HAL
open science

Analyse fonctionnelle du facteur elF4F au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin Sphaerechinus granularis

Patrick Salaün

▶ **To cite this version:**

Patrick Salaün. Analyse fonctionnelle du facteur elF4F au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin Sphaerechinus granularis. Biologie cellulaire. Rennes 1, 2004. Français. NNT : . tel-01118087

HAL Id: tel-01118087

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01118087v1

Submitted on 18 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 : 3035
de la thèse

THESE
présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1
pour obtenir

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

Par

SALAÜN Patrick

Equipe d'accueil : Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff

Ecole Doctorale : Vie-Agronomie-Santé

Composante universitaire : Unité Mer & Santé, Station Biologique de Roscoff CNRS/UPMC

TITRE DE LA THESE :
Analyse fonctionnelle du facteur eIF4F au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin *Sphaerechinus Granularis*

SOUTENUE LE 1er OCTOBRE 2004 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Dr Christian GACHE, rapporteur
Dr Didier PONCET, rapporteur
Dr Claude PRIGENT, examinateur
Dr Daniel THOMAS, examinateur
Dr Patrick CORMIER, directeur de thèse

REMERCIEMENTS

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

Je remercie les professeurs André Toulmond et Bernard Kloareg pour m'avoir accueilli au sein de la Station Biologique de Roscoff.

Je remercie le Dr Odile Mulner-Lorillon et le Pr Robert Bellé de m'avoir accueilli au sein de l'équipe. Merci pour vos conseils avisés et votre soutien.

Je remercie le Dr Patrick Cormier de m'avoir encadré pendant ces trois années. Merci pour votre enthousiasme sans faille et la confiance que vous m'avez accordée. Désormais je ne porterais plus de ceinture sans bretelles.

Je remercie aussi tout le reste de l'équipe Cycle Cellulaire et Développement:

Merci au Dr Julia Morales pour ses précieux conseils et pour sa grande patience (nécessaire lorsque l'on m'explique quelque chose....).

Merci à Sandrine Boulben, pilier technique du laboratoire sans qui je serais encore dans la chambre froide à me demander comment marche la colonne de chromato.....Merci pour ton aide toujours précieuse.

Merci à Magali Le Breton, comparse de thèse, toujours de bonne humeur. Merci pour ta gentillesse.

Merci à Frederic le Sourd (l'ami de Zorro) et à Julie Marc. Merci Fredo d'être un peu fou, de n'avoir pas dépassé 14 ans d'âge mental et de m'avoir toujours mis la patate (et parfois une avoine) quand je n'avais pas le moral.
Merci à toi Julie, brestoise devant l'éternel, d'avoir écouté mes multiples jérémiades. Merci de rire à mes blagues (même si tu étais outrée), de me payer mes cafés (je te dois 2589 euros) et surtout merci d'avoir été une amie sur qui l'on peut compter.

Merci aussi aux membres passés et présents de l'équipe. A Jérôme, à Yann, à Cécile, à Fred Le Jan, à Pouzoul (je rigole), à Aurélie kwiatz.., kwawtz.. enfin Aurélie quoi.

Merci à Stéphane et Marie, Gaëtan, Vincent, Fabrice et Manu, Franck, Marie (la grande) pour toutes ces soirées mémorables et pour le kart, les barbecues, la muscu, la pizzeria, le counter strike (on bosse à la station !). Merci à vous tous d'avoir été sur mon chemin.

Merci aussi à tout le personnel de la station biologique pour avoir rendu ces trois années si agréables.

Merci à mes vieux potes de toujours, Renaud, Mickael, Philippe et Jean-Philippe qui me supportent depuis de longues années (et c'est pas prêt de s'arrêter!!!)

Merci aussi à the Dagorn's team : Jean-Pierre, Janine, Catherine et Solen. Merci à eux pour leur gentillesse et pour m'avoir accueilli chez eux à bras ouverts.

Merci à Gilles, mon grand frère, d'être là toujours pour moi et de m'avoir épaulé si souvent. Merci aussi à sa femme Magali, ma toute récente belle-sœur, pour sa gentillesse.

Merci à mon vieux fox et nosaur qui se reconnaitreront (même s'ils ne savent pas lire). Merci aussi à ma mère et à mon père à qui je dois tant et sans qui je ne serais pas arrivé jusque là.

Et enfin merci à Stéphanie, la femme que j'aime. Merci de croire en moi.

SOMMAIRE GENERAL

Sommaire général 4

Sommaire des tableaux et Figure 7

Listes des abréviations 9

Listes des publications 10

Résumé 11

INTRODUCTION 12

Chapitre I : La régulation de l'expression des gènes 14

I) Les niveaux de régulation 16

1) Traductibilité et disponibilité des ARNm 16

a) Démasquage des ARNm 17

b) Localisation des ARNm 17

c) Polyadénylation des ARNm 17

2) Régulation de l'efficacité de traduction 18

II) L'Initiation de la traduction 19

1) L'initiation coiffe-dépendante 21

2) Le recrutement direct en position interne (IRES) 25

3) Le shunt 26

III) Le complexe eIF4F structure et régulation 27

1) Structure du complexe d'initiation eIF4F 27

a) eIF4E 27

b) eIF4A 28

c) eIF4G 29

2) La régulation du complexe eIF4F 31

a) La régulation d' eIF4E par phosphorylation 31

b) La régulation d'eIF4G par phosphorylation 32

c) pdcd4 inhibe l'activité d'eIF4A 33

d) La régulation du complexe eIF4F via les 4E-BPs 34

e) eIF4E-Transporter : 4E-T 39

f) Autres eIF4E "binding protéin" 40

g) La Maskine 40

Chapitre II : La traduction et le cycle cellulaire durant le développement embryonnaire de l'oursin 42

I) Présentation de l'oursin *Sphaerechinus granularis* 42

II) La reprise du cycle cellulaire chez *Sphaerechinus granularis* 44

III) La reprise de la synthèse protéique, analyse de l'augmentation de la traduction au cours de la fécondation chez *Sphaerechinus granularis* 46

IV) L'oursin : avantages et contraintes 48

Chapitre III : Implication des composants du complexe eIF4F dans le cycle cellulaire, le développement et la cancérogenèse 50

I) Le Contrôle du cycle cellulaire et l'initiation de la synthèse protéique 50

1) eIF4E et cycle cellulaire 51

2) eIF4G et cycle cellulaire 53

3) Contrôle de la machinerie de traduction durant le cycle cellulaire 53

4) Implications de la voie FRAP / mTOR dans le contrôle du cycle cellulaire 54

II) eIF4F et le développement embryonnaire 55

1) eIF4F et développement 56

2) eIF4A et eIF4E régule la traduction de manière tissus spécifiques 57

3) eIF4E et eIF4E binding protein : contrôle spatial et temporel de l'embryogenèse 58

4) Implication de la voie FRAP / mTOR dans le développement embryonnaire 60

III) eIF4F et Cancer : Implication et espoir thérapeutique 61

1) eIF4E est une protéine oncogénique 61

2) Implication d'eIF4G et eIF4A dans les pathologies cancéreuses 63

3) Quels sont les moyens thérapeutiques envisageables pour lutter contre les cancers impliquant une dérégulation d'eIF4F 64

RESULTATS

I) Analyse de la dynamique du complexe eIF4/4E-BP au cours de la première division mitotique de l'oursin 68

II) Analyse de la voie de régulation du complexe eIF4E / 4E-BP et contrôle de l'activation du MPF au cours de la première division mitotique 71

III) Régulation de 4E-BP au cours du développement précoce de l'oursin et identification d'une nouvelle forme de 4E-BP 74

IV) Analyse du rôle d'eIF4G au cours du développement embryonnaire de l'oursin 77

V) Point de vue général sur l'implication de la traduction coiffe dépendante dans le contrôle du cycle cellulaire 82

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 83

I) Implication du complexe eIF4E / 4E-BP dans le développement de l'embryon d'oursin 83

II) Implication du complexe eIF4E / 4E-BP dans le contrôle du cycle cellulaire 86

III) Importance des "4E binding protein" 86

IV) Conclusion générale et perspectives 87

BIBLIOGRAPHIE 90

SOMMAIRE DES TABLES ET FIGURES

Table 1 : Les différents facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction **22**
Figure 1 : Les quatres niveaux de régulation de l'expression des gènes **14**
Figure 2 : Les trois différents types d'initiation de la traduction **20**
Figure 3 : Les différentes étapes de l'initiation coiffe-dépendante **24**
Figure 4 : Structure du co-crystal d'eIF4E associé à la coiffe m^7GTP **28**
Figure 5 : Structure linéaire de la protéine eIF4GI humaine **29**
Figure 6 : Le modèle closed loop **30**
Figure 7 : Pdcd 4 se fixe à eIF4A **33**
Figure 8 : Comparaison des séquences des trois isoformes humaines de 4E-B **34**
Figure 9 : La voie de régulation du répresseur de la traduction 4E-BP **37**
Figure 10 : La protéine RAPTOR permet le rapprochement entre le complexe eIF4E / 4E-BP et la kinase FRAP /mTOR **38**
Figure 11 : 4E-T permet *via* l'importine α et β le transfert d'eIF4E du cytoplasme vers le noyau **39**
Figure 12 : Chez le Xénope, la maskine associée à eIF4E empêche son interaction avec eIF4G **41**
Figure 13 : Fécondation et premier cycle cellulaire mitotique chez l'oursin **44**
Figure 14 : Le MPF composé de la cycline B et de CDK1 est indispensable pour la transition G2-M du cycle cellulaire **45**
Figure 15 : L'association eIF4E-CUP permet le transport du messager *oskar* jusqu'au pôle postérieur **59**
Figure 16 : La balance PTEN / PI3 Kinase contrôle la production de PIP3 à l'origine de l'activation de la voie akt / PKB **65**
Figure 17 : Bilan de l'article 1 **70**
Figure 18 : Bilan de l'article 2 **73**
Figure 19 : Bilan de l'article 3 **76**
Figure 20 : Séquence en acides aminés du facteur eIF4G de *sphaerechinus granularis* **78**
Figure 21 : Comparaison des séquences d'eIF4G dans différentes espèces **79**
Figure 22 : Comparaison du motif YXXXXXLΦ de eIF4G de spaerechinus granularis avec les motifs de 4E-BP et eIF4G d'autes organismes **80**

Figure 23 : L'injection du peptide ayant pour sequence le site de fixation d'eIF4G pour eIF4F retarde la permière division mitotique **81**

LISTE DES ABREVIATIONS

eIF(4E, 4F, 4G, 4A, ect...) : Eukaryotic Initiation Factor

ARNm : Acide Ribonucléique messager

ADN : Acide Désoxyribonucléique

IRES : Internal Ribosome Entry site

m^7GTP : Méthyle 7 Guanosine Tri Phosphate

ATP : Adénosine Tri Phosphate

PABP : Poly A Binding protein

MNK1 : Map-Kinase Interacting Protein kinase 1

4E-BP : eIF4E Binding Protein

H4E-BP : Heavy eIF4E Binding Protein

FRAP / mTOR : FKBP12 Rapamycin Associated Protein / Mamalian Target Of Rapamycin

CDK : Cyclin Dependent kinase

MPF : M-Phase Factor

4E-T : eIF4E-Transporter

PI3K : Phospho-Inositol 3 Kinase

PTEN : Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten

LISTE DES PUBLICATIONS

Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., and Cormier, P. (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev Biol* 255, 428-39.

Salaun, P., Le Breton, M., Morales, J., Belle, R., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O., and Cormier, P. (2004). Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp Cell Res* 296, 347-57.

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

Salaun,P., Le breton,M., Boulben,S., Mulner-Lorillon,O., Belle,R., Cormier,P. and Morales, J. Role of eIF4G in the early development of sea urchin embryo. En préparation.

Cormier, P., Pyronnet, S., **Salaun, P**., Mulner-Lorillon, O., and Sonenberg, N. (2003). Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 469-75.

Le Breton, M., **Salaun, P**., Belle, R., Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., and Morales, J. Identification of a M-phase differentially recruited mRNA encoding for cyclin A. *N. A. R.* submitted.

RESUME

Au cours de cette décennie, l'implication des facteurs d'initiation de la traduction a été soulignée dans les processus de la division cellulaire, de la tumorigénèse ainsi qu'au cours du développement embryonnaire. Parmi ces facteurs, le facteur d'initiation eIF4E est maintenant reconnu pour jouer un rôle central dans le contrôle de la régulation de l'expression des gènes et pour être impliqué dans la régulation du développement embryonnaire.

Nous avons analysé le comportement de ce facteur et de son principal répresseur, 4E-BP, au cours du développement embryonnaire précoce de l'oursin. Nos travaux démontrent que chez l'oursin, la fécondation provoque la dissociation du complexe eIF4E / 4E-BP ainsi que la dégradation de 4E-BP, mécanisme original décrit ici pour la première fois. La dégradation et la dissociation sont sensibles à la rapamycine, suggérant qu'elles sont toutes deux sous contrôle de la kinase FRAP / mTOR. Parallèlement à ces travaux nous avons analysé la régulation enzymatique située en amont du complexe eIF4E / 4E-BP et déterminé que la PI3 kinase semble n'exercer qu'un très faible contrôle sur ce complexe contrairement à ce qui est relaté dans la littérature.

Par ailleurs, nous montrons que le complexe eIF4E / 4E-BP contrôle la synthèse de la cycline B, indispensable pour l'accomplissement de la première mitose de l'œuf d'oursin. Un autre facteur d'initiation, eIF4G, joue lui aussi un rôle déterminant pour la première division mitotique.

Enfin, Nous avons identifié une nouvelle protéine s'associant à eIF4E : H4E-BP. Nous montrons que la quantité de 4E-BP et H4E-BP, et leur degré d'association avec eIF4E sont régulés au cours du développement embryonnaire précoce. L'ensemble de nos résultats permettent de mieux comprendre comment s'articulent les processus du cycle cellulaire et ceux de la synthèse protéique au cours du développement embryonnaire précoce.

INTRODUCTION

La traduction des ARNm en protéines représentent une étape importante de l'expression des gènes. Les protéines sont très abondantes (44 % du poids sec d'un homme) (revue dans Davidson et Britten, 1973), ce sont des macromolécules organiques qui jouent un rôle fondamental dans la vie des organismes car elles constituent les "machines" moléculaires qui établissent et maintiennent l'organisation et le fonctionnement des cellules. Les protéines assument des rôles de structure, de transport, de défense, de synthèse, de destruction, ou encore des rôles de régulation. Elles sont aussi impliquées dans les processus de différenciation, de prolifération et de mort cellulaire. Aussi ce sont la nature et la variété des protéines que produit une cellule qui caractérisent son identité, par exemple : les hépatocytes, les cardiocytes, les gamètes...

La synthèse des protéines, et donc sa régulation , se révèlent être indispensables pour la cellule allant même jusqu'à déterminer sa viabilité. En effet, une synthèse protéique aberrante peut entraîner la mort de la cellule ou au contraire déclencher son "immortalisation" à l'origine de la plupart des cancers.

Mon travail de recherche durant ces trois années a concerné l'étude de la machinerie de la traduction dans un contexte physiologique particulier : la fécondation chez l'oursin *Sphaerechinus granularis* et à un niveau de régulation spécifique : l'initiation. L'initiation de la traduction des ARNm est médiée par le complexe initiateur eIF4F (eukaryotic Initiation Factor 4F). Ce complexe trimérique dont l'activité est hautement régulé, détermine la nature des ARNm traduits, ainsi que le lieu et la durée de la traduction. Nos travaux ont permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de

régulation de ce complexe et ont révélé son implication à la fois dans le cycle cellulaire et dans le développement embryonnaire.

Dans une première partie, après avoir présenté les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes, nous exposerons les différents types de régulation de la traduction, en insistant sur l'initiation dépendante de la coiffe et le complexe eIF4F.

Dans une seconde partie, nous présenterons le modèle oursin que nous avons utilisé et les raisons de ce choix comme support de cette étude.

Dans une troisième et dernière partie, nous ferons le point sur les connaissances actuelles concernant l'implication du facteur eIF4F dans le cycle cellulaire, le développement ainsi que dans la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse.

Chapitre I : La régulation de l'expression des gènes

La régulation de l'expression des gènes dans une cellule eucaryote se fait à quatre niveaux : le niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Figure 1).

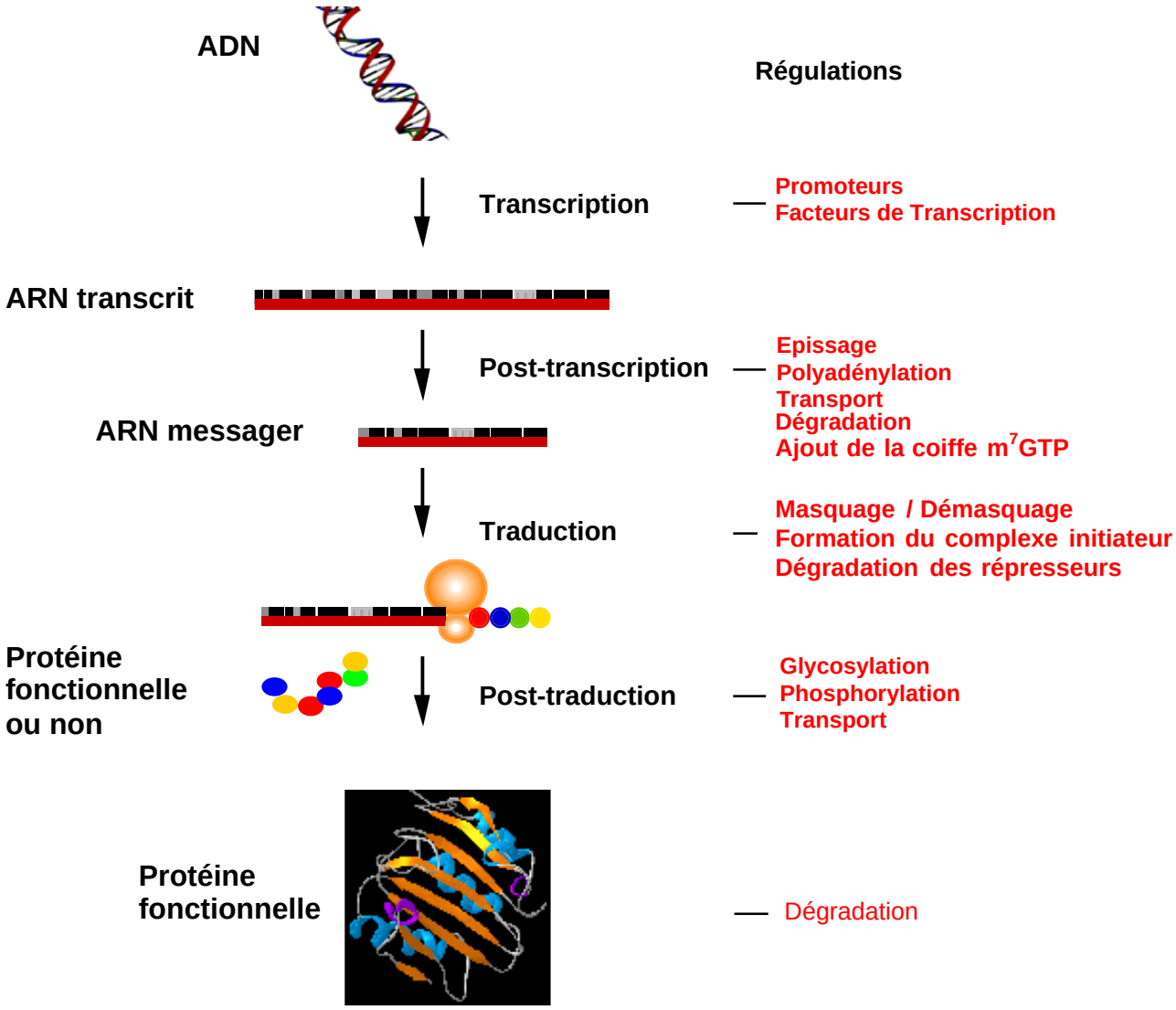


Figure 1 : Les quatre niveaux de régulation de l'expression des gènes. Les régulations traductionnelles et post-traductionnelles sont de plus en plus considérées comme fondamentales dans le contrôle de l'expression génétique (voir le texte pour explication).

La transcription correspond à la formation d'une copie d'une séquence d'ADN en une séquence d'ARN. Cette étape détermine si un gène est transcrit et en quelle quantité. Les mécanismes au niveau post-transcriptionnel permettent la maturation de l'ARN en ARN messager traduisible en polypeptides. Ces mécanismes incluent l'épissage de l'ARNm, son transport vers le compartiment cytoplasmique, sa stabilité et des modifications comme l'acquisition d'une coiffe méthylguanosine et d'une queue poly A respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm.

La traduction est le processus qui permet la creation d'une protéine à partir d'une molécule d'ARN messager. Elle définit l'efficacité de l'expression et le moment où le messager sera traduit. Les mécanismes post-traductionnels contrôlent l'expression des protéines en les activant, inactivant ou en les répartissant sélectivement dans la cellule.

Le contrôle de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel a longtemps été considéré comme l'unique moyen de contrôler l'expression d'un gène. Néanmoins, il paraît clair à ce jour que la régulation au niveau traductionnel joue aussi un rôle crucial et déterminant dans le contrôle de l'expression génique. Jacob et Monod furent les premiers en 1961 à avancer le concept d'instabilité de l'ARN à l'interface entre le gène et la protéine supposant ainsi que cet ARN pourrait être utilisé différemment suivant les conditions physiologiques.

Il existe de nombreux exemples de régulation de la traduction. Ainsi, au cours de la différenciation terminale des érythrocytes, l'accumulation spécifique de l'ARNm codant pour la globine se réalise par une stabilisation de son ARNm et une dégradation sélective des autres ARNm (Russel JE, 1997). Au cours du développement, la fécondation induit une augmentation rapide de la synthèse protéique. Cette augmentation ne nécessite pas de néosynthèse d'ARNm et se fait à partir d'un stock d'ARNm maternels (Gross et Cousineau, 1964; Giudice et al., 1973). Cette augmentation est en partie régulée à un

niveau traductionnel par l'augmentation de l'efficacité de la machinerie de la traduction (Brandis et Raff, 1978). Le cycle cellulaire est lui aussi un processus biologique contrôlé en grande partie à un niveau traductionnel et post-traductionnel (revue dans King et al., 1996).

Le contrôle traductionnel repose sur l'existence d'une utilisation différentielle de la molécule d'ARN en fonction des conditions physiologiques. Ce contrôle peut être non discriminant et affecter la population globale d'ARNm, ou plus sélectif lorsqu'il module la synthèse d'un nombre limité d'ARNm. Il existe deux types de mécanismes de contrôle : ceux qui sont basés sur la traductibilité et la disponibilité de l'ARN et ceux qui sont basés sur la machinerie de la traduction elle même.

I) Les niveaux de régulation

1) Traductibilité et disponibilité des ARNm

La quantité d'un ARNm dans le cytoplasme est déterminée par son taux de transcription et sa vitesse de dégradation. Cette quantité n'est pas limitante, tout du moins dans les systèmes où la synthèse protéique est faible. C'est par exemple le cas dans l'ovocyte bloqué en prophase 1 chez le xénope. L'ovocyte de xénope en fin de croissance contient un stock important de ribosomes dont seulement 1 à 2 % sont recrutés dans les polysomes (Woodland, 1974). Au cours de la maturation, le nombre des polysomes augmente indiquant qu'un plus grand nombre d'ARNm est traduit (Richter et al., 1982). Ces modifications peuvent avoir pour origine un démasquage des ARNm, une relocalisation rendant les ARNm plus accessibles à la machinerie de traduction ou encore des modifications post-transcriptionnelles comme la polyadénylation.

a) Démasquage des ARNm :

Les mRNP ou particules ribonucléoprotéiques peuvent masquer les ARNm. Chez le xénope par exemple, ce masquage empêche la traduction des messagers et les stabilise jusqu'à leur démasquage à des moments spécifiques comme la fécondation ou au cours du développement précoce (revue dans Richter, 1988).

b) Localisation des ARNm :

La distribution des ARNm varie au sein même de la cellule (revue dans Bashirullah et al., 1998). Dans l'ovocyte de xénope l'ARNm x121 est localisé au niveau du pôle animal (Kloc et al., 1991). D'autres, comme Vg1, sont localisés au niveau de l'hémisphère végétatif (revue dans Melton, 1987). Chez l'oursin, l'ARNm codant pour SpCOUP-TF est localisé dans une région subcorticale de l'œuf, puis au cours du développement embryonnaire, il est localisé de façon restrictive au niveau de l'ectoderme oral (Vlahou et al., 1996). Les messagers peuvent ne pas être traduit s'ils sont localisés à un endroit différent de celui de la machinerie de traduction. Les mécanismes de localisation des ARNm se réalisent par l'intermédiaire d'éléments du cytosquelette qui interagissent avec la région 3' non traduite (Yisraeli et al., 1990). De manière intéressante, nous verrons au cours du troisième chapitre que la sous unité eIF4E du facteur eIF4F est capable de réguler spécifiquement le transport de l'ARNm codant pour la cycline D1.

c) Polyadénylation des ARNm

La polyadénylation est la formation de l'extrémité 3' au cours de laquelle une queue poly(A) est synthétisée en 3' de l'ARNm. Une augmentation du taux de polyadénylation est souvent corrélée à une augmentation de la synthèse protéique. Ainsi au cours de la

maturation ovocytaire et du développement précoce, la polyadénylation est impliquée dans la traduction des ARNm (Richter, 1996; Wickens, 1996). La polyadénylation des ARNm détermine leur association avec les ribosomes (Paris et Philippe, 1990). Les CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element), très conservés au cours de l'évolution (Verrotti et al., 1996), sont composés de deux séquences signal AAUAAA et d'un élément riche en U. Ils sont capables de se lier à des facteurs trans comme les protéines p82 et p58 dont l'une est régulée au cours de la maturation (Paris et al., 1991). Il a été montré que chez le Xénope, la protéine CPEB (Cytoplasmic Polyadénylation Element Binding protein) était elle aussi capable de s'associer aux CPE (Hake et Richter, 1994). CPEB participe ainsi à la régulation de la synthèse protéique au cours de la maturation meïotique de l'ovocyte de Xénope (Cao et Richter, 2002). L'activation de la traduction d'un ARNm nécessite sa polyadénylation effective c'est-à-dire un processus dynamique de polyadénylation plutôt que la simple présence de la queue polyA (McGrew et al., 1989; Simon et al., 1992). Cependant en utilisant une queue polyA de synthèse, il a été démontré que la présence seule d'une longue queue polyA dans l'ARNm endogène codant pour le proto-oncogène c-Mos est suffisante pour stimuler l'accumulation de la protéine c-Mos et provoquer la maturation induite par la progestérone (Barkoff et al., 1998).

2) Régulation de l'efficacité de traduction

La transcription a longtemps était considérée comme le seul mécanisme de régulation de l'expression des gènes, la traduction des ARNm étant pour sa part considérée comme un mécanisme simple et non régulé. Les recherches de ces dix dernières années ont démontré le contraire (revue dans Gingras et al., 1999b). En effet, ce mécanisme s'avère être hautement régulé, complexe, et constitue une étape primordiale pour la régulation de l'expression des gènes et de la synthèse protéique. La

machinerie de la traduction est limitante et certains éléments la composant doivent être modifiés pour déclencher la traduction.

II) L'initiation de la traduction

Le processus complet de la synthèse protéique comporte 3 phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Ils existent des exemples de régulation de la traduction au cours de ces trois phases, néanmoins c'est au niveau de l'initiation que la régulation de la traduction est plus importante. Cette observation s'accorde logiquement avec le fait qu'il semble plus efficace de contrôler un mécanisme à son début plutôt que d'en interrompre son cours (Mathews, 1996). L'initiation de la traduction s'impose donc comme une étape fondamentale de la régulation de l'expression des gènes.

On dénombre à ce jour trois mécanismes distincts qui peuvent être complémentaires (Figure 2) :

- L'initiation coiffe-dépendante
- Le recrutement direct en position interne (Internal Ribosome Entry Site : IRES)
- Le shunt : phénomène au cours duquel les ribosomes reconnaissent la coiffe en 5' et sont transférés directement au niveau du codon initiateur.

Même si ces trois processus ont une réalité physiologique, la très grande majorité des ARNm eucaryotes sont traduits de manière coiffe-dépendante (revue dans von der Haar et al., 2004). Le recrutement en position interne et le shunt existent mais appartiennent en général à un contexte biologique plus spécifique.

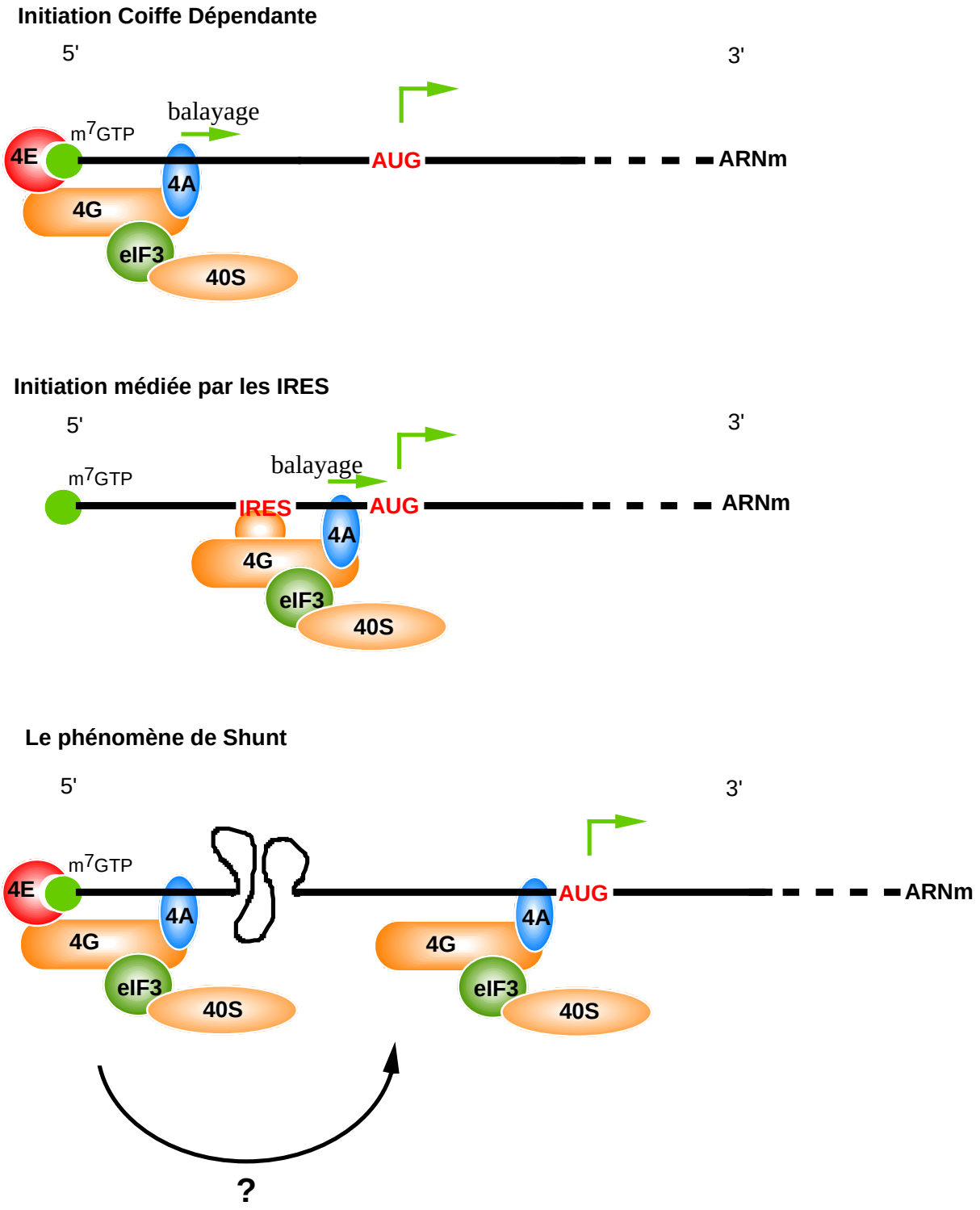


Figure 2 : Les trois différents types d'initiation de la traduction. L'initiation coiffe-dépendante dépend de l'interaction entre le facteur eIF4E et la structure m^{7}GTP des ARNm d'une part et eIF4E et eIF4G d'autre part. Le recrutement en position interne se fait directement par la reconnaissance de la séquence IRES par eIF4G. Le shunt passe d'abord par l'interaction avec la coiffe puis par l'interaction directe d'eIF4G avec une séquence de l'ARNm. Ce processus permet la traduction d'ARNm dont l'extrémité 5' est fortement structurée.

1) L'initiation coiffe-dépendante

La plupart des ARNm des cellules eucaryotes possèdent à leurs extrémités 5' une structure particulière m^7GpppX (où X est n'importe lequel des nucléotides ; (Shatkin, 1976)) appelée coiffe. Cette coiffe « m^7GTP » facilite la traduction de la plupart des ARNm. Dans des systèmes de traduction *in vitro, les* ARNm sans coiffe ont une efficacité de production de protéines très inférieure à leurs homologues qui possèdent une coiffe (Both et al., 1975; Muthukrishnan et al., 1975). De plus cette coiffe est également importante pour d'autres processus comme l'épissage ou la stabilité des ARNm (revue dans Varani, 1997).

C'est l'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation (Eukaryotic Initiation Factor : eIFs) qui permet le recrutement d'un ARNm et la formation d'un complexe d'initiation comprenant la petite sous unité ribosomique. Ce complexe va ensuite scanner l'ARNm dans le sens 5', 3' jusqu'au codon initiation (AUG). Dans ce complexe, l'anticodon de l'ARNt-méthionine initiateur interagit alors avec le codon d'initiation. Cette association spécifie la phase de lecture de l'ARNm et nécessite l'intervention d'au moins 11 facteurs d'initiations ainsi que l'énergie apportée par l'ATP et le GTP (Table 1).

Nom	Sous-unités	Fonction possible
eIF1		Stimulation de la formation du complexe de préinitiation 43 S
eIF1A		Stimulation du complexe de préinitiation 43 S ; dissociation des sous-unités 60 S et 40 S
eIF2	 β χ	Liaison de l'ARNt$_i$-Met et du GTP ; sélection de AUG Liaison de l'ARNt$_i$-Met Liaison du GTP et de l'ARNt$_i$-Met
eIF2B	 α, β γ, δ	Echange de nucléotides guanidiques sur eIF2 Liaison du GTP Liaison de l'ATP
eIF3	 p35, p36, p40, p44, p47, p66, p115, p170	Dissocie les ribosomes ; liaison à la sous-unité 60 S Majoritairement phosphorylée
eIF4A		Hélicase ATP dépendante, se lie à l'ARNm
eIF4B		Stimule l'activité hélicase, se lie à l'ARNm
eIF4F	 eIF4E eIF4A eIF4G	Liaison à la coiffe m^{7}GTP de l'ARNm ; activité hélicase Liaison à la coiffe m^{7}GTP de l'ARNm Hélicase, ATPase Liaison à eIF4E, eIF4A , eIF3 et pabp1
eIF5		Stimule l'activité GTPase de eIF2 ; stimule la libération des facteurs d'initiation
eIF6		Dissociation des sous-unités 40 S et 60 S

Table 1 : Les différents facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction

Le schéma présenté Figure 3 décrit les différentes étapes de l'initiation de la traduction. L'ARNt-Met initiateur forme un complexe ternaire avec le facteur eIF2 et le GTP (**1**) et s'associe à la petite sous-unité ribosomale 40 S pour former le complexe de préinitiation de 43 S (**2**). eIF2 et eIF2B provoquent l'association de l'ARNt-Met initiateur à la petite sous unité ribosomique. Les facteurs eIF1A e eIF3 stabilisent le complexe ternaire et sont présents dans le 43 S (Trachsel et al., 1977). Indépendamment de la formation du complexe de préinitiation 43 S, le facteur eIF4E reconnaît l'extrémité de la coiffe m^{7}GTP de l'ARNm (**3**) (Sonenberg, 1996). Cette protéine fait partie du complexe eIF4F qui est

composé de deux autres sous unités, eIF4A et eIF4G. Le facteur eIF4B s'associe dans un second temps à l'ARNm et favorise l'activité hélicase du facteur eIF4A, ce qui permet le déroulement des structures secondaires de l'ARNm de manière ATP dépendante. Le complexe de préinitiation 43 S et l'ARNm lié à eIF4F et eIF4B s'associent pour former le complexe 48 S (**4**). La sous-unité 40 S du ribosome recherche alors le codon AUG d'initiation par un processus de balayage (**5**) et le situe au niveau de son site P.

Une fois que l'ARNt-Met initiateur a interagi avec le codon d'initiation, eIF5 reconnaît le complexe de préinitiation (**6**) et provoque l'hydrolyse du GTP porté par eIF2. L'hydrolyse du GTP diminue l'affinité des facteurs d'initiation pour la sous-unité 40 S du ribosome et provoque la dissociation des facteurs d'initiation (**7**). Le facteur eIF2 associé au GDP est libéré (**8**) puis est recyclé par eIF2B qui échange le GDP par du GTP (**9**). La sous-unité 60 S du ribosome s'associe à la sous-unité 40 S pour former le complexe d'initiation 80 S (**10**). La phase d'élongation de la synthèse protéique peut alors commencer.

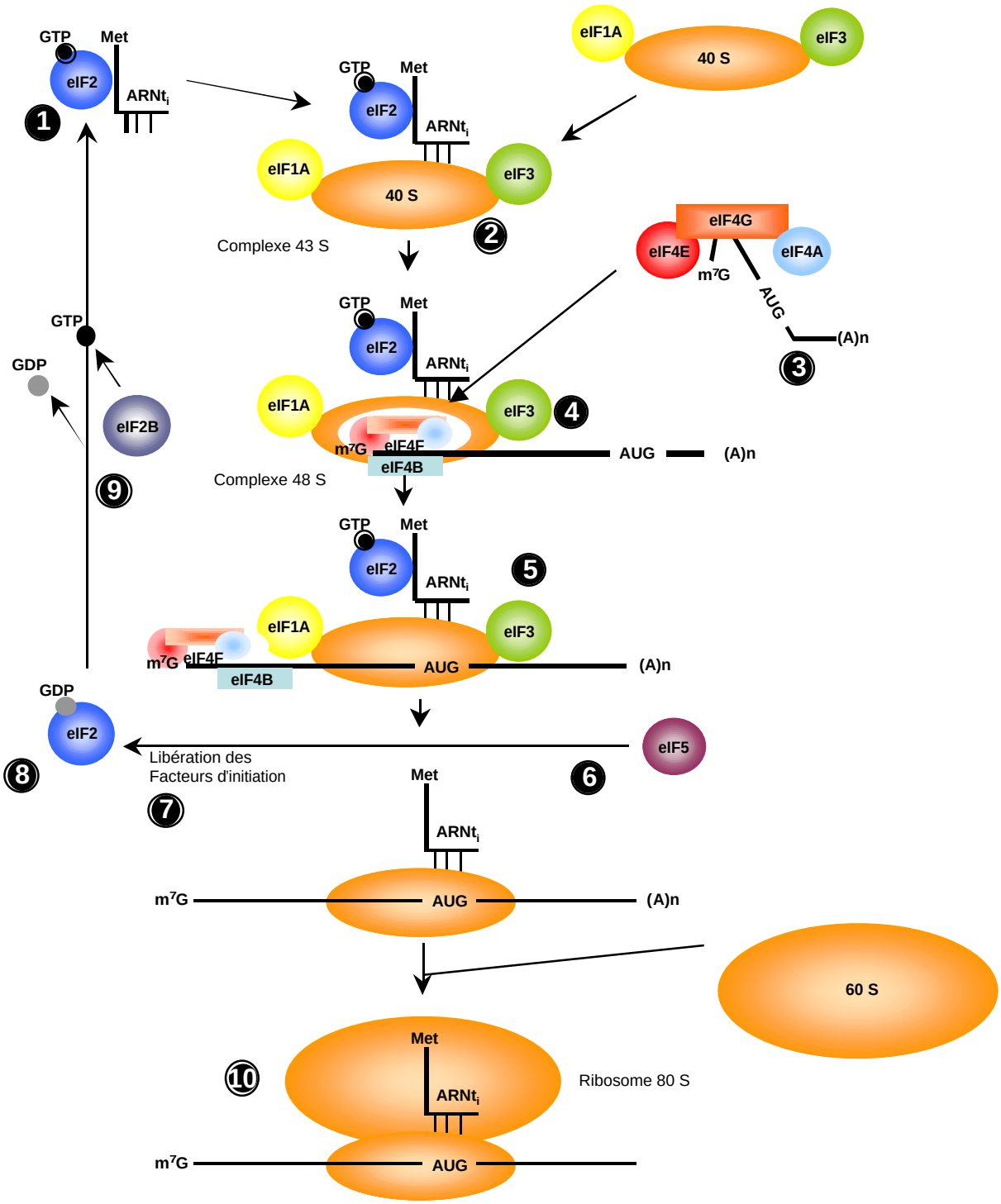


Figure 3 : Les différentes étapes de l'initiation coiffe-dépendante (voir le texte pour les explications)

2) Le recrutement direct en position interne (IRES)

Il existe un mécanisme alternatif à l'initiation coiffe dépendante pour le recrutement des ribosomes sur les ARNm. Ce mécanisme repose sur une interaction directe entre la sous-unité ribosomale 40 S et une structure interne de l'ARNm située après la coiffe m^7GTP dans la région 5' UTR. Cette structure est appelée IRES pour Internal Ribosome Entry Site. Cette séquence a été découverte en premier chez les picornavirus (Jang et al., 1988; Pelletier et Sonenberg, 1988). Ce sont des virus à ARNs qui n'ont pas de coiffe m7GTP en 5'. Ils possèdent sur leurs ARNm une séquence d'environ 450 nucléotides qui offre un accès direct aux ribosomes. Le taux de traduction de la plupart de ces virus est très important même lorsque la machinerie de traduction de la cellule hôte est bloquée (revue dans Belsham et Sonenberg, 1996). Les virus, grâce aux systèmes des IRES peuvent donc assurer la traduction de leurs messagers tout en inhibant celle de la cellule infectée.

La présence des IRES n'est pas restreinte aux ARNm sans coiffe des picornavirus, ainsi l'existence d'IRES a été montrée dans des ARNm cellulaires. Par exemple, les ARNm codant pour le facteur de croissance des fibroblastes (FGF2) (Vagner et al., 1995) ou pour l'ornithine décarboxylase (ODC) (Pyronnet et al., 2000) possèdent des séquences IRES.

Le mécanisme par lequel les ribosomes s'attachent à la molécule d'ARN est encore mal connu, mais il semble qu'à l'exception d'eIF4E, de nombreux facteurs de l'initiation participent à ce processus. Ainsi, le facteur eIF4A est par exemple nécessaire à la traduction IRES dépendante (Pause et al., 1994b). De la même manière, il a été montré que dans un système *in vitro* dépourvu du facteur eIF4E, l'ajout d'un fragment d'eIF4G possédant la propriété d'associer l'ARNm permet à la sous-unité 40 S de se complexer avec le codon initiateur AUG des protéines (Pestova et al., 1996). Dans le système IRES

dépendant, ce serait eIF4G qui s'associerait aux ARNm *via* leur séquence IRES (revue dans Pestova et al., 2001).

On peut se demander pourquoi, étant donné la grande efficacité du système de balayage, les séquences IRES sont apparues. Une explication peut être que l'on trouve des situations physiologiques où l'initiation *via* les IRES est importante. Par exemple, l'expression de FGF2 se fait majoritairement par IRES en situation de stress oxydatif ou de choc thermique. Durant un tel stress, eIF4E est hypophosphorylé, ce qui inactiverait en partie eIF4F et inhiberait la traduction coiffe dépendante. On comprend alors que la présence d'un IRES permette le maintien de l'expression de certaines protéines dans de telles conditions.

3) Le shunt

C'est une étude chez le virus de la mosaïque du choux fleur qui a permis de mettre en évidence ce troisième type de régulation (Futterer et al., 1993). Le shunt combine certains aspects du balayage classique et de l'initiation interne. Le complexe de préinitiation se forme au niveau de la coiffe 5' puis commence à balayer jusqu'à la rencontre d'ARNs structurés qui pilotent son transfert en aval où il peut atteindre le codon d'initiation. Ce processus permet de passer outre des structures très stables d'ARNm qui ne pourraient pas être déroulées lors du balayage. La nature des signaux qui induisent ce mécanisme ainsi que sa régulation sont encore inconnues.

III) Le complexe eIF4F: sa structure et sa régulation

Nous avons vu précédemment que le complexe eIF4F permet l'association entre l'ARNm et la structure ribosomale. Cette fonction lui confère un rôle déterminant pour l'initiation de la traduction où il peut être assimilé à un « pont pivotant » situé entre la coiffe m^7GTP des ARNm et la sous-unité 43 S.

Nous allons dans un premier temps décrire la structure de ce complexe en nous intéressant à ses trois composantes que sont eIF4E, eIF4G, eIF4A, puis nous analyserons sa régulation en portant notre attention sur la protéine 4E-BP (eIF4E Binding Protein).

1) Structure du complexe d'initiation eIF4F

a) eIF4E

eIF4E est une protéine de 25 kDa (chez l'homme) qui s'associe à la coiffe m^7GTP des ARNm. D'abord appelée CBP1 pour Cap Binding Protein 1, elle a été isolée pour la première fois en utilisant des ARNm viraux (possédant une coiffe) comme amorce (Sonenberg et al., 1978). Une fois purifiée, cette protéine est capable de stimuler la traduction d'ARNm viraux avec une coiffe m^7GTP dans un système *in vitro*, alors que sa déplétion dans des extraits cellulaires réduit fortement la traduction (Sonenberg et al., 1978). eIF4E est donc essentielle pour l'initiation de la traduction (revue dans Gingras et al., 1999b). Aussi, cette protéine est très conservée dans les espèces d'un même phylum et entre les règnes animal et végétal. Ainsi la protéine eIF4E des plantes, de la drosophile ou de l'aplysie possèdent de fortes homologies avec eIF4E humaine. De plus, bien que ne possèdant que 32 % d'identité avec la protéine eIF4E de la levure, eIF4E humaine est capable d'empêcher la mort des cellules de levure en complémentant la perte de leur gène codant pour eIF4E (Altmann et al., 1989).

La structure tridimentionnelle de cette protéine a été résolue par cristallographie aux rayons X (Marcotrigiano et al., 1997) (Figure 4). Elle est souvent assimilée à un gant de base-ball, où la partie concave est le lieu d'interaction avec la coiffe m^7GTP. Cette interaction se base sur la reconnaissance de l'extrémité m^7GTP de l'ARN par des résidus aromatiques situés sur les chaînes latérales d'eIF4E.

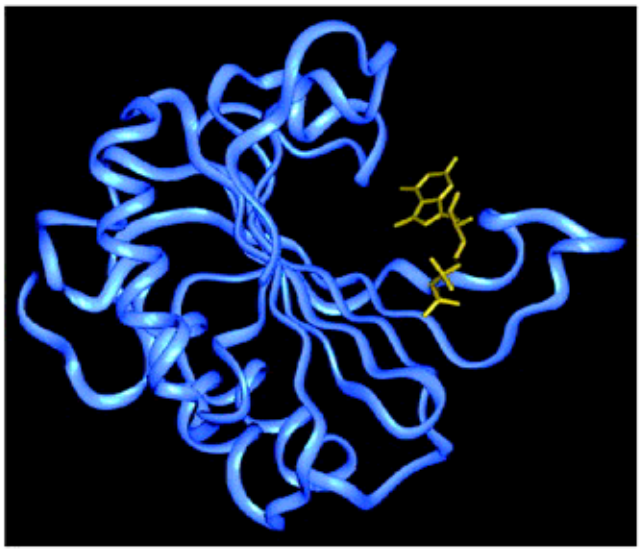


Figure 4 : Structure du co-crystal d'eIF4E (en bleu) associé à la coiffe m^7GTP des ARNm (en jaune au centre) d'après Gingras et al 1999b.

b) eIF4A

eIF4A est une protéine de 46 kDa qui exerce une activité d'ATPase ARN dépendante et d'ARN hélicase (Grifo et al., 1984; Ray et al., 1985). Elle fait partie d'une famille de protéines présentant un motif DEAD-*box* (Linder et al., 1989). En plus de son rôle dans la traduction, cette protéine participe à divers processi comme l'épissage de l'ARN (Chan et al., 2004), la synthèse des ribosomes (revue dans Rogers et al., 2002) ou encore l'oogenèse (Tomancak et al., 1998). Il existe trois isoformes d'eIF4A chez les mammifères. Bien que très homologues, ces isoformes se distinguent entre elles par leurs expressions différentielles spécifiques de certains tissus et leurs rôles dans la régulation

au cours du développement. Néanmoins, toutes assurent un rôle d'hélicase fondamental pour dérouler les structures d'ARNm afin de faciliter son balayage par le complexe 80 S.

c) eIF4G

eIF4G est une grosse protéine de structure de 220 kDa (chez l'humain) présentant deux isoformes eIF4GI et eIF4GII identifiées chez les mammifères. Cette protéine a un rôle crucial dans la mise en place du complexe eIF4F. En effet, eIF4G sert de support physique à de nombreux facteurs d'initiation de la traduction, ce qui lui vaut la qualification de protéine « adaptateur » (revue dans Hentze, 1997). eIF4G interagit avec eIF4E, eIF4A mais aussi eIF3, et PABP (Poly A Binding Protein) (Figure 5).

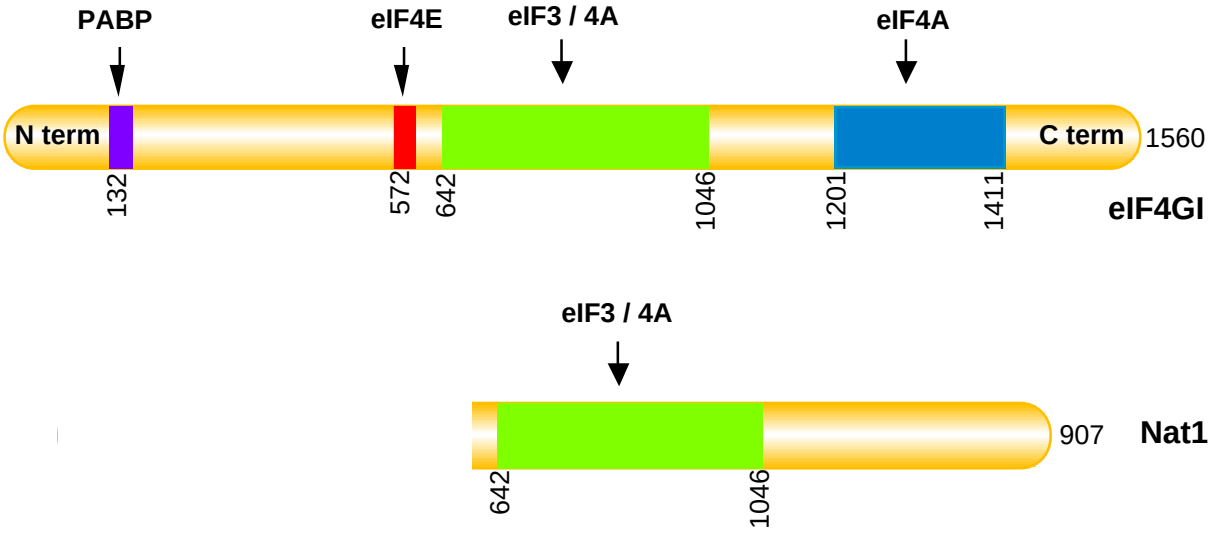


Figure 5 : Structure linéaire de la protéine eIF4GI humaine. Les domaines en couleurs représentent les sites d'interaction entre eIF4GI et ses différents partenaires. La protéine Nat1 est une forme tronquée du facteur eIF4G. Son rôle sera discuté dans la partie : régulation du complexe eIF4F.

En s'associant à eIF4E d'une part et à eIF3 de l'autre, eIF4G permet le rapprochement physique de la sous-unité 40 S ribosomale et de l'ARNm à traduire (Figure 6). eIF4G va structurer le complexe eIF4F et permettre la mise en place du complexe d'initiation suivant un modèle nommé « closed loop » (Jacobson,1996) (Figure 6). Cette

conformation particulière recrute l'ARN à traduire dans le ribosome, mais aussi stimule la reconduction de la traduction par un effet de pontage, médié par eIF4G et ses partenaires, entre la coiffe 5' et l'extrémité 3' polyadénylée. Ainsi, dans un système *in vivo* un ARNm non coiffé, sera trois fois mieux traduit s'il porte une séquence polyadénylée en 3', et environ trente fois mieux s'il est, en plus, coiffé en 5' (Gallie, 1991).

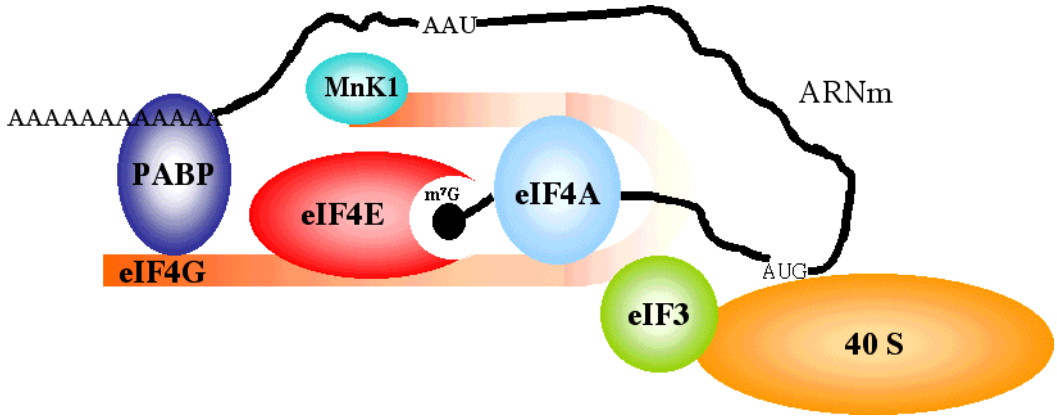


Figure 6 : Le modèle closed loop. Selon ce modèle la protéine eIF4G permet un rapprochement de l'extrémité 5' et 3' des ARNm afin de faciliter leur traduction

Le site d'interaction avec eIF4E a été localisé sur eIF4G entre les acides aminés 409 et 457 (Lamphear et al., 1995). Ainsi, eIF4E co-précipite avec le fragment N-terminal d'eIF4G généré par le clivage de la protéase virale des poliovirus. Le domaine de liaison à eIF4E sur eIF4G a été confirmé à l'aide de protéines eIF4E recombinantes. Il implique une séquence de 12 acides aminés entre les résidus 413 et 424 d'eIF4G (Mader et al., 1995). Des expériences menées sur des levures avec des mutants thermosensibles d'eIF4E ont montré que la fixation d'eIF4E sur eIF4G stimule la traduction des ARN exogènes coiffés (Tarun et Sachs, 1997) alors que les ARNm non coiffés ne sont pas traduits.

eIF4G interagit aussi avec eIF4A. Lamphear et son équipe ont localisé dans un premier temps ce site d'interaction au niveau du tiers C-terminal d'eIF4G (Lamphear et al., 1995). Mais précisement eIF4G contient deux sites indépendants de liaison à eIF4A : une

région C-terminale incluse dans le domaine précédemment décrit par Lamphear et une région centrale (Imataka et Sonenberg, 1997).

2) La régulation du complexe eIF4F

Le complexe eIF4F permet le recrutement de l'ARNm dans les ribosomes. Les très nombreuses études concernant sa régulation ont montré qu'il s'agissait d'un mécanisme hautement régulé et particulièrement complexe. En fait, chaque partenaire de ce complexe est soumis à une régulation fine faisant intervenir de nombreuses protéines et protéines kinases. Cette régulation est d'autant plus complexe qu'elle fait intervenir différents acteurs en fonction du contexte cellulaire dans lequel elle est étudiée.

a) La régulation d' eIF4E par phosphorylation

Chez l'humain et la souris, eIF4E est phosphorylé sur un site principal : la sérine 209 (De Benedetti et Rhoads, 1990; Lazaris-Karatzas et al., 1990). Il a été montré dans des réticulocytes de lapin que la forme phosphorylée d'eIF4E possède une affinité trois fois supérieure pour un analogue de coiffe m^7GTP que la forme non phosphorylée (Minich et al., 1994). La phosphorylation d'eIF4E permettrait donc d'augmenter son affinité pour la coiffe des ARNm, cependant ce résultat reste controversé notamment par de récentes découvertes qui indiquent que le facteur eIF4E phosphorylé aurait moins d'affinité pour la coiffe (Scheper et al., 2002). Néanmoins, la phosphorylation d'eIF4E est une réalité physiologique et son rôle reste donc à définir.

Des expériences suggèrent fortement que MNK1 (MAP Kinase-interacting protein kinase 1) serait la proteine kinase responsable de la phosphorylation d'eIF4E. MNK1 a été identifiée comme étant un substrat de ERK1 et ERK2 (Fukunaga et Hunter, 1997; Waskiewicz et al., 1997). L'expression d'une protéine mutante MNK1 dominante négative

dans des cellules HEK 293 inhibe la phosphorylation d'eIF4E en réponse à une stimulation par le phorbol ester (Waskiewicz et al., 1999). MNK1 interagit directement avec eIF4G1 et eIF4G2 dans les cellules de mammifères (Pyronnet et al., 1999; Waskiewicz et al., 1999). Cette interaction permet en fait de rapprocher la protéine MNK1 de son substrat eIF4E. Cette observation est confirmée par le fait qu'une mutation d'eIF4E sur son site de liaison à eIF4G induit une importante diminution de sa phosphorylation (Pyronnet et al., 1999). Ainsi en plus de son rôle de protéine de structure pour l'assemblage du complexe de préinitiation 48 S, eIF4G facilite la phosphorylation d'eIF4E. Il faut noter que dans certaines circonstances, d'autres kinases sont susceptibles de phosphoryler eIF4E. C'est le cas de la protéine kinase C qui est capable de phosphoryler eIF4E *in vitro* (Whalen et al., 1996).

b) La régulation d'eIF4G par phosphorylation

Le facteur eIF4G peut être phosphorylé *in vitro* par la protéine kinase A et la protéine kinase C (Tuazon et al., 1989). Il a été montré qu'en réponse à certains stimuli, eIF4G était phosphorylé (Morley et Pain, 1995). Cette phosphorylation serait sous le contrôle de la voie FRAP / mTOR et serait corrélée à une augmentation de la formation du complexe eIF4F. Toutefois la manière dont cette augmentation est associée à la phosphorylation d'eIF4G reste inconnue.

Le facteur eIF4G est aussi régulé par clivage. En effet, il a été montré que dans des cellules en phase apoptotique, eIF4GI était clivé en deux (revue dans Clemens et al., 1998; Marissen et Lloyd, 1998), empêchant ainsi l'initiation de la traduction. De la même manière, à la suite d'une infection virale, eIF4GI est aussi scindé en deux fragments (Etchison et al., 1982). Ce clivage se traduit par une inhibition spécifique de la traduction coiffe-dépendante de la cellule infectée (Jia et al., 1996). Néanmoins, la partie C terminale

d'eIF4G restant capable de s'associer à eIF4A, les messagers viraux peuvent être traduits *via* leurs séquences IRES.

Il existe une protéine ayant une forte homologie au niveau structural avec eIF4G. Cette protéine appelée NAT1, ou encore DAP5 (Figure 5) a une masse moléculaire d'environ 102 KDa chez l'humain. Il s'agit en fait d'une forme tronquée d'eIF4G à laquelle il manque la partie amino-terminale qui inclue les sites de fixation à eIF4E et PABP (Imataka et Sonenberg, 1997; Yamanaka et al., 1997). Ainsi cette protéine se comporterait comme un inhibiteur de la traduction en séquestrant les facteurs eIF3 et eIF4A empêchant leurs interactions avec eIF4G.

c) pdcd4 inhibe l'activité d'eIF4A

De récents travaux basés sur des approches double-hybride ont montré que la protéine pdcd4, considérée comme un suppresseur de tumeur (Cmarik et al., 1999), était capable de s'associer au facteur eIF4A (Yang et al., 2003). Cette association empêche l'interaction d'eIF4A avec la partie C terminale d'eIF4G et inhibe de ce fait la traduction en supprimant l'activité hélicase d'eIF4A (Figure 7). Dans des cellules tumorales Bon-1, on trouve une surexpression de pdcd4 corrélée avec une forte inhibition de la traduction de l'anhydrase carbonique de type II (Lankat-Buttgereit et al., 2004).

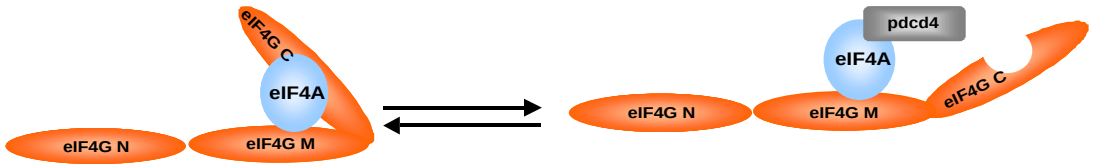


Figure 7 : Pdcd 4 se fixe à eIF4A . Cette fixation empêche l'interaction de eIF4A avec la partie C-terminale d'eIF4G et inhibe ainsi l'activité hélicase d'eIF4A.

d) La régulation du complexe eIF4F *via* les 4E-BPs

Il existe un mécanisme très conservé concernant la régulation d'eIF4F. Celui-ci situe eIF4E et les protéines capables de s'y associer comme la cible principale du contrôle de la traduction. Parmi ces protéines, la famille des 4E-BPs (eIF4E Binding Proteins) joue un rôle fondamental. Cette famille a été retrouvée dans de nombreuses espèces que ce soit chez les mammifères (Mader et al., 1995), la drosophile (Lavoie et al., 1996) ou encore l'oursin (Cormier et al., 2001). C'est une analyse Far-Western utilisant eIF4E comme sonde qui a permis de mettre en évidence l'existence de ces petites protéines (environ 16 kDa) comme partenaire d'eIF4E (Pause et al., 1994a).

Aussi appelées PHAS pour Protein Heat and Acid Stable, les protéines 4E-BPs connues à ce jour sont au nombres de trois chez les mammifères. Bien que très similaires d'un point de vue structural et fonctionnel, les différentes formes de 4E-BP n'ont pas la même affinité pour eIF4E. Ainsi, c'est 4E-BP2 qui a le plus d'affinité pour eIF4E. Cette différence s'explique par la présence d'un résidu arginine (R) chez 4E-BP2 à la place d'un résidu cystéine chez 4E-BP1 et 4E-BP3 (Figure 8).

```
4E-BP1    GTRIIYDRKFLMEC
4E-BP2    GTRIIYDRKFLLDR
4E-BP3    GTRIIYDRDFLLEC
```

Figure 8 : Comparaison des séquences des trois isoformes humaines de 4E-B. Elles sont très proches, néanmoins le résidu arginine (R , en rouge) de 4E-BP2 lui confère une plus forte affinité pour eIF4E que les autres 4E-BP.

Cette arginine ajoute une charge positive à 4E-BP2 ce qui augmenterait son affinité pour eIF4E (Ptushkina et al., 1999). Les 4E-BPs sont capables d'inhiber fortement la traduction coiffe dépendante dans des extraits cellulaires ou des cellules ayant une forte activité de synthèse protéique (Pause et al., 1994a; Poulin et al., 1998). En fait, les protéines 4E-BPs inhibent la formation du complexe eIF4F en séquestrant la protéine

eIF4E l'empêchant ainsi de s'associer à eIF4G (Haghighat et al., 1995). Cette inhibition est rendue possible par le fait que eIF4E partage le même site de fixation avec les 4E-BPs et eIF4G qui, logiquement possèdent tous deux le même motif de fixation à eIF4E. Ce motif nécessaire pour l'interaction avec eIF4E est YXXXXLϕ (où X est n'importe quel acide aminé et ϕ est un résidu aliphatique, souvent L, M ou F). La délétion de cette séquence ou la mutation du résidu tyrosine ou leucine pour un résidu alanine abroge l'interaction eIF4E / 4E-BP et par conséquent l'inhibition de la traduction (Mader et al., 1995; Poulin et al., 1998).

Les 4E-BPs s'associent au niveau de la partie dorsale d'eIF4E et n'empêche pas l'association avec la coiffe m^7GTP située à l'opposé d'eIF4E (voir Figure 5). De manière assez paradoxale, il a été démontré que l'association entre 4E-BP et eIF4E a le pouvoir d'augmenter l'affinité de l'eIF4E pour la coiffe des ARNm (Ptushkina et al., 1999).

L'affinité des 4E-BP pour eIF4E est déterminée par le degré de phosphorylation de certains résidus de 4E-BP. La forme hypophosphorylée de 4E-BP interagit fortement avec eIF4E alors que la forme hyperphosphorylée en est incapable (Fadden et al., 1997; Gingras et al., 1998; Marcotrigiano et al., 1999). Cette phosphorylation est un mécanisme complexe et hiérarchisé. Elle fait intervenir plusieurs sites de phosphorylation au niveau de 4E-BP et cela dans un ordre précis. Chez les mammifères, la phosphorylation en thréonine 37 et 46 est nécessaire mais non suffisante pour la libération d'eIF4E. Il semble en effet que la phosphorylation d'autres sites soit requise pour dissocier eIF4E de 4E-BP (Gingras et al., 1999a). Cette phosphorylation suppléméntaire se situe au niveau de la thréonine 70 et de la serine 65. Ce sont ces phosphorylations qui vont déterminer l'association de 4E-BP à eIF4E (revue dans Gingras et al., 2001). La kinase responsable de ces phosphorylations est à ce jour inconnue. En résumé, pour que 4E-BP soit dissocié de eIF4E il faut d'abord deux phosphorylations en Thr 37 et Thr 46 qui permettent deux

secondes phosphorylations en Thr 70 et Ser 65, responsables de la dissociation de 4E-BP et eIF4E. La raison pour laquelle 4E-BP hyperphosphorylé se dissocie d'eIF4E est inconnue. Une hypothèse pourrait être que la phosphorylation entraîne un changement conformationnel de 4E-BP l'empêchant d'interagir avec eIF4E. Toutefois il a été montré que la phosphorylation ne modifie pas la structure de 4E-BP. Une autre raison pourrait être une modification de la charge de 4E-BP qui entraînerait une répulsion électrostatique entre 4E-BP et eIF4E. Cette hypothèse a été étudiée et il s'est avéré qu'elle n'était pas valable (communication personnelle de P. Cormier).

La cascade enzymatique conduisant à la phosphorylation de 4E-BP implique la PI3 kinase (Phosphatidyl Inositol 3 kinase) et son effecteur la kinase sérine-thréonine AKT (revue dans Gingras et al., 1999b). Le rôle de cette PI3 kinase dans le contrôle des 4E-BPs a été montré dans de nombreuses circonstances. Par exemple, un traitement des cellules par la wortmaninne ou le LY294002 (Figure 9), deux inhibiteurs de la PI3 kinase, inhibent l'hyperphosphorylation de 4E-BP1 alors qu'au contraire une activation de la sous-unité catalytique de la PI3 kinase augmente cette phosphorylation (von Manteuffel et al., 1996).

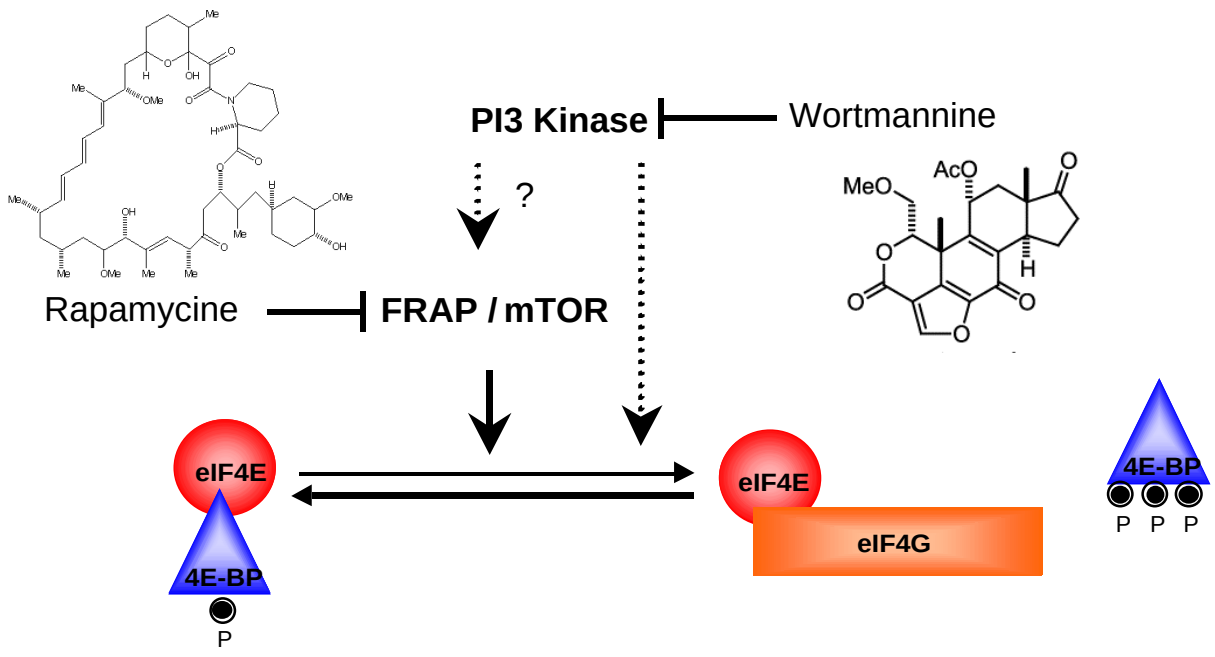


Figure 9 : La voie de régulation du répresseur de la traduction 4E-BP. La forme hypophosphorylée de 4E-BP séquestre eIF4E l'empêchant ainsi d'interagir avec eIF4G. Le taux de phosphorylation de 4E-BP est sous contrôle de la kinase FRAP / mTOR et de manière indirecte de la PI3 kinase. Ces deux kinases sont respectivement inhibées par la rapamycine et la wortmannine.

La phosphorylation de 4E-BP est aussi dépendante de la kinase FRAP / mTOR (FKBP12 and Rapamycin Associated Protein / mammalian Target Of Rapamycin) (revue dans Gingras et al., 2001). Cette kinase aussi connue sous le nom de RAFT1 (Rapamycin And 12 kDA FK506 binding protein Target 1) est un membre de la famille des PIK (Phosphoinositide Kinase-related) tout comme la PI3 kinase. La rapamycine (Figure 9), encore appelée sirolimus, est une drogue immunosuppressive issue d'un actinomycète *Streptomyces lygroscopicus* initialement isolé sur l'île de Pâques (Rapa Nui). Immunoprécipitée, la kinase FRAP / mTOR est capable de phosphoryler *in vitro* 4E-BP1, mais si l'on rajoute au milieu de réaction de la rapamycine associée à FKBP12, la phosphorylation est inhibée (Brunn et al., 1997).

De manière intéressante, nous avons montré qu'au cours de la fécondation chez l'oursin, la protéine 4E-BP est non seulement phosphorylée (Cormier et al., 2001) mais aussi rapidement dégradée (Salaun et al., 2003). Cette dégradation est sensible à la

rapamycine suggérant qu'elle est sous le contrôle de FRAP / mTOR. Ce processus de dégradation constitue une nouvelle voie de régulation du répresseur de la traduction via la voie TOR.

Des travaux ont montré que l'activité de FRAP / mTOR est suceptible d'être modulée par une nouvelle protéine appelée RAPTOR (Kim et al., 2002). Le rôle exact de cette protéine est encore inconnu mais il semblerait qu'elle agisse comme une protéine de "pontage" en créant un lien entre mTOR et 4E-BP (Hara et al., 2002) (Figure 10).

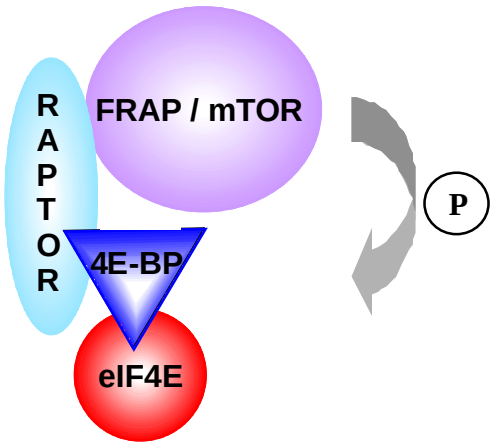


Figure 10 : La protéine RAPTOR permet le rapprochement entre le complexe eIF4E / 4E-BP et la kinase FRAP /mTOR. Ce rapprochement facilite la phosphorylation de 4E-BP par FRAP.

En contrôlant la phosphorylation de 4E-BP et par voie de conséquence son interaction avec eIF4E, FRAP / mTOR se pose donc comme une cible privilégiée dans le contrôle de l'initiation de la traduction. Néanmoins, les cascades enzymatiques conduisant à son activation (ou son inactivation) restent encore peu connues d'autant plus que l'hypothèse d'un contrôle de FRAP / mTOR par la PI3 kinase est encore très controversée. Dans cette optique, nous avons analysé l'implication de la PI3 kinase dans la régulation de 4E-BP chez l'oursin, par une approche pharmacologique (Salaun et al., 2004). Les résultats obtenus indiquent que la PI3 kinase exerce un très faible contrôle sur 4E-BP au cours de la fécondation chez l'oursin alimentant ainsi la controverse.

e) eIF4E-Transporter : 4E-T

4E-T est une protéine capable de s'associer à la partie dorsale d'eIF4E *via* le motif consensus YXXXXLϕ et qui permet ainsi le transport d'eIF4E du cytoplasme vers le noyau (Dostie et al., 2000). Une fois associé à eIF4E, 4E-T va s'associer avec l'importine α et β et va ainsi importer eIF4E dans le noyau (Figure 11).

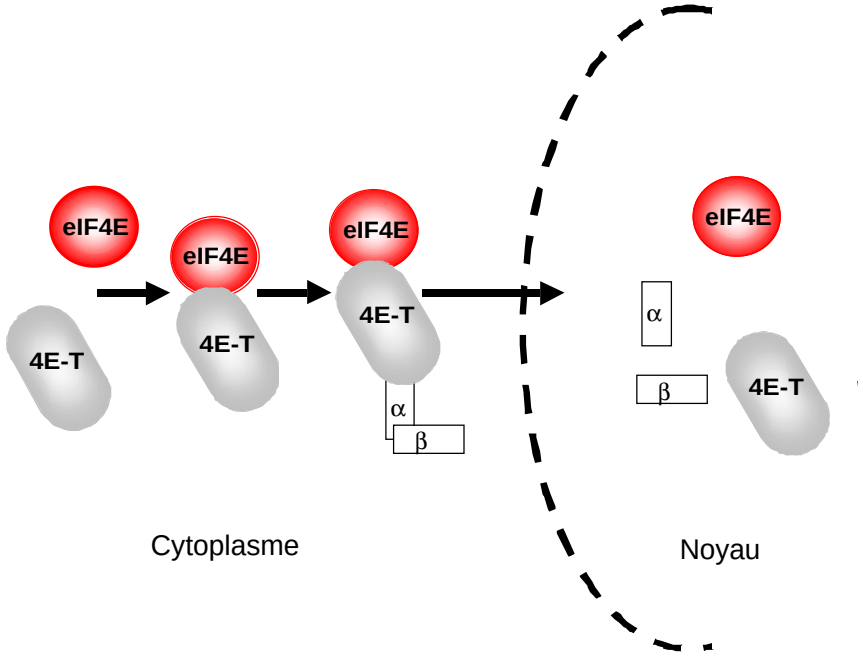


Figure 11 : 4E-T permet *via* l'importine α et β , le transfert d'eIF4E du cytoplasme vers le noyau d'après (Dostie et al., 2000).

Lorsque 4E-T est fixé à eIF4E, la formation du complexe eIF4F est réprimée. Ainsi, la surexpression de 4E-T dans des cellules HeLa inhibe la traduction cap-dépendante (Dostie et al., 2000). Aussi, lorsque eIF4E est localisé dans le noyau, celui-ci ne peut plus interagir avec les autres composants du complexe eIF4F qui restent cytoplasmiques.

La raison pour laquelle eIF4E est importé dans le noyau est à ce jour inconnue. Cependant, il a été démontré que le facteur eIF4E est responsable de l'exportation de l'ARNm codant pour la cycline D1 du noyau vers le cytoplasme (Rousseau et al., 1996).

C'est pourquoi, il se peut que l'internalisation de eIF4E dans le noyau, médiée par 4E-T, soit nécessaire pour que eIF4E puisse jouer son rôle de transporteur de messagers.

f) Autres eIF4E "binding protéin".

De récents travaux ont aussi montré que de nombreuses protéines comme Bicoïd (Niessing et al., 2002), CUP (Nelson et al., 2004; Wilhelm et al., 2003) ou encore PRH (proline-rich homeodomain protein) (Topisirovic et al., 2002) sont capables de s'associer à eIF4E *via* le motif consensus YXXXXLϕ. De manière intéressante, l'association avec ces protéines se traduit systématiquement par une répression de la traduction médiée par eIF4E (Bicoïd, Cup) ou une inhibition du rôle de transporteur de messager d'eIF4E (PRH). Chez l'oursin, il existe une forme haute de 4E-BP appellée H4E-BP (Heavy 4E-BP) qui bien que plus lourde (40 KDa) possède les même propriétés d'interaction avec eIF4E que 4E-BP (Salaun et al., soumis). Nous verrons dans le chapitre 3 que l'interaction d'eIF4E avec ces différentes protéines joue un rôle important dans les processus développementaux.

g) La maskine

Dans les ovocytes de xénope, la formation du complexe eIF4F est régulée par une autre protéine: la maskine (Figure 12). Elle est capable de s'associer à eIF4E et à la protéine CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein). Comme 4E-BP, la maskine possède le motif de reconnaissance pour eIF4E, avec pour différence un remplacement de la tyrosine par un résidu thréonine ce qui la rend moins affine que 4E-BP. La maskine associée à eIF4E empêche son interaction avec eIF4G et par conséquent inhibe la formation du complexe eIF4F maintenant ainsi les ARNm en état de dormance dans les ovocytes. Pendant la maturation méïotique, Aurora / Eg2 phosphoryle CPEB

(Mendez et al., 2000). Cette phosphorylation permet le recrutement de la protéine CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) sur le signal de polyadénylation (AAUAAA). La PAP (Poly(A) Polymérase) pourra alors s'associer à l'ARNm et allonger la queue poly (A) du messager (Groisman et al., 2000). Ceci entraîne le recrutement de PABP (Poly(A) Binding Protein) sur cette structure. La protéine eIF4G est alors capable de s'associer à PABP (Tarun et Sachs, 1997; Wakiyama et al., 2000) et le complexe ainsi formé chassera la maskine d'eIF4E déclenchant ainsi la traduction des ARNm (Groisman et al., 2002).

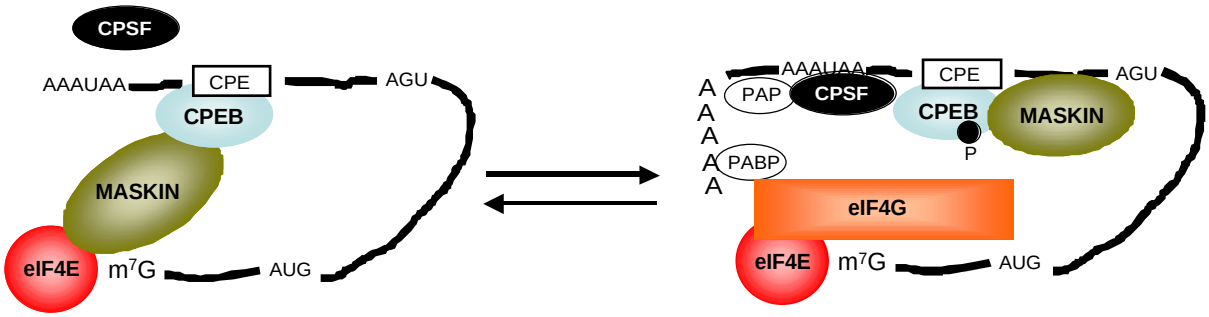


Figure 12 : Chez le xénope, la maskine associée à eIF4E empêche son interaction avec eIF4G. Cette association dépend de l'état de phosphorylation de CPEB (Groisman et al., 2002) (voir explications dans le texte).

Chapitre II : La traduction et le cycle cellulaire durant le développement embryonnaire de l'oursin

La plupart des études menées sur les facteurs d'initiation de la traduction est issue de l'utilisation de cellules en cultures. Ces cellules sont capables de répondre rapidement à des stimuli extérieurs généralement de nature hormonale, qui peuvent provoquer des modifications importantes de synthèse protéique. Bien que ce modèle ait apporté énormément d'informations sur le contrôle de la traduction, l'analyse de l'implication de la tradcution dans la production de protéines néosynthétisées n'est pas évidente. En effet, ces cellules étant nucléées, elles possèdent une activité transcriptionnelle interférant avec les processus traductionnels. Ces interférences peuvent être réduites par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription comme l'actinomycine D mais leurs effets secondaires peuvent perturber l'interprétation des résultats. D'autre part, l'utilisation des cellules en culture implique souvent un contexte d'étude assez éloigné de la réalité physiologique tant par la nature artificielle du stimulus que par l'environnement *in vitro* de la cellule.

Dans ce chapitre, nous exposerons comment et pourquoi l'utilisation du développement embryonnaire de l'oursin constitue un excellent modèle pour l'étude de l'initiation de la traduction et son implication dans le cycle cellulaire et ainsi que dans les processus développementaux.

I) Présentation de l'oursin *Sphaerechinus granularis*

L'oursin *Sphaerechinus granularis* est un invertébré marin Deuterostomien qui appartient à l'embranchement des échinodermes. Les oeufs d'oursin sont translucides et ont un diamètre d'environ 100 µM. Les oursins ont un mode de reproduction sexué et

gonochorique. La fécondation est externe et sans accouplement (Ridet et al, 1992). Au moment de la ponte, les oeufs et les spermatozoïdes sont expulsés et la fécondation se fait directement dans le milieu extérieur. Le spermatozoïde restaure la diploïdie et provoque l'activation de l'œuf qui se traduit par l'augmentation du métabolisme cellulaire ainsi que d'une forte augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cette vague calcique au moment de la fécondation est commune à toutes les espèces y compris les mammifères. Elle a pour origine la voie de signalisation de l'inositol triphosphate qui notamment déclenche un relargage important de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique et fait intervenir la PI3 kinase dont l'activité augmente considérablement à ce moment (De Nadai et al., 1998).

L'ovule d'oursin est entouré d'une enveloppe vitelline protégée par une gangue gélatineuse composée de mucopolysaccharides. A la fécondation, il y a une levée de l'enveloppe de fécondation qui est un des éléments nécessaire à la prévention de la polyspermie (Epel, 1990; Giudice et al., 1973).

Le jeune embryon va se diviser rapidement et de manière synchrone avec les autres embryons issus d'une même femelle lorsqu'ils sont fécondés ensemble. La première division s'effectue en 2 heures environ. Douze heures après fécondation, l'embryon est sous forme de blastula (400 cellules) et posséde en son centre une cavité appelée blastocœle. Cette cavité s'ouvrira par un orifice appelé blastopore qui sera à l'origine de l'anus. Aux environs de 46 heures, certaines cellules situées au niveau de ce blastopore pénètrent dans le blastocœle pour former l'archantéron (intestin primaire). Au bout de 72 heures, l'embryon se transforme en une larve appelée pluteus, suffisamment développée pour se nourrir et exister sous forme pélagique libre.

II) La reprise du cycle cellulaire chez *Sphaerechinus granularis*

Le cycle cellulaire est l'ensemble des processus par lesquels une cellule croît et se divise en deux cellules filles. Il est décrit comme une succession de quatre phases, la phase S (synthèse de l'ADN) et la phase M (ségrégation des chromosomes dupliqués dans les deux cellules filles) séparées par deux phases intermédiaires, G1 et G2 (revue dans Nurse, 1994).

Chez l'oursin, les ovocytes ont subit la maturation meïotique et sont naturellement bloqués en G1 de première mitose. La fécondation provoque une transition G1/S suivie d'une succession de divisions mitotiques rapides (transition S/M) caractéristiques du développement embryonnaire précoce (Figure 13).

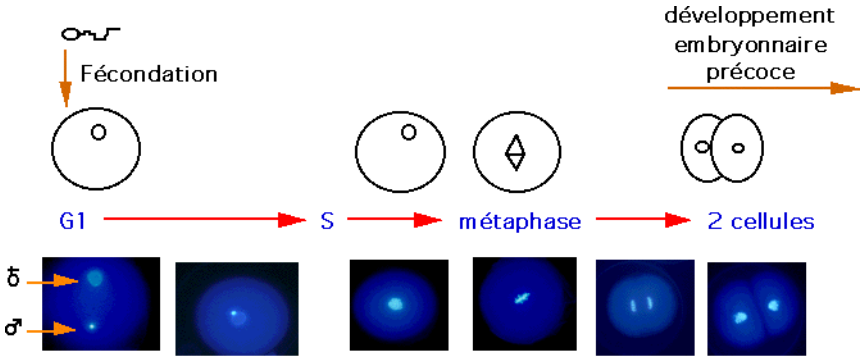


Figure 13 : Fécondation et premier cycle cellulaire mitotique chez l'oursin.
La fécondation de l'ovule d'oursin provoque une transition G1/S suivie d'une succession de divisions mitotiques rapides (S/M). Le cycle mitotique des chromosomes est suivi en microscopie à fluorescence après coloration de l'ADN au bisbenzamide.

Le retour des phases G1 et G2 se fait chez l'oursin à partir du stade de la blastula. Chez tous les organismes, les étapes du cycle cellulaire sont contrôlées par les CDKs (Cyclin Dependent Kinases) qui sont des sérine/thréonine protéines kinases impliquées dans la régulation de toute division cellulaire, méiotique ou mitotique, en association avec

leurs partenaires, les cyclines (revue dans Morgan, 1997). La transition G2/M est contrôlée par le MPF (Maturation Promoting Factor ou M-Phase Factor), constitué d'une sous-unité catalytique CDK1 et d'une sous-unité régulatrice la cycline B (revue dans Nurse, 1994) (Figure 14).

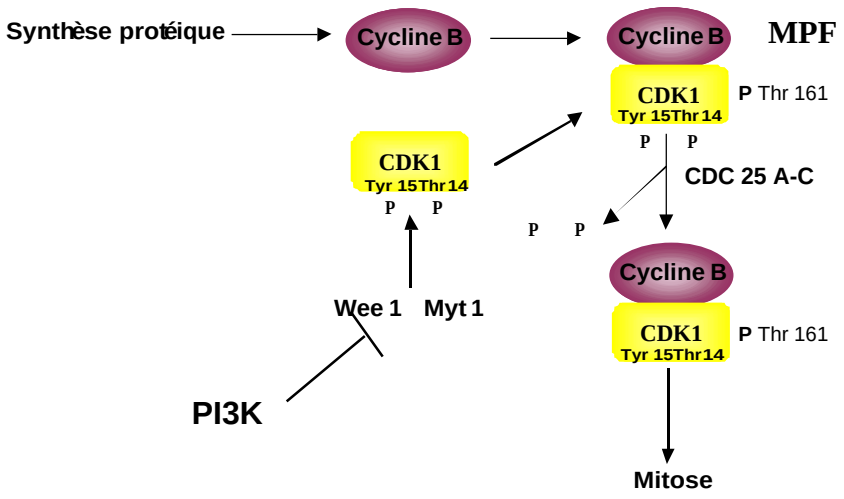


Figure 14 : Le MPF, composé de la cycline B et de CDK1, est indispensable pour la transition G2-M du cycle cellulaire. Lors de la première mitose, son activation dépend de la synthèse de cycline B et de la phosphorylation de la thréonine 161. Son activité est contrôlée par le degré de phosphorylation des residus Tyrosine 15 et Thréonine 14. Myt1, la kinase responsable de la phosphorylation en Tyr 15, est inhibée par l'activité PI3 kinase.

Une part importante de nos connaissances actuelles des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'activité du facteur MPF provient d'études de la maturation méiotique et de la fécondation chez les invertébrés marins (revue dans Kishimoto, 1996). Ainsi, le MPF a été purifié à partir d'ovocytes d'étoile de mer (Arion et al., 1988) et la cycline a été identifiée pour la première fois après fécondation chez la palourde et l'oursin (Evans et al., 1983). L'activité H1 kinase caractéristique du MPF précède la première division mitotique d'environ 20 minutes (Meijer et Pondaven, 1988). Cette activité est transitoire, elle est absente dans l'œuf non fécondé et augmente de façon brutale avant la mitose pour disparaître ensuite jusqu'à la prochaine mitose. Cette activité cyclique est dûe à la

composition intrinsèque du MPF. En effet, sa sous-unité régulatrice, la cycline B est une protéine dont la quantité varie au cours de la division mitotique. Cette variation se fait par l'intervention de phase de synthèse (en début de mitose) et de dégradation (pour la sortie de mitose). A l'inverse, la quantité de la sous-unité catalytique CDK1 reste constante. Dans l'œuf non fécondé, il n' y pas suffisement de cycline B, celle-ci doit donc être néosynthétisée pour pouvoir s'associer à la CDK1 qui ,elle, est déjà présente.

Toutefois, si l'association de la cycline B avec son partenaire CDK1 est nécessaire, elle n'est cependant pas suffisante pour activer le MPF. En effet, ce dernier est aussi régulé par un jeu de phosphorylations inhibitrices et de déphosphorylations activatrices (Figure 14). Les cibles des (dé)phosphorylations sont les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de CDK1. Lorsque ces résidus sont phosphorylés, l'activité du MPF est réprimée. La phosphorylation de ces deux résidus est catalysée par les kinases Wee-1 et Myt-1 et la déphosphorylation par les phosphatases cdc 25 A-C.

De manière intéressante, il a été montré que la kinase Myt1 est sous le contrôle de la PI3 kinase. L'activité PI3 kinase inhibe celle de Myt1 qui ne peut plus alors phosphoryler le résidu Tyr 15 de CDK1 (Okumura et al., 2002).

L'activité du MPF nécessite en outre la phosphorylation du résidu Thr 161. Cette phosphorylation est mise en place lors de la formation du complexe CDK1-cycline B et est catalysée par une sérine-thréonine kinase, la CAK, pour CDK-Activating-Kinase (Solomon et al., 1993; Poon et al., 1993).

III) La reprise de la synthèse protéique, analyse de l'augmentation de la traduction au cours de la fécondation chez *Sphaerechinus granularis*

La fécondation provoque une augmentation de 5 à 15 fois de la synthèse protéique globale chez l'oursin (Brandhorst, 1976; Epel, 1967; Humphreys, 1969). Cette

augmentation est surtout quantitative dans la mesure où le profil protéique global n'est pas modifié (Bedard et Brandhorst, 1983; Grainger et al., 1986). En présence d'émétine, un inhibiteur de l'élongation de la traduction, la première mitose est bloquée démontrant ainsi la nécessité de la synthèse de protéine pour la reprise du cycle cellulaire (Grainger et al., 1986; Hultin, 1961; Wagenaar, 1983). Parmi toutes les protéines néosynthétisées, la cycline B semble la seule protéine indispensable pour l'entrée en mitose (Arion et Meijer, 1989), les autres protéines préparant le développement ultérieur.

L'augmentation de la synthèse protéique au cours des premières mitoses se base uniquement sur des processus traductionnels. Si l'on féconde des oeufs en présence d'actinomycine D un inhibiteur de la transcription (Gross et Cousineau, 1964), ou des oeufs ayant subi une énucléation (Brachet et Denis, 1963; Denny et Tyler, 1964), le développement se déroule normalement jusqu'au stade 16 cellules indiquant donc que la transcription n'est pas requise pour les premières mitoses.

L'augmentation de la synthèse protéique repose sur deux mécanismes complexes : le recrutement des ARNm maternels dans les polysomes et l'activation de la machinerie de traduction. Ainsi, en parallèle d'une augmentation de la quantité d'ARNm dans les polysomes (Epel et al., 1974; Raft et al., 1981; Rinaldi et Monroy, 1969), on retrouve une augmentation des ARNms traduits de l'ordre de 10 à 15 fois (Humphreys, 1971). Ces observations impliquent le recrutement de plus de messagers par leur démasquage et une activation de l'initiation de la traduction.

Quels sont les acteurs moléculaires responsables de cette augmentation rapide de synthèse protéique ?

Les mécanismes qui transduisent le signal activateur du spermatozoïde vers la machinerie de traduction et du cycle cellulaire sont à ce jour très peu connus. L'augmentation du pH et du calcium intracellulaire semble être impliquée dans

l'augmentation de la synthèse protéique (Winkler et al., 1980). Un pH plus basique est capable d'induire une augmentation de 25 fois le recrutement des ARNms (Winkler et al., 1980) et déclenche la synthèse protéique dans des oeufs non fécondés (Grainger et al., 1979). Le calcium quant à lui pourrait servir de second messager et déclencher des cascades enzymatiques nécessaires pour le cycle cellulaire et la traduction.

Il a été montré que la synthèse de messagers exogènes est stimulée par addition de facteurs d'initiation purifiés (revue dans Hille et al., 1990). Ainsi l'addition d'eIF2B, celle de eIF2 (Winkler et al., 1985) ou celle de eIF4F (Huang et al., 1987) stimulent l'activité de la synthèse protéique *in vitro*. La modification de la synthèse des protéines est corrélée à la phosphorylation rapide d'eIF4E (Waltz et Lopo, 1987). Si cette phosphorylation est nécessaire, elle reste cependant insuffisante pour expliquer la stimulation de l'activité de la traduction qui croît graduellement après la fécondation. La stimulation de la synthèse protéique nécessite l'inactivation progressive d'un inhibiteur d'eIF4E présent dans l'œuf (Jagus et al., 1993). Cela implique que la synthèse protéique dans l'œuf est réprimée. Des résultats acquis par notre équipe, indiquent que la protéine 4E-BP est présente dans l'ovocyte d'oursin. Celle-ci est associée à eIF4E dans les oeufs non fécondés et cette association diminue rapidement après fécondation (Cormier et al., 2001).

IV) L'oursin : avantages et contraintes

Le développement embryonnaire précoce de l'oursin est un modèle expérimental adapté à l'étude des relations cycle / traduction pour de nombreuses raisons,

- Les premières divisions mitotiques sont synchrones, rapides et ne dépendent que de processus traductionnels.

-La synthèse protéique augmente rapidement indépendamment des phénomènes transcriptionnels et se base sur sur la traduction des ARNm d'origine maternels particulièrement abondants dans l'œuf.

-Ces caractéristiques rendent inutile l'utilisation de drogues pour synchroniser les cellules ou inhiber la transcription.

-D'un point de vue expérimental, l'abondance des gamètes femelles et mâles permet de réaliser des expériences de biochimie.

- La taille importante des oeufs et le fait qu'ils soient translucides permet de réaliser des expériences de micro-injection et de microscopie.

Toutefois, l'étude des facteurs d'initiation n'a quasiment jamais été faite chez l'oursin et il est difficile de travailler avec un modèle sur lequel il faut mettre au point la plupart des outils moléculaires.

Ces outils nous ont été fournis par le Professeur Nahum Sonenberg, bien qu'ils aient initialement été produits pour l'étude des facteurs d'initiation chez l'homme. Dans notre cas l'utilisation, de l'oursin nous oblige donc à travailler avec des outils hétérologues, avec toutes les difficultés que cela implique.

Il est cependant important de souligner que la force de l'utilisation de ce modèle repose sur une constatation simple : c'est la première fois que les facteurs d'initiation sont étudiés dans un contexte *in vivo*. En effet, La fécondation de l'oeuf d'oursin est réalisée au laboratoire dans des conditions extrêmement proches de celles du milieu naturel. Ainsi, en contraste avec l'utilisation de cellule en culture stimulée artificiellement, tous les résultats obtenus au cours de ma thèse appartiennent à un contexte physiologique bien précis : la fécondation. Cette réflexion permet de mieux appréhender le côté novateur des travaux présentés ici, d'autant plus que ceux-ci n'auraient pu, pour des raisons éthiques et pratiques évidentes, se dérouler chez l'humain par exemple.

Chapitre III : Implication des composants du complexe eIF4F dans le cycle cellulaire, le développement et la cancérogenèse

Nous avons analysé les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la synthèse protéique en réponse à la fécondation et leurs relations avec la reprise du cycle cellulaire. Nous nous sommes concentrés sur la machinerie de l'initiation, en particulier sur le complexe eIF4F et son implication au cours du développement embryonnaire de l'oursin.

L'utilisation de l'œuf d'oursin comme modèle expérimental permet d'étudier la première division mitotique, moment critique où une cellule passe d'un état de dormance à un état d'activité considérable qui génère des événements cellulaires cruciaux déterminant la viabilité même de l'individu naissant. Ce contexte particulier nous permet donc d'étudier non seulement l'implication de la synthèse protéique dans la première division mitotique de l'oursin, mais aussi toute la mise en place du processus de développement précoce lui aussi largement régulé par les protéines. Ainsi, ce contexte physiologique place la synthèse des protéines directement au cœur de ce processus complexe qu'est le début de la vie.

Dans ce chapitre, nous passerons en revue l'implication des composants du facteur eIF4F, ainsi que celle de sa voie de régulation, dans le contrôle du cycle cellulaire et du développement embryonnaire précoce. Nous soulignerons ainsi l'ubiquité de ces facteurs dans divers processus cellulaires fondamentaux et, dans une troisième partie, nous détaillerons l'implication du complexe eIF4F dans les processus cancéreux.

I) Le contrôle du cycle cellulaire et l'initiation de la synthèse protéique

La synthèse protéique est importante pour la régulation du cycle cellulaire (Cormier, 2000). Cette implication s'explique en partie par le fait que le cycle cellulaire requiert un

grand nombre de protéines devant être synthétisées à des moments précis. Dans les cellules de mammifères, une inhibition de 50 % du taux de synthèse protéique inhibe la synthèse d'ADN ayant normalement lieu à la suite d'une stimulation par des facteurs mitogènes (revue dans Zetterberg et al., 1995). À l'inverse, les cellules cancéreuses présentent généralement un taux de synthèse protéique anormalement élevé. D'autre part, chez le xénope, l'activation de CDK1 pendant la phase M conduit à des modifications quantitatives de la synthèse protéique (Kanki et Newport, 1991) impliquant une régulation au niveau de l'initiation de la traduction. Les facteurs de traduction de la synthèse protéique sont donc impliqués dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire (revue dans Clemens et Bommer, 1999).

1) eIF4E et cycle cellulaire

Le facteur d'initiation eIF4E joue un rôle prépondérant dans la synthèse protéique nécessaire au cycle cellulaire. La microinjection de ce facteur dans des cellules quiescentes NIH3T3 déclenche leur entrée en phase S du cycle (Smith et al., 1990). Ainsi, la phosphorylation d'eIF4E augmente au cours de la maturation de l'ovocyte d'étoile de mer induite par la 1-méthyladénine (Xu et al., 1993) et au cours de la maturation de l'ovocyte de xénope induite par la progestérone ou l'insuline (Morley et Pain, 1995). Cette phosphorylation permettrait la synthèse d'ARNm spécifiques, indispensables pour la maturation méiotique de l'œuf. De la même manière, chez le xénope, le démasquage d'eIF4E par la maskine est nécessaire pour la traduction de la cycline B1 et par conséquent l'accomplissement du cycle cellulaire (Cao et Richter, 2002). Aussi, nous avons montré que la dissociation du complexe eIF4E / 4E-BP lors de la première mitose de l'oursin est nécessaire pour la synthèse de cycline B (Salaun et al., 2003) et que

l'injection de peptide imitant le site de fixation de 4E-BP pour eIF4E retarde fortement le première division mitotique (Salaun et al., soumis).

L'idée que le facteur eIF4E puisse contrôler la reprise du cycle cellulaire est corroborée par de nombreuses autres observations. Ainsi chez la levure, le gène cdc33, codant pour l'homologue d'eIF4E (Brenner et al., 1988), intervient dans le contrôle de la transition G1 / S en régulant spécifiquement la production de la cycline CLN3 lors de la phase G1 (Danaie et al., 1999). De la même manière, la libération d'eIF4E ou de protéines inhibitrices de la traduction, permet l'initiation de la synthèse de cycline B nécessaire à l'activation de CDK1 au cours de la division mitotique dans l'embryon de xénope (Groisman et al., 2002).

eIF4E joue aussi un rôle majeur pour l'accomplissement de la phase S du cycle cellulaire (Abid et al., 1999). En effet, il a été montré que dans des cellules ovariennes de hamster surexprimant eIF4E, la phase S du cycle est considérablement réduite. Cette altération du cycle, s'accompagne de la surabondance de la ribonucléotide réductase 2 (RNR2), enzyme régulant la production des dNTPs nécessaire à la réplication de l'ADN. Ainsi eIF4E controlerait la réplication de l'ADN durant la phase S du cycle en déterminant la quantité de protéines RNR2 traduites (Abid et al., 1999).

La synthèse de cycline D1 est elle aussi fortement influencée par le taux d'eIF4E à en juger par le fait que des cellules surexprimant ce facteur ont un taux de cycline D1 très élevé (Rosenwald et al., 1995). Néanmoins, il semblerait que cette augmentation de cycline ne soit pas due à l'activité traductionnelle d'eIF4E mais à sa capacité à transporter l'ARNm de la cycline D1 du noyau vers le cytoplasme (Rosenwald et al., 1995).

2) eIF4G et le cycle cellulaire

Le facteur eIF4G est lui aussi impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la présence et l'activité d'eIF4G sont requises pour la transition G1 / S (Berset et al., 1998) et à l'inverse sa dégradation est nécessaire pour permettre aux cellules d'entrer dans une phase de quiescence Go. De plus, il a été montré que chez le xénope, eIF4G était requis pour le recrutement poly(A)-dépendant de plusieurs ARNm maternels indispensables à la progression du cycle cellulaire lors de la maturation méiotique parmi lesquels est présente la cycline B1. Ainsi, l'injection de protéines mutantes eIF4G ,incapable de s'associer avec PABP, dans des ovocytes de xénope empêche la maturation méïotique induite par la progestérone (Wakiyama et al., 2000). De la même l'injection de peptide imitant le site de fixation d'eIF4G pour eIF4E, retarde fortement la première division mitotique de l'oursin (Salaun et al., Article 5 en préparation).

3) Le contrôle de la machinerie de traduction durant le cycle cellulaire

De manière intéressante, les composants du cycle cellulaire peuvent réguler la machinerie de traduction. Ainsi, eIF4E est déphosphorylé pendant la phase M du cycle cellulaire (revue dans Pyronnet et Sonenberg, 2001). Cette déphosphorylation viendrait du fait que 4E-BP se réassocie à eIF4E durant cette phase du cycle. Cette association l'empêcherait alors eIF4E d'interagir avec eIF4G, responsable du rapprochement entre eIF4E et sa kinase, MNK1.

Cette hypothèse intéressante n'en est pas pour le moins très controversée dans la mesure où une autre étude démontre que la protéine 4E-BP est un substrat du complexe CDK1 / cycline B et est, par voie de conséquence, fortement phosphorylée en cours de mitose et donc parfaitement incapable de s'associer à eIF4E (Heesom et al., 2001).

Une autre interaction entre CDK1 et un composant du complexe eIF4F a été décrite chez *Arabidopsis thaliana*. Cette étude démontre que le facteur eIF4A est associé à CDKA (l'homologue de CDK1 chez *Arabidopsis*) et que le complexe ainsi formé est présent dans les cellules ayant une forte activité proliférative (Hutchins et al., 2004).

4) Implications de la voie FRAP / mTOR dans le contrôle du cycle cellulaire

Le facteur eIF4F et ses composants sont donc impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. La voie de signalisation FRAP / mTOR, qui régule la formation du complexe eIF4F pourrait donc jouer un rôle important au niveau du déroulement du cycle cellulaire. Ainsi, un traitement par la rapamycine, un inhibiteur de FRAP / mTOR arrête la plupart des cellules de mammifères et de levures au stade G1 et retarde donc la progression du cycle cellulaire. Ce résultat indique que la kinase FRAP / mTOR contrôle la transition G1 / S dans les cellules de mammifères (Fingar et al., 2004; revue dans Gingras et al., 2001). Aussi, des cellules de levures devenues déficientes en kinase FRAP / mTOR présentent les caractéristiques de cellules bloquées en G1. Ce blocage du cycle est corrélé avec une déficience en cycline CLN3, responsable de la transition G1 / S (Barbet et al., 1996). Il a été montré dans ce modèle que la progression du cycle cellulaire, nécessite un taux de croissance cellulaire suffisant (Johnston et al., 1977) et que FRAP / mTOR contrôle cette phase de croissance (Fingar et al., 2002). Par conséquent, on ne peut exclure que le contrôle de FRAP / mTOR sur le cycle cellulaire ne soit que la conséquence de son contrôle sur les mécanismes de croissance cellulaire.

De manière surprenante, il a aussi été montré que FRAP / mTOR contrôle la structure des microtubules. En effet, un traitement à la rapamycine cause de sévères anomalies morphologiques du réseau microtubulaire dans les cellules mammaliennes (Choi et al., 2000). Elle perturbre aussi très fortement la mise en place du réseau

microtubulaire lors de la première division mitotique de l'oursin (travaux en cours au laboratoire).

Ainsi FRAP / mTOR et le complexe d'inititation eIF4EF semblent être fortement impliqués dans le processus du cycle cellulaire, notamment au niveau de la transition G1 / S. Ces protéines et leur voie d'activation constituent donc un lien entre le cycle cellulaire et la synthèse protéique.

II) eIF4F et le développement embryonnaire

Chez la plupart des animaux, le développement précoce se déroule indépendamment des phénomènes transcriptionnels. Les molécules accumulées pendant l'ovogenèse sont nombreuses, ARNm et protéines compris. De ce fait, la régulation du développement à ce stade est totalement dépendante du cytoplasme maternel plutôt que du noyau du zygote.

Les ARN présents dans l'œuf avant fécondation, et donc appelés ARNm maternels, jouent un rôle déterminant dans le contrôle du développement embryonnaire. Les embryons présentent donc une forte activité post-transcriptionnelle qui contrôle la stabilité, la localisation et bien entendue la traduction des ARNm.

Dans ce chapitre, nous allons faire le point sur le rôle que jouent les composants du complexe eIF4F et leur voie de régulation dans les processus post-transcriptionnels impliqués dans l'embryogenése. Nous verrons de plus, que ce rôle ne se limite pas à une activité traductionnelle.

1) eIF4F et développement embryonnaire

La régulation de la traduction est vitale que ce soit pour le développement ou pour la croissance des cellules somatiques (revue dans Clemens et Bommer, 1999; revue dans Saffman et Lasko, 1999). Comme nous l'avons vu précédemment, la fécondation chez l'oursin déclenche une synthèse protéique très importante nécessaire au bon déroulement des premières divisions mitotiques. Il est admis que le facteur eIF4E est une protéine déterminante pour la synthèse des protéines mais aussi pour la division des cellules (revue dans Rhoads et al., 1993; Sonenberg, 1996).

Chez la drosophile, la mutation de la serine 251 d'eIF4E (l'équivalent de la serine 209, site principal de phosphorylation d'eIF4E chez les mammifères) (Whalen et al., 1996) entraîne un retard important dans le développement des ailes de l'animal. Lorsque le gène codant pour eIF4E est totalement éteint, l'arrêt de la croissance se fait durant le stade larvaire suggérant qu'eIF4E exerce une action fondamentale pour la croissance et le développement des organismes multicellulaires (Lachance et al., 2002). eIF4E est aussi indispensable pour le développement des embryons de mammifères puisque lors de la prolifération des hépatocytes des embryons de souris, le facteur d'initiation est activé parralèlement à un faible taux de 4E-BP1 (Anand et al., 2002).

De la même manière chez *Caenorhabditis elegans* il a été montré que le blocage par ARN interférence de l'expression des différentes isoformes d'eIF4E existantes chez cet animal entraîne la mort des jeunes embryons (Keiper et al., 2000).

eIF4E n'est pas le seul composant de eIF4F qui soit important pour le développement embryonnaire. Les deux autres facteurs, eIF4G et eIF4A, sont eux aussi nécessaires à l'embryogenèse. Par exemple, l'élimination de eIF4G chez *Caenorhabditis elegans* entraîne un arrêt du développement ainsi qu'une atrophie des cellules intestinales (Long et al., 2002). Aussi la mutation d'eIF4A chez la drosophile arrête le développement

embryonnaire. De plus, chez la drosophile, le produit du gène VASA, homologue de eIF4A (Liang et al., 1994), contrôle spécifiquement la traduction de *nanos* (une protéine ayant un rôle dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'embryon) pendant le développement (revue dans Curtis et al., 1995).

2) eIF4A et eIF4E régule la traduction de manière tissus spécifiques

Chez *Caenorhabditis elegans*, l'isoforme de eIF4E : IFE1 semble être requis pour la spermatogenèse. En effet, le blocage de l'expression du gène ife-1 (codant pour IFE1) entraîne l'absence de spermatozoïdes fonctionnels (Amiri et al., 2001). De manière intéressante, la protéine IFE1 ainsi que son ARNm sont présents en forte quantité dans les cellules germinales supposant que eIF4E puisse agir comme un activateur de la synthèse protéique de manière "tissu spécifique" (Amiri et al., 2001).

Cette idée que les facteurs d'initiation puisse agir sélectivement en fonction des tissus a été documentée dans d'autres systèmes. Ainsi, dans l'embryon de xénope, la surexpression d'eIF4E dans les cellules à l'origine de l'épiderme induit leur différenciation en cellules mésodermiques (Klein et Melton, 1994). Le taux élevé d'eIF4E permettrait la traduction d'ARNm codant préférentiellement pour des facteurs mésodermiques.

eIF4E régulerait donc la synthèse de messagers en fonction des tissus mais aussi du temps puisque la traduction des ARNm codant pour les facteurs mésodermiques n'aurait lieu qu'au moment où ceux-ci sont requis (Klein et Melton, 1994).

eIF4A agit lui aussi de manière sélective en fonction du type cellulaire au cours du développement. Chez le xénope, une isoforme de eIF4A : XeiF4AIII est indispensable pour la formation des tissus ectodermiques et présente un profil d'expression variable au cours de l'embryogènese (Weinstein et al., 1997).

Ainsi, les facteurs d'initiation eIF4E et eIF4A semblent être spécifiques de certains tissus au cours du développement en permettant la synthèse d'ARNm indispensables à certains types de différenciation. La manière dont se déroule cette synthèse différentielle est à ce jour peu connue mais réside semble t-il dans l'activité intrinsèque de ces facteurs à savoir un rôle d'hélicase pour eIF4A et un rôle d'association à la coiffe m^7GTP, et à eIF4G, pour eIF4E.

3) eIF4E et eIF4E "binding protein" : contrôle spatial et temporel de l'embryogenèse

De récents travaux donnent un nouveau rôle physiologique à eIF4E par son interaction avec différentes protéines à homéodomaines impliquées dans le développement et possédant le motif consensus YXXXXLϕ . Topisirovic et collaborateurs ont recherché le motif YXXXXLϕ dans 803 homéoprotéines présentes dans la banque Swissprot (Topisirovic et al., 2003). 199 d'entre elles possèdent au moins une fois ce motif indiquant donc que de nombreuses protéines à homéo-domaines sont capables de s'associer à eIF4E.

La protéine Bicoïd fait partie de ces homéoprotéines et agit comme un répresseur de la traduction de l'ARNm *caudal* dans la région antérieure de l'embryon de drosophile (Rivera-Pomar et al., 1995). Une étude récente a montré que la protéine Bicoïd possède le motif YXXXXLϕ et est capable de s'associer *in vitro* avec le facteur eIF4E, cette association étant indispensable pour la répression de la traduction des ARNm *caudal* (Niessing et al., 2002). Les auteurs de ces travaux supposent que Bicoïd agit comme un répresseur de la traduction en séquestrant eIF4E comme le fait 4E-BP. Cette séquestration se ferait de manière spécifique dans la partie antérieure de l'embryon. Cette répression sélective place donc à nouveau eIF4E au centre du processus de

différenciation cellulaire, non plus par son activité mais par son inhibition sélective. Il est intéressant de noter que le principal répresseur de eIF4E, 4E-BP, semble lui aussi jouer un rôle déterminant dans le contrôle du développement puisque sa présence est régulée au cours de l'embryogenèse de l'oursin. En effet 4E-BP est présent dans les ovules, dégradé fortement au moment de la fécondation et réapparaît au niveau du stade pré blastula (Salaun et al., soumis)

Chez la drosophile la protéine CUP est capable de s'associer avec le facteur eIF4E (Nelson et al., 2004; Wilhelm et al., 2003) via le motif YXXXXLϕ et orchestre ainsi la répression de la traduction. Dans ce système, eIF4E permet le transport du messager *oskar* vers le pôle postérieur de l'animal. Cup réprime la traduction d'*oskar* tant que celui-ci n'atteint pas son lieu d'expression (Figure 15). A ce moment CUP se sépare de eIF4E qui peut alors s'associer à eIF4G et initier la traduction d'*oskar*.

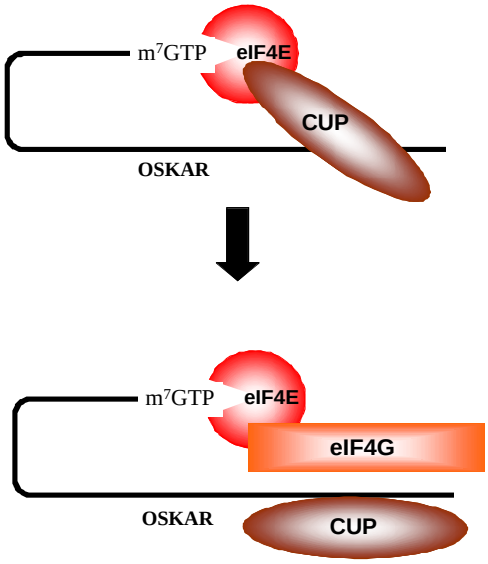


Figure 15 : L'association eIF4E-CUP permet le transport du messager *oskar* jusqu'au pôle postérieur. CUP réprime la traduction d'*oskar* en s'associant à eIF4E pendant son transport. Lorsque le messager a atteint son lieu d'expression, CUP se dissocie d'eIF4E qui peut alors fomer le complexe eIF4F et traduire *oskar* (Wilhelm et al., 2003).

L'implication d'eIF4E dans les processus développementaux réside aussi dans sa capacité à assurer le transport d'ARNm spécifique du noyau vers le cytoplasme

(Rousseau et al., 1996). Ainsi il a été montré que dans les cellules myéloïdes, la protéine PRH (proline-rich homeodomain protein) possède le site consensus de fixation à eIF4E (Topisirovic et al., 2002). Cette protéine, exprimée sélectivement dans certains types cellulaires, se fixe à eIF4E et l'empêche ainsi de jouer son rôle de transporteur d'ARNm et notamment celui de la cycline D1 (Topisirovic et al., 2002).

4) Implication de la voie FRAP / mTOR dans le développement embryonnaire

La kinase, FRAP / mTOR, est elle aussi impliquée dans les processus développementaux. Ainsi, des embryons de souris dans lesquels la protéine FRAP / mTOR est mutée, arrêtent leur développement environ 10 jours postcoïtum sans avoir formé de vésicules télencéphaliques (Hentges et al., 2001). De la même manière, l'inhibition de FRAP / mTOR par RNA interférence chez *C.elegans* provoque une atrophie des cellules intestinales (Long et al., 2002) et la même expérience chez la drosophile provoque une réduction importante de la croissance des tissus endoréplicatifs telles que les glandes salivaires (Oldham et al., 2000).

L'ensemble de ces résultats indiquent donc que la voie TOR est impliquée dans les processus de développement et suggère que cette implication est en relation avec le contrôle du facteur eIF4F. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il a été prouvé chez la souris que la rapamycine possédait des propriétés tératogènes puissantes (Hentges et al., 2001).

Ainsi, ces résultats tendent à démontrer que la protéine eIF4E, en plus d'être un facteur d'initiation générale, est aussi capable, *via* son interaction avec d'autres protéines, de réguler de manière spatio-temporelle la traduction de messagers spécifiques. Devant le nombre croissant de protéines nouvellement identifiées possédant le motif YXXXXLϕ et

impliquées dans les mécanismes d'embryogénèse, eIF4E et plus largement le complexe eIF4F se posent aujourd'hui comme de véritables régulateurs directs du développement.

III) eIF4F et Cancer : Implication et espoir thérapeutique

Les cellules transformées présentent généralement un taux de synthèse protéique supérieur aux cellules saines (Heys et al., 1991). Les acteurs moléculaires de cette synthèse ainsi que leurs régulateurs peuvent donc être considérés comme autant de cibles potentielles pour la cancérogènese. Parmi les protéines contrôlant la synthèse protéique, les facteurs d'initiation sont ceux que l'on retrouve le plus souvent dérégulés dans les cellules cancéreuses.

De tous les facteurs d'initiation, eIF4E est le plus impliqué dans les cancers (revue dans Watkins et Norbury, 2002). L'activité oncogénique de ce facteur de traduction a été tout d'abord suggérée par la découverte que sa surexpression conduisait à la transformation de fibroblastes NIH-3T3 (Lazaris-Karatzas et al., 1990) et amplifiait de manière importante la morphologie néoplasique des cellules Hela. Depuis, un taux élevé d'eIF4E a été décrit dans de nombreux cancers comme celui du côlon ou du sein (revue dans De Benedetti et Harris, 1999).

1) eIF4E est une protéine oncogénique

La surexpression d'eIF4E active l'oncogène *ras* et coopère avec deux autres oncogènes : E1A des adénovirus et *v-myc* pour la transformation de fibroblastes d'embryons de souris (Lazaris-Karatzas et Sonenberg, 1992). Ce sont là des caractéristiques classiques correspondant à la définition d'un oncogène. Dans les lignées cellulaires CHO et CREF, la surexpression d'eIF4E induit la transformation de ces cellules et déclenche une prolifération anarchique (Lazaris-Karatzas et al., 1990). De manière intéressante, l'injection d'ARNm anti-sens d'eIF4E dans ces cellules est capable de

reverser le phénotype transformé, confirmant ainsi la forte implication de ce facteur d'initiation dans la tumorigenèse. Aussi, l'expression de d'eIF4E devient constitutive et indépendante des facteurs extracellulaires dans des cellules tumorales en culture (Rosenwald et al., 1995). Ces résultats indiquent clairement que le facteur d'initiation eIF4E joue un rôle clé dans la tumorigenèse.

La surexpression d'eIF4E comme cause de transformation s'explique par son effet sur les ARNm ayant des extrémités 5' UTR longues et structurées (Koromilas et al., 1992). La traduction de ces ARNm est moins facile que celle des ARNm possédant une extrémité 5' non structurée car elle requiert une forte activité d'hélicase pour pouvoir dérouler ces structures et les rendre plus accessibles à la machinerie de traduction. Parmi ces transcripts, on retrouve de nombreux produits de proto-oncogènes (revue dans Watkins et Norbury, 2002) impliqués dans la croissance cellulaire ou la prolifération en contraste avec les ARNm codant pour des protéines dites de ménage qui eux présentent rarement des extrémités 5' UTR structurées (revue dans Sonenberg, 1994). L'activité hélicase est assumée par le facteur eIF4A, or la fixation de celui-ci aux ARNm dépend directement de l'association d'eIF4E avec la coiffe m^7GTP des ARNm. Ainsi, ces messagers seront plus facilement traduits dans des cellules qui surexpriment eIF4E. La cycline D1, c-Myc, RNR2, ODC, FGF-2 et VGF sont autant de protéines dont la synthèse est augmentée conjointement à une abondance du facteur eIF4E. De telles protéines sont normalement traduites avec parcimonie en fonction du contexte environnemental et du type cellulaire mais avec la sur-abondance d'eIF4E, cette régulation est perdue.

Parallèlement à l'augmentation de la traduction de certains messagers, il a été montré qu'eIF4E possède des propriétés anti-apoptotiques (Lazaris-Karatzas et al., 1990; Polunovsky et al., 2000). Une surexpression d'eIF4E serait donc susceptible d'empêcher

l'apoptose d'une cellule en voie de transformation et de participer ainsi à la formation d'une tumeur.

L'ensemble de ces résultats indique clairement que l'activité d'eIF4E peut influencer de manière dramatique non seulement la formation des tumeurs mais aussi leur croissance et leur capacité invasive. Dans ce cadre, la quantité d'eIF4E d'une cellule peut être considérée comme un marqueur fiable d'un phénotype cancéreux. Ainsi, dans les stades I et III des carcinomes du poumon, une surexpression d'eIF4E est le signe de la forte aggressivité de la tumeur (Li et al., 2002).

2) Implication d'eIF4G et eIF4A dans les pathologies cancéreuses

Les autres composants du facteur eIF4F sont aussi impliqués dans le processus de cancérisation. Une surexpression d'eIF4G cause la transformation maligne de cellules NIH 3T3 et augmente à la fois la synthèse coiffe dépendante et coiffe indépendante dans les cellules FM3A (Hayashi et al., 2000). eIF4G2 a été identifié comme un facteur de cancérisation causant la surexpression de l'enzyme APOBEC-1 (Yamanaka et al., 1997). eIF4G agirait par compétition avec 4E-BP activant ainsi la traduction coiffe dépendante. Un excès d'eIF4G peut aussi s'associer directement avec les motifs IRES des messagers et augmenter leur traduction. De plus, le messager d'eIF4G possédant lui-même un motif IRES pourrait assurer sa propre surexpression. Toutefois, l'augmentation de l'expression d'eIF4G n'est pas une caractéristique fréquente des tumeurs humaines, bien que sa surexpression soit rapportée dans 30 % des carcinomes du poumon (Brass et al., 1997).

L'implication directe du facteur eIF4A dans la cancérogenèse est moins connue mais on retrouve une surexpression de cette protéine dans des cas d'hépatocarcinomes et dans certains mélanomes (Eberle et al., 1997).

3) Quels sont les moyens thérapeutiques envisageables pour lutter contre les cancers impliquant une dérégulation d'eIF4F ?

De part la forte implication des facteurs d'initiation dans les processus cancéreux, les kinases régulant leur activité sont des cibles privilégiées pour les thérapies anticancéreuses. La famille des PI3 kinases intervient en tant qu'intermédiaire dans la transmission des signaux mitogéniques et de survie mais est aussi indispensable à l'effet transformant de plusieurs oncogènes à activité tyrosine kinase (revue dans Vanhaesebroeck et al., 2001). Ainsi, certaines tumeurs sont associées à une activation ou a une surexpression de cette kinase. Plusieurs enzymes stimulées en aval de la PI3 kinase, et notamment le proto-oncogène Akt/pKB, sont également surexprimées et/ou activées dans divers types de cancer humains.

La voie Akt / PKB est contrôlée par les seconds messagers lipidiques (dont l'inositol tri phosphate PIP3) produits par la PI3-kinase. Le gène *PTEN*, considéré comme un suppresseur de tumeur (revue dans Simpson et Parsons, 2001), code pour une enzyme capable d'empêcher la formation de certains de ces seconds messagers faisant ainsi de PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) une PI3-phosphatase inhibant l'activité de la PI3-kinase (Figure 16).

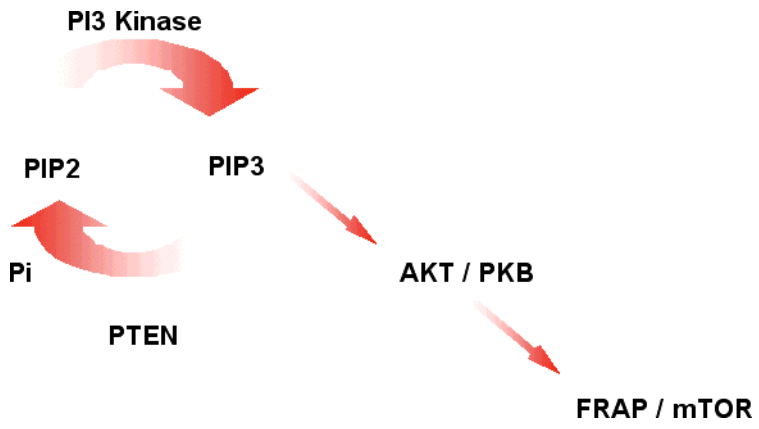


Figure 16 : La balance PTEN / PI3 Kinase contrôle la production de PIP3 à l'origine de l'activation de la voie Akt / PKB.

Dans des cellules de souris déficientes en PTEN, Akt est activée, en corrélation avec une surexpression, phosphorylation et activation de la kinase FRAP / mTOR. Ces cellules présentent également une phosphorylation de 4E-BP1 corrélée à une prolifération accrue. De faibles doses de CCI-779, un inhibiteur de FRAP / mTOR, induisent une diminution significative de la phosphorylation de 4E-BP1 *in vitro* et *in vivo* sans affecter l'activité d'Akt (Shi et al., 2002). Cet effet est associé à un arrêt de la progression tumorale. Ces résultats suggèrent que les cellules déficientes en PTEN deviennent dépendantes de la voie PI 3-kinase pour proliférer, ce qui augmente leur sensibilité au CCI-779 qui peut alors être utilisé efficacement à de faibles doses sans toxicité apparente pour les cellules normales. Ces résultats placent la kinase mTOR dans la voie de signalisation conduisant au développement de tumeurs chez les souris déficientes en PTEN.

FRAP / mTOR apparaît donc comme une cible pharmacologique primordiale dans le traitement de tumeurs dans lesquelles la balance PI 3-kinase/PTEN est modifiée en faveur de la PI 3-kinase. FRAP / mTOR, par exemple, est phosphorylée constitutivement dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate ayant des mutations inactivatrices dans PTEN ou surexprimant AKT3 (Sekulic et al., 2000). Un diagnostic fondé sur l'analyse des mutations de PTEN ainsi que sur le niveau de phosphorylation de protéines impliquées dans la voie PI 3-kinase/PTEN pourrait permettre d'identifier les patients susceptibles de répondre au CCI-779. L'association du CCI-779 et d'un agent cytotoxique pourrait représenter une nouvelle approche dans le traitement de certains cancers (Mills et al., 2001).

Les kinases contrôlant les facteurs d'initiation ne sont pas les seules cibles potentielles pour le traitement cancéreux. Ainsi, de nouveaux axes thérapeutiques tendent à viser directement ces facteurs et leurs composants. L'utilisation d'ARNm anti-sens

d'eIF4A permet de diminuer le taux de prolifération de certains mélanomes (Eberle et al., 1997). De même, les anti-sens d'eIF4E peuvent réduire l'accroissement d'une tumeur (Rinker-Schaeffer et al., 1993) ou encore l'expression de certains facteurs d'angiogenèse (DeFatta et al., 2000).

Aussi, de petites molécules inhibitrices capables d'interagir avec le site de liaison à eIF4G et 4E-BP situé sur eIF4E ont des capacités pro-apoptotiques et peuvent permettrent de cibler certains cancers où eIF4E est surexprimé. Ainsi, la surexpression de 4E-BP dans des cellules malignes est capable de reverser le phénotype cancéreux induit par la surexpression d'eIF4E (Rousseau et al., 1996). De plus, les cellules de tumeurs gastro-intestinales présentent un faible ratio 4E-BP / eIF4E, associé à une forte résistance à la rapamycine suggérant ainsi que la protéine 4E-BP pourrait agir comme un suppresseur de tumeur (Dilling et al., 2002).

Les cellules cancéreuses présentent donc une forte activité traductionnelle indispensable à leur survie. Par conséquent, les composants de cette machinerie, comme eIF4E, et ses régulateurs, comme FRAP / mTOR, représentent des cibles thérapeutiques privilégiées (revue dans Cormier et al., 2003). Les inhibiteurs de FRAP / mTOR comme le CCI-779 sont actuellement en phase I d’essai clinique dans divers cancers. Cependant les raisons pour lesquelles certaines cellules cancéreuses sont plus ou moins sensibles aux drogues ne sont pas connues et ce malgré leurs propriétés anti-cancéreuses évidentes. C'est pourquoi la poursuite des études sur les facteurs d'initiation et leurs régulations reste primordiale afin de mieux comprendre leurs implications dans la tumorigenèse.

RESULTATS

I) Analyse de la dynamique du complexe eIF4/4E-BP au cours de la première division mitotique de l'oursin

Article 1 : **Salaun, P**., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., and Cormier, P. (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev Biol* 255, 428-39.

Dans ce premier article, nous avons étudié la dynamique du complexe eIF4E/4E-BP au cours de la première mitose de l'oursin.

Cormier et collaborateurs en 2001 ont démontré que le facteur eIF4E est présent dans les oeufs d'oursin et associé à son répresseur 4E-BP dans les oeufs non fécondés. Les auteurs ont aussi montré que cette association diminue fortement après fécondation.

La rapamycine est un inhibiteur spécifique de la kinase FRAP / mTOR. Cette kinase est supposée contrôler l'association entre eIF4E et 4E-BP chez les mammifères.

Dans l'article 1, nous avons utilisé cette drogue afin d'analyser dans un premier temps, son impact sur le complexe eIF4E/4E-BP et dans un second temps, les conséquences d'une éventuelle inhibition de la dissociation du complexe sur le cycle cellulaire et la synthèse protéique.

Résultats :

La fécondation déclenche chez l'oursin la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP mais aussi la dégradation du répresseur 4E-BP (article 1, figure 2). Cette dégradation est rapide et drastique car le suivi de la quantité de 4E-BP en western blot devient quasiment impossible au-delà de 30 minutes après fécondation.

La rapamycine ajoutée 10 minutes avant fécondation, inhibe la dissociation et la dégradation (article 1, figure 3) ainsi que la reprise de la synthèse protéique (article 1, figure 4).

Ainsi, cette drogue retarde le déroulement de la première division mitotique sans pour autant perturber la fécondation (article 1, figure 5). Ce retard de division est associé à une inhibition de l'activation du complexe CDK1 / Cycline B ainsi qu'un délai dans la néosynthèse de la cycline B (article 1, figure 7).

L'action inhibitrice de la rapamycine n'est observée que lorsque celle-ci est ajoutée entre 0 et 30 minutes post-fécondation. Au-delà, la drogue n'inhibe plus le déroulement de la première division mitotique (article 1, figure 6).

Analyse des résultats :

Ces résultats constituent la première démonstration qu'une dégradation de 4E-BP existe dans un contexte physiologique. Ce mécanisme original est un nouveau mode de régulation du complexe eIF4E/4E-BP. Ce mécanisme de dégradation tout comme la dissociation du complexe est sensible à la rapamycine, suggérant ainsi qu'il existe chez l'oursin, un homologue de la kinase FRAP / mTOR contrôlant la dynamique du complexe eIF4E/4E-BP.

De manière intéressante, la reprise de la synthèse protéique est elle aussi fortement inhibée par la rapamycine. Ce résultat suggère que 4E-BP est un régulateur de la synthèse protéique chez l'oursin. Son association à eIF4E empêcherait cette synthèse et au contraire, sa dissociation et/ou sa dégradation, seraient indispensables pour l'activation de la synthèse protéique.

Aussi, la néosynthèse de cycline B est fortement retardée par la rapamycine. Ce résultat semble indiquer que la traduction du messager codant pour la cycline B est

dépendante de la disponibilité du facteur eIF4E, lui-même sous contrôle de son répresseur direct 4E-BP. Ainsi, chez l'oursin, le cycle cellulaire et la synthèse protéique sont intimement liés au cours de la première division mitotique puisque 4E-BP, le répresseur de la traduction, régulerait l'activation du complexe CDK1 / cycline B en contrôlant la néosynthèse de sa sous-unité régulatrice, la cycline B.

Conclusions :

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de mettre en évidence l'importance de la régulation du complexe eIF4E/4E-BP lors de la première mitose chez l'oursin (Figure 17). La fécondation déclenche la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP ainsi que la dégradation du répresseur. eIF4E peut alors s'associer à la coiffe m^7GTP des ARNm et déclencher leur traduction. La rapamycine, empêche la libération d'eIF4E et par conséquent inhibe la traduction des messagers. Au niveau du cycle cellulaire, elle affecte la première division mitotique. Cet effet sur le cycle s'explique par le fait que la rapamycine retarde la synthèse de la cycline B.

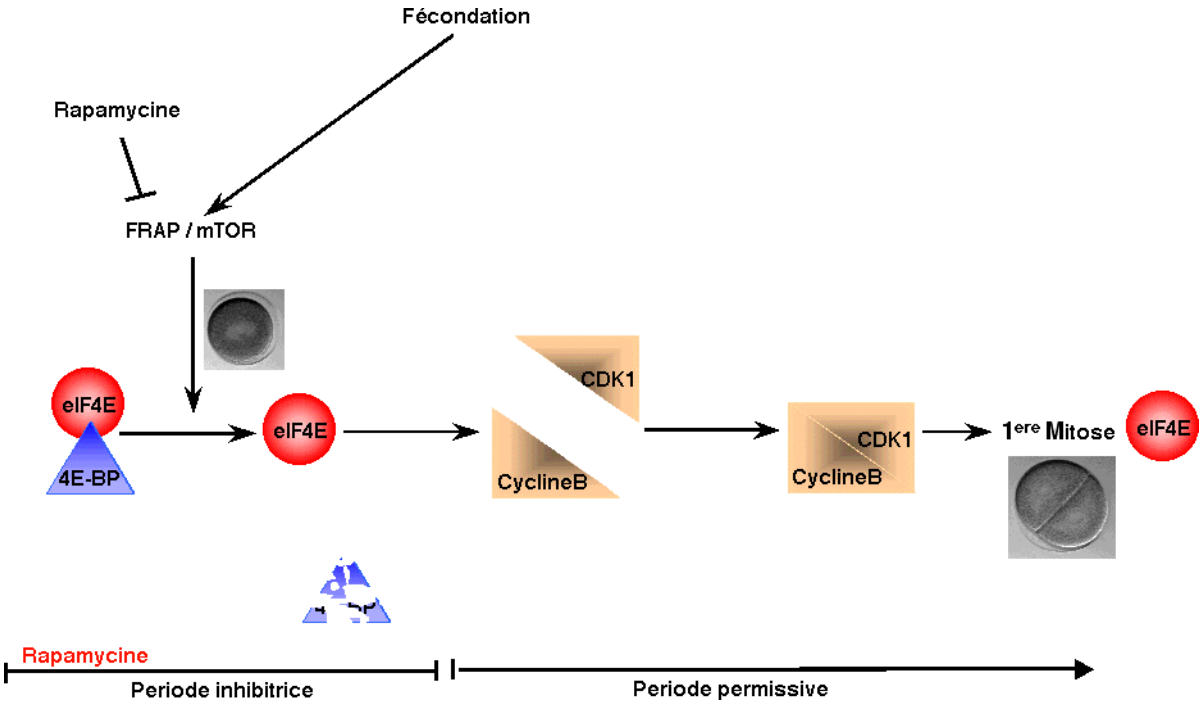


Figure 17 : Bilan de l'article 1

ARTICLE IN PRESS

ACADEMIC PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

Developmental Biology 0 (2003) 000–000

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

www.elsevier.com/locate/ydbio

eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo

Patrick Salaün,[a] Stéphane Pyronnet,[b] Julia Morales,[a] Odile Mulner-Lorillon,[a] Robert Bellé,[a] Nahum Sonenberg,[c] and Patrick Cormier[a,*]

[a] *Station Biologique de Roscoff, Université Pierre et Marie Curie (EI 37), Centre National dela Recherche Scientifique (CNRS, UMR 7127), Institut National des Sciences de l'Univers (INSU), B.P. 74, 29682 Roscoff Cedex, France*

[b] *INSERM U531, Institut Louis Bugnard, C.H.U. Rangueil, 31403 Toulouse, France*

[c] *Department of Biochemistry and McGill Cancer Center, McGill University, Montreal, Quebec H3G1Y6, Canada*

Received for publication 22 July 2002, revised 2 December 2002, accepted 4 December 2002

Abstract

The mRNA's cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor (eIF)4E is a major target for the regulation of translation initiation. eIF4E activity is controlled by a family of translation inhibitors, the eIF4E-binding proteins (4E-BPs). We have previously shown that a rapid dissociation of 4E-BP from eIF4E is related with the dramatic rise in protein synthesis that occurs following sea urchin fertilization. Here, we demonstrate that 4E-BP is destroyed shortly following fertilization and that 4E-BP degradation is sensitive to rapamycin, suggesting that proteolysis could be a novel means of regulating 4E-BP function. We also show that eIF4E/4E-BP dissociation following fertilization is sensitive to rapamycin. Furthermore, while rapamycin modestly affects global translation rates, the drug strongly inhibits cyclin B de novo synthesis and, consequently, precludes the completion of the first mitotic cleavage. These results demonstrate that, following sea urchin fertilization, cyclin B translation, and thus the onset of mitosis, are regulated by a rapamycin-sensitive pathway. These processes are effected at least in part through eIF4E/4E-BP complex dissociation and 4E-BP degradation.
© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: 4E-BP; eIF4E; 4E-BP degradation; Cyclin B; Mitosis; Fertilization

Introduction

The regulation of mRNA translation is a critical feature of entry and progression through the cell cycle (O'Farrell, 2001; Pyronnet and Sonenberg, 2001). The early steps in the development of sea urchin eggs represent an ideal system for studying the relationships between translation regulation and M-phase completion for the following reasons. (i) Sea urchin embryos are naturally synchronized during early development stages. (ii) Fertilization triggers a rapid rise in protein synthesis independent of mRNA transcription and ribosome biogenesis (Brandhorst and Fromson, 1976; Epel, 1967). (iii) De novo protein synthesis is necessary for M-phase completion but is dispensable for progression through S-phase (Dube, 1988; Wagenaar, 1983).

We reported recently the presence of the translation repressor 4E-BP (eIF4E binding protein) in unfertilized sea urchin eggs and have shown that this protein plays an important role in the first mitotic division of sea urchin embryos (Cormier et al., 2001). 4E-BP is a well-characterized inhibitor of cap-dependent translation (Haghighat et al., 1995) that competitively prevents the interaction between the eukaryotic initiation factors (eIF) 4E and 4G (Mader et al., 1995). eIF4E functions in conjunction with eIF4G, a large scaffolding protein that interacts, among others, with eIF4E, eIF4A, and eIF3 (Raught, 2000). eIF4E is the cap-binding protein. eIF4A is an RNA helicase which, in conjunction with eIF4B, is thought to facilitate ribosome binding by unwinding the mRNA secondary structure. eIF3 is a

* Corresponding author. Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, B.P. 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Fax: +33-2-98-29-23-06.

E-mail address: cormier@sb-roscoff.fr (P. Cormier).

0012-1606/03/$ – see front matter © 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.
doi:10.1016/S0012-1606(02)00099-4

ribosome-associated translation initiation factor. Through its interaction with eIF4E and eIF3, eIF4G provides a physical link between the mRNA 5′ end and the ribosome.

In mammals, three 4E-BP homologs exist (4E-BP1, 4E-BP2, and 4E-BP3) (Pause et al., 1994; Poulin et al., 1998), although only one ortholog has been described thus far in insects and in echinoderms (Bernal and Kimbrell, 2000; Cormier et al., 2001; Miron et al., 2001). In mammals, 4E-BPs binding to eIF4E is reversible, and 4E-BPs affinity for eIF4E is determined by the phosphorylation status of 4E-BPs. The underphosphorylated forms of 4E-BPs interact strongly with eIF4E, whereas the hyperphosphorylated forms do not (Pause et al., 1994). Multiple and hierarchical phosphorylation events are required to release 4E-BP1 from eIF4E (Gingras et al., 2001a). A large body of evidence indicates that phosphoinositide 3′-kinase (PI3K) and FKBP12 and rapamycin-associated protein/mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) signaling kinases effect the release of 4E-BP1 from eIF4E (Gingras et al., 2001b).

Cap-dependent translation plays an essential role in the G1/S transition. For instance, in budding yeast, a conditional mutation in *cdc33* encoding eIF4E, causes arrest at the G1/S boundary, possibly through inefficient synthesis of the cyclin CLN3 (Danaie et al., 1999; Polymenis and Schmidt, 1997). Treatment of cells with rapamycin (Vezina et al., 1975), an immunosupressive macrolide that blocks TOR activity and 4E-BP phosphorylation (Gingras et al., 2001b), causes eIF4E sequestration in a complex with 4E-BP1. Rapamycin also blocks mammalian cells at G1 possibly through inhibition of 4E-BP phosphorylation and consequent repression of cap-dependent translation inhibition (Beretta et al., 1996).

Sea urchin unfertilized eggs are haploid cells that are arrested after completion of their meiotic divisions at the G1 stage. In all eukaryotes, the onset of mitosis is under the control of a heterodimeric complex composed of the CDK1 kinase and a B-type cyclin (Nigg, 2001; O'Farrell, 2001), the maturation-promoting factor (MPF). CDK1 activity is regulated by phosphorylation on certain key tyrosine and threonine residues (Meijer et al., 1991) and depends absolutely on its association with a cyclin (Meijer et al., 1989; Minshull et al., 1989). The mitotic cyclins A and B were first discovered in sea urchin as key proteins which are rapidly synthesized and degraded during M-phase at each cell cycle (Evans et al., 1983; Minshull et al., 1989).

Here, we investigate the mechanism by which 4E-BP functions in the first mitotic cleavage following fertilization of sea urchin eggs. We show that 4E-BP is rapidly degraded following fertilization, and that both 4E-BP degradation and eIF4E/4E-BP dissociation are sensitive to rapamycin. Furthermore, while rapamycin only partially inhibits the increase in protein synthesis that occurs following fertilization, it strongly blocks cyclin B expression and prevents the first mitotic cleavage. Taken together, these data indicate that 4E-BP degradation and eIF4E release from the translational repressor 4E-BP are critical events in the first mitotic division of sea urchin embryos.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Sodium orthovanadate, EDTA, EGTA, Histone 1 (type III-SS), β-glycerophosphate, 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), dithiothreitol, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*′-2-ethanesulfonic acid (Hepes), sodium fluoride, *p*-nitrophenyl phosphate, disodium phenylphosphate, leupeptin, aprotinin, soybean trypsin inhibitor, benzamidine, ATP, Tween 20, and Triton X-100 were obtained from Sigma. 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF) and glycine were purchased from Interchim. [γ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) and [^{35}S]L-methionine (1000 Ci/mmol) were obtained from Amersham (France). Optiphase Supermix scintillation liquid was purchased from Perkin–Elmer. The purified protein kinase CDK1/cyclin B from starfish and roscovitine were kindly provided by Dr. L. Meijer (Roscoff, France). ECL detection reagents, CNBR-activated Sepharose, 7-methyl-GTP Sepharose 4B beads were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. Mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E was purchased from Transduction Laboratories (USA). Goat anti-mouse, rabbit anti-guinea pig, and swine anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase coupled) were obtained from Dako SA (France). Polyclonal antibody directed against sea urchin cyclinB (Lozano et al., 1998) was generously donated by Pr. Gérard Peaucellier and Dr. André Picard (Banyuls, France).

Handling of gametes and embryos

Sphaerechinus granularis sea urchins were collected in the Brest area, kept in running sea water, and used within 5 days. Spawning of gametes, in vitro fertilization, and culturing of eggs and embryos were performed as described (Marc et al., 2002). Briefly, eggs were collected in 0.22-μm Millipore-filtered sea water (FSW), rinsed twice, and suspended (10% suspension) in FSW containing 0.1% glycine. For 4E-BP and eIF4E analyses, eggs were dejellied as described (Cormier et al., 2001). Sperm was kept dry at 4°C until use. Shortly before use, 10 μl of dry sperm was diluted in 1 ml FSW, and 10 μl was added per milliliter of eggs suspension. More than 90% of the fertilized eggs raised fertilization membranes in all the experiments described in this article. A stock solution of 20 mM rapamycin was made in ethanol and stored at −20°C. A final concentration of 20 μM rapamycin was added 10 min before fertilization to the eggs suspensions or at different times after sperm addition. In some experiments, 100 μM final concentration of emetine was added 10 min following fertilization.

Determination of cleavage rates and nuclear envelope breakdown

Cleavage was scored by observation under a light microscope. The dispersion of the nuclear envelope was followed by Nomarski differential interference contrast (DIC) microscopy. Observation was made on an Olympus BX61 microscope using a ×20 or ×40 UPlanApo objectives and DIC optics. Pictures were taken using a RT monochrome (Diagnostic instrument, Inc.) CCD camera.

Extract preparation for 4E-BP analyses

At the indicated times following fertilization, cells were collected by centrifugation in a Sorvall TC6 centrifuge for 2 min at 2000 rpm and the cell pellet was frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C. Cells extracts were prepared as described (Cormier et al., 2001) with the following modifications. Briefly, cells were lysed in one cell volume of 2× binding buffer (40 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM β-glycerophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM ATP, 20 mM tetrasodium pyrophosphate (PPi), 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 100 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF), and 20 μg/ml of aprotinin and leupeptin). Lysates were centrifuged in a Sorvall RMC14 for 15 min at 14,000 rpm at 2°C. For 4E-BP total amount analysis, typically 50 to 100 μg of protein from the supernatant or from the pellet was directly resolved by one-dimensional (15% acrylamide) SDS–PAGE. The sea urchin translation elongation factor EF-1δ that is present in supernatant and pellet fractions was used as a loading control.

Isolation of eIF4E

Isolation from unfertilized eggs and early development stages was performed as described (Cormier et al., 2001) with the following modifications: supernatant of the extract (made as described above) with an OD (260 nm) = 50 were mixed with 100 μl (25 μl bead volume) of m^7GTP-sepharose beads (m^7GTP column). After 60-min incubation at 4°C, unbound material was removed by four washes with 1 ml of binding buffer containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was directly added to the beads. Proteins bound to the beads were resolved by one-dimensional (15% acrylamide) SDS–PAGE using the Mini-PROTEAN two-cell system (Bio-Rad Laboratories). Depending on the experiment, proteins bound to the beads were eluted with 40 μl of binding buffer containing 100 mM NaCl and 0.4 mM m^7GTP for 10 min at 4°C. Following centrifugation at 2000 rpm for 2 min at 4°C, the supernatant was collected and stored in liquid nitrogen or mixed with Laemmli sample buffer. Typically, for SDS–PAGE and blot analyses, one-fifth of the purification was loaded.

Immunoprecipitation analyses

Immunoprecipitation analyses were performed as described previously (Cormier et al., 2001). Briefly, 100 μl of unfertilized eggs extracts (15 μg proteins/μl) or 40 μl of proteins eluted as described above from m^7GTP column were incubated with anti-4E-BP2 antiserum (1:250) at least 4 h at 4°C. The antigen–antibody complex was incubated with protein A-Sepharose beads for 1 h at 4°C and the resin was washed three times. Typically, for SDS–PAGE and blots analyses, half of the immunoprecipitation was loaded.

Extract preparation for analysis of de novo synthesis of cyclin B

At the indicated times following fertilization, embryos were collected by centrifugation in a Sorvall TC6 centrifuge for 2 min at 2000 rpm. Laemmli sample buffer was directly added to 200 μl pelleted cells and the samples were boiled for 3 min. After clearing by centrifugation, 10 μl of the embryos extract was resolved by one-dimensional (12% acrylamide) SDS–PAGE.

Western blot analyses

Western blot analyses were performed following electrotransfer of proteins from SDS–PAGE onto 0.22-μm nitrocellulose membranes (Towbin et al., 1992). 4E-BP was analyzed using rabbit polyclonal antibodies directed against human 4E-BP2 (Rousseau et al., 1996) or human 4E-BP1 (Gingras et al., 1998). Polyclonal antibodies directed against the sea urchin elongation factor δ were raised in a guinea pig against a glutathione-*S*-transferase EF-1δ fusion protein (Delalande et al., 1999). eIF4E was analyzed using mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E (Transduction Laboratories, USA). Membranes were incubated with anti-4E-BPs (1:2000), anti-eIF4E (1:2000), anti-cyclin B (1:1000), or anti EF-1δ (1:5000) antibodies in 5% skim milk, 0.1% Tween 20, 20 mM Tris–HCl, pH 7.6 at room temperature. The antigen–antibody complex was measured by the chemiluminescence system with peroxidase-coupled secondary antibodies according to the manufacturer's instructions. Signals were quantified using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

Measurement of CDK1/cyclin B complex activity in vitro

CDK1/cyclin B activity was assayed under standard conditions using histone H1 (Sigma type III-S) as a substrate (Borgne and Meijer, 1996) in the presence of 20 μM rapamycin or 20 μM roscovitine or in the absence of drug. Phosphorylation of histone H1 (50 μg/ml final) was performed for 10 min at 30°C in 50 μl reaction mixture containing 1 μCi/ml [γ-^{32}P]ATP (20 μCI/ml final), 10 μM unlabeled ATP in buffer containing 60 mM β-glycerophos-

phate; 30 mM *p*-nitrophenyl phosphate; 25 mM MOPS (pH 7.2), 5 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$; 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM sodium orthovanadate. Reaction was stopped by chilling the tubes in ice. Duplicate aliquots of 10 μl were spotted on Whatman P81 phosphocellulose papers which were washed five times in 1% phosphoric acid and counted in water in a 1450 MicroBetacounter (Wallac, EG&G Instruments).

Analysis of CDK1/cyclin B activation in vivo

The activation state of CDK1/cyclin B was monitored at different times following fertilization. Every 15 min following fertilization, 1 ml of untreated or 20 μM rapamycin or 100 μM emetine-treated embryos were packed by centrifugation for 5 s at full speed in an Eppendorf centrifuge, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at −80°C until further use. For most experiments, 50 μl pelleted cells were resuspended in 400 μl ice-cold buffer (60 mM β-glycerophosphate; 15 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS (pH 7.2), 15 mM $MgCl_2$; 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM disodium phenylphosphate, 1 mM AEBSF, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor, leupeptin 10 μg/ml; aprotinin 10 μg/ml, 100 mM benzamidine, 1% Triton) and were homogenized through a 25-G needle. The homogenates were clarified by 14,000 rpm centrifugation for 10 min at 4°C. Using the ability of the 13-kDa product of the suc-1 gene from yeast to interact with CDK1 (Dunphy et al., 1988), CDK1/cyclin B complex was extracted from 300 μl of homogenate by affinity on $p13^{suc-1}$-Sepharose beads, prepared using bacterially produced $p13^{suc-1}$ protein coupled to Sepharose (Arion and Meijer, 1989). Incubation was performed for 45 min under constant rotation at 4°C in the presence of 50 μl of $p13^{suc-1}$-Sepharose beads, and after three washes, the activity of the bound kinase was determined under the standard conditions reported above.

Determination of protein synthesis rates in vivo

A 5% (v/v) suspension of eggs was incubated for 1 h in 10 μCi/ml [^{35}S]-L-methionine at 16°C. Eggs were then rinsed in FSW and fertilized in the presence or absence of 20 μM rapamycin or 100 μM emetine. At the indicated times, 200 μl of cells was pelleted and frozen in liquid nitrogen. Cell extracts were prepared as described above and radioactivity incorporation into proteins was either measured by TCA precipitation or revealed by autoradiography on gel following protein separation by SDS–PAGE (12% acrylamide). [^{35}S]methionine incorporation was measured on duplicate aliquots after 10% TCA precipitation on Whatman 3M filters and counting in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid. Radioactivity on gels was revealed by autoradiography on Hyperfilm-βmax (Amersham).

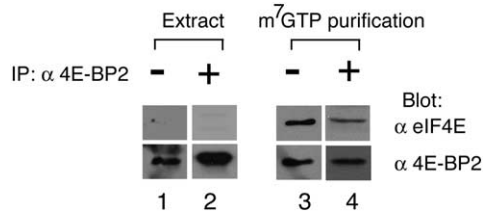


Fig. 1. 4E-BP level is higher than eIF4E level. Extracts were obtained from low-speed centrifugation of unfertilized egg homogenates (lanes 1 and 2). Protein extract before immunoprecipitation (lane 1) or proteins immunoprecipitated using anti-4E-BP2 antibody (lane 2) were resolved on 15% SDS–PAGE and were analyzed by Western blot using anti-eIF4E and anti-4E-BP2 antibodies. Extract was applied to a m7GTP-column and bound proteins were eluted from the column using the cap analogue m7GTP (lanes 3 and 4). Recovered proteins before immunoprecipitation (lane 3) or following immunoprecipitation using anti-4E-BP2 antibody (lane 4) were resolved on 15% SDS–PAGE and were analyzed by Western blot using the same antibodies as above.

Results

Sea urchin 4E-BP is degraded following fertilization

We previously suggested that 4E-BP could act as a repressor of protein synthesis in unfertilized sea urchin eggs and that translational silencing could be in part explained by 4E-BP interaction with eIF4E (Cormier et al., 2001). Higher or equal 4E-BP level relative to eIF4E is certainly required for translational silencing of maternal mRNAs before fertilization. To test this hypothesis, we first compared levels of eIF4E and 4E-BP in unfertilized eggs extracts (Fig. 1, lanes 1 and 2). While eIF4E was undetectable (lane 1, top), 4E-BP was directly detectable in cell extract from unfertilized eggs (lane 1, bottom). Furthermore, eIF4E still remained undetectable following 4E-BP immunoprecipitation from the extracts (lane 2). Codetection of eIF4E and 4E-BP required purification of eIF4E from unfertilized eggs extracts using m^7GTP columns (Fig. 1, lanes 3 and 4). This indicates that, compared to eIF4E, an excess of 4E-BP is present prior to fertilization in sea urchin eggs.

We previously showed that the total amount of 4E-BP decreases rapidly following sea urchin egg fertilization (Cormier et al., 2001). The decrease of 4E-BP could be due either to protein degradation or to redistribution to an insoluble fraction. To distinguish between these two possibilities, the supernatant and pellet obtained from eggs before or at different times after fertilization were analyzed by Western blotting (Fig. 2A) using a polyclonal antibody directed against human 4E-BP2, which was shown to recognize sea urchin 4E-BP (Cormier et al., 2001). While 4E-BP was detected exclusively in the supernatant of unfertilized eggs, the signal disappeared following fertilization (Fig. 2A, top). In contrast, the amount of elongation factor (EF) 1-δ, which served as a control, remained unchanged (Fig. 2A. bottom). Similar results were obtained using another polyclonal antibody, directed against human 4E-BP1, ruling out the possibility that the 4E-BP immunogenic properties could have

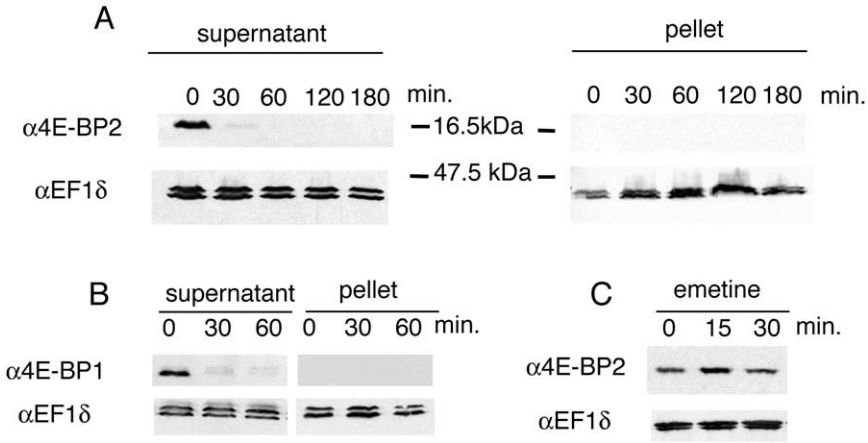


Fig. 2. 4E-BP is degraded following fertilization. (A and B) Supernatant (left) and pellet (right), obtained from low-speed centrifugation of egg homogenates prepared prior or at indicated times following fertilization, were resolved by 15% SDS–PAGE and subjected to Western blot using anti-human 4E-BP2 (A, top), anti-human 4E-BP1 (B, top), or anti-eEF-1δ (A and B, bottom) antibodies. (C) 4E-BP disappearance is independent of inhibition of its synthesis. Unfertilized eggs were incubated with 100 μM emetine during the indicated time, and a Western blot using anti-human 4E-BP2 antibodies was performed as previously described. For all experiment, 75 μg of protein was typically loaded and an anti-sea urchin eEF-1δ antibody was used as loading control (bottom).

been altered by 4E-BP posttranslational modifications following fertilization (Fig. 2B). Because 4E-BP was not recovered in the pellet, its disappearance following fertilization cannot be a consequence of protein redistribution to an insoluble fraction. The amount of a protein in the cell reflects both protein synthesis and degradation. It was thus possible that 4E-BP disappearance reflected an inhibition of its synthesis rather than degradation. However, treatment of unfertilized eggs with emetine, a potent inhibitor of elongation, which at 100 μM rapidly abolishes protein synthesis in sea urchin eggs (Hogan and Gross, 1952), had no effect on 4E-BP amount (Fig. 2C). This rules out the possible involvement of an inhibition of 4E-BP synthesis to explain the 4E-BP disappearance following fertilization.

Rapamycin prevents 4E-BP degradation triggered by fertilization

Following sea urchin egg fertilization, eIF4E is rapidly released from the eIF4E/4E-BP complex (Cormier et al., 2001). In mammalian cells, eIF4E/4E-BP interaction is sensitive to rapamycin, a compound that blocks FRAP/mTOR activity and 4E-BP hyperphosphorylation. To test whether rapamycin also prevents eIF4E/4E-BP dissociation in sea urchin eggs, 4E-BP bound to eIF4E was analyzed after affinity purification of eIF4E on m^7GTP columns from eggs fertilized in the presence or absence of rapamycin. Interestingly, the eIF4E/4E-BP dissociation observed following fertilization is strongly inhibited by rapamycin (Fig. 3A, compare the left and right panels). We next asked whether 4E-BP degradation following fertilization could also be affected by rapamycin. 4E-BP amount was monitored in eggs fertilized in the presence or absence of rapamycin. While the level of 4E-BP decreased dramatically following

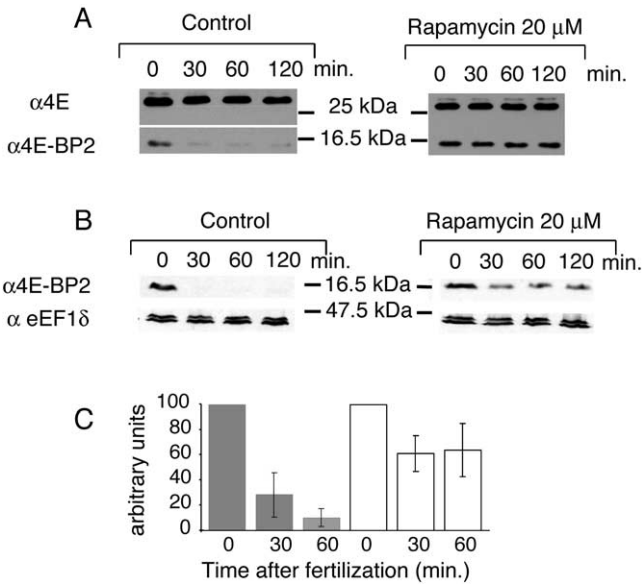


Fig. 3. eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation following fertilization are both inhibited by rapamycin. (A) Rapamycin inhibits eIF4E dissociation from 4E-BP. Proteins affinity-purified using a m7GTP column prior or at the indicated times following fertilization of untreated (left) or rapamycin-treated (right) eggs were subjected to Western blotting using anti-human 4E-BP2 (bottom) or anti-eIF4E (top) antibodies. (B) Rapamycin inhibits 4E-BP degradation. Total amount of 4E-BP (top) from untreated (left) or rapamycin-treated eggs (right), obtained prior and at the indicated times following fertilization, was analyzed by Western blotting using anti-human 4E-BP2 antibodies. Anti-sea urchin eEF-1δ antibody was used as a loading control (bottom). (C) Quantitation of the results obtained from untreated (gray boxes) or rapamycin treated (white boxes) eggs. 4E-BP amount was normalized against eEF-1δ levels and expressed as a percentage of the value obtained with unfertilized eggs. Vertical bars represent the standard deviation of four independent experiments.

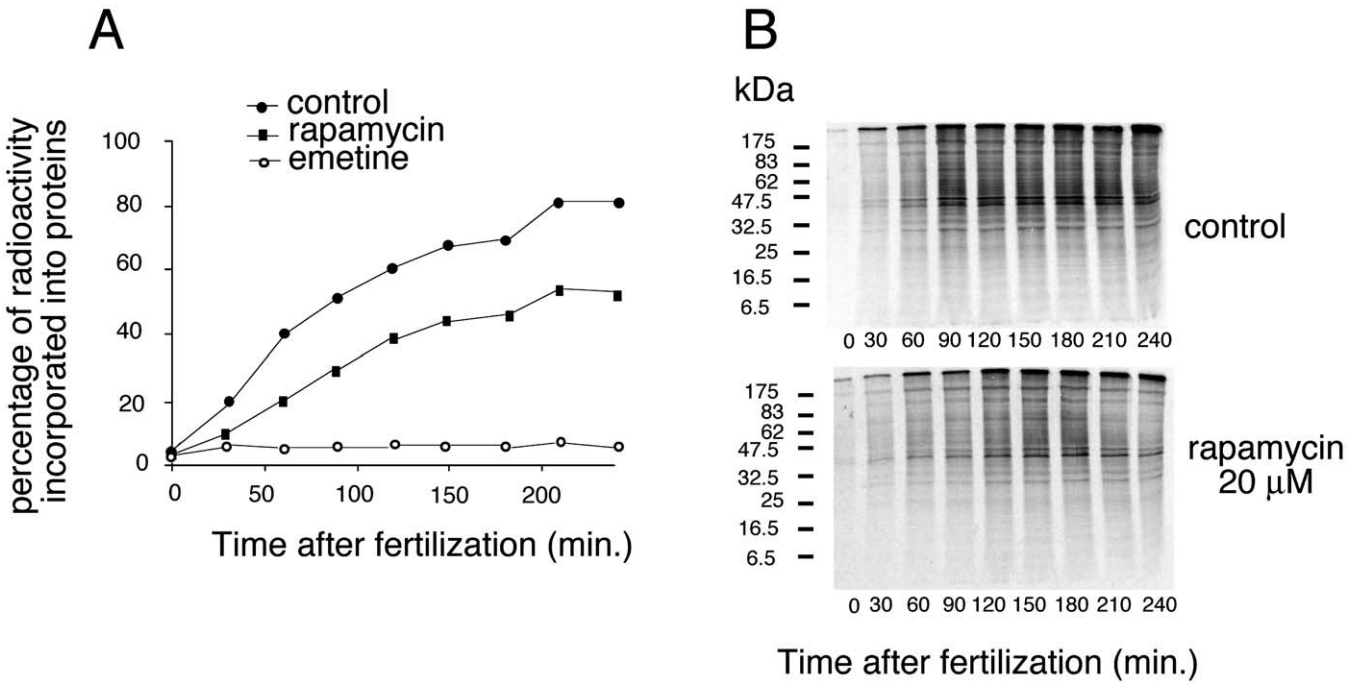


Fig. 4. Rapamycin inhibits the increase in protein synthesis triggered by fertilization. (A) The rate of in vivo protein synthesis was monitored in eggs fertilized in the absence (filled circles) or the presence of 20 μM rapamycin (filled squares) or 100 μM emetine (open circles). Embryos were metabolically labeled in the presence of [^{35}S]methionine and radioactivity incorporation into TCA-precipitated proteins was determined at indicated times after fertilization, as explained under Materials and methods. (B) Pattern of proteins translated after fertilization of untreated (top) or rapamycin-treated (bottom) eggs. Cytosoluble fractions (30 μg of proteins) obtained from embryos at indicated times after fertilization, and labeled in the presence of [^{35}S]methionine, were separated by SDS–PAGE (12%), and neosynthesized proteins were visualized by autoradiography.

fertilization in untreated eggs, 4E-BP levels remained the same in rapamycin-treated fertilized eggs (Fig. 3B, compare the right and left panels). Similar results were obtained with eggs isolated from four different females (Fig. 3C). These data suggest that both rapid eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation are mediated by a rapamycin-sensitive pathway following sea urchin egg fertilization.

The protein synthesis increase triggered by fertilization is inhibited by rapamycin

As an increase in translation rates generally correlates with 4E-BP/eIF4E dissociation, it is conceivable that rapamycin inhibits the increase in protein synthesis triggered by fertilization in sea urchin. To test this hypothesis, the rate of amino acid incorporation was measured at different times after fertilization in the presence or absence of rapamycin. Translation rates were also monitored in the presence of emetine. As expected, emetine completely blocked [^{35}S]methionine incorporation into proteins (Fig. 4A), while rapamycin inhibited translation only partially (~30%; Fig. 4A). The pattern of proteins synthesized de novo in rapamycin-treated embryos was analyzed following resolution of labeled proteins by SDS–PAGE and autoradiography. Although global translation was reduced by rapamycin treatment, the pattern of synthesized proteins was similar to that observed in untreated eggs (Fig. 4B, compare top to bottom panel). These results show that rapamycin, which blocks both eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation, also depresses the global increase in protein synthesis that occurs following sea urchin egg fertilization.

Effect of rapamycin on the first mitotic divisions

In sea urchin embryos, a high rate of protein synthesis is necessary to progress through the first mitotic division (Arion and Meijer, 1989; Wagenaar, 1983). Since the results presented above show that translation is sensitive to rapamycin, we asked whether treatment of sea urchin eggs with rapamycin could affect the completion of the first mitotic division. Unfertilized eggs were preincubated in the presence of rapamycin for 15 min and then fertilized and maintained in the presence of rapamycin (Fig. 5). Rapamycin significantly delayed the first mitotic cleavage (Fig. 5). However, fertilization per se was not affected by rapamycin, since the fertilization membranes raised even in the presence of 20 μM rapamycin (Fig. 5). The inhibitory effect of rapamycin on the first mitotic division was maintained up to 2 h after control eggs started to divide (Fig. 5A). Furthermore, rapamycin affected cell-cycle synchrony as judged by changes in the slope of the curve (Fig. 6A). In the presence of rapamycin, embryos which divided once also divided a second time (data not shown). This result suggests that only early events necessary for the first mitotic division were

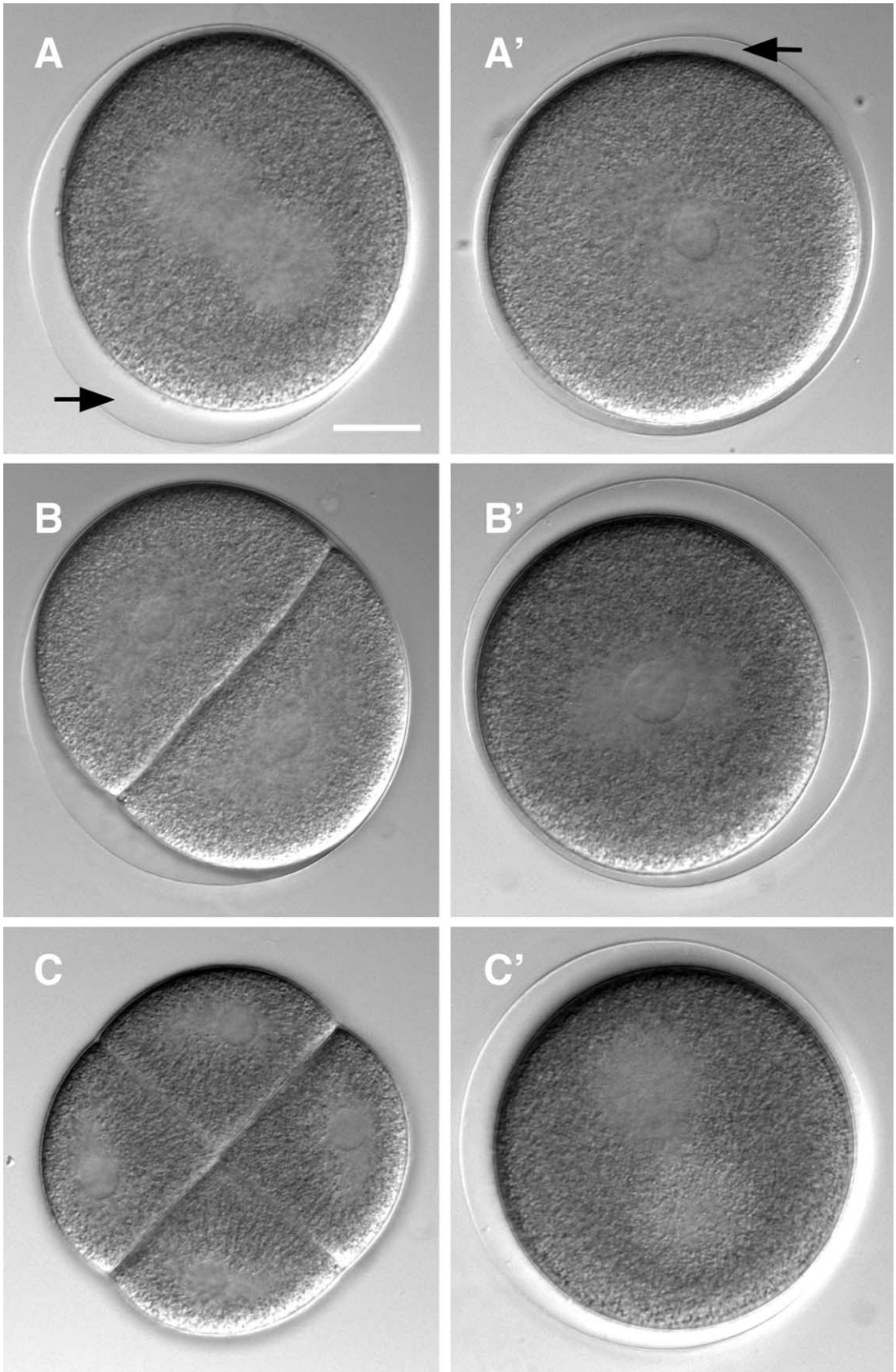


Fig. 5. Rapamycin delays the first mitotic division. Control (A–C) or rapamycin-treated (20 μM) embryos (A′–C′) taken at indicated times following fertilization were observed directly under DIC microscopy. (A–A′) At 100 min after fertilization, control and rapamycin treated eggs raised fertilization membranes (shown by an arrow). While nuclear envelope breakdown was evident in the control (A), nucleus is in center position in rapamycin-treated eggs (A′). (B–B′) At 140 min after fertilization, while control embryos accomplished the first mitotic division (B), rapamycin-treated embryos presented a typical large nucleus in center position of the egg (B′). (C–C′) At 220 min following fertilization, while control eggs divided a second time (C), nuclear envelope breakdown occurred in rapamycin-treated eggs (C′).

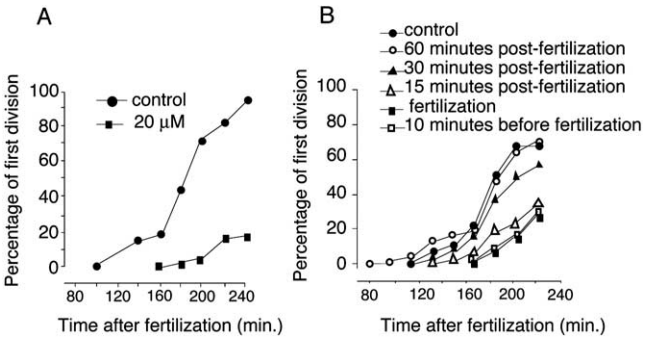


Fig. 6. Effect of rapamycin on kinetic of the first division of early development. (A) Kinetic of the first division of early development. Eggs were fertilized in the absence of rapamycin (filled circles) or following preincubation in the presence of 20 μM rapamycin for 15 min and cleavage rates were scored as described under Materials and methods. These data are representative of at least three independent experiments. (B) Determination of the rapamycin-sensitive period of the embryos. Eggs were incubated with 20 μM rapamycin prior or after fertilization as indicated, and cleavage rates were scored as described under Materials and methods.

affected by rapamycin. Indeed, when added later than 30 min following fertilization, rapamycin had no effect on the cell cycle, but blocked the first mitotic division when added up to 15 min after fertilization (Fig. 6B). Taken together, our results suggest that rapamycin does not affect fertilization per se, but rather prevents an early step required for completion of the first mitosis of the sea urchin embryo.

Rapamycin inhibits cyclin B synthesis which is necessary for CDK1/cyclin B complex activation

Since rapamycin treatment of embryos affects mitotic division, we decided to analyze the effect of the drug on activation of the mitotic kinase complex MPF triggered by fertilization. In mammalian cells, initiation of the cell cycle requires that a critical mass be reached and is dependent on the rate of protein synthesis. Rapamycin is thought to mediate G1 arrest at least in part through its action on 4E-BP via its target FRAP/mTOR and consequent inhibition of translation (Beretta et al., 1996). Unfertilized sea urchin eggs are blocked in G1 and fertilization directly promotes DNA replication in a manner independent of de novo translation (Wagenaar, 1983). Consistent with this, by monitoring [^{3}H]thymidine incorporation, we found that DNA synthesis proceeded in rapamycin-treated eggs (data not shown), suggesting that rapamycin does not act directly on the G1-to-S transition, but rather on the first M-phase of sea urchin embryos.

In sea urchins, CDK1/cyclin B complex activation, and in turn MPF stimulation, is largely dependent on protein synthesis (Arion and Meijer, 1989). Thus, alteration of the CDK1/cyclin B complex may be responsible for the dramatic delay in the first mitotic cleavage caused by rapamycin. We first examined whether rapamycin could directly affect CDK1/cyclin B activity. CDK1/cyclin B complexes were purified by affinity chromatography on p13-suc1-Sepharose beads and used for in vitro histone H1 kinase assays, in the presence of different drugs (Fig. 7A). Rapamycin had no significant effect, whereas roscovitine, a specific inhibitor of CDK1/cyclin B, strongly inhibited H1 kinase activity. This result indicates that rapamycin does not inhibit CDK1/cyclin B kinase activity. This is consistent with the finding that rapamycin had no effect on cell-cycle progression when added later than 30 min following fertilization (Fig. 6B).

We then tested whether rapamycin, or emetine, could affect CDK1/cyclin B activation triggered by fertilization. CDK1/cyclin B complexes were purified from untreated or drug-treated eggs at different times following fertilization by p13-suc1-Sepharose affinity chromatography, and in vitro kinase activity was assayed as described under Materials and methods. As expected, a peak of H1 kinase activity reflecting synchronization of the first mitosis was measured in untreated embryos (Fig. 7B). This peak was markedly reduced when CDK1/cyclin B was purified from eggs fertilized in the presence of rapamycin or emetine. Therefore, these results demonstrate that rapamycin acts upstream of a pathway that leads to CDK1/cyclin B activation.

De novo synthesis of cyclins is necessary for CDK1/cyclin B activation following sea urchin egg fertilization. Since rapamycin partially inhibits translation (Fig. 4), cyclin B synthesis may have been affected by rapamycin treatment. To investigate this, we analyzed cyclin B expression in egg extracts following fertilization (Fig. 7C). In untreated embryos (Fig. 7C, left and top), cyclin B protein appeared as early as 45 min after fertilization, and as time proceeded shifted up into a slower migrating form, and disappeared as the cells exit from mitosis. In rapamycin-treated embryos (Fig. 7C, right and top), cyclin B appeared with a delay of over 60 min following fertilization. Thus, these results demonstrate that rapamycin affects cyclin B synthesis, an event necessary for completion of the first mitotic division in sea urchin early development.

Discussion

We have previously shown that the amount of 4E-BP, and its association with eIF4E, decreases rapidly following sea urchin egg fertilization (Cormier et al., 2001). In this study, we demonstrate that 4E-BP disappearance is due to degradation of the protein. This is the first demonstration that 4E-BP degradation plays an important role in the control of protein synthesis. We also show that 4E-BP degradation and eIF4E/4E-BP dissociation induced by fertilization are both under the control of a rapamycin-sensitive pathway. Furthermore, while rapamycin treatment of embryos only partially inhibits the increase in translation rate triggered by fertilization, de novo synthesis of cyclin B is strongly blocked by rapamycin. Consequently, completion

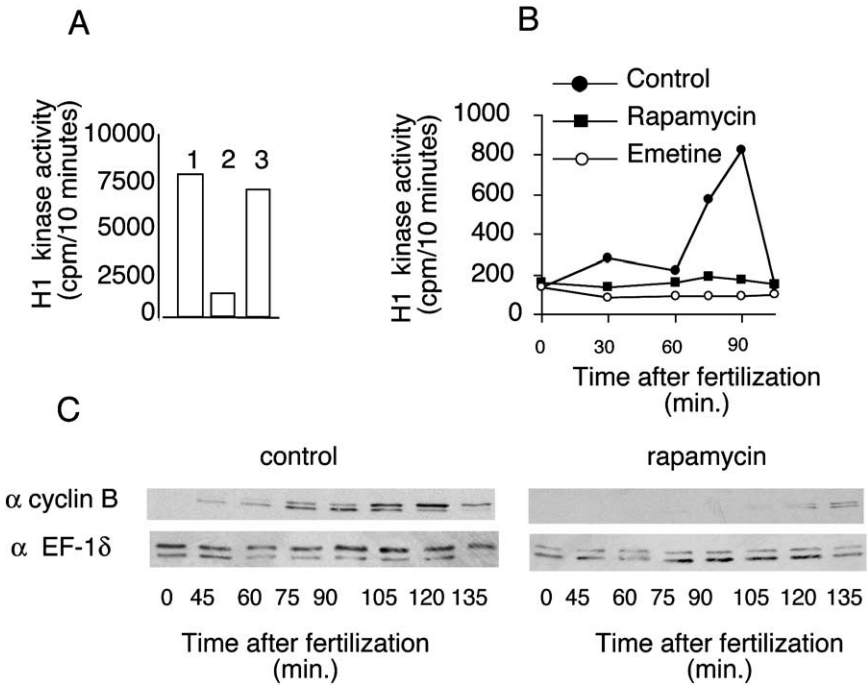


Fig. 7. Rapamycin blocks CDK1/cyclin B complex activation through inhibition of cyclin B synthesis. (A) Rapamycin has no direct effect on CDK1/cyclin B activity. H1 kinase activity of CDK1/cyclin B complex purified on p13-sepharose beads was measured in vitro in the absence (lane 1) or the presence of 20 μM roscovitine (lane 2) or 20 μM rapamycin (lane 3), as described under Materials and methods. (B) Rapamycin inhibits CDK1/cyclin B complex activation in vivo. Eggs were fertilized in the absence (full circles) or the presence of 20 μM rapamycin (full squares) or 100 μM emetine (open circles), and H1 kinase activity of CDK1/cyclin B complex purified on p13 sepharose beads was measured at indicated times postfertilization, as described under Materials and methods. (C) Rapamycin inhibits cyclin B synthesis. Eggs were fertilized in the absence (left) or the presence of rapamycin (right). Soluble fractions obtained from low-speed centrifugation of embryo homogenates prepared at indicated times following fertilization were resolved by 12% SDS–PAGE and subjected to Western blotting using anti-sea urchin Cyclin B (top), or anti-sea urchin eEF-1δ antibodies (bottom).

of the first mitotic division is dramatically delayed when sea urchin eggs are fertilized in the presence of rapamycin.

Proteolysis, a new means to regulate 4E-BP function

During oogenesis and maturation of sea urchin eggs, maternal mRNAs accumulate but remain untranslated until fertilization (Davidson et al., 1982). While precise quantitation of 4E-BP relative to eIF4E was not determined, our results suggest that an excess of 4E-BP is probably required for translational silencing of maternal mRNAs before fertilization. Our results also demonstrate that 4E-BP degradation is a posttranslational mechanism that could relieve cap-dependent translation repression following fertilization. A few reports suggest that such posttranslational regulation of 4E-BP function may also occur in other systems. For instance, in mammals, while 4E-BP2 mRNA is ubiquitously expressed in most tissues (Tsukiyama-Kohara et al., 1996), 4E-BP2 protein is present at high levels in testis and colon, but is not detected in kidney and heart (Tsukiyama-Kohara et al., 2001). Therefore, it will be interesting to determine whether the lack of 4E-BP2 in such tissues is due to inefficient translation or rapid degradation of the protein. Since it has been shown that in mammals, overexpression of 4E-BP1 or 4E-BP2 partially reverts the transformed phenotype of eIF4E-, *ras*-, or *src*-transformed cells (Rousseau et al., 1996), and since several colon carcinoma cell lines exhibit a low 4E-BP/eIF4E ratio (Dilling et al., 2002), an intriguing hypothesis is that 4E-BP proteolysis plays a role in cell transformation. Thus, posttranslational degradation may represent a new mechanism for the regulation of 4E-BP function. The proteolysis pathway responsible for 4E-BP degradation following sea urchin egg fertilization remains to be identified. Proteolysis has been shown to be important for the initiation of the first mitotic division in sea urchins. Indeed, inhibition of the proteasome activity specifically delays the onset of nuclear envelope breakdown in embryonic cell cycle (Kawahara et al., 2000). Nevertheless, the suppression of entry into mitosis in proteasome-inhibited embryos is caused by a defect in the regulatory mechanism of CDK1 activation rather than by any effect on cyclin synthesis (Kawahara et al., 2000). Therefore, 4E-BP degradation is unlikely to be dependent of the proteasome pathway. The presence of trypsin-like proteases has been reported in both membrane and cytoplasmic fractions of sea urchin (Penn et al., 1976). Since specific inhibitors of these proteases delay mitotic division in sea urchin embryos (Penn et al., 1976), it would

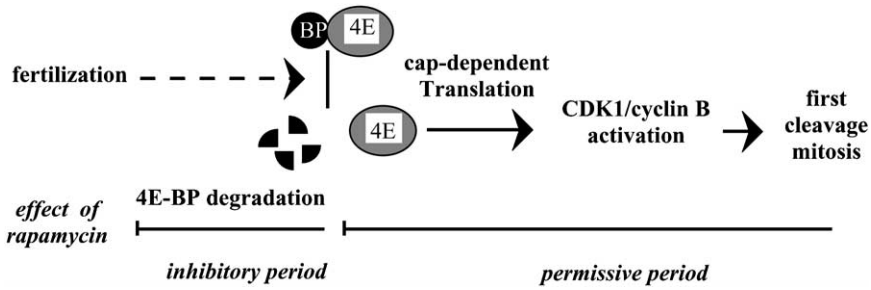


Fig. 8. Schematic diagram illustrating the relationship between 4E-BP function and completion of the first mitotic cleavage. The model posits that fertilization induces eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation through a rapamycin-sensitive signaling cascade. Consequently, global translation rate increases, thus allowing the synthesis of mitotic cyclins which are required for CDK1/cyclin B complex activation and completion of the first mitotic cleavage.

be interesting to test whether 4E-BP degradation is controlled by such proteases.

Rapamycin effects on 4E-BP degradation and eIF4E release from 4E-BP following fertilization

In mammals, the 12-kDa FKBP12 (FK506-binding protein) is the primary intracellular rapamycin receptor (Harding et al., 1989; Siekierka et al., 1989). The rapamycin/FKBP12 complex binds to, and inhibits, the protein kinase FRAP/mTOR, which is the best candidate for 4E-BP phosphorylation in vivo (Gingras et al., 2001a). In sea urchin, FKBP12 and TOR partial cDNAs have been isolated and are now accessible in an EST-database (Cameron et al., 2000). Therefore, as rapamycin prevents eIF4E/4E-BP dissociation in sea urchins, it is most probable that this event is mediated by the TOR signaling cascade following fertilization. It is conceivable that 4E-BP destruction is sensitive to rapamycin because when it is bound to eIF4E, it is protected against destruction, but becomes rapidly degraded once the eIF4E/4E-BP complex dissociates. However, the alternative possibility that the protease(s) responsible for 4E-BP degradation is directly under the control of a rapamycin-sensitive pathway cannot be excluded.

Effect of rapamycin on M-phase completion

Our results demonstrate the involvement of a rapamycin-sensitive pathway for the completion of the first mitotic division of sea urchin embryos. These results are at an apparent variance with the evidence that rapamycin arrests mammalian or budding yeast cells at the G1 phase of the cell cycle. However, our findings are consistent with the fact that following meiotic maturation, sea urchin eggs are blocked at G1, and de novo protein synthesis is required for M-phase completion, but is dispensable for progression through S-phase following fertilization (Dube, 1988; Wagenaar, 1983). Thus, cap-dependent translation is required for the first mitotic cleavage in sea urchin (this work), while in mammalian cells in culture, cap-dependent translation is required for G1 progression but is in contrast inhibited during mitosis (Pyronnet and Sonenberg, 2001). Once the first mitotic division is achieved, sea urchin embryos continue to divide. However, the size of the embryo remains unchanged until blastula, and consequently cells, are rendered progressively smaller (see Fig. 5). Indeed, during the early stages of sea urchin development, cells divide through a fast consecutive sequence of S- and M-phases, without the G1.growth phase. Thus, there is no need for an alternation between high and low cap-dependent translation rates, as is normally the case later during development (Pyronnet and Sonenberg, 2001). Consistent with this, 4E-BP levels dramatically fall during the first mitotic cleavage and remain very low thereafter. Rapamycin, which likely targets 4E-BP through the TOR signaling pathway, has no effect when added after 4E-BP destruction. It has been published that rapamycin does not affect the meiotic maturation in *Xenopus* (Morley and Pain, 1995) or in starfish oocytes (Lee et al., 2000), further supporting the idea that rapamycin effects are specific to the first mitotic division in early development stages.

We also demonstrated that rapamycin treatment only modestly prevents the increase of protein synthesis following fertilization. This result suggests a multicomponent nature of the translation silencing in sea urchin unfertilized eggs. However, rapamycin markedly affects cyclin B synthesis, which indicates that compared to other proteins, translation of cyclin B is preferentially stimulated following fertilization. Recently, a combined microarray and proteomic approach has uncovered novel genes affected by rapamycin (Grolleau et al., 2002). While a large number of ribosomal proteins and elongation factors was found to be repressed by rapamycin, only a few growth-related proteins were affected by the drug. In addition to its effect in translational control, rapamycin has been shown to affect transcript levels of several growth-related genes, which could explain the inhibition of proliferation observed in rapamycin-treated T cells (Grolleau et al., 2002). During early development of sea urchins, the cleavages of cells are naturally synchronized and first mitotic divisions are independent of mRNA transcription and ribosome biogenesis. Therefore sea urchin eggs could present an elegant system to help clarify the effect of rapamycin on translation of cell-cycle-related proteins. We thus propose a model to

explain the interplay between increased translation rates and entry into the first mitosis following fertilization (Fig. 8). The model posits that, in unfertilized eggs, cap-dependent translation is inefficient because eIF4E is sequested by the translational repressor 4E-BP. Fertilization triggers eIF4E-BP dissociation and 4E-BP degradation through a rapamycin-, and thus, TOR-sensitive pathway (inhibitory period). Cyclin B is then translated in a cap-dependent manner and entry into mitosis can occur. However, once eIF4E/4E-BP is dissociated and 4E-BP is degraded following fertilization, cap-dependent translation of cyclin B is no longer sensitive to rapamycin and, consequently, mitosis occurs even in the presence of rapamycin (permissive period).

A teratogenic activity of rapamycin has been reported in early development of mouse embryo (Hentges et al., 2001). Since early development, including gastrulation, could be readily studied in sea urchin, our model should offer the opportunity to further analyze the teratogenic activity of rapamycin and the relationships between translation initiation and cell-cycle regulations during embryonic development.

Acknowledgments

We thank C. Delalande, A. Monnier, and S. Boulben for characterization of anti-sea urchin eEF-1δ antibodies. We thank the following colleagues for generously providing reagents: L. Meijer, G. Peaucellier, and A. Picard. We thank M. Blondel for the use of the Olympus BX61 microscope and M. Miron and B. Sirry for helpful comments on the manuscript. Travel costs were supported by Université Pierre et Marie Curie (Paris, France). This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC 4247, France, PC), La Ligue Nationale contre le Cancer (France, PC), and Conseil Régional de Bretagne.

References

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

Beretta, L., Gingras, A.C., Hall, M.N., Sonenberg, N., 1996. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. EMBO J. 15, 658–664.

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

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

Brandhorst, B., Fromson, D., 1976. Lack of accumulation of ppGpp in sea urchin embryos. Dev. Biol. 48, 458–460.

Cameron, R.A., Mahairas, G., Rast, J.P., Martinez, P., Biondi, T.R., Swartzell, S., Wallace, J.C., Poustka, A.J., Livingston, B.T., Wray, G.A., Ettensohn, C.A., Lehrach, H., Britten, R.J., Davidson, E.H., Hood, L., 2000. A sea urchin genome project: sequence scan, virtual map, and additional resources. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9514–9518.

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

Danaie, P., Altmann, M., Hall, M.N., Trachsel, H., Helliwell, S.B., 1999. CLN3 expression is sufficient to restore G1-to-S-phase progression in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in translation initiation factor eIF4E. Biochem. J. 340, 135–141.

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

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

Dilling, M.B., Germain, G.S., Dudkin, L., Jayaraman, A.L., Zhang, X., Harwood, F.C., Houghton, P.J., 2002. 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are downregulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. J. Biol. Chem. 14, 14.

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

Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D., Newport, J., 1988. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell 54, 423–431.

Epel, D., 1967. Protein synthesis in sea urchin eggs: a “late” response to fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 899–906.

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

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

Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N., 2001a. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes Dev. 15, 2852–2864.

Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 2001b. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. Genes Dev. 15, 807–826.

Grolleau, A., Bowman, J., Pradet-Balade, B., Puravs, E., Hanash, S., Garcia-Sanz, A., Beretta, L., 2002. Global and specific translation control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. J. Biol. Chem. 277, 22175–22184.

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

Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., Schreiber, S.L., 1989. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. Nature 341, 758–760.

Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., Peterson, A.S., 2001. FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13796–13801.

Hogan, B., Gross, P.R., 1952. The effect of protein synthesis inhibitors on the entry of messenger RNA into the cytoplasm of sea urchin embryos. J. Cell Biol. 49, 692–701.

Kawahara, H., Philipova, R., Yokosawa, H., Patel, R., Tanaka, K., Whitaker, M., 2000. Inhibiting proteasome activity causes overreplication of DNA and blocks entry into mitosis in sea urchin embryos. J. Cell Sci. 113, 2659–2670.

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

Lozano, J.C., Schatt, P., Marques, F., Peaucellier, G., Fort, P., Feral, J.P., Geneviere, A.M., Picard, A., 1998. A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin B splice variant. J. Cell Biol. 140, 283–293.

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

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

Meijer, L., Arion, D., Golsteyn, R., Pines, J., Brizuela, L., Hunt, T., Beach, D., 1989. Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. EMBO J. 8, 2275–2282.

Meijer, L., Azzi, L., Wang, J.Y., 1991. Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. EMBO J. 10, 1545–1554.

Minshull, J., Blow, J.J., Hunt, T., 1989. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. Cell 56, 947–956.

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

Morley, S.J., Pain, V.M., 1995. Hormone-induced meiotic maturation in Xenopus oocytes occurs independently of p70s6k activation and is associated with enhanced initiation factor (eIF)-4F phosphorylation and complex formation. J. Cell Sci. 108, 1751–1760.

Nigg, E.A., 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2, 21–32.

O'Farrell, P.H., 2001. Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. Trends Cell Biol. 11, 512–519.

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

Penn, A., Lake, S., Timourian, H., Gledhill, B.L., 1976. Division delay in sea urchin embryos induced by a specific protease inhibitor. Exp. Cell Res. 97, 164–174.

Polymenis, M., Schmidt, E.V., 1997. Coupling of cell division to cell growth by translational control of te G1 cyclin CLN3 in yeast. Genes Dev. 11, 2522–2531.

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

Pyronnet, S., Sonenberg, N., 2001. Cell-cycle-dependent translational control. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 13–18.

Raught, B. (2000). Regulation of ribosomal recruitement in eukaryotes, in: Translational Control of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 245–293.

Rousseau, D., Gingras, A.C., Pause, A., Sonenberg, N., 1996. The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. Oncogene 13, 2415–24120.

Siekierka, J J., Hung, S.H., Poe, M., Lin, C.S., Sigal, N.H., 1989. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. Nature 341, 755–757.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology 24, 145–149.

Tsukiyama-Kohara, K., Poulin, F., Kohara, M., DeMaria, C.T., Cheng, A., Wu, Z., Gingras, A.C., Katsume, A., Elchebly, M., Spiegelman, B.M., Harper, M.E., Tremblay, M.L., Sonenberg, N., 2001. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. Nat. Med. 7, 1128–1132.

Tsukiyama-Kohara, K., Vidal, S.M., Gingras, A.C., Glover, T.W., Hanash, S.M., Heng, H., Sonenberg, N., 1996. Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2. Genomics 38, 353–363.

Vezina, C., Kudelski, A., Sehgal, S.N., 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. J. Antibiot. (Tokyo) 28, 721–726.

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

II) Analyse de la voie de régulation du complexe eIF4E / 4E-BP et contrôle de l'activation du MPF au cours de la première division mitotique

Article 2 : Salaun, P., Le Breton, M., Morales, J., Belle, R., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O., and Cormier, P. (2004). Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp Cell Res* 296, 347-57.

Chez les mammifères, la PI3 kinase contrôle la voie Akt/PKB, elle même contrôlant l'activité de FRAP / mTOR. Toutefois ce contrôle indirect de la PI3 kinase sur la voie TOR est sujet à de nombreuses controverses (voir introduction).

Nous avons donc analysé l'implication de la PI-3 kinase dans le contrôle du complexe eIF4E/4E-BP et dans les premières divisions mitotiques de l'embryon d'oursin.

Pour ce faire, nous avons adopté une approche pharmacologique en utilisant la wortmannine et son analogue chimique le LY294002, deux inhibiteurs de la PI3 kinase. Nous avons aussi comparé les effets de ces drogues à ceux de la rapamycine.

Résultats :

Par rapport à la rapamycine, la wortmannine inhibe faiblement la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP et la dégradation de 4E-BP (article 2, figure 1). Elle affecte aussi très partiellement la synthèse protéique (article 2, figure 2) générale ainsi que celle plus spécifique de la cycline B (article 2, figure 3).

À l'inverse, au niveau du cycle cellulaire, la wortmannine et le LY294002 ajoutés avant fécondation au milieu de culture ou introduits par micro-injection dans les oeufs, bloquent complètement la première division mitotique alors que la rapamycine ne fait que la retarder.

Lorsque la synthèse de cycline B se déroule normalement, , la wortmaninne affecte le cycle cellulaire contrairement à la rapamycine, suggérant ainsi que la wortmannine inhibe l'activation du MPF indépendamment de la synthèse de la cycline B (article 2, figure 5).

Nous avons observé par western-blot l'état de phosphorylation du résidu tyrosine 15 de CDK1. Celui-ci est déphosphorylé en phase M dans les oeufs témoins et traités par la rapamycine mais reste phosphorylé dans ceux qui sont traités par la wortmannine (article 2, figure 6).

Analyses des résultats :

Les résultats obtenus dans cet article nous ont renseigné sur de nombreux points. Tout d'abord, chez l'oursin, il paraît peu probable que la PI3 kinase contrôle, du moins directement, l'activité de FRAP/mTOR. En effet, l'inhibition de la wortmannine sur la dynamique du complexe eIF4E/4E-BP, sur la synthèse de cycline B et sur la synthèse protéique globale, sont en intensités inférieures à celles qui sont observées en présence de rapamycine. Toutefois il est intéressant de noter que l'effet sur la synthèse de cycline B et la synthèse protéique globale est proportionnel à l'inhibition de la dégradation et la dissociation de 4E-BP, renforçant ainsi l'idée que le complexe eIF4E/4E-BP contrôle la synthèse de cycline-B et celles d'autres protéines.

La voie eIF4E/4E-BP semble être nécessaire uniquement pour la première division mitotique. En effet, lorsque la rapamycine est ajoutée 45 minutes après fécondation, la deuxième mitose n'est pas retardée. Ce résultat indique que la voie TOR agit de manière extrêmement précoce au cours du développement de l'embryon. La PI3 kinase contrôle, pour sa part l'activation du MPF en empêchant la déphosphorylation du résidu Tyrosine 15 de CDK1.

Conclusions :

Même si elle ne contrôle pas directement FRAP / TOR, il est possible que la PI3 kinase, soit impliquée dans la régulation du complexe eIF4E/4E-BP. Celui-ci joue un rôle crucial et extrêmement précoce dans le contrôle de la reprise du cycle cellulaire (Figure 18)

Par ailleurs, la PI3 kinase régule la déphosphorylation du résidu tyrosine 15 de CDK1 et par conséquent l'activation du MPF.

Il en ressort que FRAP/mTOR et la PI3 kinase doivent finalement fonctionner de concert pour permettre l'activation du complexe CDK1/cycline B.

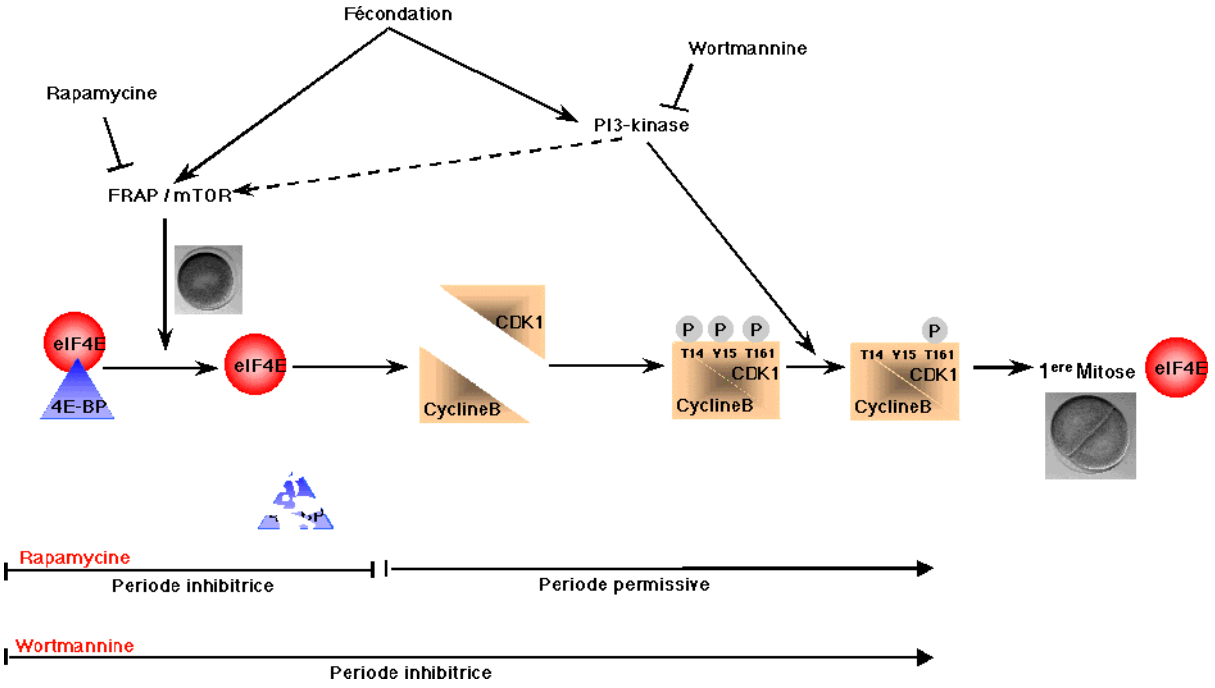


Figure 18 : Bilan de l'article 2

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

Experimental Cell Research xx (2004) xxx–xxx

Experimental Cell Research

www.elsevier.com/locate/yexcr

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

Patrick Salaün, Magali Le Breton, Julia Morales, Robert Bellé, Sandrine Boulben, Odile Mulner-Lorillon, and Patrick Cormier*

Station Biologique de Roscoff, Université Pierre et Marie Curie (EI 37), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, FRE 2775), Institut National des Sciences de l'Univers (INSU). BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

Received 12 November 2003; revised version received 18 February 2004

Abstract

In sea urchins, fertilization triggers a rapid rise in protein synthesis necessary for activation of CDK1/cyclin B, the universal cell cycle regulator. It has been shown that FRAP/mTOR is required for eIF4E release from the translational repressor 4E-BP, a process that occurs upstream of de novo cyclin B synthesis. Here, we investigate whether PI 3-kinase acts independently or upstream from FRAP/mTOR in the signal transduction pathway that links fertilization to the activation of the CDK1/cyclin B complex in sea urchin egg. We found that wortmannin, a potent inhibitor of PI 3-kinase, partially inhibited the global increase in protein synthesis triggered by fertilization. Furthermore, wortmannin treatment induced partial inhibition of cyclin B translation triggered by fertilization, in correlation with an intermediate effect of the drug on 4E-BP degradation and on the dissociation of the 4E-BP/eIF4E complex induced by fertilization. Our results presented here suggest that PI 3-kinase activity is required for completion of mitotic divisions of the sea urchin embryo. Incubation of eggs with wortmannin or microinjection of wortmannin or LY 294002 affects drastically mitotic divisions induced by fertilization. In addition, we found that wortmannin treatment inhibits dephosphorylation of the tyrosine inhibitory site of CDK1. Taken together, these data suggest that PI 3-kinase acts upstream of at least two independent targets that function in the CDK1/cyclin B activation triggered by fertilization of sea urchin oocytes. We discuss the significance of these results concerning the cascade of reactions that impinge upon the activation of the CDK1/cyclin B complex that follows sea urchin oocyte fertilization.
© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Translation regulation; 4E-BP; eIF4E; Wortmannin; PI 3-kinase; Tyrosine dephosphorylation; CDK1/cyclin B; Mitosis; Fertilization

Introduction

In eukaryotes, the onset of mitosis is under the control of a heterodimeric complex composed of a kinase, cyclin dependent kinase 1 (CDK1), and a B-type cyclin [1,2], which together constitute the maturation-promoting factor (MPF). CDK1 activity absolutely depends on its association with a cyclin [3,4] and CDK1 is regulated by phosphorylation on certain key tyrosine and threonine residues [5]. The mitotic cyclins A and B were first discovered in sea urchin as key proteins which are rapidly synthesized and degraded during the M-phase of each cell cycle [4,6].

Cyclin B was the first protein whose translation was demonstrated to be essential for the G2/M transition of the cell cycle [7]. Marine invertebrates, including sea urchin gametes and embryos [8], have proven to be powerful models for conceptual advances in the cell cycle and its regulation [9]. Unfertilized sea urchin eggs are haploid cells, which arrest after completion of their meiotic divisions at the G1 stage. Fertilization triggers a rapid rise in protein synthesis independent of mRNA transcription and ribosome biogenesis [10,11]. De novo protein synthesis is dispensable for progression through S-phase but is required for M-phase completion [12,13].

The release of the eukaryotic initiation factor (eIF) 4E from the translational repressor eIF4E binding protein (4E-BP), also called phosphorylated heat- and acid-stable protein, insulin-stimulated (PHAS-I), is required upstream of cyclin B de novo synthesis and consequently is a critical event in the first mitotic division of sea urchin embryos [14].

* Corresponding author. Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Fax: +33-2-98-29-23-06.

E-mail address: cormier@sb-roscoff.fr (P. Cormier).

0014-4827/$ - see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.yexcr.2004.02.013

In mammalian cells, eIF4E is a major target for regulation of translation initiation [15]. eIF4E functions in conjunction with a large scaffolding protein eIF4G that interacts with several proteins, including eIF4E, eIF4A, and eIF3. eIF4G, provide a physical link between the mRNA 5′ end and the ribosome [16]. 4E-BPs compete with eIF4G for a common binding site on eIF4E [17]. Thus, 4E-BPs sequester eIF4E, and consequently prevent cap-dependent translation [18]. Only one 4E-BP ortholog has been described in invertebrates [19–21], while three 4E-BP homologs (4E-BP1, 4E-BP2, and 4E-BP3) exist in mammals [22,23]. Binding of 4E-BPs to eIF4E is reversible as the affinity of 4E-BPs for eIF4E is affected by their phosphorylation status [16]. In sea urchin, an additional mechanism of 4E-BP regulation has been described, involving rapid degradation of 4E-BP following fertilization [14]. This degradation coincides with phosphorylation of 4E-BP [21].

In mammals, multiple and hierarchical phosphorylation events are required to release 4E-BP1 from eIF4E [24]. A large body of evidence indicates that 4E-BP1 is a downstream target of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and the serine/threonine kinase Akt/protein kinase B (PKB) [25]. Moreover, PKB is itself a downstream effector of PI 3-kinase. 4E-BP has been demonstrated to be an effector of PI 3-kinase/Akt signaling in *Drosophila* [20]. 4E-BP phosphorylation is also dependent on FKBP12 and rapamycin-associated protein/mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) [26]. Whether FRAP-mTOR activity mediates responsiveness to PI 3-kinase or Akt remains controversial [16]. In sea urchin, fertilization triggers eIF4E release from 4E-BP and consequently cyclin B translation through a rapamycin-sensitive TOR pathway [14].

It has been shown that PI 3-kinase is present in sea urchin embryos and that PI 3-kinase activity increases following fertilization of sea urchin oocytes [27]. Since treatment with wortmannin, a potent inhibitor of PI 3-kinase [28], led to arrest of the cell cycle [27], we have analyzed the effects of wortmannin on cyclin B cap-dependent translation and on the CDK1 activation processes. Here, we report that wortmannin acts on the first mitotic division by two mechanisms, one that weakly affects de novo synthesis of cyclin B and a second that strongly affects dephosphorylation of the tyrosine inhibitory site of CDK1. We discuss the significance of these results concerning the cascade of reactions that impinge upon the activation of the CDK1/cyclin B complex that occurs following sea urchin oocyte fertilization.

Materials and methods

Chemicals

Acetylcholin, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF), glycine and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Interchim. Sodium orthovanadate, EDTA, EGTA, β-glycerophosphate; 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), dithiothreitol (DTT), N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesulfonic acid (HEPES), sodium fluoride, *p*-nitrophenyl phosphate, disodium phenylphosphate, leupeptin, aprotinin, soybean trypsin inhibitor, Tween 20, Triton X-100, protamine sulfate, rapamycin, LY 292004 and wortmannin were obtained from Sigma. [^{35}S] L-methionine (1000 Ci/mmol) was obtained from Amersham (France). Alexafluor 488 dextran was purchased from Molecular Probes, Eugene (OR, USA). Optiphase Supermix scintillation liquid was purchased from Perkin Elmer. ECL detection reagents, 7-methyl-GTP Sepharose 4B beads were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. Mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E was purchased from Transduction Laboratories (USA). Goat anti-mouse, rabbit anti-guinea pig, and swine anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase-coupled) were obtained from Dako SA (France). Polyclonal antibodies directed against sea urchin cyclin B [29] and against phosphotyrosine [30] were a generous gift from Professor Gérard Peaucellier and Dr. André Picard (Banyuls, France). Polyclonal antibodies directed against 4E-BP2 [31] were a generous gift from Professor Nahum Sonenberg (Montreal, Quebec, Canada).

Preparation of gametes and determination of cleavage rates

Sphaerechinus granularis sea urchins collected in the Brest area, were kept in running seawater and used within 5 days. Spawning of gametes, in vitro fertilization and culturing of eggs and embryos were performed as described [32]. Briefly, eggs were collected in 0.22-μm Millipore-filtered seawater (FSW), washed twice and suspended (10% or 5% suspension) in FSW containing 0.1% glycine. For 4E-BP and eIF4E association analyses, eggs were dejellied as described [21]. Shortly before use, 10 μl of dry sperm kept at 4°C was diluted in 1 ml of FSW, and 10 μl of this were added per ml of eggs suspension. More than 90% of the fertilized eggs raised fertilization membranes in all the experiments described in this paper. Stock solutions of 20 mM rapamycin was prepared in ethanol and 100 mM LY 292004 was prepared in methanol. Stock solution of 20 mM of wortmannin was prepared in DMSO. All three were stored at −20°C. A final concentration of 20 μM rapamycin or 20 μM wortmannin was added 10 min before fertilization to the egg suspensions or at indicated times after sperm addition. In microinjection experiments, dejellied unfertilized eggs were placed and stuck in a line on a 1% protamine sulfate-coated dish. Wortmannin or LY 292004 were diluted in a microinjection buffer (10 mM HEPES (pH 7.0), 200 mM KCl, 550 mM mannitol) containing 1 mM Alexafluor 488 dextran to allow visualization of injected eggs. The microinjection system we used resulted in the injection of approximately 1% of the volume of the egg [27]. Cleavage was scored by observation under a light microscope.

Preparation of extracts for 4E-BP analyses

At the indicated times following fertilization, cells were collected by centrifugation in a Heraeus Labofuge 4000 centrifuged for 2 min at 2000 rpm, the cell pellet was frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C. Cells extracts were prepared as described [21]. Briefly, cells were lysed in one cell volume of 2× binding buffer (40 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM β-glycerophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 20 mM tetrasodium pyrophosphate (PPi), 0.4 mM EDTA, 2 mM DTT, 100 mM NaCl, 100 mM AEBSF, and 20 μg/ml of aprotinin and leupeptin). Lysates were centrifuged in an Eppendorf 5415R centrifuge for 15 min at 14,000 rpm at 2°C. For quantification of 4E-BP, typically 50 to 100 μg of protein from the supernatant or from the pellet was directly resolved by one-dimensional (15% acrylamide) SDS/PAGE. The sea urchin translation elongation factor EF-1δ was used as a loading control.

Isolation of eIF4E

Isolation of eIF4E from unfertilized eggs and early development stages was performed as described [21] with the following modifications: supernatant of the extract was mixed with 25 μl of m^7GTP-sepharose beads (m^7GTP column). After a 60-min incubation at 4°C, unbound material was removed by three washes with 1 ml of binding buffer containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was directly added to the beads. Proteins bound to the beads were resolved by one-dimensional (15% acrylamide) SDS/PAGE using the Mini-PROTEAN 2 cell system (Bio-Rad Laboratories) and analyzed by Western blot.

Purification of CDK1/cyclin B for analysis of de novo synthesis of cyclin B

Every 15 min following fertilization, 1 ml (50 μl pelleted cells) of untreated or 20 μM rapamycin-treated or 20 μM wortmannin-treated embryos were pelleted by centrifugation for 5 s at full speed in an Eppendorf centrifuge and mixed with 400 μl ice-cold buffer containing 60 mM β-glycerophosphate; 15 mM *p*-nitrophenyl phosphate, 25 mM MOPS (pH 7.2), 15 mM $MgCl_2$; 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM disodium phenylphosphate, 1 mM AEBSF, 10 μg/ml soybean trypsin inhibitor, leupeptin 10 μg/ml; aprotinin 10 μg/ml, 100 mM benzamidine, 1% Triton. The eggs were then rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until further use. Cells were homogenized by repeated passage through a 25-gauge needle at 4°C. The homogenates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4°C. Using the ability of the 13-kDa product of the suc-1 gene from yeast to interact with CDK1 [33], the CDK1/cyclin B complex was extracted from 300 μl of clarified homogenate by affinity binding to $p13^{suc-1}$-sepharose beads, prepared using bacterially produced $p13^{suc-1}$ protein coupled to sepharose [34]. Extracts were incubated for 45 min under constant rotation at 4°C in the presence of $p13^{suc-1}$-sepharose beads. After three washes, Laemmli sample buffer was directly added to the beads. The CDK1/cyclin B complex was resolved by one-dimensional (12% acrylamide) SDS-PAGE and then analyzed by Western blot.

Western blot analyses

Western blot analyses were performed following electrophoretic-transfer of proteins from SDS/PAGE onto 0.22 μm nitrocellulose membranes [35]. 4E-BP was analyzed using rabbit polyclonal antibodies directed against human 4E-BP2 [31]. Polyclonal antibodies directed against sea urchin elongation factor 1δ were raised in a guinea pig against a glutathione S-transferase EF-1δ fusion protein [36]. eIF4E was analyzed using mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E (Transduction Laboratories). The tyrosine phosphorylation status of CDK1 was analyzed using a rabbit polyclonal antibody directed against phosphotyrosine [30].

Membranes were incubated with antibodies directed against 4E-BP2 (1:2000), eIF4E (1:2000), cyclin B (1:1000), EF-1δ (1:5000), or phosphotyrosine (1:1000) in 5% skimmed milk or 3% BSA for phosphotyrosine antibody and 0.1% Tween 20, 20 mM Tris–HCl, pH 7.6 at room temperature. The antigen–antibody complex was measured by chemiluminescence using horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies according to the manufacturer's instructions. Signals were quantified using the public domain NIH Image program (Written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

Determination of in vivo protein synthesis rates

Five percent (v/v) suspensions of unfertilized eggs were incubated for 1 h in 10 μCi/ml [^{35}S] L-methionine at 16°C. Cells were then rinsed in FSW and fertilized in the presence or absence of 20 μM rapamycin or 20 μM wortmannin. At the indicated times, 200 μl of cells was pelleted and frozen in liquid nitrogen. Cells extracts were prepared as described above for 4E-BP preparation and incorporation of radioactivity into protein was measured by TCA precipitation [12]. The results are expressed as percentage incorporation of [^{35}S] L-methionine into protein over total radioactivity taken up by the cells.

Results

Wortmannin-sensitive pathway analysis upstream of cyclin B de novo synthesis

Dissociation of 4E-BP/eIF4E complex and degradation of 4E-BP are mediated by a rapamycin-sensitive mTOR

pathway following fertilization in sea urchin[14]. Since it has been reported that 4E-BP represents a common target of the FRAP/mTOR and PI 3-kinase pathways [25], it is conceivable that treatment of sea urchin eggs with wortmannin, a well-established inhibitor of PI 3-kinase, could affect 4E-BP degradation and/or the dissociation of the 4E-BP/eIF4E complex triggered by fertilization.

The amount of 4E-BP bound to eIF4E was analyzed after eIF4E affinity purification on an m^7GTP column from eggs fertilized in the absence or presence of drugs (Fig. 1A). As previously reported, the 4E-BP/eIF4E complex dissociated rapidly following fertilization, and rapamycin inhibited the dissociation of the complex (compare left and right panels). Wortmannin also prevented 4E-BP/eIF4E dissociation (central panel), but less effectively than rapamycin. Similar results were obtained in three independent experiments (Fig. 1B). Therefore, while wortmannin affects 4E-BP/eIF4E dissociation following fertilization, the drug is less efficient in blocking this process than rapamycin.

To test the effect of wortmannin on 4E-BP degradation, the level of 4E-BP was monitored in control and in 20 μM wortmannin- or rapamycin-treated egg extracts prepared before fertilization or at the indicated times following fertilization. The degradation of 4E-BP following fertilization was partially inhibited in wortmannin-treated eggs, while 4E-BP was dramatically degraded in untreated eggs and 4E-BP levels remained constant in rapamycin-treated eggs (Fig. 1C). Similar results were obtained from five different females (Fig. 1D). Therefore, wortmannin prevented 4E-BP degradation, but less effectively than rapamycin.

Since wortmannin partially prevents 4E-BP degradation and 4E-BP/eIF4E dissociation, this drug could influence the increase in protein synthesis induced by fertilization. To test this possibility, translation rates were monitored by measuring incorporation of [^{35}S] L-methionine into de novo synthesized protein in the presence or absence of 20 μM wortmannin, and these rates were compared to 20 μM rapamycin-treated fertilized eggs (Fig. 2). Interestingly, wortmannin treatment induced a significant but smaller inhibition of global protein translation compared to the inhibition induced by treatment with rapamycin. This intermediate inhibitory effect of wortmannin on protein synthesis compared to rapamycin can be correlated with its effect on 4E-BP/eIF4E dissociation and 4E-BP degradation.

In *S. granularis*, de novo synthesized cyclin B protein is detected as early as 45 min after fertilization and rapamycin delays the appearance of this protein by over 60 min [14]. The effects of wortmannin and rapamycin on the synthesis of the cyclin B protein were compared following fertilization (Fig. 3). After affinity purification of CDK1/cyclin B complexes from embryos at the indicated times, cyclin B

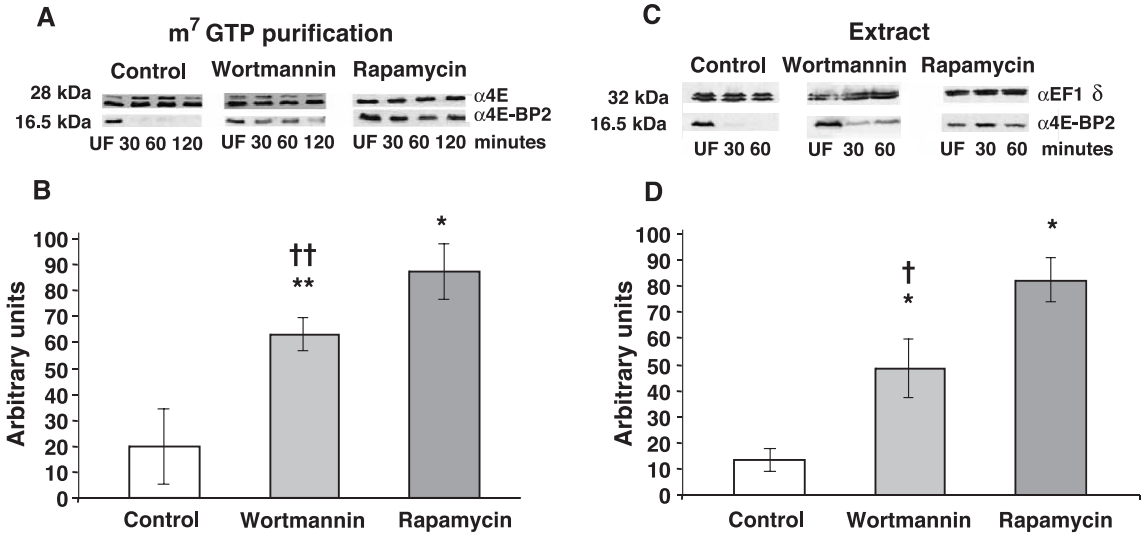


Fig. 1. Effect of wortmannin on 4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation after fertilization. (A) Wortmannin has an intermediate effect on eIF4E dissociation from 4E-BP. Proteins affinity-purified using a m^7GTP column before or at the indicated times following fertilization of control (left), wortmannin-treated (middle), or rapamycin-treated (right) eggs were subjected to Western blotting using human 4E-BP2 (bottom panels) or eIF4E (top panels) antibodies. (B) Quantitation of the level of 4E-BP associated with eIF4E from untreated (white box) or wortmannin-treated (light grey box) or rapamycin-treated eggs (dark grey box) at 60 min after fertilization. 4E-BP amount was normalized against 4E levels, and expressed as a percentage of the amount in unfertilized eggs. (C) Wortmannin has an intermediate effect on 4E-BP degradation. Total amount of 4E-BP (bottom panels), in control (left), wortmannin-treated eggs (middle) or rapamycin-treated eggs (right), obtained before and at indicated times after fertilization, was analyzed by Western blotting using polyclonal human 4E-BP2 antibodies. Sea urchin eEF-1δ antibody was used as a loading control (top panels). (D) Quantitation of the results obtained from control (white box), wortmannin-treated (light grey box) or rapamycin treated-eggs (dark grey box) at 60 min after fertilization. 4E-BP abundance was normalized using the loading control eEF-1δ levels, and expressed as a percentage of the amount in unfertilized eggs. Data are given as mean values ± SEM. Significance was assessed using the Fisher *F* test and Student's *t* test. Stars indicate a significative difference between the rapamycin- or wortmannin-treated eggs and the control (*corresponds to $P < 0.05$; **corresponds to $P < 0.1$). Crosses indicate significative difference between the wortmannin-treated and the rapamycin-treated eggs (†corresponds to $P < 0.05$; ††corresponds to $P < 0.1$).

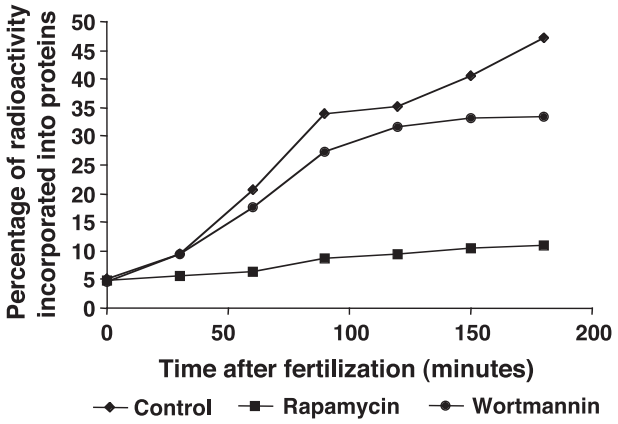


Fig. 2. Wortmannin partially affects the increase of protein synthesis triggered by fertilization. The rate of in vivo protein synthesis was monitored in untreated eggs (diamonds) or in 20 μM wortmannin-(circles) or 20 μM rapamycin-(squares) treated eggs. Embryos were labeled with [^{35}S]methionine and incorporation of radioactivity into TCA-precipitated proteins was determined at the indicated times after fertilization, as described in Materials and methods. This figure is representative of three experiments done with different females.

abundance was monitored by immunoblotting using a specific cyclin B antibody [29]. In control embryos, cyclin B protein was associated with CDK1 as early as 50 min after fertilization and the protein disappeared abruptly as the first mitotic division occurred at 110 min after fertilization (top panel). Interestingly, the appearance of cyclin B associated with CDK1 was delayed by 20–30 min following fertilization in wortmannin-treated embryos (middle panel), while cyclin B associated with CDK1 appeared with a delay of over 60 min following fertilization in rapamycin-treated embryos (bottom panels).

Taken together, these results show that a wortmannin-sensitive signaling cascade is involved upstream of a pathway that leads to eIF4E release from its inhibitor 4E-BP. The inhibitory effect of wortmannin on the cap-dependent translation machinery is correlated with a delay in the synthesis of cyclin B protein triggered by fertilization. Strikingly, for each drug, the level of inhibition of cyclin B synthesis correlates closely with the level of inhibition of 4E-BP degradation and 4E-BP/eIF4E dissociation.

A wortmannin-sensitive pathway exists upstream of the tyrosine dephosphorylation of CDK1 following fertilization

The results presented above showed that, in sea urchin, wortmannin only partially delays the cyclin B protein translation that is necessary for the CDK1/cyclin B activation triggered by fertilization. It has been previously published that the treatment of sea urchin eggs with 20 μM wortmannin dramatically inhibits the first mitotic division of the embryos [27]. Since our results showed that wortmannin has less effect on 4E-BP/eIF4E complex disruption and cyclin B synthesis than rapamycin, we then compared the effect of the two drugs on the first mitotic division of the embryo (Fig. 4). Unfertilized eggs were preincubated in the presence of 20 μM of rapamycin or wortmannin for 15 min and then fertilized and maintained in the presence of rapamycin or wortmannin. Fertilization and cleavage were scored by observation under a light microscope. Fertilization per se was affected neither by rapamycin nor wortmannin, since all the eggs showed normal elevated fertilization envelopes in the presence of rapamycin or wortmannin (data not shown). Interestingly, a dramatic arrest of the first mitotic cell division was induced by 20 μM wortmannin, while the first mitotic cleavage was significantly delayed by 20 μM rapamycin (Fig. 4A). This result demonstrates that wortmannin affects other early steps required for completion of the first mitosis of the sea urchin embryos in addition of those affected by rapamycin.

Wortmannin is a commonly used inhibitor of PI 3-kinase activity. In our system, the drug was used at a high concentration compared to that used in other cell types [37]. The need for a high concentration of wortmannin to

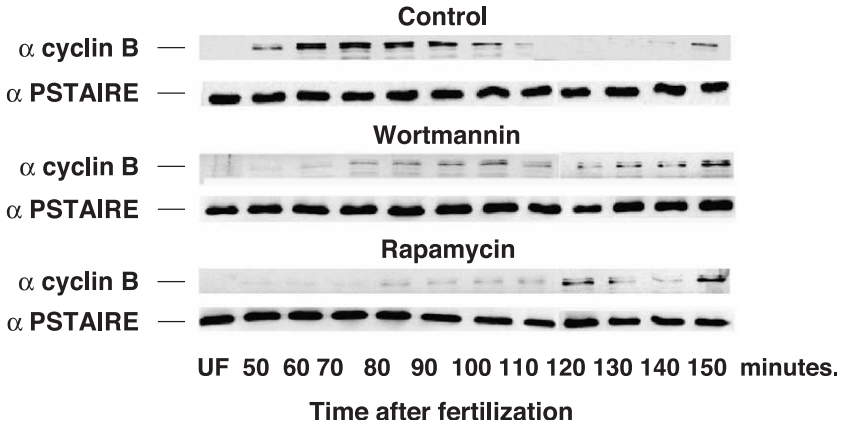


Fig. 3. Wortmannin delays cyclin B protein synthesis. CDK1/cyclin B complex was purified as described from eggs fertilized in the absence of drugs (top) or in the presence of 20 μM wortmannin (middle) or 20 μM rapamycin (bottom) at the indicated times after fertilization. Proteins were resolved by 12% SDS-PAGE and subjected to Western blotting analysis using sea urchin Cyclin B (top panels) or PSTAIRE antibodies (bottom panels).

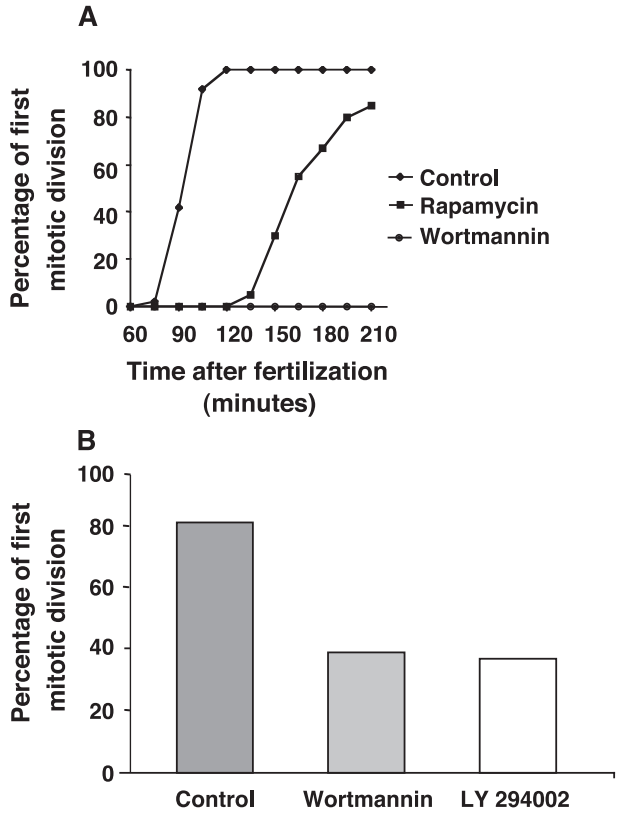


Fig. 4. Wortmannin and LY 294002 affect the first mitotic division of the sea urchin embryos. (A) Comparison of the effects of wortmannin and rapamycin treatment on the first mitotic division. Wortmannin (20 μM) and rapamycin (20 μM) were added before sperm addition. Cleavage rates were scored as described in Materials and methods for untreated embryos (diamonds) or for eggs treated 10 min before fertilization and maintained in the presence of wortmannin (circles) or rapamycin (squares). (B) Microinjection into unfertilized eggs of wortmannin and LY 292004 at final intracellular concentration of 1 μM and 50 μM, respectively. Control corresponds to unfertilized eggs microinjected with buffers. An average of 100 unfertilized eggs were injected for each compound. This figure is representative of two independent experiments.

affect the mitotic division of the embryo may be due to poor uptake of the drug into the egg [27] and the concentration within the cell may actually be much lower. However, we cannot rule out that application of wortmannin at this concentration leads to inhibit other kinases than PI 3-kinase.

In contrast, in an in vitro essay, wortmannin used at 1 μM has been shown to inhibit the PI 3-kinase and the smooth muscle myosin-like chain kinase (SmMLCK) activities but no other protein kinase activity [37]. Based on this observation, the effect of 1 μM wortmannin on the first mitotic division was tested by microinjection of the drug into the eggs. Strikingly, 1 μM wortmannin administered in this way affects significantly the first mitotic division (Fig. 4B). Since wortmannin used at this concentration inhibits also the SmMLCK, we next tested whether LY 294002, another

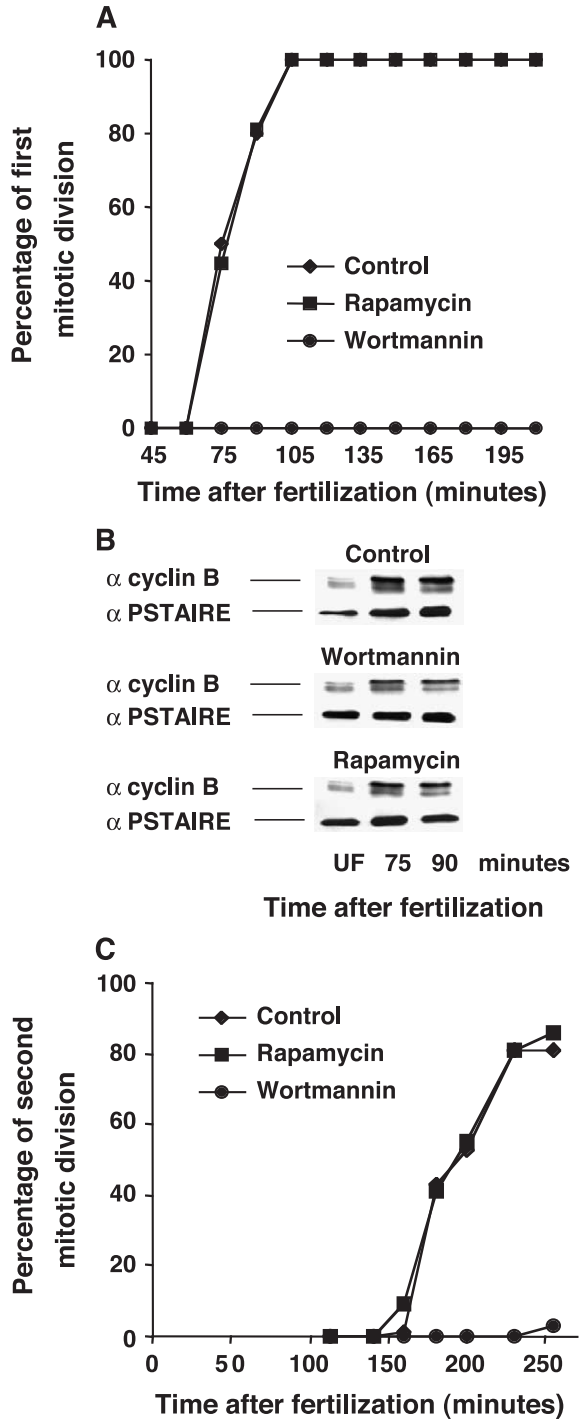


Fig. 5. Wortmannin affects the two first mitotic divisions by a rapamycin-independent pathway. (A) Wortmannin inhibits the first mitotic division when the drug is added 45 min after fertilization. Embryos were treated or not (diamonds) with 20 μM wortmannin (circles) or 20 μM rapamycin (squares) added 45 min after fertilization. Cleavage rate was monitored as described in materials and methods. (B) Wortmannin does not affect association of cyclin B with CDK1. The CDK1/cyclin B complex was purified as described from embryos treated or not (top) with 20 μM wortmannin (middle) or 20 μM rapamycin (bottom) added 45 min after fertilization. Proteins were resolved by 12% SDS-PAGE and subjected to Western blotting using sea urchin cyclin B (top panels), or PSTAIRE antibodies (bottom panels). (C) Wortmannin inhibits the second mitotic division when the drug is added after the eggs showed cytokinesis under the light microscope.

commonly used, but less potent, inhibitor of PI 3-kinase and a much weaker inhibitor of SmMLCK, could affect the cell cycle in sea urchin. In point of fact, 50 μM injected LY 294002 affects the first mitotic division to the same degree as 1 μM injected wortmannin (Fig. 4B). Taken together, these results argue strongly for the requirement of PI 3-kinase activity for the first mitotic division process following fertilization of sea urchin eggs.

Rapamycin affects the first mitotic division only if the drug is added during a period between fertilization and up to 30 min following fertilization [14]. Since the first mitotic division of sea urchin embryos is strongly sensitive to wortmannin, we asked whether wortmannin treatment of sea urchin after the rapamycin inhibitory period could affect the completion of the first mitotic cleavage. The effect of the drug added 45 min after fertilization was tested. Strikingly, wortmannin treatment dramatically blocked the first mitotic division, while as expected, 20-μM rapamycin had no significant effect neither on cleavage rates nor on cell cycle synchrony (Fig. 5A). Furthermore, neither rapamycin nor wortmannin affected cyclin B translation or CDK1/cyclin B complexes formation when added 45 min after fertilization (Fig. 5B). When wortmannin was added just after the first mitotic division of the embryos, that is, at the beginning of the second S-phase, the second mitotic cleavage was inhibited (Fig. 5C). Therefore, taken together, these data demonstrate that while both drugs affect early events that occur before cyclin B mRNA translation, wortmannin also affects events involved in the activation of the already formed CDK1/cyclin B complex.

It is well known that CDK1 activation is accompanied by dephosphorylation of Thr 14 and Tyr 15 [38] and it is accepted that dephosphorylation of the two residues is crucial for CDK1 activation [39]. Interestingly, it has been shown that wortmannin does not affect CDK1/cyclin B activity [27]. Therefore, it is possible that the dramatic effect of wortmannin observed in sea urchin could be due to alteration of the phosphorylation status of CDK1. To test this hypothesis, eggs were treated with wortmannin or rapamycin 45 min after fertilization (i.e., after the rapamycin-inhibitory period), and the rate of tyrosine dephosphorylation of CDK1 purified from embryos was investigated at the indicated times (Fig. 6). In control embryos, phosphorylated tyrosine in CDK1 was detected at 50 min, disappeared rapidly at 90 min and reappeared at 120 min following fertilization (Fig. 6A, top panel). The same pattern of tyrosine dephosphorylation was obtained when 20 μM rapamycin was used (Fig. 6A, middle panel). On the other hand, in wortmannin-treated embryos, no disappearance of phosphorylated tyrosine in CDK1 occurred for at least 150 min following fertilization (Fig. 6A, bottom panel). We checked that both untreated and wortmannin-treated embryos contained constant amounts of CDK1 throughout the course of the mitotic division (Fig. 6B). These results indicate that wortmannin affects the CDK1 tyrosine dephosphorylation process that is required for completion of the first mitosis in sea urchin embryos.

Discussion

In this study, we show that wortmannin treatment of eggs affects two biochemical events involved in the CDK1/cyclin B complex activation induced by fertilization in sea urchins. Firstly, we observed that wortmannin treatment affects weakly but reproducibly cyclin B protein synthesis. Secondly, we demonstrated that wortmannin inhibits the tyrosine dephosphorylation of CDK1 required for activation of the CDK1/cyclin B complex (and consequently necessary for the completion of the first mitotic cleavage of sea urchin embryos). Wortmannin has been shown to inhibit PI 3-kinase activity in sea urchins [27] and in other types of cells [40]. Therefore, our results suggest that PI 3-kinase is involved in two independent cascades of events, respectively, upstream of the cyclin B

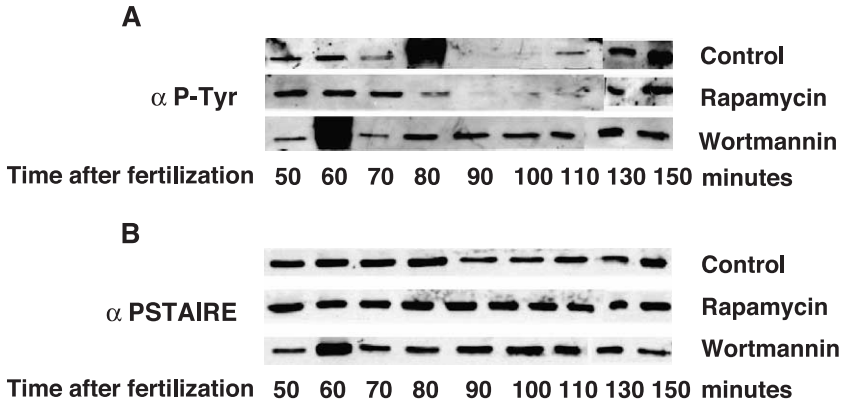


Fig. 6. Wortmannin inhibits CDK1 tyrosine dephosphorylation by a rapamycin-independent pathway. CDK1/cyclin B complex was purified as described in Materials and methods from untreated embryos (top panel) or from embryos treated 45 min after fertilization with 20 μM wortmannin (bottom panel) or 20 μM rapamycin (intermediate panel) at the indicated times following fertilization. Proteins were resolved by 12% SDS-PAGE and resolved by Western blotting using (A) phosphotyrosine antibodies and (B) PSTAIRE antibodies.

mRNA translation and upstream of the tyrosine dephosphorylation of CDK1/cyclin B complex induced by fertilization in sea urchins. This leads to several questions concerning the nature of these cascades in sea urchin embryos: (i) is the wortmannin-sensitive pathway involved in cyclin B synthesis following fertilization? (ii) Does PI 3-kinase participate in CDK1 tyrosine dephosphorylation? (iii) What is the precise relationship between the FRAP/mTOR and the PI 3-kinase pathways?

Wortmannin effects on the increase in protein synthesis triggered by fertilization

Fertilization of sea urchin eggs triggers an increase in protein synthesis, an early event that is necessary for completion of the first mitotic division of the embryos. Wortmannin had little effect on the increase in protein synthesis triggered by fertilization in sea urchin. In contrast, in mammalian cells, wortmannin strongly reduces the protein synthesis stimulated by insulin [41], by far the best characterized effector of protein synthesis in cell culture [42]. Wortmannin has also been shown to strongly influence protein synthesis rates in human lymphocytes stimulated by ionomycin and phorbol ester [43]. The basis of the difference in wortmannin's effect on protein synthesis in mammalian cells and in the fertilized sea urchin oocyte is currently unknown. A likely explanation is that wortmannin-sensitive targets represent minor signaling pathways upstream of the increase in protein synthesis triggered by fertilization, suggesting that the activation of protein synthesis can be modulated by multiple pathways depending on the cell type and/or the stimuli. Such a possibility is illustrated in meiotic maturation of Xenopus oocytes where the translation initiation factors are differentially regulated by insulin or progesterone stimulation [44].

Our current data show that wortmannin only weakly inhibits the increase in protein synthesis and this correlates with a partial inhibition of eIF4E release from 4E-BP compared to the inhibition induced by rapamycin treatment. This partial inhibition is also correlated with limited delay in cyclin B protein synthesis. The more the 4E/4E-BP complex dissociation is affected, the more cyclin B translation is delayed. Therefore, our data strengthen the notion that cyclin B mRNA translation is under a cap-dependent translation mechanism following fertilization of sea urchin oocytes. Requirement for eIF4E release from its repressor has also been described in other systems. For example, cyclin B translation during progesterone-induced meiotic maturation requires the release of eIF4E from maskin [45]. In human vascular cells, growth factor stimulation induces hyperphosphorylation of 4E-BP1 through rapamycin- and wortmannin-sensitive pathways and is associated with increases in the protein levels of cyclin B1, among other cell cycle proteins [46]. Therefore, the results of the present study highlight the significance of cap-dependant translational regulation of cyclin B.

Wortmannin inhibits the dephosphorylation of phosphotyrosine residue on CDK1

Our data show that wortmannin weakly affects cyclin B translation and also strongly affects events required for the activation of the already formed CDK1/cyclin B complex, while rapamycin affects only early events that occur before cyclin B mRNA translation. However, the weak effect of wortmannin treatment on the cyclin B synthesis cannot explain the drastic effect of the drug on the mitotic division, in agreement with previous work carried out with another species of sea urchin [27]. In starfish, it has been reported that wortmannin blocks 1-methyladenine-induced oocyte maturation [47] and germinal vesicle breakdown (GVBD) induced by a heterotrimeric G protein composed of a pertussis toxin G_i-type subunit and a $\beta\gamma$ subunit [48]. Interestingly, during oocyte meiotic maturation, protein synthesis is not required for the first MPF activation and GVBD in starfish oocytes, [49,50] strengthening the notion that wortmannin can affect the cell division process independently of translation inhibition.

The phosphorylation status of CDK1 associated with cyclin B is important for the activity of the complex [1,51]. We show that wortmannin inhibits dephosphorylation of the CDK1 inhibitory tyrosine residue when the drug is added 45 min after fertilization. On the other hand, rapamycin added at the same time does not alter tyrosine dephosphorylation and consequently does not affect the completion of the first mitosis of the sea urchin embryos, in agreement with our previous work [14]. This result reinforces the notion that the two drugs may affect different signaling pathways upstream of the CDK1/cyclin B activation induced by fertilization of the sea urchin oocytes. Both rapamycin and wortmannin have been shown to reduce the cell proliferation rate of many different cell types. Since we demonstrate here that wortmannin is able to inhibit dephosphorylation of an inhibitory site of the CDK1/cyclin B complex, this wortmannin-sensitive pathway has to be considered in relation to the effect of the drug on the cell proliferative rate.

PI 3-kinase involvement in CDK1/cyclin B complex activation

Wortmannin is considered to be a relatively selective inhibitor of classical PI 3-kinase [40,52]. Therefore, our results suggest that PI 3-kinase could be involved in two different steps upstream of CDK1/cyclin B activation.

One possible explanation for the small effect of wortmannin on translation during the early development of sea urchin is that PI 3-kinase is less sensitive to the drug in this context than in other cell types, in agreement with what has been already published [27]. A more likely explanation is that the wortmannin-associated effect is a consequence of partial inhibition of the FRAP/mTOR kinase activity instead of PI 3-kinase inhibition. This

hypothesis is possible since it has been demonstrated that the signaling functions of FRAP/mTOR can be directly affected by cellular treatment with wortmannin [53]. Therefore, the PI 3-kinase pathway may not act upstream of the activation of mTOR triggered by fertilization of sea urchin oocytes. It would be interesting to identify and analyze the signaling pathway that acts upstream of mTOR activation and consequently controls the synthesis of cyclin B, among other proteins, following fertilization of sea urchin oocytes.

We show a drastic effect of 20 μM wortmannin on cell division following sea urchin fertilization. Furthermore, following injection of two structurally unrelated inhibitors of PI 3-kinase, we observed the same inhibition of the first mitotic division. These results suggest that PI 3-kinase activity is required for the entry into mitosis following fertilization of the sea urchin egg. Our data also demonstrate that a wortmannin-sensitive pathway controls tyrosine dephosphorylation of CDK1 suggesting that a PI 3-kinase is involved in this process. The tyrosine phosphorylation state is a consequence of two opposing enzyme activities, CDC25C phosphatase and protein kinases of the Wee1 family. Therefore, our results suggest that PI 3-kinase could be involved upstream of the signaling pathway that acts on either the activation of the activatory phosphatase or the inhibition of the inhibitory kinase. Interestingly, it has been demonstrated recently that during the starfish meiotic transition induced by 1-MA, the kinase Akt (or protein kinase B (PKB)) phosphorylates and down-regulates Myt1, a member of the Wee1 family [54]. This switches the balance of tyrosine phosphorylation on CDK1 and provokes tyrosine dephosphorylation of CDK1 leading to activation of CDK1/cyclin B [54]. Since the Akt protein kinases are activated by PI 3-kinase-generated lipid products [55], an interesting hypothesis would be that this signaling pathway is involved in the tyrosine phosphorylation inhibition of CDK1 that we observed in wortmannin-treated embryos of sea urchin.

We thus propose a model to summarize the interplay between PI 3-kinase and FRAP/mTOR and the activation of the CDK1/cyclin B complex following fertilization (Fig. 7). The model posits that fertilization triggers activation of PI 3-kinase and FRAP/mTOR. Since wortmannin weakly affects eIF4E release from 4E-BP, PI 3-kinase represents a minor signaling pathways upstream of the increase in protein synthesis of cyclin B. Consequently, the nature of the main signaling pathway that acts upstream of TOR activation remains to be determined. Since wortmannin strongly inhibits the dephosphorylation of tyrosine-phosphorylated sites of the CDK1/cyclin B complex, PI 3-kinase participates upstream of the regulation of the tyrosine phosphorylation status of CDK1. Therefore, the role of CDC25C or Wee protein kinase family downstream of the PI 3-kinase signaling pathway remains to be determined.

Acknowledgments

We thank Professor Nahum Sonenberg for the gift of 4E-BP2 antibody and helpful discussion, Professor Gérard Peaucellier and Dr. André Picard for the gift of cyclin B and phosphotyrosine antibodies, and Christelle Sourdin for technical assistance. We are grateful to Dr. Stéphane Egée for helpful comments and Dr. Mark Cock for manuscript corrections. Travel costs were supported by Université Pierre et Marie Curie (Paris, France). This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC no. 4247, France, PC) and Ligue Nationale contre le Cancer (France, PC) and Conseil Régional de Bretagne.

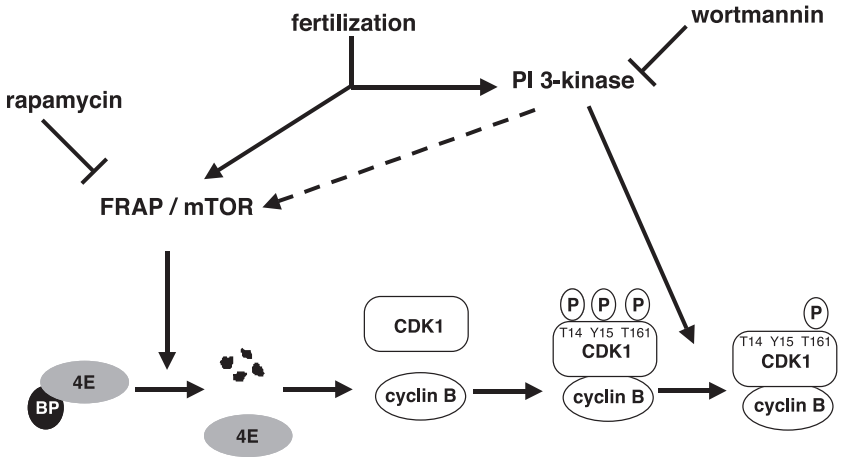


Fig. 7. Schematic diagram illustrating the role played by the wortmannin-sensitive pathway in the CDK1/cyclin B activation triggered by fertilization of sea urchin oocytes. Fertilization triggers activation of PI 3-kinase and FRAP/mTOR. PI 3-kinase acts mainly on the dephosphorylation of the inhibitory tyrosine phosphorylated site of CDK1 associated with cyclin B, while it has a weak effect on the FRAP/mTOR dependent pathway that acts upstream of cyclin B translation.

References

[1] E.A. Nigg, Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints, Nat. Rev., Mol. Cell. Biol. 2 (2001) 21–32.

[2] P.H. O'Farrell, Triggering the all-or-nothing switch into mitosis, Trends Cell Biol. 11 (2001) 512–519.

[3] L. Meijer, D. Arion, R. Golsteyn, J. Pines, L. Brizuela, T. Hunt, D. Beach, Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase, EMBO J. 8 (1989) 2275–2282.

[4] J. Minshull, J.J. Blow, T. Hunt, Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated Xenopus eggs to enter mitosis, Cell 56 (1989) 947–956.

[5] L. Meijer, L. Azzi, J.Y. Wang, Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation, EMBO J. 10 (1991) 1545–1554.

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

[7] A.W. Murray, M.W. Kirschner, Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle, Nature 339 (1989) 275–280.

[8] D. Epel, The initiation of development at fertilization, Cell Differ. Dev. 29 (1990) 1–12.

[9] P. Nurse, The incredible life and times of biological cells, Science 289 (2000) 1711–1716.

[10] B. Brandhorst, D. Fromson, Lack of accumulation of ppGpp in sea urchin embryos, Dev. Biol. 48 (1976) 458–460.

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

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

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

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

[15] N. Sonenberg, A.C. Gingras, The mRNA 5′ cap-binding protein eIF4E and control of cell growth, Curr. Opin. Cell Biol. 10 (1998) 268–275.

[16] B. Raught, A.C. Gingras, N. Sonenberg, Regulation of ribosomal recruitment in eukaryotes, in: N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, M.B. Mathews (Eds.), Translational Control of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000, pp. 245–293.

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

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

[19] A. Bernal, D.A. Kimbrell, *Drosophila* thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity, Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 6019–6024.

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

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

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

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

[24] A.C. Gingras, B. Raught, S.P. Gygi, A. Niedzwiecka, M. Miron, S.K. Burley, R.D. Polakiewicz, A. Wyslouch-Cieszynska, R. Aebersold, N. Sonenberg, Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1, Genes Dev. 15 (2001) 2852–2864.

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

[26] A.C. Gingras, B. Raught, N. Sonenberg, Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR, Genes Dev. 15 (2001) 807–826.

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

[28] A. Arcaro, M.P. Wymann, Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses, Biochem. J. 296 (1993) 297–301.

[29] J.C. Lozano, P. Schatt, F. Marques, G. Peaucellier, P. Fort, J.P. Feral, A.M. Geneviere, A. Picard, A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin B splice variant, J. Cell Biol. 140 (1998) 283–293.

[30] G. Peaucellier, P.A. Veno, W.H. Kinsey, Protein tyrosine phosphorylation in response to fertilization, J. Biol. Chem. 263 (1988) 13806–13811.

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

[32] J. Marc, O. Mulner-Lorillon, S. Boulben, D. Hureau, G. Durand, R. Belle, Pesticide roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 326–331.

[33] W.G. Dunphy, L. Brizuela, D. Beach, J. Newport, The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis, Cell 54 (1988) 423–431.

[34] D. Arion, L. Meijer, 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 (1989) 361–375.

[35] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (1979) 4350–4354.

[36] C. Delalande, R. Belle, P. Cormier, O. Mulner-Lorillon, Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266 (1999) 425–431.

[37] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors, Biochem. J. 351 (2000) 95–105.

[38] A. Kumagai, W.G. Dunphy, The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system, Cell 64 (1991) 903–914.

[39] W. Krek, E.A. Nigg, Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites, EMBO J. 10 (1991) 305–316.

[40] M. Ui, T. Okada, K. Hazeki, O. Hazeki, Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase, Trends Biochem. Sci. 20 (1995) 303–307.

[41] R. Mendez, M.G. Myers Jr., M.F. White, R.E. Rhoads, Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase, Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2857–2864.

[42] R.E. Rhoads, Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis, J. Biol. Chem. 274 (1999) 30337–30340.

[43] S. Miyamoto, S.R. Kimball, B. Safer, Signal transduction pathways

that contribute to increased protein synthesis during T-cell activation, Biochim. Biophys. Acta 1494 (2000) 28–42.

[44] S.J. Morley, V.M. Pain, Hormone-induced meiotic maturation in Xenopus oocytes occurs independently of p70s6k activation and is associated with enhanced initiation factor (eIF)-4F phosphorylation and complex formation, J. Cell Sci. 108 (1995) 1751–1760.

[45] Q. Cao, J.D. Richter, Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation, EMBO J. 21 (2002) 3852–3862.

[46] R.C. Braun-Dullaeus, M.J. Mann, U. Seay, L. Zhang, H.E. von Der Leyen, R.E. Morris, V.J. Dzau, Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin, Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 21 (2001) 1152–1158.

[47] K.C. Sadler, J.V. Ruderman, Components of the signaling pathway linking the 1-methyladenine receptor to MPF activation and maturation in starfish oocytes, Dev. Biol. 197 (1998) 25–38.

[48] T. Nakano, K. Kontani, H. Kurosu, T. Katada, M. Hoshi, K. Chiba, G-protein betagamma subunit-dependent phosphorylation of 62-kDa protein in the early signaling pathway of starfish oocyte maturation induced by 1-methyladenine, Dev. Biol. 209 (1999) 200–209.

[49] M.S. Houk, D. Epel, Protein synthesis during hormonally induced meiotic maturation and fertilization in starfish oocytes, Dev. Biol. 40 (1974) 298–310.

[50] A. Picard, G. Peaucellier, F. Le Bouffant, C. Le Peuch, M. Doree, Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation-promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes, Dev. Biol. 109 (1985) 311–320.

[51] D.J. Lew, S. Kornbluth, Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control, Curr. Opin. Cell Biol. 8 (1996) 795–804.

[52] G. Powis, R. Bonjouklian, M.M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W.F. Matter, J. Dodge, G. Grindey, et al., Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, Cancer Res. 54 (1994) 2419–2423.

[53] G.J. Brunn, J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J.C. Lawrence Jr., R.T. Abraham, Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, EMBO J. 15 (1996) 5256–5267.

[54] E. Okumura, T. Fukuhara, H. Yoshida, S. Hanada, R. Si, M. Kozutsumi, K. Mori, T. Tachibana, Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition, Nat. Cell Biol. 4 (2002) 111–116.

[55] B.M. Marte, J. Downward, PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond, Trends Biochem. Sci. 22 (1997) 355–358.

III) Régulation de 4E-BP au cours du développement précoce de l'oursin et identification d'une nouvelle forme de 4E-BP

Article 3 : Salaun, P., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., Morales, J., and Cormier, P. Embryonic stage-dependent changes in the level of eIF4E binding proteins during early development of sea urchin embryos. *J. Cell. Science* submitted.

Dans ce troisième article, nous avons regardé si la protéine 4E-BP qui est dégradée rapidement après fécondation, réapparaissait au cours du développement embryonnaire de l'oursin. Lors de cette étude, nous avons mis en évidence une nouvelle forme plus lourde de 4E-BP que nous avons appelé H4E-BP (Heavy 4E-BP).

Résultats :

Dans un premier temps, nous démontrons que 4E-BP régule de manière directe la première mitose de l'oursin. Nous avons utilisé une construction peptidique ayant pour motif la séquence acides aminés du site de liaison de 4E-BP pour eIF4E (YXXXXLΦ). La micro-injection de ce peptide dans les oeufs, retarde considérablement la première division mitotique (article 3, figure 1).

4E-BP pouvant donc être considéré comme un régulateur du cycle cellulaire, nous avons ensuite analysé sa régulation au cours du développement de l'oursin. Un suivi de la protéine en Western-blot a révélé que 4E-BP réapparaît environ 10 heures après fécondation. De plus des approches par far-Western et purification sur colonne m^7GTP montrent qu'il est alors capable de s'associer également à eIF4E (article 3, figure 6).

Au cours de ces expériences, nous avons découvert l'existence d'une nouvelle forme de 4E-BP que nous avons appelée H4E-BP. Cette protéine de 40 kDa est associée

à eIF4E dans les oeufs non fécondés, dissociée et dégradée post-fécondation *via* une voie rapamycine-sensible (article 3, figure 5). H4E-BP est aussi reconnue par une sonde 4E-HMK en far-Western (article 3, figure 5). Par ailleurs, tout comme 4E-BP, H4E-BP réapparaît vers 10 heures après la fécondation (article 3, figure 6).

Une étude par filtration sur gel révèle que H4E-BP, 4E-BP et eIF4E se trouvent au sein de mêmes fractions, vers 80 kDA, laissant ainsi supposer l'existence d'un complexe trimérique dans les oeufs non fécondés (article 3, figure 2 et 3).

Analyses des résultats :

Les expériences de micro-injection démontrent que 4E-BP est un régulateur du cycle cellulaire. Ce répresseur se place ainsi à l'interface entre traduction et cycle en accord avec ce que nous avions démontré dans les deux premiers articles.

Ce résultat est d'autant plus remarquable que 4E-BP est lui-même régulé au cours du développement. Ainsi, il semble que cette protéine joue aussi un rôle dans le contrôle développemental de l'embryon d'oursin.

H4E-BP est une nouvelle protéine capable de s'associer à eIF4E. C'est la première fois que l'existence d'une protéine possédant toutes les caractéristiques de 4E-BP mais avec un poids moléculaire plus important est démontrée.

Dans les oeufs non fécondés, eIF4E est associée à 4E-BP mais aussi à H4E-BP. Par la technique de filtration sur gel, il nous a été impossible de discriminer deux complexes différents. De plus, le fait que l'on retrouve ces trois protéines dans une fraction de 80 kDa suppose l'existence d'un complexe trimérique.

Conclusions:

La fécondation provoque la dissociation de eIF4E avec 4E-BP et H4E-BP ainsi que la dégradation de ces dernières. Ces processus sont tous deux rapamycine-sensibles indiquant un éventuel contrôle par FRAP / mTOR.

Vers 10 heures post-fécondation, 4E-BP et H4E-BP réapparaissent et sont toutes deux associées à eIF4E (Figure 19).

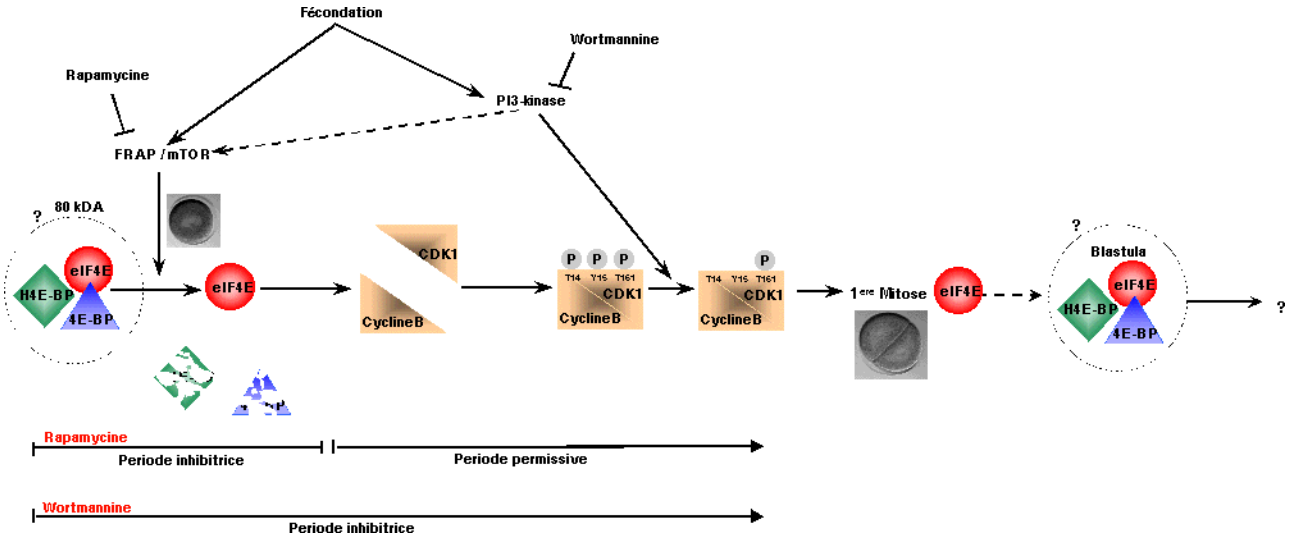


Figure 19 : bilan de l'article 3

Embryonic stage-dependent changes in the level of eukaryotic initiation factor 4E binding proteins during early development of sea urchin embryos

Patrick Salaün[1], Sandrine Boulben[1], Odile Mulner-Lorillon[1], Robert Bellé[1], Nahum Sonenberg[2], Julia Morales[1] and Patrick Cormier[1,*]

[1]Station Biologique de Roscoff, Cycle Cellulaire et Développement, Unité Mer et Santé, Université Pierre et Marie Curie (EI 37), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National des Sciences de l'Univers (INSU), BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

[2]Department of Biochemistry and McGill Cancer Center, McGill University, Montreal, Quebec H3G1Y6, Canada

*Address for correspondence: Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. fax: +33-2-98-29-23-06 (e-mail: cormier@sb-roscoff.fr)

Running title: 4E-BP in sea urchin embryonic development

Summary

The eIF4E-binding proteins (4E-BPs) inhibit translation initiation by binding eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and preventing recruitment of the translation machinery to mRNA. We have previously shown that fertilization of sea urchin eggs triggers eIF4E/4E-BP complex dissociation and 4E-BP degradation. Here, we show that microinjection of eIF4E-binding motif peptide into unfertilized eggs delays the onset of the first mitosis triggered by fertilization, demonstrating that dissociation of the eIF4E/4E-BP complex is functionally important for the first mitotic division in sea urchin embryos. We also show by gel filtration analyses that eIF4E is present in unfertilized eggs as an 80-kDa molecular weight complex containing 4E-BP and a new eIF4E-binding protein of 40-kDa. Fertilization triggers the dissociation of eIF4E from these two 4E-BP proteins and triggers the rapid recruitment of eIF4E into a high molecular weight complex. Release of eIF4E from the two 4E-BP proteins is correlated with a decrease in the total level of both 4E-BP proteins following fertilization. Abundance of the two 4E-BP proteins has been monitored during embryonic development. The level of the two proteins remains very low during the rapid cleavage stage of early development and increases 8 hours after fertilization. These results demonstrate that these two 4E-BP proteins are down- and up-regulated during the embryonic development of sea urchins. Consequently, these data suggest that eIF4E availability to other partners represents an important determinant of early development of sea urchin embryos.

Key words: eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E), eIF4E binding protein (4E-BP), Cap-dependent translation, Cell cycle, Sea urchin, Embryonic development

Introduction

Regulation of mRNA translation is an important regulatory step in gene expression in different physiological and physiopathological processes including development (Wickens et al., 2000), apoptosis (Clemens et al., 2000), cell proliferation (Mathews et al., 2000) and cancer pathogenesis (Holland et al., 2004). The eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) is a major target for regulation of translation initiation (Sonenberg and Gingras, 1998; Raught et al., 2000) and plays an important role in the regulation of the cell cycle (Mamane et al., 2004). eIF4E is also thought to have a role during reproduction and embryogenesis (Klein and Melton, 1994; Amiri et al., 2001; Cormier et al., 2001; Robalino et al., 2004).

eIF4E is a mRNA cap binding protein (Sonenberg et al., 1978) and is a major target for the regulation of cap-dependent translation (Sonenberg et al., 1979). eIF4E functions in conjunction with eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G), a large scaffolding protein which acts as a docking site for several proteins including eIF4A and eIF3 (eukaryotic initiation factor 4A and 3, respectively). eIF4E binding protein (4E-BP), also called phosphorylated heat-and-stable protein, insulin-stimulated (PHAS-I), is a small protein which inhibits cap-dependent translation (Haghighat et al., 1995) by competing with eIF4G for a common site on eIF4E (Mader et al., 1995). While three 4E-BP homologs (4E-BP1, 4E-BP2, and 4E-BP3) exist in mammals (Pause et al., 1994; Poulin et al., 1998), only one ortholog has been described in invertebrates (Bernal and Kimbrell, 2000; Cormier et al., 2001; Miron et al., 2001). In mammals, binding of 4E-BPs to eIF4E is regulated by their phosphorylation state. Underphosphorylated forms of 4E-BPs interact with eIF4E, whereas the hyperphosphorylated forms do not (Pause et al., 1994). 4E-BP is a downstream effector of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and the Akt/protein kinase B (PKB) (Gingras et al., 1998). In mammalian cells, 4E-BP phosphorylation is also dependent on FKBP12 and rapamycin associated protein/mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) (Gingras et al., 2001). In sea urchin,

4E-BP is rapidly phosphorylated (Cormier et al., 2001) and degraded following fertilization, and this involves a rapamycin-sensitive TOR signalling pathway (Salaün et al., 2003).

Previous results suggested that the release of eIF4E from its translational repressor 4E-BP is a critical event for the first mitotic division following fertilization (Salaün et al., 2003). Unfertilized sea urchin eggs are haploid cells that are arrested after completion of their mitotic division at the G1 stage. Fertilization triggers entry into S-phase and completion of the first mitotic division. Then a rapid and synchronous cleavage period occurs consisting primarily of successive M- and S-phases corresponding to cell division without an increase in overall mass (Hinegardner et al., 1964). The division synchrony in all blastomeres lasts only until the fourth cell division and a regional synchrony appears that is associated with a progressive increase of the cycle lengths of cell division (Masuda and Sato, 1984). At the blastula stage prior to hatching, the regional synchrony vanishes and then the divisions proceed asynchronously (Masuda and Sato, 1984).

We took advantage of this system to analyze the association of eIF4E with 4E-BP during these different cell divisions following fertilization of eggs and during the early development of sea urchin embryos. Here we show that microinjection of a peptide corresponding to the eIF4E-binding site of 4E-BP1 protein affects the first mitotic division triggered by fertilization. We report the existence of a heavy 4E-BP like protein that associates with eIF4E and we show that during subsequent embryonic development, the amount of 4E-BP proteins is highly regulated. Taken together, our results suggest that eIF4E release from these two 4E-binding proteins, and consequently eIF4E availability to other partners, are critical events for cell divisions occurring during the embryogenesis of sea urchins.

Materials and Methods

Reagents

Acetylcholine, 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF) and glycine were purchased from Interchim. Sodium orthovanadate, EDTA, EGTA, β-glycerophosphate, dithiothreitol (DTT), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*′-2-ethanesulfonic acid (HEPES), sodium fluoride, *p*-nitrophenyl phosphate, disodium phenylphosphate, leupeptin, aprotinin, Tween 20, protamine sulfate, rapamycin, were obtained from Sigma. [γ-^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) was obtained from Amersham (France). Alexafluor 488 dextran was purchased from Molecular Probes (USA). ECL detection reagents, 7-methyl-GTP Sepharose 4B beads and a Sepachryl S-200 high resolution column were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (France). Rabbit polyclonal antibodies directed against human 4E-BP2 have been described previously (Rousseau et al., 1996). Mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E was purchased from Transduction Laboratories (USA). Anti-mouse actin and anti-mouse tubulin antibodies were purchased from Sigma. Goat anti-mouse and swine anti-rabbit IgG (horseradish peroxidase-coupled) were obtained from Dako (France). The 4E-BP1 wild type and mutated peptides were a gift from Professor Christopher Proud (University of Dundee, UK). The amino acid sequence of the wild type peptide is RII<u>Y</u>DRKF<u>L</u>MEC. The mutated peptide corresponds to the wild type modified sequence where the tyrosine and the leucine (underlined) are changed to alanine: RII<u>A</u>DRKF<u>A</u>MEC.

Preparation of gametes and determination of cleavage rates

Sphaerechinus granularis sea urchins collected in the Brest area, were kept in running seawater and used within 5 days. Spawning of gametes, in vitro fertilization and culturing of eggs and embryos in Millipore filtered seawater were performed as described previously (Marc et al., 2002). A stock solution of 20 mM rapamycin was prepared in ethanol and stored

at –20°C. A final concentration of 20 μM rapamycin was added to eggs 10 minutes before fertilization. In microinjection experiments, dejellied unfertilized eggs were placed in a line on a 1% protamine sulfate-coated dish. 4E-BP1 peptides were diluted at 10 mM final concentration in a microinjection buffer (10 mM HEPES (pH 7.0), 200 mM KCl, 550 mM mannitol) containing 1 mM Alexafluor 488 dextran to allow visualization of injected eggs. The microinjection system resulted in the injection of approximately 1% of the volume of the egg (De Nadai et al., 1998). Cleavage was scored by observation under a light microscope.

Preparation of cell lysates

At the indicated times following fertilization, cells were collected by centrifugation in a Heraeus Labofuge 4000 centrifuge for 2 minutes at 2000 rpm; the cell pellet was frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Cells were lysed by passage through a 25 G syringe in one cell volume of 2x binding buffer (40 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM β-glycerophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM ATP, 20 mM tetrasodium pyrophosphate (PPi), 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 100 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF), and 20 μg/ml of aprotinin and leupeptin). For gel filtration experiments and immunopurification of 4E-BP proteins, cell lysates were centrifuged for 30 minutes at 4000 rpm (HS-4 rotor) at 4°C in a Jouan KR 22 centrifuge. For all other experiments, cell lysates were centrifuged for 15 minutes at 14,000 rpm at 4°C in an Eppendorf centrifuge 5415R and the supernatants were stored at –20°C before use. Protein quantification was performed in duplicate by the Bradford essay.

Gel filtration experiments

After centrifugation of cell lysates, supernatants were recovered and centrifuged for 1 hour at 100,000x*g* at 4°C in a Beckman XL-70 ultracentrifuge. Cytosols were then filtered through a 22 μm filter and loaded onto a Sephacryl 200 high resolution XK16/70 column equilibrated

with 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM EDTA. Gel filtrations were carried out using a High Precision Pump P-500 and a LV-3 valve (Amersham, France). Fractions were collected in 5 ml plastic tubes using a graduated cylinder and stored at –20°C. Typically, 20 µl of each fraction were loaded for SDS-PAGE and blot analyses.

Isolation of eIF4E and associated proteins

Isolation of eIF4E from the gel filtration elution fractions or from egg extracts was performed using m^7GTP beads as described in Salaün et al. (2004). Briefly, extracts were mixed with 25 µl of m^7GTP-Sepharose beads (m^7GTP column). After 60 minutes incubation at 4°C, columns were washed three times with 1 ml of 1x binding buffer containing 100 mM NaCl. Laemmli sample buffer was directly added to the beads. Typically, half of the purified sample was loaded for SDS-PAGE and blot analyses.

Immunopurification of sea urchin 4E-BPs

After centrifugation of cell lysates, supernatants were recovered and centrifuged for 1 hour at 100,000x*g* at 4°C in a Beckman XL-70 ultracentrifuge. Five hundred microliters of recovered supernatants were incubated for 2 hours at 4°C in batches with 1% BSA-pre-saturated immobilized protein A beads (50 µl packed beads) covalently coupled to 4E-BP2 antibodies, in 1 ml of an IP buffer (50 mM Tris–HCl (pH 7.6), 500 mM NaCl and 1% Nonidet P40). Beads were then washed three times in the IP buffer and twice in 500 mM NaCl and 50 mM Tris–HCl (pH 7.6). Laemmli sample buffer was directly added to the beads. Typically, one-third of the sample was loaded for SDS-PAGE and blot analyses.

Western-blot analyses

Cell extracts, gel filtration eluted fractions or proteins bound to the m^7GTP beads were resolved by one-dimensional (15% acrylamide) SDS/PAGE using the Mini-Protean 2 cell system (Bio-Rad laboratories) and analyzed by Western blotting. Western blot analyses were

performed using 0.22 μm nitrocellulose membranes (Towbin et al., 1979). Membranes were incubated with rabbit polyclonal antibodies directed against human 4E-BP2 (1:2000) (Rousseau et al., 1996), mouse monoclonal antibody directed against rabbit eIF4E (1:2000), or mouse monoclonal antibody directed against human tubulin (1:1000) or directed against human actin (1:2000) in 20 mM Tris–HCl (pH 7.6), 5% skimmed milk and 0.1% Tween 20 at room temperature. Antigen-antibody complexes were measured by chemiluminescence using horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies and ECL reagent. Signals were quantified using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

Far-Western analysis

Far-Western blots were performed using ^{32}P-labelled, HMK-tagged recombinant murine eIF4E, as described previously (Pause et al., 1994). Briefly, proteins were separated on an SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane by Western blot. Membranes were pre-incubated in HBB buffer (25 mM HEPES–KOH (pH 7.7), 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40 and 5% skimmed milk) for 2 hours at 4°C and then incubated in Hyb75 buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.7), 75 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P40 and 1% skimmed milk) containing ^{32}P-labelled HMK-eIF4E (250,000 cpm/ml) overnight at 4°C. After extensive washing in Hyb75 buffer, the membrane was dried, autoradiographed and quantified as described above.

Results

Microinjection of an eIF4E-binding motif peptide into unfertilized eggs affects the onset of the first mitotic division of the sea urchin embryos

We investigated the implication of the release of eIF4E from the translational repressor 4E-BP in the control of the first mitotic division of sea urchin eggs. We used a peptide that has

been developed based on the conserved eIF4E-binding motif within human 4E-BP1 (Herbert et al., 2000). First, we tested the ability of the peptide to inhibit the association between endogenous 4E-BP and eIF4E in sea urchin extracts (Fig. 1A). Unfertilized egg extracts were incubated with 10 μM of wild type peptide (RIIYDRKFLMEC), corresponding to the eIF4E binding sequence of the human 4E-BP1, or with 10 μM of a mutated peptide (RIIADRKFAMEC). After 1 hour incubation, 4E-BP bound to eIF4E was analyzed after affinity purification of eIF4E on m^7GTP columns. The wild type peptide affected the association between eIF4E and 4E-BP, while the mutated peptide did not affect the association between the two proteins (Fig. 1A). Based on this result, we tested the effects of the peptides microinjected into unfertilized eggs on the first mitotic division following fertilization (Fig. 1B). Peptides were microinjected at a final concentration of 10 μM. Fertilization per se was not affected by microinjection, since the fertilization membranes were raised normally after microinjection (data not shown). Strikingly, the wild type peptide microinjected at this concentration delayed the first cleavage efficiently, while the mutated peptide did not affect the first mitotic division compared to the control. These data provide a direct demonstration that the release of eIF4E from 4E-BP is necessary for the onset of the first cell cycle of sea urchin embryos and underlines the importance eIF4E/4E-BP complex regulation following the fertilization of sea urchin eggs.

Fertilization induces the recruitment of eIF4E from an 80-kDa complex to a higher molecular weight complex

eIF4E functions in conjunction with other partners. The hypothesis that eIF4E, released from 4E-BP, could be recruited into a high molecular weight complex was therefore tested by gel filtration. Extracts from unfertilized eggs and eggs 30 minutes post-fertilization were separated on a Sephacryl 200 column (Fig. 2A) and aliquots from collected fractions were analyzed after electrophoresis by immunoblotting with anti-4E-BP2 and anti-eIF4E

antibodies. 4E-BP (monomer size16 kDa) eluted as a single peak of 80 kDa from unfertilized eggs and, as expected, the amount of the protein decreased dramatically after fertilization (Fig 2B, compare bottom and top panels). Strikingly, the anti 4E-BP2 also recognized a second protein, with an apparent molecular weight of 40 kDa, that co-eluted with 4E-BP in unfertilized eggs (Fig. 2C, top panel). Furthermore, the amount of the 40-kDa protein also decreased in the 30 minutes post-fertilization extracts (Fig. 2C, compare top and bottom panels). We have previously shown by Western blot analysis that eIF4E is undetectable in egg extracts of sea urchins (Salaün et al., 2003). Since sample dilution is inevitable when using gel filtration, eIF4E was consequently never detectable in the eluted fractions. The amount of enriched eIF4E was therefore monitored in each fraction after purification of the protein on m^7GTP columns (Fig. 3). In unfertilized eggs eIF4E was present in fractions 40–50 as a single peak of 80 kDa (Fig. 3A, top panels). In 30 minutes post-fertilization embryos, while part of the eIF4E was still recovered from fractions 40–50, a signal was detected in fractions corresponding to proteins eluting at around 180 kDa (Fig. 3A, bottom panels), indicating that part of the eIF4E was recruited to a higher molecular weight complex (Fig. 3B, gray arrow). The 40-kDa protein and 4E-BP co-purified with eIF4E on m^7GTP columns and eluted as a peak of 80 kDa in unfertilized eggs (Fig. 3A, top panels). As expected, in 30 minutes post-fertilization embryos, the total amount of 4E-BP and the 40-kDa protein that co-purified with eIF4E on m^7GTP columns decreased dramatically and the main remaining proteins co-purified with eIF4E in the 80-kDa complex (Fig. 3A, bottom panels).

Taken together, these data suggest that, in unfertilized eggs, eIF4E is present in a complex of about 80 kDa containing 4E-BP and the 40-kDa protein. Fertilization induces dissociation of the 16-kDa 4E-BP and the 40-kDa protein from eIF4E that recruits other partners and consequently shifts to higher molecular weight complexes.

The 40-kDa protein is an eIF4E-binding protein

The results presented above, indicate that a protein of 40 kDa co-purifies with eIF4E and that the 4E-BP2 antibody recognizes this 40-kDa protein. We checked that the same antibody also detected this 40-kDa protein in a total extract from unfertilized eggs (Fig. 4A, lane 1). We then asked whether this 40-kDa protein detected in the extracts might interact directly with eIF4E. To address this question, total extract was tested by far-Western blotting using recombinant ^{32}P-labelled HMK-eIF4E as a probe that corresponds to an exogenous eIF4E (Pause et al., 1994). In addition to the 16-kDa 4E-BP protein, a 40-kDa protein interacted with radiolabelled eIF4E (Fig. 4A, lane 2). It was then important to check whether the 40-kDa protein detected by the 4E-BP2 antibody was also able to directly associate with exogenous eIF4E. Proteins from unfertilized eggs were immunopurified using 4E-BP2 antibodies coupled to Sepharose beads. After electrophoresis, immunopurified proteins were analyzed by Western and far-Western blotting (Fig. 4B, lanes 1). In addition to 4E-BP, the 40-kDa protein was efficiently immunopurified by the 4E-BP2 antibody (Fig. 4B, left panel, lane 1). Furthermore, exogenously added, radiolabelled eIF4E also bound to the immunopurified 40-kDa protein (Fig. 4B, right panel, lane 1). Proteins purified from unfertilized eggs using m^{7}GTP columns were analyzed by Western and far-Western blotting (Fig 4B, lanes 3). In addition to 4E-BP, the 40-kDa protein co-purified with endogenous eIF4E after m^{7}GTP column purification (Fig. 4B, left panel, lane 3) and bound to the exogenous radiolabelled eIF4E (Fig. 4B, right panel, lane 3). Taken together, these data demonstrated that the 40-kDa protein was a eIF4E-binding protein.

The results shown in Fig. 3A suggested that this new eIF4E-binding protein was partially dissociated from eIF4E in eggs taken 30 minutes after fertilization. We then asked whether the amount of the 40-kDa protein might be modified following fertilization of the eggs. The 40-kDa protein was monitored in extracts obtained from unfertilized eggs and from embryos

60 minutes after fertilization. Interestingly, the amount of the 40-kDa protein decreased dramatically in embryos harvested at 60 minutes after fertilization (Fig. 5, compare lanes 1 and 2). We have previously shown that both dissociation of 4E-BP/eIF4E complex and 4E-BP degradation are mediated by a rapamycin-sensitive mTOR pathway induced by fertilization (Salaün et al., 2003). We therefore tested whether rapamycin could affect the disappearance of the 40-kDa protein and/or its dissociation from eIF4E triggered by fertilization. Strikingly, rapamycin prevented both the decrease in the 40-kDa protein in total extracts (Fig. 4A, compare lanes 1 and 3), and its dissociation from eIF4E (Fig. 4B) following fertilization. We demonstrated that a 4E-BP peptide affects the association between eIF4E and 4E-BP (Fig. 1A). It was then interesting to test whether the 4E-BP peptide could also affect the association between the endogenous 40 kDa protein and eIF4E (Fig. 5C). The 40 kDa protein bound to eIF4E was analyzed after incubation of the peptide and affinity purification of eIF4E on m7GTP from unfertilized egg extracts. The wild type 4E-BP peptide affected the association between eIF4E and the 40 kDa protein (Fig. 5C, compare lanes 1 and 3), while the mutated peptide had no significant effect (Fig. 5C, compare lanes 1 and 2). Taken together, these data show that this new 40-kDa eIF4E-binding protein behaves similarly following fertilization to the sea urchin 4E-BP already identified.

4E-BP and the 40-kDa protein are up-regulated during the late embryonic development of sea urchin

The results presented above demonstrate that the amount of the translational repressor 4E-BP and of the 40-kDa protein is down-regulated during early development of sea urchin embryos. The amount of the two proteins was then monitored during later stages of the sea urchin embryonic development. Extracts prepared from unfertilized eggs and from embryos taken every 2 hours until 14 hours after fertilization were analyzed by Western blotting (Fig. 6A). As expected, fertilization triggered a decrease in both the 4E-BP and the 40-kDa proteins. The level of the two proteins remained very low for 4 hours. Strikingly, the amount

of both proteins increased gradually until 10 hours post fertilization demonstrating that the two proteins are up-regulated during late development of the sea urchin embryo. The same extracts were then tested by far-Western blotting (Fig. 6B). Exogenous radiolabelled eIF4E interacted both with 4E-BP and with the 40-kDa protein that re-appeared in late development. To test whether 4E-BP and the 40-kDa protein reassociated with the endogenous eIF4E during late development, 4E-BP and the 40-kDa proteins bound to eIF4E were monitored after affinity purification of eIF4E on m^7GTP columns at the indicated times after fertilization (Fig. 6C). While the amount of eIF4E that bound to the column did not change significantly during the development of the embryos (Fig. 6C, top panel), the amount of 4E-BP (bottom panel) and the 40-kDa protein (middle panel) that is associated with purified eIF4E, decreased dramatically following fertilization and then increased strongly in late development around 8–10 hours post-fertilization. Taken together, these data demonstrate that 4E-BP and the 40-kDa protein re-appear during late development and reassociate with eIF4E.

Discussion

A peptide corresponding to the eIF4E-binding site of the human 4E-BP1 protein was able to affect the association of 4E-BP/eIF4E complex in extracts from unfertilized sea urchin eggs. These data are consistent with the binding of mammalian eIF4E to sea urchin 4E-BP in far-Western analyses and demonstrate that functional binding sites between eIF4E and 4E-BP are highly conserved throughout deuterostome evolution. In starfish oocytes, the nonpolar amino acid residues of eIF4E that are likely to interact with 4E-BP (Marcotrigiano et al., 1997) have been shown to be accessible on the surface of the protein. However, interaction between the two proteins 4E-BP and eIF4E has not been tested in starfish (Lee et al., 2000). This point is important since in zebrafish, although two eIF4E proteins contain all the known

residues required for interaction with the 4E-binding proteins, only one is able to interact with 4E-BP (Robalino et al., 2004). Whether several eIF4E isoforms exist in echinoderms remains unknown.

By microinjection of 4E-BP-peptide into sea urchin eggs, we have provided a direct demonstration that eIF4E release from the translational inhibitor 4E-BP is required for the onset of the first mitotic division triggered by fertilization of sea urchin eggs. This result is consistent with the fact that eIF4E/4E-BP complex dissociates rapidly following fertilization of the eggs (Cormier et al., 2001) and that a rapamycin sensitive pathway is involved for the completion of the first mitotic division of sea urchin embryos (Salaün et al., 2003). Taken together, these results suggest that eIF4E is required for the dramatic rise in the rate of translation initiation that occurs rapidly after fertilization of sea urchin eggs (Lopo et al., 1988). The suggestion of a role for the cap-binding protein eIF4E in this physiological process is underscored by our observation that fertilization leads to the recruitment of the eIF4E protein to higher molecular weight protein complexes. In mammals, the initiation factor eIF4E is known to form the eIF4F complex by association with eIF4A and eIF4G (Raught et al., 2000). In a cell-free translation system using heterologous proteins, the eIF4F complex has been shown to be a critical factor whose activity is stimulated following fertilization in sea urchin (Jagus et al., 1992). Therefore, it is conceivable that eIF4G and eIF4A are associated with eIF4E following fertilization. The existence of these two proteins in sea urchin eggs is supported by the identification of partial cDNA encoding for eIF4A and a complete cDNA encoding eIF4G (EMBL, accession number AJ634049) from a sea urchin library (unpublished data). However, the fact that sea urchin fertilization induces eIF4F formation needs to be confirmed. While the mammalian eIF4F is described classically as a complex of approximately 300 kDa, our data indicate that a fraction of eIF4E is recruited into a complex of around 180 kDa. We cannot exclude that several complexes are formed and that

other proteins associate with eIF4E following fertilization of eggs. Therefore, identification of the proteins associated with eIF4E in the 180-kDa complex remains to be carried out.

It has been shown previously that introduction of eIF4E-binding peptides into mammalian cells induces rapid cell death, with characteristics of apoptosis (Herbert et al., 2000). The mechanism by which the peptide induces apoptosis remains unclear but cell death may be a result of interference of the peptide with a nuclear function of eIF4E (Herbert et al., 2000). The effect on cell viability can be explained by the fact that eIF4E-binding peptides were linked to the penetratin peptide-carrier sequence, which mediates the rapid transport of peptides across cell membranes. Sea urchin eggs possess functional apoptotic machinery (Voronina and Wessel, 2001). Yet, the microinjection of 4E-BP-peptide into unfertilized sea urchin eggs did not affect cell viability. This apparent discrepancy could be explained by the fact that 4E-BP-peptide was not linked to the penetratin peptide-carrier in our experiments, and that, consequently, microinjected peptide could not interfere with the nuclear function of eIF4E. Therefore, it would be interesting to test the effect of 4E-BP-peptide linked to the penetratin peptide-carrier sequence on the induction of apoptosis in sea urchin eggs.

In this study, using convergent approaches, we provide a demonstration that a 40-kDa protein associates with eIF4E in unfertilized sea urchin eggs. Furthermore, we show that this 40-kDa protein is recognized by an antibody directed against human 4E-BP2 and that the 40-kDa protein shares several characteristics with the 4E-BP protein (Cormier et al., 2001; Salaün et al., 2003). We propose to naming this protein H4E-BP for Heavy molecular weight eIF4E Binding like Protein.

Finding new regulators of eIF4E is crucial to understanding how eIF4E functions are modulated during different processes such as the cell cycle, cell differentiation or development (von der Haar et al., 2004). In addition to the well described eIF4E binding proteins represented by 4E-BPs and eIF4G, new eIF4E partners have recently been

discovered. In *Xenopus laevis* oocytes, the protein Maskin prevents eIF4F formation by binding eIF4E (Stebbins-Boaz et al., 1999). Similarly, in *Drosophila*, the anterior determinant Bicoid is hypothesized to simultaneously bind eIF4E and the *caudal* 3′ untranslated region, thereby preventing recruitment of eIF4G to *caudal* mRNA (Niessing et al., 2002). More recently, the protein Cup, has been shown to bind eIF4E and to consequently trigger smaug-mediated translational repression (Nelson et al., 2004) and translational repression of the posterior determinant oskar (Wilhelm et al., 2003). In mammals, eIF4E-T is another functional 4E-binding protein, which is involved in the nucleocytoplasmic shuttling of eIF4E (Dostie et al., 2000). In humans, the proline-rich homeodomain protein (PRH) has been identified as binding partner of eIF4E which seems to serve as a negative regulator of the eIF4E dependent export of a subset of mRNAs (Topisirovic et al., 2003). These eIF4E-binding proteins share a common eIF4E recognition motif, YxxxxLΦ, (where x is any amino acid and Φ is an aliphatic residue, usually L, M or F), although the tyrosine of this motif is occupied by a threonine residue in the Maskin protein (Stebbins-Boaz et al., 1999) and the PRH contains a related motif in which the hydrophobic Φ is exchanged for a polar glutamine (Topisirovic et al., 2003). The protein H4E-BP is recognized by the anti-4E-BP2 antibody. This rules out the possibility that H4E-BP corresponds to one of these novel eIF4E-binding proteins. It has recently been demonstrated that a transcript arises from the fusion of 4E-BP3 with the mammalian homologue of the *Drosophila MASK* (Multiple Ankyrin repeats, Single KH domain) gene (Poulin et al., 2003). This transcript encodes the protein MASK-BP3^{ARF} using an alternative reading frame. Therefore, two different proteins are encoded by the same exon of 4E-BP3 and the protein MASK-BP3^{ARF} does not present any similarity with the protein 4E-BP3 (Poulin et al., 2003). In contrast, H4E-BP presents many similarities with the sea urchin 4E-BP, ruling out the possibility that the 4E-BP like sequence is translated in an alternate reading frame. One hypothesis is that H4E-BP could be the result of the fusion of

two genes encoding two different protein domains that are in the same reading frame, one containing an unknown protein domain and a second containing the 4E-BP domain. Such a possibility is suggested in a few reports that describe fused proteins resulting from intergenic splicing between neighboring genes in eukaryotes (Fears et al., 1996; Magrangeas et al., 1998; Thomson et al., 2000; Pradet-Balade et al., 2002). Cloning of the cDNA that codes for H4E-BP is now important to give insight into the mechanism involved in H4E-BP production and to further analyze the role of the heavy form of 4E-BP in sea urchin. Furthermore, since a cDNA encoding for 4E-BP from echinoderms is not yet available and there is no 4E-BP sequence accessible in the available sea urchin EST-database (Cameron et al., 2000), cloning of these two cDNAs remains an important goal in marine invertebrates.

We investigated the temporal expression of 4E-BP and H4E-BP during early development. The two eIF4E-binding proteins are abundant in unfertilized eggs, decline abruptly following fertilization, and remain low during the rapid cleavage stage. Then the re-appearance and accumulation of both 4E-BP and H4E-BP in late embryogenesis is progressive until 8–10 hours post-fertilization that corresponding to the blastula stage of the embryos. This is the first observation that the translational repressor 4E-BP can be down- and up-regulated at the protein level during embryonic development. Whether mRNAs coding for these two proteins are also regulated during development remains to be elucidated. Thus, studies on sea urchin early development provide a promising model to investigate the importance and the mechanism of the regulation of gene expression of these eIF4E-binding proteins.

In mammalian cells, association between eIF4E and its translational repressor 4E-BP is regulated during the cell cycle (Heesom et al., 2001; Pyronnet and Sonenberg, 2001). Consistent with this, eIF4F, and thus cap-dependent translation initiation plays an essential role in the G1/S transition (Pyronnet and Sonenberg, 2001). Unfertilized sea urchin eggs are haploid cells that are blocked at the G1 stage. We showed previously that cap-dependent

translation is crucial for the first mitotic division of sea urchin following fertilization (Salaün et al., 2003). Here we show that the abundance of 4E-BP and H4E-BP is very low during the following cell cycles which alternate rapidly between S-phase and M-phase. The abrupt decrease in the abundance of these 4E-binding proteins triggers a release of eIF4E and could be an important molecular event that allows rapid cell divisions to occur.

Interestingly, the two eIF4E-binding proteins re-appear and associate progressively with eIF4E later during development. Indeed, there is no true mid-blastula transition in sea urchin development, as was shown in amphibians for example (Signoret and Lefresne, 1971; Newport and Kirschner, 1982), but there is a spatially and progressive process. Echinoderm embryos show asymmetric cleavage in the fourth and fifth divisions that cause the formation of different size cells: mesomeres, macromeres and micromeres (Hörstadius, 1973). The cell cycle lengths progressively increase during the development of the embryo for these different kinds of cells (Masuda and Sato, 1984; Yasuda and Schubiger, 1992). The first cells in which the cell cycle slows down are the micromeres in which lengthening of the fifth cell cycle is due to the acquisition of a G2-phase (Lozano et al., 1998). Macromere and mesomere lineages always undergo shorter cell cycles and continue cycling longer than micromere lineage (Masuda and Sato, 1984). At the blastula stage prior to hatching, the division proceeds in an asynchronous way (Parisi et al., 1978) and this embryonic stage corresponds to a normal cell cycle length with the presence of gap phases. Therefore, the progressive re-appearance and accumulation of these two eIF4E binding proteins could play an important role in the control and the organization of cell cycle length during early embryonic development. Since these eIF4E-binding proteins are well recognized by the antibodies, it would be interesting to monitor the level and the localization of these proteins during the embryonic development in time-course immunofluorescence experiments.

Our work demonstrates that the association between eIF4E and 4E-BP is highly regulated during sea urchin development. These data indicate that eIF4E is temporally available to other partners in sea urchin embryos and, thus, suggests that eIF4E can play a role in the control of gene expression during development. Other reports have implicated eIF4E in nematode spermatogenesis (Amiri et al., 2001), and embryogenesis in zebrafish and amphibians (Klein and Melton, 1994; Fahrenkrug et al., 1999; Robalino et al., 2004). Furthermore, eIF4E was shown to associate with a protein involved in pattern formation during early *Drosophila* embryogenesis (Niessing et al., 2002; Wilhelm et al., 2003). Therefore it will be interesting to determine whether sea urchin eIF4E is able to bind to factors involved in patterning in the sea urchin embryos (Angerer and Angerer, 2003).

Acknowledgments

We thank Professor Christopher Proud for the generous gift of the wild type and mutated peptides. We thank Dr Mark Cock and Dr Stéphane Égée for helpful comments and for manuscript corrections. This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC no. 4247, France, PC) and Ligue Nationale contre le Cancer (Délégation Départementale du Finistère, France, PC) and Conseil Régional de Bretagne.

References

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

Angerer, L. M. and Angerer, R. C. (2003). Patterning the sea urchin embryo: gene regulatory networks, signaling pathways, and cellular interactions. *Curr. Top. Dev. Biol.* **53**, 159-198.

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

Cameron, R. A., Mahairas, G., Rast, J. P., Martinez, P., Biondi, T. R., Swartzell, S., Wallace, J. C., Poustka, A. J., Livingston, B. T., Wray, G. A. et al. (2000). A sea urchin genome project: sequence scan, virtual map, and additional resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **15**, 9514-9518.

Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M. and Morley, S. J. (2000). Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ.* **7**, 603-615.

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

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

Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A. and Sonenberg, N. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5′ cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J.* **19**, 3142-3156.

Fahrenkrug, S. C., Dahlquist, M. O., Clark, K. J. and Hackett, P. B. (1999). Dynamic and tissue-specific expression of eIF4E during zebrafish embryogenesis. *Differentiation* **65**, 191-201.

Fears, S., Vignon, C., Bohlander, S. K., Smith, S., Rowley, J. D. and Nucifora, G. (1996). Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **17**, 127-135.

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

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

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

Heesom, K. J., Gampel, A., Mellor, H. and Denton, R. M. (2001). Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr. Biol.* **11**, 1374-1379.

Herbert, T. P., Fahraeus, R., Prescott, A., Lane, D. P. and Proud, C. G. (2000). Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E. *Curr. Biol.* **10**, 793-796.

Hinegardner, R. T., Rao, B. and Feldman, D. E. (1964). The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg. *Exp. Cell Res.* **36**, 53-61.

Holland, E. C., Sonenberg, N., Pandolfi, P. P. and Thomas, G. (2004). Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene* **23**, 3138-3144.

Hörstadius, S. (1973). *Experimental Embryology of Echinoderms*, pp. 41-91. Oxford: Clarendon Press.

Jagus, R., Huang, W. I., Hansen, L. J. and 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.

Klein, P. S. and Melton, D. A. (1994). Induction of mesoderm in *Xenopus laevis* embryos by translation initiation factor 4E. *Science* **265**, 803-806.

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

Lopo, A. C., MacMillan, S. and 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.

Lozano, J. C., Schatt, P., Marques, F., Peaucellier, G., Fort, P., Feral, J. P., Geneviere, A. M. and Picard, A. (1998). A presumptive developmental role for a sea urchin cyclin B splice variant. *J. Cell Biol*. **26**, 283-293.

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

Magrangeas, F., Pitiot, G., Dubois, S., Bragado-Nilsson, E., Cherel, M., Jobert, S., Lebeau, B., Boisteau, O., Lethe, B., Mallet, J. et al. (1998). Cotranscription and intergenic splicing of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase and interleukin-11 receptor alpha-chain genes generate a fusion mRNA in normal cells. Implication for the production of multidomain proteins during evolution. *J. Biol. Chem.* **273**, 16005-16010.

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

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

Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. and Burley, S. K. (1997). Cocrystal structure of the messenger RNA 5′ cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951-961.

Masuda, M. and Sato, H. (1984). Asynchronization of cell division is concurrently related with ciliogenesis in sea urchin blastulae. *Dev. Growth Differ*. **26**, 281-294.

Mathews, M. B., Sonenberg, N. and Hershey, J. W. B. (2000). Origins and principles of translational control. In *Translational Control of Gene Expression* (ed. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey and M. B. Mathews), pp. 1-31. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

Nelson, M. R., Leidal, A. M. and Smibert, C. A. (2004). Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J.* **23**, 150-159.

Newport, J. and Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* **30**, 675-686.

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

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

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

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

Poulin, F., Brueschke, A. and Sonenberg, N. (2003). Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK. *J. Biol. Chem.* **278**, 52290-52297.

Pradet-Balade, B., Medema, J. P., Lopez-Fraga, M., Lozano, J. C., Kolfschoten, G. M., Picard, A., Martinez, A. C., Garcia-Sanz, J. A. and Hahne, M. (2002). An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *EMBO J.* **21**, 5711-5720.

Pyronnet, S. and Sonenberg, N. (2001). Cell-cycle-dependent translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 13-18.

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

Robalino, J., Joshi, B., Fahrenkrug, S. C. and Jagus, R. (2004). Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent. *J. Biol. Chem.* **279**, 10532-10541.

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

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

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

Signoret, J. and Lefresne, J. (1971). Contribution à l'étude de la segmentation de l'oeuf d'axolotl: définition de la transition blastuléenne. *Ann. Embryol. Morphog*. **4**, 113-123

Sonenberg, N. and Gingras, A. C. (1998). The mRNA 5′ cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 268-275.

Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C. and Shatkin, A. J. (1978) A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5′-terminal cap in mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4843-4847.

Sonenberg, N., Rupprecht, K. M., Hecht, S. M. and Shatkin, A. J. (1979). Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on Sepharose-coupled m7GDP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4345-4349.

Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R. and Richter, J. D. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with elF-4E. *Mol. Cell* **4**, 1017-1027.

Thomson, T. M., Lozano, J. J., Loukili, N., Carrio, R., Serras, F., Cormand, B., Valeri, M., Diaz, V. M., Abril, J., Burset, M. et al. (2000). Fusion of the human gene for the polyubiquitination coeffector UEV1 with Kua, a newly identified gene. *Genome Res.* **10**, 1743-1756.

Topisirovic, I., Culjkovic, B., Cohen, N., Perez, J. M., Skrabanek, L. and Borden, K. L. (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J.* **22**, 689-703.

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

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

Voronina, E. and Wessel, G. M. (2001). Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 553-561.

Wickens, M., Goodwin, E. B., Kimble, J., Strickland, S. and Hentze, M. W. (2000). Translational control of developmental decisions. In *Translational Control of Gene Expression* (ed. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey and M. B. Mathews), pp. 295-370. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wilhelm, J. E., Hilton, M., Amos, Q. and Henzel, W. J. (2003). Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *J. Cell Biol.* **163**, 1197-1204.

Yasuda, G. K. and Schubiger, G. (1992) Temporal regulation in the early embryo: is MBT too good to be true? *Trends Genet.* **8**, 124-127.

Figure legends

Fig. 1. A 4E-BP-peptide affects eIF4E/4E-BP association and the first mitotic division of sea urchin embryos. (A) Treatment of extracts obtained from unfertilized eggs with the 4E-BP-peptide leads to eIF4E/4E-BP dissociation. Control extract (lane 1) or extract treated with 10 μM mutated peptide (lane 2) or 10 μM wild type peptide (lane 3) were incubated for 1 hour at 4°C. After incubation, eIF4E was purified from each extract using 50 μl m^7GTP columns as described in Materials and Methods. Proteins bound to the beads were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting using eIF4E (top panels) or 4E-BP (bottom panels) antibodies. Data are representative of three independent experiments. (B) Microinjection of 4E-BP-peptide into unfertilized eggs impedes the first mitotic division triggered by fertilization. Wild type (white bar) or mutated (light gray bar) peptides were injected at a final intracellular concentration of 10 μM. Control corresponds to unfertilized eggs microinjected with buffer (dark gray bar). Cleavage was scored by observation under a light microscope at 180 minutes after fertilization. An average of 100 unfertilized eggs were injected for each compound in each experiment and vertical bars represent the standard deviation of three independent experiments. Significance was assessed using Fisher's *F*-test and Student's *t*-test. An asterisk indicates a significant difference between eggs microinjected with wild type peptide and eggs microinjected with mutated peptide or control (* corresponds to $P<0.01$).

Fig. 2. 4E-BP is present in an 80-kDa weight molecular complex in unfertilized eggs (A). Proteins (5 mg) from extracts prepared from unfertilized or from 30 minutes post-

fertilization eggs were separated by chromatography on a Sephacryl 200 column and were monitored by absorbance at 280 nm. The bars show the position of 4E-BP from unfertilized (open bar) and from 30 minutes post-fertilization (filled bar) eggs as determined by Western blot analysis of each fraction using an anti-human 4E-BP2 antibody. The column was calibrated with the molecular mass standards indicated at the top. (B and C) Aliquots of each eluted fraction were resolved by electrophoresis and analyzed by Western blotting using 4E-BP2 antibodies. The position of the molecular mass standards (in kDa) used to calibrate the gel filtration column are indicated by arrows at the top of the figure. Data are representative of two independent experiments.

Fig. 3. eIF4E shifts from a 80-kDa molecular weight complex in unfertilized eggs to a higher molecular weight complex following fertilization. (A) Eluted fractions from the gel filtration purification of unfertilized (top) or 30 minutes post-fertilization (bottom) extracts were applied to a m^7GTP-column and bound proteins were subjected to Western blotting using anti-human eIF4E and anti-human 4E-BP2 antibodies. Arrows at the top of the figure correspond to the position of molecular mass standards (in kDa) used to calibrate the gel filtration column and the numbers at the bottom correspond to the fraction from the gel filtration purification showed in Fig. 2A. (B) Quantification of the results obtained from unfertilized (open circle) or 30 minutes post-fertilization (filled square) extracts. eIF4E amounts in each fraction were expressed as a percentage of the total amount of eIF4E contained in unfertilized or 30 minutes post-fertilization extracts, respectively. Arrows at the top of the figure correspond to the position of the molecular mass standards (in kDa) used to calibrate the gel filtration column showed in Fig. 2A. These data are representative of more than two independent experiments.

Fig. 4. The 40-kDa protein associates with eIF4E. (A) Total extract obtained from unfertilized eggs was subjected to Western blotting using 4E-BP2 antibody (lane 1) or to far-Western analysis (see Materials and Methods) using ^{32}P-labeled mouse recombinant HMK-eIF4E as a probe (lane 2). (B) Western blot and far-Western analyses of the purified 40-kDa protein. Proteins from unfertilized eggs extract were immunopurified using 4E-BP2 antibodies coupled to Sepharose beads (1) or using a m^{7}GTP-column (3). The proteins fixed on the beads were resolved by Western blotting using 4E-BP2 antibodies (left panel) or by far-Western analysis using an eIF4E-HMK probe (right panel). 4E-BP2 coupled Sepharose beads alone (lane 2) or m^{7}GTP-column beads alone (lane 4) were used as controls. Arrows point to the positions of 4E-BP and the 40-kDa protein. Data are representative of at least three independent experiments.

Fig. 5. The new 40-kDa eIF4E-binding protein presents behavior similar to that of the sea urchin 4E-BP already identified. (A) Rapamycin inhibits the disappearance of the 40-kDa protein following fertilization. The total amount of the 40-kDa protein from unfertilized eggs (lane 1) and from untreated (lane 2) or rapamycin-treated (lane 3) eggs obtained 60 minutes following fertilization was analyzed by Western blotting using 4E-BP2 antibodies (top panel). A Western blot anti-actin was also performed (bottom panel) as loading control. (B) Rapamycin inhibits the dissociation of the 40-kDa protein from eIF4E. Proteins affinity-purified using m^{7}GTP columns prior to fertilization or at the indicated times following fertilization of untreated (left) or rapamycin-treated (right) eggs were subjected to Western blotting using anti-4E-BP2 (top) or anti-eIF4E (bottom) antibodies. The data are representative of at least five independent experiments. (C) Treatment of extracts obtained from unfertilized eggs with the 4E-BP-peptide also leads to the dissociation between eIF4E and the 40-kDa

protein. Control extract (lane 1) or extract treated with 10 μM mutated peptide (lane 2) or 10 μM wild type peptide (lane 3) were incubated for 1 hour at 4°C. After incubation, eIF4E was purified using a m^7GTP column. Proteins bound to the beads were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting using 4E-BP (top panels) or eIF4E (bottom panels) antibodies.

Fig. 6. 4E-BP and the 40-kDa proteins re-appear during late embryogenesis of sea urchin. (A) Total extracts of unfertilized eggs or eggs at the indicated times following fertilization were subjected to Western blotting using 4E-BP2 or eIF4E antibodies. Tubulin antibody was used as a loading control. Data are representative of at least five independent experiments. (B) Total extracts prior to fertilization or at the indicated times following fertilization were subjected to far-Western blotting using an eIF4E-HMK probe. Data are representative of two independent experiments. (C) Proteins affinity-purified using an m^7GTP column prior to fertilization or at the indicated times following fertilization were subjected to Western blotting using 4E-BP or anti-eIF4E antibodies. Data are representative of at least two independent experiments.

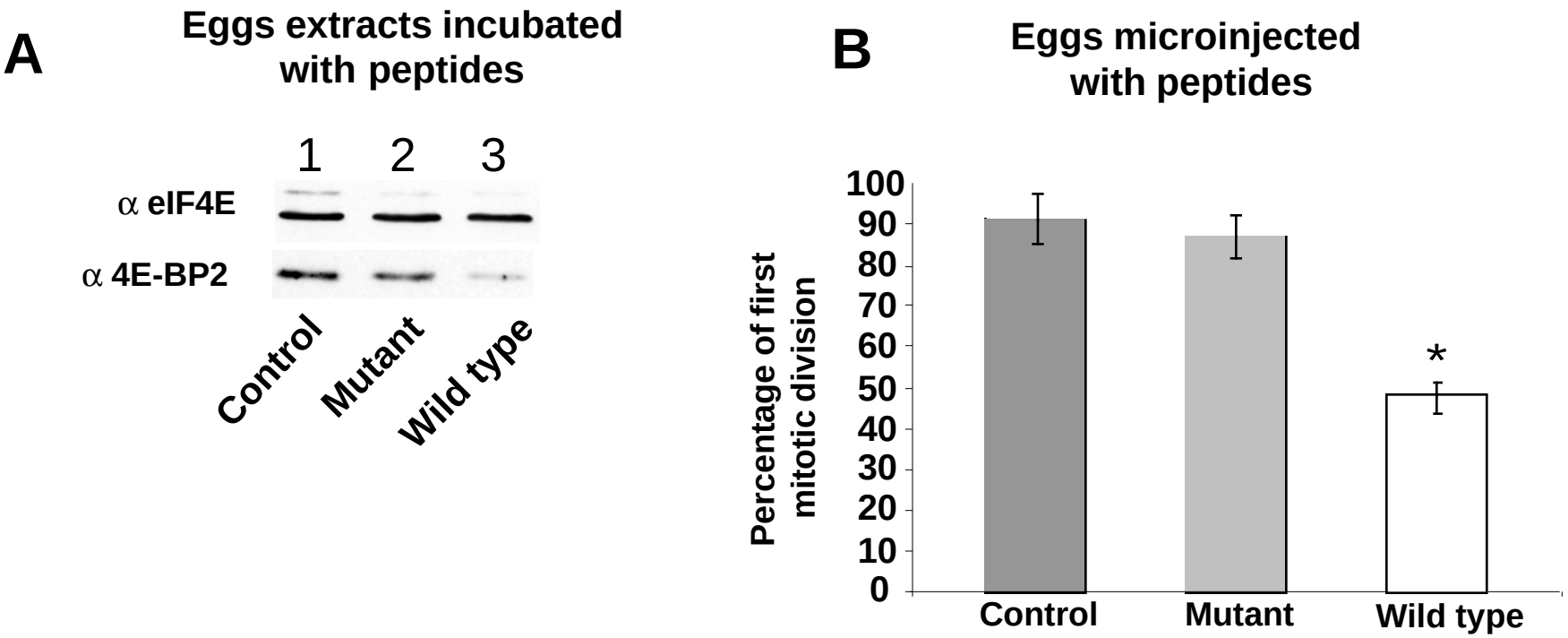

A
Eggs extracts incubated with peptides
1
2
3
α eIF4E
α 4E-BP2
Control
Mutant
Wild type
B
Eggs microinjected with peptides
Percentage of first mitotic division
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
Control
Mutant
Wild type

Figure 1

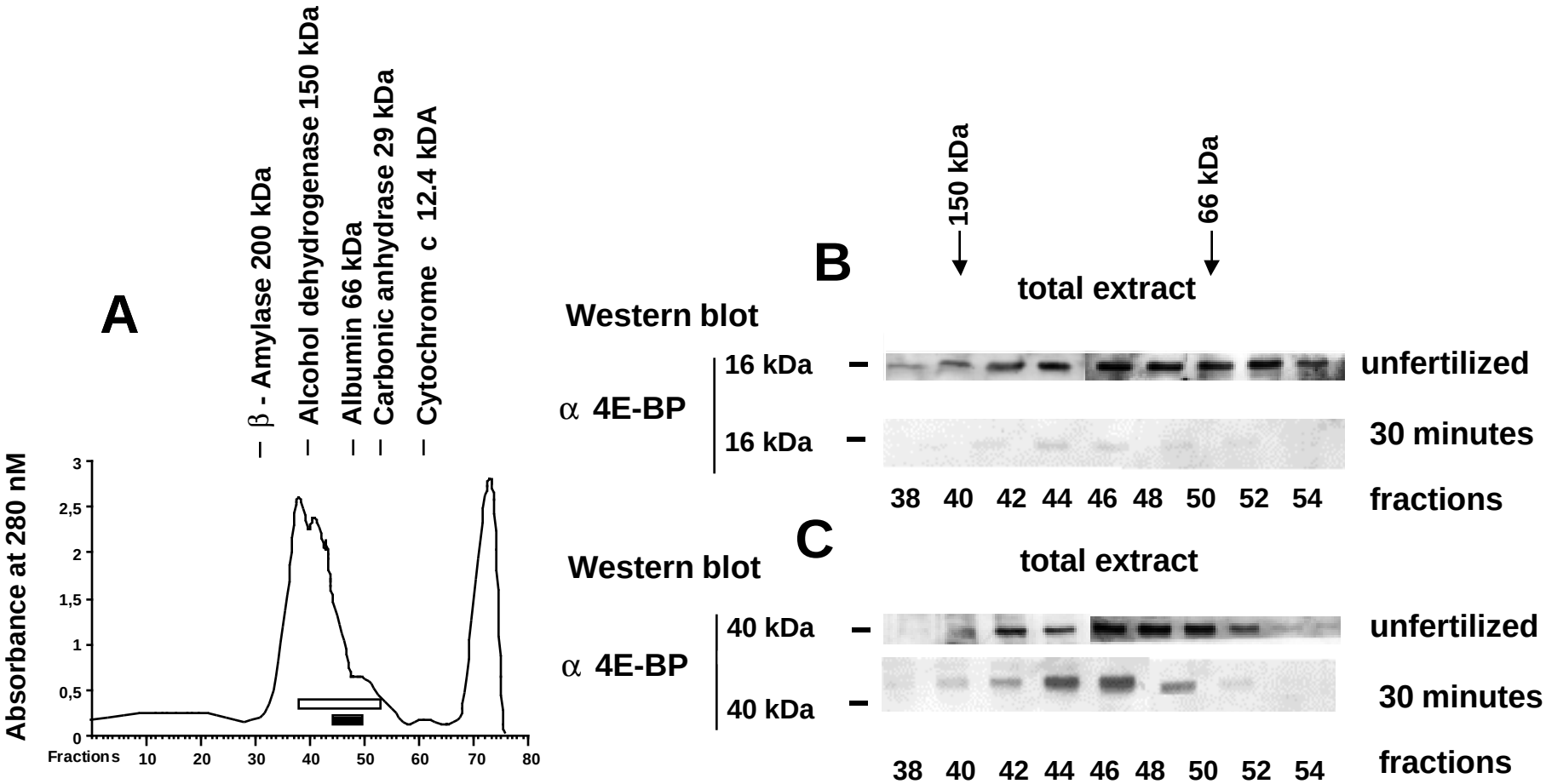

A
β - Amylase 200 kDa
Alcohol dehydrogenase 150 kDa
Albumin 66 kDa
Carbonic anhydrase 29 kDa
Cytochrome c 12.4 kDA
Absorbance at 280 nM
Fractions
B
150 kDa
66 kDa
total extract
Western blot
α 4E-BP
16 kDa
16 kDa
unfertilized
30 minutes
38 40 42 44 46 48 50 52 54
fractions
C
Western blot
total extract
α 4E-BP
40 kDa
40 kDa
unfertilized
30 minutes
38 40 42 44 46 48 50 52 54
fractions

Figure 2

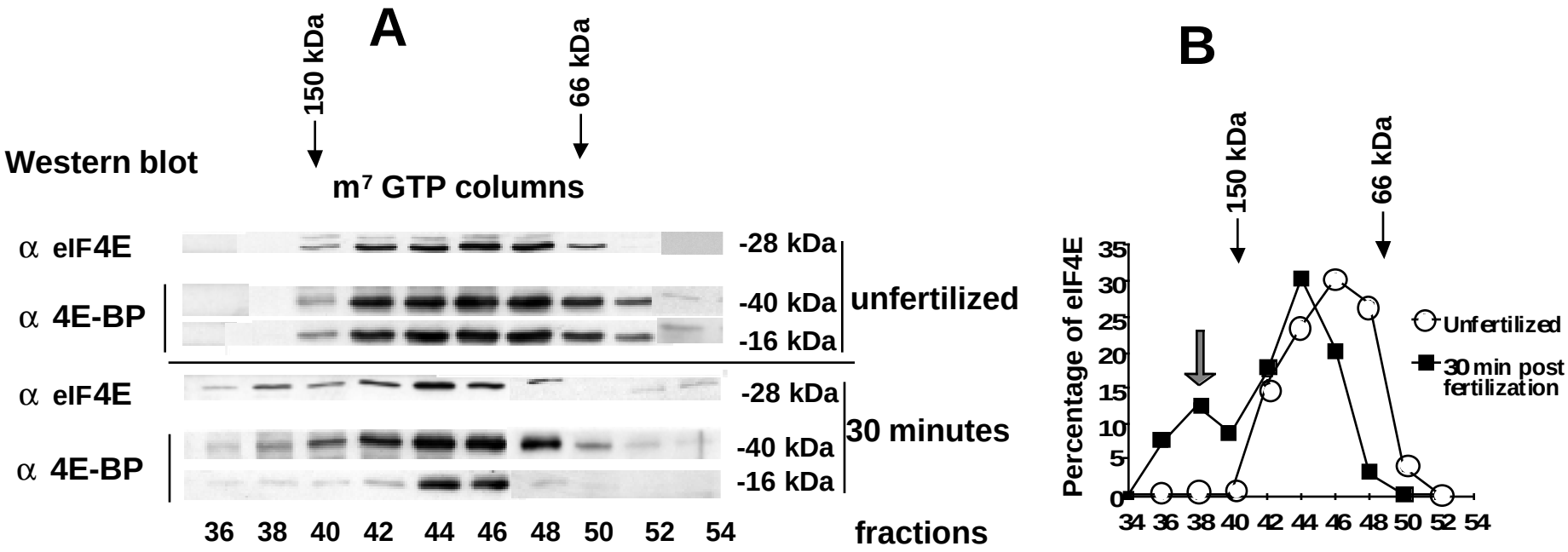

A
150 kDa
66 kDa
Western blot
m7 GTP columns
α eIF4E
α 4E-BP
-28 kDa
-40 kDa
-16 kDa
unfertilized
α eIF4E
α 4E-BP
-28 kDa
-40 kDa
-16 kDa
30 minutes
36 38 40 42 44 46 48 50 52 54
fractions
B
150 kDa
66 kDa
Percentage of eIF4E
35
30
25
20
15
10
5
0
34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54
Unfertilized
30 min post fertilization

Figure 3

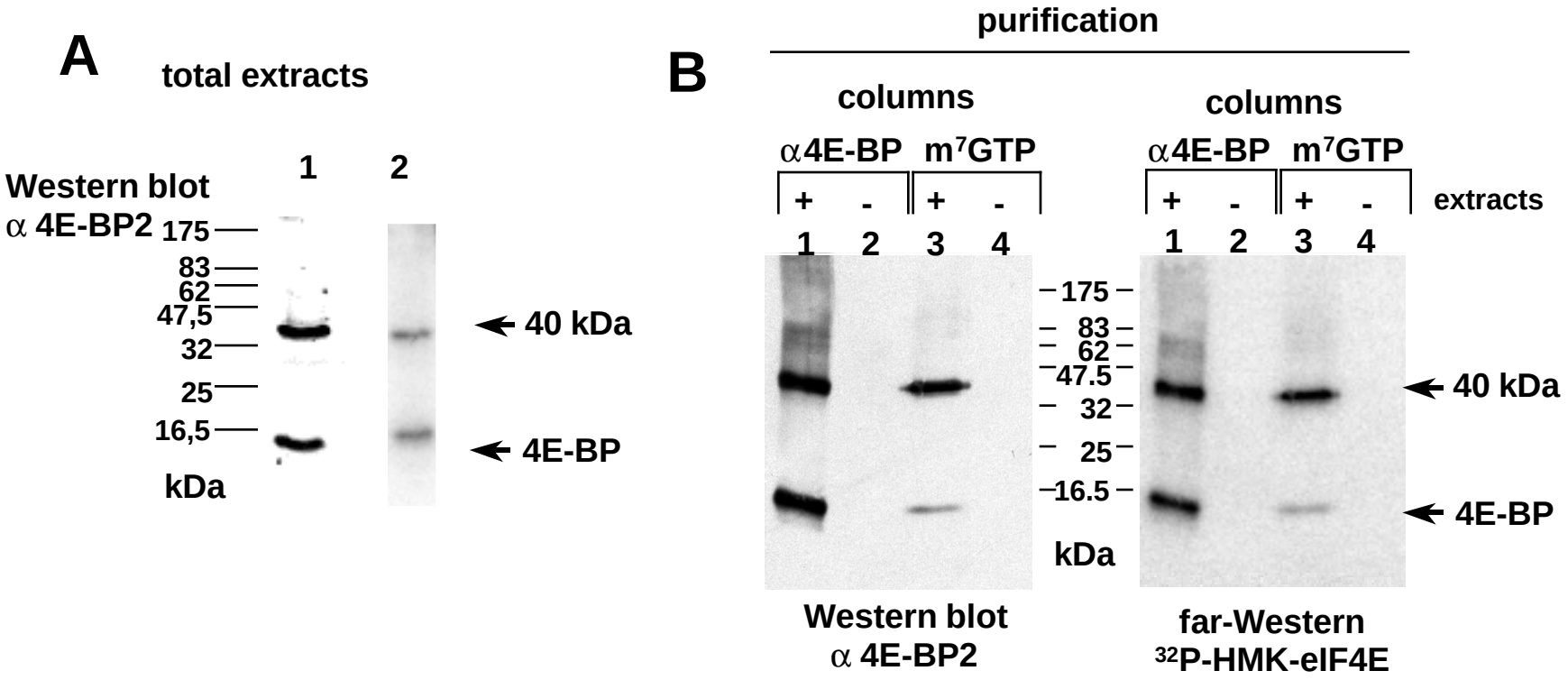

A
total extracts
Western blot
α 4E-BP2
1
2
175
83
62
47,5
32
25
16,5
kDa
40 kDa
4E-BP
B
purification
columns
α4E-BP
m7GTP
+
-
+
-
1
2
3
4
columns
α4E-BP
m7GTP
+
-
+
-
extracts
1
2
3
4
175
83
62
47.5
32
25
16.5
kDa
40 kDa
4E-BP
Western blot
α 4E-BP2
far-Western
32P-HMK-eIF4E

Figure 4

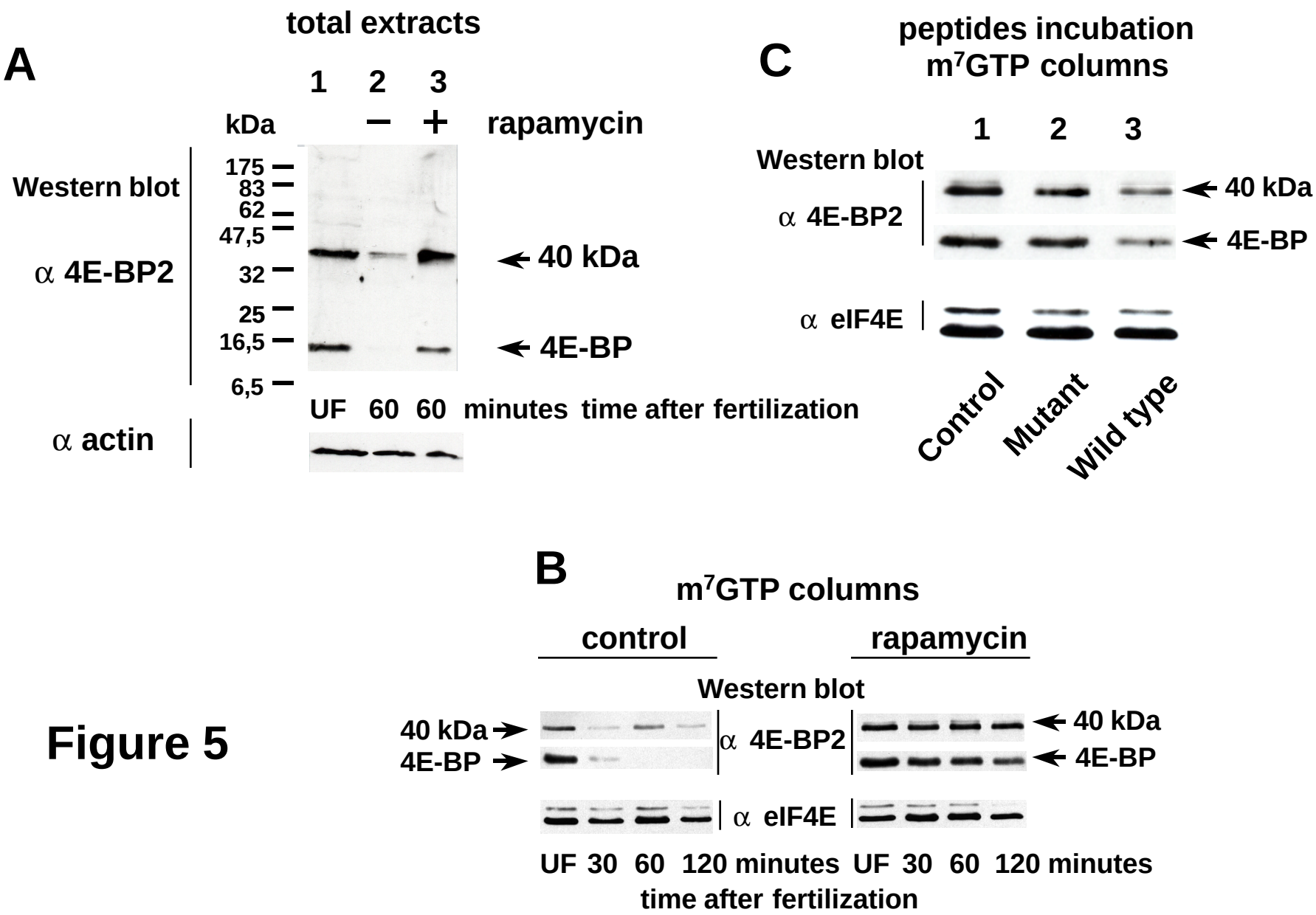
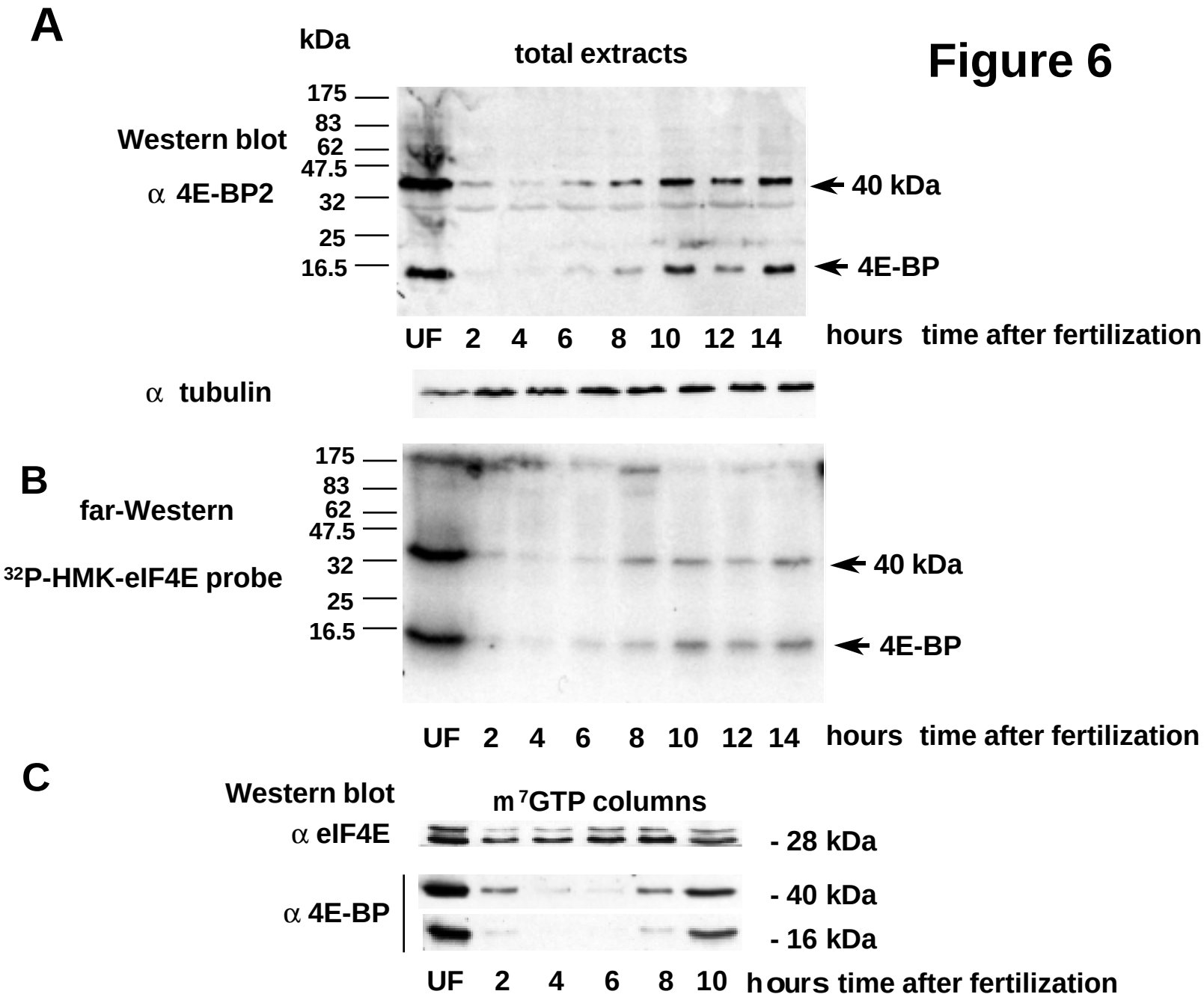

A
total extracts
1 2 3
kDa
– +
rapamycin
Western blot
175
83
62
47,5
32
25
16,5
6,5
α 4E-BP2
40 kDa
4E-BP
UF 60 60 minutes time after fertilization
α actin
C
peptides incubation
m7GTP columns
1 2 3
Western blot
α 4E-BP2
40 kDa
4E-BP
α eIF4E
Control
Mutant
Wild type
B
m7GTP columns
control
rapamycin
Western blot
40 kDa
4E-BP
α 4E-BP2
40 kDa
4E-BP
α eIF4E
UF 30 60 120 minutes UF 30 60 120 minutes
time after fertilization

Figure 5

Figure 6


A
kDa
total extracts
175
83
62
47.5
32
25
16.5
Western blot
α 4E-BP2
40 kDa
4E-BP
UF 2 4 6 8 10 12 14 hours time after fertilization
α tubulin
B
far-Western
32P-HMK-eIF4E probe
175
83
62
47.5
32
25
16.5
40 kDa
4E-BP
UF 2 4 6 8 10 12 14 hours time after fertilization
C
Western blot
m7GTP columns
α eIF4E
- 28 kDa
α 4E-BP
- 40 kDa
- 16 kDa
UF 2 4 6 8 10 hours time after fertilization

IV) Analyse du rôle d'eIF4G au cours du développement embryonnaire de l'oursin.

Article 4 en préparation : Salaun,P., Le breton,M., Boulben,S., Mulner-Lorillon,O., Belle,R., Cormier,P. and Morales, J. Role of eIF4G in the early development of sea urchin embryo. En préparation.

Après avoir étudié l'implication du complexe eIF4E/4E-BP au cours du développement embryonnaire de l'oursin, nous nous sommes intéressés au comportement d'un autre composant du complexe eIF4F, le facteur eIF4G. Comme nous l'avons vu en introduction, cette protéine de structure joue un rôle fondamental dans la mise en place du complexe d'initiation eIF4F. C'est elle qui va permettre le rapprochement de toutes les protéines impliquées dans le modèle du "closed loop". Notre souhait est de déterminer sa fonction dans l'embryogenèse de l'oursin.

A partir d'une banque d'ADNc de *Sphaerechinus granularis*, nous avons obtenu la séquence nucléotidique complète d'eIF4G. Cette séquence de 7012 paires de bases possède 5235 paires de bases de région codante, 102 paires de bases de région 5'UTR et 1675 paires de bases de région 3'UTR (voir annexe).

La protéine traduite fait 1745 acides aminés (Figure 20) pour un poids moléculaire attendu d'environ 192 kilos daltons (192 kDa).

```
   1 msysnppkgk gvyfqqqphp qrhryslqqr pdeianhppr fipqqaprpq hpvpsqspri
  61 pspsvspvav ntlthdmnkq gapsrpamaa spqqgilqnq pnpsappmmn mgqvrfqapr
 121 qplprgyqqq ipqqvypvrh qnqaqmqgmg qhppaggpas qqgatqaqmm qssaaaaasg
 181 qymqqgghqf imagamtgpm nivpqqqvth rpyhqqsfpq vysqttppyy ssppqpvwln
 241 tapaaaprqt fnsqppvsrs esqrnkkiir ivdpstnqdv tdtllrdtsg sssphsgrss
 301 anvtppvsts sedakriqaa faskvamvat asdlpqsdip pphrvppqsa pqqpqtqqpp
 361 qqhqpvpqpi pqpvpqqlpm qpgqppvvvm pggqpvpvva ggnfpvvapg aapvvaqvps
 421 qpvepavpeg apntvvaatp vaeavqpprp vpqaaaaavp aplpvqqpvq iqsvpgtpaq
 481 qippeaipaa vqppvnpvtp avppagppag ppanvqaapv qetappsskh elasvntast
 541 vgraspseqe dapdsdavpp vvqqtvqptt etkpnqvddd skqisannpa vqqsmpasvv
 601 pqpeskeaas tlpeskdgkk ksqkkrfqel dkkttkgsde fdayktddvq eptpsqenpg
 661 kevepepeak askepveetv qddipsekpk etttqpqedk kstektdesp qsdvakrkse
 721 kessvvseke seetvvpdts vpakvekeek sdhidpsedr envneadnve sensknkegk
 781 pnpkdnkmql kyayredqws pnnpegkkqy drdfllqfqk gctdkpdglp nipdivldka
 841 vvqqmsltlq qggnqkssdf mphfmksprv qgkqpnyptg qgrrssrepl kviqrqrdsa
 901 etklstsdka wkpghkrtpe eakddeemkt qdlfrnftsi lnkltpqmfn kltekalqlp
 961 inteerlkgv iqlvfekais epnfstayah mcqrlsqlkv qstsspgqqv qfrpillhnc
1021 qqefekekqt eideaqrrke isqlpanqqe aqlelleekl ykakrrtmgn irfigelfkl
1081 niltenimhg cimkllkakd ddsleclcnl mstigkaldh ekaknridqy fnkidkiias
1141 qanqprirfl mydlvdlrkn nwvprrqenk pttidalhke whvaeakkae elrgyngpsr
1201 sreqappprt vtpqaddgwn tvptsnktrt pydpsklklt rltnvddniq lgpggrgfnm
1261 wgrgsigags knksstesas sssqeeqaps qanrfsmlse dakrpmsrgg sggyssrdsr
1321 grgqspmskr srerdrerdr erekeaviae vqrisrpsra epaeprgske iaapikpekk
1381 eeptmpdskv kqtsvatvae flnlkdfaea trcvselpsk qrhlfvqati dhviekkqdm
1441 retvgvlfhs llnsnlltke qyltgikdmi efaedmaidi pkiyeylgel mgamvierae
1501 ylevqatavm plkefqtagv lmaevlrtas rriganavch lwqqaglkwe tflpdgenvq
1561 efvqkkgvef tlqgasatdn glnsvqgdwv ltfnrgltnl lnerpdnnki fdwikcnvtd
1621 tqkqhpefir alvtlicqha akgegqncri dpeilkqrgp ilqryidskr plelqalfav
1681 qalnhslhsp pgllrilfdv lydedvvsed afydwkksed pkesagkgva lksvtsfftw
1741 laead
```

Figure 20 : Séquence en acides aminés du facteur eIF4G de *Sphaerechinus granularis*

Le facteur eIF4G de l'oursin possède 43% d'identité avec la protéine eIF4G1 humaine.

Une comparaison de séquence entre les eIF4G d'humain, de lapin, de l'oursin et de la drosophile, nous montre que de nombreux motifs peptidiques sont conservés au cours de l'évolution. Ainsi, 3 domaines situés au milieu ou en partie C terminale de la protéine ressortent clairement (Figure 21) : le domaine MIF4G constitue le lieu de fixation entre eIF4G et ces partenaires eIF4A et eIF3; le domaine MA3 est un domaine très riche en hélice alpha susceptible lui aussi d'interagir avec eIF4A et eIF3; enfin le domaine W2 dont la fonction est inconnue mais qui reste caractéristique de nombreux facteurs d'initiation.

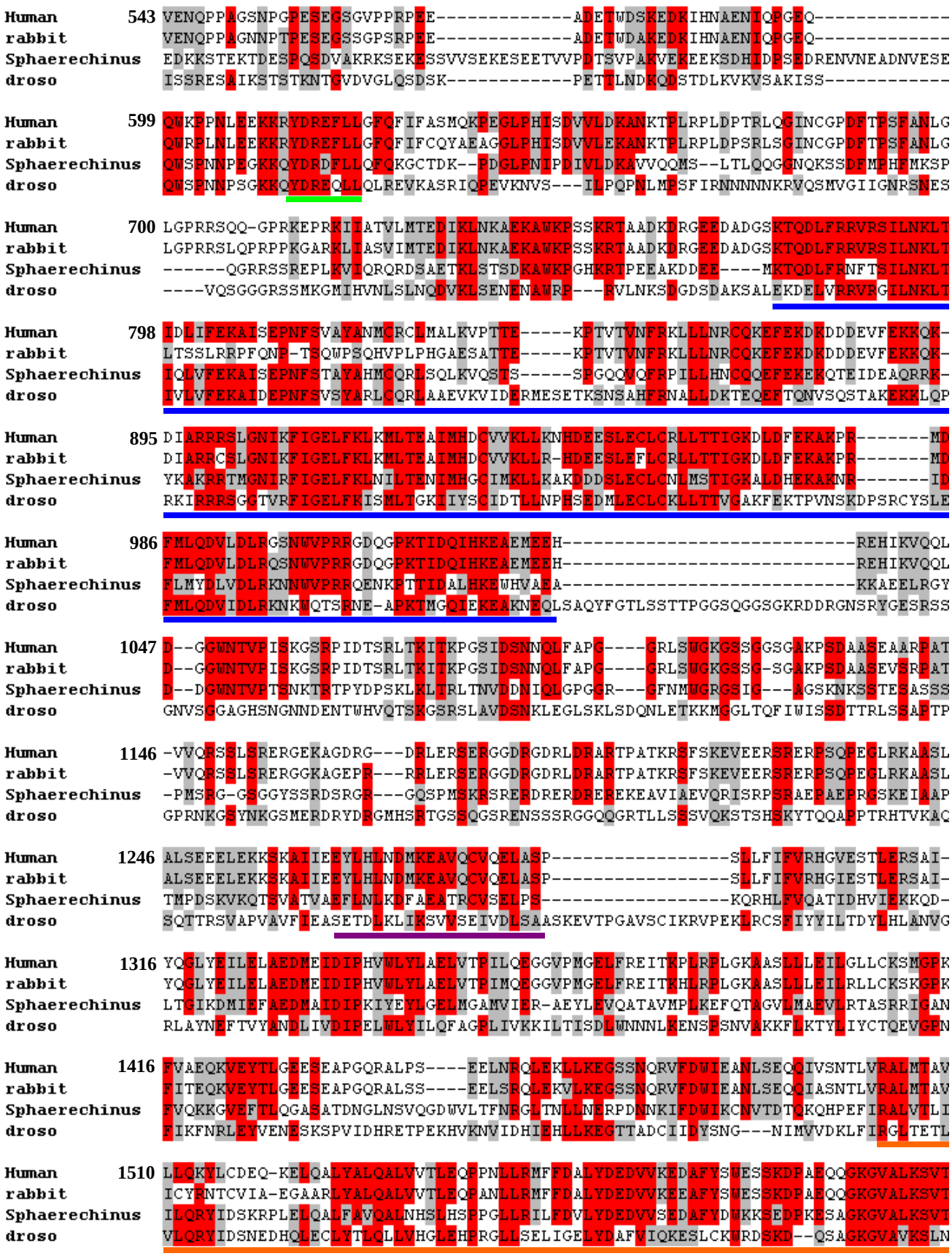


Figure 21 : Comparaison des séquences d'eIF4G dans différentes espèces. En rouge les résidus sont identiques, en gris ils sont similaires. Souligné en vert : Motif de fixation à eIF4E. Souligné en bleu : Domaine MIF4G, Middle domain of eukaryotic initiation factor 4G. Ce domaine riche en hélice alpha est le site de fixtaion entre eIF4Get les acteurs eIF4A et eIF3. Souligné en mauve : Domaine MA3 extrémement riche en hélice alpha. Souligné en orange : Domaine W2. Ce domaine dont la fonction est inconnue se trouve à l'extrémité de nombreux facteurs d'initiation comme eIF5 ou eIF2.

Au sein de cette séquence nous avons aussi isolé le site consensus de fixation à eIF4E basé sur le modèle YXXXXXLΦ. Cette séquence de 17 acides aminés (souligné en vert dans la Figure 21 et en rouge dans la Figure 20 et la Figure 22) possède une forte homologie avec celle des protéines 4E-BP et eIF4G de l'homme, de la souris et de la drosophile (table 5).

4E-BP1 souris	:	R	I	I	Y	D	R	K	F	L	M	E	C	R	N	S	P	V
4E-BP1 humain	:	R	I	I	Y	D	R	K	F	L	M	E	C	R	N	S	P	V
eIF4G drosophile	:	K	K	Q	Y	D	R	E	Q	L	L	Q	L	R	E	V	K	A
eIF4G humain	:	K	K	R	Y	D	R	E	F	L	L	G	F	Q	F	I	F	A
eIF4G oursin	:	K	K	**Q**	**Y**	**D**	**R**	**D**	**F**	**L**	**L**	Q	F	Q	K	G	C	T

Figure 22 : Comparaisons du motif YXXXXXLΦ de eIF4G de *Spaerechinus granularis* avec les motifs de 4E-BP et eIF4G d'autres organismes.

Nous avons fait produire cette séquence de 17 acides aminés afin de tester son impact sur la première division mitotique de l'oursin.

Ce peptide a ensuite été micro-injecté dans des oeufs non fécondés d'oursin. Les oeufs ont été ensuite fécondés et le suivi de leur développement a été réalisé en microscopie à contraste de phase. Un peptide "scrambled" nous a servi de témoin négatif. Le résultat de cette expérience est présenté à la Figure 23.L'expérience a été réalisée sur trois femelles différentes avec une moyenne de 150 oeufs injectés par condition. Un éventuel effet inhibiteur du tampon de micro-injection a été également testé à plusieurs reprises et s'est avéré nul.

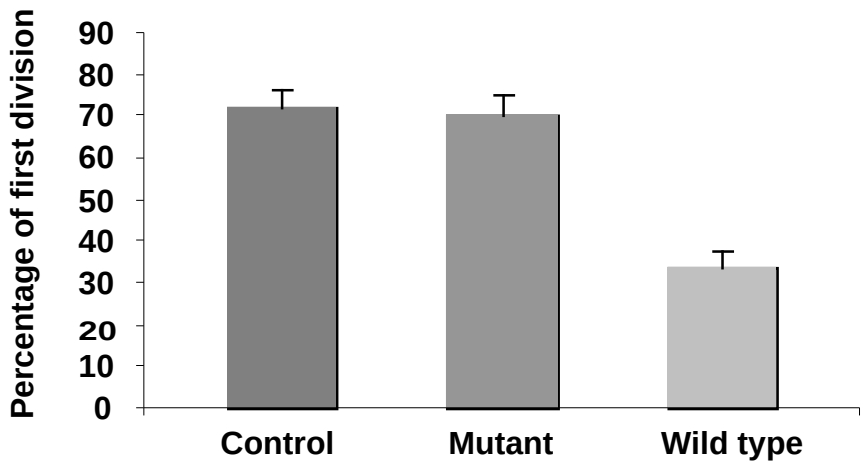


Figure 23 : L'injection du peptide ayant pour séquence le site de fixation d'eIF4G pour eIF4F retarde la première division mitotique. Différentes constructions peptidiques ont été injectées dans les oeufs. Les oeufs ont ensuite été fécondés et observés en microscopie à contraste de phase.

La micro-injection du peptide sauvage correspondant au site de fixation de eIF4G d'oursin pour eIF4E retarde fortement la première division mitotique. Nous supposons que ce peptide agit par compétition avec le facteur eIF4G endogène et empêche ainsi sa fixation sur eIF4E. Le complexe eIF4F ne peut alors se former. Ce résultat est particulièrement important car il implique directement un composant du complexe d'initiation dans le contrôle du cycle cellulaire. Il suppose aussi que la formation de ce complexe est déterminante pour le développement précoce de l'oursin.

D'autres expériences sont en cours et notamment la création d'une protéine de fusion GST qui nous permettra de produire des anti-corps contre eIF4G afin de pouvoir suivre par Western-blot le comportement de cette protéine au cours du développement.

V) Point de vue général sur l'implication de la traduction coiffe dépendante dans le contrôle du cycle cellulaire

Article 5 : Cormier, P., Pyronnet, S., **Salaun, P**., Mulner-Lorillon, O., and Sonenberg, N. (2003). Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 469-75.

Cet article de revue situe les processus traductionnels dans le contrôle du cycle cellulaire et des mécanismes qui en dépendent. Après une description détaillée des différents mécanismes de l'initiation coiffe-dépendante observés chez différents modèles, nous expliquons pourquoi les acteurs de la traduction sont fréquemment impliqués dans les processus cancéreux et comment la voie FRAP / mTOR se pose de ce fait comme une cible thérapeutique privilégiée

Progress in Cell Cycle Research, Vol. 5, 469-475, (2003)
(Meijer, L., Jézéquel, A., and Roberge, M., eds.)

chapter 48

Cap-dependent translation and control of the cell cycle

Patrick Cormier[1]*, Stéphane Pyronnet[2], Patrick Salaün[1], Odile Mulner-Lorillon[1] and Nahum Sonenberg[3]

[1] Station Biologique de Roscoff, Université Pierre et Marie Curie (EI 37), CNRS-UMR 7127, (INSU), BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France
[2] INSERM U531, Institut Louis Bugnard, C.H.U. Rangueil, 31403 Toulouse, France
[3] Department of Biochemistry and McGill Cancer Center, McGill University, Montreal, Quebec H3G 1Y6, Canada.
* To whom correspondence should be addressed

The control of gene expression at the translational level has emerged in the past decade as an important aspect of cell growth, proliferation and malignant transformation. Translation is primarily regulated at the initiation step, and mitogen-dependent signaling pathways converge to modulate the activity of translation initiation factors. In most tumors tested, at least one translation initiation factor is overexpressed and overexpression of translation initiation factors often provokes transformation. Malignant transformation could be caused by the increased translation of a subset of mRNAs encoding important proteins which are required for cell growth and proliferation. These mRNAs usually possess regulatory sequences that render their translation more sensitive to changes in the activity of translation initiation factors. In this chapter, we describe recent advances illustrating the importance of translation in cell cycle progression and cell transformation. Control of translation initiation may represent an excellent target for antitumor drugs.

mRNA translation, which has been considered for a long time as a "house keeping" mechanism, is now recognized as an important regulatory step for gene expression in different physiological and pathophysiological processes including development (1), apoptosis (2) and cell proliferation (3). Consequently, deregulation of translation rates is associated with malignant transformation (4). Translation rates are primarily regulated at the initiation level, a complicated multistep process involving a large number of initiation factors. Among them, the eIF4 (eukaryotic translation Initiation Factor 4) group, which facilitates the recruitment of ribosomes to the mRNA 5' end, is a prime target for regulation. In this chapter, we first review the important pathways that control the activity of eIF4 factors. We also present data providing evidence that these translation initiation factors play critical functions in cell cycle progression (from yeast to metazoans, including echinoderms and mammals), and that deregulation of their activity contributes to cell transformation. Finally, we discuss recent findings suggesting that the mechanisms that control eIF4 factors activity and consequent cell cycle events represent promising targets for cancer therapy.

CAP-DEPENDENT RECRUITMENT OF RIBOSOMES TO mRNAs

During the initiation process of translation, a mRNA is recruited by the translation machinery into an initiation complex with the 40S small ribosomal subunit. In this complex, the anticodon of the initiator Met-tRNA$_i$ interacts with the initiation codon. This process establishes the reading frame of the mRNA and requires at least 11 initiation factors (eIFs) (Figure 1). The energy which is consumed in the process is derived from ATP and GTP hydrolysis. The initiator Met-tRNA$_i$ forms a ternary complex with eIF2 bound to GTP (step 1), which interacts with the 40S ribosomal subunit and forms the 43S preinitiation complex (step 2). Binding of the initiator Met-tRNA$_i$ to the small ribosomal subunit is mediated by eIF2 and is regulated by eIF2B, in all eukaryotes (5). Phosphorylation of eIF2α on serine 51 inhibits translation initiation. Stabilization of the eIF2/GTP/Met-tRNA$_i$ ternary complex is effected by eIF3 which is present in the 43S complex.

eIF4F facilitates the recruitment of ribosomes to the mRNA 5' end (step 3). eIF4F is composed of three subunits: (a) eIF4E, which recognizes and binds to the 5' cap structure (m7GpppN, where N is any nucleotide); (b) eIF4A, a RNA-dependent ATPase and RNA helicase; (c) eIF4G, a large polypeptide that serves as a scaffolding protein. eIF4F also interacts with the ribosome-associated eIF3, and thus provides a physical link between the ribosome and the mRNA 5' cap. The RNA helicase activity of eIF4A, in conjunction with eIF4B, is thought to facilitate ribosome binding by unwinding the mRNA secondary structure. Association of the 43S preinitiation complex with the mRNA bound to eIF4F and eIF4B forms the 48S complex (step 4). The 40S ribosomal subunit is thought to scan from the 5' terminus downstream to the initiation codon (step 5). The 43S preinitiation complex pauses upon encountering the initiation codon, which facilitates joining of the 60S ribosomal subunit to form a 80S functional ribosome (step 10). This process requires the hydrolysis of eIF2-bound GTP into GDP in the presence of eIF5 (step 6). GTP hydrolysis also decreases the affinity between initiation factors and the 40S ribosomal subunit (steps 7 and 8). The released initiation factors recycle for another round of translation initiation (step 9). eIF5B, a recently discovered initiation factor, which has ribosome-dependent GTPase activity, plays an important

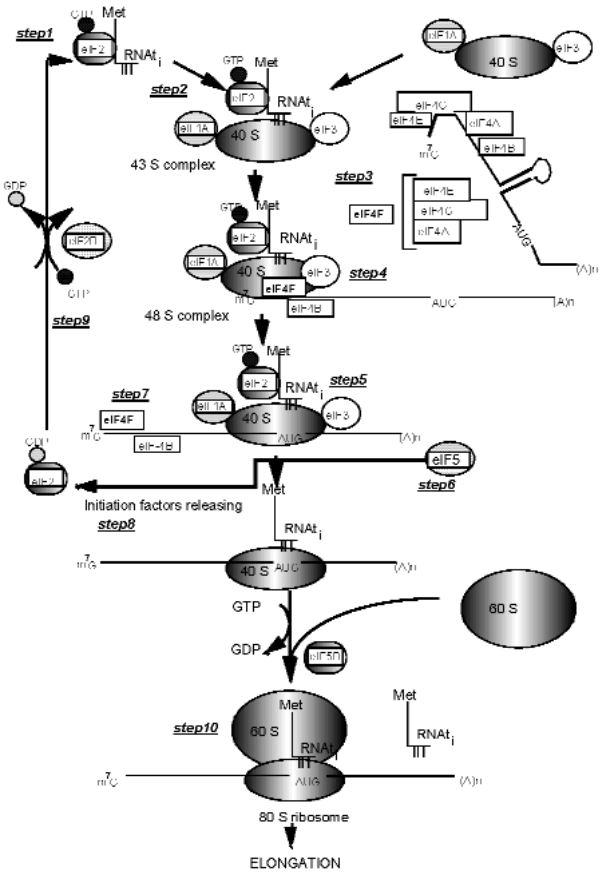


Figure 1. The initiation phase of translation.
The small ribosomal subunit (40S) is recruited at the mRNA 5' end *via* complex array of protein/protein and protein/RNA interactions. The 40S ribosomal subunit scans the mRNA until it encounters the initiation codon where the ribosome (80S) is assembled and starts elongation. See text for details.

role in the 60S ribosomal subunit joining process (6). Because eIF4E is the most limiting translation initiation factor (7), mRNA binding to ribosomes is generally the rate-limiting step in translation initiation (3). Therefore this step is a major target for translation control (8).

INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS MODULATING eIF4F FORMATION

eIF4F assembly is controlled by a family of translational repressors, the eIF4E binding proteins (or 4E-BPs, also called PHAS-I : Phosphorylated Heat- and Acid-Stable protein, Insulin stimulated). 4E-BPs compete with eIF4G for a common binding site on eIF4E (9). Thus, 4E-BPs sequester eIF4E, and consequently prevent eIF4F complex assembly (10). In mammals, three 4E-BP homologs exist (4E-BP1, 4E-BP2 and 4E-BP3) (11, 12), but only one ortholog has been described in invertebrates (13-15). In mammals, 4E-BPs binding to eIF4E is reversible as 4E-BPs' affinity for eIF4E is affected by the phosphorylation status of 4E-BPs (Figure 2). The underphosphorylated forms of 4E-BPs interact strongly with eIF4E, whereas the hyperphosphorylated forms do not (11). Multiple and hierarchical phosphorylation events are required to release 4E-BP1 from eIF4E (16). A large body of evidence indicates that 4E-BP1 is a downstream target of PI3K (phosphoinositide 3'-OH kinase) and its downstream effector, the serine/threonine kinase Akt/protein kinase B (PKB) (17). 4E-BP phosphorylation is also dependent on FRAP/mTOR (FKBP12 and Rapamycin-Associated Protein/mammalian Target Of Rapamycin) (18). However, whether FRAP-mTOR activity mediates responsiveness to PI3K or Akt remains controversial (8).

eIF4E activity is also phosphorylated on a conserved serine in metazoans (19-22). Phosphorylated eIF4E was initially reported to possess a higher affinity for the cap structure (23) and to form a more stable eIF4F complex (24). However, it has been recently shown that phosphorylation of eIF4E diminishes its ability to bind to a cap analogue or capped mRNA (25). In mammals, the best candidate for eIF4E phosphorylation is Mnk1 (Figure 3a), the MAP kinase-interacting protein kinase-1 (26), also called MAP kinase signal-integrating kinase 1 (27). Mnk1 uses a docking site in the scaffolding protein eIF4G (28, 29) to phosphorylate eIF4E. Consistent with this, eIF4E sequestration by 4E-BP inhibits eIF4E phosphorylation (30) and, conversely, eIF4E bound to eIF4G is a better substrate for phosphorylation (28, 29).

Early developmental systems provided new insight into additional mechanisms of eIF4E and 4E-BP regulation. In echinoderms, 4E-BP is rapidly degraded following sea urchin fertilization (Figure 3b) (31). This degradation coincides with rapid phosphorylation and dissociation of 4E-BP from eIF4E (14). Post-translational degradation thus represents a novel mechanism for regulation of 4E-BP function in sea urchin early development and should now be investigated in other systems.

In *Xenopus laevis* oocytes, eIF4F formation is prevented by binding of the Maskin protein (32) to both eIF4E and the Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein CPEB (Figure 3c) (33, 34). Maskin contains an eIF4E recognition motif (32) although the tyrosine YXXXXLø (where X is any amino acid and ø is an aliphatic residue, usually L, M or F) is occupied by a threonine residue and that the interaction with eIF4E appears to be weak. Through eIF4E binding, Maskin precludes eIF4G association with eIF4E, thereby preventing eIF4F formation and consequently maintaining mRNAs in a dormant state in oocytes (32). During meiotic maturation, the poly(A) tail of a subset of mRNAs is extended (35). Consequently, the Poly(A) Binding Protein (PABP) is recruited to the poly(A) and binds to eIF4G (36, 37) and the PABP-eIF4G complex subsequently evicts Maskin from eIF4E, allowing mRNA translation (38).

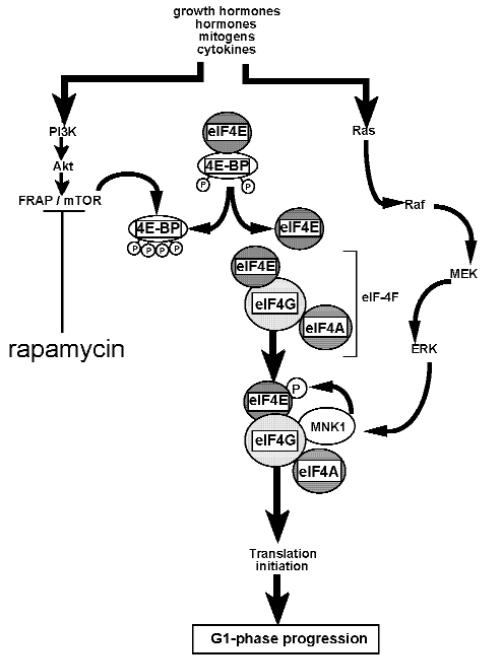


Figure 2. Signal transduction pathways impinging upon cap-dependent translation initiation in mammalian cells.
The hypophosphorylated forms of 4E-BP bind strongly to eIF4E and block cap-dependent translation in resting cells. Following stimulation with growth hormones, hormones, mitogens or cytokines, 4E-BP is hyperphosphorylated by the PI3K- and Akt/PKB-dependent FRAP/mTOR kinase pathway and dissociates from eIF4E. Liberated eIF4E assembles into the eIF4F complex (composed of eIF4E, eIF4G and eIF4A). Mnk1 is recruited to eIF4E through its direct interaction with eIF4G. Mnk1 is activated by the *Ras/Raf*/MEK/ERK cascade and then phosphorylates eIF4E. The resulting stimulation of cap-dependent translation is necessary for G_1 progression. FRAP /mTOR is sensitive to rapamycin, a compound that blocks cap-dependent translation and causes cell cycle arrest at G_1.

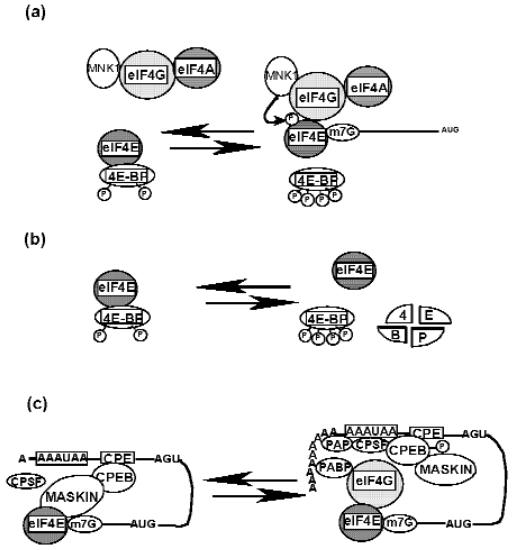


Figure 3. Cell cycle-dependent regulation of cap-dependent translation in different species.
(a) In mammalian cells, eIF4E is sequestered by the hypophosphorylated forms of 4E-BP and cap-dependent translation is inhibited at G_2/M (left). In G_1/S, cap-dependent translation increases following 4E-BP hyperphosphorylation and consequent eIF4F complex formation (right) (adapted from (58)). **(b)** In unfertilized sea urchin eggs, 4E-BP is bound to eIF4E (left). Following fertilization, 4E-BP is rapidly phosphorylated and degraded, and translation rates dramatically increase (right) (adapted from (31)). **(c)** In *Xenopus* embryos, Maskin binding to both CPEB and eIF4E prevents cap-dependent translation in S phase (left). During mitosis, CPEB is phosphorylated and recruits CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor), which attracts the Poly(A) Polymerase (PAP) to the 3' end of the mRNA. The Poly(A) Binding protein (PABP) then binds both to the newly elongated poly(A) tail and eIF4G. This complex displaces Maskin from eIF4E allowing eIF4G association with eIF4E and consequent cap-dependent translation (adapted from (38)).

CAP-INDEPENDENT TRANSLATION

In contrast to cap-dependent initiation translation described above, a subset of mRNAs is translated independently of their cap, by recruitment of the 40 S ribosomal subunit to an Internal Ribosome Entry Site (IRES) (39, 40). Internal ribosome entry bypasses the requirement for eIF4E. Several cellular mRNAs are translated efficiently when cap-dependent translation is impaired under a variety of stress conditions, including hypoxia, serum deprivation, irradiation and apoptosis (41). Several IRES-containing mRNAs encode proteins that regulate cell proliferation or apoptosis such as the proto-oncogene *c-myc* (42), the pro-apoptic factor Apaf-1 (43) as well as the inhibitor of apoptosis XIAP (44).

Recent reports indicate that IRES sequences can drive gene expression in a tissue-specific manner (45). Also, a few cellular IRES have been shown to function preferentially during mitosis (46). These findings raise the possibility of using IRES for anticancer therapy. For example, one can engineer a suicide gene whose expression in tumors would be restricted to a unique cell type, thus limiting potential side effects. Also, a mitosis-specific IRES could provide a means to target the expression of a toxic gene solely to proliferating cells, avoiding undesirable expression in differentiated tissues.

eIF4F COMPLEX REGULATION AND CELL CYCLE

The rate of protein synthesis is a critical feature in entry and progression through the cell cycle (47). In mammalian cells, 50% inhibition of protein synthesis prevents DNA replication following mitogenic stimulation (48, 49). Thus, a critical rate of protein synthesis must be attained to permit DNA replication. Consistent with this, eIF4F assembly, and thus cap-dependent translation initiation, plays an essential role in the G_1/S transition. For instance, in budding yeast, a conditional mutation in *cdc33*, encoding eIF4E, causes arrest at the G_1/S boundary through inefficient synthesis of the cyclin CLN3 (50, 51). Similarly, temperature-sensitive mutations of PRT1, encoding an

eIF3 subunit in yeast, inhibit protein synthesis and provoke G_1 arrest (52). Therefore, translation of G_1 cyclin mRNAs represents a regulatory step for the G_1/S transition.

The control of cyclin B translation appears to play an important role in G_2/M progression. In fission yeast, mutations in *ded1*, encoding a member of the DEAD-box proteins family (53, 54), engenders a phenotype similar to that observed in a cyclin B defect (55). In *Xenopus laevis*, during oocyte meiotic maturation, regulation of cyclin B1 translation is crucial for the onset of meiotic divisions (38). In cycling extracts from *Xenopus* embryos (56), cell cycle progression is controlled by polyadenylation-induced translation of cyclin B1 mRNA (38). The mitotic cyclins A and B were first discovered in sea urchin (57) as proteins that are rapidly synthesized and degraded at each cell cycle. Interestingly, Salaün et al. have shown recently that Cyclin B translation coincides with eIF4E/4E-BP complex dissociation following sea urchin fertilization (31). Therefore, the release of eIF4E from the cap-dependent translation repressor 4E-BP, like Maskin in *Xenopus* (38) seems to play a critical role in the regulation of cyclin B translation during early embryonic development.

The rate of protein synthesis varies during cell cycle progression in mammalian cells. While cap-dependent translation is prevalent in the G_1/S phase, it is inhibited in the G_2/M phase (58). The synthesis of proteins required for the completion of mitosis, such as ornithine decarboxylase (46) and the cdk-like $p58^{PITSLRE}$ (59), is however maintained by a cap-independent, IRES-mediated, mechanism. Recent work provided important insight into the mechanisms that engender such a switch from cap- to IRES-dependent translation (60). 4E-BPs are hypophosphorylated when the cell enters mitosis and bind tightly to eIF4E, leading to eIF4F complex disruption. eIF4E separated from eIF4G is then no longer phosphorylated as it is separated from its eIF4G-associated Mnk1 kinase (Figure 3a) (60). An interesting hypothesis is that activated Mnk1 complexed to eIF4G might phosphorylate yet uncharacterized proteins, which are involved in IRES-dependent translation. However, further studies are required to establish the kinetics of 4E-BP phosphorylation during the cell cycle, as 4E-BP1 was also shown to be phosphorylated during anaphase (61).

Thus, the canonical eIF4 translational factors play a crucial regulatory role in cell cycle progression. In light of these data, it is therefore not too surprising that deregulation of these translation initiation factors is implicated in malignant transformation.

DEREGULATION OF CAP-DEPENDENT TRANSLATION AND CANCER

The importance of translation factors in cell proliferation and cancer has emerged in the past decade (62, 63). Cell proliferation is associated with enhanced rates of protein synthesis which increase in response to treatment with cytokines, growth factors, hormones and mitogens (8).

Oncogenic activity of translation factors was first suggested by the finding that eIF4E overexpression leads to the transformation of NIH-3T3 fibroblasts (64). Subsequently, numerous reports demonstrated that aberrant expression of other eIFs (including eIF2, eIF3, eIF4A, and eIF4G) is a widespread feature of tumor development (63, 65). Among eIFs, eIF4E appears to play a prominent role in malignancy (17, 65). eIF4E overexpression activates the *ras* oncogene (66) and has been shown to cooperate with two immortalizing oncogenes, adenovirus E1A and *v-myc*, to transform murine embryo fibroblasts (67), thereby satisfying the definition of an oncogene in the classic two-oncogene transformation assay.

Elevated levels of eIF4E protein were reported in a broad spectrum of transformed cell lines and tumors including colon, breast and head and neck carcinomas (68). Malignant transformation as a result of eIF4E overexpression is explained by a specific effect on a subset of mRNAs containing long and structured 5' UTRs (69). Indeed, a large fraction of mRNAs that contain long and structured 5' UTRs encode proteins involved in cell growth and proliferation (*e.g.* growth factors and their receptors, signaling polypeptides, transcription factors and cyclins). Translation of mRNAs containing long and structured 5' UTRs is more sensitive to the RNA helicase activity of eIF4A (70). As eIF4E is the limiting component of the helicase complex, eIF4F, mRNAs containing secondary structures would be translated more efficiently in eIF4E-overexpressing transformed cells. The mRNA encoding ornithine decarboxylase (ODC) possesses a highly structured 5' UTR (71, 72). ODC mRNA is better translated (up to 30-fold) in cells overexpressing eIF4E as compared to normal cells (73, 74). Other proteins that are preferentially upregulated in eIF4E-overexpressing cells include: cyclin D1 and c-Myc, which control cell cycle progression and tumorigenesis; basic fibroblast growth factor (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which are involved in cell growth and angiogenesis (68).

Interestingly, a reduction in eIF4E amount by using antisense RNA in eIF4E-transformed cells results in partial reversion of the transformed phenotype (75). Also, overexpression of 4E-BP1 or 4E-BP2 partially reverts the transformed phenotype of eIF4E-, ras- or src-transformed mammalian cells (76). Since several gastrointestinal cell lines or tumors (77) exhibit a low 4E-BP/eIF4E ratio, an interesting hypothesis is that, in addition to eIF4E, 4E-BP protein levels may play a role in cell transformation. Therefore, taken together, these data suggest that 4E-BP could potentially function as a tumor suppressor.

Components of the translation initiation apparatus, including eIF4G, eIF4B, eIF2α and the p35 subunit of eIF3, have been implicated in the apoptotic process (2, 41). For example, at the onset of apoptosis, eIF4G is cleaved by activated caspases, and cap-dependent translation abruptly decreases (78). Apoptosis of NIH-3T3 cells subjected to serum deprivation is prevented by an increase in eIF4E levels (79). Wild-type 4E-BP1 overexpression promotes

apoptosis only in transformed cells, but not in nontransformed fibroblasts (80). However, nontransformed fibroblasts undergo apoptosis when cap-dependent translation is inhibited by 4E-BP1 dephosphorylation, suggesting that phosphorylation/dephosphorylation events govern the proapoptotic potency of 4E-BP1 (81). Thus, the regulation of cap-dependent translation appears as a target and a regulator of apoptosis.

FRAP/mTOR SIGNALING PATHWAY AS A TARGET FOR CANCER THERAPY

The original observations implicating the FRAP/mTOR signaling pathways in the phosphorylation of 4E-BP were based on the finding that rapamycin inhibits 4E-BP phosphorylation in response to insulin, insulin-like growth factor and serum stimulation (82-84). Rapamycin is a macrolide isolated from the bacterium *Streptomyces hygroscopicus* (85), and possesses potent antifungal, immunosuppressant and antitumor activities. Because of its inhibitory effect on lymphocyte proliferation, rapamycin was initially developed as an anti-rejection drug in kidney transplant patients (86). The antiproliferative effect of rapamycin and its inhibitory action on the growth of tumors, offer the possibility that this drug or its derivatives, CCI-779 and RAD-001, could function as therapeutics against cancer (87, 88).

The intracellular rapamycin receptor is an abundant and ubiquitously expressed immunophilin called FKBP12 (FK506-binding protein, MW of 12 kDa). (89-91). Rapamycin-FKBP12 complex interacts specifically with the evolutionarily conserved FRAP/mTOR proteins (also known as RAFT1 and RAP1), to potently inhibit signaling to downstream targets (18). Treatment of mammalian cells with rapamycin, which blocks TOR activity and 4E-BP phosphorylation (18), causes eIF4E sequestration by 4E-BP1. Consequently, rapamycin inhibits cap-dependent translation (84) but has no effect on cap-independent translation (92, 93). It is noteworthy that, in addition to its effect on 4E-BP phosphorylation, rapamycin also inhibits the phosphorylation of S6 kinase, eIF4GI, eIF4B (18) and elongation factor 2, eEF2 (94).

Rapamycin represents a promising therapeutic agent for the treatment of cancers which result from deregulation of the PI3K-FRAP/mTOR pathway (87). The antiproliferative effect of rapamycin might be explained by its ability to inhibit the translation of mRNAs possessing long and structured 5' UTRs, which encode for proteins required for G_1 to S phase progression (87, 95). Interestingly, recent results demonstrate the involvement of a rapamycin-sensitive pathway for cyclin B synthesis and completion of the first mitotic division of sea urchin embryos (31). Therefore, determination of the number and the nature of mRNAs translated in a rapamycin-sensitive manner is an important goal that is now feasible by DNA chip technologies (63, 96).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC n° 4247, France), La Ligue Nationale contre le Cancer and Conseil Régional de Bretagne.

REFERENCES

1. Wickens, M., Goodwin, E. B., Kimble, J., Strickland, S., and Hentze, M. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds), pp. 295-370, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
2. Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M., and Morley, S. J. (2000) *Cell Death Differ* **7**, 603-615.
3. Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W., and Mathews, M. B., eds), pp. 1-31, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
4. Sonenberg, N. (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**, 955-960.
5. Clemens, M. J. (1996) in *Translational control* (Hershey, J. W., Mathews, M. B., and Sonenberg, N., eds), pp. 139-172, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
6. Pestova, T. V., Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., and Hellen, C. U. (2000) *Nature* **403**, 332-335.
7. Duncan, R., Milburn, S. C., and Hershey, J. W. (1987) *J Biol Chem* **262**, 380-388.
8. Raught, B., Gingras, A. C., and Sonenberg, N. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W., and Mathews, M. B., eds), pp. 245-293, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
9. Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) *Mol Cell Biol* **15**, 4990-4997.
10. Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) *Embo J* **14**, 5701-5709.
11. Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr., and Sonenberg, N. (1994) *Nature* **371**, 762-767.
12. Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998) *J Biol Chem* **273**, 14002-14007.
13. Bernal, A., and Kimbrell, D. A. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6019-6024.
14. Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N., and Belle, R. (2001) *Dev Biol* **232**, 275-283.
15. Miron, M., Verdu, J., Lachance, P. E., Birnbaum, M. J., Lasko, P. F., and Sonenberg, N. (2001) *Nat Cell Biol* **3**, 596-601.
16. Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (2001) *Genes Dev* **15**, 2852-2864.
17. Sonenberg, N., and Gingras, A. C. (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**, 268-275.
18. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N.

(2001) *Genes Dev* **15**, 807-826.

19. Dyer, J. R., Pepio, A. M., Yanow, S. K., and Sossin, W. S. (1998) *J Biol Chem* **273**, 29469-29474.
20. Flynn, A., and Proud, C. G. (1995) *J Biol Chem* **270**, 21684-21688.
21. Joshi, B., Cai, A. L., Keiper, B. D., Minich, W. B., Mendez, R., Beach, C. M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., and Rhoads, R. E. (1995) *J Biol Chem* **270**, 14597-14603.
22. Whalen, S. G., Gingras, A. C., Amankwa, L., Mader, S., Branton, P. E., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1996) *J Biol Chem* **271**, 11831-11837.
23. Minich, W. B., Balasta, M. L., Goss, D. J., and Rhoads, R. E. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7668-7672.
24. Tuazon, P. T., Morley, S. J., Dever, T. E., Merrick, W. C., Rhoads, R. E., and Traugh, J. A. (1990) *J Biol Chem* **265**, 10617-10621.
25. Scheper, G. C., van Kollenburg, B., Hu, J., Luo, Y., Goss, D. J., and Proud, C. G. (2002) *J Biol Chem* **277**, 3303-3309.
26. Fukunaga, R., and Hunter, T. (1997) *Embo J* **16**, 1921-1933.
27. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997) *Embo J* **16**, 1909-1920.
28. Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999) *Embo J* **18**, 270-279.
29. Waskiewicz, A. J., Johnson, J. C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S. R., and Cooper, J. A. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 1871-1880.
30. Wang, X., Flynn, A., Waskiewicz, A. J., Webb, B. L., Vries, R. G., Baines, I. A., Cooper, J. A., and Proud, C. G. (1998) *J Biol Chem* **273**, 9373-9377.
31. Salaün, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., and Cormier, P. (submitted).
32. Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R., and Richter, J. D. (1999) *Mol Cell* **4**, 1017-1027.
33. McGrew, L. L., Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B., and Richter, J. D. (1989) *Genes Dev* **3**, 803-815.
34. Fox, C. A., Sheets, M. D., and Wickens, M. P. (1989) *Genes Dev* **3**, 2151-2162.
35. Richter, J. D. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds), pp. 785-805, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
36. Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1996) *Embo J* **15**, 7168-7177.
37. Wakiyama, M., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2000) *Curr Biol* **10**, 1147-1150.
38. Groisman, I., Jung, M. Y., Sarkissian, M., Cao, Q., and Richter, J. D. (2002) *Cell* **109**, 473-483.
39. Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988) *Nature* **334**, 320-325.
40. Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. (2001) *EMBO Rep* **2**, 893-898.
41. Holcik, M., Sonenberg, N., and Korneluk, R. G. (2000) *Trends Genet* **16**, 469-473.
42. Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A., and Willis, A. E. (1998) *Oncogene* **16**, 423-428.
43. Coldwell, M. J., Mitchell, S. A., Stoneley, M., MacFarlane, M., and Willis, A. E. (2000) *Oncogene* **19**, 899-905.
44. Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., and Korneluk, R. G. (1999) *Nat Cell Biol* **1**, 190-192.
45. Creancier, L., Morello, D., Mercier, P., and Prats, A. C. (2000) *J Cell Biol* **150**, 275-281.
46. Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2000) *Mol Cell* **5**, 607-616.
47. O'Farrell, P. H. (2001) *Trends Cell Biol* **11**, 512-519.
48. Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K. G. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5365-5369.
49. Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K. G. (1995) *Curr Opin Cell Biol* **7**, 835-842.
50. Polymenis, M., and Schmidt, E. V. (1997) *Genes Dev* **11**, 2522-2531.
51. Danaie, P., Altmann, M., Hall, M. N., Trachsel, H., and Helliwell, S. B. (1999) *Biochem J* **340**, 135-141.
52. Hanic-Joyce, P. J., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1987) *Exp Cell Res* **172**, 134-145.
53. de la Cruz, J., Iost, I., Kressler, D., and Linder, P. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5201-5206.
54. Iost, I., Dreyfus, M., and Linder, P. (1999) *J Biol Chem* **274**, 17677-17683.
55. Grallert, B., Kearsey, S. E., Lenhard, M., Carlson, C. R., Nurse, P., Boye, E., and Labib, K. (2000) *J Cell Sci* **113**, 1447-1458.
56. Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1989) *Nature* **339**, 275-280.
57. Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983) *Cell* **33**, 389-396.
58. Pyronnet, S., and Sonenberg, N. (2001) *Curr Opin Genet Dev* **11**, 13-18.
59. Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., and Beyaert, R. (2000) *Mol Cell* **5**, 597-605.
60. Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. (2001) *Genes Dev* **15**, 2083-2093.
61. Heesom, K. J., Gampel, A., Mellor, H., and Denton, R. M. (2001) *Curr Biol* **11**, 1374-1379.
62. Hershey, J. W., and Miyamoto, S. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds), pp. 637-654, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
63. Dua, K., Williams, T. M., and Beretta, L. (2001) *Proteomics* **1**, 1191-1199.
64. Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., and Sonenberg, N. (1990) *Nature* **345**, 544-547.

65. Watkins, S. J., and Norbury, C. J. (2002) *Br J Cancer* **86**, 1023-1027.
66. Lazaris-Karatzas, A., Smith, M. R., Frederickson, R. M., Jaramillo, M. L., Liu, Y. L., Kung, H. F., and Sonenberg, N. (1992) *Genes Dev* **6**, 1631-1642.
67. Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992) *Mol Cell Biol* **12**, 1234-1238.
68. De Benedetti, A., and Harris, A. L. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 59-72.
69. Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992) *Embo J* **11**, 4153-4158.
70. Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghighat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (2001) *Rna* **7**, 382-394.
71. Brabant, M., McConlogue, L., van Daalen Wetters, T., and Coffino, P. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2200-2204.
72. Katz, A., and Kahana, C. (1988) *J Biol Chem* **263**, 7604-7609.
73. Shantz, L. M., and Pegg, A. E. (1994) *Cancer Res* **54**, 2313-2316.
74. Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., and Sonenberg, N. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1065-1070.
75. Zimmer, S. G., DeBenedetti, A., and Graff, J. R. (2000) *Anticancer Res* **20**, 1343-1351.
76. Rousseau, D., Gingras, A. C., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996) *Oncogene* **13**, 2415-2420.
77. Dilling, M. B., Germain, G. S., Dudkin, L., Jayaraman, A. L., Zhang, X., Harwood, F. C., and Houghton, P. J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 13907-13917.
78. Marissen, W. E., Gradi, A., Sonenberg, N., and Lloyd, R. E. (2000) *Cell Death Differ* **7**, 1234-1243.
79. Polunovsky, V. A., Rosenwald, I. B., Tan, A. T., White, J., Chiang, L., Sonenberg, N., and Bitterman, P. B. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 6573-6581.
80. Polunovsky, V. A., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Peterson, M., Tan, A., Rubins, J. B., Manivel, J. C., and Bitterman, P. B. (2000) *J Biol Chem* **275**, 24776-24780.
81. Li, S., Sonenberg, N., Gingras, A. C., Peterson, M., Avdulov, S., Polunovsky, V. A., and Bitterman, P. B. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 2853-2861.
82. Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Argast, G. M., Krebs, E. G., Kong, X., Lin, T. A., and Lawrence, J. C., Jr. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7222-7226.
83. Lin, T. A., Kong, X., Saltiel, A. R., Blackshear, P. J., and Lawrence, J. C., Jr. (1995) *J Biol Chem* **270**, 18531-18538.
84. Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N., and Sonenberg, N. (1996) *Embo J* **15**, 658-664.
85. Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975) *J Antibiot* (Tokyo) **28**, 721-726.
86. Kahan, B. D. (2000) *Lancet* **356**, 194-202.
87. Hidalgo, M., and Rowinsky, E. K. (2000) *Oncogene* **19**, 6680-6686.
88. Huang, S., and Houghton, P. J. (2002) *Curr Opin Investig Drugs* **3**, 295-304.
89. Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., and Schreiber, S. L. (1989) *Nature* **341**, 758-760.
90. Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S., and Sigal, N. H. (1989) *Nature* **341**, 755-757.
91. Siekierka, J. J., Wiederrecht, G., Greulich, H., Boulton, D., Hung, S. H., Cryan, J., Hodges, P. J., and Sigal, N. H. (1990) *J Biol Chem* **265**, 21011-21015.
92. Beretta, L., Svitkin, Y. V., and Sonenberg, N. (1996) *J Virol* **70**, 8993-8996.
93. Svitkin, Y. V., Hahn, H., Gingras, A. C., Palmenberg, A. C., and Sonenberg, N. (1998) *J Virol* **72**, 5811-5819.
94. Proud, C. G. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds), pp. 719-739, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
95. Wiederrecht, G. J., Sabers, C. J., Brunn, G. J., Martin, M. M., Dumont, F. J., and Abraham, R. T. (1995) *Progress in Cell Cycle Research* **1**, 53-71.
96. Carter, M. S., Kuhn, K. M., and Sarnow, P. (2000) in *Translational control of gene expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., eds), pp. 615-635, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré que, dans l'œuf d'oursin, le facteur d'initiation eIF4E est associé à 4E-BP mais aussi avec H4E-BP, une nouvelle protéine de 40 kDa possédant toutes les caractéristiques de 4E-BP. En filtration sur gel, ces trois protéines sont présentes dans une fraction de 80 kDa suggérant l'existence d'un complexe trimérique.

La fécondation provoque une dissociation rapide de eIF4E avec 4E-BP et H4E-BP ainsi qu'une dégradation quasi totale de ces dernières. Cette dissociation et cette dégradation se font de manière rapamycine sensible suggérant ainsi que la kinase FRAP / mTOR contrôle ces processus. La PI3 kinase semble elle aussi être impliquée mais d'une manière moins importante.

La libération d'eIF4E est nécessaire pour la synthèse de la cycline B, elle-même indispensable pour la formation du MPF et donc par la mitose. Aussi, eIF4E ne doit pas seulement être libéré de ses répresseurs, mais doit aussi s'associer à eIF4G, pour pouvoir former le complexe eIF4F. Vers 10 heures après la fécondation, les protéines 4E-BP et H4E-BP réapparaissent et s'associent à nouveau à eIF4E.

I) Implication du complexe eIF4E / 4E-BP dans le développement de l'embryon d'oursin

L'œuf d'oursin, avant la fécondation, est dans un état de quiescence et présente une synthèse protéique très faible. Il a été démontré que dans cet oeuf, il existait un répresseur de la synthèse protéique. L'augmentation considérable du taux de protéines synthétisées, déclenchée par la fécondation, résulterait donc d'une dérépression de la machinerie de la synthèse protéique. Dans ce cadre, les résultats obtenus au cours de ma

thèse démontrent clairement que 4E-BP joue un rôle primordial dans la répression de la synthèse protéique dans l'ovule d'oursin.

Aussi, nous avons montré qu'à la fécondation, la libération d'eIF4E joue un rôle déterminant pour la première division mitotique du jeune embryon. Cette libération est rendue possible par la dégradation de son répresseur 4E-BP. Le côté drastique de cette dégradation est remarquable et coïncide avec le fait que le jeune embryon a besoin d'augmenter considérablement sa synthèse protéique dans un temps relativement court. De manière intéressante, si l'on bloque cette dégradation par la rapamycine, le cycle cellulaire est retardé et le plus souvent les embryons ne parviennent jamais à un développement viable. La libération d'eIF4E est donc cruciale pour la vie de l'embryon et il se peut qu'une baisse de l'affinité de ses répresseurs (*via* un jeu de phosphorylations) ne soit pas suffisante pour garantir que ce facteur reste accessible pour ses partenaires du complexe eIF4F. La dégradation quasi-totale des répresseurs serait donc une sécurité pour que la synthèse protéique coiffe dépendante ne soit pas perturbée. Cette dégradation de 4E-BP est d'autant plus importante que le rapport eIF4E / 4E-BP est très faible. Dans ce contexte, ce serait la balance eIF4E / 4E-BP qui régulerait le déclenchement de la synthèse coiffe dépendante à la fécondation.

C'est la première fois qu'un mécanisme de régulation de 4E-BP par dégradation est décrit. Il convient maintenant d'analyser la conservation de ce mécanisme non seulement au niveau du développement embryonnaire précoce d'autres organismes mais aussi dans d'autres contextes physiologiques.

Les approches pharmacologiques et fonctionnelles que nous avons menées démontrent que le développement de l'embryon est dépendant de la dégradation de 4E-BP et par conséquent de la libération d'eIF4E.

Etant donné l'implication d'eIF4E dans les processus cancéreux, il est surprenant qu'une cellule prenne le risque de ne pouvoir contrôler eIF4E en éliminant son principal répresseur. En effet, la baisse de 4E-BP ou l'augmentation de l'activité et/ou de la quantité d'eIF4E sont souvent associées à la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses.

Néanmoins, en faisant le parallèle entre une cellule en voie de transformation et un très jeune embryon, on remarque que la liberté d'action d'eIF4E est associée à une division cellulaire rapide. En effet, dans les premiers stades de la vie, les cellules se divisent suivant une succession rapide de transition S/M comme les cellules transformées, et présentent une synthèse protéique soutenue.

Toutefois, au niveau du développement embryonnaire précoce, la nature des protéines néosynthétisées est guidée par l'origine maternelle de leur ARNm et l'on peut penser que le panel des ARNm, dont la surexpression est dangereuse, reste limité.

De manière remarquable, 4E-BP réapparaît 10 heures après la fécondation, au moment de l'augmentation de la transcription. Cette transcription, sans doute à l'origine de la production de 4E-BP, permet la synthèse de nouvelles protéines ayant une origine non plus maternelle mais zygotique. Il est donc raisonnable de penser qu'à ce moment une régulation plus fine de la traduction est nécessaire d'autant plus que les cellules commencent à se différencier. L'activité d'eIF4E est alors à nouveau régulée par la présence de ses répresseurs.

Ainsi, 4E-BP se comporte comme un répresseur temporel de la traduction dont l'activité serait régulée par sa synthèse et sa dégradation, elles mêmes régulées en fonction du stade embryonnaire.

II) Implication du complexe eIF4E / 4E-BP dans le contrôle du cycle cellulaire

Nous avons démontré que 4E-BP en contrôlant l'activité d'eIF4E contrôle aussi la synthèse de la cyline B et donc la division mitotique. Ce contrôle du facteur d'initiation eIF4E sur le cycle cellulaire s'explique en grande partie par la position de ce dernier dans le processus complexe de la synthèse protéique. En effet, le fait que la fixation d'eIF4E avec eIF4G soit le premier évènement de la traduction, place ce facteur à l'origine de toute synthèse coiffe dépendante.

Le jeune embryon se divise rapidement. Pour ses divisions, la cellule utilise un grand nombre de protéines parmi lesquelles on trouve les cyclines, protéines caractérisées par une succession de synthèse et de dégradation. Il paraît donc normal que l'initiateur de la traduction soit aussi directement impliqué dans la synthèse des cyclines et donc dans le contrôle du cycle cellulaire. Cette implication est plus conséquente dans le processus de développement embryonnaire précoce en raison de la forte fréquence des divisions et donc des synthèses de cyclines.

III) Importance des "4E binding protein"

Nous avons découvert une nouvelle protéine H4E-BP, capable de s'associer à eIF4E. La nature de cette protéine est encore inconnue mais, mis à part un poids moléculaire plus important, elle partage toutes les caractéristiques biochimiques du 4E-BP d'oursin. L'intérêt de découvrir de nouvelles "4E binding protein" est fondamental pour la compréhension de la régulation de ce facteur. En effet, celui-ci semble être constitutivement actif et n'est pas régulé proprement dit mais plutôt inhibé et désinhibé. Mis à part eIF4G, toutes les protéines qui interagissent avec lui ont pour but de supprimer son activité. Ainsi, chez l'oursin, nous avons démontré que 4E-BP se comporte comme un répresseur temporel, qui réprimerait l'activité d'eIF4E avant la fécondation puis à partir du

stade pré blastula. On retrouve aussi des répresseurs de type spatial tel PRH ou Bicoïd qui répriment l'activité d'eIF4E en fonction du tissu dans lequel ils sont présents.

Il est intéressant de souligner que la régulation de l'activité d'eIF4E ne réside pas dans sa fonction première à savoir la fixation à la coiffe des ARNm mais plutôt dans son rôle de pontage entre le messager d'une part et les composants du complexe eIF4F de l'autre. Ainsi, lorsque eIF4E est inhibé par 4E-BP, il reste capable de se fixer aux ARNm. C'est pourquoi, l'étude de sa régulation revient à déterminer quelles sont les protéines qui interagissent physiquement avec lui. eIF4E est ainsi régulé d'une manière originale puisque mis à part MNK1, toutes les protéines régulant son activité ne sont pas des kinases. Dans ce contexte, la découverte de nouvelles protéines interagissant avec eIF4E se révèle donc être un objectif important dans la compréhension des mécanismes de régulation de sa régulation et, à plus large échelle, de l'initiation de la traduction. Le fait de cribler les protéines interagissant avec eIF4E, est d'autant plus important que le motif de fixation à eIF4E, YXXXXXΦ , est un motif extrêmement conservé parmi les espèces animales. eIF4Esemble donc fonctionner comme un activateur perpétuel de la traduction dont il faut constamment surveiller l'activité *via* des répresseurs pour ne pas risquer la surexpression de certains messagers. Cette activité importante explique pourquoi il est le moins abondant des facteurs de traduction dans la cellule.

IV) Conclusion générale et perspectives

En confrontant nos résultats avec ceux de la littérature, nous observons que le complexe eIF4E / 4E-BP et plus largement eIF4E seul, sont impliqués, dans les processus de cancérisation, d'apoptose, de prolifération, de croissance cellulaire, de développement et comme nous l'avons démontré du cycle cellulaire et de la fécondation. Tous ces mécanismes qui orchestrent la vie d'une cellule dépendent de la synthèse de protéines.

Par conséquent, il semble que eIF4E et le complexe eIF4F soient incontournables dans tous les processus qui requièrent une synthèse protéique. C'est peut-être la raison pour laquelle les virus, à défaut de ne pouvoir utiliser la machinerie de synthèse protéique hautement régulée de leur hôte ont dû trouver un moyen de contourner la monopolisation d'eIF4E par des ARNm endogène en utilisant le système des IRES.

Quoi qu'il en soit, devant le nombre croissant de mécanismes impliquant eIF4E et de protéines interagissant avec ce dernier, la compréhension de la régulation de cette protéine se révèle être un challenge exaltant tant sur le plan fondamental que sur l'aspect thérapeutique étant donné l'implication grandissante de ces facteurs dans de nombreuses pathologies.

L'utilisation de l'embryon d'oursin à permis de découvrir le rôle du complexe eIF4F aux cours des premiers stades de la vie.

Il convient maintenant d'approfondir ces résultats. Il faudra comprendre comment 4E-BP est dégradé et surtout pourquoi il réapparaît au cours du développement. Il serait aussi intéressant de déterminer si cette dégradation est spécifique de la fécondation ou si elle est retrouvée dans des contextes physiologiques particuliers. Une première approche consisterait à déterminer si cette nouvelle voie de régulation est conservée au cours de l'évolution.

L'étude du rôle et de la régulation de H4E-BP devra être poursuivie notamment par le clonage de son ADN et le séquençage de sa chaîne polypeptidique. Cette étude devra s'élargir à toutes les autres protéines capables d'interagir avec eIF4E. On peut imaginer qu'à l'aide des protéo-chips ou de la technique double hybrides, on puisse réaliser un crible afin de déterminer la nature de ces protéines.

Le rôle des autres composant du complexe eIF4F devra être aussi élucidé. Nous avons déjà commencé à analyser l'implication du facteur eIF4G dans la reprise da la

synthèse protéique et le contrôle du cycle cellulaire au cours du développement précoce de l'oursin. Le clonage d'eIF4A est actuellement en cours au laboratoire et son étude fonctionnelle sera réalisée par l'équipe.

Enfin, une analyse du comportement de 4E-BP dans des cellules cancéreuses pourrait révéler un dysfonctionnement de sa régulation et peut-être une (sur)activation de la voie enzymatique responsable de sa dégradation.

L'ensemble de ces nouvelles investigations devrait permettre de comprendre comment s'articulent les mécanismes de régulation de la synthèse protéique et du cycle cellulaire au cours des premières divisions mitotiques. Ces travaux devraient aussi permettre de mieux comprendre comment est régulée la machinerie de l'initiation de la traduction ouvrant ainsi, à moyen terme, de nouveaux espoirs thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Abid, M. R., Li, Y., Anthony, C., and De Benedetti, A. (1999). Translational regulation of ribonucleotide reductase by eukaryotic initiation factor 4E links protein synthesis to the control of DNA replication. *J Biol Chem* 274, 35991-8.

Altmann, M., Muller, P. P., Pelletier, J., Sonenberg, N., and Trachsel, H. (1989). A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue in vivo. *J Biol Chem* 264, 12145-7.

Amiri, A., Keiper, B. D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R. E., and Strome, S. (2001). An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in C. elegans. *Development* 128, 3899-912.

Anand, P., Boylan, J. M., Ou, Y., and Gruppuso, P. A. (2002). Insulin signaling during perinatal liver development in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E844-52.

Arion, D., and Meijer, L. (1989). M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. *Exp Cell Res* 183, 361-75.

Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L., and Beach, D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 55, 371-8.

Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., and Hall, M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 7, 25-42.

Barkoff, A., Ballantyne, S., and Wickens, M. (1998). Meiotic maturation in Xenopus requires polyadenylation of multiple mRNAs. *Embo J* 17, 3168-75.

Bashirullah, A., Cooperstock, R. L., and Lipshitz, H. D. (1998). RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67, 335-94.

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

Belsham, G. J., and Sonenberg, N. (1996). RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev* 60, 499-511.

Berset, C., Trachsel, H., and Altmann, M. (1998). The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4264-9.

Both, G. W., Banerjee, A. K., and Shatkin, A. J. (1975). Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1189-93.

Brachet, J., and Denis, H. (1963). Effects of actinomycin D on morphogenesis. *Nature* 198, 205-6.

Brandhorst, B. P. (1976). Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* 52, 310-7.

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

Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G. W., and Meese, E. (1997). Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum Mol Genet* 6, 33-9.

Brenner, C., Nakayama, N., Goebl, M., Tanaka, K., Toh-e, A., and Matsumoto, K. (1988). CDC33 encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* 8, 3556-9.

Brunn, G. J., Hudson, C. C., Sekulic, A., Williams, J. M., Hosoi, H., Houghton, P. J., Lawrence, J. C., Jr., and Abraham, R. T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, 99-101.

Cao, Q., and Richter, J. D. (2002). Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *Embo J* 21, 3852-62.

Chan, C. C., Dostie, J., Diem, M. D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., and Dreyfuss, G. (2004). eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *Rna* 10, 200-9.

Choi, J. H., Adames, N. R., Chan, T. F., Zeng, C., Cooper, J. A., and Zheng, X. F. (2000). TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr Biol* 10, 861-4.

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

Clemens, M. J., Bushell, M., and Morley, S. J. (1998). Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene* 17, 2921-31.

Cmarik, J. L., Min, H., Hegamyer, G., Zhan, S., Kulesz-Martin, M., Yoshinaga, H., Matsuhashi, S., and Colburn, N. H. (1999). Differentially expressed protein Pdcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14037-42.

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

Cormier, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Sonenberg, N., and Belle, R. (2001). eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev Biol* 232, 275-83.

Cormier, P., Pyronnet, S., Salaun, P., Mulner-Lorillon, O., and Sonenberg, N. (2003). Cap-dependent translation and control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 5, 469-75.

Curtis, D., Lehmann, R., and Zamore, P. D. (1995). Translational regulation in development. *Cell* 81, 171-8.

Danaie, P., Altmann, M., Hall, M. N., Trachsel, H., and Helliwell, S. B. (1999). CLN3 expression is sufficient to restore G1-to-S-phase progression in Saccharomyces cerevisiae mutants defective in translation initiation factor eIF4E. *Biochem J* 340 (Pt 1), 135-41.

Davidson, E. H., and Britten, R. J. (1973). Organization, transcription, and regulation in the animal genome. *Q Rev Biol* 48, 565-613.

De Benedetti, A., and Harris, A. L. (1999). eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 59-72.

De Benedetti, A., and Rhoads, R. E. (1990). Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8212-6.

De Nadai, C., Huitorel, P., Chiri, S., and Ciapa, B. (1998). Effect of wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, on the first mitotic divisions of the fertilized sea urchin egg. *J Cell Sci* 111 (Pt 17), 2507-18.

DeFatta, R. J., Nathan, C. A., and De Benedetti, A. (2000). Antisense RNA to eIF4E suppresses oncogenic properties of a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Laryngoscope* 110, 928-33.

Denny, P. C., and Tyler, A. (1964). Activation of protein biosynthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun* 14, 245-9.

Dilling, M. B., Germain, G. S., Dudkin, L., Jayaraman, A. L., Zhang, X., Harwood, F. C., and Houghton, P. J. (2002). 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem* 277, 13907-17.

Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A., and Sonenberg, N. (2000). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *Embo J* 19, 3142-56.

Eberle, J., Krasagakis, K., and Orfanos, C. E. (1997). Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro. *Int J Cancer* 71, 396-401.

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

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

Epel, D., Steinhardt, R., Humphreys, T., and Mazia, D. (1974). An analysis of the partial metabolic derepression of sea urchin eggs by ammonia: the existence of independent pathways. *Dev Biol* 40, 245-55.

Etchison, D., Milburn, S. C., Edery, I., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* 257, 14806-10.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-96.

Fadden, P., Haystead, T. A., and Lawrence, J. C., Jr. (1997). Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 272, 10240-7.

Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., and Blenis, J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* 24, 200-16.

Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16, 1472-87.

Fukunaga, R., and Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J* 16, 1921-33.

Futterer, J., Kiss-Laszlo, Z., and Hohn, T. (1993). Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. *Cell* 73, 789-802.

Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5, 2108-16.

Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999a). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13, 1422-37.

Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12, 502-13.

Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999b). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68, 913-63.

Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Control of translation by the target of rapamycin proteins. *Prog Mol Subcell Biol* 27, 143-74.

Giudice, G., Pirrone, A. M., Roccheri, M., and Trapani, M. (1973). Maturational cleavage of nucleolar ribosomal RNA precursor can be catalyzed by non-specific endonuclease. *Biochim Biophys Acta* 319, 72-80.

Grainger, J. L., von Brunn, A., and Winkler, M. M. (1986). Transient synthesis of a specific set of proteins during the rapid cleavage phase of sea urchin development. *Dev Biol* 114, 403-15.

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

Grifo, J. A., Abramson, R. D., Satler, C. A., and Merrick, W. C. (1984). RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* 259, 8648-54.

Groisman, I., Huang, Y. S., Mendez, R., Cao, Q., Theurkauf, W., and Richter, J. D. (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* 103**,** 435-47.

Groisman, I., Jung, M. Y., Sarkissian, M., Cao, Q., and Richter, J. D. (2002). Translational control of the embryonic cell cycle. *Cell* 109, 473-83.

Gross, P. R., and Cousineau, G. H. (1964). Macromolecule Synthesis and the Influence of Actinomycin on Early Development. *Exp Cell Res* 33, 368-95.

Haghighat, A., Mader, S., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J* 14, 5701-9.

Hake, L. E., and Richter, J. D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during Xenopus oocyte maturation. *Cell* 79, 617-27.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-89.

Hayashi, S., Nishimura, K., Fukuchi-Shimogori, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2000). Increase in cap- and IRES-dependent protein synthesis by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 117-23.

Heesom, K. J., Gampel, A., Mellor, H., and Denton, R. M. (2001). Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr Biol* 11, 1374-9.

Hentges, K. E., Sirry, B., Gingeras, A. C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A. S. (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13796-801.

Hentze, M. W. (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* 275, 500-1.

Heys, S. D., Park, K. G., McNurlan, M. A., Calder, A. G., Buchan, V., Blessing, K., Eremin, O., and Garlick, P. J. (1991). Measurement of tumour protein synthesis in vivo in human colorectal and breast cancer and its variability in separate biopsies from the same tumour. *Clin Sci (Lond)* 80, 587-93.

Hille, M. B., Dholakia, J. N., Wahba, A., Fanning, E., Stimler, L., Xu, Z., and Yablonka-Reuveni, Z. (1990). In-vivo and in-vitro evidence supporting co-regulation of translation in sea-urchin eggs by polypeptide initiation factors, pH optimization, and mRNAs. *J Reprod Fertil Suppl* 42, 235-48.

Huang, W. I., Hansen, L. J., Merrick, W. C., and Jagus, R. (1987). Inhibitor of eukaryotic initiation factor 4F activity in unfertilized sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6359-63.

Hultin, T. (1961). The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia* 17, 410-1.

Humphreys, T. (1969). Efficiency of translation of messenger-RNA before and after fertilization in sea urchins. *Dev Biol* 20, 435-58.

Humphreys, T. (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* 26, 201-8.

Hutchins, A. P., Roberts, G. R., Lloyd, C. W., and Doonan, J. H. (2004). In vivo interaction between CDKA and eIF4A: a possible mechanism linking translation and cell proliferation. *FEBS Lett* 556, 91-4.

Imataka, H., and Sonenberg, N. (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 17, 6940-7.

Jacobson, A. 1996. Poly(A) metabolism and translation, p. 451-480. *In* J. W. B. Hershey, M. B. Mathews, and N. Sonenberg (ed.), Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y

Jagus, R., Huang, W., Hiremath, L. S., Stern, B. D., and Rhoads, R. E. (1993). Mechanism of action of developmentally regulated sea urchin inhibitor of eIF-4. *Dev Genet* 14, 412-23.

Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62, 2636-43.

Jia, X. Y., Tesar, M., Summers, D. F., and Ehrenfeld, E. (1996). Replication of hepatitis A viruses with chimeric 5' nontranslated regions. *J Virol* 70, 2861-8.

Johnston, G. C., Singer, R. A., and McFarlane, S. (1977). Growth and cell division during nitrogen starvation of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol* 132, 723-30.

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

Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T., and Rhoads, R. E. (2000). Functional characterization of five eIF4E isoforms in Caenorhabditis elegans. *J Biol Chem* 275, 10590-6.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-75.

King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M., and Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-9.

Kishimoto, T. (1996). Starfish maturation-promoting factor. *Trends Biochem Sci* 21, 35-7.

Klein, P. S., and Melton, D. A. (1994). Induction of mesoderm in Xenopus laevis embryos by translation initiation factor 4E. *Science* 265, 803-6.

Kloc, M., Reddy, B. A., Miller, M., Eastman, E., and Etkin, L. D. (1991). x121: a localized maternal transcript in Xenopus laevis. *Mol Reprod Dev* 28, 341-5.

Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *Embo J* 11, 4153-8.

Lachance, P. E., Miron, M., Raught, B., Sonenberg, N., and Lasko, P. (2002). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Mol Cell Biol* 22, 1656-63.

Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* 270, 21975-83.

Lankat-Buttgereit, B., Gregel, C., Knolle, A., Hasilik, A., Arnold, R., and Goke, R. (2004). Pdcd4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II. *Mol Cell Endocrinol* 214, 149-53.

Lavoie, C. A., Lachance, P. E., Sonenberg, N., and Lasko, P. (1996). Alternatively spliced transcripts from the Drosophila eIF4E gene produce two different Cap-binding proteins. *J Biol Chem* 271, 16393-8.

Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., and Sonenberg, N. (1990). Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345, 544-7.

Lazaris-Karatzas, A., and Sonenberg, N. (1992). The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with v-myc or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts. *Mol Cell Biol* 12, 1234-8.

Li, S., Sonenberg, N., Gingras, A. C., Peterson, M., Avdulov, S., Polunovsky, V. A., and Bitterman, P. B. (2002). Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites on translational repressor 4E-BP1 governs its proapoptotic potency. *Mol Cell Biol* 22, 2853-61.

Liang, L., Diehl-Jones, W., and Lasko, P. (1994). Localization of vasa protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120, 1201-11.

Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121-2.

Long, X., Spycher, C., Han, Z. S., Rose, A. M., Muller, F., and Avruch, J. (2002). TOR deficiency in C. elegans causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Curr Biol* 12, 1448-61.

Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15, 4990-7.

Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1997). Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89, 951-61.

Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 3, 707-16.

Marissen, W. E., and Lloyd, R. E. (1998). Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol Cell Biol* 18, 7565-74.

Mathews, M. B. (1996). "Interaction between viruses and the cellular machinery for protein synthesis."

McGrew, L. L., Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B., and Richter, J. D. (1989). Poly(A) elongation during Xenopus oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev* 3, 803-15.

Meijer, L., and Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res* 174, 116-29.

Melton, D. A. (1987). Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of Xenopus oocytes. *Nature* 328, 80-2.

Mendez, R., Hake, L. E., Andresson, T., Littlepage, L. E., Ruderman, J. V., and Richter, J. D. (2000). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 404, 302-7.

Mills, G. B., Lu, Y., and Kohn, E. C. (2001). Linking molecular therapeutics to molecular diagnostics: inhibition of the FRAP/RAFT/TOR component of the PI3K pathway preferentially blocks PTEN mutant cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10031-3.

Minich, W. B., Balasta, M. L., Goss, D. J., and Rhoads, R. E. (1994). Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7668-72.

Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-91.

Morley, S. J., and Pain, V. M. (1995). Hormone-induced meiotic maturation in Xenopus oocytes occurs independently of p70s6k activation and is associated with enhanced initiation factor (eIF)-4F phosphorylation and complex formation. *J Cell Sci* 108 (Pt 4), 1751-60.

Muthukrishnan, S., Both, G. W., Furuichi, Y., and Shatkin, A. J. (1975). 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature* 255, 33-7.

Nelson, M. R., Leidal, A. M., and Smibert, C. A. (2004). Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *Embo J* 23, 150-9.

Niessing, D., Blanke, S., and Jackle, H. (2002). Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev* 16, 2576-82.

Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79, 547-50.

Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* 4, 111-6.

Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G., and Hafen, E. (2000). Genetic and biochemical characterization of dTOR, the Drosophila homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 14, 2689-94.

Paris, J., and Philippe, M. (1990). Poly(A) metabolism and polysomal recruitment of maternal mRNAs during early Xenopus development. *Dev Biol* 140, 221-4.

Paris, J., Swenson, K., Piwnica-Worms, H., and Richter, J. D. (1991). Maturation-specific polyadenylation: in vitro activation by p34cdc2 and phosphorylation of a 58-kD CPE-binding protein. *Genes Dev* 5, 1697-708.

Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr., and Sonenberg, N. (1994a). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-7.

Pause, A., Methot, N., Svitkin, Y., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. (1994b). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *Embo J* 13, 1205-15.

Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-5.

Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16, 6859-69.

Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., and Hellen, C. U. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7029-36.

Ridet, J.M., Platel, R. et Meunier, F.J. (1992). Des protozoaires aux échinodermes. Ed ellipses, pp. 199-216

Polunovsky, V. A., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Peterson, M., Tan, A., Rubins, J. B., Manivel, J. C., and Bitterman, P. B. (2000). Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *J Biol Chem* 275, 24776-80.

Poon, R. Y., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., and Shuttleworth, J. (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J* 12, 3123-32.

Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273, 14002-7.

Ptushkina, M., von der Haar, T., Karim, M. M., Hughes, J. M., and McCarthy, J. E. (1999). Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *Embo J* 18, 4068-75.

Pyronnet, S., Dostie, J., and Sonenberg, N. (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 15, 2083-93.

Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *Embo J* 18, 270-9.

Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5, 607-16.

Pyronnet, S., and Sonenberg, N. (2001). Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev* 11, 13-8.

Raft, D., Davidson, J., Wasik, J., and Mattox, A. (1981). Relationship between response to phenelzine and MAO inhibition in a clinical trial of phenelzine, amitriptyline and placebo. *Neuropsychobiology* 7, 122-6.

Ray, B. K., Lawson, T. G., Kramer, J. C., Cladaras, M. H., Grifo, J. A., Abramson, R. D., Merrick, W. C., and Thach, R. E. (1985). ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem* 260, 7651-8.

Rhoads, R. E., Joshi-Barve, S., and Rinker-Schaeffer, C. (1993). Mechanism of action and regulation of protein synthesis initiation factor 4E: effects on mRNA discrimination, cellular growth rate, and oncogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 46, 183-219.

Richter, J. D. (1988). Information relay from gene to protein: the mRNP connection. *Trends Biochem Sci* 13, 483-6.

Richter, J. D. (1996). Dynamics of poly(A) addition and removal during development in translational control, ,in Translational control of gene expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. 481-503

Richter, J. D., Wasserman, W. J., and Smith, L. D. (1982). The mechanism for increased protein synthesis during Xenopus oocyte maturation. *Dev Biol* 89, 159-67.

Rinaldi, A. M., and Monroy, A. (1969). Polyribosome formation and RNA synthesis in the early post-fertilization stages of the sea urchin egg. *Dev Biol* 19, 73-86.

Rinker-Schaeffer, C. W., Graff, J. R., De Benedetti, A., Zimmer, S. G., and Rhoads, R. E. (1993). Decreasing the level of translation initiation factor 4E with antisense RNA causes reversal of ras-mediated transformation and tumorigenesis of cloned rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer* 55, 841-7.

Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H., and Jackle, H. (1995). Activation of posterior gap gene expression in the Drosophila blastoderm. *Nature* 376, 253-6.

Rogers, G. W., Jr., Komar, A. A., and Merrick, W. C. (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72, 307-31.

Rosenwald, I. B., Kaspar, R., Rousseau, D., Gehrke, L., Leboulch, P., Chen, J. J., Schmidt, E. V., Sonenberg, N., and London, I. M. (1995). Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 270, 21176-80.

Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., and Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of

cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1065-70.

Russel JE, M. J. a. L. S. (1997). "The role of mRNA stability in the control of globin gene expression."

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

Salaun, P., Le Breton, M., Morales, J., Belle, R., Boulben, S., Mulner-Lorillon, O., and Cormier, P. (2004). Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp Cell Res* 296, 347-57.

Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Sonenberg, N., and Cormier, P. (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev Biol* 255, 428-39.

Saffman, E. E., and Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 55, 1141-63.

Scheper, G. C., van Kollenburg, B., Hu, J., Luo, Y., Goss, D. J., and Proud, C. G. (2002). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* 277, 3303-9.

Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 60, 3504-13.

Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645-53.

Shi, Y., Gera, J., Hu, L., Hsu, J. H., Bookstein, R., Li, W., and Lichtenstein, A. (2002). Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779. *Cancer Res* 62, 5027-34.

Simon, R., Tassan, J. P., and Richter, J. D. (1992). Translational control by poly(A) elongation during Xenopus development: differential repression and enhancement by a novel cytoplasmic polyadenylation element. *Genes Dev* 6, 2580-91.

Simpson, L., and Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264, 29-41.

Smith, M. R., Jaramillo, M., Liu, Y. L., Dever, T. E., Merrick, W. C., Kung, H. F., and Sonenberg, N. (1990). Translation initiation factors induce DNA synthesis and transform NIH 3T3 cells. *New Biol* 2, 648-54.

Solomon, M. J., Harper, J. W., and Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* 12, 3133-42.

Sonenberg, N. (1994). mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Curr Opin Genet Dev* 4, 310-5.

Sonenberg, N. (1996). mRNA 5' cap-binding 4E and control of cell growth, in Translational control of gene expression, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. 246-269

Sonenberg, N., Morgan, M. A., Merrick, W. C., and Shatkin, A. J. (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4843-7.

Tarun, S. Z., Jr., and Sachs, A. B. (1997). Binding of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) to eIF4G represses translation of uncapped mRNA. *Mol Cell Biol* 17, 6876-86.

Tomancak, P., Guichet, A., Zavorszky, P., and Ephrussi, A. (1998). Oocyte polarity depends on regulation of gurken by Vasa. *Development* 125, 1723-32.

Topisirovic, I., Capili, A. D., and Borden, K. L. (2002). Gamma interferon and cadmium treatments modulate eukaryotic initiation factor 4E-dependent mRNA transport of cyclin D1 in a PML-dependent manner. *Mol Cell Biol* 22, 6183-98.

Topisirovic, I., Culjkovic, B., Cohen, N., Perez, J. M., Skrabanek, L., and Borden, K. L. (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *Embo J* 22, 689-703.

Trachsel, H., Erni, B., Schreier, M. H., and Staehelin, T. (1977). Initiation of mammalian protein synthesis. II. The assembly of the initiation complex with purified initiation factors. *J Mol Biol* 116, 755-67.

Tuazon, P. T., Merrick, W. C., and Traugh, J. A. (1989). Comparative analysis of phosphorylation of translational initiation and elongation factors by seven protein kinases. *J Biol Chem* 264, 2773-7.

Vagner, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., and Prats, A. C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 15, 35-44.

Vanhaesebroeck, B., Leevers, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J., and Waterfield, M. D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.

Varani, G. (1997). A cap for all occasions. *Structure* 5, 855-8.

Verrotti, A. C., Thompson, S. R., Wreden, C., Strickland, S., and Wickens, M. (1996). Evolutionary conservation of sequence elements controlling cytoplasmic polyadenylylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9027-32.

Vlahou, A., Gonzalez-Rimbau, M., and Flytzanis, C. N. (1996). Maternal mRNA encoding the orphan steroid receptor SpCOUP-TF is localized in sea urchin eggs. *Development* 122, 521-6.

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

von Manteuffel, S. R., Gingras, A. C., Ming, X. F., Sonenberg, N., and Thomas, G. (1996). 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4076-80.

Waltz K. and Lopo A. C. (1987). Change in covalent modification of eIF4E with activation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. p. 157. *In* : Translational control (Mathews M., Hershey J. W. B., Safer B., ed) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Wagenaar, E. B. (1983). Increased free Ca2+ levels delay the onset of mitosis in fertilized and artificially activated eggs of the sea urchin. *Exp Cell Res* 148, 73-82.

Wakiyama, M., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2000). Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for Xenopus oocyte maturation. *Curr Biol* 10, 1147-50.

Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16, 1909-20.

Waskiewicz, A. J., Johnson, J. C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S. R., and Cooper, J. A. (1999). Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol Cell Biol* 19, 1871-80.

Watkins, S. J., and Norbury, C. J. (2002). Translation initiation and its deregulation during tumorigenesis. *Br J Cancer* 86, 1023-7.

Weinstein, D. C., Honore, E., and Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Epidermal induction and inhibition of neural fate by translation initiation factor 4AIII. *Development* 124, 4235-42.

Whalen, S. G., Gingras, A. C., Amankwa, L., Mader, S., Branton, P. E., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1996). Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *J Biol Chem* 271, 11831-7.

Wickens, M., Kimble, J. and Strickland S. (1996). "Translational control of developmental decision."

Wilhelm, J. E., Hilton, M., Amos, Q., and Henzel, W. J. (2003). Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of oskar and the recruitment of Barentsz. *J Cell Biol* 163, 1197-204.

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

Winkler, M. M., Steinhardt, R. A., Grainger, J. L., and Minning, L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature* 287, 558-60.

Woodland, H. R. (1974). Changes in the polysome content of developing Xenopus laevis embryos. *Dev Biol* 40, 90-101.

Xu, Z., Dholakia, J. N., and Hille, M. B. (1993). Maturation hormone induced an increase in the translational activity of starfish oocytes coincident with the phosphorylation of the mRNA cap binding protein, eIF-4E, and the activation of several kinases. *Dev Genet* 14, 424-39.

Yamanaka, S., Poksay, K. S., Arnold, K. S., and Innerarity, T. L. (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev* 11, 321-33.

Yang, H. S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., Lockett, S. J., Sonenberg, N., and Colburn, N. H. (2003). The transformation suppressor Pdcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* 23, 26-37.

Yisraeli, J. K., Sokol, S., and Melton, D. A. (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNA in Xenopus oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289-98.

Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7, 835-42.

Identification of a M-phase differentially recruited mRNA encoding for cyclin A

Magali Le Breton, Patrick Salaun, Robert Bellé, Odile Mulner-Lorillon, Patrick Cormier, and Julia Morales*.

Station Biologique de Roscoff, FRE 2775, CNRS/UPMC, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

Tel 33(0) 2 98 29 23 69 Fax 33 (0) 2 98 29 23 06 e-mail: morales@sb-roscoff.fr

* Corresponding author:

Station Biologique de Roscoff

FRE 2775, CNRS/UPMC, BP 74

29682 Roscoff Cedex

France

Tel 33(0) 2 98 29 23 69

Fax 33 (0) 2 98 29 23 06

e-mail: morales@sb-roscoff.fr

running title : sea urchin cyclin A

Keywords : cell cycle / mRNA recruitment / cyclin A / protein translation / M-phase

number of figures : 4

number of tables:1

Abstract

CDK1 / cyclin B promotes the selective recruitment of specific mRNAs into polysomes during M-phase in sea urchin early development. We report in this paper the characterization of one of these mRNAs recruited at M-phase. By RACE PCR, we extended the original clone to a 6kb cDNA that encodes for cyclin A. By RT-PCR and Northern blot analysis, we demonstrate that cyclin A mRNA is present at the rapid cleavage stages of development and is barely detectable after blastula stage. Three transcripts of 8, 7 and 5.5kb were detected by Northern blot with both coding and untranslated region probes. The significance of cyclin A mRNA being translationally regulated during M-phase is discussed.

Introduction

The regulation of mRNA translation is a critical feature of entry into and progression through the cell cycle (Murray, 2004). The early steps of sea urchin early development are an ideal system for studying the relationships between translational regulation and cell cycle : (1) gene expression is regulated essentially at the translational and post-translational level, (2) maternal mRNAs stored in untranslated ribonucleoparticles are recruited selectively for translation following fertilization and during development, (3) unfertilized eggs are blocked at the G1 phase of mitotic cell cycle, fertilization initiates the activation of CDKs (cyclin dependent kinases) and triggers the synchronous and rapid cell division of the early development (Meijer et al., 1989; Epel, 1990).

CDK1, a serine/threonine kinase associated to its partner cyclin B, is the universal cell cycle regulator implicated in the G2/M transition. Activation of CDK1 is concommitant with modifications of translational activity, arguing for a role of CDK1 in translational control. Several substrates of CDK1 are part of the translational machinery, such as elongation factor 1 and 2 (Belle et al., 1989; Celis et al., 1990), 4E-BP (Heesom et al., 2001), S6 kinase (Shah et al., 2003), polyA polymerase (Colgan et al., 1996). During mitosis, protein synthesis is transiently repressed (Kanki and Newport, 1991; Monnier et al., 2001), involving at least in part an inhibition of cap-dependent translation (Bonneau and Sonenberg, 1987; Pyronnet et al., 2001). In contrast, some specific mRNAs remain predominantly associated with large polysomes during mitosis and are translated at M phase (Cornelis et al., 2000; Pyronnet et al., 2000; Qin and Sarnow, 2004).

CDK1 / cyclin B promotes the differential recruitment of specific mRNA into polysomes during mitosis in sea urchin early development (Le Breton et al., 2003). We report here the identification of one mRNA recruited at M-phase as encoding for cyclin A, and its

characterization during development. The significance of cyclin A mRNA being translationally regulated during M-phase is discussed.

Materials and methods

Handling of animals and gametes: *Sphaerechinus granularis* sea urchins were collected in the Brest area and kept in running sea water. Gamete collection, in vitro fertilization and embryo culture were processed as described (Le Breton et al., 2003). The first cell division and the following stages of development were monitored by phase contrast microscopy.

RNA extraction : Total RNAs were purified from embryos by the guanidium thiocyanate method (Chomczynski and Sacchi, 1987) and polyA+ RNAs were isolated using the Oligotex mRNA isolation kit (Quiagen).

RACE-PCR: One µg of polyA+ RNA isolated from 2 cell embryos was reverse transcribed into 5' and 3' RACE-ready first strand cDNA as instucted by the SMART^{TM} RACE cDNA amplification kit (Clontech), and used as template for PCR as instructed by the manufacturer. Specific primers used were respectively primers 5II and 28SP1 for 5' RACE-PCR extention and primer 3II for 3' RACE-PCR extention (see table 1). Amplified fragments were cloned into pGEMT (Promega) or pCR2.1 (Invitrogen) vectors. Sequencing was performed on an Applied biosystem AB3100 automatic sequencer at the Génopole Ouest sequencing facility in Roscoff (France).

RT-PCR analysis: RNA (0.2-1 µg) was hybridized with oligo dT (Sigma) for 10 minutes at 70°C, and reverse-transcribed for 50 minutes at 37°C with Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Primers for amplification of cyclin A mRNA (EMBL accession #AJ634048) are listed table 1. For cytosqueletal actin mRNA amplification, forward primer

5'-GAGCACGGTATCGTCACCAACTGG-3' and reverse 5'-GAGAGAGGCAAGGATGGAGCCTCC-3' were used to amplify a 900pb that was partially sequenced (EMBL accession #AJ541052). PCR was done using the specific primers at the following conditions: 94°C for 5 minutes, (94°C 30 seconds, 48°C 30 seconds, 72°C 1.5 minutes) 30 cycles, 72°C for 10 minutes, in a GeneAmp 2700 (Applied Biosystems). For amplification of larger fragments (>3kb) elongation time was set to 6 minutes. PCR fragments were analysed on 0.8-1% agarose/TBE gels and visualized on a GelDoc system (BioRad). Signals were quantified by NIH Image software (written by W. Rasband at the US National Institutes of Health).

Northern blot hybridization : Two μg polyA+ RNA was separated by electrophoresis on a 1 % agarose gel containing 2.2 M formaldehyde (Sambrook et al., 1989). After electrophoresis, RNA were partially hydrolysed in NaOH 0.05 N for 20 min and transferred to a hybond-N+ nitrocellulose membrane (Amersham, Biosciences) in 20xSSC overnight. After transfert, membranes were washed in 5xSSC and UV cross-linked in a GS gene linker™ UV chamber (Bio-Rad). Blots were prehybridized in a solution containing 5x SSC, 5x Denhardt, 0.1% SDS and 100μg/ml denatured salmon sperm at 65°C for 1-2h. The prehybridization solution was replaced with fresh solution containing specific DNA probe, and the filters were incubated overnight at 65°C. Filters were washed at 65°C in 0.1 x SSC, 0.1% SDS. Radioactivity on blots was revealed by autoradiography on X-OMAT AR film (Kodak).

Probe synthesis and labelling: cDNAs corresponding to the cyclin A coding region (A) and untranslated region (B) were amplified by PCR using primers pairs cycA5' / cycA3' and 28D2/28U2 respectively (see table 1). Cytosqueletal actin cDNA was amplified by PCR as described above. The PCR products obtained were purified twice on GeneElute Agarose™ spin columns (sigma) and 25ng of purified product was labelled in presence of [α-^{32}P] dCTP

with Megaprime™ DNA labeling systems (Amersham Biosciences) according to the manufacturer.

Results

A differential screen for mRNA translated at M-phase in sea urchin embryos allowed the isolation of several clones (Le Breton et al., 2003). A clone termed CDM97-28 (EMBL accession #AJ519423) was 317pb long. Primers were designed at the extremities of the fragment (see table 1) and used for RACE-PCR extention to obtain full-length cDNA. The cloning strategy is presented figure 1. The 3' RACE extention yielded a 600 bp fragment ending with a polyA stretch. Two rounds of 5' RACE-PCR cloning were necessary for obtention of the complete upstream region. A first extention led to a fragment of 2kb upstream of the original clone, showing no reading frame. A second amplification using a primer located in the 5' end of the newly obtained sequence (fig 1), yielded an upstream fragment of 3.6kb and contained an open reading frame of 463 aminoacid long. The complete sequence was obtained from both strands of RACE-PCR clones. The resulting cDNA contains a 5' untranslated region of 342 nucleotides, an open reading frame of 1395 nucleotides and a 3' untranslated region of 4335 nucleotides, ending with a polyA stretch, for a total length of 6072 nucleotides (EMBL accession #AJ634048). The 5'UTR contains in-frame STOP codons upstream of the initial methionine, is 43% of GC rich and does not contain stable secondary structures as tested by RNA2 prediction (GeneBee at http://www.genebee.msu.su). The 3'UTR contains four AAUAAA polyadenylation sites, with nearby potential cytoplasmic polyadenylation elements (CPE).

To determine whether the three RACE-PCR clones (see figure 1) belonged to the same transcript, fragments overlapping the different RACE-PCR clones were amplified by RT-PCR on two-cells embryo mRNAs (fig. 2A). Using a forward primer located into the 5'RACE-1

fragment and a reverse primer into the 3'RACE fragment, we obtained an expected 1.3kb amplified cDNA. Similarily, using a forward primer located into the 5'RACE-2 fragment and a reverse primer into the 5'RACE-1 fragment, we amplified an expected 2.2kb cDNA (fig 2B). Both cDNAs were cloned and their sequence matched the RACE clones. Therefore, the different RACE-PCR clones came from one unique transcript in the embryo.

The protein predicted from the ORF sequence was identified to cyclin A on the basis of 97% identity to a previously described S. granularis sequence (EMBL accession #AJ224985; Geneviere-Garrigues et al., 1995). We investigated the existence of a cyclin A transcript with a minimal length of 6kb containing the cloned fragments. A RT-PCR reaction was set-up using upstream primers located into the coding region of cyclin A (cyc5' and cyc5'-2) and downstream primers located in the untranslated region (28D, 28D2 and 28D3). Amplified fragments were specifically detected at the expected size, respectively 5732nt for cyc5'-28D2 primer pair, 5285nt for cyc5'-28D, 3037nt for cyc5'-28D3, 4432nt for cyc5'-2 -28D2, 3985nt for cyc5'-2 -28D and 1732nt for cyc5'-2 -28D3 primer pairs. The control PCR performed without prior reverse-transcription of the RNA showed no amplification (fig. 2C). This result indicates that a mRNA encoding cyclin A with a long 3' untranslated region (4.5 kb) is present in sea urchin embryos.

We investigated whether the 6 kb long mRNA was the only cyclin A encoding mRNA in sea urchin embryos. Northern blot analysis was performed on polyA+ mRNAs purified from either unfertilized eggs (NF), early (2 hours post-fertilization) or late embryos (pluteus larvae, 72 hours) with a probe designed against the coding region of cyclin A (probe A, nt 352-1643). Two major mRNAs were detected at an estimated size of 8kb and 7kb, and an additional mRNA was faintely revealed post fertilization at 5.5kb (fig 3A). No signal was detectable in late embryos, although an equal amount of poly A+ mRNAs estimated by optical density was loaded onto the gel. Furthermore, a control probe for cytosqueletal actin

cDNA showed a strong signal in late embryos. We then analyzed the expression of the cyclin A mRNA during development by RT-PCR amplification on total RNAs from embryos at the indicated stages. Both coding region and untranslated region of cyclin A were monitored, and the amplification showed a similar profil of expression (fig. 3B) : the mRNA was present in the early stages of development, up to 15-20 hours (bastula) and was barely detectable afterwards. Cytosqueletal actin cDNA was used as a control for RT-PCR analysis, and as expected, accumulates at high levels after 15 hours of development (fig. 3B and Kelso-Winemiller et al., 1993). Cleavage stage specific mRNAs have been described to be abundant and efficiently translated during the rapid cell divisions of early embryogenesis in sea urchin, and to decrease afterwards (Kelso-Winemiller et al., 1993). The developmental expression of the cyclin A mRNA as shown in figure 3 corresponds to cleavage stage specific (CSS) mRNA.

Northern blot analysis revealed the existence of three mRNAs in two-cells embryos detected with a probe designed against the coding region of cyclin A (probe A, nt 352-1643; see figure 3A). In mouse and human cells, multiple mRNA were detected by northern blot analysis (Henglein et al., 1994; Ravnik and Wolgemuth, 1996), differing only by the length of their 3'UTR region using alternative polyadenylation site. Four potential AATAAA signals were found within the 3' untranslated region of sea urchin cyclin A at position 3292, 4454, 5446 and 6050 (figure 4, see arrows). To determine whether the multiple mRNAs detected arise from the use of alternative polyadenylation sites, northern blot analysis was performed with a probe located into the 3'UTR region of cyclin A cDNA (probe B, nt 4628-5995). Three transcripts were detected with probe B, as observed using probe A (fig 4). The same result was obtained with other 3'UTR probes spanning nucleotides 3611 to 4828 (data not shown). Therefore the three mRNAs contain both the coding region and the distal 3'UTR region, the

use of alternative polyadenylation sites cannot likely account for the presence of multiple mRNAs in the sea urchin embryo.

Discussion

Cyclin A is identified as a differentially recruited mRNA in M phase.

Several mRNAs differentially recruited into polysomes at M-phase have been isolated in sea urchin early development (Le Breton et al., 2003). This paper describes the identification of one of them as encoding for cyclin A mRNA. Cyclin A is associated with both CDK1 and CDK2 (Yam et al., 2002). Cyclin A / CDK2 complex is implicated in the control of DNA replication at S phase. It was recently shown that cyclin A/CDK2 complexes are key regulators of CDC25 and CDK1 activation in human cells (Mitra and Enders, 2004). Cyclin A/ CDK1 is active at the G2/M transition but its exact role remains unclear.

Cyclin A level and / or activity are strictly regulated during the cell cycle at several steps, involving post-translational regulation such as proteolysis (den Elzen and Pines, 2001), post-transcriptional regulation such as mRNA stability and transcriptional regulation (Henglein et al., 1994). CDK1/cyclin B promotes the recruitment into polysomes of CDM97-28 (Le Breton et al., 2003), identified here as part of cyclin A cDNA, suggesting a new mechanism of the regulation of cyclin A involving mRNA recruitment, in addition to the already described regulations. Synthesis and degradation of cyclins is essential for sequential activation of CDKs and progression through the cell cycle (Murray, 2004). In invertebrates, cyclin A protein level is thought to be regulated by degradation whereas its synthesis is continuous during the cell cycle (Evans et al., 1983; Hunt et al., 1992). At M phase, global protein synthesis is partially down-regulated (Kanki and Newport, 1991; Monnier et al., 2001). We suggest that cyclin A mRNA recuitment in polysomes is stable or up-regulated at M phase by CDK1 / cyclin B to maintain a continuous cyclin A protein synthesis.

Existence of three different cyclin A mRNA in sea urchin embryos

We demonstrate the existence of three different cyclin A mRNAs which contain both the coding region and 3'UTR end of the cyclin A cDNA sequence (see figures 2 and 4), since all probes tested by northern blot showed the same profile and RT-PCR analysis showed the amplification of a unique band for each set of primers tested. The smallest transcript could correspond to the cDNA described here and the others to larger splice variant containing either larger 5'UTR, coding region or 3'UTR. However, it is unlikely that a variant containing a larger ORF exist since only one cyclin A protein at the expected size of 56kDa was detected in Sphaerechinus granularis embryos (Geneviere-Garrigues et al., 1995). We cannot exclude the existence of longer untranslated regions and for example, the use of alternative polyadenylation sites located downstream of the last AATAAA signal to account for cyclin A transcripts of different size.

The presence of three cyclin A mRNA may be due to the existence of interspersed repetitive sequence located in the untranslated region of cyclin A mRNA. Interspersed repetitive sequences are present in xenopus and sea urchin eggs and embryos, thought to be implicated in mRNA localisation and translation (Davidson, 1986). Cleavage of these interspersed sequences after fertilization may promote a timely translation of a set of mRNA (Davidson, 1986; Guttridge and Smith, 1995; Zearfoss et al., 2003). By blast search, no known interspersed sequences were found in the cyclin A sequence described here, which may however correspond to the smallest form of cyclin A devoid of interspersed sequences. The repartition of the three cyclin A mRNAs remains to be done to compare their polysomal recruitment and their regulation.

Mechanisms implicated in M phase recruitment of cyclin A.

Gene expression depends on regulatory elements often located into the 5' and 3' untranslated regions of mRNA (Pesole et al, 2001). Two main features are connected with regulation of translation during cell cycle : IRES (Internal Ribosome Entry Site) in 5'UTR and CPE (Cytoplasmic polyadenylation element) in 3'UTR. In eukaryotic cells, the partial inhibition of protein synthesis at M phase is mostly due to inhibition of cap-dependent translation (Bonneau and Sonenberg, 1987; Pyronnet et al., 2001). In contrast, translation of some specific mRNA at M phase involves a cap-independent initiation through an IRES element generally located in their 5'UTR (Cornelis et al., 2000; Pyronnet et al., 2000; Qin and Sarnow, 2004; Sachs, 2000). 5'UTR containing IRES often have : 1) long sequence ; 2) stable secondary structures and 3) potential initiation codon(s) (Vagner et al., 2001). The cyclin A 5'UTR described in this paper is not likely to contain an IRES element when its features are examined. However, one mRNA among the three revealed by Northern blot may contain a longer structured 5'UTR with a potential IRES.

Cytoplasmic polyadenylation is also implicated in translational control and requires two elements in the 3'UTR : the hexanucleotide AAUAAA and a nearby CPE (cytoplasmic polyadenylation element). The sequence of CPE is variable within a general consensus $U_{4-5}AU$. Overall the precise sequence of CPE, the distance between CPE and hexanucleotide or sequences adjacent to the CPE might regulate the time at which polyadenylation takes place (Charlesworth et al., 2004; Mendez and Richter, 2001). During early development of xenopus embryo, cyclin A mRNA is polyadenylated during M phase in correlation with high level of cyclin A protein (Groisman et al., 2002). Interestingly, putative CPE elements were found in the S. granularis 3' UTR cyclin A sequence. Four of them are located near the hexanucleotide sequences and could be implicated in a CPE -dependent polyadenylation, therefore suggesting the regulation of cyclin A mRNA polyadenylation during M-phase, which remains to be analyzed in sea urchin embryos.

Acknowledgments

We thank Dr. André Picard and Jean-Claude Lozano for the help in RACE PCR, and Sandrine Boulben for technical assistance. This work was supported by Conseil Régional de Bretagne, Fonds Européens de Développement Régional (FEDER), Association de la Recherche contre le Cancer (ARC 4247) and Ligue Départementale du Finistère contre le Cancer. M.L.B. was supported by a fellowship from Ligue Nationale contre le cancer.

Table 1: oligonucleotides used for RACE-PCR amplification and RT-PCR analysis. Their position is indicated on cyclin A cDNA sequence (EMBL # AJ634048).

U= upstream primer, D= downstream primer

primer	Sequence	position 5'-3'
3II	5'-GACTTCCAATTTGGTCAAATATGCAAGTGATGGAATG-3'	5462-5498
5II	5'-AAATCCCCTCTCTCATGATGGCAGTGAT-3'	5349-5322
28SP1	5'-AAGGCGTGAGCCACGAGTCTTCCGCCC-3'	3684-3658
cycA5'	5'-CTCAATCGGTAGTTCAAACG-3'	352-370
cycA3'	5'-TAGGTGCCTTGATGAATAGC-3'	1643-1624
cycA5-2	5'-CACACTACACCGATTACCAGC-3'	1566-1586
28D3	5'-GTTTTATTCCTCTCTGAACATGAG-3'	3300-3277
28U	5'-ATCACTGCCATCATGAGAGAGG-3'	5322-5343
28D2	5'-CAACATGAAGTCATGATTGTTGAGATGC-3'	5995-5968
28D	5'-ATGTTATTCATGGACTCTTGTATG-3'	5548-5525
28U4	5'-CTTTGTTTCACATGACAATGAG-3'	3300-3321
28U3	5'-GTAAGGTCGCATAAAGTCCCAAGATG-3'	3387-3912
28U2	5'-CTCAGCCTACTTGCTTAGCAGAGTTCAC-3'	4628-4655

Legends

Figure 1

Schematic representation of cDNA obtained by RACE-PCR extention of the CDM97-28 clone. Bar represents 1kb, open reading frame and CDM97-28 clone are boxed.

A- RACE-PCR strategy. One 3' end extention and two successive 5' end extentions with the indicated primers (respectively 3II, 5II and 28SP1) were necessary to obtain a complete open reading frame. B- Complete sequence of cDNA was obtained on both strands by the indicated strategy (arrows).

Figure 2

A- Schematic representation of sea urchin cyclin A cDNA and position of the primers used for RT-PCR analysis. B- Overlapping RT-PCR verified the existence of a mRNA containing the different RACE-PCR fragments. RT-PCR was performed on total RNA isolated from 2

cells embryos, using the indicated primers. Control PCR was done on the same RNA without prior reverse transcription. Identity of the obtained fragments was confirmed by end sequencing. C - RT-PCR amplification from 2 cells embryo total RNA using primers located in the coding region (upstream primers) and into the 3' untranslated region (downstream primers) of cyclin A. Controls were performed on RNA without prior reverse-transcription.

Figure 3

Expression of cyclin A mRNA during sea urchin early development. A - 2µg of polyA+ mRNAs from embryos at the indicated stages were analyzed by Northern blot with a probe corresponding to the coding region of cyclin A. Transcripts sizes were estimated from RNA markers (Ambion) run on the same gel. The arrows indicate the 8kb, 7kb and 5,5kb mRNAs position. The same blot was stripped and reprobed with a cytosqueletal actin cDNA probe. B - Total RNA was extracted from embryos at the indicated times post-fertilization and presence of various mRNAs was monitored by RT-PCR amplification with the indicated primers. The plot is representative of 2 independent experiments.

Figure 4

Northern blot analysis of cyclin A mRNA. 2µg of polyA+ mRNAs from 2 cells embryos were resolved on formaldehyde agarose gel and probed with cDNA corresponding to the coding region (A) or to the 3' end of the untranslated region (B). Arrows indicate the 8kb, 7kb and 5.5kb mRNAs position. Exposure time with probe B was four times longer than with probe A for a comparable signal.

References

Belle R, Derancourt J, Poulhe R, Capony JP, Ozon R, Mulner-Lorillon O. 1989. A purified complex from Xenopus oocytes contains a p47 protein, an in vivo substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 gamma and EF-1 beta. FEBS Lett 255(1):101-104.

Bonneau AM, Sonenberg N. 1987. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. J Biol Chem 262(23):11134-11139.

Celis JE, Madsen P, Ryazanov AG. 1990. Increased phosphorylation of elongation factor 2 during mitosis in transformed human amnion cells correlates with a decreased rate of protein synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 87(11):4231-4235.

Charlesworth A, Cox LL, MacNicol AM. 2004. CPE- and CPEB-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in Xenopus oocytes. J Biol Chem in press.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162(1):156-159.

Colgan DF, Murthy KG, Prives C, Manley JL. 1996. Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. Nature 384(6606):282-285.

Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, Beyaert R. 2000. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. Mol Cell 5(4):597-605.

Davidson EH. 1986. The nature and function of maternal transcripts. In: Davidson E, editor. Gene activity in early development. Orlando : Academic Press. p 46-125.

den Elzen N, Pines J. 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. J Cell Biol 153(1):121-136.

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

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

Geneviere-Garrigues AM, Barakat A, Doree M, Moreau JL, Picard A. 1995. Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. J Cell Sci 108 (Pt 7):2693-2703.

Groisman I, Jung MY, Sarkissian M, Cao Q, Richter JD. 2002. Translational control of the embryonic cell cycle. Cell 109(4):473-483.

Guttridge KL, Smith LD. 1995. Xenopus interspersed RNA families, Ocr and XR, bind DNA-binding proteins. Zygote 3(2):111-122.

Heesom KJ, Gampel A, Mellor H, Denton RM. 2001. Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). Curr Biol 11(17):1374-1379.

Henglein B, Chenivesse X, Wang J, Eick D, Brechot C. 1994. Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. Proc Natl Acad Sci U S A 91(12):5490-5494.

Hunt T, Luca FC, Ruderman JV. 1992. The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. J Cell Biol 116(3):707-724.

Kanki JP, Newport JW. 1991. The cell cycle dependence of protein synthesis during Xenopus laevis development. Dev Biol 146(1):198-213.

Kelso-Winemiller L, Yoon J, Peeler MT, Winkler MM. 1993. Sea urchin maternal mRNA classes with distinct development regulation. Dev Genet 14(5):397-406.

Le Breton M, Belle R, Cormier P, Mulner-Lorillon O, Morales J. 2003. M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. Biochem Biophys Res Commun 306(4):880-886.
Meijer L, Arion D, Golsteyn R, Pines J, Brizuela L, Hunt T, Beach D. 1989. Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. Embo J 8(8):2275-2282.
Mendez R, Richter JD. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. Nat Rev Mol Cell Biol 2(7):521-529.
Mitra J, Enders GH. 2004. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. Oncogene in press.
Monnier A, Morales J, Cormier P, Boulben S, Belle R, Mulner-Lorillon O. 2001. Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. Zygote 9(3):229-236.
Murray AW. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell 116(2):221-234.
Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N. 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. Genes and Development 15(16):2083-2093.
Pyronnet S, Pradayrol L, Sonenberg N. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. Mol Cell 5(4):607-616.
Qin X, Sarnow P. 2004. Preferential translation of IRES-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. J Biol Chem.
Ravnik SE, Wolgemuth DJ. 1996. The developmentally restricted pattern of expression in the male germ line of a murine cyclin A, cyclin A2, suggests roles in both mitotic and meiotic cell cycles. Dev Biol 173(1):69-78.
Sachs AB. 2000. Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. Cell 101(3):243-245.
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Shah OJ, Ghosh S, Hunter T. 2003. Mitotic regulation of ribosomal S6 kinase 1 involves Ser/Thr, Pro phosphorylation of consensus and non-consensus sites by Cdc2. J Biol Chem 278(18):16433-16442.
Vagner S, Galy B, Pyronnet S. 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. EMBO Rep 2(10):893-898.
Yam CH, Fung TK, Poon RY. 2002. Cyclin A in cell cycle control and cancer. Cell Mol Life Sci 59(8):1317-1326.
Zearfoss NR, Chan AP, Kloc M, Allen LH, Etkin LD. 2003. Identification of new Xlsirt family members in the Xenopus laevis oocyte. Mech Dev 120(4):503-509.

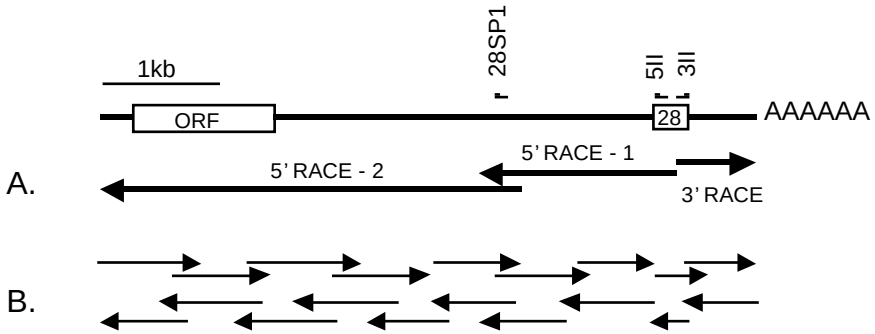
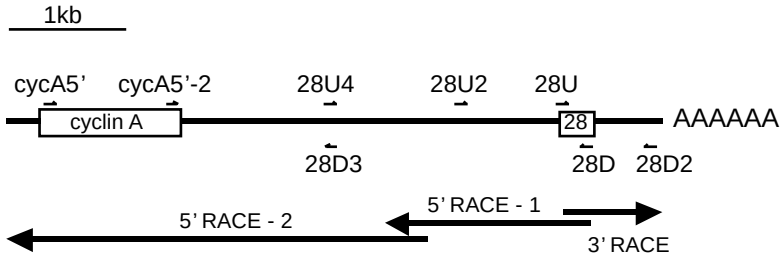
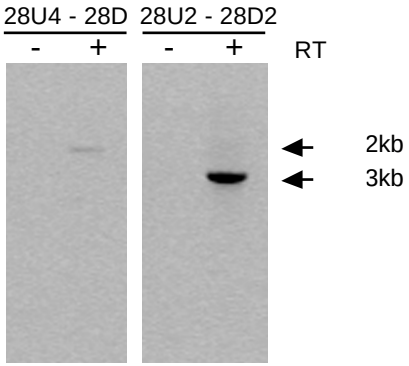


fig. 1

A


1kb
cycA5'
cycA5'-2
28U4
28U2
28U
cyclin A
28
AAAAAA
28D3
28D
28D2
5' RACE - 1
5' RACE - 2
3' RACE

B


28U4 - 28D
28U2 - 28D2
- + - +
RT
2kb
3kb

C

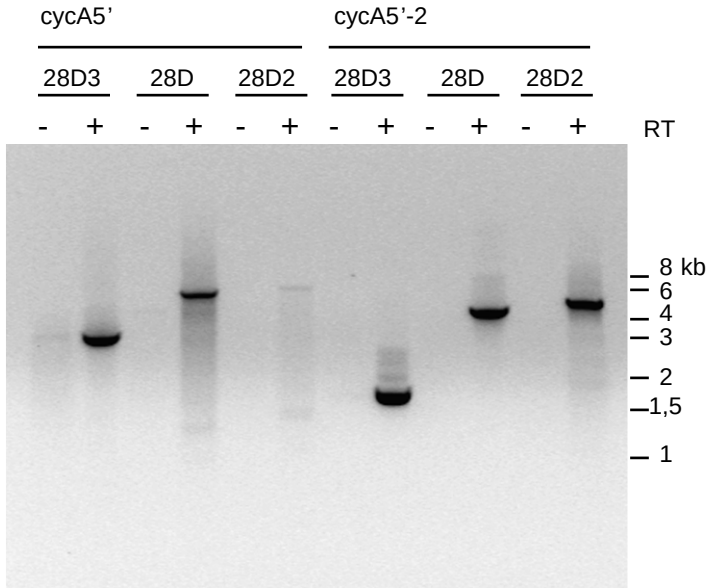
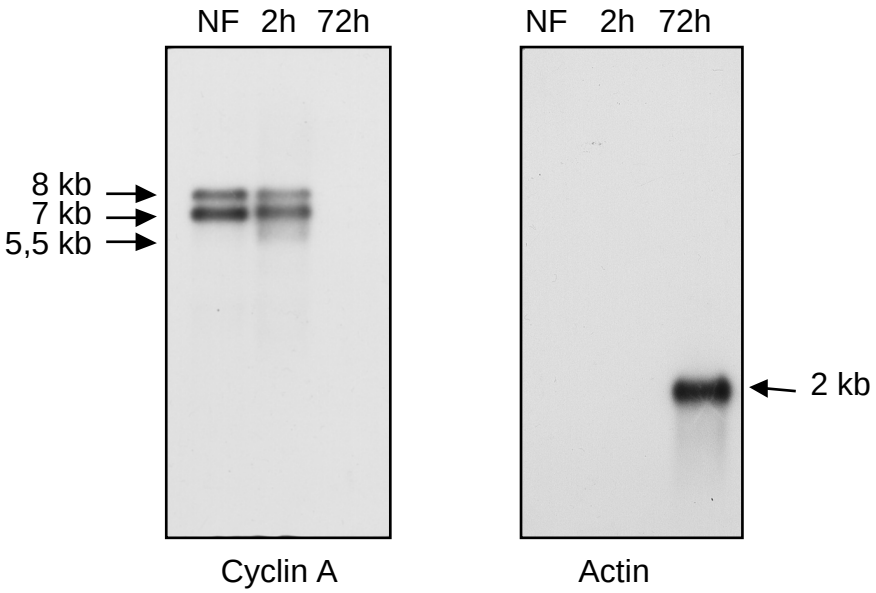

cycA5'
cycA5'-2
28D3
28D
28D2
28D3
28D
28D2
- + - + - + - + - + - +
RT
8 kb
6
4
3
2
1,5
1

fig. 2

A


NF 2h 72h
NF 2h 72h
8 kb
7 kb
5,5 kb
2 kb
Cyclin A
Actin

B

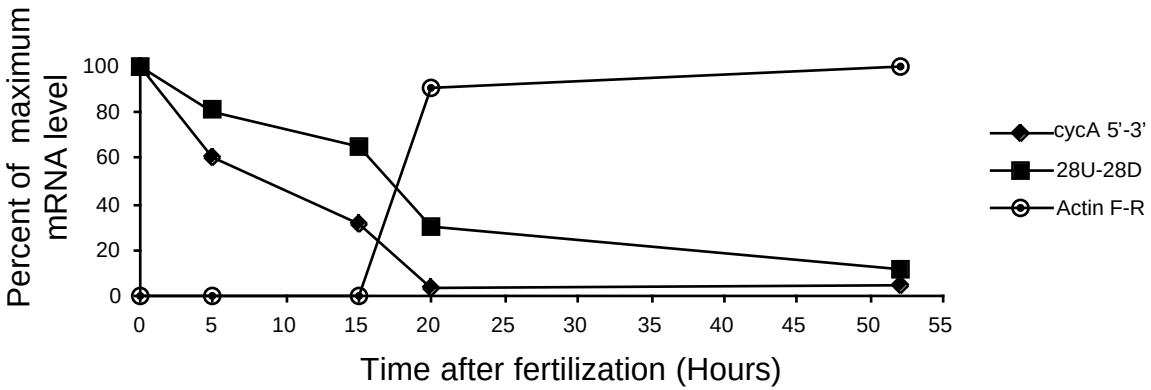

Percent of maximum mRNA level
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Time after fertilization (Hours)
cycA 5'-3'
28U-28D
Actin F-R

fig. 3

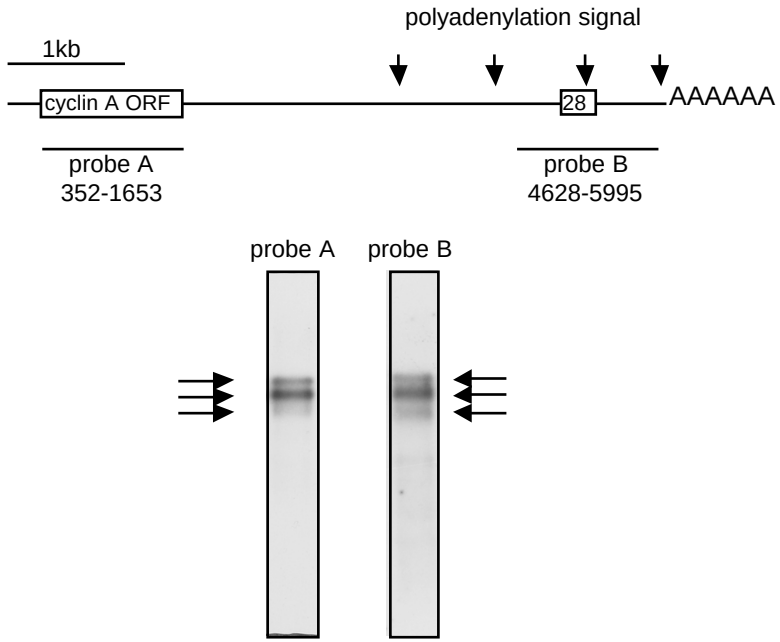

polyadenylation signal
1kb
cyclin A ORF
28
AAAAAA
probe A
352-1653
probe B
4628-5995
probe A
probe B

fig. 4