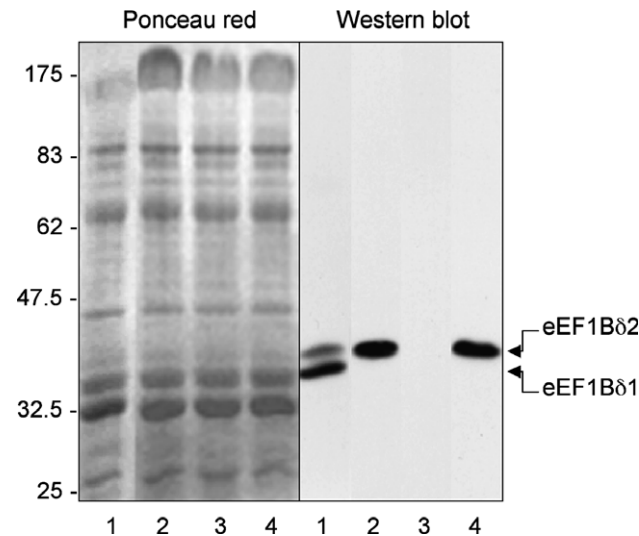


Fig. 1. Characterization of eEF1B δ 2 subunit in sea urchin eEF1B complex. Proteins (10 μ g per lane) from cytoplasmic egg extracts were resolved on a 12% polyacrylamide gel and transferred onto a membrane for immunorevelation. Left panel, Ponceau Red staining of the membrane; Right panel, immunorevelation with (1) eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ _{TOT}), (2) eEF1B δ 2 specific antibodies, (3) eEF1B δ 2 specific antibodies pre-incubated with 1 μ g of *S. granularis* eEF1B δ 2 derived-peptide (H₂N-CVQKSDGPASNLVSE-CONH₂), (4) eEF1B δ 2 specific antibodies pre-incubated with 1 μ g unrelated-peptide (H₂N-SNEQLRGTTDDLSKAQC-CONH₂). The positions of the molecular-weight markers run in parallel are indicated in kDa.

3.2. The eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 proteins are present in two eEF1B complex subsets

Extracts were prepared from sea urchin unfertilized eggs. The extracts were immunoprecipitated (Fig. 2A) with the specific eEF1B δ 2 antibodies (anti-eEF1B δ 2; Fig. 2A; lane 1) or with the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ _{TOT}) recognizing both eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 proteins (Fig. 2A; lane 3). In both cases, several proteins were detected using silver staining of the gels (Fig. 2A). As judged from immunoprecipitation experiments performed without egg extracts, the bands resolved at 48, 31 and 28 kDa corresponded to heavy and light chains of immunoglobins and the band at 60 kDa corresponded to

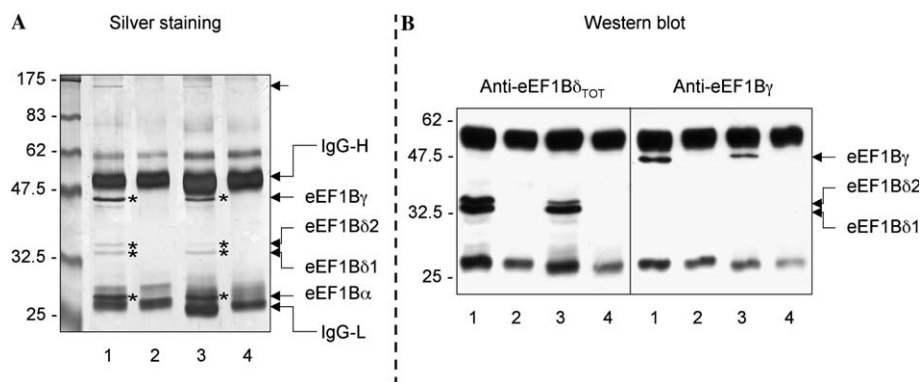


Fig. 2. Characterization of two subsets of eEF1B complex. Proteins (1 mg) from cytoplasmic egg extracts were immunoprecipitated and resolved on a 12% polyacrylamide gel. Figure A corresponds to silver nitrate stained gel and B to Western blots using eEF1B δ antibodies (B; left panel: anti-SgEF1B δ _{TOT} or eEF1B γ antibodies (B; right panel: anti-eEF1B γ). In A and B: (1) immunoprecipitate using eEF1B δ 2 specific antibodies (anti-eEF1B δ 2; 1:1000), (3) eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ _{TOT}; 1:200), (2, 4) control immunoprecipitations performed with the respective antibodies in the absence of egg extracts. The position of eEF-1B α , eEF-1B δ 1, eEF-1B δ 2 and eEF-1B γ are arrowed and indicated by stars on the gel. The heavy and light chains of the IgG used for immunoprecipitation are indicated with arrows on the right of the panel. The positions of molecular-weight markers run in parallel are indicated in kDa.

bovine serum albumin (Fig. 2A; lanes 2 and 4). When the egg extracts were immunoprecipitated using the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), five bands were consistently and specifically detected at 150, 47, 37, 35 and 30 kDa (Fig. 2A; lanes 3). The 47 kDa protein corresponds to eEF1B γ component, the 37 and 35 kDa doublet corresponds to the two eEF1B δ components and the 30 kDa band to eEF1B α subunit (formerly named eEF1 β) as previously reported [14]. The 150 kDa protein was not identified although it may correspond to the valyl-tRNA synthetase (review in [1,10]).

When the egg extracts were immunoprecipitated using the specific eEF1B δ 2 antibodies (anti-eEF1B δ 2), again, five bands were consistently observed at 150, 47, 37, 35 and 30 kDa (Fig. 2A; lane 1). The bands immunoprecipitated by the specific eEF1B δ 2 antibodies at 47, 37 and 35 were further identified by immunoblot analysis using the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}) or using antibodies generated (see Section 2) against the eEF1B γ protein (anti-eEF1B γ). The immunoblot using eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}) revealed the presence of the two eEF1B δ isoforms at 37 and 35 kDa in the immunoprecipitate obtained using the specific eEF1B δ 2 antibodies (Fig. 2B left panel; lane 1) comparable to the immunoblot of the precipitate obtained using the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT} ; Fig. 2B left panel; lane 3). The anti-eEF1B γ antibodies revealed the presence of the eEF1B γ component in both immunoprecipitates obtained using the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT} ; Fig. 2B right; lane 3) or using the specific eEF1B δ 2 antibodies (anti-eEF1B δ 2; Fig. 2B right panel; lane 1). Therefore, the 47 kDa component corresponds in both cases to eEF1B γ while the 35 and 37 kDa proteins correspond to the two eEF1B δ isoforms. We assume that the 30 kDa protein corresponds to eEF1B α which is always associated to eEF1B γ (reviews in [1,10]). Altogether, the specific eEF1B δ 2 antibodies co-precipitate all the components of eEF1B including eEF1B δ 1. Since the specific eEF1B δ 2 antibodies do not directly recognize eEF1B δ 1, its presence in the immunoprecipitate demonstrates that a subset of eEF1B complex contains both the eEF1B δ 1 and the eEF1B δ 2 components.

Immunoprecipitation experiments were performed using batches of embryos from different females. For each of the antibodies used, the eEF1B constituents were reproducibly observed in the same proportions. For note, while the eEF1B δ 2 antibodies were highly specific for eEF1B δ 2, the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}) were obtained from the recombinant eEF1B δ -GST protein devoid of the 26 amino acid insert [14], therefore they may recognize each of the two eEF1B δ isoforms with the same efficiency with respect to their identical primary sequence. Using the two types of antibodies, an interesting observation was consistently made. While the ratios between eEF1B α and eEF1B γ were comparable (0.47 and 0.43), the respective proportions of eEF1B δ 2 and eEF1B δ 1 were different according to the antibodies used for immunoprecipitation (compare in Fig. 2A; lanes 1 and 3 and compare in Fig. 2B left panel; lanes 1 and 3) suggesting that the pool of eEF1B in the cell is heterogeneous regarding eEF1B δ composition. This point was addressed by accurate quantification of eEF1B γ , eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 in the eEF1B complex depending on the antibodies used for immunoprecipitation. When egg extracts were immunoprecipitated using the specific eEF1B δ 2 antibodies, quantification of the silver stained gel showed that eEF1B δ 1 represented 49% and eEF1B δ 2 51% (S.D. = 7; n = 6) of the total amount of eEF1B δ . Thus embryos contain a subset

of cellular eEF1B that contains equal amounts of eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2. The ratio of eEF1B δ 2 versus eEF1B γ co-immunoprecipitated by the eEF1B δ 2 specific antibody was calculated to be 0.09 (S.D. = 0.02, n = 4). When the egg extracts were immunoprecipitated using eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), the ratio of eEF1B δ 2 versus eEF1B γ was calculated to be 0.05 (S.D. = 0.03; n = 3). Thus, for an identical amount of eEF1B δ 2 immunoprecipitated, a higher amount of eEF1B γ is co-immunoprecipitated by the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), implicating that this extra proportion of eEF1B γ originates from a subset of eEF1B complex containing solely eEF1B δ 1 component. We conclude that two subsets of eEF1B complex coexists in the embryos, one containing the couple eEF1B δ 1–eEF1B δ 2 and the other containing solely eEF1B δ 1. To evaluate the potential presence of free eEF1B δ 1 in the cell that could have been immunoprecipitated by the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), we have evaluated the ratio of total eEF1B δ components versus eEF1B γ according to the antibody used for immunoprecipitation. The ratio was comparable in both cases, respectively, 0.21 and 0.22, thus discarding the eventuality of free eEF1B δ 1 excess in the cells, which is in agreement with previous findings (reviews in [1,10]).

When using eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), the proteins eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 in the immunoprecipitates represented, respectively, 71% and 29% (S.D. = 5; n = 4) of total eEF1B δ . We further estimated the proportion of the two isoforms of eEF1B δ in the whole cellular extracts, reflecting the whole pool of eEF1B δ protein, by quantification of the Western blots. The proportion obtained was 69% and 31% for, respectively, eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 (S.D. = 8; n = 10) highly compatible with the proportions calculated from the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}) immunoprecipitation experiments.

In conclusion, the comparison between the different complexes obtained by immunoprecipitation using either the specific eEF1B δ 2 antibodies or the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}) demonstrated that several subsets of eEF1B complex coexist in the cells. The results demonstrate the existence of at least one subset of cellular eEF1B containing eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 in a 1:1 stoichiometry and existence of a complex containing only the eEF1B δ 1 isoform. They allow to propose a model for the different structural subsets of the factor eEF1B (see Section 4).

3.3. Early developmental changes in eEF1B components

We investigated developmental changes in eEF1B δ . The expression of each isoforms remained constant from fertilization up to the pluteus stage (80 h after fertilization) as judged from Western blot analysis of embryo extracts (data not shown). We then investigated intracellular localization changes during the first cell cycle. Since it was shown that using eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), a subset of the eEF1B complex was subjected to cell cycle-directed localization changes [14], it was of interest to investigate potential specific changes of the eEF1B complex subset containing the eEF1B δ 2 component. The results showed highly comparable relocalization of the subsets of eEF1B complex during cell cycle (Fig. 3). The localization of the component eEF1B γ of eEF1B was also analyzed, taking advantage of the generation of specific eEF1B γ antibodies. The same cell-cycle-directed relocalization of eEF1B γ was observed (Fig. 3). Therefore, all the subsets of eEF1B detected in our experiments undergo comparable cell-cycle directed localization changes.

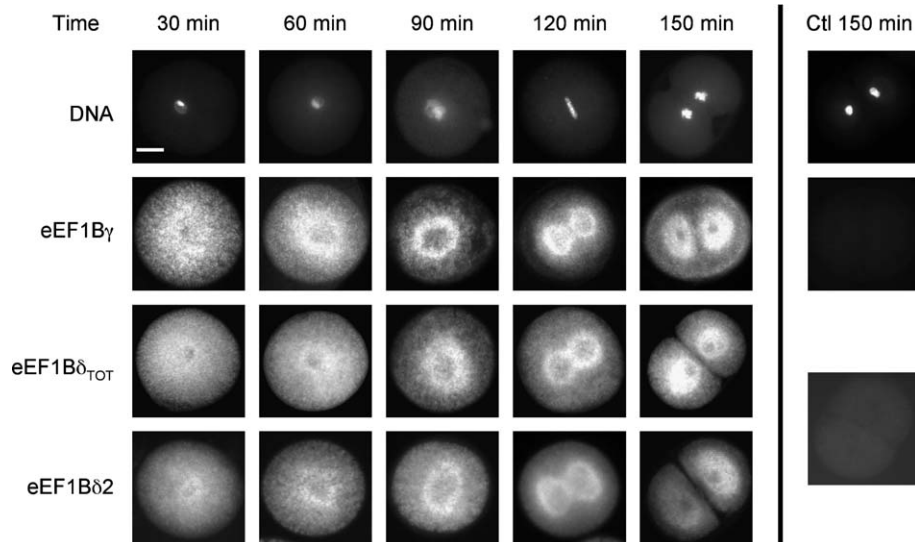


Fig. 3. Localization by fluorescence microscopy of the eEF1B subunits during sea urchin embryo first cell cycle. Progression through cell division was followed by DNA staining with the dye bis-benzimide (DNA). Embryos were sampled at the indicated times after fertilization and treated for immunostaining as indicated in Section 2. The subunit eEF1B γ was detected using eEF1B γ antibodies (eEF1B γ), total eEF1B δ was detected using eEF1B δ antibodies (eEF1B δ_{TOT}), eEF1B δ 2 was detected using the specific eEF1B δ 2 antibodies (eEF1B δ 2). The right column corresponds to control staining using secondary antibodies alone (Ctl 150 min). Each photography is representative of the pool of embryos. Bar: 30 μ m.

4. Discussion

Our results demonstrate the existence of different subsets of the guanine nucleotide exchange factor (eEF1B) known to be involved in the elongation step of protein synthesis (see Section 1). We have identified two isoforms for the eEF1B δ subunit of eEF1B. The two isoforms eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 originate from a single gene by alternative splicing of a unique pre-mRNA and are concomitantly expressed in the cells. Immunodetection analyses show that eEF1B is present in the cell under several subsets differing in their eEF1B δ isoform proportion.

A model (Fig. 4) may be proposed to match our observations and estimations of the relative amounts of eEF1B δ 1 and eEF1B δ 2 in immunoprecipitation or immunoblotting experiments. The results indicate the coexistence of a subset of complex (Fig. 4, subset 1) containing the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 2] in a 1:1 stoichiometry together with a subset of complex (Fig. 4, subset 2) containing the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 1]. We have estimated the relative amounts of each eEF1B subset. When using the eEF1B δ antibodies (anti-eEF1B δ_{TOT}), the first subset of complex containing the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 2] is immunoprecipitated in addition to the subset of complex devoid of eEF1B δ 2 and containing the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 1]. The protein eEF1B δ 1 represents 70% of total eEF1B δ and eEF1B δ 2 represents 30% of total eEF1B δ . Since all eEF1B δ 2 is engaged in the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 2], 70 – 30 = 40% of eEF1B contains the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 1], and consequently 60% of eEF1B contains the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 2] (Fig. 4).

The complex eEF1B is assumed to be composed of a basic heteromer consisting in the association of four subunits, valyl-tRNA synthetase (ValRS), eEF1B δ , eEF1B γ and eEF1B α [ValRS–eEF1B δ –eEF1B γ –eEF1B α] in a 1:1:1:1 stoichiometry [10,11,18] or 1:1:2:1 stoichiometry [19]. Our results demonstrate the cellular existence of a macromolecular dimeric assemblage [ValRS–eEF1B δ 1–eEF1B γ –eEF1B α]–[ValRS–

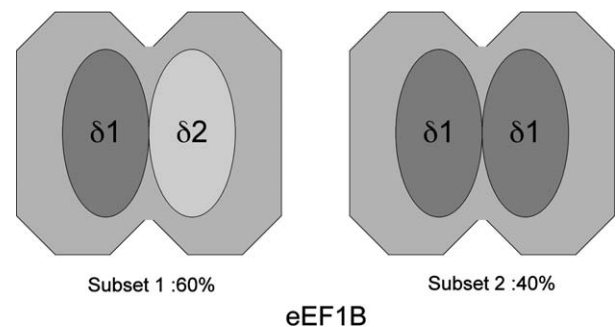


Fig. 4. Schematic model for the composition and the proportion of the eEF1B subsets. Subset 1 contains the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 2] in a 1:1 stoichiometry. Subset 2 contains the couple [eEF1B δ 1–eEF1B δ 1] in a 1:1 stoichiometry. The grey polygons correspond to the grouped associated eEF1B subunits (eEF1B δ , eEF1B γ and Valyl-tRNA synthetase). The proportion of each eEF1B subset in the same cell is indicated.

eEF1B δ 2–eEF1B γ –eEF1B α] and suggest by analogy the existence of a [ValRS–eEF1B δ 1–eEF1B γ –eEF1B α] dimer. This is in accordance with the models proposing dimerization of the heteromer [ValRS–eEF1B δ –eEF1B γ –eEF1B α] [11,19–21]. Our results do not rule out existence of a [eEF1B γ –eEF1B α] multimer as proposed [10] and which would not have been revealed in the present analysis.

The existence of the two isoforms of the protein eEF1B δ first demonstrated here in sea urchin eggs, questions the respective roles for the proteins concomitantly expressed in the same cells and present under different subsets of eEF1B complex in vivo. The feature discovered in sea urchin is conserved in several if not all metazoan species including human and must then be of general significance among evolution. This further suggests an important specific function for each subset of complex related or not to protein synthesis elongation.

Acknowledgements: This work was supported by Conseil Régional de Bretagne, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and Ligue Nationale contre le Cancer. F.L.S. is doctoral research fellow financed by the Ligue Nationale contre le Cancer, Comité des Côtes d'Armor.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.febslet.2006.04.038](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.038).

References

- [1] Le Sourd, F., Boulben, S., Le Bouffant, R., Cormier, P., Morales, J., Belle, R. and Mulner-lorillon, O. (2006) eEF1B: at the dawn of the XXIst century. *Biochim. Biochim. Acta.*
- [2] Merrick, W.C. and Nyborg, J. (2000) The protein biosynthesis elongation cycle in: *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. and Mathews, M., Eds.), pp. 89–125, CSHL Press, New York.
- [3] 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.
- [4] Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 21–32.
- [5] O'Farrell, P.H. (2001) Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol.* 11, 512–519.
- [6] Doree, M. and Hunt, T. (2002) From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell. Sci.* 115, 2461–2464.
- [7] Pomerening, J.R., Valente, L., Kinzy, T.G. and Jacobs, T.W. (2003) Mutation of a conserved CDK site converts a metazoan elongation factor 1Bbeta subunit into a replacement for yeast eEF1Balpha. *Mol. Genet. Genom.* 269, 776–788.
- [8] Carr-Schmid, A., Valente, L., Loik, V.I., Williams, T., Starita, L.M. and Kinzy, T.G. (1999) Mutations in elongation factor 1 beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5257–5266.
- [9] Morales, J., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R. and Belle, R. (1992) Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1delta. *Nucleic Acids Res.* 20, 4091.
- [10] Minella, O., Mulner-lorillon, O., Bec, G., Cormier, P. and Belle, R. (1998) Multiple phosphorylation sites and quaternary organization of guanine-nucleotide exchange complex of elongation factor-1 (EF-1bgd/ValRS) control the various functions of EF-1a. *Biosci. Rep.* 18, 119–127.
- [11] Bec, G., Kerjan, P. and Waller, J.P. (1994) Reconstitution invitro of the valyl-transfer RNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex – essential roles of the NH₂-terminal extension of valyl-transfer RNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation. *J. Biol. Chem.* 269, 2086–2092.
- [12] Monnier, A., Belle, R., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S. and Mulner-Lorillon, O. (2001) Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 1453–1457.
- [13] Joseph, P., Lei, Y.X. and Ong, T.M. (2004) Up-regulation of expression of translation factors – a novel molecular mechanism for cadmium carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 255, 93–101.
- [14] Boulben, S., Monnier, A., Le Breton, M., Morales, J., Cormier, P., Belle, R. and Mulner-Lorillon, O. (2003) Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2178–2188.
- [15] Delalande, C., Monnier, A., Minella, O., Geneviere, A.M., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. and Cormier, P. (1998) Developmental regulation of elongation factor-1 delta in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae. *Exp. Cell. Res.* 242, 228–234.
- [16] Guerrucci, M.A., Monnier, A., Delalande, C. and Belle, R. (1999) The elongation factor-1delta (EF-1delta) originates from gene duplication of an EF-1beta ancestor and fusion with a protein-binding domain. *Gene* 233, 83–87.
- [17] Cameron, R.A. et al. (2000) A sea urchin genome project: sequence scan, virtual map, and additional resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9514–9518.
- [18] Janssen, G.M.C., Van Damme, H.T.F., Kriek, J., Amons, R. and Moller, W. (1994) The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia* – why two alpha-chains in this complex? *J. Biol. Chem.* 269, 31410–31417.
- [19] Sheu, G.T. and Traugh, J.A. (1999) A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII. *Mol. Cell. Biochem.* 191, 181–186.
- [20] Jeppesen, M.G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T.G., Nyborg, J. and Andersen, G.R. (2003) The crystal structure of the glutathione *S*-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 47190–47198.
- [21] Jiang, S., Wolfe, C.L., Warrington, J.A. and Norcum, M.T. (2005) Three-dimensional reconstruction of the valyl-tRNA synthetase/elongation factor-1H complex and localization of the delta subunit. *FEBS Lett.* 579, 6049–6054.

Article 2

II - Le facteur eEF1B : une cible universelle de CDK

Article 2:

Le Sourd, F., Bellé, R., Cormier, P, and Mulner-Lorillon, O. (2006c). Molecular cloning of sea urchin eEF1B α and eEF1B γ puts forward the universal presence of a CDK phosphorylation site on one or the other eEF1B components. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, Accepted

Dans la continuité de l'article précédent et de l'étude structurale du complexe eEF1B, nous avons cloné et caractérisé les sous-unités eEF1B α et eEF1B γ chez l'oursin. Nous avons pu ainsi étudier les interactions entre eEF1B γ et respectivement eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2. Nous concluons dans cet article que les deux isoformes d'eEF1B δ présentent les mêmes caractéristiques d'interaction avec eEF1B γ . La littérature rapportait l'implication de la région N-terminale de la protéine eEF1B δ dans cette interaction. Nous avons délimité celle-ci et montrons pour la première fois que les 45 premiers acides-aminés d'eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 sont suffisants pour permettre cette interaction.

L'analyse des séquences des protéines eEF1B α et eEF1B γ d'oursin montre l'absence de site potentiel de phosphorylation par CDK dans la séquence d'eEF1B γ alors qu'un motif potentiel est présent dans celle d'eEF1B α . Jusqu'à maintenant, la littérature rapportait la phosphorylation de la sous-unité eEF1B γ par CDK, ce qui se reflétait, dans les banques de séquences, par la conservation de sites de phosphorylation sur eEF1B γ pour un large panel d'espèces. Cette caractéristique supposait alors une fonction importante, ce qui classait l'oursin parmi les exceptions. Nous montrons pourtant ici, également par analyse de banque, que la caractéristique de l'oursin se retrouve dans quelques autres espèces. Plus généralement, nous avons remarqué

que la plupart des espèces qui ne possédaient pas de site de phosphorylation sur leur protéine eEF1B γ en possédaient un sur eEF1B α . Ces deux protéines étant toujours étroitement associées dans la cellule, nous supposons qu'au cours de l'évolution, la fonction ainsi que le site de la phosphorylation par CDK1 ont été conservés, soit sur eEF1B α , soit sur eEF1B γ , ce qui leur donne un caractère universel.

Article 3

III - Revue des connaissances sur le complexe eEF1B

Article 3 :

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

Cette revue est dédiée au Professeur Wim Moller, illustre chercheur s'étant attaché au "décryptage" de la machinerie complexe qui permet la synthèse des protéines.

Elle a pour but de recadrer l'importance majeure de la régulation de la phase d'élongation de la synthèse des protéines au sein de la cellule, et notamment son rôle et son implication dans de multiples processus cellulaires.

La première partie de cette revue apporte une précision et une homogénéisation de la nomenclature des sous-unités du facteur eEF1B parmi les différents grands groupes de l'évolution, parfois confuse auparavant dans la littérature.

La deuxième partie expose par ailleurs les caractéristiques structurales des divers constituants du complexe eEF1B. L'analyse montre qu'au moins deux éléments essentiels impliqués dans l'élongation de la traduction sont conservés au cours de l'évolution des espèces. Il s'agit d'une protéine G (EF-Tu chez les procaryotes et eEF1A chez les eucaryotes) qui a pour rôle de transférer l'aminocyl-ARNt sur le ribosome en cours d'élongation et d'un complexe d'échange de GDP/GTP (EF-Ts chez les procaryotes et eEF1B chez les eucaryotes) dont la fonction basique est de réactiver la protéine G. Pourtant, la complexité structurale du facteur d'échange de nucléotides s'est accrue avec l'évolution, par l'acquisition progressive de nouvelles sous-unités, le maximum étant atteint chez les animaux (*cf* l'introduction, figure 4,

page 24). Nous énumérons les différentes caractéristiques structurales (domaines, interactions et sites de phosphorylation conservés) et fonctionnelles (implication sur la traduction) connues à ce jour pour chacune des différentes entités du complexe eEF1B. L'émergence de nouvelles sous-unités au cours de l'évolution soulève la question de leurs fonctions respectives. Elles sont certainement le reflet d'une régulation de plus en plus fine de l'activité d'élongation de la traduction mais nous énonçons plusieurs éléments qui tendent également à attribuer à ces sous-unités d'autres fonctions dans d'autres processis cellulaires.

Ainsi après avoir fait le point sur la complexité structurale du complexe eEF1B, la troisième partie traite des découvertes des implications multiples des composants d'eEF1B et de l'élongation de la traduction dans divers processis cellulaires d'une part, et de leurs régulations multiples au cours de la vie d'une cellule d'autre part. Cet exposé renforce l'importance majeure de ceux-ci dans certains cas de dysfonctionnements cellulaires à l'origine de certaines maladies. Parmi ces maladies viennent s'inscrire nombre de cancers et diverses infections virales qui impliquent souvent directement le facteur eEF1B. Ainsi des dérégulations de l'expression (synthèse et/ou fonction) de certaines sous-unités du complexe eEF1B sont directement liées à certains cas de cancérisations. De plus, le complexe eEF1B est une cible multiple de phosphorylation par diverses kinases exerçant des rôles clés dans le cycle cellulaire (CDK, CK2, PKC...) ou encore de certaines kinases virales (HSV1 kinase).

Review

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

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

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

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

Available online 24 March 2006

Abstract

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

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

2. eEF1B structure and its canonical role

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

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

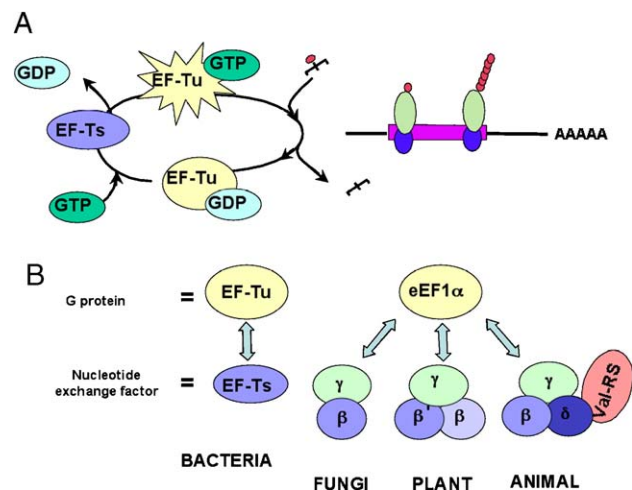


Fig. 2. First step of protein synthesis elongation. (A) Schematic representation of peptide chain elongation. The guanine nucleotide exchange factor (EF-Ts) reloads GTP on the G-protein EF-Tu which catalyzes the binding of aminoacyl (red circle)-tRNA to the A site of the ribosome (green and blue circles)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

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

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

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

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

2.1. The eukaryotic specific EF1B protein: eEF1B γ

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

Table 1
A new clarified nomenclature of eEF1B components

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

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

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

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

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

2.1.1. eEF1B γ structure

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

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

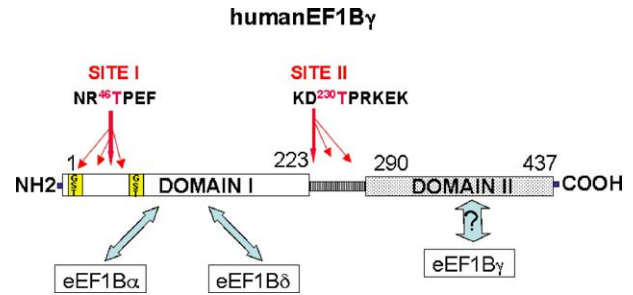


Fig. 3. Schematic structure of the eEF1B γ protein component of elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation sites detailed in one letter amino acids and their position arrowed in the sequence (red) according to the different species, and the localization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

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

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

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

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

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

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

2.1.2. eEF1B γ function

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

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

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

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

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

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

2.2.1. eEF1B α , the eukaryotic canonical nucleotide exchange subunit

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

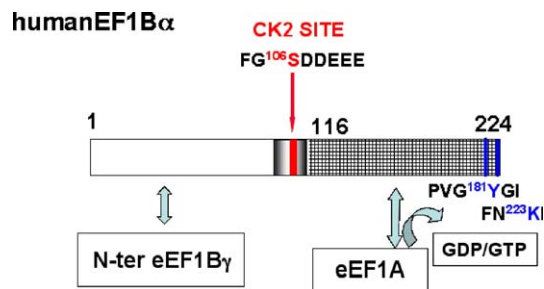


Fig. 4. Schematic structure of the eEF1B α protein component of elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation site position arrowed in red, and the localization of the binding domain (blue arrow) to the associated partners. The squaring area corresponds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

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

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

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

Notes to Table 2:

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

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

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

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

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

The first evidence for the existence of at least two different proteins for the exchange nucleotide protein came from studies on the eEF1B complex in plants. After purification from wheat embryos, two subunits of low molecular weight were co-purified with eEF1B γ , both having nucleotide exchange activity and sharing common tryptic peptides, as shown by microsequencing [41]. Subsequently, three beta-type isoforms were cloned from rice embryos, called eEF1 β' , eEF1 β and eEF1 $\beta 2$ [89,101,102]. Searches in the plant sequence database revealed a number of sequences in each species matching the rice sequences. We performed a full-length alignment of the 40 plant “beta-type” sequences using CLUSTAL X [103] and a neighbor-joining tree using % identity [104] was calculated (Fig. 5). The analysis confirmed and extended an early report [105] that the plant nucleotide exchange protein sequences separated into two groups named the “ α type” and the “ β type” with respect to Merrick’s nomenclature (see Table 1). Note that the “ α type” clusters are the sequences formerly referred to as β' while the “ β type” clusters are the sequences formerly referred to as β (Fig. 5). Each species contains a guanine nucleotide exchange protein of the “ α type” and one of the “ β type”,

supporting the hypothesis that gene duplication occurred before speciation.

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

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

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

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

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

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

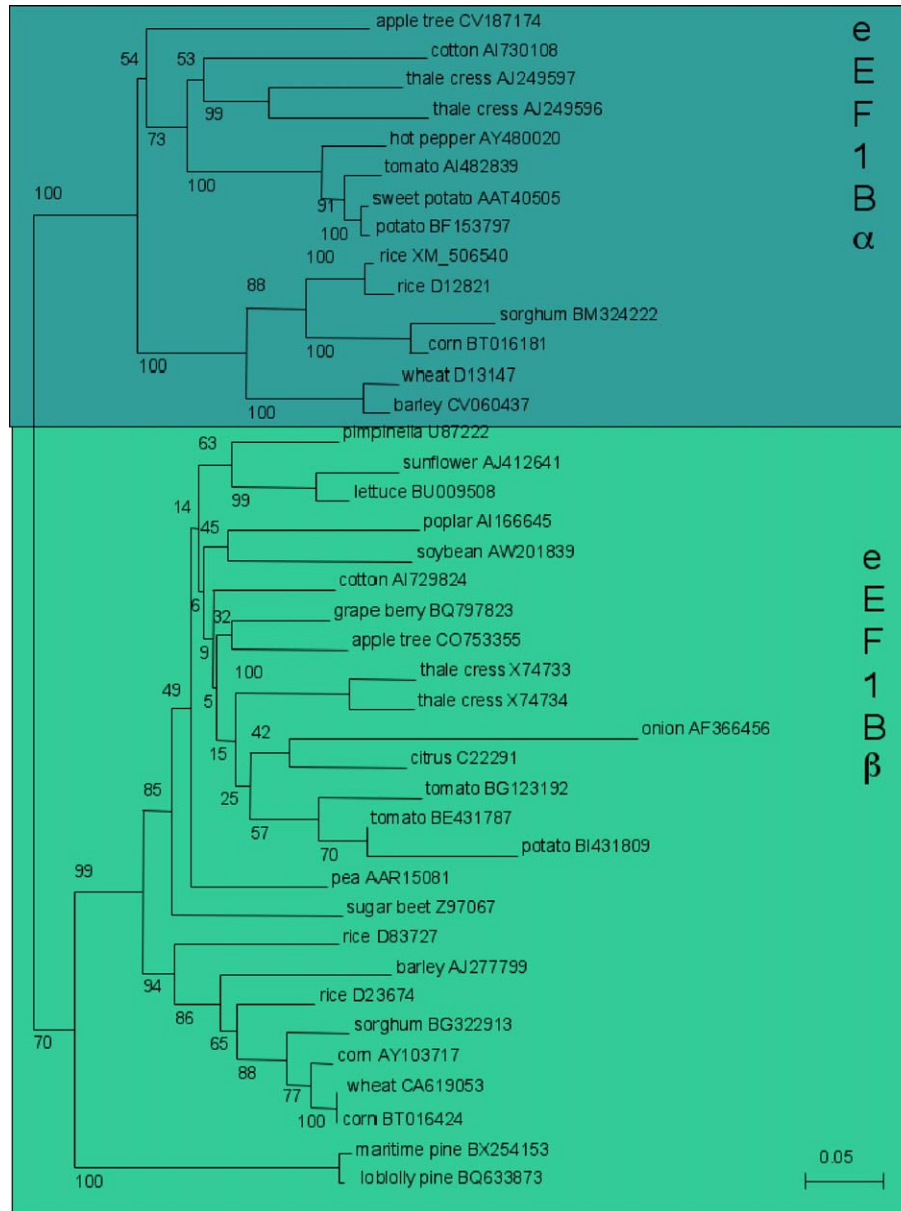


Fig. 5. Consensus tree inferred from the full-length sequences of 40 eEF1B α (formerly eEF1B') and eEF1B β (formerly eEF1B β) proteins from plants as described in the text. Sequences were extracted from nucleic and proteic data banks using NCBI resources via the Internet. The tree is unrooted. The common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

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

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

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

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

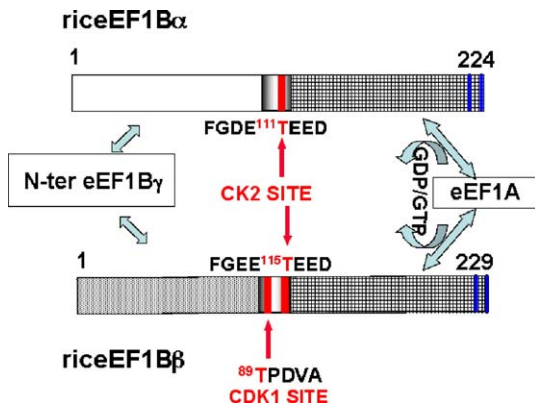


Fig. 6. Schematic structure of the eEF1B α (upper) and eEF1B β (lower) protein components of rice elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation sites position arrowed in red, and the localization of the binding domain (blue arrow) to the associated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

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

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

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

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

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

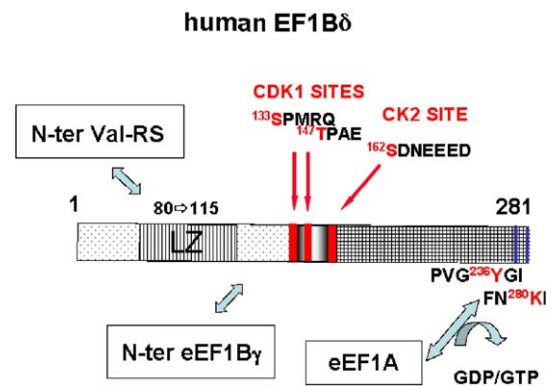


Fig. 7. Schematic structure of the eEF1B δ protein component of human elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed), the phosphorylation sites indicated in one letter amino acids and their position arrowed in the sequence (red) according to the different species, and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

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

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

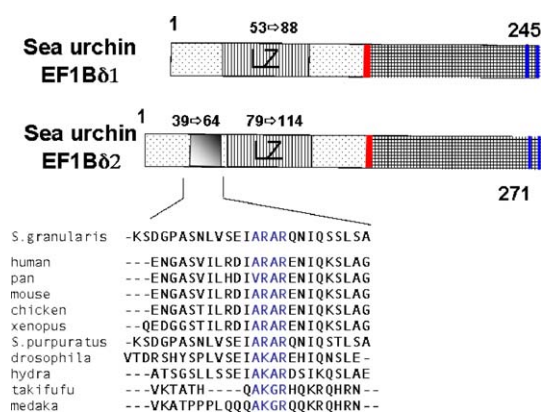


Fig. 8. Schematic structure of the eEF1B δ 1 and 2 proteins components of sea urchin elongation factor 1B illustrating the structural and functional domains (boxed) and the phosphorylation site (red). The leucine zipper motif is indicated LZ in a striated box. The squaring area corresponds to the guanine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

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

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

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

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

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

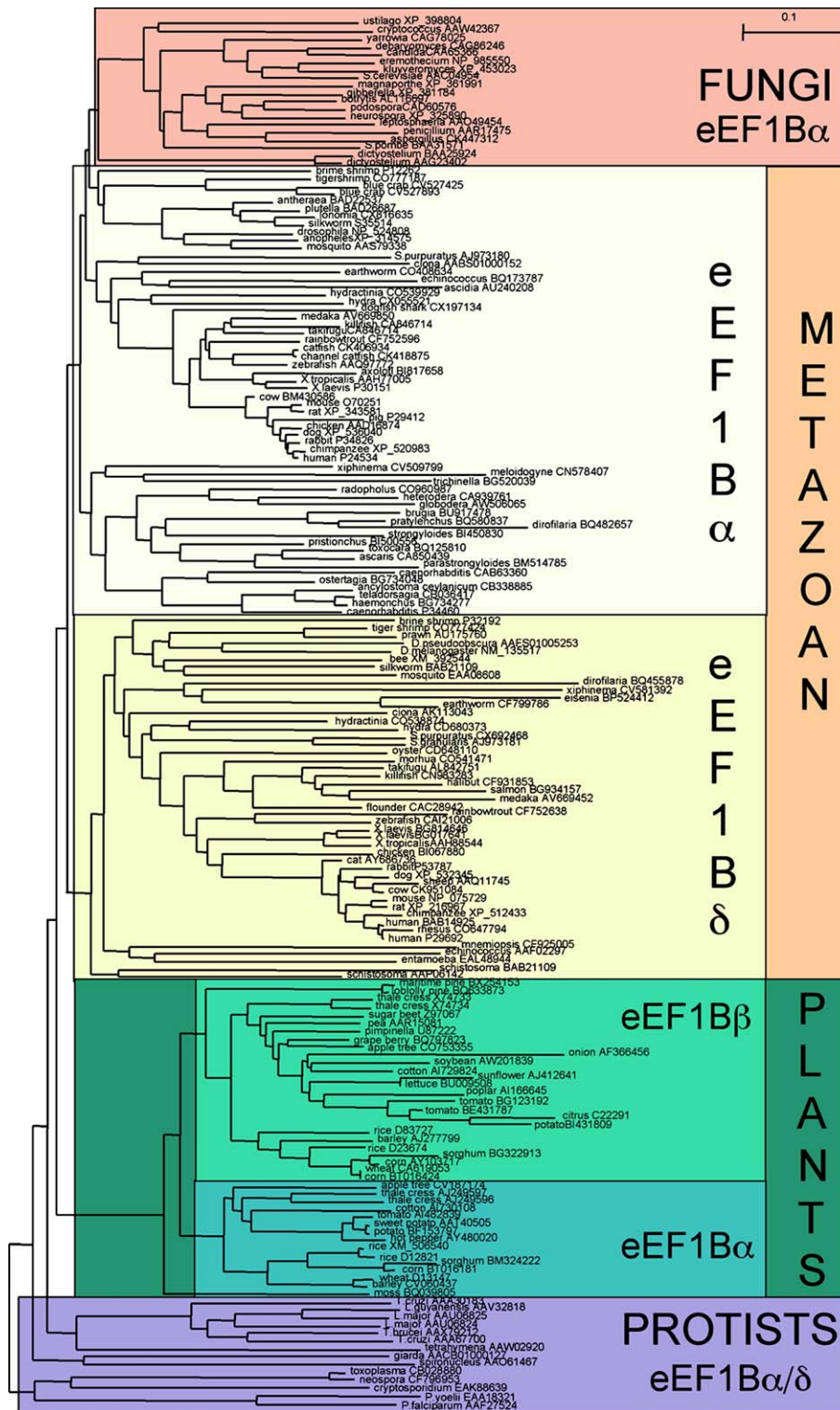


Fig. 9. Consensus tree inferred from the full-length sequences of 179 eEF1B α , eEF1B β , eEF1B δ proteins from all organisms as described in the text. Sequences were extracted from nucleic and proteic data banks using NCBI resources via the Internet. The tree is unrooted. The common names of organisms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

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

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

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

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

3. eEF1B, a multifunctional regulator

3.1. eEF1B, cell cycle and tumorigenesis

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

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

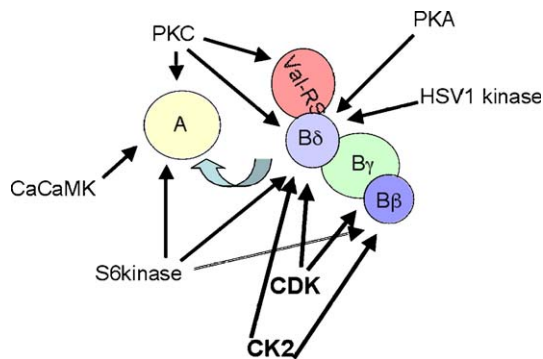


Fig. 10. Schematic representation of eEF1 showing various protein kinases subunit targets in the G-protein subunit eEF1A (left) and the different components (right) of the guanine-nucleotide exchange factor eEF1B. See text for details.

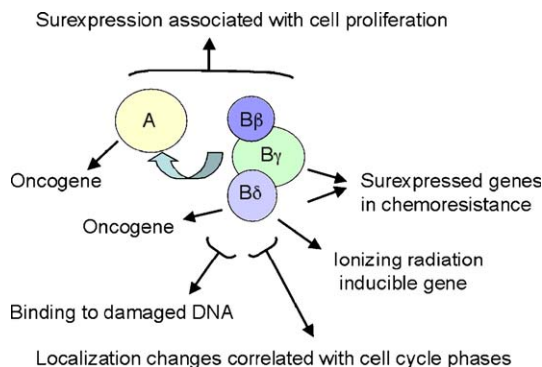


Fig. 11. Schematic representation of the known biological implications in the cell cycle of the different components of eEF1. See text for details.

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

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

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

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

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

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

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

3.2. eEF1B and virus

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

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

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

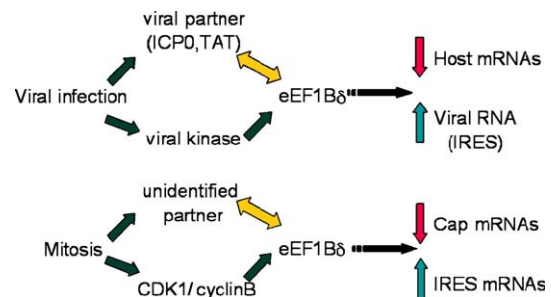


Fig. 12. Schematic representation of the speculative role of eEF1B δ in the regulation of protein synthesis during viral infection (upper) and during mitosis (lower). The protein eEF1B δ would favor (green arrow) translation initiated at the internal ribosome entry site (IRES) and inhibit (red arrow)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

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

4. Conclusion

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

Appendix A. Supplementary data

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

References

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

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

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

- that of EF-Ts from *Escherichia coli*, Structure Fold. Des. 7 (1999) 217–226.
- [91] G.M.C. Janssen, G.D.F. Maessen, R. Amons, W. Moller, Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity, J. Biol. Chem. 263 (1988) 11063–11066.
- [92] R. Belle, O. Minella, P. Cormier, J. Morales, R. Poulhe, O. Mulner-Lorillon, Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase, Prog. Cell Cycle Res. 1 (1995) 265–270.
- [93] C.J. Chen, J.A. Traugh, Expression of recombinant elongation factor 1 beta from rabbit in *Escherichia coli*. Phosphorylation by casein kinase II, Biochim. Biophys. Acta 1264 (1995) 303–311.
- [94] F. Meggio, L.A. Pinna, One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? FASEB J. 17 (2003) 349–368.
- [95] S. Matsumoto, T. Mizoguchi, N. Oizumi, M. Tsuruga, K. Shinozaki, H. Taira, S. Ejiri, Analysis of phosphorylation of wheat elongation factor-1 beta and factor-beta(′) by casein kinase-II, Biosci. Biotechnol. Biochem. 57 (1993) 1740–1742.
- [96] Y.W. Chang, J.A. Traugh, Phosphorylation of elongation factor 1 and ribosomal protein S6 by multipotential S6 kinase and insulin stimulation of translational elongation, J. Biol. Chem. 272 (1997) 28252–28257.
- [97] H.I. Peters, Y.W.E. Chang, J.A. Traugh, Phosphorylation of elongation factor 1(EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity, Eur. J. Biochem. 234 (1995) 550–556.
- [98] Y.W.E. Chang, J.A. Traugh, Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity, Eur. J. Biochem. 251 (1998) 201–207.
- [99] A. Pizzuti, M. Gennarelli, G. Novelli, A. Colosimo, S. Locicero, C.T. Caskey, B. Dallapiccola, Human elongation factor-EF-1 beta-cloning and characterization of the Efl beta 5a gene and assignment of EF-1 beta isoforms to chromosome-2, chromosome-5, chromosome-15 and chromosome-X, Biochem. Biophys. Res. Commun. 197 (1993) 154–162.
- [100] D.M. Chambers, G.A. Rouleau, C.M. Abbott, Comparative genomic analysis of genes encoding translation elongation factor 1B(alpha) in human and mouse shows EEF1B1 to be a recent retrotransposition event, Genomics 77 (2001) 145–148.
- [101] S. Matsumoto, Y. Terui, S.X. Xi, H. Taira, S. Ejiri, Cloning and characterization of the cDNA encoding rice elongation factor 1 beta, FEBS Lett. 338 (1994) 103–106.
- [102] Y. Terui, K. Tsutsumi, S. Kidou, T. Sawazaki, Y. Kuroiwa, M. Yamaki, S. Ejiri, A novel variant of translation elongation factor 1 beta: isolation and characterization of the rice gene encoding EF-1beta2, Biochim. Biophys. Acta 1442 (1998) 369–372.
- [103] F. Jeanmougin, J.D. Thompson, M. Gouy, D.G. Higgins, T.J. Gibson, Multiple sequence alignment with Clustal X, Trends Biochem. Sci. 23 (1998) 403–405.
- [104] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4 (1987) 406–425.
- [105] M.A. Guerrucci, A. Monnier, C. Delalande, R. Belle, The elongation factor-1 delta (EF-1 delta) originates from gene duplication of an EF-1 beta ancestor and fusion with a protein-binding domain, Gene 233 (1999) 83–87.
- [106] E. Palen, T.T. Huang, J.A. Traugh, Comparison of phosphorylation of elongation factor 1 from different species by casein kinase II, FEBS Lett. 274 (1990) 12–14.
- [107] J.R. Pomeroy, L. Valente, T.G. Kinzy, T.W. Jacobs, Mutation of a conserved CDK site converts a metazoan elongation factor 1Bbeta subunit into a replacement for yeast eEF1Balpha, Mol. Genet. Genomics 269 (2003) 776–788.
- [108] R.S. Jope, G.V. Johnson, The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3, Trends Biochem. Sci. 29 (2004) 95–102.
- [109] O. Mulner-Lorillon, R. Poulhe, P. Cormier, J.C. Labbe, M. Doree, R. Belle, Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate, FEBS Lett. 251 (1989) 219–224.
- [110] J. Morales, P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, R. Poulhe, R. Belle, Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1delta, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 4091.
- [111] R. Amons, M.A. Guerrucci, R.H. Karssies, J. Morales, P. Cormier, W. Moller, R. Belle, The leucine-zipper in elongation factor EF-1 delta, a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus*, Biochim. Biophys. Acta 1218 (1994) 346–350.
- [112] J. Sanders, R. Raggiaschi, J. Morales, W. Moller, The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1-delta, Biochim. Biophys. Acta 1174 (1993) 87–90.
- [113] C. Delalande, A. Monnier, O. Minella, A.M. Geneviere, O. Mulner-Lorillon, R. Belle, P. Cormier, Developmental regulation of elongation factor-1 delta in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae, Exp. Cell Res. 242 (1998) 228–234.
- [114] C. Delalande, R. Belle, P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266 (1999) 425–431.
- [115] G.T. Sheu, J.A. Traugh, A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII, Mol. Cell. Biochem. 191 (1999) 181–186.
- [116] T. Alber, Structure of the leucine zipper, Curr. Opin. Genet. Dev. 2 (1992) 205–210.
- [117] T. Abel, T. Maniatis, Gene regulation. Action of leucine zippers, Nature 341 (1989) 24–25.
- [118] J. Sang Lee, S. Gyu Park, H. Park, W. Seol, S. Lee, S. Kim, Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex, Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (2002) 158–164.
- [119] S.-L. Hsieh, R.D. Campbell, Evidence that gene G7a in the human major histocompatibility complex encodes valyl-tRNA synthetase, Biochem. J. 278 (1991) 809–816.
- [120] O. Minella, O. Mulner-Lorillon, R. Poulhe, R. Belle, P. Cormier, The guanine-nucleotide-exchange complex (EF-1 beta gamma delta) of elongation factor-1 contains two similar leucine-zipper proteins EF-1 delta, p34 encoded by EF-1 delta 1 and p36 encoded by EF-1 delta 2, Eur. J. Biochem. 237 (1996) 685–690.
- [121] S. Boulben, A. Monnier, M. Le Breton, J. Morales, P. Cormier, R. Belle, O. Mulner-Lorillon, Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase, Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 2178–2188.
- [122] O. Mulner-Lorillon, O. Minella, P. Cormier, J.P. Capony, J.C. Cavadore, J. Morales, R. Poulhe, R. Belle, Elongation factor EF-1 delta, a new target for maturation-promoting factor in *Xenopus* oocytes, J. Biol. Chem. 269 (1994) 20201–20207.
- [123] Y. Kawaguchi, K. Kato, M. Tanaka, M. Kanamori, Y. Nishiyama, Y. Yamanashi, Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta, J. Virol. 77 (2003) 2359–2368.
- [124] L.H. Hartwell, Nobel lecture. Yeast and cancer, Biosci. Rep. 22 (2002) 373–394.
- [125] A.W. Murray, Recycling the cell cycle: cyclins revisited, Cell 116 (2004) 221–234.
- [126] P.M. Nurse, Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control, Biosci. Rep. 22 (2002) 487–499.
- [127] T. Hunt, Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions, Biosci. Rep. 22 (2002) 465–486.
- [128] H. Fan, S. Penman, Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis, J. Mol. Biol. 50 (1970) 655–670.
- [129] J.P. Kanki, J.W. Newport, The cell cycle dependence of protein synthesis during *Xenopus laevis* development, Dev. Biol. 146 (1991) 198–213.
- [130] A. Monnier, R. Belle, J. Morales, P. Cormier, S. Boulben, O. Mulner-Lorillon, Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 1453–1457.
- [131] M. Al-Maghrebi, H. Brule, M. Padkina, C. Allen, W.M. Holmes, Z.E.

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

Conclusions et perspectives

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La synthèse des protéines est un processus indispensable à la vie des cellules. Ainsi, une multitude de facteurs s'orchestre autour des différentes phases de la traduction des ARN messagers, l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Ce travail de thèse qui s'inscrit dans le cadre des recherches sur les relations existantes entre traduction et cycle cellulaire, a consisté en l'étude du facteur d'élongation de la traduction eEF1B, notamment sa structure macromoléculaire et son implication dans le cycle cellulaire. Cette thématique de recherche est motivée par de nombreux travaux qui ont rapporté l'implication directe des constituants du complexe eEF1B dans certains désordres cellulaires à l'origine de maladies comme le cancer, désordres qui résultent du dysfonctionnement des mécanismes de surveillance du cycle cellulaire.

I - Structure du complexe eEF1B

La structure du facteur eEF1B, décrite dans diverses espèces présente une complexité qui n'est pas encore entièrement élucidée. Les modèles proposés chez les vertébrés présentent le complexe eEF1B comme un hétéromère associant quatre sous-unités, eEF1B γ , eEF1B α , eEF1B δ et la ValRS suivant une stœchiométrie de 1:1:1:1 (Bec *et al.*, 1994; Janssen *et al.*, 1994; Minella *et al.*, 1998; Mansilla *et al.*, 2002) ou 2:1:1:1 (Sheu et Traugh, 1999). En revanche, différentes structures supramoléculaires résultant de la multimérisation de cet hétéromère sont proposées.

En effet, alors que pour certains auteurs il n'existe pas de multimérisation (Janssen *et al.*, 1994), pour d'autres une dimérisation (Bec *et al.*, 1994; Sheu et Traugh, 1999; Mansilla *et al.*, 2002) ou une trimérisation pour Bellé et collaborateurs (Minella *et al.*, 1998) sont rapportées.

Les résultats que nous avons obtenus chez l'oursin apportent des précisions sur la structure du complexe eEF1B des eucaryotes. Ils sont en accord avec la dimérisation d'hétéromères [eEF1B γ -eEF1B α -eEF1B δ -(ValRS)], et démontrent l'existence de deux sous-populations du complexe eEF1B due à la co-expression de deux isoformes d'eEF1B δ . La première population contient l'hétérodimère [eEF1B γ -eEF1B α -eEF1B δ 1-(ValRS)]-[eEF1B γ -eEF1B α -eEF1B δ 2-(ValRS)] et la deuxième l'homodimère [eEF1B γ -eEF1B α -eEF1B δ 1-(ValRS)]₂. La présence de la ValRS chez l'oursin reste à confirmer. En effet, l'analyse de la séquence de la ValRS d'oursin n'a pas permis de mettre en évidence dans cette protéine l'extension permettant sa liaison à la protéine eEF1B δ et ainsi son intégration au complexe eEF1B (Morales *et al.*, 2006). Cette extension, caractéristique des mammifères n'est pas retrouvée dans la ValRS de levure, ce qui est corrélé à l'absence de la protéine eEF1B δ dans cette espèce (Bec et Waller, 1989). Ainsi, l'oursin est un organisme intéressant qui se positionnerait comme un "intermédiaire" dans l'évolution entre les eucaryotes inférieurs (levure) et les mammifères, en exprimant déjà la sous-unité eEF1B δ au sein du complexe eEF1B mais pas encore son interaction avec la ValRS. Il faut vérifier cette hypothèse en testant de manière croisée les interactions directes entre les protéines recombinantes eEF1B δ et ValRS d'oursin et de mammifère. Il est également possible de construire une protéine chimère entre la ValRS d'oursin et l'extension de la ValRS humaine permettant son interaction avec eEF1B δ . Il sera alors

intéressant de tester l'interaction de cette protéine chimère avec la protéine eEF1B δ d'oursin. Ces expériences d'interaction sont facilement réalisables par la technique du double-hybride chez la levure. Elles permettront de répondre à la question de l'association ou non de la ValRS à eEF1B δ et donc son intégration possible au sein du complexe eEF1B chez l'oursin. La présence de la protéine eEF1B δ non reliée à celle de la ValRS chez l'oursin pose à nouveau la question du rôle spécifique de cette protéine au sein du complexe eEF1B. Pour répondre à cette question, l'oursin sera donc un modèle avantageux.

L'existence de deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 de la protéine eEF1B δ co-exprimées au sein de la même cellule est intrigante. En effet, ces deux isoformes diffèrent uniquement par la présence supplémentaire dans la protéine eEF1B δ 2 d'un insert de 26 acides aminés juste en amont du motif "leucine zipper". Nous n'avons pas trouvé de similitudes avec cette insertion dans des protéines autres que eEF1B δ permettant de supposer une fonction particulière. La séquence de cette insertion est hautement conservée parmi les différentes espèces, ce qui dénote certainement une fonction importante et conservée. Il est intéressant de noter la position stratégique de cette insertion, à savoir juste en amont du motif "leucine zipper". On peut imaginer que cette insertion a pour effet de changer la structure de la protéine eEF1B δ 2 au voisinage du motif "leucine zipper", lui conférant ainsi des interactions spécifiques. Des précisions pourront certainement être obtenues par la comparaison des structures tridimensionnelles respectives des deux protéines. Par ailleurs, la protéine eEF1B δ ayant la capacité de se dimériser, il serait intéressant de comparer les constantes d'association entre les dimères δ 1/ δ 1, δ 2/ δ 2 et δ 1/ δ 2. Ceci peut être fait par des méthodes de biophysiques.

Le modèle de Bellé et collaborateurs établi chez le xénope (Minella *et al.*, 1998) propose l'existence de sous-populations de complexe eEF1B résultant de la multimérisation des sous-unités eEF1B γ et eEF1B α . Nos résultats n'écartent pas cette possibilité. Au contraire, ces modèles sont complémentaires et confortent l'hypothèse de l'expression simultanée de différentes sous-populations du complexe eEF1B au sein d'une même cellule. Une question subsiste : quels sont les rôles respectifs de ces différentes sous-populations ?

II - Fonction du complexe eEF1B

Les deux isoformes eEF1B δ 1 et eEF1B δ 2 sont retrouvées exprimées dans la quasi-totalité des métazoaires, indiquant certainement une fonction spécifique conservée des deux protéines et ainsi des complexes eEF1B au sein desquels elles sont différenciellement réparties. Nous avons montré que les deux sous-populations du complexe eEF1B que nous avons mises en évidence (article 1) présentaient des changements comparables de relocalisation au cours du cycle cellulaire. L'enjeu maintenant est de comprendre les fonctions respectives de cette localisation pour chacun des complexes en rapport ou non avec la synthèse des protéines. Des éléments de réponse pourraient être obtenus en bloquant spécifiquement la relocalisation de l'un ou l'autre des complexes en bloquant spécifiquement la synthèse de eEF1B δ 1 ou eEF1B δ 2 par la technique des morpholinos (oligonucléotides antisens) et en étudiant l'effet sur les différentes phases du cycle cellulaire.

Il est par ailleurs important d'élucider les mécanismes qui régissent cette relocalisation au cours du cycle cellulaire. Nous avons vu que le complexe eEF1B est la cible de plusieurs protéines kinases, notamment la CDK1/cycline B qui contrôle l'entrée des cellules en mitose. Des études ont montré que l'activité d'élongation du complexe eEF1B était directement influencée quand il était phosphorylé par cette kinase (Monnier *et al.*, 2001a). Il est alors probable que la phosphorylation du complexe eEF1B par CDK1/cyclineB est directement liée à son changement de localisation et induise ainsi une spécificité de traduction de messagers particuliers ou toutes autres fonctions essentielles au bon déroulement de la mitose. Nous avons montré la conservation chez les espèces d'un site de phosphorylation par CDK1/cyclineB soit sur la protéine eEF1B γ , soit sur la protéine eEF1B α du complexe eEF1B. Cette régulation par phosphorylation est donc certainement conservée au cours de l'évolution. Il faut maintenant prouver la réalité physiologique de cette phosphorylation chez l'oursin. Ceci pourra être fait dans des extraits acellulaires d'oursin. L'utilisation d'extraits préparés à différentes phases du cycle cellulaire permettra également d'étudier la cinétique de cette phosphorylation en relation avec le déroulement du cycle cellulaire. Chez l'oursin, il serait intéressant de microinjecter les protéines recombinante du complexe eEF1B marquée en fluorescence (ou leurs messagers), mutées ou non sur leurs sites potentiels de phosphorylations. Dans l'hypothèse où ces protéines recombinantes seraient incorporées au sein des complexes eEF1B, il serait alors aisé de suivre les effets sur leurs localisations au cours du cycle cellulaire.

L'étude de la régulation de la synthèse protéique dans les cas pathologiques d'infections virales est une voie potentielle de compréhension des modes de

régulations et de changements d'activités des acteurs de la synthèse protéique dans des cas normaux. Ainsi, des données obtenues dans des cas d'infection virale ont permis de supposer une fonction spécifique pour la protéine eEF1B δ . En effet, la protéine eEF1B δ est une cible de certaines protéines kinases virales qui la phosphorylent notamment sur le même site de phosphorylation que CDK1/Cycline B (*cf* paragraphe I-D-3, page 73). L'activation de la kinase CDK1/Cycline B est associée à la phase mitotique du cycle cellulaire. Les situations d'infection virale et de mitose sont toutes deux des situations physiologiques particulières pour la cellule, se caractérisant par la traduction favorisée de messagers spécifiques et initiés de façon dépendante des IRES [revue dans (Le Breton *et al.*, 2005)]. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation d'eEF1B δ par CDK1/Cycline aurait pour rôle, lors de la mitose, de favoriser la traduction des messagers portant une IRES. Serait-ce une fonction propre à la protéine eEF1B δ qui pourrait alors être assimilée à une ITAF, ou bien cette fonction impliquerait t-elle le complexe eEF1B dans sa totalité ? Des réponses à ces questions pourraient être apportées par l'étude comparées, en extraits acellulaires, du taux d'élongation spécifique de messagers exogènes pré-initiés, avec ou sans IRES, et ceci en relation avec l'activité de la kinase CDK1/Cycline B.

Les données actuelles permettent déjà de poser des hypothèses quant au rôle de la phosphorylation de la protéine eEF1B δ par CDK1/Cycline B au cours de la mitose. Il est fort plausible qu'un des rôles de la phosphorylation soit la traduction sélective de messagers particuliers nécessaires aux besoins spécifiques d'une cellule lors de la mitose.

L'évolution s'est accompagnée d'un accroissement de la complexité structurale de eEF1B. Alors que la fonction canonique d'échange de GDP/GTP est portée par une protéine unique (EF-Ts) chez les bactéries, un complexe macromoléculaire de complexité croissante au cours de l'évolution semble nécessaire aux organismes eucaryotes. Une hypothèse serait que ces organismes possèdent un complexe eEF1B plus élaboré, en relation avec une régulation plus sophistiquée de la synthèse des protéines. Une autre hypothèse serait que le complexe se soit spécialisé dans d'autres fonctions cellulaires. Il faut noter les caractéristiques structurales des protéines eEF1B δ et eEF1B γ . La protéine eEF1B δ possède un motif "leucine zipper" indicatif d'interaction protéine-protéine. Cette protéine possède t-elle des partenaires encore non identifiés qui lui confèreraient d'autres particularités fonctionnelles ? La protéine eEF1B γ , quant à elle, présente un motif GST. Ce motif est-il impliqué exclusivement dans la stabilité structurale du complexe eEF1B et ainsi dans la régulation de sa fonction d'échange de GDP/GTP ou possède t-il un réel rôle dans les mécanismes de détoxification cellulaire ?

Parallèlement, la découverte de nouvelles fonctions pour chacune des protéines du complexe eEF1B est indissociable de la compréhension du rôle des phosphorylations sur ce complexe.

III - eEF1B : un complexe plein d'avenir

En conclusion, le complexe d'élongation de la traduction eEF1B semble être un facteur à la fois hautement régulé et régulateur au cours de la vie d'une cellule. Les différents arguments énoncés ci-dessus font de l'élongation et plus précisément du complexe d'élongation de la traduction eEF1B un acteur majeur de la régulation du cycle cellulaire. Le complexe eEF1B se pose ainsi comme un facteur incontournable à étudier pour mieux comprendre les causes et les caractéristiques de certaines maladies, notamment les cancers, et ainsi pour l'identification de nouveaux marqueurs du cancer et de nouvelles cibles thérapeutiques.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Alber, T. (1992). Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 205-10.
- Amons, R., Guerrucci, M. A., Karssies, R. H., Morales, J., Cormier, P., Moller, W., and Belle, R. (1994). The leucine-zipper in elongation factor EF-1 delta, a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 346-350.
- Andersen, G. R., Nissen, P., and Nyborg, J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem Sci* **28**, 434-41.
- 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.
- Ballinger, D. G., Bray, S. J., and Hunt, T. (1984). Studies of the kinetics and ionic requirements for the phosphorylation of ribosomal protein S6 after fertilization of *Arbacia punctulata* eggs. *Dev Biol* **101**, 192-200.
- Bec, G., Kerjean, P., Zha, X. D., and Waller, J. P. (1989). Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. I. Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1. *J. Biol. Chem.* **264**, 21131-21137.
- Bec, G., and Waller, J.-P. (1989). Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. II. The enzyme derived from the high-Mr complex displays hydrophobic as well as polyanion-binding properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 21138-21143.
- Bec, G., Kerjan, P., and Waller, J. P. (1994). Reconstitution In vitro of the Valyl-Transfer RNA Synthetase-Elongation Factor (EF) 1 beta gamma delta Complex - Essential Roles of the NH2-Terminal Extension of Valyl-Transfer RNA Synthetase and of the EF-1 delta Subunit in Complex Formation. *J. Biol. Chem.* **269**, 2086-2092.
- Bedard, P. A., and Brandhorst, B. P. (1983). Patterns of protein synthesis and metabolism during sea urchin embryogenesis. *Dev Biol* **96**, 74-83.
- 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.
- Belle, R., Minella, O., Cormier, P., Morales, J., Poulhe, R., and Mulner-Lorillon, O. (1995). Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. *Prog. Cell Cycle Res.* **1**, 265-270.

- Billaut-Mulot, O., Schoneck, R., Fernandez-Gomez, R., Taibi, A., Capron, A., Pommier, V., Plumas-Marty, B., Loyens, M., and Ouaiissi, A. (1994). Molecular and immunological characterization of a Trypanosoma cruzi protein homologous to mammalian elongation factor 1 gamma. *Biol Cell* **82**, 39-44.
- Billaut-Mulot, O., Fernandez-Gomez, R., and Ouaiissi, A. (1997). Phenotype of recombinant Trypanosoma cruzi which overexpress elongation factor 1-gamma: possible involvement of EF-1gamma GST-like domain in the resistance to clomipramine. *Gene* **198**, 259-67.
- 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.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-27.
- Brachet, J., and Denis, H. (1963). Effects of actinomycin D on morphogenesis. *Nature* **198**, 205-6.
- Brandhorst, B. P. (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* **52**, 310-7.
- 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.
- Brandis, J. W., and Raff, R. A. (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilisation. *Nature* **278**, 467-9.
- Brandsma, M., Kerjan, P., Dijk, J., Janssen, M. C., and Moller, W. (1995). Valyl-tRNA synthetase from Artemia. Purification and association with elongation factor 1. *Eur. J. Biochem.* **233**, 277-282.
- Brown, C. M., Stockwell, P. A., Trotman, C. N., and Tate, W. P. (1990). Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **18**, 6339-45.
- Browne, C. L., Bower, W. A., Palazzo, R. E., and Rebhun, L. I. (1990). Inhibition of mitosis in fertilized sea urchin eggs by inhibition of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Exp Cell Res* **188**, 122-8.
- Carr-Schmid, A., Valente, L., Loik, V. I., Williams, T., Starita, L. M., and Kinzy, T. G. (1999). Mutations in elongation factor 1 beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5257-5266.
- Carroll, D. J., Albay, D. T., Hoang, K. M., O'Neill, F. J., Kumano, M., and Foltz, K. R. (2000). The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev Biol* **217**, 179-91.

- Carvalho, J. F., Carvalho, M. G. C., and Merrick, W. C. (1984a). Purification of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 591-602.
- Carvalho, M. D., Carvalho, J. F., and Merrick, W. C. (1984b). Biological characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch Biochem Biophys* **234**, 603-11.
- Chang, Y. W., and Traugh, J. A. (1997). Phosphorylation of elongation factor 1 and ribosomal protein S6 by multipotential S6 kinase and insulin stimulation of translational elongation. *J Biol Chem* **272**, 28252-7.
- Chang, Y. W. E., and Traugh, J. A. (1998). Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity. *Eur. J. Biochem.* **251**, 201-207.
- Chen, C. J., and Traugh, J. A. (1995). Expression of recombinant elongation factor 1 beta from rabbit in *Escherichia coli*. Phosphorylation by casein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1264**, 303-311.
- Chen, E., Proestou, G., Bourbeau, D., and Wang, E. (2000). Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* **259**, 140-8.
- Chi, K., Jones, D. V., and Frazier, M. L. (1992). Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. *Gastroenterology* **103**, 98-102.
- Conway, J. F., and Parry, D. A. (1990). Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 328-334.
- Cormier, P., Osborne, H. B., Morales, J., Bassez, T., Puhle, R., Mazabraud, A., Mulner-lorillon, O., and Belle, R. (1991). Molecular cloning of *Xenopus* elongation factor 1gamma, major M-phase promoting factor substrate. *Nucl. Acid. Res.* **19**, 6644.
- 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.
- de Barry, J., Kawahara, S., Takamura, K., Janoshazi, A., Kirino, Y., Olds, J. L., Lester, D. S., Alkon, D. L., and Yoshioka, T. (1997). Time-resolved imaging of protein kinase C activation during sea urchin egg fertilization. *Exp Cell Res* **234**, 115-24.
- 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.

- Delalande, C., Monnier, A., Minella, O., Geneviere, A. M., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., and Cormier, P. (1998). Developmental regulation of elongation factor-1 delta in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae. *Exp Cell Res* **242**, 228-34.
- Delalande, C., Belle, R., Cormier, P., and Mulner-Lorillon, O. (1999). Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 425-431.
- Denny, P. C., and Tyler, A. (1964). Activation of protein biosynthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun* **14**, 245-9.
- Ejiri, S.-I., Ebata, N., Kawamura, R., and Katsumata, T. (1983). Occurrence of four subunits in high molecular weight forms of polypeptide chain elongation factor 1 from wheat embryo. *J. Biochem.* **94**, 319-322.
- Ejiri, S., and Honda, H. (1985). Effect of cyclic AMP and cyclic GMP on the autophosphorylation of elongation factor 1 from wheat embryos. *Biochem Biophys Res Commun* **128**, 53-60.
- Ejiri, S. (2002). Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 1-21.
- Ender, B., Lynch, P., Kim, Y. H., Inamdar, N. V., Cleary, K. R., and Frazier, M. L. (1993). Overexpression of an elongation factor-1 gamma-Hybridizing RNA in colorectal adenomas. *Mol. Carcinogen.* **7**, 18-20.
- 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. (1977). The program of fertilization. *Sci Am* **237**, 128-38.
- Epel, D. (1978). Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. *Curr Top Dev Biol* **12**, 185-246.
- Epel, D. (1990). The initiation of development at fertilization. *Cell Differ Dev* **29**, 1-12.
- 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**, 389-96.
- 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.
- Fernandez-Guerra, A., Aze, A., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Cormier, P., Bradham, C., Adams, N., Robertson, A. J., Marzluff, W. F., Coffman, J. A.,

- and Genevriere, A. M. (2006). The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Dev Biol*.
- Fumagalli, S., and Thomas, G. (2000). S6 phosphorylation and signal transduction. *In* "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 695-717. CSHL Press, New York.
- Gale, M., Jr., Tan, S. L., and Katze, M. G. (2000). Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 239-80.
- Gesteland, R. F., Weiss, R. B., and Atkins, J. F. (1992). Recoding: reprogrammed genetic decoding. *Science* **257**, 1640-1.
- Giudice, G. (1973). "Developmental biology of the sea urchin embryo." Academic Press, New-York.
- Gopalkrishnan, R. V., Su, Z. Z., Goldstein, N. I., and Fisher, P. B. (1999). Translational infidelity and human cancer: role of the PTI-1 oncogene. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 151-62.
- 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.
- 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. *Dev Biol* **114**, 403-15.
- Grainger, J. L., and Winkler, M. M. (1987). Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. *Mol Cell Biol* **7**, 3947-54.
- Gross, P. R., and Cousineau, G. H. (1964). Macromolecule Synthesis and the Influence of Actinomycin on Early Development. *Exp Cell Res* **33**, 368-95.
- Guerrucci, M. A., Monnier, A., Delalande, C., and Belle, R. (1999). The elongation factor-1delta (EF-1delta) originates from gene duplication of an EF-1beta ancestor and fusion with a protein-binding domain. *Gene* **233**, 83-7.
- Hartwell, L. H. (2002). Nobel Lecture. Yeast and cancer. *Biosci Rep* **22**, 373-94.
- Heinecke, J. W., Meier, K. E., Lorenzen, J. A., and Shapiro, B. M. (1990). A specific requirement for protein kinase C in activation of the respiratory burst oxidase of fertilization. *J Biol Chem* **265**, 7717-20.
- Hille, M. B., and Albers, A. A. (1979). Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature* **278**, 469-71.
- Hinegardner, R. T. (1969). Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol Bull* **137**, 465-75.

- Hiraga, K., Suzuki, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. (1993). Cloning and characterization of the elongation factor ef-1beta homologue of *saccharomyces-cerevisiae* - ef-1beta is essential for growth. *Febs Lett.* **316**, 165-169.
- Holcik, M., Sonenberg, N., and Korneluk, R. G. (2000). Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* **16**, 469-73.
- Hörstadius, S. (1973). "Experimental embryology of echinoderms." Clarendon Press, Oxford.
- Hsieh, S.-L., and Campbell, R. D. (1991). Evidence that gene G7a in the human major histocompatibility complex encodes valyl-tRNA synthetase. *Biochem. J.* **278**, 809-816.
- Hultin, T. (1961). The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia* **17**, 410-1.
- Humphreys, T. (1969). Efficiency of translation of messenger-RNA before and after fertilization in sea urchins. *Dev Biol* **20**, 435-58.
- Hunt, T. (2002). Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions. *Biosci Rep* **22**, 465-86.
- Jacob, A. N., Kandpal, G., and Kandpal, R. P. (1996). Isolation of expressed sequences that include a gene for familial breast cancer (BRCA2) and other novel transcripts from a five megabase region on chromosome 13q12. *Oncogene* **13**, 213-21.
- 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**, 14885-8.
- Janssen, G. M. C., Maessen, G. D. F., Amons, R., and Moller, W. (1988). Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity. *J. Biol. Chem.* **263**, 11063-11066.
- Janssen, G. M. C., and Moller, W. (1988a). Elongation factor 1betagamma from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur. J. Biochem.* **171**, 119-129.
- Janssen, G. M. C., and Moller, W. (1988b). Kinetic studies on the role of elongation factors 1beta and 1gamma in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **263**, 1773-1778.
- Janssen, G. M. C., Vandamme, H. T. F., Kriek, J., Amons, R., and Moller, W. (1994). The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia* - Why two alpha-chains in this complex? *J. Biol. Chem.* **269**, 31410-31417.

- Jeppesen, M. G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T. G., Nyborg, J., and Andersen, G. R. (2003). The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1B γ from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 47190-8.
- Jiang, S., Wolfe, C. L., Warrington, J. A., and Norcum, M. T. (2005). Three-dimensional reconstruction of the valyl-tRNA synthetase/elongation factor-1H complex and localization of the delta subunit. *FEBS Lett* **579**, 6049-54.
- Johnson, J. D., and Epel, D. (1976). Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. *Nature* **262**, 661-4.
- Jope, R. S., and Johnson, G. V. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**, 95-102.
- Joseph, P., Lei, Y. X., Whong, W. Z., and Ong, T. M. (2002). Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene. *J Biol Chem* **277**, 6131-6.
- Joseph, P., Lei, Y. X., and Ong, T. M. (2004). Up-regulation of expression of translation factors--a novel molecular mechanism for cadmium carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* **255**, 93-101.
- Jung, M., Kondratyev, A. D., and Dritschilo, A. (1994). Elongation factor 1 delta is enhanced following exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **54**, 2541-3.
- Kambouris, N. G., Burke, D. J., and Creutz, C. E. (1993). Cloning and genetic characterization of a calcium- and phospholipid-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae* that is homologous to translation elongation factor-1 gamma. *Yeast* **9**, 151-63.
- Kamiie, K., Taira, H., Kobayashi, K., Yamashita, T., Kidou, S., and Ejiri, S. (1999). Expression of elongation factor 1 beta' in *Escherichia coli* and its interaction with elongation factor 1 alpha from silk gland. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 666-71.
- Kamiie, K., Nomura, Y., Kobayashi, S., Taira, H., Kobayashi, K., Yamashita, T., Kidou, S., and Ejiri, S. (2002). Cloning and expression of *Bombyx mori* silk gland elongation factor 1gamma in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 558-65.
- Kamiie, K., Yamashita, T., Taira, H., Kidou, S., and Ejiri, S. (2003). Interaction between elongation factors 1beta and 1gamma from *Bombyx mori* silk gland. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 1522-9.
- Kanki, J. P., and Newport, J. W. (1991). The cell cycle dependence of protein synthesis during *Xenopus laevis* development. *Develop. Biol.* **146**, 198-213.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-23.

- Kato, K., Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Igarashi, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kanamori, M., Nakajima, K., Nishimura, Y., Shimojima, M., Phung, H. T., Takahashi, E., and Hirai, K. (2001). Epstein-Barr virus-encoded protein kinase BGLF4 mediates hyperphosphorylation of cellular elongation factor 1delta (EF-1delta): EF-1delta is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses in mammalian cells. *J Gen Virol* **82**, 1457-63.
- Kato, S., and Schroeter, S. C. (1985). Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, and its fishery in California *Marine Fisheries Review* **47**, 1-20.
- Kawaguchi, Y., Bruni, R., and Roizman, B. (1997). Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1delta: ICP0 affects translational machinery. *J. Virol.* **71**, 1019-1024.
- Kawaguchi, Y., Van Sant, C., and Roizman, B. (1998). Eukaryotic elongation factor 1delta is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the U(L)13 gene of herpes simplex virus 1. *J Virol* **72**, 1731-6.
- Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B., and Hirai, K. (1999). Cellular elongation factor 1 delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J. Virol.* **73**, 4456-4460.
- Kawaguchi, Y., Kato, K., Tanaka, M., Kanamori, M., Nishiyama, Y., and Yamanashi, Y. (2003). Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta. *J Virol* **77**, 2359-68.
- Keller, W., Konig, P., and Richmond, T. J. (1995). Crystal structure of a bZIP/DNA complex at 2.2 Å: determinants of DNA specific recognition. *J Mol Biol* **254**, 657-67.
- Kinzy, T. G., and Woolford Jr, J. R. (1995). Increased expression of *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factor 1 alpha bypasses the lethality of TEF5 allele encoding elongation factor 1 beta. *Genetics* **141**, 481-489.
- Kisselev, L. L., and Frolova, L. Y. (1999). Termination of translation in eukaryotes: new results and new hypotheses. *Biochemistry (Mosc)* **64**, 8-16.
- Kobayashi, S., Kidou, S., and Ejiri, S. (2001). Detection and characterization of glutathione S-transferase activity in rice EF-1beta'gamma and EF-1gamma expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 509-14.
- Kolettas, E., Lymboura, M., Khazaie, K., and Luqmani, Y. (1998). Modulation of elongation factor-1 delta (EF-1 delta) expression by oncogenes in human epithelial cells. *Anticancer. Res.* **18**, 385-392.
- Komar, A. A., and Hatzoglou, M. (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* **280**, 23425-8.

- Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Tatusov, R. L., Altschul, S. F., Bryant, S. H., Bork, P., and Valencia, A. (1994). Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain - Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Science* **3**, 2045-2054.
- Kumabe, T., Sohma, Y., and Yamamoto, T. (1992). Human cDNAs encoding elongation factor 1 gamma and the ribosomal protein L19. *Nucleic Acids Res* **20**, 2598.
- Lamberti, A., Caraglia, M., Longo, O., Marra, M., Abbruzzese, A., and Arcari, P. (2004). The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article. *Amino Acids* **26**, 443-8.
- Le Breton, M., Cormier, P., Belle, R., Mulner-Lorillon, O., and Morales, J. (2005). Translational control during mitosis. *Biochimie* **87**, 805-11.
- Lee, J. M. (2003). The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 69.
- Lew, Y., Jones, D. V., Mars, W. M., Evans, D., Byrd, D., and Frazier, M. L. (1992). Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. *Pancreas* **7**, 144-152.
- Liu, Y., Chen, Q., and Zhang, J. T. (2004). Tumor suppressor gene 14-3-3sigma is down-regulated whereas the proto-oncogene translation elongation factor 1delta is up-regulated in non-small cell lung cancers as identified by proteomic profiling. *J Proteome Res* **3**, 728-35.
- Lucas-Lenard, J., and Lipmann, F. (1966). Separation of three microbial amino acid polymerization factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 1562-6.
- Maessen, G. D., Amons, R., Zeelen, J. P., and Moller, W. (1987). Primary structure of elongation factor 1 gamma from Artemia. *FEBS Lett* **223**, 181-6.
- Maessen, G. D. F., Amons, R., Maassen, J. A., and Moller, W. (1986). Primary structure of elongation factor 1beta from Artemia. *Febs Lett.* **208**, 77-83.
- Mansilla, F., Friis, I., Jadidi, M., Nielsen, K. M., Clark, B. F., and Knudsen, C. R. (2002). Mapping the human translation elongation factor eEF1H complex using the yeast two-hybrid system. *Biochem J* **365**, 669-76.
- Marc, J., Belle, R., Morales, J., Cormier, P., and Mulner-Lorillon, O. (2004). Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol Sci* **82**, 436-42.
- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.
- 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.
- Mathur, S., Cleary, K. R., Inamdar, N., Kim, Y. H., Steck, P., and Frazier, M. L. (1998). Overexpression of elongation factor-1gamma protein in colorectal carcinoma. *Cancer* **82**, 816-821.
- Matsumoto, S., Oizumi, N., Taira, H., and Ejiri, S. (1992). Cloning and sequencing of the cDNA encoding rice elongation factor-1beta'. *Febs Lett.* **311**, 46-48.
- Matsumoto, S., Mizoguchi, T., Oizumi, N., Tsuruga, M., Shinozaki, K., Taira, H., and Ejiri, S. (1993). Analysis of Phosphorylation of Wheat Elongation Factor-1 beta and Factor-beta(') by Casein Kinase-II. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1740-1742.
- Matsumoto, S., Terui, Y., Xi, S., Taira, H., and Ejiri, S. (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding rice elongation factor 1 beta. *FEBS Lett* **338**, 103-6.
- McIlwain, C. C., Townsend, D. M., and Tew, K. D. (2006). Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* **25**, 1639-48.
- Meggio, F., and Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* **17**, 349-68.
- Meijer, L., and Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res* **174**, 116-29.
- Merrick, W. C., and Hershey, J. W. B. (1996). The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. *In* "Translational control" (J. W. B. Hershey, Mathews, M.B. and Sonnerberg, N., Ed.), pp. 31-69. CSHL Press.
- Merrick, W. C., and Nyborg, J. (2000). The protein biosynthesis elongation cycle. *In* "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 89-125. CSHL Press, New York.
- Mimori, K., Mori, M., S, T., T, A., and Sugimachi, K. (1995). The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma. *Cancer* **75**, 1446-1449.
- Mimori, K., Mori, M., Inoue, H., Mafune, K., Akiyoshi, T., and Sugimachi, K. (1996). Elongation factor 1 gamma mRNA expression in oesophageal carcinoma. *□Gut* **38**, 66-70.
- Minella, O., Cormier, P., Morales, J., Poulhe, R., Belle, R., and Mulner-Lorillon, O. (1994). cdc2 kinase sets a memory phosphorylation signal on elongation factor EF-1 delta during meiotic cell division, which perdures in early development. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 521-525.

- Minella, O., Mulner-Lorillon, O., De Smedt, V., Hourdez, S., Cormier, P., and Belle, R. (1996a). Major intracellular localization of elongation factor-1. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **42**, 805-810.
- Minella, O., Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Belle, R., and Cormier, P. (1996b). The guanine-nucleotide-exchange complex (EF-1 beta gamma delta) of elongation factor-1 contains two similar leucine-zipper proteins EF-1 delta, p34 encoded by EF-1 delta 1 and p36 encoded by EF-1 delta 2. *Eur J Biochem* **237**, 685-690.
- Minella, O., Mulner-lorillon, O., Bec, G., Cormier, P., and Belle, R. (1998). Multiple phosphorylation sites and quaternary organization of guanine-nucleotide exchange complex of elongation factor-1 (EF-1bgd/ValRS) control the various functions of EF-1a. *Biosci. Rep.* **18**, 119-127.
- Miyazaki, M., Uritani, M., Fujimura, K., Yamakatsu, H., Kageyama, T., and Takahashi, K. (1988). Peptide elongation factor 1 from yeasts: purification and biochemical characterization of peptide elongation factors 1 alpha and 1 beta (gamma) from *Saccharomyces carlsbergensis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem (Tokyo)* **103**, 508-21.
- 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**, 229-236.
- Morales, J., Cormier, P., Mulner-lorillon, O., Poulhe, R., and Belle, R. (1992). Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1delta. *Nucl. Acids Res.* **20**, 4091.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C. A., Beane, W. S., and Cormier, P. (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev Biol.*
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91.
- Motorin, Y. A., Wolfson, A. D., Lohr, D., Orlovsky, A. F., and Gladilin, K. L. (1991). Purification and properties of a high-molecular-mass complex between Val-tRNA synthetase and the heavy form of elongation factor 1 from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **201**, 325-331.
- Motorin, Y. U. A., Wolfson, A. D., Orlovsky, A. F., and Gladilin, K. L. (1988). Mammalian valyl-tRNA synthetase forms a complex with the first elongation factor. *Febs. Lett.* **238**, 262-264.

- Motoyoshi, K., and Iwawaki, K. (1977). Resolution of the polypeptide chain elongation factor-1 beta gamma into subunits and some properties of the subunits. *J. bi* **82**, 703-708.
- Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Cormier, P., Labbe, J. C., Doree, M., and Belle, R. (1989). Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an in vivo and in vitro p34cdc2 substrate. *FEBS Lett* **251**, 219-24.
- Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Cavadore, J. C., Morales, J., Poulhe, R., and Belle, R. (1992). Phosphorylation of *Xenopus* elongation factor-1 gamma by cdc2 protein kinase: identification of the phosphorylation site. *Exp Cell Res* **202**, 549-51.
- 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**, 20201-20207.
- Murakami, K., Ejiri, S., and Katsumata, T. (1978). Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Effect of EF-1b on EF-1a- and ribosome-dependent GTPase activity. *Febs. Lett.* **92**, 255-257.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-34.
- Namy, O., Duchateau-Nguyen, G., and Rousset, J. P. (2002). Translational readthrough of the PDE2 stop codon modulates cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **43**, 641-52.
- Namy, O., Rousset, J. P., Naphthine, S., and Brierley, I. (2004). Reprogrammed genetic decoding in cellular gene expression. *Mol Cell* **13**, 157-68.
- Negrutskii, B. S., and El'skaya, A. V. (1998). Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **60**, 47-78.
- Nierhaus, K. H. (1984). New aspects of the ribosomal elongation cycle. *Mol Cell Biochem* **61**, 63-81.
- Nigg, E. A. (1991). The substrates of the cdc2 kinase. *Semin Cell Biol* **2**, 261-70.
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471-80.
- Nigg, E. A. (2006). Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* **119**, 2717-23.
- Nordnes, S., Krauss, S., and Johansen, T. (1994). cDNA sequence of zebrafish (*Brachydanio rerio*) translation elongation factor-1 alpha: molecular phylogeny

- of eukaryotes based on elongation factor-1 alpha protein sequences. *Biochim Biophys Acta* **1219**, 529-32.
- Nurse, P. (1992). Eukaryotic cell-cycle control. *Biochem Soc Trans* **20**, 239-42.
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**, 547-50.
- 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.
- Nygaard, O., and Nilsson, L. (1990). Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *Eur J Biochem* **191**, 1-17.
- Ogawa, K., Utsunomiya, T., Mimori, K., Tanaka, Y., Tanaka, F., Inoue, H., Murayama, S., and Mori, M. (2004). Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*.
- Olarewaju, O., Ortiz, P. A., Chowdhury, W. Q., Chatterjee, I., and Kinzy, T. G. (2004). The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway. *RNA Biology* **1**, 89-94.
- Olds, J. L., Favitt, A., Nelson, T., Ascoli, G., Gerstein, A., Cameron, M., Cameron, L., Lester, D. S., Rakow, T., De Barry, J., and et al. (1995). Imaging protein kinase C activation in living sea urchin eggs after fertilization. *Dev Biol* **172**, 675-82.
- Palen, E., Huang, T. T., and Traugh, J. A. (1990). Comparison of phosphorylation of elongation factor 1 from different species by casein kinase II. *FEBS Lett* **274**, 12-4.
- Palen, E., Venema, R. C., Chang, Y. W., and Traugh, J. A. (1994). GDP as a regulator of phosphorylation of elongation factor 1 by casein kinase II. *Biochemistry* **33**, 8515-20.
- 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.
- 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.
- Perez, J. M. J., Siegal, G., Kriek, J., Hard, K., Dijk, J., Canters, G. W., and Moller, W. (1999). The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1 beta reveals a striking resemblance to that of EF-Ts from *Escherichia coli*. *Structure with Folding & Design* **7**, 217-226.

- Peters, H. I., Chang, Y. W. E., and Traugh, J. A. (1995). Phosphorylation of elongation factor 1(EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity. *Eur. J. Biochem.* **234**, 550-556.
- Philipova, R., and Whitaker, M. (1998). MAP kinase activity increases during mitosis in early sea urchin embryos. *J Cell Sci* **111 (Pt 17)**, 2497-505.
- Polacek, N., and Mankin, A. S. (2005). The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 285-311.
- Pomerening, J. R., Valente, L., Kinzy, T. G., and Jacobs, T. W. (2003). Mutation of a conserved CDK site converts a metazoan Elongation Factor 1Bbeta subunit into a replacement for yeast eEF1Balpha. *Mol Genet Genomics* **269**, 776-88.
- Pommier, Y., and Kohn, K. W. (2003). [Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]. *Med Sci (Paris)* **19**, 173-86.
- Proud, C. (2000). Control of the elongation phase of protein synthesis. In "Translational control of gene expression" (N. Sonenberg, J. Hershey, and M. Mathews, Eds.), pp. 719-739. CSHL Press, New York.
- Proud, C. G. (1994). Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol Biol Rep* **19**, 161-70.
- Proud, C. G. (2006). Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans* **34**, 213-6.
- Raff, R. A., Brandis, J. W., Huffman, C. J., Koch, A. L., and Leister, D. E. (1981). Protein synthesis as an early response to fertilization of the sea urchin egg: a model. *Dev Biol* **86**, 265-71.
- Richter, J. D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477-80.
- Riis, B., Rattan, S. I., Clark, B. F., and Merrick, W. C. (1990). Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci* **15**, 420-4.
- 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.
- 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.
- Sanders, J., Maassen, J. A., and Moller, W. (1992). Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucleic Acids Res* **20**, 5907-10.

- Sanders, J., Raggiaschi, R., Morales, J., and Moller, W. (1993). The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1 delta. *Biochim. Biophys. Acta* **1174**, 87-90.
- Sanders, J., Brandsma, M., Janssen, G. M., Dijk, J., and Moller, W. (1996). Immunofluorescence studies of human fibroblasts demonstrate the presence of the complex of elongation factor-1 beta gamma delta in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **109 (Pt 5)**, 1113-7.
- Sang Lee, J., Gyu Park, S., Park, H., Seol, W., Lee, S., and Kim, S. (2002). Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 158-64.
- Schatt, P., Moreau, M., and Guerrier, P. (1983). Variation cyclique de la phosphorylation des protéines and de l'activité MPF pendant la segmentation précoce de l'oeuf d'oursin. *C.R. Acad. Sci. Paris* **296**, 551-554.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.
- Sheu, G. T., and Traugh, J. A. (1997). Recombinant subunits of mammalian elongation factor 1 expressed in Escherichia coli. Subunit interactions, elongation activity, and phosphorylation by protein kinase CKII. *J Biol Chem* **272**, 33290-7.
- Sheu, G. T., and Traugh, J. A. (1999). A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII. *Mol Cell Biochem* **191**, 181-6.
- Sinha, P., Kohl, S., Fischer, J., Hutter, G., Kern, M., Kottgen, E., Dietel, M., Lage, H., Schnolzer, M., and Schadendorf, D. (2000). Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 3048-57.
- Slobin, L. I., and Moller, W. (1978). Purification and properties of an elongation factor functionally analogous to bacterial elongation factor Ts from embryos of *Artemia salina*. *Eur. J. Biochem.* **84**, 69-77.
- Sonenberg, N., and Dever, T. E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 56-63.
- Sprinzi, M. (1994). Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem Sci* **19**, 245-50.
- Stahl, G., and Rousset, J. P. (1999). Les surprises du décodage de l'information génétique. *Med Sci (Paris)* **15**, 1118-1125.
- Swann, K., and Whitaker, M. J. (1990). Second messengers at fertilization in sea-urchin eggs. *J Reprod Fertil Suppl* **42**, 141-53.

- Terui, Y., Tsutsumi, K., Kidou, S., Sawazaki, T., Kuroiwa, Y., Yamaki, M., and Ejiri, S. (1998). A novel variant of translation elongation factor 1 beta: isolation and characterization of the rice gene encoding EF-1beta2. *Biochim. Biophys. Acta* **1442**, 369-372.
- Thornton, S., Anand, N., Purcell, D., and Lee, J. (2003). Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J Mol Med* **81**, 536-48.
- Tokumoto, M., Nagahama, Y., and Tokumoto, T. (2002). A major substrate for MPF: cDNA cloning and expression of polypeptide chain elongation factor 1 gamma from goldfish (*Carassius auratus*). *DNA Seq* **13**, 27-31.
- Traugh, J. A. (2001). Insulin, phorbol ester and serum regulate the elongation phase of protein synthesis. *Prog Mol Subcell Biol* **26**, 33-48.
- Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* **2**, 893-8.
- Valente, L., and Kinzy, T. G. (2003). Yeast as a sensor of factors affecting the accuracy of protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2115-30.
- Van Damme, H., Amons, R., Janssen, G., and Moller, W. (1991). Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1betagamma. *Eur. J. Biochem.* **197**, 505-511.
- Van Damme, W. T. F., Amons, R., Karssies, R., Timmers, C. J., Janssen, G. M. C., and Moller, W. (1990). Elongation factor 1beta of artemia : localization of functional sites and homology to elongation factor 1delta. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**, 241-247.
- van der Velden, A. W., and Thomas, A. A. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 87-106.
- Vanwetswinkel, S., Kriek, J., Andersen, G. R., Guntert, P., Dijk, J., Canters, G. W., and Siegal, G. (2003). Solution structure of the 162 residue C-terminal domain of human elongation factor 1Bgamma. *J Biol Chem* **278**, 43443-51.
- Venema, R. C., Peters, H. I., and Traugh, J. A. (1991a). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity. *J Biol Chem* **266**, 12574-80.
- Venema, R. C., Peters, H. I., and Traugh, J. A. (1991b). Phosphorylation of valyl-tRNA synthetase and elongation factor 1 in response to phorbol esters is associated with stimulation of both activities. *J. Biol. Chem.* **266**, 11993-11998.
- Vickers, T. J., and Fairlamb, A. H. (2004). Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J Biol Chem* **279**, 27246-56.

- Vickers, T. J., Wyllie, S., and Fairlamb, A. H. (2004). Leishmania major elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J Biol Chem* **279**, 49003-9.
- 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.
- Wang, J. F., Engelsberg, B. N., Johnson, S. W., Witmer, C., Merrick, W. C., Rozmiarek, H., and Billings, P. C. (1997). DNA binding activity of the mammalian translation elongation complex: recognition of chromium- and transplatin-damaged DNA. *Arch Toxicol* **71**, 450-4.
- Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Sodergren, E., Davidson, E. H., Cameron, R. A., and Consortium, T. S. U. G. S. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **Sous presse**.
- Whitaker, M., and Larman, M. G. (2001). Calcium and mitosis. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 53-8.
- Winkler, M. M., Steinhardt, R. A., Grainger, J. L., and Minning, L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature* **287**, 558-60.
- Xiao, H., Neuveut, C., Benkirane, M., and Jeang, K. T. (1998). Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 384-9.
- Zhang, W. L., Huitorel, P., Glass, R., Fernandez-Serra, M., Arnone, M. I., Chiri, S., Picard, A., and Ciapa, B. (2005). A MAPK pathway is involved in the control of mitosis after fertilization of the sea urchin egg. *Dev Biol* **282**, 192-206.
- Zhang, W. L., Huitorel, P., Geneviere, A. M., Chiri, S., and Ciapa, B. (2006). Inactivation of MAPK in mature oocytes triggers progression into mitosis via a Ca²⁺-dependent pathway but without completion of S phase. *J Cell Sci* **119**, 3491-501.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : alignement ClustalX sur EF1B α (données supplémentaires de l'article 3)

Alignement par ClustalX de 108 sequences pleine taille des protéines EF1B α accessibles comme décrit dans l'article 3. Dans un souci de clareté, les noms communs des organismes sont utilisés. Les noms binominaux sont accessibles à partir des numéros d'accession associés au noms des organismes. Les encadrements bleus dénotent les motifs conservés caractéristiques du domaine d'échange de nucléotide et nécessaires à cette activité comme décrit dans l'article 3. Les encadrements rouges correspondent aux sites consensus de phosphorylation par CK2. Les sites potentiels de phosphorylation par CDK sont indiqués en gras.

ADDITIONAL DATA 1 Clustalw alignment of EF1B α from eukaryotes

humanP24534 -----MGFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAVSPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKALGKY
humanEAL24079 -----MGFRDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIKG-----YVPSQADVAVFEAVSGPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKAGLPGVKKALS
chimpanzeeXP_520983 -----MGFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIKG-----YVPSQADVAVFEAVSPLPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKALGKY
cowBM430586 -----MGFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAVSGPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKALGKY
pigP29412 -----MGFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAVSGPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKALGKY
dogXP_536040 -----MGFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAVSGPPPADLYHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKALGKY
rabbitP34826 -----MGFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAVSGPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGIKKALGTY
rattusXP_343581 -----MGFGDLKTPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAISGPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKSLGKY
mouseO70251 -----MGFGDLKTPAGLQVLNDYLADKSYIEG-----YVPSQADVAVFEAVSGPPPADLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKSLGKY
chickenAAD16874 -----MGFGDLKSAAGLRVLDNDFLADKSYIEG-----YVPSQADIAVFEAVGAPPADLFHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKALGKY
XlaevisP30151 -----MGFGDLKSPAGLVKLFADKSYIEG-----YVPSQADVAVFDALSAAPPADLFHALRWYNHIKSYEK-QKSSLPVKKALGNY
XtropicalisAAH77005 -----MGFGDLKSPAGLVKLFADKSYIEG-----YVPSQADVAVFDALSGAPPADLFHALRWYNHIKSYEK-QKSSLPVKKPLGNY
axolotlBI817658 -----MGFGDLKSPAGLQVLNTFLADRSYIEG-----YVPSQADVAVFEALISGAPPDGLFHVLRWYNHIKSYEK-QKGSPLGVKKPLGKY
dogfishsharkCX197134 -----LPGGQELIDG-----YVPSQADIAVFEALGAPSAAFYHALRWYNHRSYES-TKTSPLGVKQPLGKY
channelcatfishCK418875 -----MGFGDLKTPAGLVKLFADKSYIEG-----YVPSQADVAVFDALSGAPPDGLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKPLGQY
catfishCK406934 -----MGFGDLKTPAGLVKLFADKSYIEG-----YVPSQADVAVFDALSGAPPDGLCHALRWYNHIKSYEK-EKASLPGVKKPLGQY
zebrafishAAQ97772 -----MGFGDLKTPAGLVKLFADKSYIEG-----YVPSQADIAVFDALSGVPSADLCHALRWYNHIKSYEK-EKGSPLGVKKPLGQY
rainbowtroutCF752596 -----MGFGDLKTPGGLKVLNDFLADKSYIEG-----WVPSQADVAVFDALPSAPSTVQCHALRWYNHIKSYEK-QKGSPLGVKKPLGQY
killifishCA846714 -----MGFGDLKKAASGLKVLNDFLSDRSYIEG-----FVPSQADVAVFEVLSAPPADLCHALRWYNHRSYQS-QKGSPLGVKKALGQY
medakaAV669850 -----MGFGDLKSSSGLKVLNDFLSDRSYIEG-----YVPSQADVAVFEVLSAPPADLCHALRWYNHIKSYQA-QKNSLPVKKPLGQY
takifuguCA846714 -----MGFGDLKKAASGLKVLNDFLSDRSYIEG-----YVPSQADTVVFDALISGAPPADLCHALRWYNHIKSYEK-QKNSLPVKKPLGQY
ascidiaAU240208 -----MGFGDLKSDAGXKTLNEFLQDKSYIEG-----YVPSQADVAVFESIANAPNSFAHALRWYNHINSYKS-SFDSLPGVKKPIDSY
cionaaABS01000152 -----MKKSNINASLY---LPQIFKPSFYSSR-----YVPSQDVVVVFAAISAAPASKFCHALRWYNHMKSYQC-KFASLPGVKKALEQC
SpurpuratusAJ973180 -----GTASQADVIVFKAMSGAPAEALFNALRWYNQVKSYSSTFTSLPGVAKALGDYG
hydraCX055521 -----MGFGHLKTDAGIKSLNEYLADKSYIEG-----YVATQADTAIILKAIASAPNPKYPHALRWYNHINSFTVGEQSSFPGETDAVEY
hydractiniaCO539929 -----MGFGDLKTDAGLKSLNSFLADKSYVDG-----FTPSQADVAVFQALSSAPDSSHAVLRWYKHLQSYSTQDRDGFQKQKAITTEY
schistosomaAAP06142 -----MMDFGNLSSDSALKKLDDFLTRSYISG-----FQPTQADASTYIAVGKLPSSSFGNVRWYRHIDSFQA-ERKQFPAPGKSDHPE
echinococcusBQ173787 -----MVFGDLKRSEGLECLNAFLTRSYIEGLFAIFVIYCIDFRFQPSKADAVFDADADAKYLNVLRWYNHINSFGD-ERKRFPEAKDVSNE
earthwormCO408634 -----MSFGDLKAASGLKALNDYLQDKSYIEG-----YQPSQADTATFQKLAGLPGKDYINVLRWYNHINSYGA-EKASFPGQKSSSEVN
bluecrabCV527893 -----MTKFGNLTNTNSGVQALNDYLGDRSYVEG-----YSPSQADVAVFEGLGKQPNPQFVHALRWYNHITSFQS-AKSKFPGSKPAPAK
bluecrabCV527425 -----MTKFGNLTNTDSGIGALNDYLGDRSYVEG-----HSPSQADVAVFEGLGRAPNPQFAHALRWYSHISSFQA-GRSKFPGSKPASP
tigershrimpCO777187 -----MPNFGDLKSDAGVKALNDYLGDKSYIEG-----FVPSQDDVAVFEALGKAPAGKYSHALRWYNHISSFQA-EKSKFPGVKKALS
brimeshrimpP12262 -----MANIDLKAEKQQLNELLANKSYLQGL-----YEPSQEDVAVFQNLNAPSKDFPYPYLLRWYKHISFSDAEKGFPGIPTASAK-
mosquitoAAS79338 -----MAFGDVKTPKGLQELNLFADHSYIEG-----YVPSKADLSVFDALGKAPAGDYVHVQRWYRHIAFSSQERAAWGGQALPQVAG
anophelesXP_314575 -----MAFGDVKTANGLKELDKFLADHSYIEG-----YAPSKADLSVFDALGKAPATHVHALRWYNHIAFNAKERSEWGGQALPQVAG
drosophilaNP_524808 -----MAFGDVTPQGLKELNAFLADNSYISG-----YTPSKADLSVFDALGKAPADNVNVARWYRHIAFEEAERAASGTPLPQLAG
silkwormS35514 -----MAVGDVKTAQGLNDLNLQYLAEKSYVSG-----YTSPQADVQVFEQVQKAPANLPHVLRWYNQIASYTSERKTWSQGTSP
antheraeaBAD22537 -----MAVGDVKTAQGLNDLNLQYLAEKSYVSG-----YTSPQADVQVFEQVQKAPANLPHVLRWYNQIASYTSERKTWSQGTSP
lonomiaCX816635 -----LNELNQYFAEKSYVSG-----YTSPQADVQVFEQVQKAPASLPHILRWYNQIASYTPAERKTWSEGTSP
plutellaBAD26687 -----MAFGDVKSAQGLNQLNQLFLAEKSYISG-----WVPTSADVQVFEQVQKAPASLAHALRWYNQIASYTPAERKAWPAGASP
trichinellaBG520039 -----KRFSSWPAKLSFEIDLKVLNLSLETKSYING-----YFPSSADVQTFNQIKNPP-TTLHHLQRWFHHIASFTDAERAKWPKXS-----
xiphinemaCV509799 -----MPAFNIVNELNSWLESRSYIEG-----YVPSQDQVAVFDNLKSPKSDSPHVLRWYNHIKSYSAERTKFGDAGVSSSG
haemonchusBG734277 -----FDVKTTPAGLSAFNEVLHTQAFATG-----FVLSGEDSTLFEAIGSAPCAKTYPNVARWYRNIAFYDKSERSAWPSAGGSAGGD
teladorsagiaCB036417 -----MMFDVKTTPAGLAAFDEALHTQAFATG-----FVHSGEDSTLFEAIGSAPCAKTYPNVARWYRNIAFYDKSERSAWPSAGGSAGGD
ancylostomaceylanicumCB338885 -----MVDVKTTPAGLAAFNETLSTQAFATG-----FVLSGEDSTLFDALGSAPCAKTYPHIARWYKNIAFYDKSERSWPSAGGSAGGD
caenorhabditisP34460 -----MVDVKSAPGLAAFNTTLAEQAFATG-----FVLSGEDAQLFAALGSAPNASTYPNVARWYANVASYTDAERKTWASAGGSAPAA
ostertagiaBG734048 -----ELRETIKFTTRMQVIPAKYEPVAE-----GKKE
ascarisCA850439 -----QTRFGSSRIHNFADNFAFATG-----FTLAGEDSCLFAGLGKAPDAKKYANVARWYKHIAFYTDDEERAAWPVASAVKKH
toxocaraBQ125810 -----MFFVNSESGLAAFNFKFLADNFAFASG-----FTLSGEDACLFAIGKAPDPKKYANVARWYRNIAFYTDDEERKTWPVAGASVEKH
parastrongyloidesBM514785 -----GGXLEFCKKKQITHCATGIH-----ALAGRRIIAYIDGLGKAPDAKKYANVDRWYKHIAFYTDDEERAAWPVASAVKKH
dirofilariaBQ482657 -----MYDSKADDGLASFDRHLENFAYASG-----YTPSGDDVQLFKSLNSEP-PKKYANISRWRNIGSFSDEEQKSWSPMTSSNGD
pratylenchusBQ580837 -----MYDLKADDGLASFDRHLENFAYASG-----YTPSGDDVQLFKSLNSEP-PKKYANISRWRNIGSFSDEEQKSWSPMTSSANGD
brugiaBU917478 -----RLAPKTDGDLAFAFDGHLKDFAYASG-----YTPSGDDMQLFASLSAEP-TMKYVNLVLRWYRNISFNDEERKLWPAAPMITSANGV
strongyloidesBI450830 -----SSAADLAAFNAFLYGLDFPYAGG-----YTISSKDFTLFNLFKSTPCSKAYEHLRWYKNVASFSDSEKAFGEPSPTAG--
pristionchusBI500556 -----SSAADLAAFNAFLYGLDFPYAGG-----YTISSKDFTLFNLFKSTPCSKAYEHLRWYKNVASFSDSEKAFGEPSPTAG--
-----AAPDAKKFANVARWYKNVASFSDSEKAFGEPSPTAG--

globoderaAW506065 -MAQQQAHNGVAVTSKELTEFNCLSSRAYLHG-----FLPSQEDQYVFKSLTMAPSAKEYPHIDRWYKHIKSYDDAERSAWPMKTGGSPQT
 heteroderaCA939761 --MPKRPSVGMTVSKELNELNCLSTRAYLHG-----FLPSQEDQYVFKSIKSVSPSEKEYAHVARWYKHIQSFDDVERLNWSKKAGQTTQT
 radopholusCO960987 -----WPQKAGGPPST
 meloidogyneCN578407 MADFNGLLNGAPSTEEQFKQLNEHLATRGYLKG-----FLPSTEDSYVFGVLKSSSTISAQYPHVARWFKHMQSFSDDVEQGTGWPKSGVGGSGP
 dictyosteliumAAG23402 -----MPSFADLTTENGLVELNKFVSDKTYIVG-----FVPSSADVQAFNLVKTAPCATKYPHAARWFNTIASYSAAEQGQFEKVTETVTIA
 dictyosteliumBAA25924 -----MLLADLTTENGLVELNKFVSDKTYIVG-----FVPSSADVQAFNLVKTAPCATKYPHAARWFNTIASYSAAEQGQFEKVTETVTIA
 candidaCAA65366 -----MSFSDFSKVESIKSLNEFLADKSYIDG-----TTATQADVTVYKAFQKE----FPQFTRWFNHIASFTEEFEDLPAGKAPAASGS
 debaryomycesCAG86246 -----MSFSDFSKVETIKSLNEFLADKSYIEG-----TSATQADVTVYKAFQKE----FPQFARWFNHIASFTEEFELPAGKVPASS--
 kluyveromycesXP_453023 -----MSFSDFSKVETLQKLNDFLADKSYIEG-----TSATQADVTVYKAFQST----YPEFSRWFNHIASKADQFESLPAATS**TPAAA**-
 eremotheciumNP_985550 -----MSFSNFSKIETVQELNSFLADKSYIEG-----TSATQADVTVYKAFQET----YPEFSRWFNHIASKQEEFESLPAASKAAAAE-
 ScerevisiaeAAC04954 -----MASTDFSKIETLQKLNADLADKSYIEG-----TAVSQADVTVYKAFQSA----YPEFSRWFNHIASKADEFDSFPAASAAAAEE-
 yarrowiaCAG78025 -----MGFSDLSSAAGLTQLNFLVSKSYIEG-----NAASQADVTVYKAVASAPDAEKYPNARWFKHIAAQEDHSALPGTAKEASAYGP
 aspergillusCK447312 -----MGFTDFVSDAGLTIANTFFGSRSYVVG-----TSPSQADVTVYKAVFSAAPDAEKYPNARWYKHIASYEPEFGSLPGDASKAFTAY
 penicilliumAAR17475 -----MGFTDFVSDAGLSLANNYLATRSYIVG-----HAPSQADVTVYKAFASAPDAEKYPHVARWYKHIASYESEFPTLPGDASKAFTAY
 leptosphaeriaAAO49454 -----MGFTDFVSDAGLTLNWNVVKTRSYIVG-----YTSPQADVTVYKQIKQIPAPEKFPYAWRWYNHILTFEGEFESLPGDPTKEHTAY
 podosporaCAD60576 -----MGFTDLLSDAGLTVLNNWLLTRSYVTGYALLQR-----YSASQADVTVYKALSSAPDAEKYPNARWYKHIASYESEFPTLPGDASQPYTVY
 botrytisAL116697 -----PDAKFPHARWYKHINSWTEEFGLTLPGDASKAFTAY
 neurosporaXP_325890 -----MGFTDLLTDAGLAVLNNWLLTRSYVTG-----YTASQADVTVYKALKEAPSAEKYPNARWYKHIATYEDEFATLAGDSSAPYTTY
 gibberellaXP_381184 -----MGFTDLLSETGAVLNSWLSTRSYIVG-----QSASQADVTVYKALSGPPSGESYPHARWYKHIASYESQFATLPGDASAPYSTY
 magnaportheXP_361991 -----MGFADILTDAGLAMLDLWLSSTRSYIVG-----NSASQADVTVYKALSSAPDATKYANARWYKHIASFEDFNLPDGDSTKAYTEY
 SpombeBAA31571 -----MGFSDDLTSADGLKALNDFLADKSYIEG-----YEPSQADVTVYKAVFSAAPDAEKYPNARWYKHIATYDLATLPGDASKAFTAY
 cryptococcusAAW42367 -----MASTIDLKQLEQLHATRSYIDG-----FKPTTADVEIYKSLGSAPEATFP-HCHRWYHIASFADEFDSLPL----AGANPL
 ustilagoXP_398804 -----MSLPDFSSAANLAKLDGFLADKSYVVG-----HSASQADVTVYEAIGKAPEADKYSHVARWYEHIASYEAHEKDLTGDKAKAASLL
 potatoBF153797 -----MAITFSNLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAISEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 sweetpotatoAAT40505 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAISEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 tomatoAI482839 -----MAVTFSNLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 hotpepperAY480020 -----MAVTFSNLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 cottonAI730108 -----MAVTFSNLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 thalecressAJ249596 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 thalecressAJ249597 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 appletreeCV187174 -----MAITFSDLYTDAGLKADEFKLAGKSYISG-----DKLTLDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 wheatD13147 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 barleyCV060437 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 cornBT016181 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 sorghumBM324222 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 riceD12821 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 riceXM_506540 -----MAVTFSDLHTEAGLKSVDHLSGKTYISG-----DQLTKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 entamoebaEAL48944 -----NAISKDDIKVYGAILEQPSDLYPNASKWYQAVSAKLASSFPGKAVGVRFGS-Q
 TcruziAAA67700 -----MSVKDVKNFKSELEGLKGLKFLGG-----TKPSEEDVVKLFNDLLGAENTSLYLWVKHMTSFTTEERKAWGAPVKVT---
 TbruceiAAX79212 -----MSIKDENVKSGKLEELKGLKFLGG-----VKPSEEDVVKAFNDLLGGDNTNFRWVKNIASFTEAERTAWGAPVKI**TPPV**
 LmajorAAU06825 -----MSLKDVSCKAAELESKLSGKFLGG-----AKPTAEDVVKAFNDLLGANHVNLRYWAKNMTATYAEGERKAWGAPVRVAAPAE
 LguyanensisAAV32818 -----MSVKDVSCKAAELEARLGGKFLGG-----AKPTAEDVVKAFNDLLGANHSLYRWKNMTATYTEGERKAWGAPVRVAAPAE
 TcruziAAA30183 -----NSARVKDAMTTKELNGLRSLSSQPYVSG-----YCPAR-KTRRYSLRCS-ARLALWLSGPHVWLRTIKRTEQILKG-----
 TcruziCB923623 -----MTTLKELNGLRSLSSQPYVSG-----YCPSEDVVKAFNDLLGGDNTNFRWVKNIASFTEAERTAWGAPVKI**TPPV**
 LmajorAAU06824 -----MSTLKEVNGRLNTQPFVSG-----FSPSSEDARIFNEMFG-SNVNVIQWVARMASYYQAEERDEILNAGTEKKAT
 PfallciparumAAF27524 -----MASNASLLNVKGEEDYHNLNSFFESHYVDN-----YSVGFKDIKIYHQIKTVIKKDTYPHLFRWFHHISSLPEFLLNQYDEEHNKCKKN
 PyoeliiEAA18321 -----MASNNANLLTVKGESDYGKLSNFFAENSFYFN-----YMLSGNDIKIYHQIKCVINKDSYPHLYRWYHNSLPPNYVLDKYMNDKCKKN
 neosporaCF796953 -----MVVPDFGNLKSIDIGVGLKNEYLASRSFITG-----YTATQDDAIFPSKLLGAPNATKFFVDASRWYRHSV**SPVQ**KAAPWPKGELSAEKP
 toxoplasmaCB028880 -----MVVPDFGNLKSIDIGVGLKNEYLASRSFITG-----YSATQDDAIFPSKLLGAPNATKFFVDASRWYRHSV**SPVQ**KAAPWPKGELSAEKP
 toxoplasmaAA520212 -----HIRTNRHISALCPLFLSTMVTA-----FATSDELATPCTYYT-----LTWE**TPLR**RPEK-
 cryptosporidiumEAK88639 -----MDKFGDISTDAGRKKLNDYLSSTRSYMNG-----VSPTQDDVEALYMIKAGGFCDFQHCRIYVSHIQSFSAMERDAFPGESFKNKLL
 tetrahymenaAAW02920 -----MTFTITDLTITIEKHLAAHTFLSG-----TDKPAKIDATIVNELKAAKVPVSTHPNIYAWYSF**TPEA**QSQWADVAPVVAAK
 giardaAACB01000127 -----MAG-----FVPSLNDHIMYTHVCSMDVAPEMHHVLRWLWSHMKSFSQAERAALPAKGIKCDFA
 spironucleusAAO61467 -----ARAFDAAGMKKLEHLADKAYLNG-----FTISKNDIAICYGKITKSELKVDLVNIKRWMAHMSYTTLAEVSTFTGKVTACAMC

humanP24534	G-----PADVEDTTGSGATD---SKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
humanEAL24079	G-----PADVEDTTGSGATD---SKDDDD---IDLF	GSDDVEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
chimpanzeeXP_520983	G-----PADVEDTTGSGATD---SKDEDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
cowBM430586	G-----PANVEDTTESGATD---SKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
pigP29412	G-----PANVEDTTESGATD---SKDDDD---IDLF	XXXXXXXXXX	AKXKLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSXXXXXVK
dogXP_536040	G-----PANVEDTTGSGATD---SKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
rabbitP34826	G-----PADVEDTTGSGATD---SKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
rattusXP_343581	G-----PVSVDTTGSGAAD---AKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EDAKRLREER-LAQYESKKA	-----AVVAKSSILLDVK
mouseO70251	G-----PSSVEDTTGSGAAD---AKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----AVVAKSSILLDVK
chickenAAD16874	G-----PADVEDTTGSGATD---SKDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EEAKRLREER-LAQYESKKA	-----ALVAKSSILLDVK
XlaevisP30151	G-----PVNIEDTTGSAKETKEEDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EDAKRVREER-LAQYEAKKS	-----TLIAKSSILLDVK
XtropicalisAAH77005	G-----PVNIEDTTGSTAKDTKEEDDDDD---IDLF	GSDDDEEES	EESKRVREER-LAQYEAKKS	-----ALIAKSSILLDVK
axolotlBI817658	G-----PSDIEDTTGSKATESKEDDDDD---IDLF	GSDEEEES	EESKRIREER-LAQYESKKS	-----ALIAKSSILLDVK
dogfishsharkCX197134	G-----PQNVADT---TPTKAVADDDDD---IDLF	GSDDDEEET	ADAKRIKEER-LAQYEAKKS	-----TLIAKSSIFLDVK
killifishCA846714	G-----PVGVEDTTSGSAPVKEEEEDDD---DIDLF	GSDEEEDDE	T-KRIKEER-LAAYNEKKS	-----ALIAKSSILLDVK
catfishCK406934	G-----PVGVEDTTSGAAPVKEEEEDDD---DIDLF	GSDEEEDDE	T-KRIKEER-LAAYNEKKS	-----ALIAKSSILLDVK
zebrafishAAQ97772	G-----PAGVEDTTAAAPAAADEDDD---DIDLF	GSDEEEDDE	EAA-KIKEER-LAAYNAKKA	-----ALIAKSSILLDVK
rainbowtroutCF752596	G-----PSGVEDNTAADSKDDDD---DMDLF	GSDDDEEDA	EAE-RLKEER-LAAYAAKKS	-----TLIAKSSILLDVK
killifishCA846714	G-----PAGVADTTSGSAPAASKDDDDDD---DIDLF	GSDEEEDDE	EAA-KLTEQR-LAEYAACKA	-----GLIAKSSILLDVK
medakaAV669850	G-----PTGVADTTSSGPAASKDEDDD---DIDLF	GSDEEEDDE	EAA-KLKEQR-LAEYAACKA	-----ALIAKSSILLDVK
takifuguCA846714	G-----PPGVADTTASAKPAAKDDDD---DIDLF	GSDEEEDDE	ETA-RIKEER-LAQYAACKS	-----TVIAKSSILLDVK
ascidiaAU240208	G-----PAQAMSNHSGKTEDIDEDDDDD---IDLF	GSDDDDDDN	EYERIKAER-VAAYQAKKSE	-----AVIAKSNIFDVK
cionaAABS0100152	G-----PSAVTNGTAAAESDEDSDDD---VDLF	GSDEEES	EADKKIREDR-LAAYAAKKS	-----ALIAKSSIFLDVK
SpurpuratusAJ973180	P-----AGTPAAAKKPAAGDDDDDDDFDCL	GSDEEES	EAKPAKTKIEVKKPKK	-----VVIKSSVFLDVK
hydraCX055521	G-----PRGTEQAKVNDDD---IDLFGDE	ESEETE	E---KRIKEKRLADYHAKKAT	-----ALIAKSMIVLDVK
hydractiniaCO539929.echinata	G-----PRGNEQAGKADDDDF---DLFDDDDDE	EEEEETE	E---QKKIKEER-LAAYAKKS	-----AVVAKSSILLDVK
schistosomaAAP06142	A-----KVAVDKCASPTD---NEDDLF	GSDDDEE	E---YELRSEER-QAVYEAKKAN	-----VPVAKSTIVLDVK
echinococcusBQ173787	G-----PLEVPTSATN---GEKDE--DSDDL	ASDDDEE	VE---KRHAEC--IAAYNAKKA	-----KPIAKSMIILDVK
earthwormCO408634	G-----SAPAKKEEKE---AEDDD--DFDPL	KSDEEDDA	EAE-RIKQER-LAAYEAKKS	-----AIIAKSNIVLDVK
bluecrabCV527893	-----VEVKEEED---DDEV---NLF	GSDDDEEER	DAEAARVREERLASYAACKA	-----GPIAKSQILLDCK
bluecrabCV527425	-----VEVKEEKE---DDDE---VDLF	GSDDDEEER	DAEAARVREER-LASYAACKA	-----GPIAKSQILLDCK
tigershrimpCO777187	A-----PAPAAADDD---DDDE---VDLF	GSDEEEDDE	E---EAEKIKAEER-MKAYS	-----AIVAKSSVILDIK
brimeshrimpP12262	-----EEDDD---VDLF	GSDEEEDDE	E---EAEKIKAEER-MKAYS	-----AIVAKSSVILDIK
mosquitoAAS79338	G-----KPTVAAPAKPAAD---EDDDD---VDLF	GSDEEES	EAEAKIKAEER-LAAYNAKKS	-----ALIAKSSIILDVK
anophelesXP_314575	G-----KPTVAA---APAGG---DDDD---VDLF	GSDEEES	EAEAKIKAEER-LAAYNAKKS	-----ALIAKSSIILDVK
drosophilaNP_524808	G-----KPTVAAAAPAKPAAD---DDDD---VDLF	GSDDDEED	E---EAEERIKQER-VAAYAAKKS	-----ALIAKSSVLLDVK
silkwormS35514	A-----KPTAPAPAAKD---DDDD---VDLF	GSDEEEDDE	EAEARIREER-LKAYADKKS	-----ALIAKSSILLDVK
antheraeaBAD22537	A-----KPTAPAPAAAND---DDDD---VDLF	GSDEEEDDE	EAEARIREER-LKAYADKKS	-----ALIAKSSIILDVK
lonomiaCX816635obliqua	A-----KPTAPAAAD---DDDD---VDLF	GSDEEEDDE	EAEARIREER-LKAYS	-----ALIAKSSILLDVK
plutellaBAD26687	G-----KPTAPAAAKKEE---DDDD---VDLF	GSDEEEDDE	EAEARIREER-VKAYSEKKS	-----ALIAKSSILLDVK
trichinellaBG520039	-----SEPVASAEGL---DDEDI---DLFG	SSSEEEEDS	E---EKKRARQER-XDAYAAKKA	-----AAGAKSNIILDAK
xiphinemaCV509799	P-----STAPKPSAAD---DDDDV---DLFG	DSGDEDD	AAEKVKQER-LAAYAEKKS	-----GPIAKSNIVFDVK
haemonchusBG734277	E-----EKEDD---LDLF	GSDDDEE	E---LEKQKVVQER-LKAYAEKKA	-----GPIAKSSVILDVK
teladorsagiaCB036417	E-----EKEDD---LDLF	GSDDDEE	E---LEKQKAVQER-LKAYAEKKA	-----GPIAKSSVILDVK
ancylostomaceylanicumCB338885	Q-----EEE---LDLF	GSDDDEE	E---DAEKQKIVQER-LKAYAEKKA	-----GPIAKSSVILDVK
caenorhabditisP34460	A-----AADGDD---FDLF	GSDDDEEED	EAEAKKIVVEER-LAAYAEKKA	-----GPIAKSSVILDVK
ostertagiaBG734048	E-----KAGDED---FDLF	GSDDDEEDA	E---KAKVVEER-LKAYAEKKS	-----GPIAKSSVILDVK
ascarisCA850439	E-----KKEE---ADED---IDLF	GSDDDEEED	E---EKKARITAER-LKAYEAKKA	-----AGIAKSNIFDVK
toxocaraBQ125810	E-----KKEE---ADED---IDLF	GSDDDEGDD	E---EKKARITAER-LKAYEAKKA	-----AGVAKSNIFDVK
parastrongyloidesBM514785	E-----KKEE---ADED---IDLF	GSDDDEEED	E---VYKARITAER-LKAYEAKK	-----AGIAKSNIFDVK
dirofilariaBQ482657	L-----EKKE---LDED---IDLF	GSDDDEDDG	E---KARITAAR-LKAYEAKKA	-----ATVAKSNIIFDVK
pratylenchusBQ580837	L-----EKKE---LDED---IDLF	GSDDDEDDG	E---KARITAAR-LKAYEAKKA	-----ATVAKSNIIFDVK
brugiaBU917478	L-----EK---LDED---IDLF	GSDDDEDDDE	E---KARITAAR-LKAYEAKKA	-----AVIAKSNIFDVK
strongyloidesBI450830	-----ASK---GDDD---DFDL	DSEEEDE	E---QAKVVQER-LKAYHDKKS	-----GPIAKSNIIFDVK
pristionchusBI500556	-----AAA---DDDE---DIDLF	GSDEEED	E---KAKQTAER-LREYAACKS	-----GPIAKSNIIFDVK

globoderaAW506065 V-----AAKEG**TPAK**KG-----DEDFDLFGD**GS**SDDEE-KKRITTEER-LKAYA**EKKAK**KP-----G**VP**AKSNVIYDVK
heteroderaCA939761 V-----ASKE**TPAK**KV----EAEDDFDLFGD**ES**SDDEE-KKRITNER-LKAYA**EKKAK**KP-----G**VP**AKSNVIYDVK
radopholusCO960987 S-----AAQ**S****SPPK**GAAAAAGDDDFDLFGD**HS**SDDXQ-KKRITTEER-LKAYA**EKKSK**KP-----G**PI**AKSNVIYDVE
meloidogyneCN578407 AP-----KATT**TP**KEAPKPA**AA**--DDFDLFGT**QS**SDDEEK**KL**TERQRLKAYA**EKKAK**KPG-----V**IA**KSNIYDVY
dictyosteliumAAG23402 A-----P-----AAPKADD--VDL**F**GSDDDEEYERQLEERRK**KAMEH**KKPKET-----V**IA**KSSILLDVK
dictyosteliumBAA25924 A-----P-----AAPKADD--VDL**F**GSDDDEEYERQLEERRK**LWNT**KN-HRKR-----H**AK**SSILLDVK
candidaCAA65366 -----AAAAEEEDDED--VDL**F**GSDDDE--VDEEA**EKLKQ**ORLA**EYAAK**KA**AKG**PK-----P**AA**KSIVTLDVK
debaryomycesCAG86246 -----AAEEDDDD--VDL**F**GSDDD--VDEEA**EKVKQ**ORL**ADYAAK**KA**SKG**PK-----P**AA**KSIVTLDVK
kluyveromycesXP_453023 -----EEDDDDE--VDL**F**GSDDD--VDEEA**EQLKAKR**IA**EYNEK**KA**AK**-PK-----P**AA**KSIVTLDVK
eremotheciumNP_985550 -----EEEDDED--VDL**F**GSDDDE--VDEEA**EKLKAQ**RLA**EYNAR**KA**AK**-PK-----P**AA**KSIVTMDVK
ScerevisiaeAAC04954 -----EEDDD--VDL**F**GSDDDE**EA**DA**EAEKLKA**ER**IAAYNAK**KA**AKPA**K-----P**AA**KSIVTLDVK
yarrowiaCAG78025 E-----GAAAAEEEDDDD--VDL**F**GSDDDE**VE**EA**EKLKQ**ORL**EYAAK**KA**AK**-PK-----T**AA**KSIVTLDVK
aspergillusCK447312 G-----PEGAE**LPTNPKDKP**--AAEDDDD--MDL**F**GSDEE**EE**EV**AKKHAANL**A**AYKAK**KEA-KGPK-----P**AA**KSLVTEVK
penicilliumAAR17475 G-----PEGSEAS**ANPKDKP**--AEEDDDD--MDL**F**ASDSE**ED**PA**VVAERN**KN**LE**Y**KKKA**AK**GP**K-----P**AA**KSLVTEVK
leptosphaeriaAAO49454 G-----PDSSEL**T**LN**PAKAP**E**KEAE**EDD--IDL**F**GSDDDE**E**DA**EAEK**V**KAERL**A**EYNNK**KA**G**-VK-----P**AA**KSIVTLDVK
podosporaCAD60576 G-----PDVAE**VT**LN**PAKAP**AAAA**EEDE**--D**VDL**F**GS**DDDE**E**DA**EAA**IR**EERL**A**EYR**KK**KEG**K-**AK**-----P**AA**KSVTMDVK
botrytisAL116697 G-----PDKTE**AT**LN**PAKAP**AA**EEEDD**--D**VDL**F**GS**DDDE**E**DA**EAA**IR**EERL**A**EYR**KK**KEG**K-**TK**-----P**AA**KSVTMDVK
neurosporaXP_325890 G-----PDVAE**VT**LN**PAKAP**AAAA**EEEDD**--D**VDL**F**GS**DDDE**E**DA**EAA**IR**EERL**A**EYR**KK**KEG**K-**PK**-----I**AA**KSIVTMDVK
gibberellaXP_381184 G-----PGSAE**VT**LN**PAKAP**E**KEAE**AA**EEEDD**VDL**F**GSDDDE**E**DA**EAA**IR**EERL**A**EYR**KK**KEG**K-**PK**-----T**IA**KSVTLDVK
magnaportheXP_361991 G-----PDKTE**AT**LN**PAKAP**AA**EEEDD**--D**VDL**F**GS**DDDE**E**DA**EAA**IR**VRQ**ERL**DEYNK**KA**AK**-**PK**-----T**IA**KSVTLDIK
SpombeBAA31571 G-----AAAAE**DE**--IDL**F**GSDEE**E**DP**EAE**IR**KAER**V**EYNNK**KA**AK**-**PK**-----A**VH**KSLVTEVK
cryptococcusAAW42367 S-----STSAG-----AAAA**GEED**DE--VDL**F**GSDDDE**EA**DA**EAE**IR**KAER**I**AKYNEA**KE**AKQ**E**KL**AG**KT**LE**VAK**SV**TLQ**VK
ustilagoXP_398804 S-----STFAA-----P**AAA**AG**DD**DDD--VDL**F**GSDDDE**V**DE**EAE**IR**KAER**V**EYNNK**KA**AKG**PG-----P**AA**KSLVTELDIK
potatoBF153797 A-----APAE**AA**PA**KEA**AK**PA**AD**DD**DDD--IDL**F**GE**E**TE**E**E**K**AA**ES**RE**AAK**AS**T**KK-KES**G**KSS-----V**LM**DKV
sweetpotatoAAT40505 A-----APAE**AA**PA**KEA**AK**PA**AD**DD**DDD--IDL**F**GE**E**TE**E**E**K**AA**ES**RE**AAK**AS**T**KK-KES**G**KSS-----V**LM**DKV
tomatoAI482839 A-----APAGA**AA**PA**KEA**AK**PA**AD**DD**DND--IDL**F**GE**E**TE**E**E**K**AA**ES**RE**AAK**AS**A**KK-KES**G**KSS-----V**LM**DKV
hotpepperAY480020 A-----APAAA**AA**SA**KEA**AK**PA**AD**DD**DDD--IDL**F**GE**E**TE**E**E**K**AA**EA**RE**AAK**AS**T**KK-KES**G**KSS-----V**LM**DKV
cottonAI730108 A-----APA**ESAK**AE**AD**-----D**DD**D--LDL**F**GD**E**TE**ED**X**K**AA**E**KE**EA**AK**S**AK**K**-KES**G**KSS-----V**LM**DKV
thalecressAJ249596 A-----PPSE**AHP**TE**EP**AA**DG**D**DD**DDD--IDL**F**PA**E**TE**ED**K**AA**E**RE**AA**KD**T**KK**T**KES**G**K**SS-----V**LL**EVK
thalecressAJ249597 -----S**AAA**PA**VE**AE**AP**AA**AD**DDD--MDL**F**GD**E**TE**E**E**K**AA**E**RE**AAK**D**T**KK**P**KE**S**G**K**SS-----V**LM**DKV
appletreeCV187174 -----G**KAG**AA**PA**PA**AA**AG**DD**DDD--LDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**E**L**AA**AK**AS**T**KK**KE**S**G**KSS-----V**LL**DKV
wheatD13147 -----A**AAA**PA**AS**K**D**ED**DD**DDD--MDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**E**RE**AA**AK**PA**K**--K**ES**G**K**SS-----V**LM**DIK
barleyCV060437 -----A**AAA**PA**AS**K**D**ED**DD**DDD--MDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**E**RE**AA**AK**PA**K**--K**ES**G**K**SS-----V**LM**DIK
cornBT016181 -----S**AP**AA**AA**PA**DE**AE**DD**DDD--LDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**D**ER**AA**AA**K**AS**SK**KE**S**G**KSS-----V**LM**DKV
sorghumBM324222 -----S**AP**AA**AA**PA**EA**ED**DD**DDD--LDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**D**ER**AA**AA**K**AS**--K**KK**ES**G**KSS-----V**LM**DKV
riceD12821 A-----ASS**AAA**AA**PA**AK**DA**ED**DD**DDD--LDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**D**ER**AA**AS**K**AS**--K**KK**ES**G**KSS-----V**LL**DKV
riceXM_506540 A-----ASS**AAA**AA**PA**AK**DA**ED**DD**DDD--LDL**F**GD**E**TE**ED**K**AA**D**ER**AA**AS**K**AS**--K**KK**ES**G**KSS-----V**LL**DKV
entamoebaEAL48944 -----M**AD**D--MDL**F**GE**M**TE**EE**I**E**AE**K**RR**KEA**KE**AAK**AE**P**V**G**Q**S**Q-----I**V**YDIK
TcruziAAA67700 -----ATTS**AS**AP**AQ**AP**KA**AS**AP**AQ**AD**E**DE**--IDL**F**GE**A**TE**EE**T**A**LE**A**KK**K**K**D**T**AK**AK**KE**V-----I**AK**SSILFDVK
TbruceiAAX79212 A-----AP**V**AA**PA**AA**PA**AA**TPAR**KA**EA**ED**DD**DDD--IDL**F**GE**T**TE**EE**L**A**LE**A**KK**K**K**DA**AK**S**T**KK**V**I**-----I**AK**SSILFDIK
LmajorAAU06825beta LRMP**PA**AA**KA**AG**S**DA**AA**E**K**RA**AP**KA**AA**V**PP**PA**AA**AE**E**--EDDIDL**F**GE**T**TE**EE**K**AA**LE**A**KK**K**DA**E**KK**AK**KE**V**-----I**AK**SSILFDIK
LguyanensisAAV32818 LRMP**PA**AA**AA**PA**AA**AK**VP**AA**AA**PA**AK**P**AP**AP**KA**V**AP**AE**DD**DIDL**F**GE**T**TE**EE**Q**AA**LE**A**KK**R**AK**DA**E**KK**AK**K**D**V**-----I**AK**SPILFDIK
TcruziAAA30183 -----T**AS**SS**K**AA**AA**E**DE**DIDL**F**GE**A**TE**EE**T**A**LE**A**KK**K**K**D**AD**AK**AK**KE**V-----I**AK**SSILFDVK
TcruziCB923623 -----T**AS**SS**K**AA**AA**E**DE**DIDL**F**GE**A**TE**EE**T**A**LE**A**KK**K**K**D**AD**AK**AK**KE**V-----I**AK**SSILFDVK
LmajorAAU06824alfa E-----P**AK**KA**AA**PA**PA**AAAA**EE**EDIDL**F**GE**T**TE**EE**K**AA**LE**A**KK**K**DA**E**KK**AK**KE**V**-----I**AK**SSILFDIK
PfalciiparumAAF27524 S-----GT**NT**T**CT**CK**SN**KA**AG**DD**DD**DNDIDL**F**GD**DD**D**NT**K**D**S**AN**LL**LE**KK**K**Q**KE**EL**KK**Q**KE**KE**KN**R-----S**IL**L**IE**IK
PyoeliiEAA18321 -----C**PK**K**AT**N**DD**DD**ND**IDL**F**GD**S**N**DD**K**S**-----I**L**E**KK**Q**KE**EL**KK**Q**KE**KE**KN**R-----S**IL**L**IE**IK
neosporaCF796953 -----K**KE**ED**DD**IDL**F**GE**DD**AD**KE**AV**KK**LA**ES**SK**KE**AA**G**-----K**KK**KE**V**IN**K**-----S**SL**VIE**V**K
toxoplasmaCB028880 -----K**KE**ED**DD**IDL**F**GE**DD**AD**KE**AV**KK**LA**ES**SK**KE**AA**G**-----K**KK**KE**V**IN**K**-----S**SL**VIE**V**K
ToxoplasmaAA520212 -----A**AV**DD**DD**DL**F**GA**E**S**AE**D**KE**AV**KK**LA**ES**SK**KE**AE-----K**KK**KE**V**IN**K**-----S**ML**VIE**V**K
cryptosporidiumEAK88639 N-----K**G**CT**KE**KK**S**N**DD**D--FDL**F**GD**DD**ED**ME**AA**KK**ME**AK**KK**AL**Q**DK**KA**KE**PK**AS**-----K**SS**L**V**FD**IK**
tetrahymenaAAW02920 P-----A**VA**AK**PA**PK**KE**ES**DD**--VDL**F**GSDEE**E**AE**AE**AL**RE**KK**RL**E**AV**AA**KE**ARD**G**KK**K**-----K**AI**AK**T**I**V**FN**V**K
giardaAACB01000127 P-----A**E**E**K**PE**AK**SS**N**ADL**F**GSDE**ES**DE**EL**KA**E**KE**KL**Q**AS**LEN**KK**PK**NA**K-----A**E**MS**M**V**V**LE**IK**
spironucleusAAO61467 S-----A**G**K**CD**T**KK**DD**KE**ES**DS**FS**GS**SE**EE**EV**DE**V**KA**IA**IA**IA**IA**KA**AA**AR**KA**AK**PK**-----K**Q**ER**S**M**I**V**F**H**IK**

humanP24534
humanEAL24079
chimpanzeeXP_520983
cowBM430586
pigP29412
dogXP_536040
rabbitP34826
rattusXP_343581
mouseO70251
chickenAAD16874
XlaevisP30151
XtropicalisAAH77005
axolotlBI817658
dogfishsharkCX197134
channelcatfishCK418875
catfishCK406934
zebrafishAAQ97772
rainbowtroutCF752596
killifishCA846714
medakaAV669850
takifuguCA846714
ascidiaAU240208
cionaAABS01000152
SpurpuratusAJ973180
hydraCX055521
hydractiniaCO539929
schistosomaAAP06142
echinococcusBQ173787
earthwormCO408634
bluecrabCV527893
bluecrabCV527425
tigershrimpCO777187
brimeshrimpP12262
mosquitoAAS79338
anophelesXP_314575
drosophilaNP_524808
silkwormS35514
antheraeaBAD22537
lonomiaCX816635
plutellaBAD26687
trichinellaBG520039
xiphinemaCV509799
haemonchusBG734277
teladorsagiaCB036417
ancylostomacelyanicumCB338885
caenorhabditisP34460
ostertagiaBG734048
ascarisCA850439
toxocaraBQ125810
parastrongyloidesBM514785
dirofilariaBQ482657
pratylenchusBQ580837
brugiaBU917478
strongyloidesBI450830
pristionchusBI500556
globoderaAW506065
heteroderaCA939761

DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DYEESEEAKRLREEH-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-RVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
XXXXXXXXXAKLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSIXXXVXMAKLEE-XVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMVKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEDAKRLREER-LAQYESKAKKP-----AVVAKSSILLDVKPWDEETDMTKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----AVVAKSSILLDVKPWDEETDMTKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRLREER-LAQYESKAKKP-----ALVAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQADGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEDAKRVRDR-LAQYEAKKSKP-----TLIAKSSILLDVKPWDEETDMGKLEE-CLRSIQMDGLLWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEEENEESKRVRER-LAQYEAKKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQMEGLVWGASKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
DDEESEEAKRIKEER-LAQYEAKKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIHMDDLWQSKLVVPGYGIKLLQIGCV--
DDEETADAKRIKEER-LAQYEAKKSKP-----TLIAKSSIFLDVKPWDEETDMSKLEE-CVRSVIMDGLVWGSSKLVVPGYGIKLLQIQCVVE
SDEEDEETFKRIKEER-LAAYNEKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMSKLEE-CVRSIELDGLVWGQSKFVPGYGIKLLQIACVVE
SDEEDEETFKRIKEER-LAAYNEKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMSKLEE-CVRSIELDGLVWGQSKFVPGYGIKLLQIACVVE
SDEEEDAEAKIKEER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQDLGLVWGQSKLLVPGYGIKLLQIACVVE
SDDEEDAEARLKEER-LAAYNAKSKP-----TLIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSISMDGLLWGQSKLVVPGYGIKLLQIGCVVE
SDEEEDAEAKLKEQR-LAAYNAKSKP-----GLIAKSSILLDVKPWDEEXXXXXXX-VRSIPLDVTVWGQSKLVVPGYGIKLLQIACVVE
SDEEEDAEAKLKEQR-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQMDGLVWGQSKLVVPGYGIKLLQIACVVE
SDEEDEETFKRIKEER-LAQYEAKKSKP-----TVIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQMDGLVWGQSKLVVPGYGIKLLQIACVVE
DDDDNEEYERIKAEER-LAAYNAKSKP-----AVIAKSNIIFDVKPWDEETDLX-----
DEEESEADKIREDR-LAAYNAKSKP-----ALIAKSNIIFDVKPWDEETDMAAVE-KCVRDIEADGLLWGACKSKYCFRCGNKNCIKCSLF
DDDDDFCFGSDDEEAKPAPKTKIEVKKPK-----VVIKSSVILFDVKPWDEETDLGDI-KAVRAIVKDGHWGASKRVPICYGIKLLQIILSTVE
ESEEDEEAKRIKEER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMAKLEE-CVRSIQADGLLWGTSKLMPVPGYGIKLLQIACVVE
EEEEETEOKRIKEER-LAAYNAKSKP-----AVVAKSSILLDVKPWDEETDVKMEE-CVRTIKADGLLWQAKYIPVPGYGIKLLQIACVVE
GSD--DDEEYKLRSEER-LAAYNAKSKP-----VPAKSTIVLDVKPWDEETNMADIET-AVRSIQADGLLWGASKLVVPGYGIKLLQIACVVE
ASD--DDEEVEKRAEC-LAAYNAKSKP-----KPIAKSMIILDVKPWDEETDMLALEA-AVRSIQADGLLWGTSKLVVPGYGIKLLQIACVVE
SDEEDDAEAERIKQER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSNIVLDVKPWDEETDMAELEK-AVRTVEADGLLWGASKLVVPGYGIKLLQIACVVE
DDEEDDAEAARVREER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSQILLDCKPWDEETDMKAMED-MIRTISMDGLVWGASKLVVPGYGIKLLQIACVVE
DDDEEDAEARVREER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSQILLDCKPWDEETDMKAMED-MVRTISMDGLVWGASKLVVPGYGIKLLQIACVVE
DEEEDDAEAARVREER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSQIMLDCKPWDEETDMKEMEN-QIRTITMDGLVWGASKLVVPGYGIKLLQIACVVE
DEEDE--EAERIKAEER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMAEME-KLVRSVQMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
EDEESAEAAKLKEER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMEN-NVRSIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
EDEESAEAAKLKEER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMEN-NVRSIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
DDEED--EAERIKQER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMEN-NVRTIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
GDEEDAEARIREER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMEN-QVRTIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
GDEEDAEARIREER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPRDEETDMKEMEN-QVRTIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
GDEEDAEARIREER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMEN-HVRTIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
GDEEDAEARIREER-LAAYNAKSKP-----ALIAKSSILLDVKPWDEETDMKEMEN-LVRTIEMDGLLWGAAKLVVPGYGIKLLQIACVVE
SEEDSEEKRRARQER-LAAYNAKSKP-----AAGAKSNIIFDVKPWDEETDLKLTTEE-SIRKITDGLIWGPSKIY-----
GDEED--AAEKVKQER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSNVIFDVKPWDEETDLNEMEK-VIRSIATDGLLWGPSKTVVAFGIKLLQIACVVE
DDEE--DLEKQVQER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSSVILDVKPWDEETNMEEMEK-LVRGIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEE--DLEKQAVQER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSSVILDVKPWDEETNMEEMEK-LVRGIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEE--DAEKQIVQER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSSVILDVKPWDEETNLEEMES-LVRGIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEEEDAEAKIVREER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSSVILDVKPWDEETDLGEMEK-LVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEE--DAEKAKVVEER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSSVILDVKPWDEETDLKEMET-LVRGIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEEEDAEAKIVREER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSSVILDVKPWDDSDVAEIEK-KVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEGDDEEKARITAEER-LAAYNAKSKP-----AGVAKSNIIFDVKPWDDTINIAEIEK-NVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDEEEDVYKARITAEER-LAAYNAKSKP-----AGVAKSNIIFDVKPWDDSDVAEIEK-KVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDE--DDGEKARITAEER-LAAYNAKSKP-----ATVAKSNIIFDVKPWDDSDVAEIEK-NVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDE--DDGEKARITAEER-LAAYNAKSKP-----ATVAKSNIIFDVKPWDDSDVAEIEK-NVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDE--DDDEKARITAEER-LAAYNAKSKP-----AVIAKSNIIFDVKPWDDSDVAEIEK-NVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
SE--EEDDEQAVVQER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSNIIYDVKPWDDTIDIAEIEK-KVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
SD--SEDEEKAKQTAER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSNIIYDVKPWDDTIDIAEIEK-KVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DDGSDDEEKRIKAEER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSNIIYDVKPWDDTIDIAEIEK-KVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE
DEESDDEEKRIKAEER-LAAYNAKSKP-----GPIAKSNIIYDVKPWDDTIDIAEIEK-KVRSIEMDGLVWGAKLIPVPGYGIKLLQIACVVE

radopholusCO960987 DEHSDDXQKKRITEER-LKAYAEEKSKPK-----GPIAKSNVIYDVEPDDTVDIKEIEK--NVRSIHTEGLVWGTSKILP VAFGVKLLQICCCVE
meloidogyneCN578407 GTDQSDDEEKKKLEFQRLKAYAEEKAKPK-----GVIKSNVIYDVPWEETIDLXKMEK--NVRSIETDG-----
dictyosteliumAAG23402 DDEDDDEEYERQLEERRKKAMEHKKPKETVIAKSS-----ILLDVKPWDEETDMVELEK--CVRSIEMDGLVWGASKLVA VGYGIKLLVINLVVE
dictyosteliumBAA25924 DDEDDDEYDRQLEERRKLELWNTKN-HRKRHAKSS-----ILLDVKPWDEETDMVELEK--CVRSIEMDGLVWGASKLVA VGYGIKLLVINLVVE
candidaCAA65366 DDE-VDEEAEKLLKQRLAEYAAKKAAGPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDLEELLT--NVKAIEMEGLTWGAHQWIP VGFGIKLLQINLVVE
debaryomycesCAG86246 DDD-VDEEAEKVKQRLADYAAKKAAGPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDLEELLA--NVKAIEMDGLVWGASQWIP VGFGIKLLQINLVIE
kluyveromycesXP_453023 DDD-VDEEAEQLKAKRIAEYNEKKAAPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDLEELVA--NVKNIEMDGLNWAHQWIP VGFGIKLLQINLVIE
eremotherciumNP_985550 DDE-VDEEAEKLLKQRLAEYNAKKAAPK-----PAAKSIVTMDVKPWDEETDLEEMLA--NVKSIEMDGLSWGASQWIA VGFGIKLLQINLVVE
ScerevisiaeAAC04954 DDEEADAEAEKLLKQRLAEYNAKKAAPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDLEEMVA--NVKAIEMEGLTWGAHQFIP VGFGIKLLQINLVVE
yarrowiaCAG78025 DDDEVDDEAEKLLKQRLAEYAAKKAAPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDLEELLA--NVKAIEMEGLTWGAHQWIP VGFGIKLLQINLVVE
aspergillusCK447312 DEEEDDEEVAEKHAANLAAYKAKKEAKG-PK-----PAAKSIVTLEVKPWDEETDLEEMEA--NVRAIEKDGLVWGASQWIA VGFGIKLLQINLVVE
penicilliumAAR17475 SEDEDPAVVAERNKNLEEKYKKAAGPK-----PAAKSIVTLEVKPWDEETDLEELLA--NVRAIEKDGLVWGASQWIA VGFGIKLLQINLVVE
leptosphaeriaAAO49454 DDEEEDAEAEKVKAEERLAEYNAKKAAGPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDLEEMEA--NVRAIEKDGLVWGASQWIA VGFGIKLLQINLVVE
podospiraCAD60576 DDEEEDAEAEARIREERLAEYRKKKEGK-AK-----PAAKSIVTMDVKPWDEETDMVALEE--GVRAIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVVE
botrytisAL116697 DDEEEDAEAEARIREERLAEYRKKKEGK-TK-----PAAKSIVTMDVKPWDEETDMVALEE--AVRSVEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVIE
neurosporaXP_325890 DDEEEDAEAEARIREERLAEYRKKKAAPK-----PAAKSIVTMDVKPWDEETDMVALEE--AVRGIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVIE
gibberellaXP_381184 DDEEEDAEAEARVREERLAEYRKKKAAGPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDMVALEE--AVRSIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVVE
magnaportheXP_361991 DDEEEDAEAEARVQRERLAEYRKKKAAPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDMVALEE--AVRAIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVVE
SpombeBAA31571 DEE-EDPEAEERIKAEERLAEYRKKKAAPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDMVALEE--AVRSIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVVE
cryptococcusAAW42367 DDEEADAEAEARVREERLAEYRKKKAAGPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDMVALEE--AVRSIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVVE
ustilagoXP_398804 DDEEADAEAEARVREERLAEYRKKKAAGPK-----PAAKSIVTLDVKPWDEETDMVALEE--AVRSIEKDGLVWGASKLVA VGFGIKLLQINLVVE
potatoBF153797 ETEEEKAAAESREAAKASTTK-KESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRGVMEGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTIV
sweetpotatoAAT40505 ETEEEKAAAESREAAKASTTK-KESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRGVMEGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
tomatoAI482839 ETEEEKAAAESREAAKASAKK-KESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTIV
hotpepperAY480020 ETEEEKAAAESREAAKASTTK-KESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVMEGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
cottonAI730108 ETEEDXKAAEKEAAKKSAK-KESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--TVRSVEMPGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIHXLTI
thalecressAJ249596 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
thalecressAJ249597 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
appletreeCV187174 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
wheatD13147 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
barleyCV060437 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
cornBT016181 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
sorghumBM324222 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
riceD12821 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
riceXM_506540 ETEEDKAAEEREAAKKDTKPKKESGKSS-----VLMDDVKPWDEETDMKMLEE--AVRSVQMDGLLWGASKLVA VGFGIKLLQIMLTII
entamoebaEAL48944 MTPPEIEAEKRRKKEAEEAEEKKEPVGQSQ-----IVYDVKPWGEDTDLDEMEA--AVRAISREGLWKGSRKDP VAYGIKLLQICCNV
TcruziAAA67700 ATEEETAALAEAKKKKDTDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAN--KLHAVKRDGLLWGDHKLVP VAFGVKLLQQLIVIE
TbruceiAAX79212 TTEEEAALAEAKKKKDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAN--KLHAVKRDGLLWGDHKLVP VAFGVKLLQQLIVIE
LmajorAAU06825beta TTEEEAALAEAKKKKDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAN--KLHAVKRDGLLWGDHKLVP VAFGVKLLQQLIVIE
LguyanensisAAV32818 TTEEEAALAEAKKKKDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAN--KLHAVKRDGLLWGDHKLVP VAFGVKLLQQLIVIE
TcruziAAA30183 ATEEETAALAEAKKKKDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAD--K----- VAFGVKLLQQLIVIE
TcruziCB923623 ATEEETAALAEAKKKKDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAD--K----- VAFGVKLLQQLIVIE
LmajorAAU06824alfa TTEEEAALAEAKKKKDAKKAKEV-----IAKSSILFDVKPWDDTVDLQALAN--KLHAVKRDGLLWGDHKLVP VAFGVKLLQQLIVIE
PfalciiparumAAF27524 DDDNTFKDSASNLLLEKKKQKEEELKKKKQKEKEKNR-----SILIEIKPKSIDTDLAKIPKLVKQIVDENIKWGEVKKLP VAFGLYKLLHMSCIY
PyoeliiEAA18321 SNNDKSS-----ILEKKKQKEEELKKKKQKEKEKNR-----SILIEIKPKSIDTDLAKIPKLVKQIVDENIKWGEVKKLP VAFGLYKLLHMS---
neospiraCF796953 D-DADKEAVKLLAESKKEAAG-----KKKKEVINK-----SSLVIEVKPADADTSLDEIA--KLCKEINIEGVTWGEAVKKVP VTFGLYKLLQQLCCTIL
toxoplasmaCB208880 D-DADKEAVKLLAESKKEAAG-----KKKKEVINK-----SSLVIEVKPADADTSLDEIS--KLCKEIKIEGVTWGEAVKKVP VAFGLYKLLQQLCCTIL
toxoplasmaAA520212 ESAEDKEAVKLLAESKKEAAG-----KKKKEVINK-----SSLVIEVKPADADTSLDGVCK--KVKSIQMEGVTWGEAVKKVP VAFGLYKLLQQLCCTIL
cryptosporidiumEAK88639 DDEDMEAAKKAMEAKKALQDKKAKEKPKAS-----KSSLVLDVKPSSLDVLDLDAVA--KMIRALKIEGVEFSEGEKKVP VAFGLYKLLQQLCCTIL
tetrahymenaAAW02920 DEEEDAEAEALREKRLAEVAAKEARDGKPK-----KAIKTIIVFNKVFEEEDLNALAKKIYAEINPDGLVWNKEHLVP VAFGLYKLLQQLCCTIL
giardaAACB01000127 DSESDDEELKAEKELQASLENKPKNAK-----AEMSMVLEIKPNDESDEME--YVQKNLTKMVTMDGLNWESEFQPV LCYGLKALVIACVVV
spironucleusAAO61467 SEEEVDEVKKAATAAAIKAAARAKKPK-----KQERSMIVFHIPYGDENDMT--KVLKEIPEKIOMEGLKWIGELLDHCYGLKALVIACVVV

humanP24534	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
humanEAL24079	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
chimpanzeeXP_520983	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
cowBM430586	DDKVGTDML-----EEQIT-AFDEYVQSM DVAAF	NKI
pigP29412	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
dogXP_536040	DDKVGTDML-----EERIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
rabbitP34826	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
rattusXP_343581	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
mouseO70251	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
chickenAAD16874	DDKVGTDML-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
XlaevisP30151	DDKVGTDVL-----E EKIT-AFEDFVQSM DVAAF	NKI
XtropicalisAAH77005	DDKVGTDVL-----EENIT-AFEDFVQSM DVAAF	NKI
axolotlBI817658	-----	-----
dogfishsharkCX197134	DEQVGTDFL-----EE-----	-----
channelcatfishCK418875	DDKVGTDQL-----EELIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
catfishCK406934	DDKVGTDQL-----EELIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
zebrafishAAQ97772	DDKVGTDQL-----EELIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
rainbowtroutCF752596	DDKVGTDQL-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
killifishCA846714	DDKVGTDIL-----E EKIT-AFEDHVQSM DVAAF	NKI
medakaAV669850	DDKVGTDIL-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
takifuguCA846714	DDKVGTEIL-----EEQIT-AFEDYVQSM DVAAF	NKI
ascidiaAU240208	-----	-----
cionaAABS01000152	SIQISTDFL-----DEEITKNEDLVQSV D IAAF	NKVI
SpurpuratusAJ973180	DEKVSVDL-----LQEEIE-EFDTVQSV D IAAF	NKV
hydraCX055521	DDKIFTDWL-----EEEIL-KFSDHVQSM D IAAF	NKL
hydractiniaCO539929	DDKISTDFL-----EEEIT-KFEDYVQSM D IAAF	NKI
schistosomaAAP06142	DDKIGTDML-----EEEIM-KFDDLQSV D IAAF	NKL
echinococcusBQ173787	DDKVG-----	-----
earthwormCO408634	DDKVGTDLF-----	-----
bluecrabCV527893	DAKVSVDL-----IEKIT-DFEDFVQSV D VAAF	NKH
bluecrabCV527425	DAKVSVDL-----IEKII-EFEDFV-----	-----
tigershrimpCO777187	DAKVSVDL-----IEKIQ-EFEDFVQSV D VAAF	NKV
brimeshrimpP12262	DDKVSIDEL-----QEKIS-EFEDFVQSV D IAAF	NKV
mosquitoAAS79338	DDKVSDEL-----QEKIQ-DFEDFVQSV D IAAF	NKI
anophelesXP_314575	DDKVSVDL-----TETIQ-EFEDYVQSV D IAAF	NKI
drosophilaNP_524808	DDKVSIDL-----QEKIE-EFEDFVQSV D IAAF	NKI
silkwormS35514	DDKVSVDL-----TEKIQ-EFEDFVQSV D IAAF	NKI
antheraeaBAD22537	DDKVSVDL-----TEKIQ-EFEDFVQSV D IAAF	NKI
lonomiaCX816635	DDKVSVDL-----TEKI-----	-----
plutellaBAD26687	DDKVSVDL-----TETIQ-EFEDFVQSV D IAAF	NKI
trichinellaBG520039	-----	-----
xiphinemaCV509799	DEKVSVDL-----EEQIT-AHDDFLQSV D IAAF	NKI
haemonchusBG734277	DLKVSVDL-----IEKITGDFEDHVQSV D IAAF	NKI
teladorsagiaCB036417	DLKVSVDL-----IEKITGDFEDHVQSV D IAAF	NKI
ancylostomacyleanicumCB338885	DLKVSVDL-----IEKITGDFEDHVQSV D IAAF	NKI
caenorhabditisP34460	DLKVSVDL-----IEKITGDFEDHVQSV D IAAF	NKI
ostertagiaBG734048	DDKVSVDL-----IDKITGDFESHVQSV D IAAF	NKI
ascarisCA850439	DEKVSVDL-----EEQIT-GFEDLVQSV D VAAF	NKV
toxocaraBQ125810	DDKVSVDL-----EEQIT-AMEDLVQSV D VAAF	NKV
parastrongyloidesBM514785	DEKVSVDL-----EEQIT-GFED-----	-----
dirofilariaBQ482657	KMKKCLRIG-----WKNKL-WLSMN-----	-----
pratylenchusBQ580837	DEKVSVDL-----EEQIM-AFEDLVQSV D IAAF	NKV
brugiaBU917478	DEKVS-----	-----
strongyloidesBI450830	DDKVSVDL-----EEQIT-DMEDLVQSGDV VAAF	YKV
pristionchusBI500556	DDKVSVDL-----EESIT-GFEDLVQSV D IAAF	NK-
globoderaAW506065	DEKVSVDL-----EGRDD-RFLK TWSN-----	-----
heteroderaCA939761	DEKVSVDL-----EGKIT-DFODLGQSV D VAAF	NEV

radopholusCO960987
dictyosteliumAAG23402
dictyosteliumBAA25924
candidaCAA65366
debaryomycesCAG86246
kluyveromycesXP_453023
eremotheciumNP_985550
ScerevisiaeAAC04954
yarrowiaCAG78025
aspergillusCK447312
penicilliumAAR17475
leptosphaeriaAAO49454
podosporaCAD60576
botrytisAL116697
neurosporaXP_325890
gibberellaXP_381184
magnaportheXP_361991
SpombeBAA31571
cryptococcusAAW42367
ustilagoXP_398804
potatoBF153797
sweetpotatoAAT40505
tomatoAI482839
hotpepperAY480020
cottonAI730108
thalecressAJ249596
thalecressAJ249597
appletreeCV187174
wheatD13147
barleyCV060437
cornBT016181
sorghumBM324222
riceD12821
riceXM_506540
entamoebaEAL48944
TcruziAAA67700
TbruceiAAX79212
LmajorAAU06825beta
LguyanensisAAV32818
TcruziAAA30183
TcruziCB923623
LmajorAAU06824alfa
PfalciiparumAAF27524
PyoeliiEAA18321
neosporaCF796953
toxoplasmaCB028880
ToxoplasmaAA520212
cryptosporidiumEAK88639
meloidogyneCN578407
tetrahymenaAAW02920
giardaAACB01000127
spironucleusAAO61467

DEKVS TDW-----LEEQIT-GFEDLVQSV DVVAFNKV
DLKVS TDE-----LEEKIK-DFEDYVQSV DVVAFNKI
DLKVS TDE-----LEEKIK-DFEDYVQSV DVVAFNKI
DALVSLDD-----LQAAVE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DEKVS LDD-----LQSSIE-EFEDHVQST DIAAMQKL
DAKVS LDE-----LQQLIE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DAKVS LDD-----LQQLIE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DDKVS LDD-----LQQSIE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DDLVS LDE-----LQQLIE-EEDDNVQST DIAAMQKL
DEKIX IDE-----LQQAIE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DEKVS TDE-----LQQAIE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DEKVS LDD-----LQQLIE-EDEDHVQST DIAAMQKL
DEKVS LDD-----LQEQIA-ELEDYVQSS DIAAMQKL
DDKVS LDD-----LQEEIA-EFEDYVQSS DIAAMQKL
DEKIS LDE-----LQEEIA-GFEDYVQST DIAAMQKL
DEKIS VAD-----LEEEIQ-EFEDYVQST DIAAMQKL
DDKVS GTE-----LQEQLE-ELEDYVQST DIAAMQKL
DDKVS LEA-----LQEELE-GFEDYVQST DIAAMSKL
DAKIS LDE-----LQEEIA-ELEDYVQSS DIAAMQKL
DAKVS LDE-----LQERIA-DECEDEYVQST DIAAMAKI
DDLVS VDTL-----IEERL TEEP INEYVQSC DIVAFNKI
DDLVS VDTL-----IEERL TEEP INEYVQSC DIVAFNKI
DDLVS VDTL-----IEERL TEEP INEYVQSC DIVAFNKI
DELVS GDSL-----IEERL TVEP INEYVQSC DIVAF--
VG-----
DDLVS VDNL-----IEDHLTSEPNNEY IQSVD IVAFNKI
DDLVS PNL-----IEDFLTSEPNNEY IQSVD IVAFNKI
DDLVS VDDL-----IEEQLTVEPRNEY IQSCH IVAFTK-
DDLASTP-----IEEVLCEAP INEYVQSC DIVAFNKI
DDLVS VDTL-----IEEVLCEAP INEYVQSC DIVAFNKI
DDLVS IDTL-----IEDHLTQEP INEYVQSC DIVAFNKI

DDLVS VI-----AYRRHL TEEP INEFVQSC DIVAFNKI
DDLVS VDSL-----IEEHL TEEP INEFVQSC DIVAFNKI
DSVDTES-----VQEEIEGLEDYVQSV DIVS FNKL
DDKVS LDDL-----EELIMSFEDVQSM DIVAVNKI
DDKVS GDDL-----EEMIMSGDAVQSM DIVAVNKI
DDKVS GDDL-----EEMIMGFEEVQSM DIVAVNKI
DDKVS GDDL-----EEMIMGFEDVQSID IVAV NKI
DDKVS SDDL-----EELIMSFEDVQSM DIVAVNKI

DDKVS GDDL-----EEMVMGFEDVQSM DIVAVNKI
DDFVNTNELIEKIENIDL NEEKKRTLILGLDEDDENYDENAEV EDDLEFLVQSAE IIS FNKL

DDIVNTNEIVDHI-----
DDIVNTNEIVDQIQ-----
DDVVNTNALVDEVEEIGMTEERN-----
DDLVNTQDIVDSIETLGMTDEQKKKFSEKDDACG-----DDDEEEEEEYGLVQSC EIVS FNKL

DDKVQTD-----DIFEI IQGWEEEVQSV DIAAFNKI
DDICSVDDL-----CEKVVEVFEEVQSC DVRS FNKL
DDICSVDEI-----QEKIQEIFEDDVQNC DINS FNKF

Annexe 2 : alignement ClustalX sur eEF1B δ (données supplémentaires de l'article 3)

Alignement par ClustalX de 45 séquences pleine taille des protéines eEF1B δ accessibles comme décrit dans l'article 3. Les séquences ont été extraites des banques de données nucléiques et protéiques accessible sur NCBI. Dans un souci de clarté, les noms communs des organismes sont utilisés. Les noms binominaux sont accessibles à partir des numéros d'accès associés au noms des organismes. Les encadrements bleus dénotent les motifs conservés caractéristiques du domaine d'échange de nucléotide et nécessaires à cette activité comme décrit dans l'article 3. Les encadrements rouges correspondent aux sites consensus de phosphorylation par CK2. Les sites potentiels de phosphorylation par CDK sont indiqués en gras. Les acides aminés surlignés en jaune sont les résidus hydrophobes caractérisant le domaine leucine zipper. Deux résidus aromatiques hautement conservés dans les séquences sont surlignés en gris. Pour les espèces présentant deux messagers dans les banques de données, uniquement la forme portant l'insert est présentée ici. L'insert est indiqué en vert.

ADDITIONAL DATA II Clustalw alignment of EF1Bδ from eukaryotes

```
humanNM_032378 -----MATNFLAHEKIWFDFKFKYDDAERRFYEQMNGPVGASRQ-----ENGASVILRDIARARENIQKSLAG-----
chimpanzeeXP_512433 -----MATNFLAHEKIWFDFKFKYDDAERRFYEQMNGPVGASRQ-----ENGASVILHDIVRARENIQKSLAG-----
rhesusCO647794 -----MATNFLVHEKIWFDFKFKYDDAERRFYEQMNGPVGASRQ-----
cowCK951084 -----MATNFLMHEKIWFDFKFKYDDAERKFYEQMNGPVGASSRQ-----ENGASVILRDIARARENIQKSLAG-----
sheepAAQ11745 -----MATNFLVHEKIWFDFKFKYDDAERKFYEQMNGPVGASSRQ-----ENGASVILRDIARARENIQKSLAG-----
dogXP_532345 -----MATNFLVHEKIWFDFKFKYDDAERKFYEQMNGPVGASSRQ-----ENGASVILRDIARARENIQKSLAG-----
catAY686736 -----
rabbitP53787 -----MTTNFLVHEKIWFDFKFKYDDAERSFYERMNGPVPGPSRQ-----ENGATVILRDIARARENIQKSLAG-----
ratXP_216967 -----MATNFLMHEKIWFDFKFKYDDAERRFYEQMNGPVTAGSRQ-----ENGASVILRDIARARENIQKSLAG-----
mouseNP_075729 -----MATNFLAHEKIWFDFKFKYDDAERRFYEQMNGPVTSGSRQ-----ENGASVILRDIARARENIQKSLAG-----
chickenBI067880 -----MAVDFLSNENIWFDFKFKYDDAERRFYEQVNGPAGSSSHQQ-----ENGASTILRDIARARENIQKSLAG-----
XlaevisBG017641 -----MSAFVITTEQVWLDKYKYDDAERQYENLSMGSASGNKPHNSPQQ-----EDGASTILRDIARARENIQKSLAG-----
XlaevisBG814646 -----MSASVIATEQVWLDKYKYDDAERQYENLSGGSSPNNPHNSPQQ-----EDGGSTILRDIARARENIQKSLAG-----
TropicalisAAH88544 -----MSASFISTEKVWLDKCKYDDAERQYETLSRGSAPNNPHNSPQ-----
rainbowtroutCF752638 -----MSSAVDYFVQEKIWFDFKPRYDAERHFYECINSTSHPAQ-----ELGANTILQDIARARENIQKSLAG-----
zebrafishCAI21006 -----MTAADCLASERIWDFDKPRYDEAERRFYEQMNGPTKPKQ-----DTGANTILQDIARARENIQKSLAGLKTTLQPSRGSAP
flounderCAC28942 -----
halibutCF931853 -----RFYEGVNGPSTQQQ-----
medakaAV669452 -----MSGLOCLATENIWFDFKHRYDEAEKHFYEGANGPVTQHQQ-----VKATPPPLQQQAKGRQQRQHRN-----
salmonBG934157 -----MSGLOCLGEDNIWFDFKPRYDEAERRFYEGANGPSTHSHHQ-----
takifuguAL842751 -----MSGLOCLASENVWDFDKHRFDEAEKRFYEGANGPAPQQQQ-----VKTAT----HQAKGRHQQRQHRN-----
killifishCN983283 -----MSGLOCLAAENIWFDFKHRYDEAEKRFYEGANGPAAQQQQ-----
morhuaCO541471 -----EGANGSPAQ-----
SgranularisAJ973181 -----MAHPLMHENIWFDRNRFQEAQYQEHVASQHSGLVVQ-----KSDGPASNLVSEIARARQNIQSSLSAGVGLSVGVGDNP
SpurpuratusCX692468 -----MAHPLMKENVWYERNKRFQEAQYQEQVASKHSLVVQ-----KSDGPASNLVSEIARARQNIQTSLSAGVGLSVGVGDNP
mosquitoEAA08608 -----MAAAMAHEKLVTEKSTMDAAEKAYHEYMS-----KETVQQONAKNQKEKENLAHKLCDNITEELNKINSVPSQCTLASEISKARQHIKNSLERMDGIAALAASPGA
silkwormBAB21109 -----MAALLHEKVWLDNRVYNDAEKAYYESLS-----KVQAPLSLARSSLASEVAKARQHIKNSLECMDSVATLAGVPNT
DmelanogasterNM_135517 -----MKVEALDKFWADKSRDYDLAEKRFYEGPQ-----KVTDRSHYSPVSEIAKAREHIQNSLEKIDGV-TLDDGLNS
DpseudoAAFS01005253 -----LANNTFFQIDVATLEDKCRL-----
beeXM_392544 -----MEKSALAQEKVWDFDKPSYDKAERLYFERMAKGNQQ-----TTSPILSAGGSLANEVAKARQHIKQSLQCMDDIAAVAGFATP
bluecrabCV528107 -----MALELAHENIWFDFKWRVDAERQFYEEKSSPAGGVSCARQSCQTQVGLGLDYKGLVSEGGESSPAGNESGRLPQQEASPVASEPKKEBGSGLGSVASQIAKARQEIKNLSVSVSHTGGGQVSA--
prawnAU175760 -----KQVHG-----
brineshrimpP32192 -----MRGDNFLYQEKFYEDAERTFQEHLAGTYKPKPTAVTETLSGVLPSNTLQKLESAV-----
oysterCD648110 -----MANPLVCDVWVKDKQKYEAEAHYQOVLAGTAP-----KGGGKGG
earthwormCF799786 -----MISESSAQGLAEDNIWFDFKWRFEAEVSYQEHLAYLKSQQGGEKAKAC-----PASSPIRSSLASEIAKAREHIQKSLN-----
eiseniaBP254412 -----MSSAQGLAEDNIWFDFKWRFEAEVSYQEHLAHLRSGGQTTKVTCKERANAC-----HAASSPIRSSLAGEIAKAREHIQKSLN-----
schistosomaBAB21109 -----MEVGLLTDQTLPFPDYDIEKAYVSHLSSHDPKA-----SEPLKLGSLTQEIQKAREHIKTSLD-----
echinococcusAAF02297 -----MESAYMRFLSKDIGKTSATEQ-----KGDVYLKVEIQKVRDNKSSLE-----
caenorhabditisCAB63360 -----MSVEGLLSEVKHFNHHLDAALGEQLFYGGKRVFSDVKPGTSSGGDHGC-----KGGKSELGAIHNAKHAADKALNK-----
xiphinemaCV581392 -----FMWRATG-----KAGPGAAGISSSLVSEIAAARKRIGDVLKDVTTVPVPSDI-----
dirofilariaBQ455878 -----MSDGNRDTTEHRKGRKDKHDKSHSDDTH-----ETPIASDGLRDAIASARMTIKQALEDNGDD-----
cionaAK113043 -----MAALAEAMKAGIWFDRSKVEAAEDKYQEYLVRSVGGVKKVAGFLKAGTQ-----SSGGEVSKIAEARKKIQDTLKE-----
hydraCD680373 -----MQFPDAMMHENIWFDRPKYEEEREHYELFLTNNLSKLAETHCKESKTTLNAVESKK-----ATSGSLLSSEIAKARDSIKQSLAE-----
hydractiniaCO538874 -----
mnemiopsisCF925005 -----
```

humanNM_032378 -----SSGPGASSGTSGDHSELVRIASLEVENQSLRGVVQELQQAISKLEARLNVLKSSPGHRATAPQTQHV-SPMRQVEPPAKKPA**TPAE**-----DDEDDIDLFGSDNEEEDKEAA-----
chimpanzeeXP_512433 -----SSGPGASSGSPGDH-----VVQELQQAISKLEARLNVLKSSPGHRATAPQTQHV-SPMRQVESPAKKPA**TPAE**-----DDEDDIDLFGSDNEEEDKEAA-----
rhesusCO647794 -----TSGPGASSGSPGDHSELVRIASLEVENQSLRGVVQELQQAISKLEARLNVLKSSPGHRATAPQTQHV-SPMRQVEPPAKKPA**TPAE**-----DDEDDIDLFGSDNEEEDKEAA-----
cowCK951084 -----SSGPGASSGSPGDHSELVTRIASLEVENQSLRGVVQDLQQAIVSKLEARLSALEKSSPAHRATTPQTQHV-SPMRQVEPPSRKAATATE-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAT-----
sheepAAQ11745 -----SAGPGASSGSPGDHSELVTRIASLEVENQSLRGVVQDLQQAIVSKLEARLSALEKSSPAHRATTPQTQHV-SPMRQVEPPSRKAATATE-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAA-----
dogXP_532345 -----SSGPGASSGSPGDHSELVRIASLEVENQSLRGVVQDLQQAIVSKLEARLSALEKSSPTHRAAAPQTQHV-SPMRQAEPPPRKAATAAE-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAA-----
catAY686736 -----VSKLEARLSALEKSSPTHRAAAPQTQHV-SPMRQVEPPAGKAATAAE-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAA-----
rabbitP53787 -----SSGPGASSGPGGDHSELVRIASLEVENQNLRGVVQDLQRAVSKLEARLSALEKSSPTHRASAPQTQHV-SPMRQVEPPAKKAAAPAE-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAA-----
ratXP_216967 -----SSGPGASSGPGGDHSDLI VRIASLEVENQNLRGVVQDLQQAISKLEVRSLTEKSSPTHRATAPQTQHV-SPMRQVEPPAKKGA**TPAE**-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAA-----
mouseNP_075729 -----SSGPGASSGPGGDHSELVRIASLEVENQNLRGVVQDLQQAISKLEARLSLEKSSPTHRAAPQTQHV-SPMRQVEPPPKKAATAAE-----DDEDDIDLFGSDEEEDKEAA-----
chickenBI067880 -----SASTSSSGPG-DQNELLSRISHLEVENQNLHVVADLQKAIKFLSRLNALKSTSHQSPVPPTQKVEPPGVSPSKVVELPSA**SPAKKAEP**AAAEEDDDDDIDNLFSGSDEEEDQEA-----
XlaevisBG017641 -----SAASALNSGDSGSELAARVANLEQENQSLHKVVKDLQSAISKLEIRLSTLEKSSSQKPAASQPAIEVAARVQKVVQV-----TPAAKEENG TG-EDDDDDIDLFGSDNEEEDAEAA-----
XlaevisBG814646 -----SAAPSNSGDSGSELAARVANLEQENQSLHKVVKDLQSAISKLEIRLSTLEKSSNSQKPAAPQPVKVAAPVQKVVQV-----TPAK-EENG TG-EDDDDD-IDLFGSDEEEDAEAA-----
XtropicalisaAH88544 -----SGAASNSGDSSELAARVANLEQENQSLHKVVKDLQQAIVSKLEARLSLEKSSPAPPAAPVQKVVQV-----TPAAKEENG TG-AEDDDDD-IDLFGSDEEEDAEAA-----
rainbowtroutCF752638 -----SAANGAGDQELITRIKSELENSLQVVEDLRLALSLEKRVAVLEKSPSPAAAPVSAAPCTNGTSVQQKTSPPV-----EEDDDDDMDLFGSDEEEDAEAA-----
zebrafishCAI21006 **KPSNPSHCSAS**-SAGGSAADIGELAARMKSELENSLHKVVEDLRLALSLEKRVAVLEKSPSPAAAPVSAAPCTNGTSVQQKTSPPV-----EEDDDDDMDLFGSDEEEDAEAA-----
flounderCAC28942 -----NQLHKVVEHMKATMLKLESRVALLEKTPATAATAAVPSAKAAPKVE-----DDEDDDDMDLFGSDEEEDAEAA-----
halibutCF931853 -----SSHAGADQELVSRMKSLELENQTLHKVVEHMRATMLKLESRVALLEKTPATAATAAVPSAKAAPKADN-----DDEDDDDMDLFGSDEEEDAEAA-----
medakaAV669452 -----SSSGAGEQELVSRMKSLELENQTLHKVVEEMRAALQKLESRVFLKSPAAAPCAQAASVQKVVQV-----DDEDDDLFGSDEEEDAEAA-----
salmonBG934157 -----SSSASGDQELVSRMKSLELENQTLHKVVEDLRAALFKLENRVQVLESPAVPCVAVTVQSVKV-----EENDDIDLFGSDEEEDAEAA-----
takifuguAL842751 -----SSSH-GDQELGSRMKSLELENQSLHKVGENMKAALQKLESRVAGLEKAPTAAVPCAKAAPVQAPVQVANG-----DDEDDDLFGSDEEEDAEAA-----
killifishCN93283 -----SSSQGGQELVSRMKSLELENQSLHKVVEEMRAALQKLESRVTELEKSPAPAAAPVQKVVQV-----DDEDDDDIDLFGSDEEEDAEAA-----
morhuaCO541471 -----SSSKSGDQDTKGQMDY-----QSMQKEIEDMRALIRVLESRVTSLEKTQTAAAPAPCVQAQVQAPQKAVV-----DDEDDDDDDDDDLFGSDEEEDAEAA-----
SgranularisAJ973181 -----EILARLSAVEKENADLRKITDLDQAQAVKLERLSALDTSAPPASQPAQSPVQNGKA-----DEDEDDDDDFPFAESDEDEEKK-----
SpurpuratusCX692468 -----EILARLSAVEKENADLRKITDLDQAQAVKLERLSALDTSAPPASQPAQSPVQNGKA-----DDEDDDDDDDFDLFGSDEEEDAEAA-----
mosquitoEAA08608 -----ELLDRLSVEKENELRSI IDGLNLLVIDLHERVRSLESGSGKSAAPAKPAAAA-TKPAALAKKA-----EAEDDDDDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
silkwormBAB21109 -----ELSTKVISLENNKDLKKAIDDLRNLVLSLQVRVETLESSSITSDCIQSEKPAASTDK-----DDEDDVDLFGSDEEEDAEAA-----
DmelanogasterNM_135517 -----ELAKRLAQLGEHKKLQVSLNEL-----LTATVKRLETQLKLTNGVSKPEVEAKKP-----EANDDDDDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
Dpseudofurcifer1005253 -----EFLDRISLENNQIDLKSQVSKLNQAYSVDLKRDLVENRLNCSNGNVK-----NNDDDDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
beeXM_392544 -----NENKIDLDSSVFQELKNTVEKLEERVKALEIKIRTFVPADPIAVCPAKPQAPASKPTQEA-----DDEDDVDLFGSDEEEDAEAA-----
bluecrabCV528107 -----DVLNRLTKLESENSALSKTVTTLEKTVQVQVLRLEALECGGTTASATTSTALSAPKPEPME-----EDDDDDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
prawnAU175760 -----SRGGSGSGVSPDILNRIKLEGENGTLKKTVTLEERTIMDLTKRLAALCGGTTAPAKSKPEPM-----ETEDDDDDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
brineshrimpP32192 -----ALSNKVEALSSENKELKCIDGLQLLGLRQRIETLEBKTTGAKLAAPPQK-----EEDDDVDLFGSDEEEDAEAA-----
oysterCD648110 -----SGGVAGDNSQVTRRVECLEKENRDLKVVDMKALVQRLESRVTKLEGGSSAPAAQAPAKKPAAPA-----EDDEDDIDLFGSDEEEDAEAA-----
earthwormCF799786 -----SSGAIPESECFVKKVGSLEENKELKIVKDLQHLVDTLTSRVAALHGHGAPSSSAPAAVQQAAPVAANHTTEK-----DNDDEEDFELFGSDEEEDAEAA-----
eiseniaBP524412 -----SSSAGAIPESECFVKKVGVIEENKELKIVKDLQHLVDTLTSRVAALHGHGAPSSSAPAAVQQAAPVAANHTTEK-----EEEEEDFELFGSDEEEDAEAA-----
schistosomaBAB2110 -----RVAVSRPFDVARLDELEKLVTSLVNRIISDLERSIGSLKSNNDTCDDVVKDK-----PDAESDLFASDESEDKAE-----
echinococcusAAF02297 -----SNGSWNERMEKLEAIVKEMSLRVNELEVQIQRLGQILPSESLEKAKPIRPVVVKAPPAEGG-----DDDDIDLFGSDEEEDAEAA-----
caenorhabditisCAB63360 -----EGGEDVSKLREEHSALAKKVDLQSLVAELQLQLSTLRGGQTSVAAPAAAPAAK-----EAAAGDDDFDLFGSDEEEDAEAA-----
xiphinemaCV581392 -----SAVSKDSERISKLEQENSTIRQELKDLRNLVDGMRKIDELSGGKPSGPAKAIIPVQPKPAKEQ-----DDDDVDLFGSDEEEDAEAA-----
dirofilariaBQ455878 -----ATSDALTELNGEVAALKISDEMREIEKLEDFQKILNYAQGGDSTLQKQSSSIEKLSLEELR-----EDDDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
cionakAK113043 -----SSSSKSSSEDEVSLKQVQDLGTITNMNKKFESLESRLSALEGGKSTSSKPAEAAAQNGVEDS-----DDSDSDVDFLFGSDEEEDAEAA-----
hydraCD680373 -----TGSSSISSELESENKAMQKITELVAKVAALSRVTKLEQAAGHTTTTAAEVQKAKK-----DDDDIDLFGSDEEEDAEAA-----
hydractiniaCO538874 -----LATENTDLRKLADLAKQVANLDRVSKLEGGTGTQTKP-----ENDDDDDFDLFGSDEEEDAEAA-----
mnemiopsisCF925005 -----LEGRVEKLEAENAHLFNVTNLLAKRLAELEKVLGDQTVTAAPVVASKPAKPAKPVK-----EESDDDFGFGSDEEEDAEAA-----

humanNM_032378	QLREERLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLEACVRSIQLDGLVWGASKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
chimpanzeeXP_512433	QLREEWLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKLWDE	TDMAQLEACVRSIELDGLVWGTGSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
rhesusCO647794	QLREERLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLEACVRSIQLDGLVWGASELV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	NIPPF---
cowCK951084	RLREERLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLEACVRSVQLDGLVWGSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
sheepAAQ11745	RLREERLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLEACVRSVQLDGLVWGSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVECRWG---RPLERSH-QVEEHVQSV	DIAAFNKI
dogXP_532345	RLREERLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKPWDE	TNMAQLEACVRSIQLDGLTWGSSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
catAY686736	RLREERLRQYAEKK---AGRPALVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLEACVRSIQLDGLTWGSSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
rabbitP53787	RLREERLRQYAEKK---AKKPALVAKSSILLD	VKPWDE	TDMARLEACVRSVQLDGLVWGASKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
ratXP_216967	RLREERLRQYAEKK---AKKPTLVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLETCVRSIQLDGLVWGASKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
mouseNP_075729	RLREERLRQYAEKK---AKKPTLVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAQLETCVRSIQLDGLVWGASKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEEHVQSV	DIAAFNKI
chickenBI067880	KVREERLRQYAEKK---AKKPGLIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKMEECVRSVQMDGLVWGASKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDYVQSV	DIAAFNKI
XlaevisBG017641	RIREERLKHAYAEKK---SKKPGVIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRTVQMDGLVWGSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDYVQSV	DIAAFNKI
XlaevisBG814646	RLREERLQYAEKK---SKKPGVIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRTVQMDGLVWGSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDYVQSV	DIAAFNKI
XtropicalisaAH88544	RIREERLRQYAEKK---AKKPGVIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRTVQMDGLLWGSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDYVQSV	DIAAFNKI
rainbowtroutCF752638	RLXEQRLKEYAEKK---AKKPTLIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRSVADGLLWGQSKLV	PVGYGIR	KLQIQCVVEDDKVGTDLLE-----	
zebrafishCAI21006	RLKEQRLQYAEKK---AKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMSKLEECVRSVQMDGLLWGASKLV	PVGYGIR	KLQINCVVEDDKVGTDFLEEEIT-KFEDYVQSV	DIAAFNKI
flounderCAC28942	RLKQERIAAAYAACK---AKKPTLIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRTVQIDGLLWGASKLV	PVGYGIR	KLQI-----	
halibutCF931853	RVKQERLDAYAACK---AKKPTLVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRTVXIDGLLWGASKLV	PVGYGIR	-----	
medakaAV669452	RIKQERLEAYAACK---AKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRSVQMDGLLWGASKLV	PV-----	-----	
salmonBG934157	RMKEERIAAAYAACK---SKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMSKLEECVRSVVXDGLLWGQSKLV	PRGLXA-	-----	
takifuguAL842751	RIKQERLDAYAACK---SKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMSMLEKCVRSVQMDGLLWGASKLV	PVGYGIR	KLQINCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDFVQSV	DIAAFNKI
killifishCN93283	RIKQERLEAYAACK---AKKPTLVAKSSILLD	VKPWDE	TDMAKLEECVRTVQMDGLLWGASKLV	PVGYGIR	KLQINCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDYVQSV	DIAAFNKI
morhuaCO541471	RIKQERIDAYAACK---SKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDVMKLEECVRSVQADGLLWGASKLV	PVGYGIR	KLQINCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFEDYIQSV	DIAAFNKI
SgranularisAJ973181	RQTEERLAEYRAKK---AKKPGVIAKSNILLD	VKPWDE	TDMAEVEKAVRSVEKDGLLWGASKLV	PLAFGIK	KLQITCVVEDDKVGTDEIEEALD-AFEDLIQSV	DIAAFNKV
SpurpuratusCX692468	KRTQERVAAYQAKK---SKKPALIAKSNILLD	VKPWDE	TDMAEIEKAVRTVAMDGLLWGASKLV	PLAYGIR	KLQITCVVVDKVGTEDEDAIT-AFEDLVQSV	NIAAFK---
mosquitoEAA08608	ELREKRLAEYAACK---SKKPALIAKSNILLD	VKPWDE	TDMKVMEQEVRSISADGLLGAAKLV	PLAYGIR	KLQMSCVIEDDKISVDWLQEEIE-KIEDYVQSV	DIAAFNKI
silkwormBAB21109	KIKEERLAAYNAKK---AKKPVLIAKSNILLD	VKPWDE	TDMAALEQAVRSISTDGLLWGAALKLV	PLAYGIR	KLQISCVVEDDKVSDWLWTEEIE-KNEDYVQSV	DIAAFNKV
DmelanogasterNM_135517	RIREERLAAYAACK---AKKVQIIAKSNILLD	VKPWDE	TDLQVMEFTEIRKITQDGLLWGASKLV	PVAFGIK	KLQISCVVEDDKVSDWLWTEEIE-KLEDYVQSV	DIAAFNKI
DpseudoAASF01005253	RIREERLAAYTAKK---SKKAVIIAKSNILLD	VKPWDE	TDLQAMEFTEIRKIALDGLLWGASRLV	PVAFGIK	KLQISCVVEDDKVSDWLWTEEIE-KLEDYVQSV	DIAAFNKI
beexM_392544	KLREERLAAYAACK---AKKPALIAKSNILLD	VKPWDE	TDMKAMEEEVRSIETDGLLWGASKLV	PLAFGIK	KLQISCVVEDDKVSDWLWTEQIQ-DIEDYVQSV	DIAAFNKV
bluecrabCV528107	KVREQRL-----					
prawnAU175760	RIREERLKAYADKK---SKKPGVIAKSSVLLD	VKPWDE	TDMKVMAEVRKIEMDGLLWGAALKLV	PLAFGIK	KLQILCTVEDEKVSIDDLSEKIQ-EIEDYVQSV	DIAAFNKI
brineshrimpP32192	KVKAERIAAYQAKK---SHKPTVIAKSSILLD	VKPWDE	TDMGAMEREVRSIAMDGLIWGASKLV	PVAFGVK	KLQISCVVEDDKVSDDELVEKIE-AFEDYVQSV	DIAAFNKI
oysterCD648110	KIRQERLAAYEAKK---SKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMKMEEVRSKITADGLLWGQAKLV	PIGYGIR	KLQINCVIEDDKISTDFLEDEIT-GIEDLVQSM	DIAAFNKI
earthwormCF799786	RVKQERLKAYESKK---AKKTVLIAKSNILLD	VKPWDE	TDMSLLEKSVRSIEMDGLLWGASKLV	PVGYVIR	KLQISCVVEDDKLALMTLK-----	
eiseniaBP524412	RVKQERLKAYEEKK---SKKPVLIAKSNILLD	VKPWDE	TDMTLGL-----			
schistosomaBAB21109	RIRSERAAYLAKK---ASKPAIVAKSSIVLLD	VKPWSDE	VHMEELTSLVRSIQADGLLWGSKLV	PVAYGIR	KLQICCVVEDDKVWTDYLEESIL-NFEDHVQSV	DIASFNKL
echinococcusAAF02297	KCKQMAEQNKAAA---SKKEKPVAKSMIVLLD	VKPWDDT	TNMAEMEMGVRAITTDGLLWGTGSKLV	PLVHGIR	KLQIACVVEDDKVGTDFLEESIM-ELEDYVQSV	DIVASFNKL
caenorhabditisCAB63360	KVVEERLAAYAACK---ATKAGPIAKSSVILLD	VKPWDE	TDLGEMEKLVRSIEMDGLVWGAKLV	PIGYGIR	KLQIITVIEDLKVSDDLIEKITGDFEDHVQSV	DIVAFNKI
xiphinemaCV581392	RIREECLNAYADKKKXPNLGVIAKSSVILLD	VKPWDE	TN-----			
dirophilariabQ455878	RIKQERLKAYAEKK---AKKPEVIAKSSIFE	VKPWDGT	TDM-----			
cionaAK113043	RLKQERIEAYKAKK---SKKPALIAKSNILLD	VKPWSDE	TDMALEKCVRSVQTDGLLWGASKLV	KIAYGVK	KLQITCVVEDDKVGTDFLEEEIT-AHDEYVQSV	DIAAFNKI
hydraCD680373	KRKEELLAKYNAKK---ASKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMALMEQKVRSIEMDGLLWGASKLV	PLAYGIR	KLQILCVVEDDKVGTDLLEEEIT-KFDDLQSV	DIASFNKL
hydractiniaCO538874	KKKAEEAVAKYNAKK---AKKPALIAKSSILLD	VKPWDE	TDMAEIERLVGRIKVDGLVWGASKLV	PVGYGIR	KLQILCVVEDDKVGTDFLEEEIT-KFEDLVQSM	DIAAFNKI
mnemiopsisCF925005	KMKRLAAEKKAADAAAKKDKPVLKSNVLLD	VKPWDE	TDLQAMEKAVRAIKMDGLTWGSKLV	PIGFGIR	KLRLRISTCVIDELVGLYDLLEDNIT-ELEDYVQSV	DIVSHNKI

Legend : ClustalX alignment for 45 full-length eEF1Bδ sequences from all organisms as described in text. Sequences were extracted from nucleic and proteic databanks using NCBI resources via Internet. The common names of organisms are used for convenience. Scientific binomials can be obtained from the accession numbers associated to the names of the organisms. Blue boxes correspond to highly conserved motif sequences characteristic for guanine nucleotide exchange activity as explained in text. Red boxes are the consensus CK2 phosphorylation sites. Sequences motif in bold red indicated the putative CDK phosphorylation sites. The aminoacid sub-lined in yellow are the hydrophobic residue characterizing the leucine zipper domain. In grey are two aromatic residues conserved in the sequences. For the species where two messengers had been found, only the insert containing form was shown, the insertion motif is written in green.

Annexe 3 : Séquences protéiques des protéine eEF1B α (partielle), eEF1B δ et eEF1B γ chez l'oursin
(l'insert caractéristique de l'isoforme eEF1B δ 2 est surligné en jaune).

>S. purpuratus eEF1Bbeta (emb|CAJ00308.1)
GTASQADVVIKAMSGAPAAELFNALRWYNQVKSYSSTFTSLPGVAKALGDYGPAGTPAAAKKPKAGDDDDDDDDDF
DCFGSDEEEEEAKPAPKTKIEVKKPKKVVIKSSVLFVDPKPEDDETDLGDIEKAVRAIVKDGLHWGASKRVPICYG
IEKLQILSTVEDEKVSVDALQEEIEEFDTVQSVDIAAFNKV*

>S. granularis eEF1Bdelta2 (emb|CAJ00309.1)
MAHPLMHENIWFDRNRFQEAQAEAKYQEHVASQHSGLVVQKSDGPASNLVSEIARARQNIQSSLSAGVGLSVGVGVD
NPEILARLSAVEKENADLRKITTDLQAQAVAKLTERLSALDTSAAPPASSQPAQSKPVQNGKADEDEDDDDDFDPFA
ESDEDEESEEEKRQTEERLAEYRAKKAKKPGPIAKSNIILDVQKPDDETDMAEVEKAVRSVEKDGLLWGASKLV
PLAFGIKKLQITCVVEDDKVGTEDIEEALDAFEDLIQSDVDAAFNKV*

>S. purpuratus eEF1Bgamma (emb|CAJ00307.1)
MASGTLTYTPENTRAYKIQIAAGYSGAQLTVVQDPPAFKFGETNKSAEFLKFFPLGKVPAPAFENGSGDTLFESNAI
AYYVSNEQLRGTDDLKSAQVQMFVNLADNEIEPAASTWVFPTLGVVQYNKQOTEKAKETLKAVLGFLELYLKTRT
FLVGERVTLADISVGCQLLGAYKQVLDVNFKEFVHLNRWFVTLVNQPEVKAIIVGEVTLCEKMAQFDSKKYAELS
GGSKKEKKPKVEKPKAEKKAKKEVVDEDEDEPPPPPKPKVDLFAKCPKSDFDMDAWKRCYSNKDTEALPYFWD
KFDKEGYSIWHCEYNIPEYLNENMYYQTCNLVAGFFQRTKEMVKNVAFGNVLI FGEDKDTALQGVFFWKGQSLIFE
RCEDWQVDYQSYNWTKLDPETAETKRMVKKFFMWEGDFGPKLVNQGKTYK*

Résumé

La synthèse protéique est une étape cruciale dans la régulation de l'expression des gènes. Elle implique l'orchestration de différents facteurs autour de trois phases, l'initiation, l'élongation, et la terminaison, permettant l'expression des protéines de manière ciblée dans le temps et l'espace. Le facteur d'élongation eEF1 regroupe deux éléments : une protéine G nommée eEF1A et un complexe d'échange de GDP/GTP nommé eEF1B dont le rôle fondamentalement reconnu est de réactiver eEF1A.

Nos résultats concernent notamment la structure du complexe eEF1B avec la mise en évidence de différentes sous-populations co-exprimées dans la cellule. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence une relocalisation de ces complexes dépendante du cycle cellulaire. Des analyses de séquences nous permettent de suggérer que le complexe est une cible universelle de la kinase CDK1/Cycline B.

Ces résultats montrent l'importance des régulations du complexe eEF1B et plus généralement de l'élongation au cours du cycle cellulaire.

Summary

Protein synthesis is a critical step during the regulation of gene expression. It implies the coordination of diverse factors during three steps called initiation, elongation and release, thus allowing the production of proteins at the right place and at the right time. The elongation factor eEF1 is made-up of two entities : a G protein called eEF1A and a GDP/GTP exchange complex called eEF1B which canonical role is to reactivate eEF1A.

Our results concern particularly the eEF1B complex structure, and we show the co-expression of different subsets of the complex within the cell. Moreover, our results demonstrate a cell cycle-directed relocalisation of the eEF1B complex subsets. Finally, sequences analysis lead us to hypothesise that the eEF1B complex is a universal CDK1/Cyclin B target.

Altogether, our results show the importance of regulation of the eEF1B complex and globally elongation, associated with the cell cycle.