Le facteur EEF-1B et la régulation de l'élongation de la synthèse protéique dans l'embryon d'oursin Sphaerechinus granularis

Annabelle Monnier

▶ **To cite this version:**

Annabelle Monnier. Le facteur EEF-1B et la régulation de l'élongation de la synthèse protéique dans l'embryon d'oursin Sphaerechinus granularis. Biologie cellulaire. Rennes 1, 2000. Français. NNT : . tel-01117677

HAL Id: tel-01117677

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117677

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
de la thèse : 2437

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

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

mention Biologie

PAR

Annabelle MONNIER

Equipe d'accueil :
Laboratoire Biologie Cellulaire de l'Ovocyte
Station Biologique de Roscoff
CNRS UPR 9042-UPMC UFR 937

Ecole Doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

LE FACTEUR eEF-1B ET LA RÉGULATION DE L'ÉLONGATION DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS L'EMBRYON D'OURSIN *Sphaerechinus granularis.*

Soutenue le 5 Décembre 2000 devant la Commission d' Examen

COMPOSITION DU JURY :

Pr Katherine Le Guellec	Professeur à l'Université de Rennes 1	Président
Dr Beverley Osborne	Directeur de Recherche CNRS	Examinateur
Dr Hervé Moreau	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
Pr Jean-Pierre Rousset	Professeur à l'Université de Paris VI	Rapporteur
Dr Odile Mulner-Lorillon	Directeur de Recherche CNRS	Directeur deThèse

Ce travail a été réalisé à la Station Biologique de Roscoff dans l'équipe Biologie Cellulaire de l'Ovocyte.

Je remercie le Professeur André Toulmond pour son accueil à la Station Biologique.

Je remercie le Docteur Odile Mulner-Lorillon et le Professeur Robert Bellé de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de l'équipe "BCO" et d'avoir guidé mon travail avec patience. Je les remercie pour leurs précieux conseils tout au long de cette thèse et pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont accordés.

Je tiens à remercier le Docteur Hervé Moreau et le Professeur Jean-Pierre Rousset d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie le Professeur Katherine Le Guellec et le Docteur Beverley Osborne d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Un grand merci également à tous les membres de l'équipe BCO, Sandrine pour son soutien quotidien et sa grande patience, Magali pour sa gentillesse et sa bonne humeur, Julia, Patrick et Julie pour leur aide, leur grande écoute et l'amitié qu'ils m'ont accordée.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnels de la Station Biologique sans qui ce travail n'aurait pu être possible. Une pensée toute particulière pour les étudiants qui ont fait de cette thèse un moment très agréable, Arnaud et Marie-Cécile, Isabelle et Marie, Flo et François-Yves, Florent, Aline, Kamal...la liste est longue. Merci à Christelle, Odile et à Franck.

Un grand merci à tous.

A mes parents, pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont toujours accordés

Une pensée particulière pour Laurence, Yannick et Mohamed

Sommaire

Introduction

Chapitre I: L'élongation de la synthèse protéique

I- Situation de l'élongation dans la synthèse protéique p.2
A- Initiation de la synthèse protéique p.3
B- Terminaison de la synthèse protéique p.6
II- La phase d' élongation de la synthèse protéique p.7
A- Les réactions de l'élongation p.7
B- Les facteurs d'élongation p.10
1- Le facteur d'élongation eEF-1 p.10
a- Le facteur eEF-1A p.11
b- Le complexe d'échange de nucléotides eEF1-B p.13
2- Le facteur d'élongation eEF-2 p.19
3- Le facteur d'élongation eEF-3 p.20
III- La régulation de la traduction au niveau de l'élongation p.21
A- Régulation de l’élongation par phosphorylation p.22
1- Le facteur d'élongation eEF-1 p.22
2- Le facteur d'élongation eEF-2 p.27
B- Régulation de l’élongation par les polyamines p.28
IV- Les facteurs d'élongation: du cycle cellulaire au cancer p.30
A- Les facteurs d'élongation et le cycle cellulaire p.30
B- Les facteurs d’élongation et la transformation cellulaire p.31

Chapitre II: L'embryon d'oursin

I- La fécondation et le développement précoce p.34
II- La synthèse protéique au cours du développement précoce p.38
A- Analyse de l’augmentation de la traduction p.38
B- Mécanismes impliqués dans l’augmentation de la traduction p.40
III- Les changements de phosphorylation p.42
A- Changements impliqués dans la transduction du signal p.43
B- Changements liés au cycle cellulaire p.44
C- Changements liés au développement précoce p.44
IV-Rôle des polyamines dans le développement de l'embryon précoce p.46

Résultats

I- Le facteur d'élongation eEF-1B p.48

A- Clonage de la sous-unité eEF-1δ d'oursin p.48

Article 1 p.49

Developmental regulation of elongation factor-1δ in sea urchin suggest appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae.
Exp. Cell. Res., **242**, 228-234.

B- Origine phylogénétique des protéines eEF-1δ et eEF-1β p.56

Article 2 p.57

The elongation factor-1 δ (EF-1 δ) originates from gene duplication of an EF-1 β ancestor and fusion with a protein-protein binding domain. *Gene,* **233**, 83-87.

C- Analyse structurale du complexe eEF-1B d'oursin p.62

II- Régulation transcriptionnelle de eEF-1δ chez l'oursin p.76

A- Sélection alternative du site de polyadénylation du messager eEF-1δ au cours du développement précoce p.76

Article 1 p.49

Developmental regulation of elongation factor-1δ in sea urchin suggest appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae.
Exp. Cell. Res., **242**, 228-234.

B- Découplage de la transcription de eEF-1δ et eEF-1A au cours du développement précoce p.76

Article 3 p.77

Changes in elongation factor-1α transcripts are uncoupled to changes in EF-1δ during sea urchin development. *Biology of the cell,* **90**, 661-663.

III- Régulation de l'élongation par les polyamines dans le lysat d'oursin p.80

Article 4 p.81

Polypeptide chain elongation in lysates from the sea urchin *Sphaerechinus granularis*: regulation by polyamines. Soumis.

IV- Régulation de l'élongation par phosphorylation du complexe CDK1/cycline B dans le lysat de réticulocytes de lapin p.95

Article 5 p.96

Evidence for regulation of protein synthesis at the level of the elongation step and effect of CDK1/cyclin B phosphorylation. Soumis.

Conclusions et perspectives

I- Structure du facteur eEF-1B p.107

II- Fonctions du facteur eEF-1B p.107

Bibliographie

p.111

Sommaire des figures

Figure 1: Les trois phases de la synthèse protéique p.2
Figure 2: Initiation de la synthèse protéique chez les eucaryotes p.4
Figure 3: L'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes p.8
Figure 4: Activité de eEF-1 au cours de la phase d'élongation de la synthèse protéique p.9
Figure 5: Structure du facteur d'élongation eEF-1 p.11
Figure 6: Structure de la protéine eEF-1A p.12
Figure 7: Les différents rôles de eEF-1A p.13
Figure 8: Composition des différents complexes eEF-1B existant dans la nature p.14
Figure 9: Structure de la protéine eEF-1γ p.15
Figure 10: Structure de la protéine de type eEF-1β p.16
Figure 11: Structure de la protéine eEF-1δ p.17
Figure 12: Représentation schématique de la comparaison des séquences protéiques de eEF-1δ et de eEF-1β p.18
Figure 13: Structure de la Val-RS p.19
Figure 14: Structure de la protéine eEF-2 chez les eucaryotes p.20
Figure 15: Structure du facteur eEF-3 p.21
Figure 16: Les phosphorylations des différentes sous-unités de eEF-1 p.23
Figure 17: Alignement des séquences protéiques de eEF-1γ dans la région contenant le site phosphorylé par le complexe CDK1/cycline B p.24
Figure 18: Alignement des séquences protéiques de eEF-1β, eEF-1β' et de eEF-1β2 dans la région contenant les sites de phosphorylation par la CK2 p.25
Figure 19: Alignement des séquences protéiques de eEF-1δ p.26
Figure 20: Les polyamines et leurs multiples fonctions p.29
Figure 21: Relations entre le facteur d'élongation eEF-1, le cycle cellulaire et la tumorigenèse p.31
Figure 22: Fécondation et première division de l'oursin *Sphaerechinus granularis* p.36
Figure 23: Les principaux stades du développement précoce de l'oursin *Sphaerechinus granularis* p.37
Figure 24: Effet de l'émétine sur le développement embryonnaire de *Sphaerechinus granularis* à 2h15 et 24h après fécondation p.39
Figure 25: Effet de l'actinomycine D sur le développement embryonnaire de *Sphaerechinus granularis* à 4h et 24h après fécondation p.39
Figure 26: Profil des activités kinases mesurées au cours du développement précoce p.42
Figure 27: Variations cycliques des concentrations de polyamines dans l'embryon d'oursin p.47
Figure 28: Schéma récapitulatif des protéines potentiellement associées à eEF-1B et de l'effet des polyamines sur la synthèse protéique p.109
Figure 29: Régulation de l'élongation par phosphorylation du complexe CDK1/cyclineB p.110

Liste des abbréviations

ADN : **A**cide **D**ésoxy**R**ibonucléique

ADNc: **A**cide **D**ésoxy**R**ibonucléique **c**omplémentaire

ARN : **A**cide **R**ibo**N**ucléique

ARNm: **A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essager

ARNt : **A**cide **R**ibo**N**ucléique de **t**ransfert

CDK1 : **C**yclin **D**ependant **K**inase 1

CK2 : **C**asein **K**inase **2**

GSK3 : **G**lycogen **S**ynthase **K**inase 3

GST : **G**lutathione **S**-**T**ransferase

eEF : **e**ucaryotic **E**longation **F**actor

eIF : **e**ucaryotic **I**nitiation **F**actor

eRF : **e**ucaryotic **R**eleasing **F**actor

ICPO : **I**nfected **C**ell **P**rotein **0**

PKA : **P**rotéine **K**inase **A**

PKC : **P**rotéine **K**inase **C**

PI3K : **P**hospho**i**nositide **3** **K**inase

PMA : **P**horbol 12 **m**yristate 13 **a**cetate

Val-RS: **Val**yl-A**R**Nt **s**ynthétase

Introduction

Chapitre I:

L'élongation de la synthèse protéique

La synthèse protéique est importante au sein d'une cellule. Les protéines représentent plus de la moitié de la masse sèche totale et leur synthèse est capitale pour la division et la différenciation cellulaires ainsi que pour l'homéostasie. Elles possèdent des fonctions essentielles et variées: protéines enzymatiques, protéines structurales, protéines de sécrétion (hormones, immunoglobulines...). Cette multiplicité de fonction nécessite des mécanismes moléculaires de régulation.

L'expression des gènes jusqu'à la production de protéines actives peut être contrôlée à quatre niveaux:

1-transcriptionnel: transcription ou non d'un gène donné

2-post-transcriptionnel: épissage des ARN messagers (ARNm), maturation, stabilité, localisation...

3-traductionnel: ARNm traduit ou masqué, état de la machinerie de traduction

4-post-traductionnel: phosphorylation, glycosylation...

L'ensemble de ces niveaux est soumis à des régulations fines, et en particulier la traduction, sur laquelle porte plus spécifiquement notre étude. La traduction des messagers est constituée de trois phases, l'initiation, l'élongation et la terminaison. Nous nous intéressons principalement à l'étape d'élongation et à ses régulations. En effet, si l'étape d'initiation est particulièrement bien documentée dans la littérature, l'élongation et surtout sa régulation sont moins bien connues. Nous étudions le facteur d'élongation eEF-1 de la synthèse protéique, d'une part au niveau de sa structure et d'autre part au niveau de sa fonction à travers la régulation de l'élongation de la synthèse protéique.

Nos recherches ont été réalisées à partir de l'embryon d'oursin au cours du développement précoce, modèle de choix pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes aux niveaux traductionnel et post-traductionnel.

En introduction à nos résultats, nous établirons un bilan des connaissances sur l'élongation de la synthèse protéique puis nous aborderons le modèle expérimental, les embryons d'oursin.

I- Situation de l'élongation dans la synthèse protéique

La synthèse protéique est un événement biochimique majeur indispensable au maintien de la vie cellulaire. Elle fait intervenir une machinerie très élaborée dans laquelle plus de 200 molécules sont impliquées (revue dans Merrick et Hershey, 1996). Parmi ces molécules, sont recensés les ARN messagers (ARNm), les ribosomes, les ARN de transfert (ARNt), les synthétases ainsi que les facteurs de traduction (revue dans Merrick et Hershey, 1996; Pain, 1996; Proud et Denton, 1997; Clemens et Bommer, 1999). La traduction d'un messager comporte trois phases successives, l'initiation, l'élongation et la terminaison (Figure 1). L'initiation permet le recrutement d'un ARNm dans un ribosome et spécifie la phase de lecture de cet ARNm. La phase d'élongation réalise l'addition séquentielle d'acides aminés à l'extrémité carboxyterminale de la chaîne polypeptidique naissante. La chaîne peptidique sera ensuite libérée lors de la terminaison.

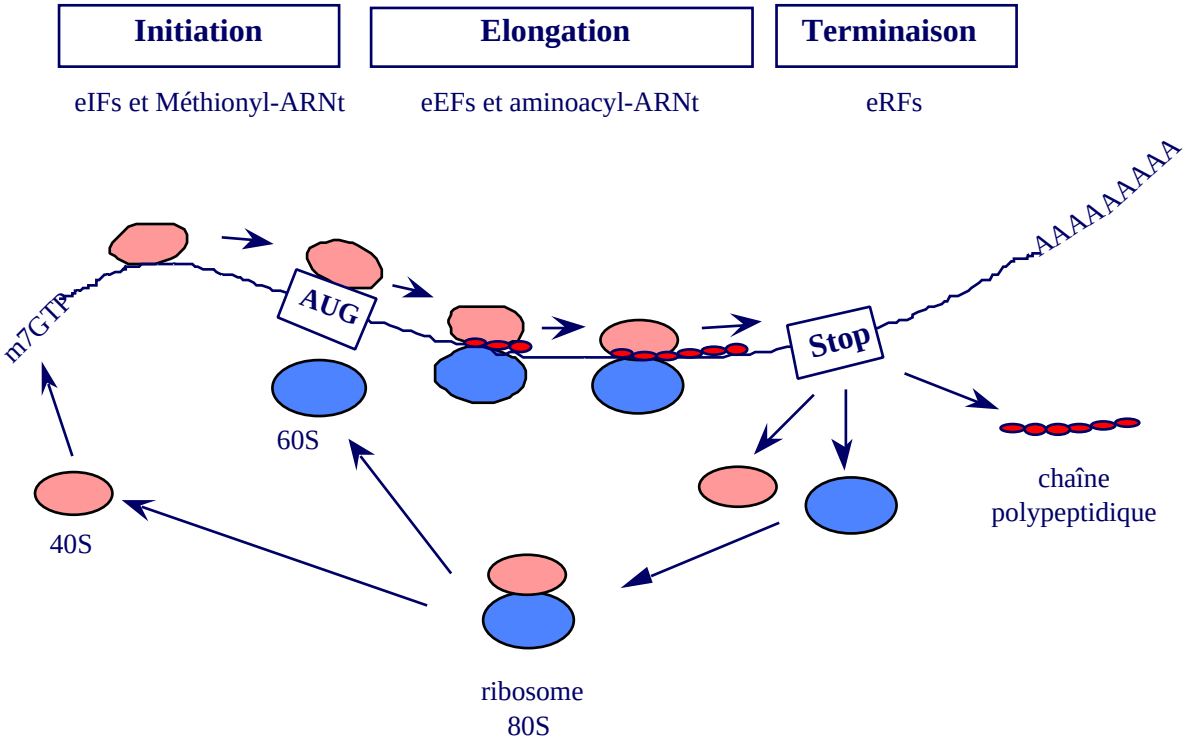


Figure 1: Les trois phases de la synthèse protéique.

Ces trois phases mettent en jeu des facteurs spécifiques, eIFs (eucaryotic Initiation Factors), eEFs (eucaryotic Elongation Factors), eRFs (eucaryotic Releasing Factors).

A- Initiation de la synthèse protéique

Au cours de la phase d'initiation, la machinerie de traduction sélectionne un ARNm et forme un complexe ribosomal de 80S dans lequel l'anticodon de l'ARNt Méthionine "initiateur" (ARNt-Met-i) intéragit avec le codon initiateur. Cette interaction établit précisément le cadre de lecture du messager. L'initiation est un processus extrêmement complexe qui nécessite l'intervention d' au moins 11 facteurs d'initiation (eIFs) ainsi que de l'énergie sous forme de GTP et d'ATP (Moldave, 1985; Merrick et Hershey, 1996). Nous allons présenter brièvement dans cette partie les différentes étapes ainsi que les différents facteurs impliqués dans la phase d'initiation (revue dans Moldave, 1985; Hershey, 1991; Merrick et Hershey, 1996; Pain, 1996). Les étapes schématisées sur la figure 2 sont:

Etape 1- dissociation des ribosomes et accumulation des sous-unités ribosomales 40S et 60S
Etape 2- formation d'un complexe contenant le facteur eIF2, du GTP et l'ARNt-Met-i et liaison de ce complexe ternaire à la sous-unité ribosomale 40S afin de former le complexe de préinitiation 43S
Etape 3- liaison de ce complexe sur l'ARNm suivie par son positionnement sur le codon initiateur correct AUG
Etape 4- fixation de la sous-unité ribosomale 60S afin de former le complexe 80S sur le codon initiateur, fin prêt à débuter la phase d'élongation. A cette étape, le complexe 80S ne contient plus de facteurs d'initiation.

L'initiation débute par l'utilisation de la petite sous-unité ribosomale 40S, maintenue dissociée de la sous-unité 60S. Trois facteurs d'initiation contribuent à maintenir ces deux sous-unités dissociées. Les facteurs eIF1A et eIF3 se lient à la sous-unité 40S afin de prévenir sa réassociation avec la sous-unité 60S (Goumans et al., 1980; revues dans Moldave, 1985; Merrick et Hershey, 1996; Pain, 1996). Le facteur eIF1A empêche la dimérisation des sous-unités 40S (Goumans et al., 1980). Le facteur d'initiation eIF6 se fixe sur la sous-unité 60S évitant ainsi toute réassociation avec la sous-unité 40S (revue dans Moldave, 1985; Merrick et Hershey, 1996).

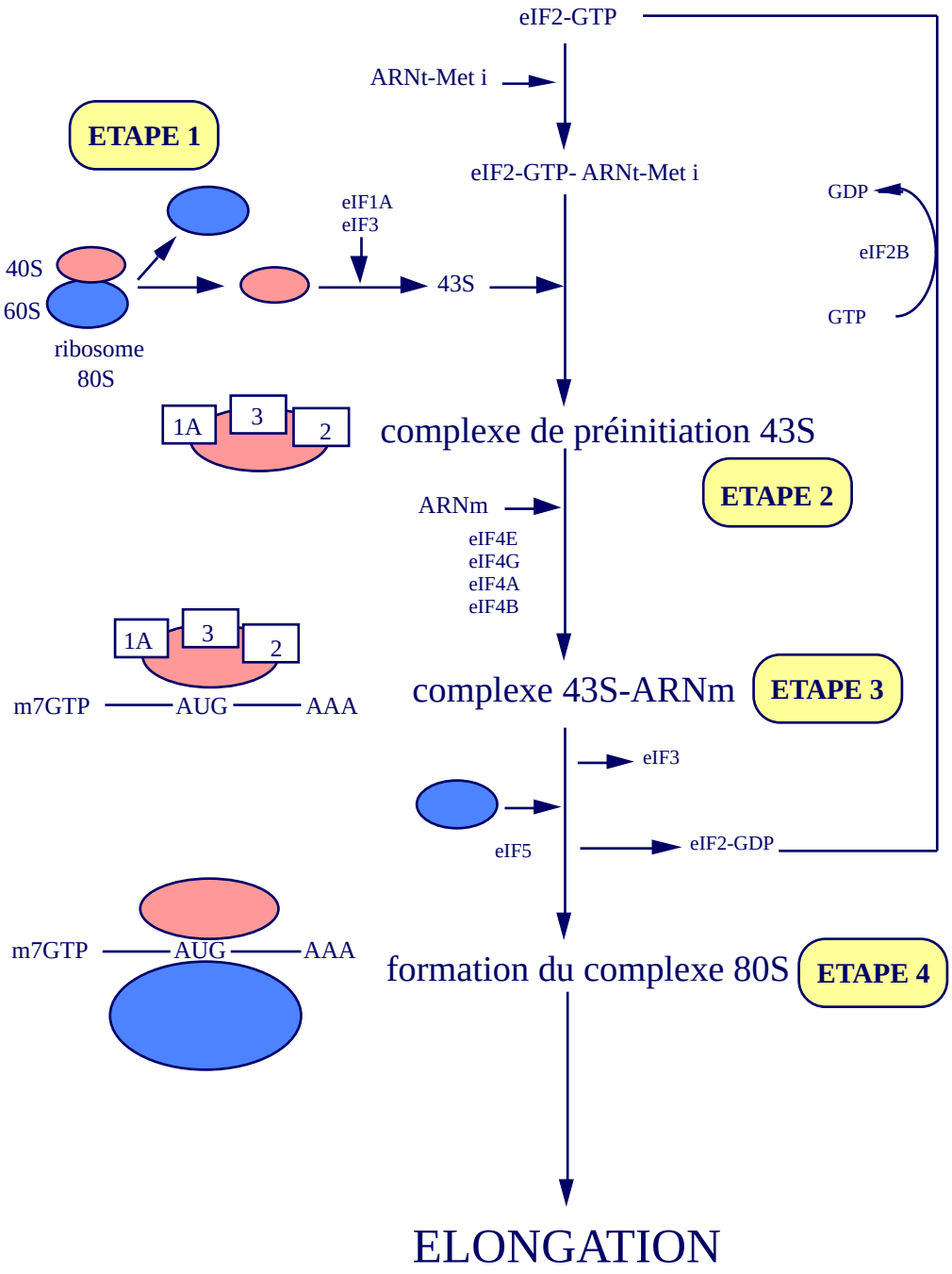


Figure 2: Initiation de la synthèse protéique chez les eucaryotes.

L'initiation comprend quatre étapes principales: la dissociation des sous-unités ribosomales (Etape1), la formation du complexe de préinitiation 43S (Etape 2), la liaison de ce complexe sur le messager puis le positionnement sur le codon initiateur AUG (Etape 3) et la fixation de la sous-unité ribosomale 60S formant ainsi le complexe 80S prêt à démarrer l'étape d'élongation (Etape 4). Ces étapes nécessitent la mise en place de facteurs d'initiation spécifiques qui sont mentionnés sur le schéma.

L'ARNt Méthionine initiateur forme un complexe ternaire ARNt-Met-i-eIF2-GTP, stabilisé par les facteurs d'initiation eIF2C et eIF3 (Gupta et al., 1990). Le facteur eIF2C évite la libération du complexe ternaire de l'ARN (Roy et al., 1988). Ce complexe ternaire se lie alors à la sous-unité 40S afin de former le complexe de préinitiation 43S. Les facteurs eIF1A et eIF3 stabilisent la liaison du complexe ternaire et sont présents dans le complexe de préinitiation 43S (Trachsel et al., 1977; Benne et Hershey, 1978; Goumans et al., 1980).

Deux types de mécanismes de reconnaissance du codon initiateur existent chez les eucaryotes. Pour la majorité des messagers, le complexe de préinitiation se fixe à l'extrémité 5' et avance sur l'ARNm dans le sens 5'/3' jusqu'à ce qu'il rencontre le codon initiateur AUG (Kozak, 1989; Altmann et Trachsel, 1993; Kozak, 1994). Ce mécanisme est dépendant de la coiffe (cap) et fait intervenir le facteur eIF4F, complexe trimérique constitué de eIF4E, eIF4A et eIF4G. La formation de ce complexe eIF4F est nécessaire pour le dépliement des structures secondaires des messagers et pour établir la liaison au ribosome (revue dans Cormier, 2000; Caraglia et al., 2000). Le facteur eIF4E s'associe avec la coiffe à l'extrémité 5' du messager. C'est le facteur limitant dans la mise en place du complexe trimérique (Sonenberg et Gingras, 1998). Le facteur eIF4A possède une activité hélicase permettant l'élimination des structures secondaires en coordination avec le facteur eIF4B. Le facteur eIF4G forme un pontage entre eIF4E et eIF3 dirigeant ainsi le recrutement du complexe 43S sur l'ARN. Ce facteur aide également à la liaison de eIF4A sur le complexe. Le recrutement de nouvelles molécules de eIF4A et eIF4B évite d'autres repliements secondaires susceptibles de gêner la migration du complexe de préinitiation jusqu'au codon AUG de départ. Les nucléotides se trouvant dans l'environnement proche du codon AUG, identifiés par Kozak (1989, 1991), permettent d'arrêter le glissement (scanning) de la sous-unité 40S au niveau du codon d'initiation. L'autre mécanisme de reconnaissance du codon AUG consiste en une fixation du ribosome sur un site interne du messager appelé IRES (Internal Ribosome Entry Site) (Pelletier et Sonenberg, 1988). Ce procédé ne nécessite pas la reconnaissance du cap et/ou le glissement sur le messager; le complexe 40S-Met-ARNt initiateur se fixe directement sur un site interne IRES. Ceci est observé pour des messagers viraux qui ne possèdent pas de coiffe en 5' et existe pour un petit nombre de messagers cellulaires (c-myc (revue dans Clemens et Bommer,1999); ornithine décarboxylase (Pyronnet et al., 2000)...).

La libération de tous les facteurs du complexe de préinitiation permet aux sous-unités 60S et 40S de s'associer en sous-unité 80S (Merrick, 1992; Pain, 1996). Cette libération est dépendante de l'hydrolyse du GTP lié à eIF2, catalysée par eIF5 (Chaudhuri et al., 1994). L'hydrolyse de eIF2-GTP permet la libération de eIF3 et de tous les autres facteurs du complexe d'initiation. Le complexe d'initiation 80S peut alors entrer dans la phase d'élongation de la

synthèse protéique. Le facteur eIF2B recharge eIF2 en GTP afin de débuter un nouveau cycle d'initiation (Trachsel, 1996).

La phase d'élongation consiste en l'allongement de la chaîne peptidique naissante par ajout successif d'acides aminés à l'extrémité C-terminale. Ce processus sera longuement détaillé dans le paragraphe II.

B- Terminaison de la synthèse protéique

Lorsque l'élongation de la chaîne polypeptidique est achevée, la translocation conduit le polypeptidyl-ARNt au niveau du site P du ribosome et un codon de terminaison UAA, UAG ou UGA (Beaudet et Caskey, 1971) se trouve au niveau du site A (revue dans Moldave, 1985). La terminaison est gouvernée par des protéines spécifiques appelées eRF pour eucaryotic Releasing Factors. Le premier, eRF1, a été purifié par Frolova et al. (1994) dans des réticulocytes de lapin. Il catalyse, *in vitro*, l'hydrolyse du peptidyl ARNt sur le ribosome en présence d'un codon stop (Frolova et al., 1994). Le facteur eRF1 reconnaît quatre nucléotides adjacents, dont le codon stop, sur le site A (Brown et al., 1990). Le second facteur, eRF3 (Zhouravleva et al., 1995) contient un motif liant le GTP et stimule *in vitro* l'activité de eRF1 en présence de GTP. A la différence de eRF1 qui possède une structure hautement conservée, eRF3 peut être subdivisé en deux parties: un domaine N-terminal très variable qui ne possède pas d'effet sur l'activité de stimulation de eRF1 (Zhouravleva et al., 1995; Frolova et al., 1996) et un domaine C-terminal essentiel pour l'activité de eRF3. Le facteur eRF3 possède une activité GTPase dépendante de eRF1 et du ribosome (revue dans Kisselev et Frolova, 1999).

La levure possède deux facteurs impliqués dans la terminaison, SUP 35 et SUP 45, correspondant respectivement à eRF3 et eRF1 (Zhouravleva et al., 1995; revue dans Buckingham et al., 1997). Les bactéries possèdent quatre facteurs de terminaison: RF1 à RF4. Les facteurs bactériens RF1 et RF2 ont un rôle équivalent à eRF1; RF3 possède une activité identique à eRF3 (Freistroffer et al., 1997).

Après l'étape de terminaison, les sous-unités ribosomales se détachent de l'ARN messager et un nouveau cycle de traduction peut débuter. Pour la plupart des messagers eucaryotiques qui sont monocystroniques, la réinitiation après la terminaison n'a pas lieu (revue dans Merrick et Hershey, 1996). Toutefois, elle existe pour des messagers contenant de petites séquences ORF (Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert) qui sont présents dans le système GCN4 chez la levure (Hinnebusch, 1996) et pour plusieurs messagers eucaryotiques (Geballe, 1996).

II- La phase d' élongation de la synthèse protéique

La phase d'élongation est un procédé cyclique qui consiste en l'allongement de la chaîne peptidique naissante par ajout successif d'acides aminés à l'extrémité C-terminale (Figure 3). Chaque cycle d'élongation est très rapide; chez les mammifères, plus de huit acides aminés sont incorporés par seconde et par ribosome. Le ribosome possède trois sites de liaison à l'ARNt. Le site A, ou site de liaison de l'aminoacyl-ARNt, fixe la molécule d'ARNt entrante, le site P, ou site de liaison du peptidyl-ARNt, fixe, après translocation, la molécule d'ARNt liée à l'extrémité en croissance de la chaîne polypeptidique et le site E, fixe l'ARNt déacétylé avant son éjection du ribosome (revue dans Proud, 1994).

Nous allons détailler les étapes d'élongation puis décrire les facteurs impliqués.

A- Les réactions de l'élongation

L'élongation est constituée de trois étapes successives (revues dans Moldave, 1985; Hershey, 1991; Merrick et Hershey, 1996; Figure 3):

I- la liaison de l'aminoacyl ARNt sur le site A du ribosome, catalysée par le facteur d'élongation eEF-1.

II- la formation de la liaison peptidique, catalysée par la peptidyltransférase localisée dans la sous-unité ribosomale 60S.

III- la translocation du peptidyl-ARNt sur le site P du ribosome par le facteur d'élongation eEF-2.

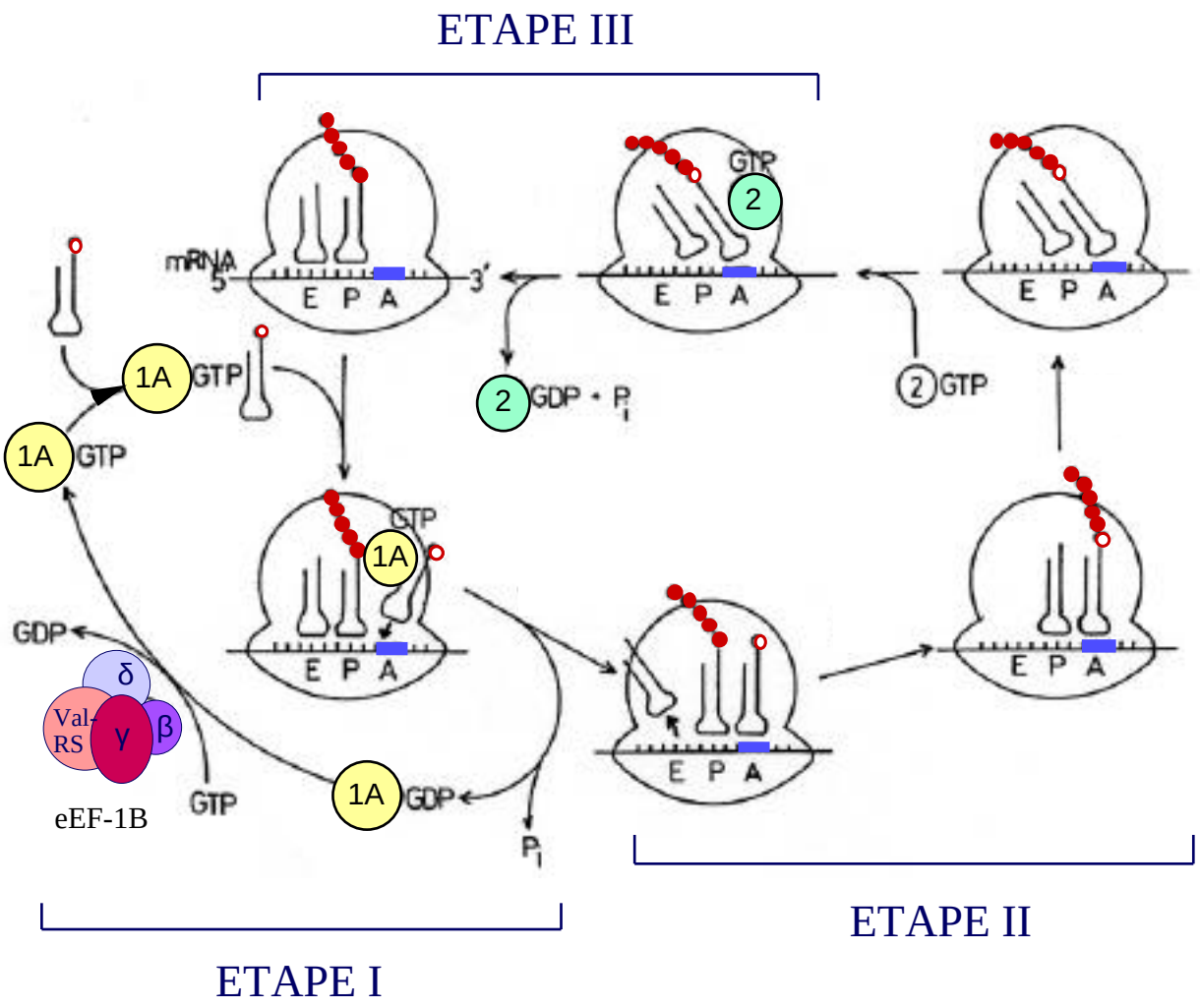


Figure 3: L'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes.

L'étape I (Figure 3) débute par la formation d'un complexe ternaire entre l'aminoacyl-ARNt, eEF-1A et du GTP avant l' interaction avec le ribosome. La fixation du complexe ternaire au site A est suivie par l'hydrolyse du GTP (Proud, 1994; Merrick et Hershey, 1996). La réaction GTPase est catalysée par eEF-1A lorsque cette sous-unité est liée au ribosome. Cette étape d'hydrolyse du GTP permet la fidélité de la traduction (Hopfield, 1974; Ninio, 1975). La traduction est fidèle lorsque l'aminoacyl-ARNt adéquat est incorporé. Lorsque l'interaction codon-anticodon est imparfaite, elle se dissocie plus vite que le GTP n'est hydrolysé. En revanche, lorsque l'appariement est stable (codon-anticodon complémentaire), le complexe eEF-1A-GTP-aminoacylARNt reste lié au ribosome suffisamment longtemps pour réaliser cette étape. Le complexe eEF-1A-GDP quitte ensuite le ribosome. Le complexe eEF-1B va alors recharger le facteur d'élongation eEF-1A en GTP (Figure 4) pour réaliser un nouveau cycle d'élongation.

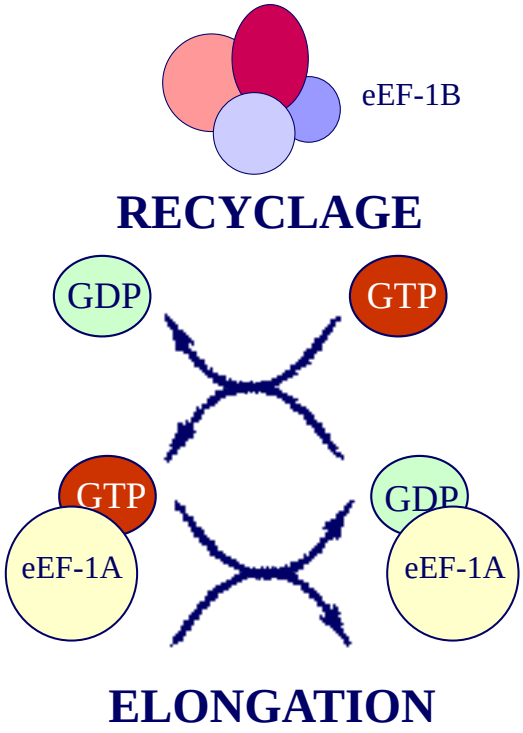


Figure 4: Activité de eEF-1 au cours de la phase d'élongation de la synthèse protéique.

L'étape II (Figure 3) correspond à la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site A, très rapidement suivie par la formation d'une liaison peptidique. La liaison peptidique est catalysée par la peptidyl transférase, seule enzyme associée au ribosome. L' activité de cette enzyme est localisée dans la sous-unité 60S et dépend à la fois de l'ARN ribosomal (ARNr) et des éléments catalytiques protéiques du ribosome (Moldave, 1985; Merrick et Hershey, 1996). La liaison peptidique est dûe à une attaque nucléophilique du groupe amine en α de l'aminoacyl-ARNt sur le groupement carbonyl du peptidyl-ARNt. L'extrémité carboxylée de la chaîne polypeptidique est ainsi séparée de la molécule d'ARNt du site P et ajoutée par la liaison peptidique à l'acide aminé fixé à la molécule d'ARNt du site A, libérant un ARNt déacétylé (Moldave, 1985; Proud, 1994; Merrick et Hershey, 1996). La formation de cette liaison peptidique ne requiert pas d'hydrolyse de GTP (Proud, 1994) et utilise l'énergie contenue dans les liaisons ester du peptidyl-ARNt (Merrick et Hershey, 1996).

Au cours de l'étape III (Figure 3), le nouveau peptidyl-ARNt est transféré du site A au site P pendant que le ribosome avance exactement de trois nucléotides le long de la chaîne d'ARNm. Cette translocation est induite par la fixation du complexe eEF-2-GTP. C'est un procédé dépendant du GTP mais pas de son hydrolyse. L'avancée unidirectionnelle du ribosome est dûe à la différence d'affinité pour le messager entre les sites A, P et E (Proud, 1994). Le facteur

eEF-2-GTP possède une forte affinité pour le ribosome. Après la translocation, le ribosome se retrouve dans une conformation qui induit l'activation de l' activité GTPase de eEF-2 (Nygard et Nilsson, 1989). En l'état, le ribosome possède une faible affinité pour le complexe eEF-2-GDP qui pourra être rapidement libéré par l'arrivée d'un nouveau complexe ternaire contenant eEF-1A (Nygard et Nilsson, 1989). Le site E favorise la tranlocation en liant l'ARNt déacétylé qui va être éjecté (Nierhaus, 1984). Chez la levure, l'éjection de l'ARNt déacétylé est réalisée par le facteur eEF-3 (Triana et al.,1993).

B- Les facteurs d'élongation

Deux facteurs (eEF-1 et eEF-2) participent à l'élongation de la synthèse protéique chez la majorité des eucaryotes. Chez les levures un troisième facteur intervient (eEF-3).

1- Le facteur d'élongation eEF-1

Le facteur d'élongation eEF-1 est constitué de deux éléments: une protéine G, eEF-1A et un complexe d'échange de GTP/GDP, eEF-1B (revue dans Riis et al., 1990; Nygard et Nilsson, 1990; Figure 5).

Nous utilisons les nomenclatures eEF-1A et eEF-1B proposées pour les facteurs d'élongation (revue dans Merrick et Hershey, 1996) et nous conservons les noms usuels de la littérature pour leurs sous-unités (Tableau 1).

Facteur	Nomenclature utilisée
Protéine G : eEF-1α	eEF-1A (50 kDa)
Complexe d'échange GTP/GDP	eEF-1B
β animal/ β végétal /β' végétal	type β (28-30 kDa)
δ animal	type δ (32-36 kDa)
γ	type γ (50-52 kDa)
Valyl-ARNt synthétase	Val-RS (140 kDa)

Tableau I : Nomenclature des sous-unités du facteur d'élongation eEF1 chez les eucaryotes.

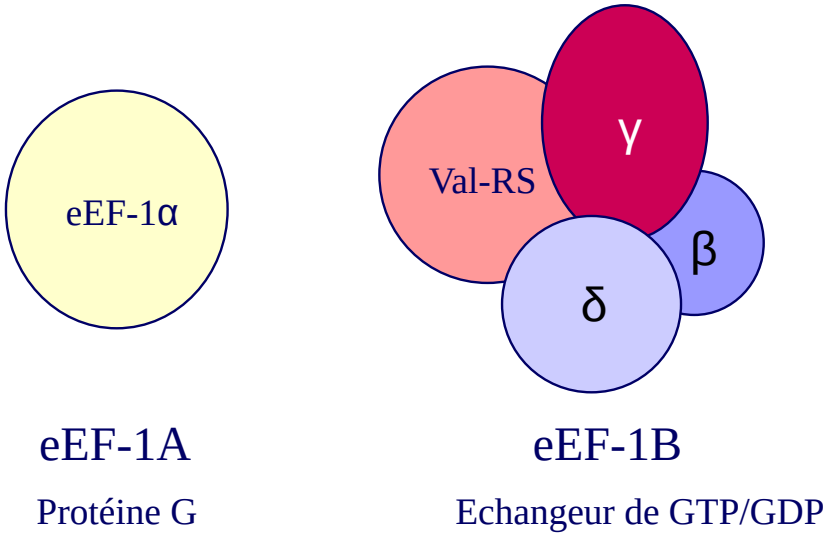


Figure 5: Structure du facteur d'élongation eEF-1.

a- Le facteur eEF-1A

La protéine eEF-1A est responsable de la liaison des aminoacyl-ARNt et de leur transfert sur le site A du ribosome. Ce transfert requiert de l'énergie et nécessite l'hydrolyse du GTP lié à eEF-1A. Cette dernière possède une activité GTPase intrinsèque et appartient à la superfamille des GTPases (Bourne et al., 1991; Sprinzl, 1994; Figure 6). La protéine eEF-1A possède la même affinité pour le GTP que pour le GDP (revue dans Negrutskii et El'skaya, 1998) et nécessite le complexe d'échange de nucléotides eEF-1B pour être rechargée en GTP. Elle intéragit avec eEF-1B par son domaine C-terminal (Van Damme et al., 1992). Dans la cellule, elle est présente sous deux formes, la forme liée à eEF1-B qui représente 10 à 30% et la forme libre majoritaire (Nagata et al., 1976).

Cette protéine de 50 à 55 kDa a été isolée, clonée et/ou purifiée dans de nombreux organismes (revues dans Browning, 1996; Merrick et Hershey, 1996). C'est une des protéines les plus abondantes dans la cellule, 1 à 3% des protéines solubles, et elle est très utilisée pour l'élaboration d'arbres phylogénétiques (Nordnes et al., 1994; Kidou et Ejiri, 1998). Elle possède un très fort degré de conservation chez les eucaryotes mais également avec son équivalent procaryotique EF-Tu (Thermo-unstable) (Nagata et al., 1976) ce qui suggère un rôle très important dans la cellule (revues dans Riis et al., 1990; Browning, 1996). L'analyse cristallographique de EF-Tu a été réalisée et indique que la protéine est composée de trois modules globulaires. Le domaine de liaison du GTP/GDP se situe dans le module N-terminal et la

liaison de l'aminoacyl-ARNt nécessite les deux modules globulaires de la partie C-terminale (revues dans Sprinzl, 1994; Merrick et Hershey, 1996; Negrutskii et El'skaya, 1998).

Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été observées: la méthylation (Hiatt et al., 1982; Fonzi et al., 1985; Dever et al., 1989) active eEF-1A; l'incorporation d'éthanolamine (Rosenberry et al., 1989; Whiteheart et al., 1989) permet l'ancrage au réticulum endoplasmique (Hayashi et al., 1989), et la phosphorylation (cf Paragraphe IIIA). Ces modifications sont des sources de régulation de l'activité de eEF-1A.

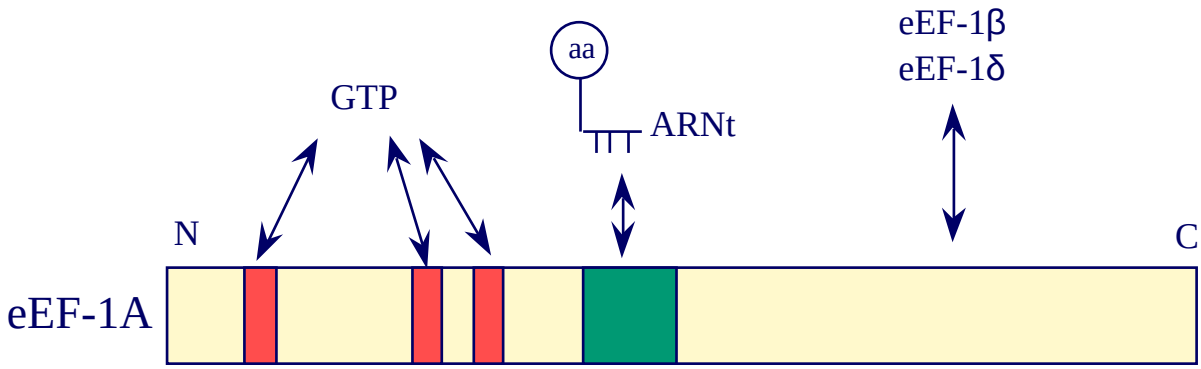


Figure 6 : Structure de la protéine eEF-1A.

Les flèches indiquent les interactions physiques.

La protéine eEF-1A est multifonctionnelle **(**Hafezparast et Fisher, 1998 **;** Figure 7). En effet, elle est impliquée dans la synthèse protéique à d'autres niveaux que l'élongation: l'initiation (Herrera et al., 1991), le transport orienté de l'aminoacyl-ARNt (revue dans Negrutskii et El'skaya, 1998) ainsi que la fidélité de traduction (Thompson, 1988; Song et al., 1989; Dinman et Kinzy, 1997). De plus, eEF-1A intervient dans l'organisation du cytosquelette, le métabolisme des acides nucléiques, la croissance et la prolifération cellulaires (revues dans Riis et al., 1990; Hershey, 1991; Bellé et al., 1995; Merrick et Hershey, 1996; Cormier, 2000). Ces différentes fonctions peuvent être corrélées à la présence de plusieurs formes de eEF-1A au sein d'une même cellule.

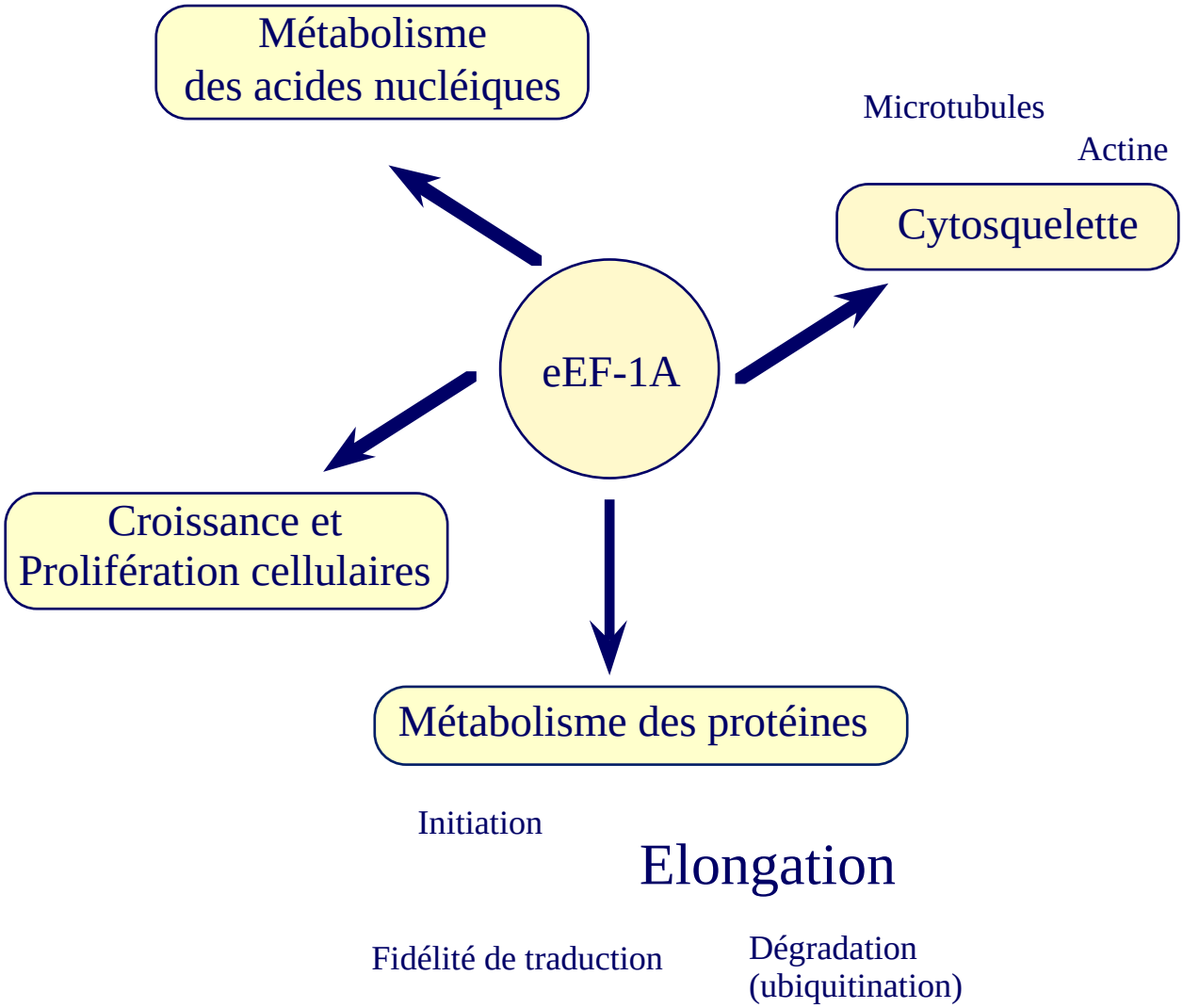


Figure 7: Les différents rôles de eEF-1A.

b- Le complexe d'échange de nucléotides eEF1-B

Le complexe d'échange de GTP/GDP, eEF1-B, purifié à partir de différents organismes, est composé de plusieurs unités en quantité variable selon les espèces et les modes de préparation (Riis et al., 1990). Les complexes purifiés de différents organismes ont en commun la protéine de 47-50kDa, eEF-1γ, et la protéine ayant le plus petit poids moléculaire, eEF-1β, qui possède l'activité d'échange de GTP/GDP dans sa partie C-terminale. La sous-unité eEF-1δ a initialement été considérée comme un contaminant de la purification car elle est moins fortement associée au complexe. C'est une protéine de poids moléculaire intermédiaire qui possède une forte identité dans sa région C-terminale avec eEF-1β mais est très différente dans sa région N-terminale. Chez les eucaryotes supérieurs, la valyl-ARNt synthétase (Val-RS), enzyme qui

catalyse l'aminoacylation de l'ARNt valine, est associée au complexe eEF1-B (Bec et al., 1989; Motorin et al., 1991; Bellé et al., 1995; Brandsma et al., 1995). Dans ce cas, la cellule contient deux formes de complexe eEF1-B, l'une contenant les sous-unités β et γ, l'autre contenant les sous-unités β, γ, δ et Val-RS . Chez les levures, le complexe eEF-1B est de forme eEF-1βγ, chez les animaux eEF-1βγ ou les deux formes eEF-1βγ et eEF-1βγδVal-RS et chez les végétaux, eEF-1ββ'γ (Figure 8).

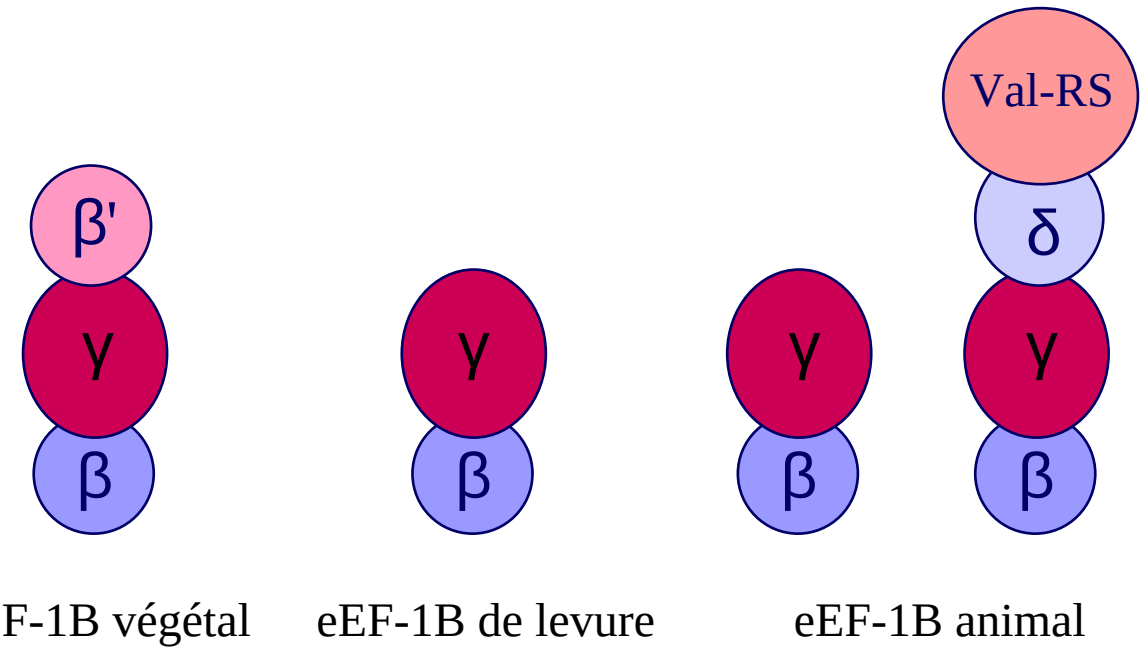


Figure 8: Composition des différents complexes eEF-1B existant dans la nature.

Représentation schématique des différents facteurs eEF-1B. β: eEF-1β; β': eEF-1β '; γ: eEF-1γ, δ: eEF-1δ. Val-RS:Valyl-ARNt synthétase.

La protéine eEF-1γ (47-50kDa) a été identifiée dans de nombreuses espèces (artémie, levure, xénope, trypanosome, souris, homme). Elle est apparue avec les eucaryotes, se retrouve chez les levures, les végétaux et les animaux. C'est une protéine majoritairement hydrophobe avec une petite région hydrophile contenant un domaine riche en lysines. Une particularité intéressante est la présence dans l'extrémité N-terminale d'un domaine homologue à celui des glutathione S-transférases (domaine GST) (Figure 9). Ce motif pourrait intervenir dans la régulation de l'assemblage spécifique et multimérique d'un complexe protéique (Koonin et al., 1994). De plus, le domaine GST est capable de lier des composés lipophiles; eEF-1γ serait ainsi susceptible de prendre part au processus de détoxification cellulaire (Billaut-Mulot et al., 1997).

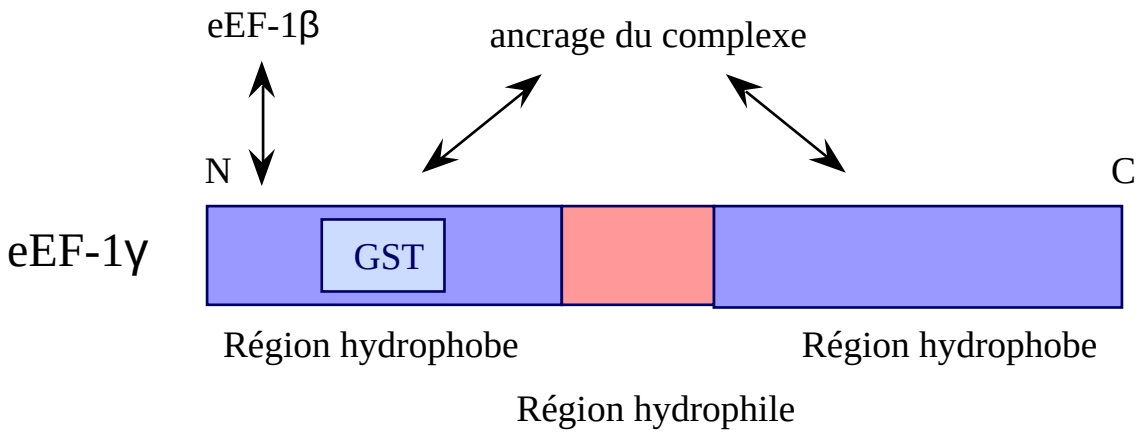


Figure 9: Structure de la protéine eEF-1γ.
Les flèches indiquent les interactions physiques.

La sous-unité eEF-1γ intéragit avec les autres sous-unités du complexe (β et δ) au niveau de sa partie N-terminale (Van Damme et al., 1991). La protéine eEF-1γ est toujours retrouvée associée à eEF-1β (Motoyoshi et Iwasaki, 1977; Bec et al., 1989) et augmente son activité d'échange GTP/GDP (Janssen et Möller, 1988b).

Dans les cellules en culture, la majorité du complexe eEF1-B se situe au niveau du réticulum endoplasmique (Minella et al., 1996a; Sanders et al., 1996) probablement par la présence de domaines hydrophobes dans eEF-1γ. Aucune activité enzymatique n'a encore été décrite pour eEF-1γ. Elle agirait d'une part comme un ciment en maintenant les sous-unités du complexe dans une configuration stable (Sheu et Traugh, 1999) et servirait d'autre part à ancrer le complexe dans les différents compartiments cellulaires (Minella et al., 1998).

La plus petite sous-unité du complexe (26-30kDa), eEF-1β, a été clonée et séquencée dans de nombreuses espèces animales et végétales. Des délétions fonctionnelles réalisées chez la levure démontrent que ce facteur est essentiel (Hiraga et al., 1993). Les protéines de type β possèdent l'activité d'échange de GDP/GTP sur eEF-1A (Murakami et al., 1978; Slobin et Möller, 1978; Ejiri et al., 1983; Carvalho et al., 1984). Alors qu'il existe une forte identité entre eEF-1A et son équivalent bactérien EF-Tu, les deux facteurs d'échange de nucléotides bactérien EF-Ts (Thermo-stable) et eucaryote eEF-1 β ne possèdent pas d'identité de séquence primaire (Maessen et al., 1986; Janssen et Möller, 1988a; Matsumoto et al., 1994). En revanche, l'analyse par résonance magnétique nucléaire montre une ressemblance de structure tridimensionnelle entre ces deux facteurs (Perez et al., 1999). La partie C-terminale de eEF-1β contient l'activité catalytique (Van Damme et al., 1991; Carr-Schmidt et al., 1999) et le site d'interaction avec eEF-

1A (Van Damme et al., 1991). Le site d'interaction avec eEF-1γ est situé dans la partie N-terminale (Van Damme et al., 1991). Entre les deux parties existe une région " charnière " riche en acides aminés acides, aspartate et glutamate (Figure 10).

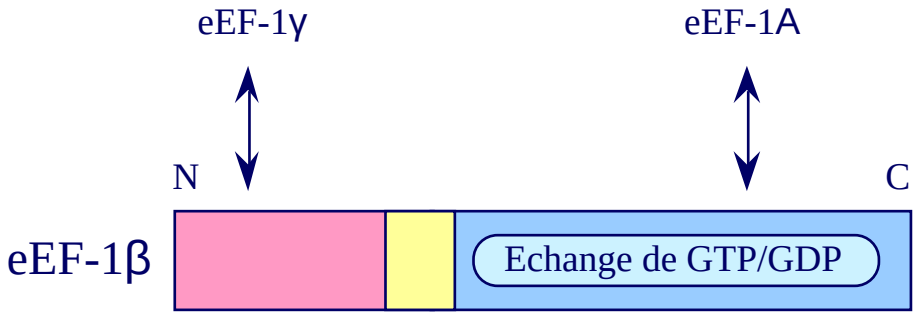


Figure 10: Structure de la protéine de type eEF-1β.

Les flèches indiquent les interactions physiques. Le carré jaune représente la région charnière riche en aspartate et glutamate.

Chez les plantes, eEF-1B contient deux protéines de type eEF-1β (Ejiri et al., 1983; Oizumi et al., 1992; Matsumoto et al., 1992). Ces deux protéines β et β' possèdent des similitudes de séquences de 60%, le domaine C-terminal étant le plus conservé (Matsumoto et al., 1994). Un nouveau gène codant pour une autre sous-unité de type β, appelée β2, a été isolé chez le Riz (Terui et al., 1998). L'analyse des séquences permet de regrouper toutes les protéines β/β' animales et végétales (Article 2). Les complexes eEF-1β de plantes contiennent les deux protéines issues de gènes paralogues β et β' dont les fonctions respectives ne sont pas connues. Les complexes eEF-1β d'animaux contiennent une seule protéine de type β. Les complexes de ver à soie (Taira et al., 1992) et de drosophile (Murphy et al., 1998) ne dérogent pas à la règle mais la protéine β a été appelée β'.

En association avec sa fonction d'échange de GDP/GTP, la protéine eEF-1 β participe à la fidélité de la traduction chez la levure (Kinzy et Wooldford, 1995; Carr-Schmidt et al., 1999).

La protéine eEF-1δ a été identifiée chez le xénope (Morales et al., 1992), l'homme (Sanders et al., 1993), l'artémie (Amons et al., 1994), le lapin (Sheu et Traugh, 1997) et plus récemment, l'oursin (Article 1). Elle est absente chez les levures et chez les végétaux; les séquences de la protéine de poids moléculaire intermédiaire des complexes de riz et de blé, appelées β, sont clairement différentes de eEF1δ (Matsumoto et al., 1994). Dans le règne animal, elle est apparue après l'émergence des Arthropodes (Article 2). La protéine eEF-1δ (28 à 36 kDa)

possède un domaine analogue à celui des protéines de type eEF-1β, situé dans le domaine C-terminal (Morales et al., 1992; Amons et al., 1994) (Figure 11). Elle possède une activité d'échange de nucléotides sur eEF-1A (Van Damme et al., 1990; Bec et al., 1994; Sheu et Traugh, 1997). Toutefois, bien que le domaine C-terminal de eEF-1β d'humain complémente un mutant déficient en eEF-1β chez la levure, eEF-1 δ humain en est incapable (Carr-Schmidt et al., 1999). Ceci suggère que ces deux protéines possèdent des spécificités de fonction bien distinctes y compris dans leurs domaines C-terminaux pourtant homologues. Le domaine N-terminal de eEF-1 δ est différent de celui des protéines de type eEF-1β (Figure 12) et ne montre pas d'identité avec d'autres protéines (Article 2). Il contient un motif leucine zipper dans une structure en hélice de type "coiled-coil" (Morales et al., 1992; Amons et al., 1994) (Figure 11). C'est un motif d'interaction protéine-protéine (Abel et Maniatis, 1989). Ce motif est particulièrement long et pourrait être responsable de multimérisation (revue dans Minella et al., 1998). L'analyse phylogénétique montre que la protéine provient d'un gène ancestral de type β fusionné avec un domaine leucine zipper (Article 2). La protéine eEF-1δ caractérisée chez l'oursin (Article 1) est présente, comme chez les autres espèces, dans un complexe de haut poids moléculaire (cf Résultats: analyse structurale du complexe eEF-1B d'oursin). Il est intéressant de noter que, chez l'oursin, eEF-1δ copurifie avec des protéines faiblement associées qui n'avaient pas été détectées dans les autres espèces, en particulier, des protéines ayant des similitudes avec une protéine ribosomale (L10A) et une protéine chaperone (HSP90) qui pourraient jouer un rôle dans la synthèse protéique (Burston et Clarke, 1995). Cette structure du facteur eEF-1B conforte l'hypothèse d'un regroupement des éléments de la machinerie de traduction dans la cellule (Negrutskii et Deutscher, 1991).

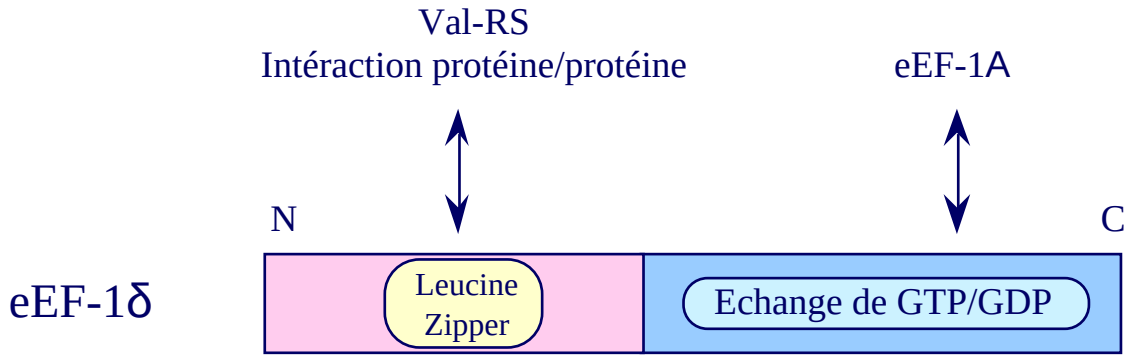


Figure 11: Structure de la protéine eEF-1δ.

Les flèches indiquent les interactions physiques.

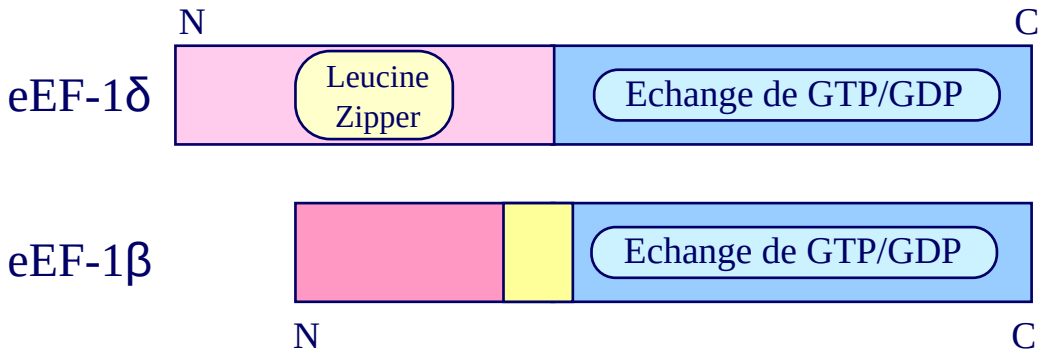


Figure 12: Représentation schématique de la comparaison des séquences protéiques de eEF-1δ et de eEF-1β.

La région C-terminale, identique entre eEF-1δ et eEF-1β, possède l'activité d'échange de GTP/GDP. Les régions N-terminale n'ont qu'une faible identité.

Les ovocytes de xénope contiennent deux sous-unités δ1 (p34) et δ2 (p36), dans un rapport 1/10, traduites à partir de deux messagers différents (Minella et al., 1994) conduisant à de multiples isoformes (Minella et al., 1998). Il existe trois isoformes de eEF-1δ dans les réticulocytes de lapin: p34, p36 et p38 qui résultent de modifications post-traductionnelles (Chang et Traugh, 1998). Dans les ovules d'oursin, la protéine eEF-1δ est présente sous deux isoformes de 33 et 35kDa (cf. Résultats non publiés). Ni l'origine, ni la signification physiologique de la présence d'isoformes multiples de eEF-1δ ne sont élucidées.

La protéine eEF-1δ intéragit avec eEF-1A par son domaine C-terminal (Sheu et Traugh, 1997; Carr-Schmidt et al., 1999) (Figure 11). Elle est associée au complexe par son interaction avec eEF-1γ, dans un site différent de celui de eEF-1β (Sheu et Traugh, 1997). Elle est responsable de l'ancrage de la Val-RS au sein du complexe eEF-1B (Bec et al., 1994; Figure 11).

La Valyl-ARNt synthétase est la seule aminoacylARNt synthétase associée au complexe eEF-1B. Elle est présente sous cette forme dans l'ovocyte de xénope (revue dans Bellé et al., 1995), dans le foie de lapin (Bec et al., 1989; Motorin et al., 1991) et chez l'artémie (Brandsma et al., 1995). Elle n'a jamais été retrouvée associée à eEF-1B chez les plantes ou les levures en relation avec l'absence de la sous-unité eEF-1δ chez ces organismes.

Chez les mammifères et le xénope, toute l'activité Valyl-ARNt synthétase est associée au complexe eEF-1B (βγδ) (Motorin et al., 1988; Bec et al., 1989; Minella et al., 1998). Une forme libre de l'enzyme est aussi présente, chez l'artémie, représentant le vestige de la forme ancestrale de l'enzyme (Brandsma et al., 1995). Le domaine de fixation de la Val-RS à la sous-unité eEF-1δ se situe dans sa partie N-terminale (Brandsma et al., 1995; Figure 13). La séquence humaine contient une extension de 200 acides aminés dans la partie N-terminale, possédant une

similitude avec eEF-1γ (Hsieh et Campbell, 1991). Cette extension est nécessaire à l'intégration de la Val-RS dans le complexe eEF-1B par la sous-unité δ (Bec et al., 1994).

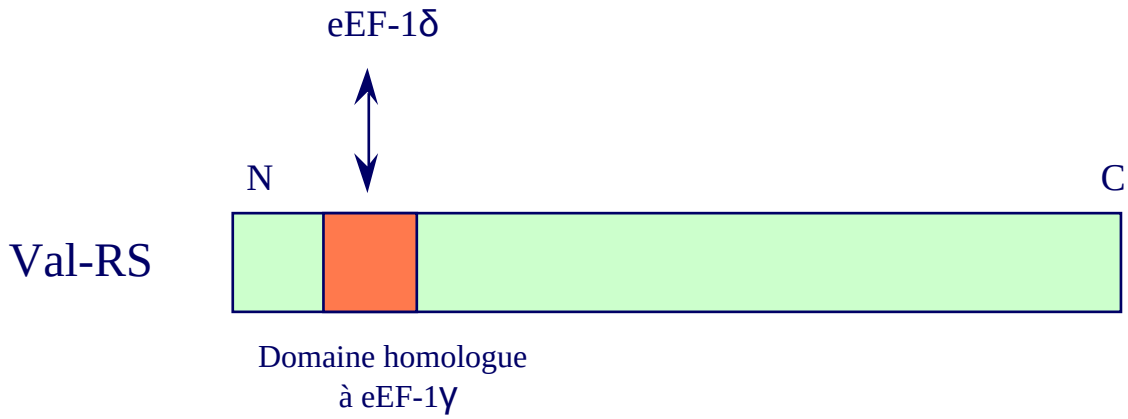


Figure 13: Structure de la Val-RS.
Les flèches indiquent les interactions physiques.

Le rôle de la présence d'une seule aminoacyl-ARNt synthétase dans une forme du complexe eEF-1B, est encore inexpliqué mais est corrélé avec l'existence d'une nouvelle régulation de l'élongation que démontrent nos résultats (cf. § IIIA et Article 5).

2- Le facteur d'élongation eEF-2

Le facteur eEF-2 catalyse la translocation du peptidyl-ARNt du site A au site P du ribosome. Il lie le GTP sur un domaine proche de l'extrémité N-terminale (revue dans Proud, 1994). Ceci induit un changement de conformation augmentant l'affinité du facteur pour le ribosome. La translocation du peptidyl-ARNt induit l'activité GTPase du facteur et sa libération du ribosome sous forme eEF-2-GDP (revue dans Riis et al., 1990; Proud, 1994). La vitesse de dissociation du GDP sur eEF-2 étant 5 fois plus élevée que celle du GTP, un facteur d'échange n'est pas nécessaire (Nygard et Nilsson, 1990). La protéine eEF-2 est conservée (Rapp et al., 1989), et apparaît sous la forme d'un unique polypeptide de 95 à 110 kDa (Figure 14).

Le facteur eEF-2 peut subir des modifications post-traductionnelles covalentes de trois ordres: la formation de diphtamide, l'ADP ribosylation et la phosphorylation (Riis et al., 1990; Proud., 1994). La première modification est la présence d'un acide aminé modifié qui résulte de la conversion de l'histidine (Histidine 714 chez les mammifères) en diphtamide (Van Ness et al., 1978; Rapp et al., 1989). C'est un processus nécessitant l'intervention d'au moins cinq enzymes différentes (Chen et Bodley, 1988). Cependant la conversion d'histidine en diphtamide n'est pas requise pour la fonction de eEF-2 (Phan et al., 1993). En revanche, les mutants pour

lesquels l'histidine a été remplacée par un autre acide aminé (lysine, arginine, acide aspartique...) deviennent inactifs (Omura et al., 1989).

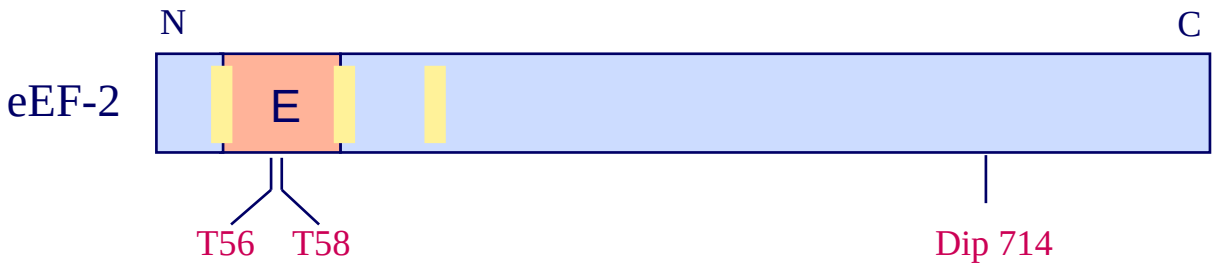


Figure 14: Structure de la protéine eEF-2 chez les eucaryotes.

Les traits jaunes représentent les éléments liant le GTP, les résidus T56 et T58, les sites de phosphorylation et l'emplacement de la diphtamide est indiqué (Dip 714). Le domaine E est le domaine effecteur de la translocation.

L'existence du dérivé diphtamide est nécessaire pour que le facteur puisse subir son deuxième type de modification, l'ADP ribosylation. La diphtamide peut être ADP ribosylée par au moins deux toxines d'origine bactérienne, la toxine diphtérique et l'exotoxine A issue de *Pseudomonas aeruginosa* (revue dans Riis et al., 1990). L'ADP ribosylation inactive totalement eEF-2 (Nygard et Nilsson, 1990; Marzouki et al., 1991).

Le troisième type de modification est la phosphorylation qui a lieu sur deux résidus Thréonine proches de l'extrémité N-terminale (les Thr 56 et Thr 58) (cf §IIIA).

3- Le facteur d'élongation eEF-3

Des études réalisées sur les facteurs d'élongation chez la levure ont démontré l'existence d'un troisième facteur, eEF-3, présent chez les levures et certains champignons (Kamath et Chakraburtty, 1986; revue dans Riis et al., 1990; Belfield et Tuite, 1993; Proud, 1994). Le facteur eEF-3, polypeptide de 115 à 125 kDa, lie et hydrolyse le GTP et l'ATP (Miyazaki et Kagiyama, 1990). Le facteur eEF-3 est spécifique de la levure et n'a pas d'effet sur des ribosomes de mammifères *in vitro* (Skogerson, 1979; Kamath et Chakraburtty, 1986; revues dans Riis et al., 1990; Merrick et Hershey, 1996). La protéine stimule la liaison du complexe eEF-1A-GTP-aminoacyl ARNt sur le site A en facilitant la libération de l'ARNt déacétylé du site E (Triana et al., 1993; Chakraburtty, 1999). Cette réaction nécessite l'hydrolyse d'ATP. Le facteur eEF-3 contient plusieurs motifs de liaison à l'ATP (Figure 15). L'extrémité carboxyterminale contient une région homologue aux aminoacyl-ARNt synthétases (Belfield et Tuite, 1993; revue dans Proud, 1994) dont la fonction est indéterminée (Figure 15).

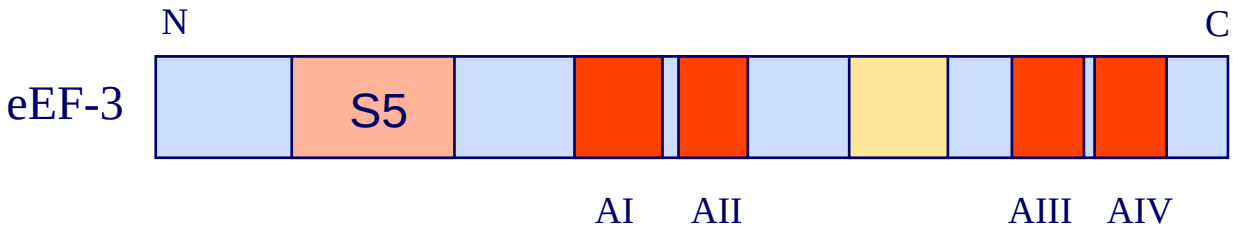


Figure 15: Structure du facteur eEF-3.

La protéine eEF-3 possède une région homologue à la protéine ribosomale S5 de E.coli, quatre régions semblables aux cassettes liant l'ATP (AI à AIV) et une séquence homologue à celle des aminoacylARNt synthétases (carré jaune).

III- La régulation de la traduction au niveau de l'élongation

Plusieurs modèles ont été développés pour étudier le contrôle de la traduction de messagers endogènes ou exogènes. Le choix de ces modèles est guidé par le fait que la traduction est modifiée en réponse à différents stimuli sans l'intervention des voies de synthèse et de transport des nucléotides.

Les réticulocytes de mammifères sont les plus utilisés. Ces cellules énuclées font activement de la traduction, essentiellement d'hémoglobine. Cette traduction s'effectue, sans transcription, sous le contrôle des concentrations en fer et en hème, par un mécanisme de tout ou rien. Les lysats préparés à partir de ces cellules sont extrêmement actifs in vitro, avec des messagers endogènes ou exogènes. Ils permettent de traduire plusieurs fois le même messager: dans une incubation de 90 minutes à 26°C, chaque molécule d'ARNm est réinitiée de 40 à 70 fois avec un taux d'élongation de la chaîne polypeptidique d'environ un acide aminé par seconde (Palmiter, 1973). Ces lysats ont permis de caractériser l'essentiel des étapes et des facteurs de la traduction (Clemens, 1984; revue dans Wahba et al., 1990). Le lysat de germe de blé a été également largement utilisé, il permet d'étudier la traduction de messagers exogènes car la traduction des messagers endogènes est faible à inexistante. D'autres systèmes acellulaires existent bien que moins efficaces pour effectuer de la traduction (revue dans Clemens, 1984). L'ensemble de ces lysats est à l'origine de la mise au point de systèmes artificiels reconstitués à partir des différents acteurs purifiés de la synthèse protéique. L'isolement et la purification des sous-unités ribosomales, facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison ainsi que d' ARN de transfert et d' aminoacyl-ARNt synthétases ont été réalisés à partir d'extraits de levure *Saccharomyces*

cerevisiae (Clemens, 1984). De même, l'étude de la phase d'élongation a été réalisée à partir des facteurs purifiés chez l'artémie (Janssen et al., 1990).

La fécondation de l'ovocyte fournit le deuxième grand modèle d'étude de la traduction. Avant la fécondation, les cellules se trouvent dans un état "quiescent", le taux de traduction y est faible. A la fécondation, le taux de synthèse protéique augmente très rapidement sans intervention de transcription. Parmi les organismes, les Invertébrés dont l'oursin sont des modèles de choix (revue dans Mathews et al., 1996).

D'autres modèles expérimentaux ont également été exploités pour l'étude du contrôle de la synthèse protéique au niveau traductionnel:
- l'infection virale de cellules mammaliennes, au cours de laquelle la machinerie de traduction de la cellule est détournée au profit du virus
- les réponses cellulaires à de nombreux stimuli externes, qui implique la production rapide d'une ou de quelques protéines spécifiques.

Ces modèles expérimentaux ont permis de mettre en évidence des régulations de la traduction au niveau de la phase de l'élongation. Nous nous attacherons à décrire les régulations induites par les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation et celles résultant de la présence de polyamines naturelles dans les cellules.

A- Régulation de l'élongation par phosphorylation

1- Le facteur d'élongation eEF-1

Les différentes sous-unités du complexe eEF-1 sont phosphorylables par plusieurs kinases (Figure 16). Ces phosphorylations sont potentiellement régulatrices à plusieurs niveaux:
-dans la structure du facteur eEF-1
-dans l'activité d'échange de GDP/GTP
-dans une autre activité liée à l'élongation (fidélité, spécificité...)
-dans l'une des nombreuses fonctions de eEF-1A.

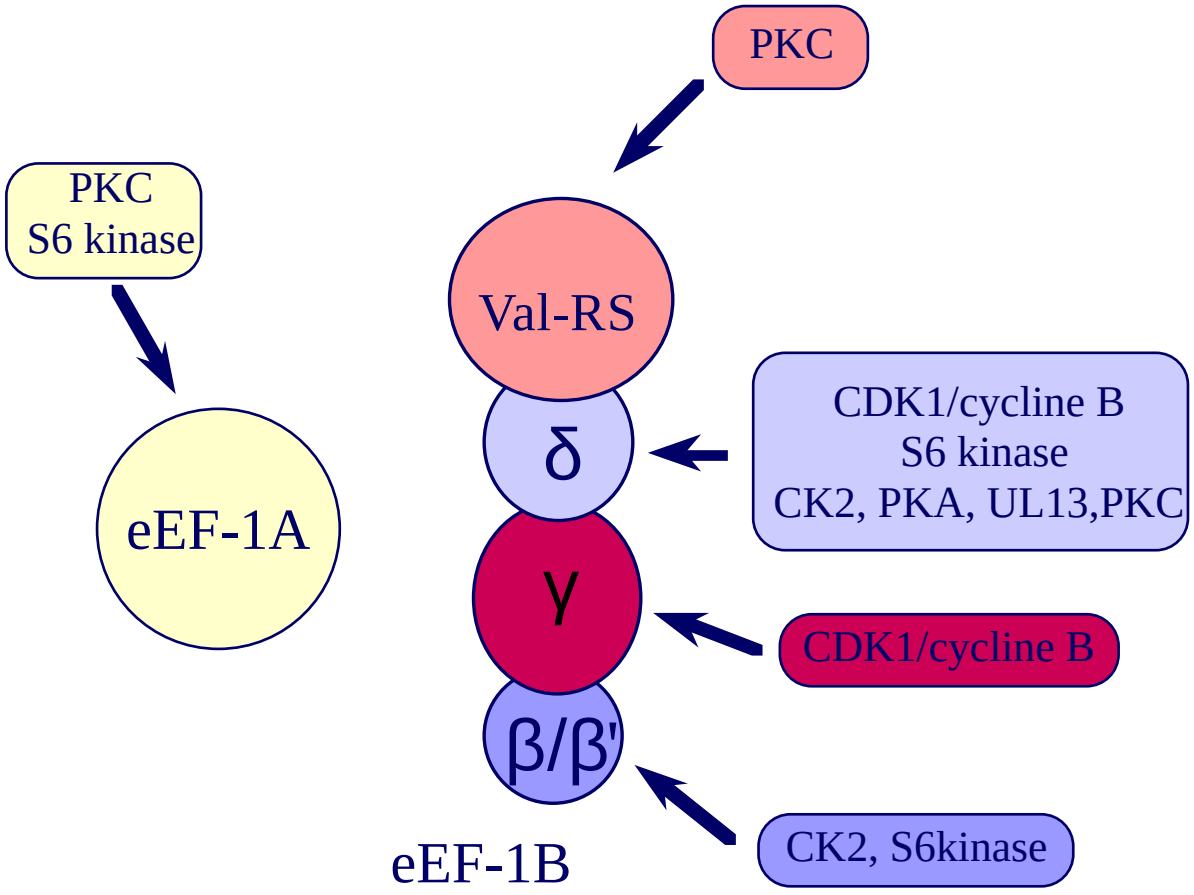
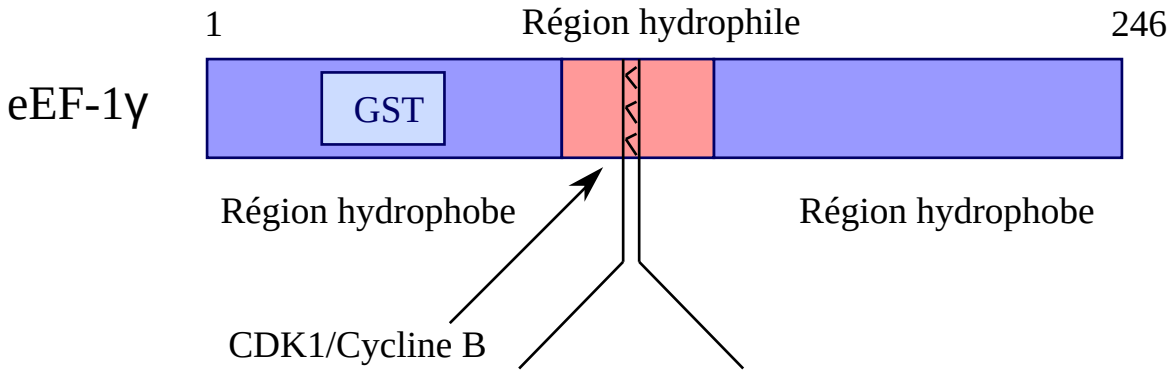


Figure 16: Les phosphorylations des différentes sous-unités de eEF-1.

Cette figure dresse le bilan de l'ensemble des phosphorylations mises en évidence à partir des différents organismes.

La protéine eEF-1A est substrat de la protéine kinase S6 (Chang et Traugh, 1997) ainsi que de la protéine kinase C delta (PKC delta) (Venema et al., 1991b; Peters et al., 1995; Kielbassa et al., 1995). En réponse à des activateurs de ces deux kinases, l'insuline et le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), une stimulation de l'activité d'élongation est observée.

La sous-unité eEF-1γ de eEF-1B est un substrat majeur de la kinase de contrôle de l'entrée en phase M, CDK1 (ou p34cdc2), dans les ovocytes de xénope *in vivo* (Mulner-Lorillon et al., 1989; Janssen et al., 1991) et dans les cellules de mammifères *in vitro* (Minella et al., 1998; Figure 17). Cette phosphorylation suggère une relation entre machinerie de traduction et cycle cellulaire qui serait apparue après l'émergence des arthropodes puisqu'elle n'existe pas chez l'Artémie. Le rôle de cette phosphorylation n'est pas déterminé dans la mesure où le rôle spécifique de la protéine au sein du complexe n'est pas connu. La phosphorylation de eEF-1γ n'a pas d'effet sur les activités *in vitro* d'échange de nucléotide de eEF-1B.



Xénope XLEF1G, X62508	FAEMQPKKE**T**(230)PKKEKPAKE
Lapin OCEF1G, X68142	FAESQPKKD**T**(230)PRKEKGSREE
Humain HSEF1G, X63526	FAETQPKKD**T**(230)PRKEKGSREE
Artémie ASEF1G, M28020	YAEFQAAIG**S**(227)GEKKKTEKAP

Figure 17: Alignement des séquences protéiques de eEF-1γ dans la région contenant le site phosphorylé par le complexe CDK1/cycline B.

Le site de phosphorylation sur Thréonine 230 (Mulner-Lorillon et al., 1992) est conservé chez le xénope, le lapin et l'humain mais absent de l'artémie.

La protéine eEF-1β peut être phosphorylée par plusieurs protéine kinases dans différents organismes. Elle est phosphorylée par une protéine kinase de type caséine kinase 2 (CK2) (Minella et al., 1998). La CK2 phosphoryle eEF-1β d'Artémie sur la Sérine 89 (Janssen et al., 1988) et chez le Lapin sur les Sérines 106 et 112 (Chen et Traugh, 1995). La Figure 18 présente l'alignement des séquences des protéines eEF-1β animales dans la région des sites consensus de phosphorylation par la CK2. Deux sites consensus ressortent de cet alignement (sites I et II). Toutes les protéines eEF-1β animales possèdent au moins un site: le site I correspondant à la Sérine 89 de l'artémie. Les séquences des vertébrés possèdent également le site II, correspondant à la Sérine 112 du lapin. Les protéines eEF-1β' de blé et de riz (Ejiri et Honda, 1985; Matsumoto et al., 1994) ne sont pas phosphorylées par la CK2. En revanche, les protéines homologues à eEF-1 β de ces mêmes espèces sont phosphorylées par la CK2 sur un résidu Sérine non identifié (Matsumoto et al., 1993).

Le rôle de la phosphorylation de eEF-1β par CK2 est controversé; pour Janssen et collaborateurs (1988), elle diminue l'activité d'échange de eEF-1β sur eEF-1A alors que Sheu et Traugh (1997) n'observent pas de modification dans l'activité d'élongation. Le GDP stimule la phosphorylation ce qui suggère qu'elle a lieu à une étape précise de l'élongation lorsque eEF-1A-GDP est associé à eEF-1B (Palen et al., 1994).

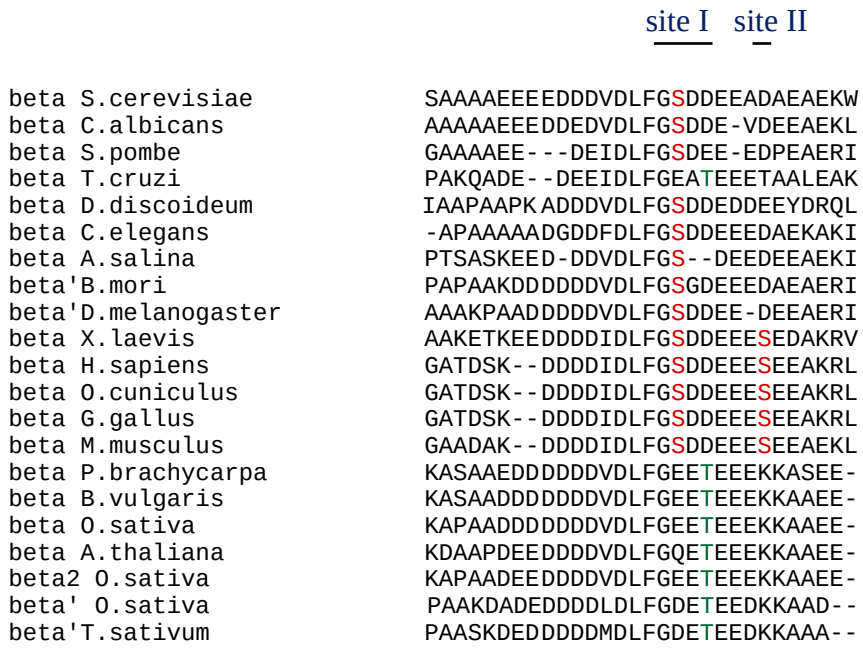


Figure 18: Alignement des séquences protéiques de eEF-1β, eEF-1β' et de eEF-1β2 dans la région contenant les sites de phosphorylation par la CK2.

Les résidus Thréonine phosphorylables par la CK2 sont représentés en vert et les résidus Sérine en rouge.

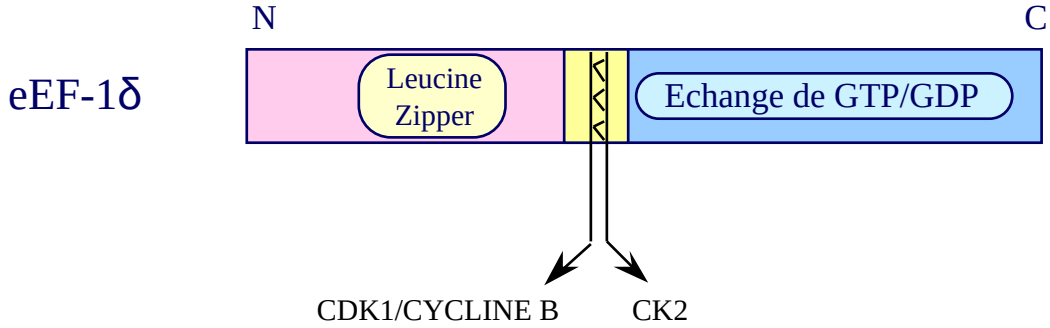
La protéine kinase C phosphoryle *in vitro* eEF-1β de lapin sur une Sérine non déterminée et, dans ce cas, augmente l'activité d'échange de GDP/GTP (Venema et al., 1991 a et b; Peters et al., 1995). Une stimulation du même ordre est observée *in vivo* dans les réticulocytes en réponse au PMA (Venema et al., 1991b). La sous-unité eEF-1β est également phosphorylée *in vitro* par la S6 kinase sur un résidu Sérine non identifiée et *in vivo* en réponse à l'insuline. Cette phosphorylation augmente l'activité d'élongation (Chang et Traugh, 1997; Chang et Traugh, 1998).

La protéine eEF-1 δ est substrat de nombreuses protéine kinases selon les espèces : la CDK1/cycline B, la CK2, la PKC, la S6 kinase, la PKA et U(L)13.

Les protéines eEF-1δ1 et δ2 du Xénope sont phosphorylées *in vivo* par le complexe CDK1/ cycline B lors de la maturation méiotique des ovocytes (Mulner-Lorillon et al., 1994; Minella et al., 1996b). Deux sites de phosphorylation ont été mis en évidence dans chacune des protéines: l'un est une Thréonine dans la séquence TPA(A)K, l'autre est une Sérine non identifiée (Mulner-Lorillon et al., 1994; Minella et al., 1996b). Chez les mammifères, la protéine est aussi phosphorylée par CDK1 / cycline B (Minella et al., 1998); en revanche, les protéines eEF-1δ d'artémie et d'oursin (Delalande et al., 1999) ne le sont pas. Cette phosphorylation serait donc acquise au cours de l'évolution.

La protéine eEF-1δ est substrat *in vitro* de la CK2 chez le Xénope (Bellé et al., 1989). Elle est phosphorylée sur des résidus Sérine et Thréonine dans un rapport 1/2 (revue dans Bellé et al., 1995). Chez le lapin, la Sérine 162 est phosphorylée par la CK2 (Sheu et Traugh, 1999); cette Sérine est présente dans un site consensus de phophorylation par la CK2 qui se retrouve dans les séquences connues de eEF-1δ. Ce site est homologue au site I de eEF-1β (Figure 18). La protéine eEF-1δ d'oursin est également substrat de la CK2 sur un résidu Sérine (Delalande et al., 1999). Le site II décrit dans les séquences de eEF-1β se retrouve dans les séquences eEF-1δ d'artémie et d'oursin (Figure 19).

Il est intéressant de noter que les phosphorylations de eEF-1β et δ par la CK2 et que celle de eEF-1δ par la CDK1 sont situées dans la région charnière de ces protéines, séparant deux domaines fonctionnels.




```
delta1 X.laevis       SQKPAAASQPAIEVAARVQKVQVTPAAKEENGTGEDDDDDDIDLF-GSDNEEEDAEAAR
delta2 X.laevis       SQKPAAAPQPVIKVAAPVQKVQVTPAKEE-NGTGE--DDDDDIDLF-GSDDEEEDAESAR
delta  O.cuniculus    THRASAPQTQHVSPMR-----QVEPPAKKAAAPAEDDEDDD-IDLF-GSD-EEEDKEAAR
delta  H.sapiens      GHRATAPQTQHVSPMR-----QVEPPAKKPATPAEDDEDDD-IDLF-GSDNEEEDKEAAQ
delta  S.granularis   -AAPPASQPAQSKP------VQ--------NGKADEDEDDDDFDPFAESDEDEEESEEKK
delta  A.salina       GAKLAAPPQKE-----------------------EEDDD--VDLF-GSD--EE-SEEAE
```

Figure 19: Alignement des séquences protéiques de eEF-1δ.

Les séquences sont alignées par clustal W. Le site de phosphorylation par la CK2 est indiqué en rose et celui de phosphorylation par le complexe CDK1/cycline B en jaune.

La protéine eEF-1δ de lapin est substrat de la PKC et de la S6 kinase *in vitro* et *in vivo* en réponse à l'insuline (Chang et Traugh, 1997; 1998). Ces phosphorylations sont corrélées à une stimulation de l'activité d'élongation de la traduction. Chez l'oursin, eEF-1δ est phosphorylée *in vitro* par la PKA (Delalande et al., 1999). Une autre phophorylation a été décrite par une protéine kinase U(L)13 lors de l'infection par le virus de l'Herpes. Dans ce cas, eEF-1δ est multiphosphorylée sur des sites non encore identifiés (Kawaguchi et al., 1997; Kawaguchi et al., 1999).

La valyl-ARNt synthétase (Val-RS) est substrat de la PKC *in vitro* et *in vivo* en réponse à une stimulation par l' insuline ou par le PMA. La phosphorylation provoque une stimulation de son activité d'aminoacylation (Venema et al., 1991a; Venema et al., 1991b).

Le complexe eEF-1 est la cible de multiples protéine kinases sur de multiples sites. Il est à remarquer que le rôle des phosphorylations est peu élucidé, en grande partie parce que les fonctions des sous-unités elles-mêmes ne sont pas connues. Soit les effets *in vitro* sont inexistants, quantitativement faibles ou controversés, soit, comme c'est le cas pour la PKC, l'effet est significatif et global impliquant la phosphorylation de toutes les sous-unités.

Nous avons privilégié la recherche de modifications globales afin de déterminer le rôle de la phosphorylation de CDK1/ cycline B. Nous nous sommes appuyés sur deux évidences : eEF-1B de mammifère est substrat de la kinase et il contient une aminoacyl-ARNt spécifique, la valyl-ARNt synthétase. Nous avons alors étudié l'élongation de polyValine comparée à une autre élongation (polySérine) dans le lysat de réticulocytes sous l'effet de la phosphorylation par CDK1/ cycline B. Nos résultats mettent en évidence une nouvelle régulation de l'élongation (Article 5). CDK1/ cycline B défavorise la traduction du codon Valine et favorise la traduction des autres codons. Nos résultats sont interprétés en terme de phosphorylation des deux sous-unités eEF-1δ et eEF-1γ. Il y aurait activation de l'élongation par la phosphorylation de la sous-unité eEF-1γ, présente dans l'ensemble du pool de eEF-1B, et inhibition spécifique pour la traduction du seul codon valine par la phosphorylation de la sous unité eEF-1δ présente dans une fraction de la population de eEF-1B contenant la valyl-ARNt synthetase (Article 5; cf Conclusions et Perspectives: Figure 29).

2- Le facteur d'élongation eEF-2

Le facteur eEF-2 de réticulocytes est phosphorylé sur deux résidus Thréonine proches de l'extrémité N-terminale (les Thr 56 et Thr 58). Ces deux sites se situent dans la région responsable de la liaison du GTP (Price et al., 1991). La phosphorylation résulte en l'inactivation

complète du facteur et l'arrêt de traduction du fait de l'absence de translocation (Nairn et Palfrey, 1987; Ryazanov et al., 1988; Redpath et al., 1993). La phosphorylation du résidu Thr 56 est suffisante pour cette inactivation (Redpath et al., 1993). La kinase qui phosphoryle les deux sites est hautement spécifique (Nairn et al., 1985; Redpath et al., 1993) d'où son nom de eEF-2 kinase. Elle a été purifiée dans les cellules de mammifères. C'est une protéine kinase appartenant à la famille des protéines kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline (Nairn et al., 1985; Redpath et Proud, 1993). Une protéine phosphatase de type 2A est capable de déphosphoryler eEF-2 (Gschwendt et al., 1989) et ainsi de rendre eEF-2 à nouveau actif sans nécessiter de nouvelle synthèse (revue dans Riis et al., 1990). La phosphorylation du facteur eEF-2 apparaît jouer un rôle physiologique. Elle est toujours associée à une inhibition de l'élongation dans les cellules et elle se produit en réponse à des stimuli induisant une augmentation du calcium intracellulaire (Nairn et Palfrey, 1996).

B- Régulation de l'élongation par les polyamines

Les polyamines sont de petites molécules présentes dans toutes les cellules (Igarashi et al., 1982). Leur rôle ne se résume pas à leur propriétés cationiques puisqu'elles sont soumises à un métabolisme complexe et qu'il existe une corrélation étroite entre de fortes concentrations de polyamines et des taux de prolifération cellulaire rapide (Wallace, 1998). Elles sont présentes sous trois formes majoritaires synthétisées à partir de l'ornithine : la putrescine, la spermidine et la spermine. Les polyamines sont indispensables pour la croissance et le fonctionnement normaux de la cellule. Il est généralement admis qu'elles jouent un rôle régulateur de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 20) même si les mécanismes moléculaires ne sont pas toujours élucidés (Igarashi et Kashiwagi, 2000; Wallace, 2000). En particulier, leur rôle régulateur dans la synthèse protéique est largement documenté (revue dans Tabor et Tabor, 1984).

Les expériences réalisées dans les systèmes acellulaires démontrent qu'elles font partie des composés de petit poids moléculaire dont l'absence (dialyse ou gel filtration) provoque une importante baisse de l'activité de traduction. L'addition de polyamines rétablit le taux de traduction des lysats de réticulocytes de lapin dialysés (Igarashi et al., 1988). La stimulation de la traduction par les polyamines provient d'une part d'un effet de charge, synergique avec les ions magnésium, et d'autre part d'un effet propre et spécifique (Igarashi et al., 1974). Dans les systèmes acellulaires, la concentration optimale de polyamines permettant la traduction est de l'ordre de grandeur des concentrations physiologiques millimolaires (Hunter et al., 1977; Igarashi

et Kashiwagi, 2000). En dehors des effets pouvant s'expliquer au niveau de l'initiation, l'élongation est aussi spécifiquement concernée (Hunter et al., 1977; Giannakouros et al., 1990). Les effets stimulateurs, au niveau de la traduction de messagers spécifiques (Russel, 1983; Igarashi et al., 1988), de l'assemblage des sous-unités ribosomales (Rheinberger et Nierhaus, 1987), du contrôle de la dégradation des ARNm inactifs par le facteur eIF5A (contenant un dérivé de la spermidine) (Cooper et al., 1983), impliquent principalement l'initiation. Au niveau de l'élongation, les polyamines agissent sur la fidélité de traduction en contribuant à spécifier l'interaction correcte codon/anticodon (Abraham, 1981; Igarashi et al., 1982; Balasundaram et al., 1994), ainsi que sur les aminoacyl-ARNt synthétases qu'elles stimulent ou inhibent (Kern et Lapointe, 1979; Kim et Mehler, 1981).

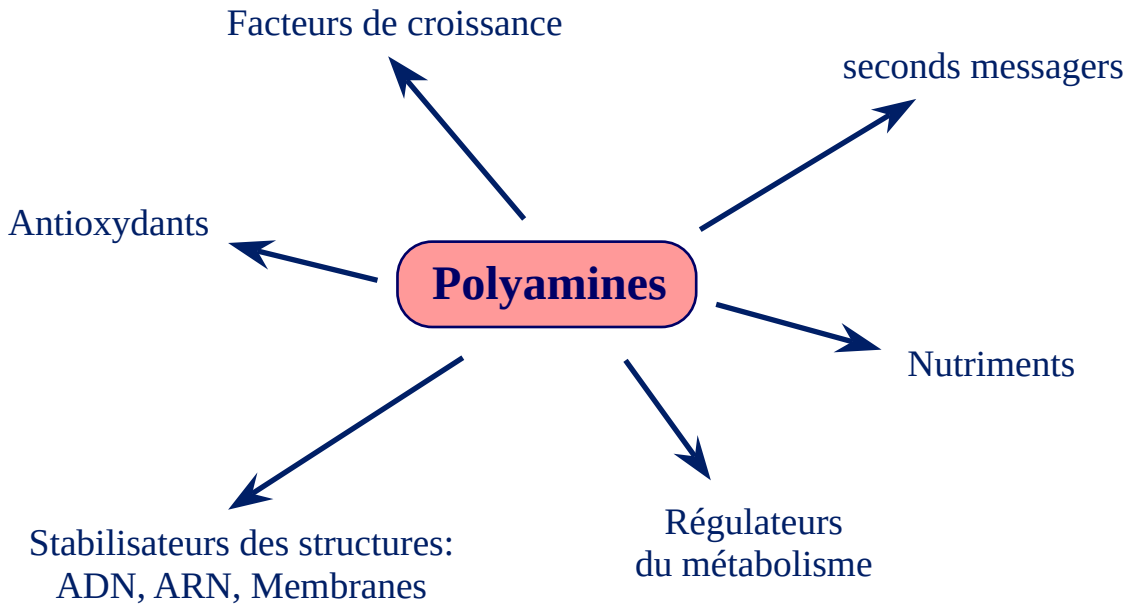


Figure 20: Les polyamines et leurs multiples fonctions.

IV- Les facteurs d'élongation: du cycle cellulaire au cancer

L' information génétique et ses altérations sont largement prises en compte dans les études des anomalies de la division cellulaire qui conduisent aux tumeurs et aux cancers. En revanche, peu d'études abordent le problème de l'implication des dérégulations de la traduction des protéines dans ces phénomènes. Les informations liant la synthèse protéique et le cycle cellulaire méritent d'être présentées.

A- Les facteurs d'élongation et le cycle cellulaire

La synthèse protéique et le cycle cellulaire sont étroitement associés. La synthèse protéique est nécessaire pour l'entrée et le bon déroulement du cycle cellulaire et le cycle cellulaire s'accompagne de modifications de traduction. Les CDK, protéines kinases dépendantes des cyclines, régulent la division cellulaire (Morgan, 1997). Des études démontrent que le taux de synthèse protéique varie au cours du cycle cellulaire, avec une chute importante au cours de la phase M. Cette chute est généralement décrite comme résultant d'une inhibition de l'initiation (Fan et Penman, 1970; Kanki et Newport, 1991). Un certain nombre de données suggèrent que l'inhibition de l'élongation pourrait jouer un rôle important.

Les sous-unités γ et δ du complexe eEF-1B sont des substrats de CDK1/cycline B (Minella et al., 1998). Au cours de la maturation méiotique de l'ovocyte de xénope, cette phosphorylation est corrélée aux changements de la synthèse protéique et établit un lien direct entre machinerie de traduction et les CDK du cycle cellulaire.

Le gène codant pour eEF-1δ est inductible par des radiations ionisantes qui arrêtent la prolifération à la transition G2/M. Puisque l'expression de eEF-1δ précède l'arrêt en G2, elle aurait un rôle dans la transition G2/M du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN (Jung et al., 1994). Le complexe eEF-1B intéragit avec l'ADN lorsque celui-ci est endommagé par le chrome ou la transplatine (Wang et al., 1997). Ceci pourrait être lié à une fonction spécifique de eEF-1 dans la réparation de l'ADN. La protéine eEF1-δ possède un domaine leucine zipper et la protéine eEF-1γ, un domaine riche en lysines qui rappellent la structure des facteurs de transcription; ces deux domaines pourraient être impliqués dans la liaison du facteur eEF-1B à l'ADN.

De nombreuses données bibliographiques démontrent qu' il existe dans les cellules intactes une corrélation entre la phosphorylation de facteur eEF-2 et une inhibition de la synthèse protéique au niveau de l'élongation (revue dans Nairn et Palfrey, 1996). La stimulation des

cellules quiescentes par le sérum ou des facteurs de croissance s'accompagne d'une augmentation transitoire de la phosphorylation du facteur eEF-2 (Carlberg, 1990), probablement responsable d'une inhibition de la phase d'élongation régulant l'expression des protéines spécifiques à demi-vie courte (Ryazanov et al., 1988; Ryazanov et al., 1991).

B- Les facteurs d'élongation et la transformation cellulaire

Des dérégulations de l'expression des protéines constitutives de eEF-1A et eEF-1B sont associées à des phénotypes de transformation cellulaire (revues dans Cormier 2000; Caraglia et al., 2000; figure 21).

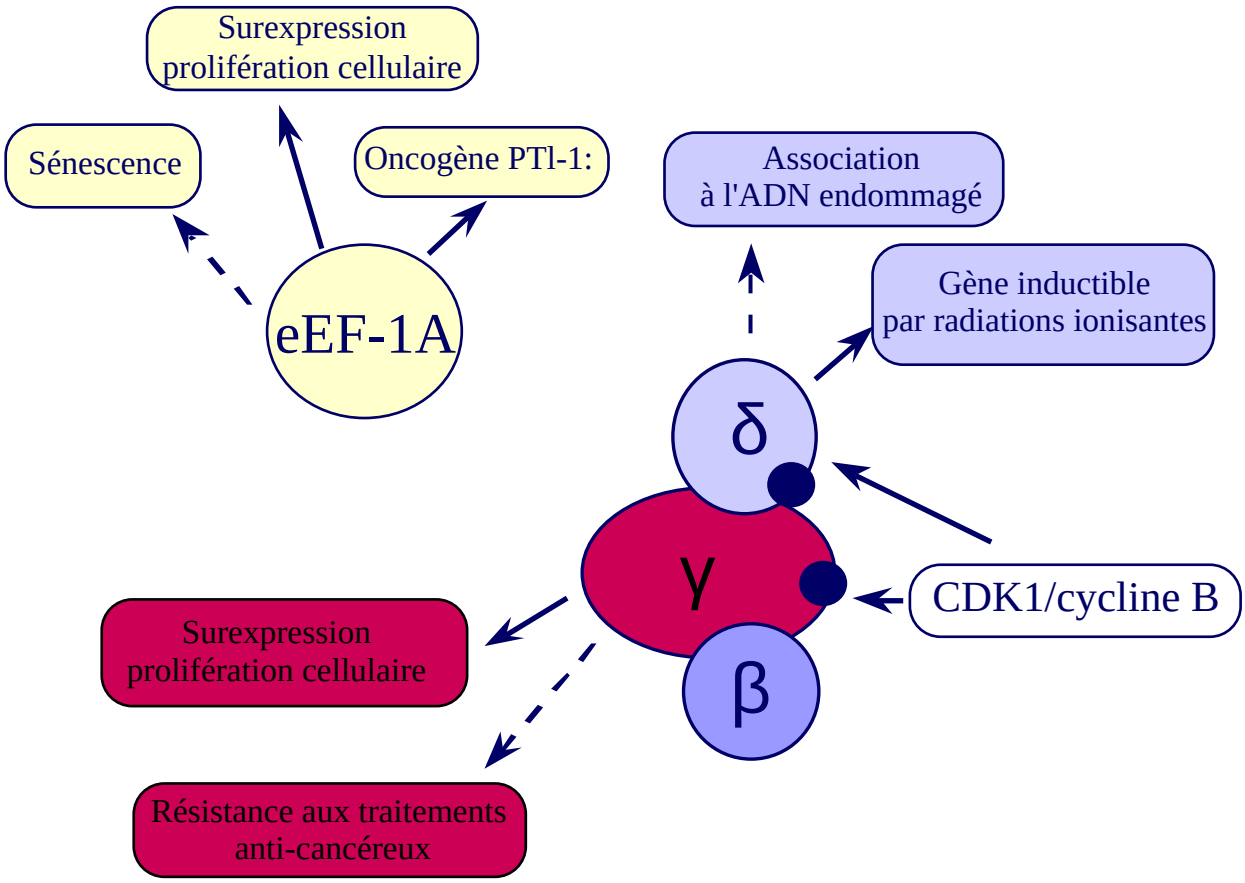


Figure 21: Relations entre le facteur d'élongation eEF-1, le cycle cellulaire et la tumorigenèse.
Les flèches en traits pleins indiquent des faits expérimentaux acquis et celles en pointillés reflètent des hypothèses.

L'expression élevée de eEF-1A est corrélée à la prolifération cellulaire. Dans des fibroblastes humains et murins, la quantité et l'activité de eEF-1A diminuent au cours du vieillissement cellulaire. Elles demeurent constantes dans des lignées de fibroblastes tumorales transformées par le virus SV-40. Dans plusieurs lignées de fibroblastes, l'expression constitutive de eEF-1A rend les cellules plus sensibles à la transformation maligne (Tatsuka et al., 1992) et un criblage différentiel d'adénocarcinome pancréatique a montré que l'ARNm codant pour eEF-1A est surexprimé dans les cellules tumorales (Grant et al., 1992). Dans les cellules quiescentes 3T3 après une stimulation mitotique, l'augmentation de l'expression de la protéine est due à un recrutement spécifique de l'ARNm dans les polysomes (Jefferies et al., 1994). Il existe une protéine appelée PTl-1 (prostatic carcinoma tumor inducing gene) correspondant à une forme tronquée et mutée de eEF-1A (Shen et al., 1995) exprimée dans les tissus cancéreux de la prostate, du colon, du poumon et du sein (Sun et al., 1997). La surexpression de cette protéine dans des cellules fibroblastiques d'embryons de rat sains provoque un phénotype tumoral aggressif. De plus, le blocage de l'expression de PTl-1 entraîne un retour à une morphologie cellulaire normale (Su et al., 1998). PTl-1 est donc un réel oncogène (Shen et al., 1995).

Le complexe eEF-1B est également impliqué dans le processus de cancérisation. L'ARNm codant pour eEF-1γ est surexprimé dans de nombreuses lignées tumorales: carcinomes intestinaux et pancréatiques (Lew et al., 1992; Chi et al., 1992), carcinomes gastriques, adénocarcinomes oesophagiens (Su et al., 1998) et carcinomes colorectaux (Ender et al., 1993). Dans ce dernier cas, un taux également élevé de la protéine eEF-1γ a été observé (Mathur et al., 1998). De plus, la surexpression de eEF-1 γ constitue un marqueur de l'agressivité de la tumeur (Ender et al., 1993; Frigerio et al., 1995; Mimori et al., 1996). La surexpression de eEF-1γ est un évènement très précoce dans le développement de cancers (Ender et al., 1993). La surexpression de cette sous-unité pourrait être un des acteurs de la résistance de certaines tumeurs aux traitements anticancéreux par la présence de son domaine GST (Billaut-Mulot et al., 1997). En revanche, il n'a pas encore été démontré si cette surexpression est une cause ou une conséquence du développement de la tumeur.

L'analyse d'une banque d'ADNc de cellules cancéreuses colorectales humaines a montré que non seulement l'expression de eEF-1γ mais également celles de eEF-1β et eEF-1A sont augmentées (Frigerio et al., 1995). La sous-unité eEF-1δ joue, elle aussi, un rôle dans le processus de cancérisation, car on note un taux d'expression élevé du messager codant pour EF-1δ dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ovariennes et mammaires (Jacob et al, 1996; Kolettas et al., 1998).

L'infection par des virus interfère avec les contrôles de traduction de la cellule hôte et peut contribuer à la transformation cellulaire. Dans ce contexte, il est intéressant de remarquer

une association de la protéine régulatrice ICPO (infected cell protein O) du virus de l'Herpes avec la protéine eEF-1δ (Kawaguchi et al., 1997). De même, la protéine Tat du virus HIV-1 s'associe à eEF-1δ pour réprimer la traduction des ARNm de la cellule hôte infectée au profit des messagers du virus (Xiao et al., 1998). Une recherche de ce type de protéines dans le cas des virus transformant permettrait de relier ces deux observations.

L'ensemble des données que nous avons développées dans cette revue permettent d'attribuer un rôle essentiel du facteur eEF-1 dans la traduction et probablement d'autres fonctions cellulaires. Les fonctions spécifiques du facteur et de ses sous-unités demeurent cependant mystérieuses. Nous avons utilisé le lysat de réticulocytes et les embryons d'oursin pour étudier ces régulations fonctionnelles.

Chapitre II:

L'embryon d'oursin

La fécondation de l'oeuf d'oursin provoque une augmentation considérable du taux de synthèse protéique indépendante de la transcription jusqu'au stade blastula (Epel, 1990). La fécondation induit également de nombreuses modifications au niveau des phosphorylations /déphosphorylations des protéines (Keller et al., 1980; Meijer et al., 1982). La fécondation de l'oursin constitue un modèle de choix pour l'étude de la régulation de la synthèse protéique notamment au niveau de l'élongation permettant d'aborder la fonction de eEF-1. Ce chapitre décrit les évènements biochimiques majeurs induits par la fécondation et leurs mécanismes.

I- La fécondation et le développement précoce

L'oursin est un invertébré marin qui appartient au phylum des Echinodermes (animaux recouverts d'épines) constitué d'environ 6000 espèces réparties en deux sous-embranchements qui diffèrent esssentiellement par leur mobilité. Les Pelmatozoaires sont fixés par un pédoncule et sont actuellement représentés par les crinoïdes. Les Eleuthézoaires sont toujours libres et regroupés en quatre classes: les étoiles de mer ou astéries, les ophiures, les holoturies et les échinides ou oursins (Kato et Schröeter, 1985). Actuellement 900 espèces d'oursin sont connues. Parmi les trois espèces majoritaires présentes au large de Brest, nous avons choisi *Sphaerechinus granularis*. De nombreuses études portent sur le développement précoce de l'oursin qui est une référence dans ce domaine (Giudice, 1973; Hörstadius, 1973).

Les oursins ont un mode de reproduction sexué et gonochorique (à sexes séparés). La fécondation s'effectue dans le milieu extérieur et sans accouplement (Platel, 1992).

L'oeuf mature ou ovule (100 µm de diamètre) a achevé sa méïose et est bloqué en phase G1 du premier cycle de mitose. L'ovule est entouré d'une enveloppe vitelline protégée par une gangue gélatineuse composée de mucopolysaccharides. Le cortex de l'ovule situé sous la membrane plasmique renferme environ 30000 granules corticaux (Giudice, 1973). Le spermatozoïde restaure la diploïdie et provoque l'activation de l'oeuf qui se traduit par l'augmentation du métabolisme cellulaire et l'initiation du développement (Epel, 1990). En particulier, la fécondation conduit à la levée du blocage en phase G1 entraînant ainsi une transition G1/S du cycle cellulaire et les divisions mitotiques. L'exocytose des granules corticaux se produit

alors et leur contenu fusionne avec l'enveloppe vitelline, formant la membrane de fécondation (Figure 22). Cette membrane participe au blocage de la polyspermie (Giudice, 1973; Epel, 1990).

La première partie du développement (jusqu'à l'éclosion) est constituée de successions de phases S et M sans phase de latence G1 et G2 avec un taux de divisions dix fois plus élevé qu'à la blastula (Parisi et al., 1978; Epel, 1990; Figure 23). La première division s'effectue en 2h à 2h 30, la deuxième en 1h30 et les suivantes en 30 minutes. A la sixième division (stade morula), l'oeuf est constitué de trois types de cellules différentes, les mésomères, les macromères et les micromères. Une petite cavité centrale se forme dès la huitième division et correspond au blastocoèle (Hörstadius, 1973). Au stade blastula précoce, de longs cils apparaissent à la surface externe au niveau du pôle animal. La jeune blastula est constituée d'une couche de cellules et nage à l'intérieur de la membrane de fécondation. Le retour à des divisions plus lentes a lieu à cette étape (environ 12 heures après fécondation) et correspond à l'acquisition des phases d'intervalle G1 et G2 (Figure 23). Vers 14-16 heures après la fécondation, la blastula sécrète une enzyme d'éclosion, protéase qui digère la membrane de fécondation libérant ainsi la blastula ciliée. Les cils présents au pôle animal sont remplacés par des stéréocils immobiles formant ainsi la touffe apicale. La blastula s'aplatit au niveau du pôle végétatif pour donner naissance à la plaque végétative. Les micromères situés au centre de cette plaque commencent alors à migrer à l'intérieur du blastocoèle et forment le mésenchyme primaire, précurseur du squelette de la larve. La gastrulation débute par la mise en place de l'archentéron (intestin embryonnaire) par invagination des cellules du pôle végétatif. L'archentéron sera entièrement formé environ 46 heures après fécondation et donnera naissance à l'œsophage, l'estomac et l'intestin, le stade prisme est alors atteint (Figure 23). La gastrulation peut également être caractérisée par la formation du mésenchyme secondaire au sommet de l'archentéron et l'apparition des spicules tri-radiées à partir de ce mésenchyme ainsi que par la mise en place d'une symétrie bilatérale. L'embryon devient alors, 72 heures après fécondation, une larve nommée plutéus (1500 cellules) capable de se nourrir et de vivre sous forme pélagique libre (Figure 23).

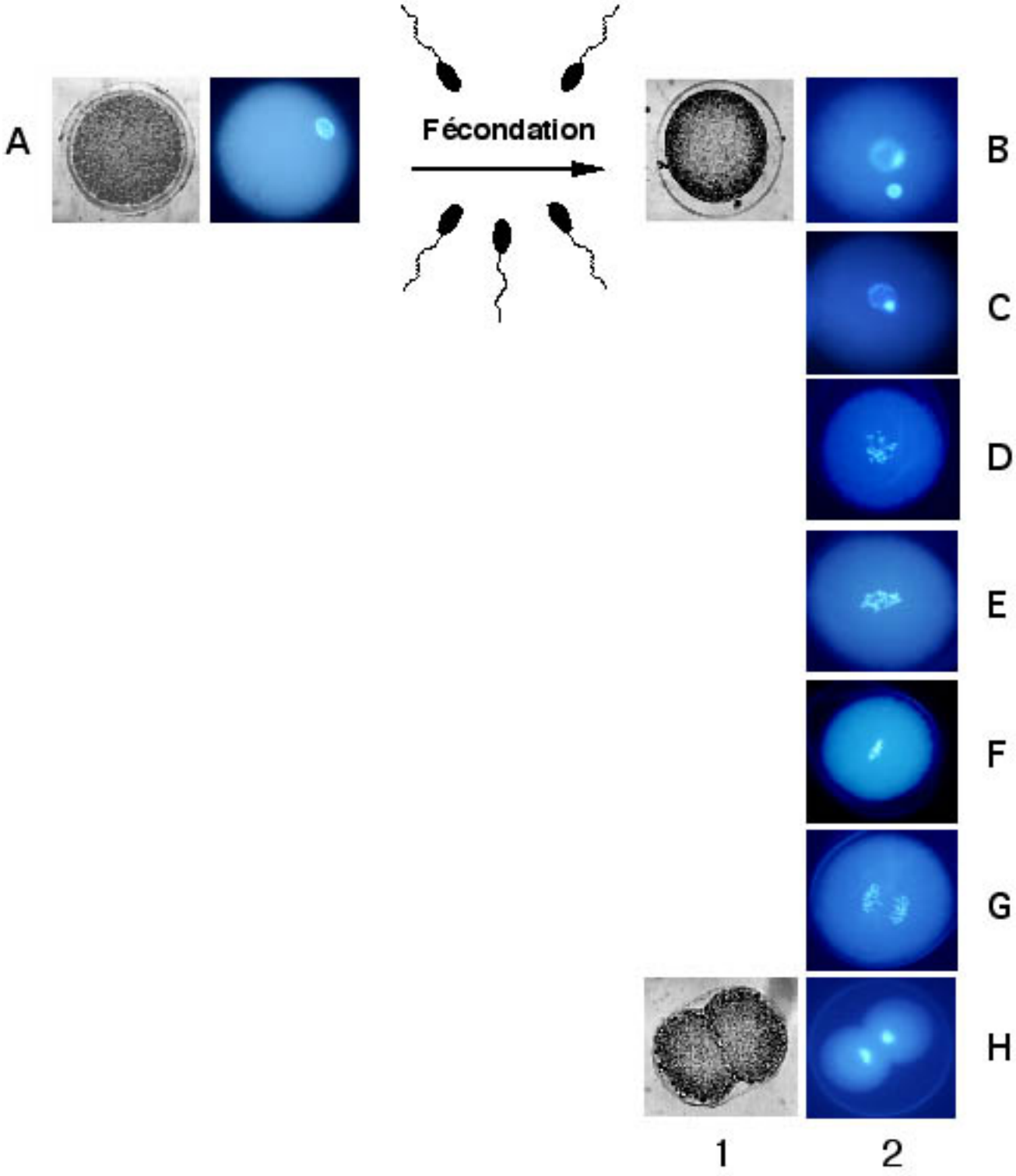


Figure 22: Fécondation et première division de l'oursin *Sphaerechinus granularis*.
1- en microscopie à contraste de phase. 2- en microscopie à fluorescence après coloration au Höechst
A: ovule non fécondé. B: ovule fécondé, observation des deux pronucléi mâle et femelle
C: fusion des deux pronucléi. D: condensation des chromosomes.
E: réorganisation des chromosomes, début de plaque métaphasique.
F: chromosomes alignés sur la plaque métaphasique
G: anaphase. H: stade deux cellules

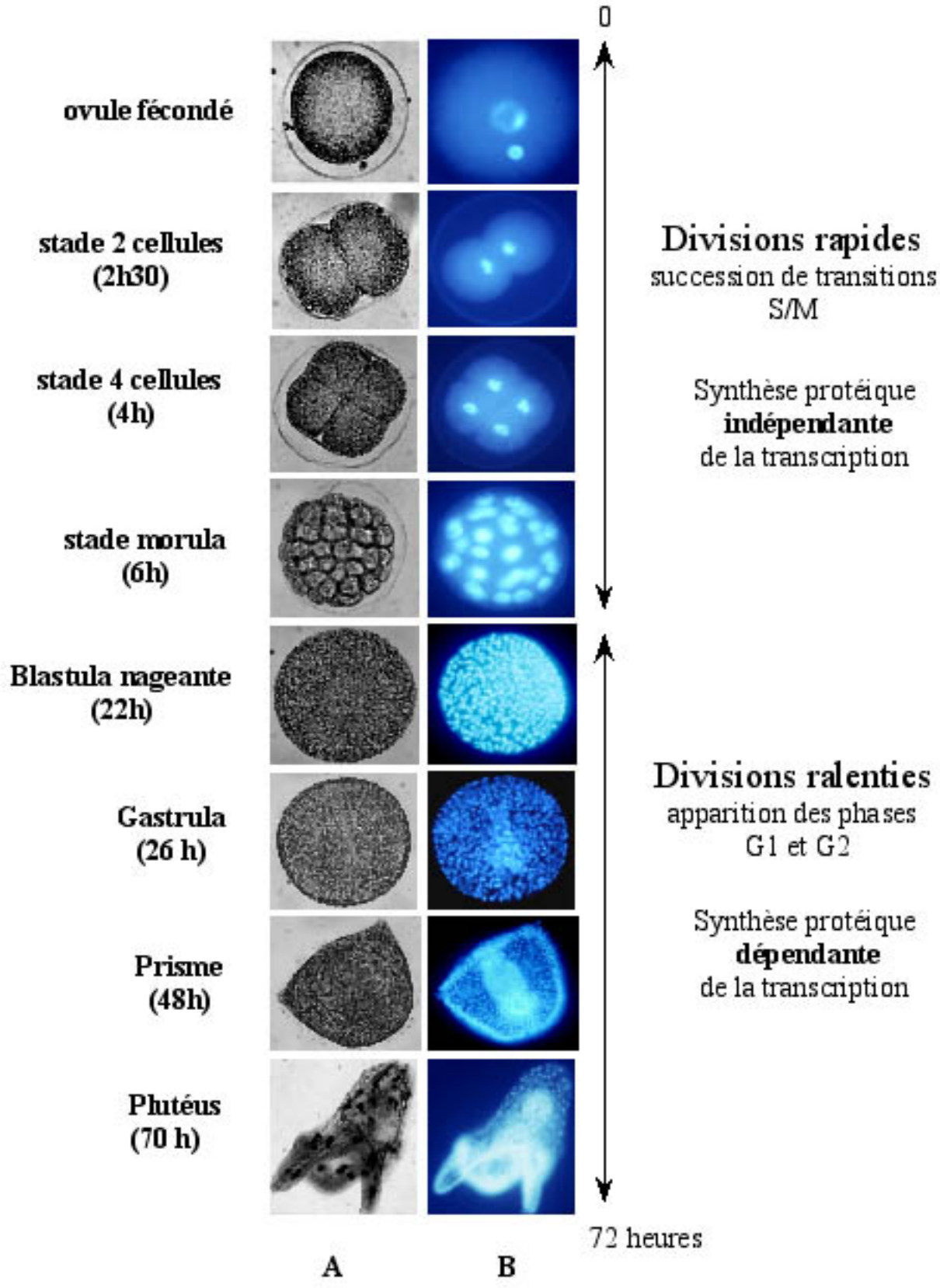


Figure 23: Les principaux stades du développement précoce de l'oursin *Sphaerechinus granularis*. A: en microscopie à contraste de phase. B: en microscopie à fluorescence après coloration au Höechst. Barre: 20µm.

II- La synthèse protéique au cours du développement précoce

A- Analyse de l'augmentation de la traduction

A la fécondation, la synthèse protéique est considérablement augmentée (Gross et Fry, 1966; Epel, 1967; Humphreys, 1969; Brandhorst, 1976; Regier et Kafatos, 1977; Grainger et al., 1979). Cette augmentation est surtout quantitative et le profil protéique n'est pas modifié (Bedard et Brandhorst, 1983; Grainger et al., 1986). En présence d'émétine, inhibiteur de la traduction, le développement s'arrête à la première division mitotique montrant la nécessité de synthèses protéiques pour le déroulement de la division cellulaire (Hultin, 1961; Wagenaar, 1983; Grainger et al., 1986; Figure 24). La synthèse de la cycline B (Evans et al., 1983), protéine de régulation du cycle cellulaire (Morgan, 1997) est la seule synthèse indispensable pour l'entrée en mitose (Arion et Meijer, 1989). L'augmentation globale de synthèse des autres protéines prépare le développement ultérieur.

L'actinomycine D, inhibiteur de transcription, provoque l'arrêt du développement des embryons au stade 16 cellules (Figure 25). L'augmentation de la synthèse protéique est donc indépendante de la transcription jusqu'au stade blastula (Gross et Cousineau, 1964; revue dans Giudice, 1973). En revanche des transcrits précoces s'avèrent nécessaires pour la transition blastula/gastrula. L'un des tout premiers transcrits observés dès la fécondation, code pour l'histone 2A (Palla et al., 1999). D'autres ARN messagers, en nombre limité, sont transcrits au stade blastula précoce. Ces messagers de la très jeune blastula ou « Very Early Blastula » (VEB) ont une distribution spatiale progressive le long de l'axe animal végétal (Reynolds et al., 1992). Le messager codant pour l'enzyme d'éclosion ou hatching enzyme en fait partie (Lepage et al., 1992).

Deux types d'ARN messagers sont stockés dans l'ovule non encore fécondé. Ce sont soit des messagers de grande taille (5 à 15kb) immatures soit des messagers associés avec des protéines ou des ribonucléoparticules sous forme de complexes appelés mRNP (messenger ribonucleoparticules) (Moon et al., 1980; Moon, 1983; Le Blanc et Infante, 1992). Les messagers de grande taille possèdent une queue polyA de 50 à 120 nucléotides et des séquences, principalement présentes dans les ARNm nucléaires (Posakony et al., 1983), appelées « interspersed repeat sequences » ou séquences répétées intercalées (revue dans Davidson et al., 1982). Ces séquences sont des motifs répétés de 150 à 200 nucléotides (Constantini et al., 1980)

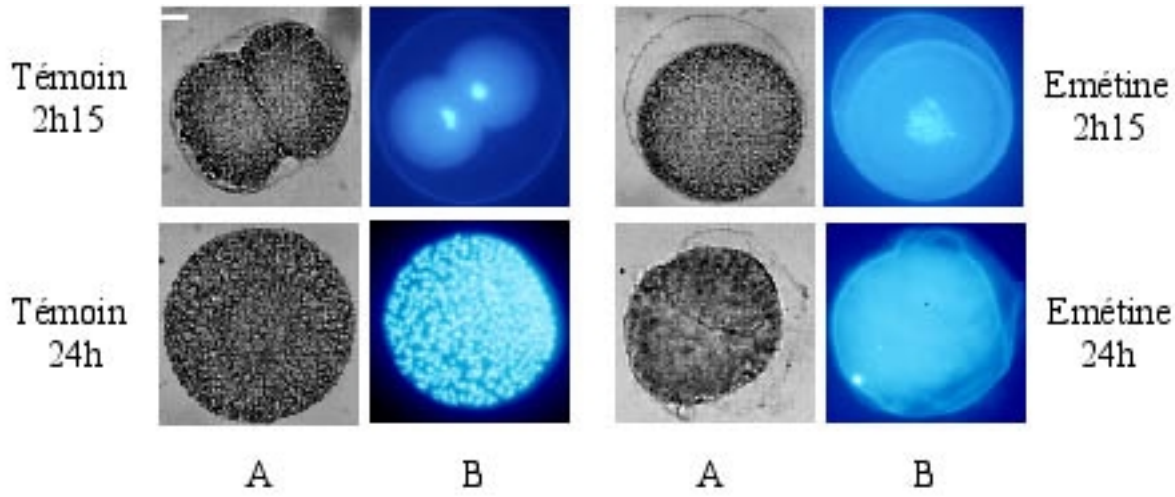


Figure 24: Effet de l'émétine sur le développement embryonnaire de *Sphaerechinus granularis* à 2h15 et 24h après fécondation. L'émétine (2.10-4 M) est ajoutée 10 minutes après fécondation. A:observation en microscopie à contraste de phase B: observation en microscopie à fluorescence après coloration au Höechst. Barre : 20 µm.

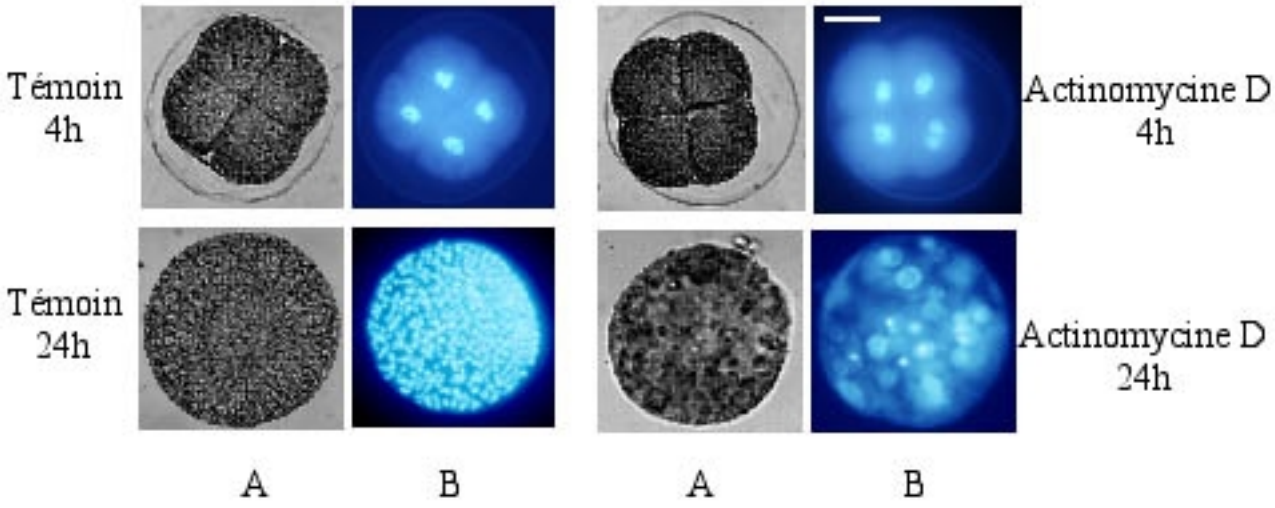


Figure 25: Effet de l'actinomycine D sur le développement embryonnaire de *Sphaerechinus granularis* à 4h et 24h après fécondation. L'actinomycine D (100µg/ml) est ajoutée 10 minutes après fécondation. A:observation en microscopie à contraste de phase. B: observation en microscopie à fluorescence après coloration au Höechst. Barre : 20 µm.

intercalés à l'intérieur des séquences codantes ou dans la région 3' non codante (Posakony et al., 1983). Après la fécondation, ces séquences sont éliminées puisqu'elles sont absentes des ARNm recrutés dans les polysomes. Après fécondation, les messagers présents sous forme de mRNPs doivent être démasqués par le relargage des protéines qui leur sont associées (Grainger et Winkler, 1987).

A la transition blastula-gastrula précoce, le profil d'expression des ARN messagers est nettement modifié par l'apparition des messagers transcrits à partir du génome zygotique (Brandhorst et Humphreys, 1971; Galau et al., 1977). Les transcrits maternels sont progressivement remplacés par ces nouveaux transcrits (Cabrera et al., 1984; Davidson, 1986). Parmi ceux-ci, les articles 1 et 3 présentent le profil d'expression des messagers codant pour les protéines EF-1δ et EF-1A. Nos résultats démontrent l'existence d'une nouvelle régulation de la transcription pour eEF-1δ à la transition blastula-gastrula par un mécanisme de sélection alternative du site de polyadénylation.

B- Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la traduction

L'augmentation de la synthèse protéique peut être décomposée en deux phases. La première est due à un mécanisme post-transcriptionnel et la seconde, à partir de la transition morula/blastula, implique la traduction des messagers nouvellement transcrits (Figure 23).

L'augmentation de la synthèse protéique dans la première phase résulte d'une régulation à deux niveaux: un recrutement des ARN messagers maternels préalablement transcrits (Grainger et Winkler, 1987) et une régulation traductionnelle qui conduit à une augmentation de l'activité de la machinerie de traduction (Brandis et Raff, 1978; Hille et al., 1990). Les mécanismes de démasquage des ARN messagers maternels et l'élimination des séquences répétées ne sont pas connus. En revanche, il est démontré que la polyadénylation des ARNm est nécessaire à la traduction et augmente à la fécondation (Slater et al., 1973; Wilt, 1977; Peters et Jeffery, 1978). L'acquisition de la coiffe à l'extrémité 5' des ARNm est stimulée (Winkler et al., 1983; Caldwell et Emerson, 1985; Showman et al., 1987). La quantité d'ARN dans les polysomes augmente (Hille et Alberts, 1979; Brandis et Raff, 1979; Goustin et Wilt, 1981; Raff et al., 1981) de même que leur traduction (de 10 à 15 fois) (Humphreys, 1971). Le nombre de ribosomes dans les polysomes augmente également (de 20 à 25 fois) (Goustin et Wilt, 1981; Kelso-Winemiller et Winkler, 1991) et l'observation en microscopie électronique indique une modification de leur morphologie (Martin et Miller, 1983). Ces phénomènes résultent non seulement de la stimulation de l'initiation mais

aussi de l'élongation (Brandis et Raff, 1978; Brandis et Raff, 1979; Hille et Alberts, 1979; Raff et al., 1981).

L'initiation a été largement étudiée afin de mieux appréhender les facteurs limitants. De nombreuses expériences de synthèse protéique ont été réalisées à l'aide de lysats. La synthèse de messagers exogènes est stimulée par ajout de facteurs d'initiation purifiés (Colin et al, 1987; revue dans Hille et al, 1990). L'addition de eIF-2B, facteur d'initiation responsable de l'échange de GTP sur eIF-2, augmente l'activité *in vitro* dans des lysats d'oursin non fécondés (Colin et al., 1987). L'activité in vitro est également stimulée par eIF-2 de 4 fois (Winkler et al., 1985; Dholakia et al., 1990) ainsi que par eIF-4F (de 2 à 3,5 fois) (Huang et al, 1987; Lopo et al., 1988). eIF-4F est capable de réverser l'effet inhibiteur de traduction présent dans les oeufs non fécondés (Huang et al., 1987; Hansen et al., 1987). Le facteur eIF-4F est présent sous forme inactive dans les oeufs non fécondés et est activé à la fécondation (Jagus et al., 1992; Jagus et al., 1993).

Les mécanismes de la stimulation de l'élongation demeurent encore non élucidés. Seule l'augmentation d'activité de deux facteurs d'élongation appelés alors T1 et T2 a été observée (Felicetti et al, 1972). La correspondance entre ces facteurs et les eEF-1 et eEF-2 n'a pas été déterminée.

Quels sont les mécanismes de la transduction du signal entre l'interaction du spermatozoïde avec l'ovule et l'augmentation de la traduction ? L'augmentation de la synthèse protéique post-fécondation est dépendante du flux de calcium et du pH. La fécondation induit la libération de calcium conduisant à une élévation transitoire du calcium intracellulaire. Cette dernière rentre en jeu dans une séquence d'évènements qui aboutissent à l'augmentation du pH intracellulaire (Winkler et al., 1980). L'augmentation expérimentale du pH, en absence de fécondation, est capable d'activer de 25 fois le recrutement des messagers et des ribosomes (Johnson et Epel, 1976; Winkler et al., 1980) et d'induire une augmentation de synthèse protéique (Grainger et al., 1979). Cependant, Rees et collaborateurs (1995) ont montré que l'élévation de pH à elle seule n'est pas responsable de l'augmentation de synthèse protéique post-fécondation mais participe à une cascade de signaux qui induisent cette augmentation. Le calcium serait également nécessaire à l'activation de l'élongation (Brandis et Raff, 1979; Winkler et al., 1980).

A la transition morula/blastula, dans la phase dépendante de la transcription, l'augmentation de synthèse se poursuit, elle passe de 120pg/heure/embryon au premier clivage à 500pg/heure/embryon à la blastula (Regier et Kafatos, 1977; Goustin et Wilt, 1981). Le profil des protéines traduites est dû à la traduction des messagers nouvellement transcrits et impliqués dans la différenciation cellulaire (Brandhorst, 1976). Cette augmentation est proportionnelle au

recrutement des ribosomes dans les polysomes. Jusqu'à 60% des ribosomes peuvent être regroupés en polysomes (Infante et Nemer, 1967; Denny et Reback, 1970; Humphreys, 1971).

En conclusion, la première phase d'augmentation est réalisée à partir de messagers maternels sans modification sensible du profil des protéines. La seconde correspond à un changement d'ordres quantitatif et qualitatif et s'effectue à partir de nouveaux transcrits.

III- Les changements de phosphorylation

Des modifications d'activités de phosphorylation/déphosphorylation sont induites par la fécondation pour les régulations de la transduction du signal, du cycle cellulaire et du développement précoce. Elles font intervenir les différents types de kinases, phosphorylant leurs substrats sur les résidus sérine/ thréonine dans les protéines, et sur l'acide aminé tyrosine (revues dans Kinsey, 1997; Ohi et Gould, 1999). Le profil des différentes activités kinasiques qui vont être détaillées dans ce paragraphe, est récapitulé figure 26.

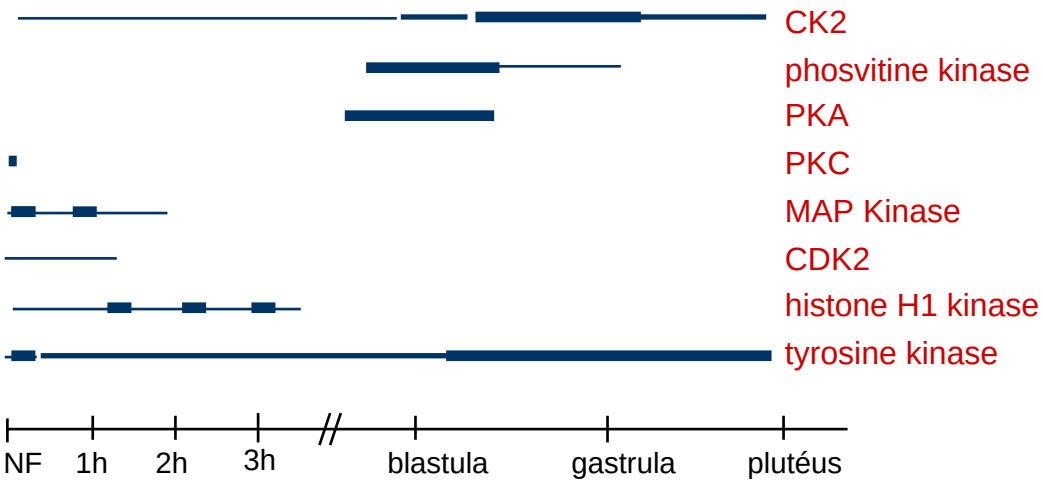


Figure 26: Profil des activités kinases mesurées au cours du développement précoce.

Ce profil est un profil global représentant les grandes variations au cours du développement précoce. L'intensité du trait est représentative de l'activité.

A- Changements impliqués dans la transduction du signal

La fécondation induit très rapidement (2 minutes) l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC est dépendante du calcium et se limite à la zone corticale de l'oeuf (Olds et al., 1995; DeBarry et al., 1997). Elle est suivie d'une chute brutale d'activité, probablement due à l'hydrolyse de l'enzyme par des protéases calcium dépendante (DeBarry et al., 1997). La PKC active l'échangeur Na+/H+ qui provoque l'augmentation du pH intracellulaire (Heinecke et Shapiro, 1990; revue dans Swann et Whitaker, 1990; Shen et Buck, 1990). Elle est également impliquée dans l'activation du métabolisme oxydatif en régulant l'activité de la NADPH/O2 oxydo-réductase (Heinecke et Shapiro, 1989; Heinecke et Shapiro, 1990; Heinecke et al., 1990).

La fécondation induit la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (Ballinger et al., 1984). Bien que cette phosphorylation est généralement impliquée dans la régulation de la traduction (Jefferies et Thomas, 1996), elle n'a pas été étudiée depuis chez l'oursin.

Les changements de phosphorylation sur tyrosine débutent très tôt en réponse à la liaison du spermatozoïde (Kinsey, 1984; Peaucellier et al, 1988; Ciapa et Epel, 1991). Abassi et Foltz (1994) ont mis en évidence une phosphorylation sur tyrosine du récepteur, dès la fixation du spermatozoïde, cette phosphorylation est maximale dans les 20 secondes suivantes ce qui suggère que le récepteur est directement associé à une tyrosine kinase. Une activité tyrosine kinase est liée à la libération du calcium intracellulaire (Shen et al., 1999). Cette protéine kinase est la p57 de la famille de la protéine kinase src. Parmi les tyrosines kinases impliquées dans les toutes premières minutes après la fécondation, trois sont identifiées, la protéine $p220^{abl}$ (Moore et Kinsey, 1994), la $p59^{fyn}$ (Kinsey, 1996) et la $p57^{src}$ (Abassi et al., 2000).

Les ovules non fécondés ont une activité MAP kinase de base qui décroît rapidement après la fécondation (Pelech et al., 1988 ; Chiri et al., 1998 ; Philipova et Whitaker, 1998). La MAP kinase est phosphorylée et active dans les oeufs non fécondés puis se déphosphoryle pour s'inactiver dans les 15 minutes suivant la fécondation (Caroll et al., 2000). Le calcium est nécessaire et suffisant pour cette inactivation. L'inactivation de la MAP kinase après la fécondation est corrélée avec l'initiation de la synthèse d'ADN (Caroll et al., 2000).

B- Changements liés au cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est sous le contrôle de protéine kinases dépendantes des cyclines ou CDKs (Morgan, 1997). La CDK2, associée à la cycline E puis à la cycline A, est impliquée au cours de la division cellulaire dans le contrôle de la phase S (Ohi et Gould, 1999). Chez l'oursin, bien que la CDK2 possède une activité faible et constante dans l'embryon, elle ne contrôlerait pas l'initiation de la réplication de l'ADN dans les premières divisions (Moreau et al., 1998).

La génistéine, inhibiteur des tyrosine kinases, n'inhibe pas les évènements précoces tels la levée de membrane de fécondation mais empêche les évènements plus tardifs comme la migration du pronucleus, la synthèse de DNA et la division cellulaire. Ceci suggère que les tyrosine kinases ont un rôle dans l'initiation des mouvements pronucléaires et l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Moore et Kinsey, 1995).

Chez l'oursin, la PI3 kinase contrôle le cycle cellulaire puisque son inhibiteur spécifique, la wortmamine, arrête la division entre la phase S et la phase M (De Nadai et al., 1998).

La transition G2/M du cycle cellulaire est régulée par le complexe CDK1/cycline B ou MPF (M-Phase Promoting Factor) (revue dans Morgan, 1997). Dans les embryons d'oursin, la kinase CDK1 ou Histone H1 kinase est activée transitoirement 20 minutes avant chaque division cellulaire (Schatt et al., 1983; Meijer et Pondaven, 1988). Les mécanismes d'activation et de régulation de CDK1 sont nécessairement en place pour la réalisation de ces cycles cellulaires (Morgan, 1997).

L'activité de la MAP kinase augmente après son inactivation initiale (Pelech et al., 1988; Chiri et al., 1998; Philipova et Whitaker, 1998). Cette activation est dépendante du calcium et participerait au contrôle de la phase M du cycle cellulaire (Philipova et Whitaker, 1998 ; Caroll et al., 2000).

Des variations d'activité de protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) ont également été observées au cours de la première division mitotique. Elle augmente après la fécondation et décline juste avant le premier clivage. L'inhibition de l'activité de la PKA empêche la formation du fuseau mitotique (Browne et al., 1990).

C- Changements liés au développement précoce

La PKC intervient dans le développement: le TPA, activateur de la PKC, cause des modifications dramatiques du développement lorsqu'il est ajouté entre la fécondation et le premier clivage. En effet, le nombre de cellules se différenciant en endoderme et mésoderme est plus élevé

que celui des cellules de l'ectoderme; le TPA induit une accumulation de messagers spécifiques de l'endoderme et du mésoderme et, simultanément une diminution de ceux spécifiques de l'ectoderme. Ces résultats indiquent que la PKC joue un rôle dans le déterminisme des cellules au cours du développement (Livingston et Wilt; 1992).

L'activité de la protéine kinase A, PKA, présente un pic transitoire au moment de la blastula nageante (Fujino et Yamasu., 1983b) dont le rôle n'est pas connu.

Chez l'oursin, la mise en place de l'axe animal/végétal est prédéterminée avant la fécondation et les territoires embryonnaires sont établis le long de cet axe par des mécanismes non élucidés. Emily-Fenouil et collaborateurs (1998) ont isolé dans les embryons une enzyme sensible au lithium, la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), impliquée dans la voie de transduction wnt qui joue un rôle essentiel dans la définition de l'axe (revues dans Moon et al., 1997 ; Arias et al., 1999). La surexpression d'un dominant négatif de la GSK3 entraîne une végétalisation de l'embryon et provoque une diminution du domaine d'expression de l'enzyme d'éclosion. La surexpression de GSK3 induit une animalisation et élargit le domaine d'expression de cette enzyme en direction du pôle végétal (Emily-Fenouil et al., 1998; Vonica et al., 2000).

Une activité phosvitine kinase varie également au cours du développement; elle est élevée au stade blastula tardive puis faible à la gastrula. L'activation de l'enzyme est associée à un changement de répartition entre une forme soluble et une forme sédimentable (Fujino et Yasumasu., 1983b).

Delalande et collaborateurs (1999) ont démontré l'existence d'une activité eEF-1δ kinase présentant un pic d'activité transitoire atteignant son maximum à 24-30 heures de développement et impliquée dans l'éclosion et dans la transition blastula/gastrula. Cette activité a été identifiée à la CK2.

L'activité d'une tyrosine kinase 30 à 45 minutes après fécondation, est requise pour la gastrulation de l'embryon: les embryons traités avec des inhibiteurs forment une blastula normale, ne gastruleront pas et s'arrêteront au stade plutéus (Kinsey, 1995). Cette kinase est nécessaire à l'invagination de l'archentéron, à la fusion du mésenchyme primaire et à l'élaboration des spicules du squelette (Livingston et al., 1998).

De nombreuses protéine kinases sont activées ou jouent un rôle après la fécondation, pour la transduction du signal, le cycle cellulaire ou le bon déroulement du développement. Parmi elles, les kinases PKC, PKA, CDK1, CK2 et la S6 kinase peuvent phosphoryler l'un ou l'autre des éléments de la machinerie de traduction et ainsi être impliquées dans la régulation de la synthèse protéique. Les protéines kinases spécifiques de facteurs de

traduction sont très probablement impliquées à la fécondation. La kinase FRAP/mTOR (Sonenberg et Gingras, 1998) qui phosphoryle 4EBP, protéine régulatrice du facteur d'initiation eIF4E et la protéine kinase de eEF-2 (cf Chapitre I-§III-A-2) pourraient jouer un rôle important.

IV- Rôle des polyamines dans le développement de l'embryon précoce

L'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC), enzyme limitante dans la biosynthèse des polyamines, augmente après fécondation (Manen et Russel, 1973; Kusunoki et Yasumasu, 1978). Il en résulte une augmentation de la concentration en polyamines, de l'ordre du millimolaire, associée à leur variation cyclique avec les divisions (Kusunoki et Yasumasu, 1976). Les polyamines sont nécessaires pour le développement précoce puisque l' αHydrazinoornithine (αHO), un inhibiteur compétitif de l'ODC, arrête les divisions et que l'addition de putrescine ou de spermine lève cette inhibition (Kusunoki et Yasumasu , 1978). L' augmentation est importante pour la spermidine et la putrescine et moindre pour la spermine (Manen et Russel, 1973; Kusunoki et Yasumasu, 1976). Au cours des cycles cellulaires, leur concentration est forte avant et retombe après le clivage (Kusunoki et Yasumasu, 1976).

Toutefois, ces observations ne permettent pas d'élucider les rôles physiologiques des polyamines. La présence de l'hypusine dans le facteur d'initiation eIF5A (cf ChapitreI-§IV), premier exemple de dérivé des polyamines associé à une molécule spécifique, laisse présager un rôle physiologique (Park et al., 1981). Le profil de protéines, dont une de 30 kDa (Canellakis et al., 1985) capable de lier la spermidine, varie au cours du développement précoce (Canellakis et al., 1989) et suggère l'existence de régulations.

Des résultats récents relancent l'intérêt de l'étude des cibles des polyamines puisque celle-ci sont capables de réguler le cycle cellulaire en induisant l'expression de protéines inhibitrices de CDK, p21CIP et p27KIP (Ray et al., 1999; Li et al., 1999; Alm et al., 2000).

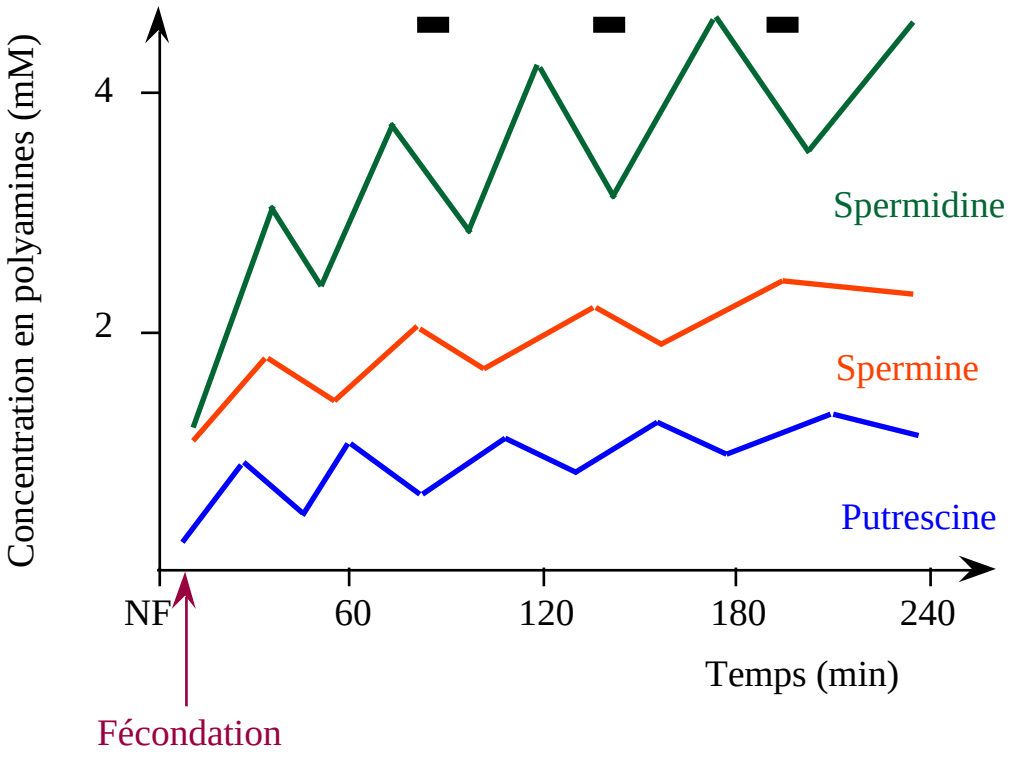


Figure 27: Variations cycliques des concentrations de polyamines dans l'embryon d'oursin. Schéma adapté de Kusunoki et Yasumasu, 1976. Les traits noirs épais indiquent les trois premières mitoses.

En analysant la synthèse protéique dans les lysats d'oursin, nous avons obtenu des lysats capables de faire de l'élongation des messagers préalablement initiés *in vivo*. Grâce à ces lysats, nous avons montré l'existence d'une régulation de la phase d'élongation par des concentrations physiologiques (millimolaires) de polyamines (Article 5).

L'ensemble des évènements de la fécondation chez l'oursin, de la transduction du signal au contrôle du cycle cellulaire, nécessitant l' intervention de multiples protéines kinases et une régulation post-transcriptionnelle de la synthèse protéique, font de l'oursin un modèle de choix pour nos études.

Résultats

Article 1

Nous avons obtenu de nouvelles données structurales et phylogénétiques sur le complexe d'échange de nucléotides eEF-1B. Nous avons démontré de nouvelles régulations de l'élongation: la première au niveau de la transcription des éléments de eEF-1A et eEF-1B au cours du développement, et la seconde, au niveau de la régulation de l'étape d'élongation par les polyamines naturelles et par la phosphorylation du complexe CDK1/cycline B. Les résultats, sous forme d'articles publiés ou soumis, sont complétés par des données non publiées.

Nous avons étudié le facteur d'élongation eEF-1B en clonant la sous-unité eEF-1δ d'oursin (Article 1), en abordant l'origine phylogénétique des protéines eEF-1β et eEF-1δ (Article 2) et en réalisant l'analyse structurale du complexe eEF-1B (résultats non publiés). Nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation transcriptionnelle de eEF-1δ chez l'oursin en caractérisant un mécanisme de sélection alternatif du site de polyadénylation du messager de eEF-1δ au cours du développement (Article 1) et en observant le découplage de la transcription de eEF-1δ de celle de eEF-1A (Article 3). L'étude de l'élongation a été abordée par la mise au point d'un lysat d'oursin et de sa régulation par les polyamines naturelles (Article 4 en préparation). Les régulations de l'élongation par phosphorylation par le complexe CDK1/cycline B sont effectuées dans des lysats de réticulocytes de lapin (Article 5 soumis).

I- Le facteur d'élongation eEF-1B

A- Clonage de la sous-unité eEF-1δ d'oursin

Article 1

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

Dans cet article, nous avons isolé et séquencé par criblage à partir d'une banque d'embryons d'oursin *Sphaerechinus granularis* deux ADNc de 2 et 2,7 kb codant pour eEF-1δ (numéro d'accession: Y14235 et Y14236). Ces ADNc ont été identifiés à la protéine eEF-1δ (35kDa), selon trois critères: la séquence protéique contient un domaine d'échange de GTP/GDP, la région N-terminale comporte un motif Leucine Zipper et la protéine eEF-1δ, produite dans un système d'expression constitué par les ovocytes de xénope, est capable de s'intégrer au sein d'un complexe eEF-1βγδ hétérologue.

Article 2

B- Origine phylogénétique des protéines eEF-1δ et eEF-1β

Article 2

Guerrucci, M.A., Monnier, A., Delalande, C. and Bellé, R. (1999).The elongation factor-1 δ (EF-1 δ) originates from gene duplication of an EF-1 β ancestor and fusion with a protein-protein binding domain. *Gene*, **233**, 83-87.

Nous avons analysé l'évolution moléculaire des protéines échangeuses de nucléotides de type béta et de type delta à l'aide des méthodes classiques de phylogénie. Nous montrons que la protéine de type β est ubiquitaire et se duplique chez les plantes pour donner deux protéines de type structural β et β'. Chez les animaux, eEF-1β et eEF-1δ sont monophylétiques. Les domaines N-terminaux des protéines eEF-1δ possédant le motif Leucine Zipper sont spécifiques de eEF-1δ et ne se retrouvent dans aucune autre séquence. Nous en avons déduit que la protéine eEF-1δ résulte de la fusion d'un domaine Leucine Zipper avec le domaine C-terminal d'un gène ancestral commun de type eEF-1β. La duplication de l'ancêtre β a eu lieu avant l'émergence des Arthropodes et la protéine eEF-1δ n'est présente que chez les animaux supérieurs. Toutefois, les deux gènes eEF-1β et eEF-1δ ont évolué conjointement probablement du fait de leur association avec le même facteur eEF-1A.

C- Analyse structurale du complexe eEF-1B d'oursin

Résultats non publiés

Monnier, A., Cormier P., Boulben, S., Morales J., Bellé, R. et Mulner-Lorillon, O. Analyse structurale du complexe eEF-1B d'oursin.

A partir d'une protéine recombinante issue de l'ADNc codant pour la sous-unité eEF-1δ, nous avons obtenu un anticorps spécifique de eEF-1δ d'oursin. Au cours de cette analyse structurale, nous montrons que:

- eEF-1δ existe dans l'ovule d'oursin sous deux isoformes (33, 35kDa) présentes dans un complexe de haut poids moléculaire (350kDa)
- comme chez les autres espèces, la protéine eEF-1δ est fortement associée avec une protéine identifiée à eEF-1γ
- plusieurs protéines nouvelles restent associées à eEF-1δ au cours de la purification. Ces protéines possèdent des intéractions labiles avec eEF-1B dans la mesure où elles ne sont plus détectées après immunoprécipitation du complexe. Le microséquençage de ces protéines révèle des similitudes de séquence avec une protéine heat shock, une aryl sulfatase, une actine et une protéine ribosomale L10A. Trois autres protéines restent de nature inconnue.

Article 3

II- Régulation transcriptionnelle de eEF-1δ chez l'oursin

A- Sélection alternative du site de polyadénylation du messager eEF-1δ au cours du développement précoce

Les deux ADNc de 2 et 2,7 kb codant pour eEF-1δ (cf A-1- clonage de la sous-unité eEF-1δ) sont issus d'un précurseur unique possédant un site de polyadénylation alternatif: ils sont identiques dans les extrémités 5' non traduites, dans les séquences codantes ainsi que dans la région 3' non traduite jusqu'à la position AATAAA (1892). L'ADNc de 2,7kb possède une séquence supplémentaire de 722 paires de bases à l'extrémité 3'UTR.

L'analyse de l'expression du gène eEF-1δ au cours du développement indique que le messager de 2,7 kb est présent à la fécondation et diminue au cours des divisions rapides du développement précoce. A la gastrula, eEF-1δ réapparaît sous la forme des deux messagers de 2,7 et 2 kb. L'apparition du messager de 2kb suggère qu'un mécanisme de sélection alternative du site de polyadénylation est mis en place à la gastrulation.

Ces résultats sont présentés dans l'Article 1 (p.49).

B- Découplage de la transcription de eEF-1δ et eEF-1A au cours du développement précoce

Article 3

Delalande, C., Monnier, A., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Bellé, R.(1998b). Changes in elongation factor-1α transcripts are uncoupled to changes in EF-1δ during sea urchin development. *Biology of the cell*, **90**, 661-663.

Nous avons cloné et séquençé un fragment d'ADNc codant pour eEF-1A de *Sphaerechinus granularis* (numéro d'accession AJ010972). L'analyse de la régulation de l'expression de eEF-1δ par rapport à celle de eEF-1A révèle que l'expression de EF-1δ au cours du développement est découplée de celle de EF-1A. L'expression de eEF-1A est faible pendant les divisions précoces puis augmente considérablement à la transition blastula/gastrula. En revanche, eEF-1 δ diminue lors des divisions précoces et réaugmente plus tardivement et plus régulièrement que l'expression de eEF-1A. Le découplage de l'expression de ces deux messagers démontre une régulation au cours du développement du facteur d'élongation eEF-1 et suggère que ces deux protéines peuvent avoir des fonctions spécifiques et peuvent être régulées indépendamment.

Article 4

Nous avons réalisé enfin des études fonctionnelles de eEF-1B. Nous avons dans ce but utilisé deux systèmes acellulaires, un lysat d'embryon d'oursin et un lysat de réticulocytes de lapin. Nous montrons grâce au lysat d'oursin que les polyamines naturelles sont de puissants régulateurs de l'élongation (Article 4). Les lysats de réticulocytes nous ont permis de démontrer une régulation nouvelle de l'élongation par phosphorylation par la kinase CDK1/ cycline B (Article 5).

III- Régulation de l'élongation par les polyamines dans le lysat d'oursin

Article 4 (soumis dans *European Journal of Biology*)

Monnier, A., Morales, J., Cormier, P., Bellé, R et Mulner-Lorillon, O. Polypeptide chain elongation in lysates from the sea urchin *Sphaerechinus granularis*: regulation by polyamines.

Nous avons mis au point un système acellulaire dont l'originalité réside dans la capacité à réaliser spécifiquement de l'élongation. En effet, dans nos conditions expérimentales, ce lysat ne possède aucune activité d'initiation puisqu'il n'est pas affecté par la présence d'inhibiteurs de cette phase (m7-méthyl-GTP, acide aurintricarboxylique) et ne réalise pas de traduction de messagers exogènes.

Nous avons étudié la cinétique d'activation de la synthèse protéique après fécondation des oeufs d'oursin. Les lysats préparés à partir d'ovules pondus non fécondés ont une activité synthétique faible ou indétectable. L'activité augmente dès 15 minutes après fécondation, rapidement pendant la première heure, puis plus lentement ensuite avec un infléchissement à chaque division ce qui reproduit les cinétiques observées *in vivo*. Le taux d'élongation dans ces lysats s'est révélé insensible à plusieurs kinases (CDK1, CKII ou PKA), et régulateurs de phosphorylation (6-DMAP, olomoucine, roscovitine, héparine ou acide okadaïque). En revanche, nous avons démontré l'existence d'un effet inhibiteur des polyamines naturelles sur la phase d'élongation de la traduction. La présence dans les cellules de ces polyamines et leur régulation au cours du développement suggère que la traduction pourrait être sous leur contrôle physiologique.

Article 5

IV- Régulation de l'élongation par phosphorylation du complexe CDK1/cycline B dans le lysat de réticulocytes de lapin

Article 5 (soumis dans *Nucleic Acid Research*)

Monnier, A., Bellé, R., Morales, J., Cormier, P. and Mulner-Lorillon, O. Evidence for regulation of protein synthesis at the level of the elongation step and effect of CDK1/cyclin B phosphorylation.

Pour comprendre le rôle de l'association de la Val-RS (et uniquement de cette synthétase) avec le complexe eEF-1B ainsi que la possibilité d'une régulation à ce niveau, nous avons mis au point, dans le lysat de réticulocytes, les conditions d'élongation optimale d'ARN messagers synthétiques sans initiation spécifique. Afin de comparer l'élongation au niveau des triplets codant pour la Valine par rapport aux autres acides aminés, nous avons produit et cloné un ADN synthétique de 141 bases. Selon le site de fixation du ribosome, le messager conduit à un peptide polyValine ou polySérine (de 37 acides aminés maximum soit 4kDa). Le troisième cadre de lecture donne un codon stop. Dans ces conditions, la traduction du peptide polyValine est toujours supérieure à celui du peptide polySérine.

Nous observons que l'ajout de la kinase CDK1 dans l'incubation conduit à des changements de l'efficacité de lecture de l'un et l'autre codon. En effet, cette phosphorylation diminue le taux d'élongation pour le peptide polyValine alors qu'elle l'augmente pour le polySérine.

Ces résultats démontrent une régulation directe de CDK1 sur la phase d'élongation par la phosphorylation des sous-unités du facteur eEF-1B.

Conclusions et perspectives

I- Structure du facteur eEF-1B

Le facteur eEF-1B de l'oursin *Sphaerechinus granularis* possède des caractéristiques semblables aux complexes des eucaryotes supérieurs. Il contient les sous-unités eEF-1δ, eEF-1γ et très vraisemblablement eEF-1β. La Valyl-ARNt synthétase est probablement associée au complexe puisque l'ancrage de cette protéine se fait par la sous-unité δ (Hsieh et Campbell, 1991).

La protéine eEF-1δ est présente sous deux isoformes de 33 et 35kDa dans un rapport 2:1. Les deux isoformes proviennent-elles d'un messager unique? L'une est-elle une forme phosphorylée de l'autre? Quels sont leurs rôles respectifs?

La purification du complexe sur le critère de la présence de la sous-unité eEF-1δ montre l'existence de nouvelles protéines faiblement associées. Deux d'entre elles pourraient être des acteurs de la synthèse des protéines, l'une possède des similitudes avec une protéine ribosomale L10, l'autre avec une protéine chaperon. La présence de ces protéines serait liée au regroupement dans la cellule de l'ensemble des éléments participant à la traduction, les ARN de transfert, les aminoacyl-ARNt synthétases et les facteurs d'élongation formant une "super structure" autour des ribosomes qui aiderait à promouvoir l'efficacité de traduction (Motorin et al, 1988; Negrutskii et Deutscher, 1991, Negrutskii et al., 1994, Negrutskii et El'skaya, 1998; Figure 28). L'identification définitive de ces protéines ainsi que l'universalité de leur association avec le complexe eEF-1B devront être déterminées.

II- Fonctions du facteur eEF-1B

L'étude de l'expression des messagers codant pour la protéine eEF-1δ a montré une régulation transcriptionnelle particulière au cours du développement précoce. En effet, nous avons montré la mise en place à la gastrulation d'un mécanisme de sélection alternative du site de polyadénylation conduisant à deux ARNm. L'unique différence entre les séquences réside dans la longueur de la région 3' non codante suggérant ainsi une régulation particulière pour chacun des messagers. Cette région 3'UTR est généralement impliquée dans la stabilité des messagers, dans

leur efficacité de traduction ou dans leur localisation. L'étude de la stabilité des messagers et la recherche des protéines capables d'intéragir avec la région 3'UTR des deux messagers de eEF-1δ d'oursin seraient intéressantes. Toutes ces études peuvent être réalisées par les techniques de microinjection de constructions codant pour des protéines contenant une étiquette GFP mises au point chez l'oursin (Arnone et al., 1997).

Le découplage de l'expression de eEF-1A et eEF-1δ renforce l'idée que ces deux protéines ont des fonctions spécifiques indépendantes. La protéine eEF-1A est un facteur multifonctionnel dont les nombreuses fonctions ne dépendent pas nécessairement de la fonction de eEF-1B. L'expression de eEF-1βγ est également découplée de celle de eEF-1A chez le Xénope (Morales et al., 1993). Une étude conjointe de l'expression de tous les élèments du facteur eEF-1 devrait être réalisée. Ainsi, un découplage de l'expression de eEF-1βγ de celle de eEF-1δ et/ou de la Valyl-ARNt synthétase conforterait l'idée que la population de eEF-1B contenant eEF-1βγδ-Val-RS puisse être une entité physiologique possédant ses propres fonctions.

La protéine eEF-1δ est la sous-unité du complexe eEF-1B qui est phosphorylable par le plus grand nombre de kinases différentes. Les phosphorylations de eEF-1δ en font un élément central intégrateur d'effecteurs cellulaires multiples chez les eucaryotes supérieurs. Il devient indispensable de comprendre le rôle de ces phosphorylations. Sont-elles présentes *in vivo* et sujettes à régulation pendant le développement? Elles peuvent influer sur la composition intrinsèque du complexe, sur l' intéraction au sein des différentes protéines du complexe ou avec d'autres partenaires, sur l'activité des protéines de eEF-1B, leur(s) rôle(s) cellulaire(s) et toute régulation physiologique qui peut en résulter.

Nous avons montré un effet *in vitro* des polyamines sur l'élongation de la synthèse protéique. Or, les concentrations en polyamines varient de façon cyclique après la fécondation, en phase avec les divisions cellulaires (Figure 28). Ces fluctuations ont-elles des conséquences sur la traduction spécifique et/ou globale par une régulation de l'élongation? Par quel(s) mécanisme(s) agissent-elles sur l'élongation?

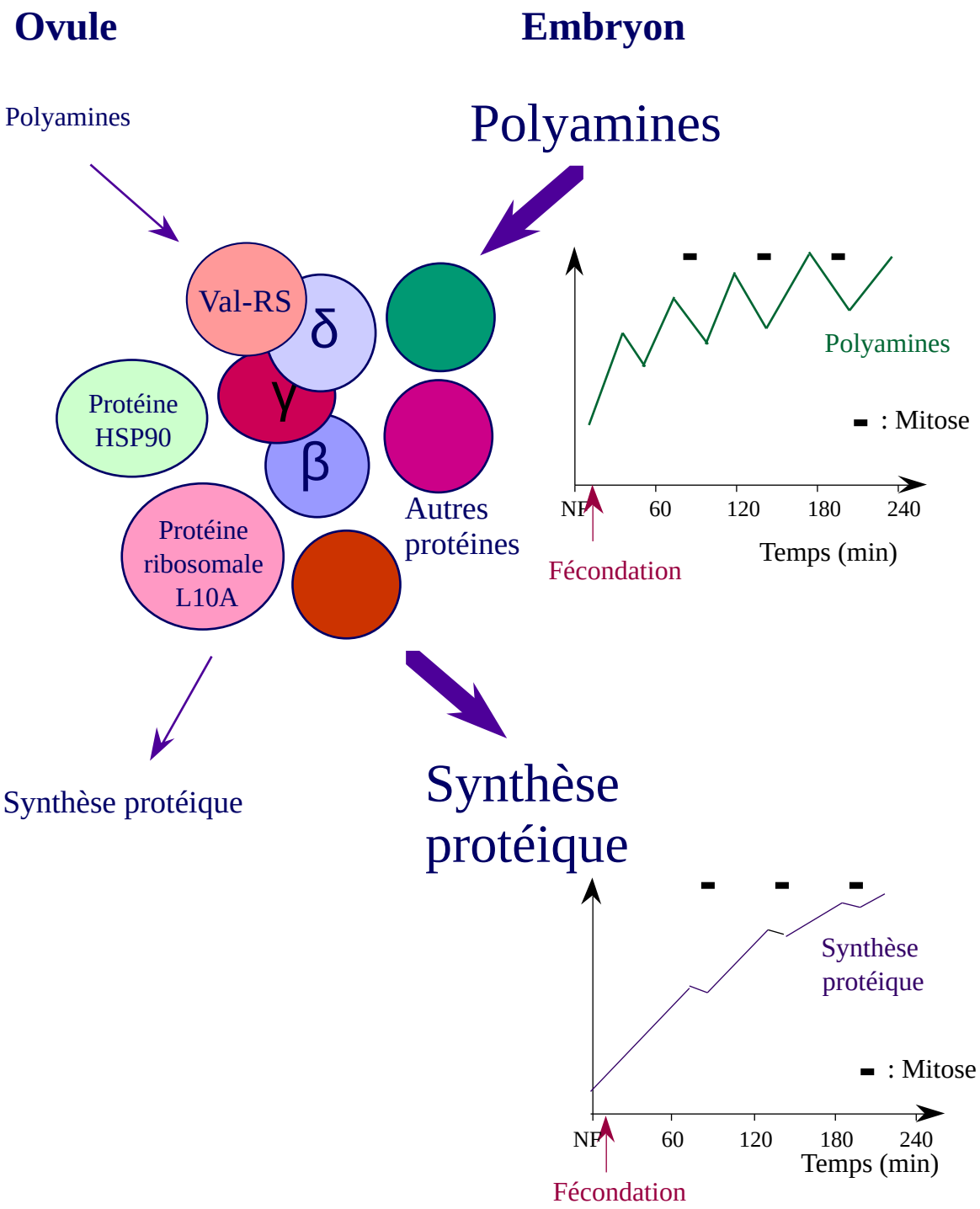


Figure 28: Schéma récapitulatif des protéines potentiellement associées à eEF-1B et de l'effet des polyamines sur la synthèse protéique.

La régulation de l'élongation par CDK1/ cycline B que nous avons démontrée est nouvelle et originale. Elle permet de proposer une régulation de la traduction pendant le cycle cellulaire sous l'effet de la phosphorylation des sous-unités eEF-1δ et eEF-1γ (Figure 29) et permet de proposer pour la première fois un rôle de la présence de la Val-RS dans le complexe

eEF-1B. Le facteur eEF-1B est présent sous deux formes dans les cellules, eEF-1βγ et eEF-1βγδVal-RS. En l'absence d'activité CDK1 (phase de croissance), la synthèse de protéines structurales (riches en valine; Conway et Pary, 1990) seraient favorisées par rapport aux protéines régulatrices (Figure 29; gauche). Lors de la transition G2/M, le rapport serait inversé (Figure 29, droite) au détriment des protéines riches en valine.

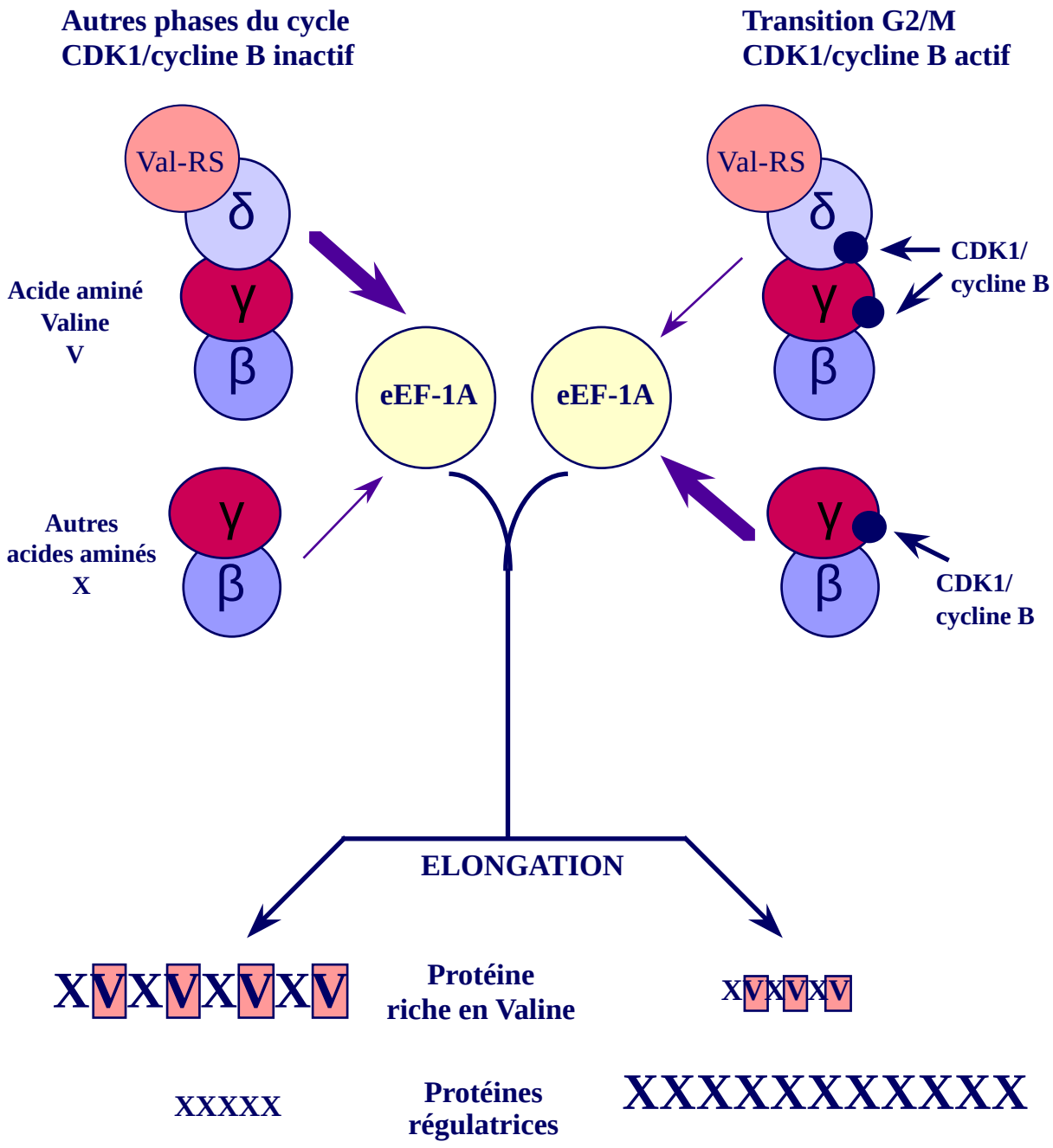


Figure 29: Régulation de l'élongation par phosphorylation du complexe CDK1/cyclineB.

Bibliographie

Abassi, Y.A. et Foltz, K.R. (1994). Tyrosine phosphorylation of the egg receptor for sperm at fertilization. *Develop. Biol.* **164**, 430-443.

Abassi, Y.A., Carroll, D.J., Giusti, A.F., Belton, R.J. et Foltz, K.R. (2000). Evidence that Src-type tyrosine kinase activity is necessary for initiation of calcium release at fertilization in sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **218**, 206-219.

Abel, T. et Maniatis, T. (1989). Action of leucine zippers. *Nature.* **341**, 24-25.

Abraham, A.K. (1981). Effect of polyamines on the fidelity of macromolecular synthesis. *Med. Biol.* **59**, 368-373.

Alm, K., Berntsson, P.S., Kramer, D.L., Porter, C.W. et Oredsson, S.M. (2000). Treatment of cells with the polyamine analog N, N11-diethylnorspermine retards S phase progression within one cell cycle. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4157-4164.

Altmann, M. et Trachsel, H. (1993). Regulation of translation initiation and modulation of cellular physiology. *Trends Biochem. Sci.* **18,** 429-32.

Amons, R., Guerrucci, M.A., Karssies, R.H., Morales, J., Cormier, P., Möller, W. et 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.

Arias, A.M., Brown, A.M.C. et Brennan, K. (1999). Wnt signalling: pathway or network? *Curr. Op. Genet. Dev*. **9**, 447-454.

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

Arnone, M.I., Bogarad, L.D., Collazo, A., Kirchhamer, C.V., Cameron, R.A., Rast, J.P., Gregorians, A., Davidson, E.H. (1997). Green Fluorescent Protein in the sea urchin: new experimental approaches to transcriptional analysis in embryos and larvae. *Development.* **124,** 4649-4659.

Balasundaram, D., Dinman, J.D., Wickner, R.B., Tabor, C.W. et Tabor, H. (1994). Spermidine deficiency increases +1 ribosomal frameshifting efficiency and inhibits Ty1 retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**,172-176.

Ballinger, D.G., Bray, S.J. et Hunt T. (1984). Studies of the kinetics and ionic requirements for the phosphorylation of ribosomal protein S6 fertilization of Arbacia punctulata eggs. *Dev. Biol*. **101**, 192-200.

Beaudet, A.L. et Caskey, C.T. (1971). Mammalian peptide chain termination. II. Codon specificity and GTPase activity of release factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 619-624.

Bec, G., Kerjean, P. et 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.

Bec, G., Kerjean, P., Zha, X.D. et 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.

Bedard, P.A. et Brandhorst, B.P. (1983). Patterns of protein synthesis and metabolism during sea urchin embryogenesis. *Develop. Biol.* **96**, 74-83.

Belfield, G.P. et Tuite, M.F. (1993). Translation elongation factor 3: a fungus-specific translation factor? *Mol. Microbiol.* **9,** 411-418.

Belle, R., Derancourt, J., Poulhe, R., Capony, J.P., Ozon, R. et 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-1gamma and EF-1beta. *FEBS Lett.* **255**, 101-104.

Belle, R., Minella, O., Cormier, P., Morales, J., Poulhe, R. et Mulner-Lorillon, O. (1995). Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. Dans "Progress in Cell Cycle Research" (eds. Meijer, L., Guidet, S. et Tung, H.Y.L.), Vol.1, p. 265-270. Plenum Press, New York.

Benne, R. et Hershey, J.W. (1978). The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **253**, 3078-3087.

Billaut-Mulot, O., Fernandez-Gomez, R. et Ouaissi, A. (1997). Phenotype of recombinant Trypanosoma cruzi which overexpress elongation factor 1-gamma: possible involvement of EF-1 gamma GST-like domain in the resistance to clomipramine. *Gene.* **198**, 259-267.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. et McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* **349**, 117-127

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

Brandhorst, B.P. et Humphreys, T. (1971). Synthesis and decay rates of major classes of deoxyribonucleic acid-like ribonucleic acid in sea urchin embryos. *Biochemistry.* **10**, 877-881.

Brandis, J.W. et Raff, R.A. (1978). Translation of oogenetic mRNA in sea urchin eggs and early embryos. Demonstration of a change in translational efficiency following fertilization. *Develop. Biol.* **67**, 99-113.

Brandis, J.W. et Raff, R.A. (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilization. *Nature.* **278**, 467-469.

Brandsma, M., Kerjan, P., Dijk, J., Janssen, M.C. et Möller, 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. et Tate, W.P. (1990). Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes. *Nucleic. Acids Res.* **18**, 6339-6345.

Browne, C.L., Bower, W.A., Palazzo, R.E. et Rebhun, L.I. (1990). Inhibition of mitosis in fertilized sea urchin eggs by inhibition of the cyclic AMP-dependant protein kinase. *Exp. Cell Res.* **188**, 122-128.

Browning, K.S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant. Mol. Biol.* **32**, 107-144.

Buckingham, R.H., Grentzmann, G. et Kisselev, L. (1997). Polypeptide chain release factors. *Mol. Microbiol.* **24**, 449-456.

Burston, S.G. et Clarke, A.R. (1995). Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. *Essays Biochem.* **29**,125-36.

Cabrera, C.V., Lee, J.J., Ellison, J.W., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1984). Regulation of cytoplasmic mRNA prevalence in sea urchin embryos. Rate of appearance and turnover for specific sequences. *J. Mol. Biol.* **174**, 85-111.

Caldwell, D.C. et Emerson, C.P. JR (1985). The role of cap methylation in the translational activation of stored maternal histone mRNA in sea urchin embryos. *Cell.* **42**, 691-700.

Canellakis, Z.N., Bondy, P.K. et Infante, A.A. (1985). Spermidine is bound to a unique protein in early sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 7613-7615.

Canellakis, Z.N., Marsh, L.L., Manabe, Y.C., Infante, A.A., Bondy, P.K. et Scalise, F. (1989). Spermidine labels proteins during sea urchin embryogenesis. *Biochem. Int.* **19**, 969-976.

Caraglia, M., Budillon, A., Vitale, G., Lupoli, G., Tagliaferri, P. et Abbruzzese, A. (2000). Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3919-36.

Carlberg, U., Nilsson, A. et Nygard, O. (1990). Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur. J. Biochem*. **191**, 639-645.

Carroll, D.J., Albay, D.T., Hoang, K.M., O'Neill, F.J., Kumano, M. et Foltz, K.R. (2000). The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Develop. Biol.* **217**, 179-191.

Carr-Schmid, A., Valente, L., Loik, V.I., Williams, T., Startita, L.M. et Kinzy, T.G. (1999). Mutations in elongation factor 1 beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5257-5266.

Carvalho, J.F., Carvalho, M.G.C. et Merrick, W.C. (1984). Purification of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 591-602.

Chakraburtty, K. (2000). Functional interaction of yeast elongation factor 3 with yeast ribosomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **31**, 163-173.

Chang, Y.W. et 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**, 28252-28257.

Chang, Y.W. et Traugh, J.A. (1998). Insulin stimulation of phosphorylation of elongation factor 1 (eEF-1) enhances elongation activity. *Eur. J. Biochem.* **251**, 201-207.

Chaudhuri, J., Das, K. et Maitra, U. (1994). Purification and characterization of bacterially expressed mammalian translation initiation factor 5 (eIF-5): demonstration that eIF-5 forms a specific complex with eIF-2. *Biochemistry.* **33**, 4794-4799.

Chen, J.Y. et Bodley, J.W. (1988). Biosynthesis of diphthamide in Saccharomyces cerevisiae. Partial purification and characterization of a specific S-adenosylmethionine:elongation factor 2 methyltransferase. *J. Biol. Chem*. **263,** 11692-11696.

Chen, C.J. et 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.

Chi, K., Jones, D.V. et Frazier, M.L. (1992). Expression ef elongation factor-1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon. *Gastroenterology.* **103**, 98-102.

Chiri, S., De Nadai, C. et Ciapa, B. (1998). Evidence for MAP kinase activation during mitotic division. *J. Cell Sci.* **111**, 2519-2527.

Ciapa, B. et Epel, D. (1991). A rapid change in phosphorylation on tyrosine accompanies fertilization of sea urchin eggs. *FEBS Lett.* **295**, 167-170.

Clemens, M.J. (1984). Dans "Transcription and translation - A practical approach" (eds. Hames, B.D. et Higgins, S.J.). IRL press, Oxford et Washington.

Clemens, M.J. et Bommer, U.A. (1999). Translational control: the cancer connection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1-23.

Colin, A.M., Brown, B.D., Dholakia, J.N., Woodley, C.L., Wahba, A.J. et Hille, M.B. (1987). Evidence for simultaneous derepression of messenger RNA and the guanine nucleotide exchange factor in fertilized sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **123**, 354-363.

Constantini, F.D., Britten, R.J. and Davidson, E.H. (1980). Message sequences and short repititive sequences are interspersed in sea urchin egg poly(A)+ RNAs. *Nature.* **287**, 111-117.

Conway, J.F. et 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.

Cooper, H.L., Park, M.H., Folk, J.E., Safer, B. et Braverman, R. (1983). Identification of the hypusine-containing protein hy+ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 1854-1857.

Cormier, P. (2000). Facteurs de traduction: du contrôle de la synthèse des protéines au cycle cellulaire et à la tumorigenèse. *Médecine Sciences* .**16**, 378-385.

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

Davidson, E.H. (1986). Gene activity in early development (Eds., Davidson, E.H.). Academic Press, Orlando.

DeBarry, J., Kawahara, S., Takamura, K., Janoshazi, A., Kirino, Y., Olds, J.L., Lester, D.S., Alkon, D.L. et Yoshioka, T. (1997). Time-resolved imaging of protein kinase C activation during sea urchin egg fertilization. *Exp. Cell Res.* **234**, 115-124.

Delalande, C., Belle, R., Cormier, P. et 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.

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

Denny, P.C. et Reback, P. (1970). Active polysomes in sea urchin eggs and zygotes: evidence for an increase in translatable messenger RNA after fertilization. *J. exp. Zool.* **175**, 133-140.

Dever, T.E., Costello, C.E., Owens, C.L., Rosenberry, T.L. et Merrick, W.C. (1989). Protein location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine, and glycerylphosphorylethanolamine. *J. Biol. Chem*. **264**, 20518-20525.

Dholakia, J.N., Xu, Z., Hille, M.B. et Wahba, A.J. (1990). Purification and characterization of sea urchin initiation factor 2. The requirement of guanine nucleotide exchange factor for the release of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2-bound GDP. *J. Biol. Chem.* **265**, 19319-19323.

Dinman, J.D. et Kinzy, T.G. (1997). Translational misreading: Mutations in translation elongation factor 1 alpha differentially affect programmed ribosomal frameshifting and drug sensitivity. *RNA.* **3**, 870-881.

Ejiri, S.I., Ebata, N., Kawamura, R. et Katsumata, T. (1983). Occurence of four subunits in high molecular weight forms of polypeptide chain elongation factor 1 from wheat embryo. *J. Biochem.* **94**, 319-322.

Ejiri, S.I. et 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.

Emily-Fenouil, F., Ghiglione, C., Lhomond, G., Lepage, T. et Gache, C. (1998). GSK3 beta/shaggy mediates patterning along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo. *Development.* **125**, 2489-2498.

Ender, B., Lynch, P., Kim, Y.H., Inamdar, N.V., Cleary, K.R. et 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. USA.* **57**, 899-906.

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

Etkin, L.D. (1988). Regulation of the mid-blastula transition in amphibians. *Develop. Biol.* **5**, 209-225.

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

Fan, H. et 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**; 655-670.

Felicetti, L., Metafora, S., Gambino, R. et Di Matteo, G. (1972). Characterization and activity of the elongation factors T1 and T2 in the unfertilized egg and in the early development of sea urchin. *Cell Differ.* **1**, 265-277.

Flytzanis, C.N., Brandhorst, B.P., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1982). Developmental patterns of cytoplasmic transcript prevalence in sea urchin embryos. *Develop. Biol.* **91**, 27-35.

Fonzi, W.A., Katayama, C., Leathers, T. et Shyperd, P.S. (1985). Regulation of protein synthesis factor EF-1alpha in Mucor racemosus. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1100-1103.

Freistroffer, D.V., Pavlov, M.Y., MacDougall, J., Buckingham, R.H. et Ehrenberg, M. (1997). Release factor RF3 in E.coli accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO. J.* **16**, 4126-4133.

Frigerio, J.M., Berthezene, P., Garrido, P., Ortiz, E., Barthellemy, S., Vasseur, S., Sastre, B., Seleznieff, I., Dagorn, J.C. et Iovanna, J.L. (1995). Analysis of 2166 clones from a human colorectal cancer cDNA library by partial sequencing. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 37-43.

Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H.H., Cheperegin, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A.L., Celis, J.E., Philippe, M. et Et, A.L. (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature.* **372**, 701-703.

Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M. et Kisselev, L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA.* **2**, 334-341.

Fujino, Y. et Yasumasu, I. (1983a). Change in phosvitin kinase activity during early development of the sea urchin. *Gamete Res.* **7**, 249-257.

Fujino, Y. et Yasumasu, I. (1983b). Changes in cAMP-dependent protein kinase activity in the 10,000g sediment of sea urchin embryos during early development. *Gamete Res.* **7**, 241-248.

Galau, G.A., Lipson, E.D., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1977). Synthesis and turnover of polysomal mRNAs in sea urchin embryos. *Cell.* **10**, 415-432.

Geballe, A.P. (1996). Translational control mediated by upstream AUG codons. Dans "Translational control" (eds. Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 173-197. CSHL Press .

Giannakouros, T., Nikolakaki, H. et Georgatsos, J.G. (1990). Concentration-dependent effects of natural polyamines on peptide chain initiation and elongation in a cell-free system of protein synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* **99**, 9-19.

Giudice, G. (1973). Developmental biology of the sea urchin embryo, Academic Press, New-

York.

Goumans, H., Thomas, A., Verhoeven, A., Voorma, H.O. et Benne, R. (1980). The role of eIF-4C in protein synthesis initiation complex formation. *Biochim. Biophys. Acta.* **608**, 39-46.

Goustin, A.S. et Wilt, F.H. (1981). Protein synthesis, polyribosomes, and peptide elongation in early development of *Strongylocentrotus purpuratus. Develop. Biol.* **82**, 32-40.

Grainger, J.L., Winkler, M.M., Shen, S.S. et Steinhardt, R.A. (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin egg and early embryo. *Develop. Biol.* **68**, 396-406.

Grainger, J.L., Von Brunn, A. et Winkler, M.M. (1986). Transient synthesis of a specific set of proteins during the rapid cleavage phase of sea urchin development. *Develop. Biol.* **114**, 403-415.

Grainger, J.L. et Winkler, M.M. (1987). Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3947-3954.

Grant, A.G., Flomen, R.M., Tizard, M.L. et Grant, D.A. (1992). Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumour cells. *Int. J. Cancer.* **50**, 740-745.

Gross, P.R. et Cousineau, G.H. (1964). Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Exp. Cell. Res.* **33**, 368-395.

Gross, P.R. et Fry, B.J. (1966). Continuity of protein synthesis through cleavage metaphase. *Science.* **153**, 749-751.

Gschwendt, M., Kittstein, W., Mieskes, G. et Marks, F. (1989). A type 2A protein phosphatase dephosphorylates the elongation factor 2 and is stimulated by the phorbol ester TPA in mouse epidermis in vivo. *FEBS Lett.* **257**, 357-60.

Gupta, N.K., Roy, A.L., Nag, M.K., Kinzy, T.G., MacMillan, S., Hileman, R.E., Dever, T.E., Wu, W., Merrick, W.C. et Hershey, J.W.B. (1990). New insights into an old problem: Ternary complex (Met-tRNAf.eIF-2.GTP) formation in animal cells. Dans "Post transcriptionnal control of gene expression" (eds. McCarthy, J.E.G. et Tuite, M.F.), p. 521-526. Springer-Verlag, Berlin.

Hafezparast, M. et Fisher, E. (1998). Wasted by an elongation factor. *Trends. Genet.* **14**, 215-217.

Hansen, L.J., Huang, W.I. et Jagus, R. (1987). Inhibitor of translational initiation in sea urchin eggs prevents mRNA utilization. *J. Biol. Chem.* **262**, 6114-6120.

Hayashi, Y., Urade, R., Utsumi, S. et Kito, M. (1989). Anchoring of peptide elongation factor EF-1alfa by phosphatidylinositol at the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biochem. (tokyo*)

106, 560-563.

Heinecke, J.W. et Shapiro, B.M. (1989). Respiratory burst oxidase of fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 1259-1263.

Heinecke, J.W. et Shapiro, B.M. (1990). Protein kinase C activates the respiratory burst of fertilization, but not cortical granule exocytosis, in ionophore-stimulated sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **142**, 216-223.

Heinecke, J.W., Meier, K.E., Lorenzen, J.A. et Shapiro, B.M. (1990). A specific requirement for protein kinase C in activation of the respiratory burst oxidase of fertilization. *J. Biol. Chem*. **265**, 7717-7720.

Herrera, F., Correia, H., Triana, L. et Fraile, G. (1991). Association of ribosomal subunits. A new functional role for yeast EF-1alfa in protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* **200**, 321-327.

Hershey, J.W.B. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 717-755.

Hiatt, W.R., Garcia, R., Merrick, W.C. et Sypherd, P.S. (1982). Methylation of elongation factor 1 alpha from the fungus Mucor. *Proc. Natl. Acad. Sci .USA.* **79,** 3433-3437.

Hille, M.B. et Albers, A.A. (1979). Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature.* **278**, 469-471.

Hille, M.B., Dholakia, J.N., Wahba, A., Fanning, E., Stimler, L., Xu, Z. et Yablonka-Reuveni, Z. (1990). In-vivo and in-vitro evidence supporting co-regulation of translation in sea-urchin eggs by polypeptide initiation factors, pH optimization, and mRNAs. *J. Reprod. Fert.* **42**, 235-248.

Hinnebusch, A.G. (1996). Translational control of GCN4: Gene-specific Regulation by Phosphorylation of eIF2. Dans "Translational control" (eds. Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 173-197. CSHL Press .

Hiraga, K., Suzuki, K., Tsuchiya, E. et 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.

Hopfield, J.J. (1974). Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 4135-4139.

Hörstadius, S. (1973). Experimental embryology of echinoderms, Clarendon Press, Oxford.

Hsieh, S.L. et Campbell, R.D. (1991). Evidence that gene G7a in the human major histocompatibility complex encodes valyl-tRNA synthetase. *Biochem. J.* **278,** 809-816.

Huang, W.I., Hansen, L.J., Merrick, W.C. et Jagus, R. (1987). Inhibitor of eukaryotic initiation factor 4F activity in unfertilized sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 6359-6363.

Hultin, T. (1961). Activation of ribosomes in sea urchin eggs in response to fertilization. *Exp. Cell Res.* **25**, 405-417.

Humphreys, T. (1969). Efficiency of translation of messenger-RNA before and after fertilization in sea urchins. *Develop. Biol.* **20**, 435-458.

Humphreys, T. (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **26**, 201-208.

Hunter, A.R., Farrell, P.J., Jackson, R.J. et Hunt T. (1977). The role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat-germ system. *Eur. J. Biochem.* **75**, 149-157.

Igarashi, K., Hashimoto, S., Miyake, A., Kashiwagi, K. et Hirose, S. (1982). Increase of fidelity of polypeptide synthesis by spermidine in eukaryotic cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* **128**, 597-604.

Igarashi, K., Ito, K., Sakai, Y., Ogasawara, T. et Kashiwagi, K. (1988). Regulation of protein synthesis by polyamines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **250**, 315-330.

Igarashi, K. et Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 559-64.

Igarashi, K., Sugawara, K., Izumi, I., Nagayama, C. et Hirose, S. (1974). Effect of polyamines of polyphenylalanine synthesis by Escherichia coli and rat-liver ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **48**, 495-502.

Infante, A.A. et Nemer, M. (1967). Accumulation of newly synthesized RNA templates in a unique class of polyribosomes during embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **58**, 681-688.

Jacob, A.N.K., Kandpal, G. et Kandpal, R.P. (1996). Isolation of expressed sequences that include a gene for familial breast cancer (BRCA2) and ather novel transcripts from a five megabase region on chromosome 13q12. *Oncogene.* **13**, 213-221.

Jagus, R., Huang, W.I., Hansen, L.J. et Wilson, M.A. (1992). Changes in rates of protein synthesis and eukaryotic initiation factor-4 inhibitory activity in cell-free translation systems of sea urchin eggs and early cleavage stage embryos. *J. Biol. Chem.* **267**, 15530-15536.

Jagus, R., Huang, W.I., Hiremath, L.S., Stern, B.D. et Rhoads, R.E. (1993). Mechanism of action of developmentally regulated sea urchin inhibitor of eIF-4. *Develop. Genet.* **14**, 412-423.

Janssen, G.M.C. et Möller, W. (1988a). Elongation factor 1betagamma from Artemia. Purification

and properties of its subunits. *Eur. J. Biochem.* **171**, 119-129.

Janssen, G.M.C. et Möller, 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., Maessen, G.D.F., Amons, R. et Möller, 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., Maassen, J.A. et Möller, W. (1990). Purification of elongation factors from *Artemia salina*. Dans "Ribosomes and Protein Synthesis- A practical approach" (ed. Spedding, G.). IRL Press.

Janssen, G.M.C., Morales, J., Schipper, A., Labbe, J.C., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. et Möller, W. (1991). A major substrate of maturation promoting factor identified as elongation factor 1bgd in *Xenopus lævis*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14885-14888.

Jefferies, H.B.J., Thomas, G. et Thomas, G. (1994). Elongation Factor-1 alpha mRNA is selectively translated following mitogenic stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 4367-4372.

Jefferies, H.B.J., Thomas, G. (1996). Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. Dans "Translational control" (eds. Hershey, J.W.B, Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 389-409. CSHL Press.

Johnson, J.D. et Epel, D. (1976). Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature.* **262**, 661-664.

Jung, M., Kondratyev, A.D. et Dritschilo, A. (1994). Elongation factor 1 delta is enhanced following exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* **54**, 2541-2543.

Kamath, A. et Chakraburtty, K. (1986). Protein synthesis in yeast. Purification of elongation factor 3 from temperature-sensitive mutant 13-06 of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **261**, 12596-12598.

Kanki, J.P. et Newport, J.W. (1991). The cell cycle dependence of protein synthesis during Xenopus laevis development. *Dev. Biol.* **146**, 198-213.

Kato, S. et Schroeter, S.C. (1985). Biology of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanis*, and its fishery in California. *Marine Fisheries Review.* **47**, 1-20.

Kawaguchi, Y., Bruni, R. et Roizman, B. (1997). Interaction of Herpes simplex virus 1 a regulatory protein ICPO with elongation factor 1 delta : ICPO affects translational machinery. *J. Virol.* **71**, 1019-1024.

Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B. et Hirai, K. (1999). Cellular elongation factor 1 delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J. Virol.* **73**, 4456-4460.

Keller, C., Gundersen, G. et Shapiro, B.M. (1980). Altered *in vitro* phosphorylation of specific proteins accompanies fertilization of *Strongylocentrotus purpuratus* eggs. *Develop. Biol.* **74**, 86-100.

Kelso-Winemiller, L.C. et Winkler, W.M. (1991). "Unmasking" of stored maternal mRNAs and the activation of protein synthesis at fertilization in sea urchins. *Development.* **111**, 623-633.

Kern, D. et Lapointe, J. (1979). The twenty aminoacyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli.* General separation procedure, and comparison of the influence of pH and divalent cations on their catalytic activities. *Biochimie*. **61**, 1257-1272.

Kidou, S. et Ejiri, S. (1998). Isolation, characterization and mRNA expression of four cDNAs encoding translation elongation factor 1A from rice (Oryza sativa L.). *Plant Mol. Biol.* **36**, 137-148.

Kielbassa, K., Muller, H.J., Meyer, H.E., Marks, F. et Gschwendt, M. (1995). Protein kinase C delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF-1 alpha and an eEF-1 alpha peptide at threonine 431. *J. Biol. Chem.* **270**, 6156-6162.

Kim, J.J. et Mehler, A.H. (1981). Stimulation of the transfer reaction of aminoacyl-tRNA synthetases by cations. *Arch. Biochem. Biophys.* **209**, 465-470.

Kinsey, W.H. (1984). Regulation of tyrosine-specific kinase activity at fertilization. *Develop. Biol.* **105**, 137-143.

Kinsey, W.H. (1995). Protein tyrosine kinase activity during egg activation is important for morphogenesis at gastrulation in the sea urchin embryo. *Develop. Biol.* **172**, 704-707.

Kinsey, W.H. (1996). Biphasic activation of fyn kinase upon fertilization of the sea urchin egg. *Develop. Biol.* **174**, 281-287.

Kinsey, W.H. (1997). Tyrosine kinase signaling at fertilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 519-522.

Kinzy, T.G. et Woolford, J.R. (1995). Increased expression of *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factor 1 alpha bypasses the lethality of TEF5 null allele encoding elongation factor 1 beta. *Genetics.* **141**, 481-489.

Kisselev, L.L. et Frolova, L.Y. (1999). Termination of translation in eukaryotes: new results and new hypotheses. *Biochemistry.* **64,** 8-16.

Kolettas, E., Lymboura, M., Khazaie, K. et Luqmani, Y. (1998). Modulation of elongation factor-1 delta (EF-1 delta) expression by oncogenes in human epithelial cells. *Anticancer Res.* **18**, 385-392.

Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P. et 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.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**, 229-241.

Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* **115**,887-903.

Kozak, M. (1994). Determinants of translational fidelity and efficiency in vertebrate mRNAs. *Biochimie.* **76**, 815-821.

Kusukoni, S. et Yasumasu, I. (1976). Cyclic change in polyamine concentrations in sea urchin eggs related with cleavage cycle. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **68,** 881-885.

Kusukoni, S. et Yasumasu, I. (1978). Inhibitory effect of a-Hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **67,** 336-345.

Lasky, L., Lev, Z., Xin, J.H., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1980). Messenger RNA prevalence in sea urchin embryos measured with cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 5317-5321.

Le Blanc, J.M. et Infante, A.A. (1992). Sea urchin small RNA ribonucleoprotein particles: identification, synthesis, and subcellular localization during early embryonic development. *Mol. Reprod. Dev*. **31**, 96-105.

Lepage, T., Sardet, C.et Gache, C. (1992). Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Develop. Biol.* **150**, 23-32.

Lew, Y., Jones, D.V., Mars, W.M., Evans, D., Byrd, D. et Frazier, M.L. (1992). Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. *Pancreas.* **7**, 144-152.

Li, L., Li, J., Rao, J.N., Li, M., Bass, B.L. et Wang, J.Y. (1999). Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. *Am. J. Physiol*. **276**, 946-954.

Livingston, B.T. et Wilt, F.H. (1992). Phorbol esters alter cell fate during development of the sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* **119**, 1641-1648.

Livingston, B.T., Vanwinkle, C.E. et Kinsey, W.H. (1998). Protein tyrosine kinase activity following fertilization is required to complete gastrulation, but not for initial differentiation of

endoderm and mesoderm in the sea urchin embryo. *Develop. Biol.* **193**, 90-99.

Lopo, A.C., MacMillan, S. et Hershey, J.W. (1988). Translational control in early sea urchin embryogenesis: initiation factor eIF4F stimulates protein synthesis in lysates from unfertilized eggs of Strongylocentrotus purpuratus. *Biochemistry*. **27**, 351-357.

Maessen, G.D.F., Amons, R., Maassen, J.A. et Möller, W. (1986). Primary structure of elongation factor 1beta from Artemia. *FEBS Lett.* **208**, 77-83.

Manen, C.A. et Russel, D.H. (1973). Spermine is a major polyamine in sea urchin: studies of polyamines ans their synthesis in developing sea urchins. *J. Embryol. Exp. Morph.* **29**, 331-354.

Martin, K.A, et Miller, O.L. (1983). Polysome structure in sea urchin eggs and embryos: an electron microscopic analysis. *Develop. Biol.* **98**, 338-348.

Marzouki, A., Sontag, B., Lavergne, J.P., Vidonne, C., Reboud, J.P. et Reboud, A.M. (1991). Effect of ADP-ribosylation and phosphorylation on the interaction of elongation factor 2 with guanylic nucleotides. *Biochimie*. **73,** 1151-1156.

Mathews, M.B. Sonenberg, N. et Hershey, J.W.B. (1996). Origins ans targets of translational control. Dans "Translational control" (eds. Hershey, J.W.B, Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 31-69. CSHL Press .

Mathur, S., Cleary, K.R., Inamdar, N., Kim, Y.H., Steck, P. et Frazier, M.L. (1998). Overexpression of elongation factor-1gamma protein in colorectal carcinoma. *Cancer.* **82**, 816-821.

Matsumoto, S., Mizoguchi, T., Oizumi, N., Tsuruga, M., Shinozaki, K., Taira, H. et 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., Oizumi, N., Taira, H. et Ejiri, S. (1992). Cloning and sequencing of the cDNA encoding rice elongation factor-1beta'. *FEBS Lett.* **311**, 46-48.

Matsumoto, S., Terui, Y., Xi, S.X., Taira, H. et Ejiri, S. (1994). Cloning and Characterization of the cDNA Encoding Rice Elongation Factor 1 beta. *FEBS Lett.* **338**, 103-106.

Meijer, L. et Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp. Cell Res.* **174**, 116-129.

Meijer, L., Paul, M. et Epel, D. (1982). Stimulation of protein phosphorylation during fertilization-induced maturation of Urechis caupo oocytes. *Develop. Biol.* **94**, 62-70.

Merrick, W.C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* **56**, 291-315.

Merrick, W.C. et Hershey, J.W.B. (1996). The pathway and mecanism of eukaryotic protein synthesis. Dans "Translational control" (eds Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 31-69. CSHL Press .

Mimori, K., Mori, M., Inoue, H., Mafune, K., Akiyoshi, T. et 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. et 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. et Belle, R. (1996a). Major intracellular localization of elongation factor-1. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 805-810.

Minella, O., Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Belle, R. et 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. et Belle, R. (1998). Multiple phosphorylation sites and quaterny organization of guanine-nucleotide exchange complex of elongation factor-1 (EF-1 beta gamma delta /ValRS) control the various functions of EF-1alpha. *Biosci. Rep.* **18**, 119-127.

Miyazaki, M. et Kagiyama, H. (1990). Soluble factor requirements for the Tetrahymena peptide elongation system and the ribosomal ATPase as a counterpart of yeast elongation factor 3 (EF-3). *J. Biochem. (Tokyo).* **108,** 1001-1008.

Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1109-1149.

Moon, R.T. (1983). Poly(A) containing messenger ribonucleoprotein complexes from sea urchin eggs and embryos: polypeptides associated with natives and UV-crosslinked mRNPs. *Differentiation.* **24**, 13-23.

Moon, R.T., Moe, K.D. et Hille, M.B. (1980). Polypeptides of nonpolyribosomal messenger ribonucleoprotein complexes of sea urchin eggs. *Biochemistry*. **19**, 2723-2730.

Moon, R.T., Brown, J.D. et Torres, M. (1997). WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet*. **13**, 157-62.

Moore, K.L. et Kinsey, W.H. (1994). Identification of an Abl-related protein tyrosine kinase in

the cortex of the sea urchin egg: Possible role at fertilization. *Develop. Biol.* **164**, 444-455.

Moore, K.L. et Kinsey, W.H. (1995). Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on egg activation and fertilization-dependent protein tyrosine kinase activity. *Develop. Biol.* **168**, 1-10.

Morales, J., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R. et Belle, R. (1992). Molecular cloning of a new guanine nucleotide-exchange protein, EF1delta. *Nucl. Acids Res.* **20**, 4091.

Morales, J., Bassez, T., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. et Osborne, H.B. (1993). Expression of elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) and 1 beta gamma (EF-1 beta gamma) are uncoupled in early Xenopus embryos. *Dev. Genet.* **14**, 440-448.

Moreau, J.L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J.C., Peaucellier, G., Picard, A. et Geneviere, A.M. (1998). Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Develop. Biol.* **200**, 182-197.

Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Develop. Biol.* **13**, 261-291.

Motorin, Y.A., Wolfson, A.D., Orlowsky, A.F. et Gladilin, K.L. (1988). Mammalian valyl-tRNA synthetase forms a complex with the first elongation factor. *FEBS Lett.* **238**, 262-264.

Motorin, Y.A., Wolfson, A.D., Lohr, D., Orlovsky, A.F. et 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.

Motoyoshi, K. et Iwasaki, K. (1977). Resolution of the polypeptide chain elongation factor-1 beta gamma into subunits and some properties of the subunits. *J.biochem.* **82**, 703-708.

Mulner-Lorillon, O., Poulhe, R., Cormier, P., Labbe, J.-.C., Doree, M. et 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**, 219-224.

Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Cavadore, J.-.C., Morales, J., Poulhe, R. et Belle, R. (1992). Phosphorylation of Xenopus elongation factor-1 gamma by cdc2 protein kinase : Identification of the phosphorylation site. *Exp. Cell Res.* **202**, 549-551.

Mulner-Lorillon, O., Minella, O., Cormier, P., Capony, J.P., Cavadore, J.C., Morales, J., Poulhe, R. et 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. et Katsumata, T. (1978). Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Effect of EF-1beta on EF-1alpha- and ribosome-dependent GTPase activity. *FEBS Lett.* **92**, 255-257.

Murphy, L., Harris, D. et Barrell, B. (1998). soumission EMBL. n° d'accession: CAA21314.

Murray, A.W. et Kirschner, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature.* **339**, 275-280.

Nagata, S., Iwasaki, K. et Kaziro, Y. (1976). Distribution of the low molecular weight form of eukaryotic elongation factor 1 in various tissues. *J. Biochem. (tokyo).* **80**, 73-77.

Nairn, A.C. et Palfrey, H.C. (1987). Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J. Biol. Chem.* **262**, 17299-17303.

Nairn, A.C. et Palfrey, H.C. (1996). Regulation of protein synthesis by calcium. Dans "Translational control" (eds Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 295-318. CSHL Press .

Nairn, A.C., Bhagat., B. et Palfrey, H.C. (1985). Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalia tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**,7939-7943.

Negrutskii, B.S. et Deutscher, M.P. (1991). Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88,** 4991-4995.

Negrutskii, B.S., Stapulionis, R. et Deutscher, M.P. (1994). Supramolecular organization of the mammalian translation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 964-968.

Negrutskii, B.S. et El'Skaya, A.V. (1998). Eukaryotic translation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **60**, 47-78.

Nierhaus, K.H. (1984). New aspects of the ribosomal elongation cycle. *Mol. Cell Biochem.* **61**, 63-81.

Ninio, J. (1975). Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie.* **57,** 587-595.

Nordnes, S., Krauss, S. et 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**, 529-532.

Nygard, O. et Nilsson, L. (1989). Characterization of the ribosomal properties required for formation of a GTPase active complex with eukaryotic elongation factor 2. *Eur. J. Biochem.* **179**, 603-608.

Nygard, O. et Nilsson, L. (1990). Translational dynamics. Interactions between the translational factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* **191**, 1-17.

Ohi, R. et Gould, K.L. (1999). Regulating the onset of mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 267-273.

Oizumi, N., Matsumoto, S., Taira, H. et Ejiri, S. (1992). Nucleotide sequences of the cDNA encoding wheat elongation factor 1 beta'. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5225.

Olds, J.L., Favit, A., Nelson, T., Ascoli, G., Gerstein, A., Cameron, M., Cameron, L., Lester, D.S., Rakow, T., et de Barry, J. (1995). Imaging protein kinase C activation in living sea urchin eggs after fertilization. *Develop. Biol.* **172**, 675-682.

Omura, F., Kohno, K. et Uchida, T. (1989). The histidine residue of codon 715 is essential for function of elongation factor 2. *Eur. J. Biochem.* **180,** 1-8.

Pain, V.M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**, 747-771.

Palen, E., Venema, R.C., Chang, Y.W.E. et Traugh, J.A. (1994). GDP as a regulator of phosphorylation of elongation factor 1 by casein kinase II. *Biochemistry.* **33**, 8515-8520.

Palla, F., Melfi, R., Digaetano, L., Bonura, C., Anello, L., Alessandro, C. et Spinelli, G. (1999). Regulation of the sea urchin early H2A histone gene expression depends on the modulator element and on sequences located near the 3 ' end. *Biol. Chem.* **380**, 159-165.

Palmiter, R.D. (1973). Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation. Comparable rates of polypeptide initiation and elongation on ovalbumin and globin messenger ribonucleic acid in a rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **248,** 2095-2106.

Parisi, E., Filosa, S., de Petrocellis, B. et Monroy, A. (1978). The pattern of cell division in the early development of the sea urchin. Paracentrotus lividus. *Develop. Biol.* **65**, 38-49.

Park, M.H., Cooper, H.L. et Folk, J.E. (1981). Identification of hypusine, an unusual aminoacid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 2869-2873.

Peaucellier, G., Veno, P.A. et Kinsey W.H. (1988). Protein tyrosine phosphorylation in response to fertilization. *J. Biol. Chem.* **263**, 13806-13811.

Pelech, S.L., Tombes, R.M., Meijer, L. et Krebs, E.G. (1988). Activation of myelin basic protein kinases during echinoderm oocyte maturation and egg fertilization. *Develop. Biol.* **130**, 28-36.

Pelletier, J. et Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* **334**,320-325.

Perez, J.M.J., Siegal, G., Kriek, J., Hard, K., Dijk, J., Canters, G.W. et Möller, 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 Fold. & Des.* **7**, 217-226.

Peters, H.I., Chang, Y.W.E. et 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.

Phan, L.D., Perentesis, J.P. et Bodley, J.W. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **268,** 8665-8668.

Philipova, R. et Whitaker, M. (1998). MAP kinase activity increases during mitosis in early sea urchin embryos. *J. Cell Sci.* **111**, 2497-2505.

Platel, R. (1992). Echinodermes. Dans "Des protozoaires aux Echinodermes" (eds Ridet, J.M., Platel, R. et Meunier, F.J.). Ellipses, 199-216.

Posakony, J.W., Flytzanis, C.N., Britten, R.J. et Davidson, E.H. (1983). Interspersed sequence organization and developmental representation of cloned poly(A) RNAs from sea urchin eggs. *J. Mol. Biol.* **167**, 361-389.

Price, N.T., Redpath, N.T., Severinov, K.V., Campbell, D.G., Russell, J.M. et Proud, C.G. (1991). Identification of the phosphorylation sites in elongation factor-2 from rabbit reticulocytes. *FEBS Lett.* **282**, 253-258.

Proud, C.G. (1994). Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **19**, 161-170.

Proud, C.G. et Denton, R.M. (1997). Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem. J.* **328**, 329-341.

Pyronnet, S., Pradayrol, L., Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol. Cell.* **5,** 607-616.

Raff, R.A., Brandis, J.W., Huffman, C.J., Koch, A.L. et Leister, D.E. (1981). Protein synthesis as an early response to fertilization of the sea urchin egg: a model. *Develop. Biol.* **86**, 265-271.

Rapp, G., Klaudiny, J., Hagendorff, G., Luck, M.R. et Scheit, K.H. (1989). Complete sequence of the coding region of human elongation factor 2 (EF-2) by enzymatic amplification of cDNA from human ovarian granulosa cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **370**, 1071-1075.

Ray, R.M., Zimmerman, B.J., McCormack, S.A., Patel, T.B.et Johnson, L.R. (1999). Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* **276**, 684-691.

Redpath, N.T. et Proud, C.G. (1993). Purification and phosphorylation of elongation factor-2 kinase from rabbit reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* **212**, 511-520.

Redpath, N.T., Price, N.T., Severinov, K.V. et Proud, C.G. (1993). Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **213**, 689-699.

Rees, B.B., Patton, C., Grainger, J.L. et Epel, D. (1995). Protein synthesis increases after fertilization of sea urchin eggs in the absence of an increase in intracellular pH. *Develop. Biol.* **169**, 683-698.

Regier, J.C. et Kafatos, F.C. (1977). Absolute rates of protein synthesis in sea urchins with specific activity measurements of radioactive leucine and leucyl-tRNA. *Develop. Biol.* **57**, 270-283.

Reynolds, P.J., Angerer, L.M., Palis, J., Nasir, A. and Angerer, R.C. (1992). Early mRNAs, spatially restricted along the animal-vegetal axis of sea urchin embryos, include one encoding a protein related to tolloid and BMP-1. *Development.* **114**, 769-786.

Rheinberger, H.J. et Nierhaus, K.H. (1987). The ribosomal E site at low Mg2+: coordinate inactivation of ribosomal functions at Mg2+ concentrations below 10 mM and its prevention by polyamines. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **5**, 435-446.

Riis, B., Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C. et Merrick, W.C. (1990). Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 420-424.

Rosenberry, T.L., Krall, J.A., Dever, T.E., Haas, R., Louvard, D. et Merrick, W.C. (1989). Protein Biosynthetic incorporation of [3H]ethanolamine into protein synthesis elongation factor 1 alpha reveals a new post-translational protein modification. *J. Biol. Chem.* **264**, 7096-7099.

Roy, A.L., Chakrabarti, D., Datta, B., Hileman, R.E. et Gupta, N.K. (1988). Natural mRNA is required for directing Met-tRNA(f) binding to 40S ribosomal subunits in animal cells: involvement of Co-eIF-2A in natural mRNA-directed initiation complex formation. *Biochemistry.* **27**, 8203-8209.

Russel, D.H. (1983). Microinjection of purified ornithine decarboxylase into Xenopus oocytes selectively stimulates ribosomal ARN synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 1318-1321.

Ryazanov, A.G., Shestakova, E.A.et Natapov, P.G. (1988). Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature.* **334**, 170-173.

Ryazanov, A.G., Rudkin, B.B. et Spirin, A.S. (1991). Regulation of protein synthesis at the elongation stage. New insights into the control of gene expression in eukaryotes. *FEBS Lett.* **285**,170-5.

Sanders, J., Brandsma, M., Janssen, G.M.C., Dijk, J. et Möller, 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**, 1113-1117.

Sanders, J., Raggiaschi, R., Morales, J. et Möller, W. (1993). The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1-delta. *Biochim. Biophys. Acta.* **1174**, 87-90.

Schatt, P., Moreau, M. et Guerrier, P. (1983). Variation cyclique de la phosphorylation des protéines et de l'activité MPF pendant la segmentation précoce de l'oeuf d'oursin. *C.R. Acad. Sci. Paris*. **296**, 551-554.

Shen, S.S. et Buck, W.R. (1990). A synthetic peptide of the pseudosubstrate domain of protein kinase C blocks cytoplasmic alkalinization during activation of the sea urchin egg. *Dev. Biol*.**140**, 272-280.

Shen, R., Su, Z.Z., Olsson, C.A. et Fisher, P.B. (1995). Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 6778-6782.

Shen, S.S., Kinsey, W.H. et Lee, S.J. (1999). Protein tyrosine kinase-dependent release of intracellular calcium in the sea urchin egg. *Develop. Growth Differ.* **41**, 345-355.

Sheu, G.T. et Traugh, J.A. (1997). Recombinant subunits of mammalian elongation factor 1 expressed in *escherichia coli. J. Biol. Chem.* **272**, 33290-33297.

Sheu, G.T. et 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.

Showman, R.M., Leaf, D.S., Anstrom, J.A. et Raff, R.A. (1987). Translation of maternal histone mRNAs in sea urchin embryos: a test of control by 5' cap methylation. *Develop. Biol.* **121**, 284-7.

Skogerson, L. (1979). Separation and characterization of yeast elongation factors. *Methods Enzymol.* **60**, 676-685.

Slater, I., Gillespie, D. et Slater, D.W. (1973). Cytoplasmic adenylylation and processing of maternal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 406-411.

Slobin, L.I. et Möller, 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. et Gingras, A.C. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10,** 268-275.

Song, J.M., Picologlou, S., Grant, C.M., Firoozan, M., Tuite, M.F. et Liebman, S. (1989). Elongation factor EF-1alfa gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **9**, 4571-4575.

Sprinzl, M. (1994). Elongation factor Tu: A regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 245-250.

Su, Z.Z., Goldstein, N.I. et Fisher, P.B. (1998). Antisens inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 1764-1769.

Sun, Y., Lin, J., Katz, A.E. et Fisher, P.B. (1997). Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer Res.* **57**, 18-23.

Swann, K. et Whitaker, M.J. (1990). Second messengers at fertilization in sea urchin eggs. *J. Reprod. Fertil.* **42**, 141-153.

Tabor, C.W. et Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem*. **53**, 749-790.

Taira, H., Kamiie, K., Kakuta, A., Ooura, H., Matsumoto, S., Ejiri, S. et Katsumata, T. (1992). Nucleotide sequence of the cDNA encoding silk gland elongation factor 1beta'. *Nucl. Acids Res.* **20**, 6734.

Tatsuka, M., Mitsui, H., Wada, M., Nagata, A., Nojima, H., Okayama, H.(1992). Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation. *Nature.* **359**, 333-336.

Terui, Y., Tsutsumi, K., Kidou, S., Sawazaki, T., Kuroiwa, Y., Yamaki, M. et 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.

Thompson, R.C. (1988). EFTu provides an internal kinetic standard for translational accuracy. *Trends Biol. Sci.* **13**, 91-93.

Trachsel, H., Erni, B., Schreier, M.H. et Staehelin, T. (1977). Initiation of mammalian protein synthesis. II. The assembly of the initiation complex with purified initiation factors. *J. Mol. Biol.* **116**, 755-767.

Trachsel, H. (1996). Binding of initiator Methionyl-tRNA to ribosomes. Dans "Translational control" (eds Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. et Sonenberg, N.), p. 113-138. CSHL Press .

Triana, F.J., Nierhaus, K.H., Ziehler, J.et Chakraburtty, K. (1993). Defining the function of EF3, a unique elongation factor in low fungi. Dans "The translational apparatu: Structure, function, regulation, evolution. (ed. Nierhaus, K.H.et al.), p327-338. Plenum Press New York.

Van Damme, H., Amons, R., Janssen, G. et Möller, W. (1991). Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1betagamma. *Eur. J. Biochem.* **197**, 505-511.

Van Damme, H., Amons, R. et Möller, W. (1992). Identification of the sites in the eukaryotic elongation factor 1alfa involved in the binding of elongation factor 1beta and aminoacyl-tRNA. *Eur. J. Biochem.* **207**, 1025-1034.

Van Damme, H.T.F., Amons, R., Karssies, R., Timmers, C.J., Janssen, G.M.C. et Möller, W. (1990). Elongation factor 1beta of artemia : localization of functional sites and homology to elongation factor 1delta. *Biochim. Biophys. Acta*. **1050**, 241-247.

Van Ness, B.G., Howard, J.B. et Bodley, J.W. (1978). Isolation and properties of the trypsin-derived ADP-ribosyl peptide from diphtheria toxin-modified yeast elongation factor 2. *J. Biol. Chem.* **253,** 8687-8690.

Venema, R.C., Peters, H.I. et Traugh, J.A. (1991a). 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.

Venema, R.C., Peters, H.I. et Traugh, J.A. (1991b). 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**, 12574-12580.

Vonica, A., Weng, W., Gumbiner, B.M. et Venuti, J.M. (2000). TCF is the nuclear effector of the β-catenin signal that patterns the sea urchin animal-vegetal axis. *Develop. Biol.* **217**, 230-243.

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

Wahba, A.J., Woodley, C.L. et Dholakia, J.N. (1990). Initiation of protein synthesis. Dans "Ribosomes and Protein Synthesis- A practical approach" (ed. Spedding, G.). IRL Press.

Wallace, H.M. (1998). Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations? *Biochem. Soc. Trans.* **26**,569-71.

Wallace, H.M. (2000). The physiological role of the polyamines. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**, 1-3.

Wang, J.F., Engelsberg, B.N., Johnson, S.W., Witmer, C., Merrick, W.C., Rozmiarek, H. et Billings, P.C. (1997). DNA binding activity of the mammalian translation elongation complex: Recognition of chromium- and transplatin-damaged DNA. *Arch. Toxicol.* **71**, 450-454.

Whiteheart, S.W., Shenbagamurthi, P., Chen, L., Cotter, R.J. et Hart, G.W. (1989). Protein Murine elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) is posttranslationally modified by novel amide-linked ethanolamine-phosphoglycerol moieties. Addition of ethanolamine-phosphoglycerol to specific glutamic acid residues on EF-1 alpha. *J. Biol. Chem.* **264**, 14334-14341.

Wilt, F.H. (1977). The dynamics of maternal poly(A)-containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. *Cell.* **11**, 673-681.

Winkler, M.M., Steinhardt, R.A., Grainger, J.L. et Minning, L. (1985). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature.* **287**, 558-560.

Winkler, M.M., Bruening, G. et Hershey, J.W. (1983). An absolute requirement for the 5' cap structure for mRNA translation in sea urchin eggs. *Eur. J. Biochem.* **137**, 227-232.

Winkler, M.M., Nelson, E.M., Lashbrook, C. et Hershey, J.W. (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Develop. Biol.* **107**, 290-300.

Xiao, H., Neuveut, C., Benkirane, M. et Jeang, K.T. (1998). Interaction of the second coding exon of tat with human EF-1delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 384-389.

Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L. et Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**, 4065-4072.

La synthèse protéique est composée de trois phases, l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le facteur d'élongation eEF-1 contient deux éléments: une protéine G, eEF-1A et un complexe macromoléculaire d'échange de GDP/GTP, eEF-1B. Chez les animaux supérieurs, eEF-1B est constitué de quatre sous-unités eEF-1βγδ et la Valyl-ARNt synthétase (Val-RS).

Nous avons cloné et séquencé deux ADNc de 2 et 2,7kb codant pour eEF-1δ chez l'oursin *Sphaerechinus granularis.* Ils diffèrent uniquement par la longueur de leur région 3'UTR. Leur expression est régulée et découplée de celle de eEF-1A au cours du développement précoce.

L'analyse phylogénétique montre que eEF-1δ provient de la fusion d'un domaine C-terminal du gène ancestral β avec un domaine Leucine Zipper.

A partir d'une protéine recombinante issue de l'ADNc codant pour eEF-1δ, nous avons obtenu un anticorps spécifique. Il nous a permis de montrer que la protéine eEF-1δ existe, dans l'ovule d'oursin, sous deux isoformes présentes dans un complexe de haut poids moléculaire et que eEF-1δ est fortement associée à eEF-1γ. Des protéines présentant des homologies avec une protéine chaperon et une protéine ribosomale restent associées à eEF-1δ au cours de la purification.

L'utilisation de polyamines à des concentrations physiologiques a montré un effet inhibiteur de la phase d'élongation dans un lysat acellulaire d'oursin.

Un messager synthétique, sans initiation spécifique, a été traduit dans des lysats de réticulocytes de lapin pour comprendre le rôle de l'association de la Val-RS au complexe. Selon le site de fixation du ribosome, il conduit à un peptide polyValine ou polySérine. La traduction du polyValine est toujours supérieure à celle du polySérine. La phosphorylation avec CDK1/cycline B diminue l'élongation du polyValine et augmente celle du polySérine, suggérant une régulation de CDK1 sur l'élongation par phosphorylation des sous-unités de eEF-1B.