



**HAL**  
open science

# Régulation traductionnelle en réponse à la fécondation et en conditions perturbées dans l'embryon d'oursin

Vlad Costache

► **To cite this version:**

Vlad Costache. Régulation traductionnelle en réponse à la fécondation et en conditions perturbées dans l'embryon d'oursin. Biologie cellulaire. Université Rennes 1, 2012. Français. NNT : 2011REN1S162 . tel-00706548

**HAL Id: tel-00706548**

**<https://theses.hal.science/tel-00706548>**

Submitted on 11 Jun 2012

**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.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : BIOLOGIE*

**Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Vlad COSTACHE**

Préparée à l'unité de recherche UMR7150 CNRS UPMC, Roscoff  
Equipe Traduction, Cycle cellulaire et Développement (TCCD)  
E.I. 937 Centre de Biologie Marine et Océanographie de Roscoff

**Régulation  
traductionnelle en  
réponse à la  
fécondation et en  
conditions perturbées  
dans l'embryon  
d'oursin**

**Thèse soutenue à Roscoff  
le 16 décembre 2011**

devant le jury composé de :

**Dr JEAN JEAN Olivier**

Directeur de Recherches CNRS  
FRE 3402, Paris / rapporteur

**Dr RABET Nicolas**

Maître de Conférences à l'Université  
Pierre et Marie Curie  
UMR 7802, Paris / rapporteur

**Dr CORCOS Laurent**

Directeur de Recherches INSERM  
U613-ECLA, Brest / examinateur

**Pr PAILLARD Luc**

Professeur à l'Université de Rennes 1  
UMR 6061 CNRS, Rennes / examinateur

**Dr MORALES Julia**

Chargée de Recherches CNRS  
UMR7150, Roscoff / directrice de thèse

*A mon père,*

*Je garderai toujours dans mon âme ton amour et ton sacrifice...*

---

## Remerciements

*Cette thèse a été réalisée à la Station Biologique de Roscoff, au sein de l'équipe Traduction, Cycle Cellulaire et Développement qui est sous la direction du Prof. Patrick Cormier. Elle a été financée par la Région Bretagne.*

*Je remercie tout d'abord Patrick Cormier pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, la « Dream Team », comme on l'appelle à la Station. Je te remercie pour ton écoute, tes conseils, pour toutes les discussions très enrichissantes sur la biologie, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir fait entrer dans le monde du développement et de la traduction. Je suis arrivé sur l'île !, au moins j'espère ne pas être loin...*

*Mes chaleureux remerciements à Julia Morales, pour m'avoir encadré pendant ces trois dernières années. Merci beaucoup pour ta patience (nécessaire lorsqu'on m'explique quelque chose...), pour ta disponibilité, tes conseils et tes encouragements.*

*Je remercie les membres de mon comité de thèse pour leur implication, leur aide et leurs conseils : Catherine Corcos, Reynald Gillet et Luc Paillard. J'adresse un merci spécial à Xavier Le Goff, mon tuteur de thèse auprès de l'école doctorale VAS, pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Merci aux membres de l'équipe TCCD pour avoir été toujours là :*

*Je remercie Bertrand Cosson pour ses conseils et ses encouragements. Merci de m'avoir nourri lorsqu'on se retrouvait « travailleurs du soir, espoir.. » tard au labo, tout en faisant attention combien de CO<sub>2</sub> ça rapportait à la planète. Merci à Robert Bellé, pour ta gentillesse, pour ton aide, tes conseils et ta disponibilité. Merci pour tous les « voyages cantine » avec la Robert-mobil 2 et pour ta bonne humeur quotidienne. Je remercie Odile Mulner-Lorillon pour sa gentillesse et son savoir-faire au laboratoire.*

*Je remercie chaleureusement Virginie Glippa pour sa bonne humeur, son écoute et ses conseils. Merci pour ta confiance et pour ton amitié. Merci à Sandrine Boulben, ma passagère courageuse à moto, pour son efficacité et sa gentillesse. Je remercie Sophie Paris Labrousse pour son aide, son efficacité et sa gentillesse.*

*Merci à Pauline Gosselin, ma « camarade » de bureau et de thèse, depuis trois années. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, pour les gâteaux et les verres de jus piqués des conférenciers... Merci à mon vieux Maxime Masse, mon « chou », merci pour toutes les bêtises et les conneries qu'on débitait et bien sûr pour les leçons de pêche !*

*Merci à Nicole Guyard pour ton efficacité de faire venir à Roscoff toutes les publiés et ouvrages que je commandais. Je remercie Christophe Caron au service info, pour son aide et pour sa gentillesse. Je remercie Marine et Floriane, qui sont venues en stage dans notre équipe, pour leur contribution sur mon projet de thèse.*

*Merci à Erwan Corre et Gildas Le Corguillé pour leur aide en bioinfo et leur contribution sur le projet du traductome.*

---

*Tous mes remerciements aux membres de « l'équipage » de la SBR présents ou anciens, vous avez rendu mon passage à la station vraiment inoubliable : Alexandre Geoffroy, Benoit Godard, Caroline Corbel, Daniella Mella, Daphné Grulois, Frédéric Le Sourd, Dr Hussam Saad, François Thomas, Guillaume Margé, Isabelle Gauffeny, Jessica Durand, Joana Projecto Garcia, Laurent Laguerre, Magali Le Breton, Matthieu Bruneaux, Pierre François Pluchon (PFP), Sarah Romac, Sophie Plouviez, Stefania Bilotto, Vincent Ouisse, Xavier Lecomte....*

*Merci à Nathalie Oulhen, ancienne thésarde de l'équipe, pour toutes les déconnes, les discussions, les conseils et aussi pour l'accueil à Providence à chaque congrès des oursinists.*

*Je remercie Mahdi El Bendif pour son amitié, mon vieux camarade de galère ! Merci pour les discussions, les pizzas le soir, la guitare, les fêtes... Merci à Eric Fontanillas pour ses conseils, pour les longues discussions de la biologie à la phylosophie, ainsi que pour avoir remonté ensemble les Journal Clubs à la station.*

*J'adresse un merci particulier à Andrés Ritter, mon ami, mon scientifique et mon guitariste préféré. Merci pour toutes les discussions et pour l'optimisme que tu m'inspires tout le temps.*

*Je remercie Marthe Melguen pour son amitié, ses précieux conseils, son écoute et ses belles paroles.*

*Merci aux AJC-ists présents ou passés : Nathalie, Florentine, Laure, Dominique, Florian, Jean-Charles, Noan. Ce fut un plaisir de faire partie de notre association roscovite des 'jeunes chercheurs avec vous. Bon courage pour les projets !*

*Un grand merci à toute ma famille, merci pour votre soutien, malgré la distance.*

*En fin, je dois un énorme merci à ma chérie Maria. Je te remercie de croire en moi. Merci pour ton soutien, ta compréhension et tes encouragements, mais aussi pour l'amour et l'optimisme que tu m'inspires tous les jours.*

---

## Sommaire

Résumé .....	1
Liste des abréviations.....	3
Sommaire des figures.....	5
Avant propos.....	7
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>1. L'embryon d'oursin, un modèle biologique incontournable.....</b>	<b>10</b>
1.1. Les principales espèces « modèles » .....	10
1.2. Données génomiques des échinodermes. Ressources disponibles en 2011.....	12
1.3. L'ovogénèse et les principales étapes du développement chez l'oursin .....	14
1.4. L'étude du cycle cellulaire et le développement précoce de l'oursin .....	17
1.5. L'embryon d'oursin et la synthèse protéique .....	19
1.6. Exemples d'ARNm recrutés sélectivement dans les polysomes.....	22
<b>2. Régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes chez les eucaryotes.....</b>	<b>26</b>
2.1. L'ARN messager : de la transcription à la traduction .....	26
2.2. La régulation de la synthèse protéique .....	33
2.2.1. L'initiation de la synthèse protéique.....	34
L'initiation dépendante de la coiffe.....	35
La traduction IRES ( <i>Internal Ribosome Entry Site</i> ) dépendante.....	39
Le modèle hybride d'initiation.....	40
2.3. Acteurs régulateurs clés au niveau de l'initiation .....	40
2.3.1. Régulation du complexe eIF4F .....	41
2.3.2. Le facteur eIF2.....	46
2.3.2.1. La structure d'eIF2 .....	47
2.3.2.2. Le facteur eIF2B .....	49
2.3.2.3. Le facteur eIF5 .....	52
2.3.2.4. Régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .....	54
2.3.2.5. Conséquences de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ sur la traduction qualitative d'ARNm .....	54
2.3.2.6. Les kinases d'eIF2 $\alpha$ .....	57
2.4. Importance de la régulation traductionnelle dans différents contextes.....	61
2.4.1. Traduction et apoptose.....	61

2.4.1.1. Les acteurs de l'apoptose .....	61
2.4.1.2. L'implication des facteurs de traduction en apoptose .....	63
2.4.2. Traduction et cancer .....	68
<b>3. Régulation traductionnelle dans l'embryon d'oursin .....</b>	<b>70</b>
3.1. Les eIFs et la fécondation .....	70
3.2. Les eIFs et les conditions de stress/apoptose .....	72
<b>4. Objectifs de la thèse.....</b>	<b>73</b>
<b>II. RESULTATS .....</b>	<b>74</b>
<b>1. Le rôle de la phosphorylation d'eIF2<math>\alpha</math> dans les ovules et embryons d'oursin, en réponse à la fécondation .....</b>	<b>75</b>
<b>2. Le recrutement polysomal dans les embryons d'oursin.....</b>	<b>103</b>
2.1. Matériel et Méthodes .....	105
2.2. Le traductome en conditions physiologiques chez l'oursin.....	107
2.2.1. La synthèse protéique est nécessaire pour le maintien de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et la présence de 4E-BP avant fécondation.....	108
2.2.2. Modifications des facteurs de traduction en réponse à la fécondation chez <i>P.lividus</i> .....	109
2.2.3. Le profil de polysomes dans les ovules et embryons d'oursin.....	109
2.2.4. Ratio polysomes/monosomes au cours du développement .....	112
2.2.5. Vérification des ARN extraits à partir des fractions polysomales .....	113
2.2.6. Séquençage à haut débit et données du <i>traductome</i> .....	114
2.3. Le traductome et l'induction de l'apoptose dans les embryons d'oursin .....	116
2.3.1. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et l'induction de l'apoptose dans les traitements au MMS n'est pas sous dépendance transcriptionnelle. ....	116
2.3.2. Activation de GCN2 en réponse au MMS.....	117
2.3.3. L'induction de l'apoptose dans les embryons de <i>P. lividus</i> .....	118
2.3.4. Profil des polysomes lors de l'induction de l'apoptose .....	120
2.3.5. Séquençage à haut-débit des transcrits traduits lors de l'induction de l'apoptose chez l'oursin	121
<b>III. SYNTHÈSE, DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>123</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>130</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>145</b>

---

## Résumé

La traduction est une étape critique de la régulation de l'expression des gènes. Chez l'oursin, la fécondation induit une augmentation de la synthèse protéique, qui dépend essentiellement de la traduction d'ARN messagers maternels. Cette synthèse protéique est indispensable au déroulement des cycles cellulaires du développement précoce. Le développement embryonnaire de l'oursin constitue ainsi un modèle de choix pour étudier la régulation de la traduction. Dans le cadre de cette thèse, le contrôle de la traduction a été étudié chez l'oursin dans deux situations : le contexte physiologique de la fécondation et le contexte de l'induction de l'apoptose.

Nous nous sommes interrogés d'abord sur les mécanismes régulateurs impliqués dans la synthèse protéique après fécondation. L'une des étapes limitantes de la traduction est l'initiation. Dans ce cadre, le facteur d'initiation eIF2 joue un rôle clé. eIF2 est responsable de l'apport de la méthionine initiatrice au niveau du ribosome. Lorsque la sous-unité alpha d'eIF2 est phosphorylée, la synthèse protéique globale est inhibée et la traduction sélective de certains ARNm est stimulée. Dans les ovules non fécondés d'oursin, eIF2alpha est physiologiquement phosphorylé et la fécondation provoque sa déphosphorylation. En microinjectant dans les ovules non fécondés un variant d'eIF2alpha mimant l'état phosphorylé, nous avons montré que la déphosphorylation d'eIF2alpha est nécessaire pour la première division mitotique chez l'oursin.

Nous nous sommes intéressés au lien entre la phosphorylation d'eIF2alpha et l'induction de l'apoptose chez l'oursin. En effet, la traduction d'ARNm codant pour des protéines pro- ou anti-apoptotiques influence directement la survie des cellules. L'embryon d'oursin possède la machinerie nécessaire pour le déclenchement de l'apoptose, après induction par l'agent génotoxique MMS. Le traitement au MMS des embryons provoque la phosphorylation d'eIF2alpha. Dans cette situation, nous avons trouvé que la kinase GCN2 est impliquée dans la phosphorylation d'eIF2alpha.

En fin, dans le but d'étudier comment la machinerie traductionnelle module le recrutement polysomal, nous avons analysé le traductome en réponse à la fécondation et après le traitement au MMS. Nous avons effectué une approche de séquençage à haut-débit des transcrits purifiés par gradients de polysomes. L'analyse de ces transcrits nous permettra d'appréhender le réseau des gènes régulés au niveau traductionnel lors de la fécondation et de l'induction de l'apoptose dans les embryons d'oursin.

Mots-clés : régulation traductionnelle, eIF2, développement embryonnaire, oursin, traductome, *polysome profiling*, traduction sélective



---

## Abstract

Translation is a critical step in gene expression regulation. In sea urchin embryos, fertilization induces an increase in protein synthesis, which depends mainly on the translation of maternal messenger RNAs. This protein synthesis is essential for the first cell cycles. Embryonic development of the sea urchin is an excellent model for studying translational control. In this thesis, translational regulation in sea urchin embryos was studied in two situations: the physiological context of fertilization and the context of apoptosis induction.

We first examined the regulatory mechanisms involved in protein synthesis after fertilization. Initiation is one of the limiting steps of translation. In this context, the initiation factor eIF2 plays a key role. eIF2 is responsible for bringing the initiator methionine to the ribosome. When the alpha subunit of eIF2 is phosphorylated, global protein synthesis is inhibited and the selective translation of certain mRNAs is stimulated. In the sea urchin unfertilized eggs, eIF2alpha is physiologically phosphorylated and fertilization induces its dephosphorylation. By microinjecting a variant mimicking the phosphorylated state of eIF2alpha into the unfertilized eggs, we showed that dephosphorylation of eIF2alpha is required for the first mitotic division in the sea urchin.

We were interested in the relationship between the phosphorylation of eIF2alpha and induction of apoptosis in the sea urchin. Indeed, the translation of mRNAs encoding proteins pro- or anti-apoptotic directly influences cell survival. The sea urchin has the molecular tool kit for apoptotic induction. Exposing embryos to MMS, a DNA-damaging agent, causes phosphorylation of eIF2alpha and apoptosis activation. In this situation, we found that the GCN2 kinase is involved in the phosphorylation of eIF2alpha.

In order to study how the translational machinery modulates the polysomal recruitment, we analyzed the translome in response to fertilization and after exposure to MMS. We conducted deep sequencing of transcripts that are present in polysomes. Analysis of these transcripts, following annotation, will allow a better understanding of the genes regulatory network at the translational level during fertilization and the induction of apoptosis in sea urchin embryos.

Keywords: translational control, eIF2, embryo, sea urchin, translome, polysome profiling, selective translation

---

## Liste des abréviations

<b>AA-boxes</b>	Aromatic Acidic boxes
<b>ABC 50</b>	ATP-binding cassette 50
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AIF</b>	Apoptosis Induction Factor
<b>Apaf-1</b>	Apoptotic peptidase activating factor 1
<b>ARE</b>	Adenine/uridine Rich Elements
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	ARN messager
<b>ARNt</b>	ARN de transfert
<b>ATF4</b>	Activating Transcription Factor 4
<b>BAG-1</b>	Bcl-2-associated athanogene
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tag
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>cdc2</b>	Cell division control 2
<b>CDK1</b>	Cyclin Dependant Kinase 1
<b>CDK1</b>	Cyclin Dependant Kinase1
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary
<b>CHOP</b>	C/EBP CCAAT/enhancer binding protein homologous protein
<b>c-IAP</b>	Cellular inhibitor of apoptosis
<b>Bag</b>	Bcl-2-associated anthanogene
<b>c-myc</b>	Cellular myelocytomatosis oncogene
<b>CReP</b>	Constitutive Repressor of eIF2 $\alpha$ phosphorylation
<b>DAP5/p97/NAT1</b>	Death Associated Protein 5 / p97 / Novel Apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC) Target no. 1
<b>Dcp1</b>	Eukaryotic mRNA decapping protein 1
<b>eEFs</b>	Eukaryotic Elongation Factors
<b>eEF1A</b>	Eukaryotic Elongation Factor1A
<b>eIFs</b>	Eukaryotic Initiation Factors
<b>eIF2<math>\alpha</math>[P]</b>	Phospho - Eukaryotic Initiation Factor2 $\alpha$
<b>eRFs</b>	Eukaryotic Release Factors
<b>FPKM</b>	fragments per kilobase of exon per million fragments mapped
<b>FRAP/mTOR</b>	FKBP12 Rapamycin Associated Protein / mammalian Target Of Rapamycin
<b>GADD34</b>	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34
<b>GAP</b>	GTPase-Activating Protein
<b>GCN2</b>	General Control Nondepressible 2 kinase
<b>GEF</b>	Guanine Exchange Factor
<b>GSK3</b>	Glycogen Synthase Kinase 3
<b>GTP</b>	Guanosine TriPhosphate
<b>HEAT</b>	Huntingtin, Elongation factor 3, PR65/A, kinase TOR1
<b>HIAP2/BIRC2</b>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2
<b>IRES</b>	Internal Ribosome Entry Site
<b>ISR</b>	Integrated Stress Response
<b>ITAF</b>	IRES Trans Acting Factor
<b>LR</b>	Linker Region
<b>m7GTP</b>	7-methyl Guanosine Tri-Phosphate
<b>MAPK/Erk</b>	Mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-regulated kinase

---

<b>Met-ARNTi</b>	Méthionyl-ARNt initiateur
<b>Met-ARNTm</b>	Méthionyl-ARNt d'élongation
<b>miRNA</b>	micro ARN
<b>MMS</b>	Methyl Methane Sulfonate
<b>Mnk1</b>	Mitogen-activated protein kinase-interacting kinase 1
<b>MRE</b>	miRNA Recognition Element
<b>mRNP</b>	messenger RiboNucleoProtein
<b>ncRNA</b>	ARN non codant
<b>PABP</b>	PolyA Binding Protein
<b>PAIP</b>	PABP Interacting Proteins
<b>PAK2</b>	p21 Activated Protein Kinase 2
<b>PCRq</b>	PCR quantitative
<b>Pdcd4</b>	Programmed cell death protein 4
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PP1</b>	Protein Phosphatase 1
<b>RBPs</b>	RNA Binding Proteins
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complexes
<b>TC</b>	Complexe Ternaire
<b>TRBP</b>	TAR RNA Binding Protein
<b>Unr</b>	Upstream of N-ras
<b>uORF</b>	Upstream Open Reading Frame
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis protein

---

## Sommaire des figures

<b>Figure 1.1</b> Les deux espèces d'oursin majoritairement utilisées en France comme modèle biologique : <i>Paracentrotus lividus</i> et <i>Sphaerechinus granularis</i> .	11
<b>Figure 1.2</b> La position phylogénétique de l'oursin par rapport aux autres modèles en biologie du développement et par rapport à l'humain.	13
<b>Figure 1.3</b> Les projets de séquençage des échinodermes en cours.	13
<b>Figure 1.4</b> L'ovogénèse et la maturation méiotique chez l'oursin.	15
<b>Figure 1.5</b> Différents stades de développement embryonnaire de l'oursin <i>P.lividus</i> .	16
<b>Figure 1.6</b> Le développement précoce de l'oursin et la synthèse protéique.	20
<b>Figure 1.7</b> Différents types de polysomes extraits des ovules et zygotes d'oursin et visualisés par microscopie électronique à transmission.	21
<b>Figure 1.8</b> Expression d'un gène : la vie d'un ARNm comme mRNP.	28
<b>Figure 1.9</b> L'impact des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes sur l'abondance des protéines, dans des cellules MEF (fibroblastes de souris).	32
<b>Figure 1.10</b> Le complexe d'initiation 48 S.	36
<b>Figure 1.11</b> L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe.	37
<b>Figure 1.12</b> Facteurs de traduction impliqués dans l'initiation dépendante de séquence IRES.	39
<b>Figure 1.13</b> Régulateurs clés de l'initiation.	41
<b>Figure 1.14</b> Les deux isoformes d'eIF4G et leurs domaines d'interaction.	44
<b>Figure 1.15</b> Les rôles d'eIF2 et eIF2B dans la traduction, présentés dans l'enchaînement de réactions qui mènent à la synthèse protéique.	47
<b>Figure 1.16</b> Les sous-unités d'eIF2 sont représentées sous forme de rectangles verts symbolisant les chaînes polypeptidiques linaires.	49
<b>Figure 1.17</b> Interaction d'eIF2 avec eIF2B.	51
<b>Figure 1.18</b> Les domaines d'eIF5 et son interaction avec eIF2.	53
<b>Figure 1.19</b> Traduction spécifique du messenger GCN4.	56
<b>Figure 1.20</b> Les différents stress qui activent les quatre kinases d'eIF2α PKR, PERK, GCN2 et HRI.	57
<b>Figure 1.21</b> Architecture des eIF2α kinases	58
<b>Figure 1.22</b> Schéma intégratif de la réponse aux stress (ISR) faisant intervenir eIF2α[P].	59
<b>Figure 1.23</b> Les voies d'induction de l'apoptose.	62
<b>Figure 1.24</b> Les deux isoformes de DAP5, homologue d'eIF4G.	66
<b>Figure 1.25</b> L'implication de la régulation traductionnelle IRES-dépendante dans l'apoptose.	67

---

<b>Figure 2.1</b> Schéma bilan de la régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ dans les ovules et embryons d'oursin.	76
<b>Figure 2.2</b> Stratégie expérimentale pour analyser le recrutement polysomal.	107
<b>Figure 2.3</b> La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et le maintien de 4E-BP dans les ovules non fécondés.	108
<b>Figure 2.4</b> Modifications des facteurs d'initiation eIF2 et 4E-BP chez <i>P. lividus</i> .	109
<b>Figure 2.5</b> Profils des polysomes au cours du développement précoce de l'oursin <i>P. lividus</i> .	111
<b>Figure 2.6</b> Vérification des profils des polysomes des stades 4 heures par le traitement du lysat d'embryons à l'EDTA.	112
<b>Figure 2.7</b> L'augmentation du ratio polysomes/monosomes (80 S) après fécondation.	113
<b>Figure 2.8</b> Profil des ARN totaux de <i>P. lividus</i> extraits des fractions du gradient de sucrose. Les fractions polysomales sont numérotées de 13 à 20.	114
<b>Figure 2.9</b> L'activation de la caspase 3, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et la dégradation de 4E-BP dans les embryons traités avec MMS.	117
<b>Figure 2.10</b> La kinase GCN2 est active d'une manière corrélée avec la forme phosphorylée d'eIF2 $\alpha$ dans les embryons d'oursin en réponse au MMS.	118
<b>Figure 2.11</b> Le traitement au MMS induit l'arrêt du cycle cellulaire des embryons de <i>P. lividus</i> et le blebbing caractéristique des cellules en apoptose (8-13 heures après fécondation).	119
<b>Figure 2.12</b> Vérification de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ dans les embryons de <i>P. lividus</i> traités au MMS.	119
<b>Figure 2.13</b> Profils de polysomes des embryons d'oursin traités au MMS.	120
<b>Figure 2.14</b> Fréquence et taille des transcrits du traductome.	122
<b>Figure 3.1</b> Stratégie de recherche des transcrits régulés à la fécondation et lors de l'induction de l'apoptose, après séquençage à haut-débit des transcrits purifiés des polysomes.	128
<b>Tableau 1.</b> Les facteurs d'initiation	38

---

## Avant propos

Le contrôle de l'expression des gènes est crucial pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cela présente un grand intérêt pour beaucoup de recherches en biologie et en médecine. Mais très souvent on confond l'expression d'un gène avec juste la présence d'un transcrit dans la cellule. Un gène s'exprime lorsque son ADN est transcrit en ARN et traduit par la suite en protéine. 44% du poids sec humain est représenté par les protéines, qui sont les principaux effecteurs des fonctions cellulaires : transport, structure, régulation... Il est donc nécessaire de considérer l'étape de traduction des ARNm, puisque la régulation traductionnelle permet de contrôler d'une manière précise et rapide la quantité et la qualité des protéines synthétisées, dans le temps et l'espace. De plus, le rôle dominant de la traduction (60%) par rapport à la transcription a été récemment démontré par Schwanhausser et collab. (2011) à l'aide de la modélisation mathématique et des données à haut débit des ARNm et des protéines néo-synthétisés.

La synthèse protéique a été étudiée depuis plus de soixante ans et certains modèles biologiques comme le xénope, la drosophile, le nématode *C. elegans* ou l'oursin, ont joué un rôle important dans la compréhension du rôle de la synthèse protéique. Chez l'oursin, la fécondation provoque une augmentation de la synthèse protéique, essentielle pour le développement. Les premières divisions sont principalement sous la dépendance de la traduction. Dans ce contexte traductionnel, beaucoup d'études des années '70 - '80 ont fourni des quantifications importantes par rapport aux variations de synthèse protéique (vitesse de traduction, nombre de ribosomes par polysome..) pendant le développement précoce de l'oursin.

L'oursin a également l'avantage d'une synchronie naturelle de ses cycles cellulaires embryonnaires. En faisant le lien entre la synthèse protéique et la division cellulaire chez l'oursin, Tim Hunt a identifié la cycline, qui est une découverte majeure pour l'étude du cycle cellulaire et qui lui a valu le prix Nobel de la médecine.

Malgré ces avancées, les réseaux des acteurs moléculaires régulateurs de la traduction ont commencé à être décryptés seulement depuis peu de temps. L'arrivée des « omics » permet une vision globale des réseaux de régulation de la synthèse protéique, au sein desquels, les facteurs d'initiation, qui sont responsables de l'assemblage du ribosome sur l'ARNm, constituent des acteurs régulateurs majeurs. Cependant, leur rôle ainsi que les mécanismes de régulation dans un contexte cellulaire particulier, tel que celui de la fécondation et du développement embryonnaire, n'est que peu exploré.

---

Mon travail de thèse s'est focalisé autour des questions suivantes :

- Quels sont les mécanismes traductionnels responsables de la synthèse protéique dans les ovules et les embryons précoces d'oursin ? Quel est le rôle de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans le contexte traductionnel du premier clivage embryonnaire de l'oursin ?
- Quel est l'impact des mécanismes traductionnels sur le recrutement polysomal des ARNm maternels ? Quels sont les messagers traduits sélectivement dans les ovules et les embryons d'oursin ?
- Comment sont modifiés les facteurs d'initiation en réponse à l'induction de l'apoptose au cours du développement embryonnaire de l'oursin. Quels sont les transcrits traduits dans cette condition ?

Pour mieux répondre à ces questions, (i) la première partie de l'introduction est consacrée à la présentation de l'embryon d'oursin comme modèle biologique intéressant pour l'étude de la synthèse protéique. (ii) Par la suite, j'ai tenu à faire le point sur le contrôle de la synthèse protéique dans un contexte de régulations post-transcriptionnelles. Les acteurs moléculaires impliqués dans la traduction seront présentés ensuite, avec l'accent mis sur eIF2, ainsi que sur l'implication des facteurs de traduction dans l'apoptose. (iii) La fin de l'introduction présente succinctement les données au niveau des facteurs de traduction chez l'embryon d'oursin.

Les résultats présentés dans le chapitre 2 sont organisés en deux parties. (i) Je me suis d'abord penché sur la question des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la synthèse protéique après fécondation chez l'oursin, en s'appuyant sur les facteurs d'initiation et surtout sur le facteur eIF2, capable de moduler la synthèse protéique en fonction de son état de phosphorylation. (ii) Je me suis également intéressé au lien entre la traduction et l'induction de l'apoptose, qui représente un moment décisionnel ultime pour la cellule. J'ai analysé donc l'impact des changements de la machinerie de traduction sur le recrutement d'ARNm dans les polysomes. Grâce aux nouvelles technologies de séquençage à haut-débit, nous pouvons réaliser une étude exhaustive du traductome, constitué par les transcrits en cours de traduction. Cette approche permet de répondre à des questions qui concernent à la fois la synthèse globale de protéines mais aussi la synthèse sélective de protéines nécessaires à un moment donné ou à un endroit donné, au niveau de la cellule.

L'ensemble des résultats obtenus apportent une nouvelle vision sur le rôle et la régulation des facteurs de traduction, notamment autour de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , dans le contexte physiologique de la fécondation et également, lors de l'induction de l'apoptose dans les embryons d'oursin.

CHAPITRE I.



INTRODUCTION



## I. 1.

---

### **L'embryon d'oursin, un modèle biologique incontournable**

**L**e développement embryonnaire de l'oursin constitue un des modèles embryologiques les plus étudiés depuis plus d'un siècle (Derbès, 1847; Beetschen et Fischer, 2004). Ce modèle expérimental permet aux chercheurs de répondre à des questions qui peuvent aller de la polarisation embryonnaire ou larvaire aux problématiques du cycle cellulaire, en passant par les mécanismes moléculaires liés à la fécondation. Malgré le grand nombre d'études publiées, de multiples interrogations restent sans réponse ou sont reconsidérées grâce à de nouvelles approches conceptuelles et technologiques (par exemple : l'essor de la biologie moléculaire, les *omics*, la biologie systémique).

Cette première partie introduit d'abord les principales espèces d'oursin étudiées en France et dans la communauté scientifique internationale, avec un aperçu sur les phases précoces du développement ainsi que sur les avancées des données génomiques des échinodermes. Ensuite, l'accent sera mis sur les différents mécanismes régulateurs du développement précoce, en particulier la synthèse protéique.

#### 1.1. Les principales espèces « modèles »

Les oursins font partie du groupe des Echinodermes où se retrouvent également les étoiles de mer, les ophiures, les holothuries et les crinoïdes. Ce sont des invertébrés Deutérostomiens exclusivement marins, qui développent en 3 - 4 jours après fécondation, une larve pélagique appelée

*pluteus* caractérisée par une symétrie bilatérale. Les *plutei* se métamorphosent après quelques semaines, en formant un rudiment à partir de la poche cœlomique gauche uniquement. Les adultes ont une symétrie penta-radiale, sont benthiques et se nourrissent en broutant des algues ou du biofilm. La maturité sexuelle est atteinte après 6 mois environ. La capacité de produire des gamètes ne diminue pas jusqu'à la fin de la vie, qui peut atteindre une centaine d'années chez certaines espèces (Giudice, 1973; Ebert, 2008).

Giudice (1973) a recensé 26 espèces d'oursin au niveau mondial, qu'on peut retrouver dans l'océan Pacifique, Atlantique ou la Mer Méditerranée et qui ont été décrites au niveau de leur développement ainsi que leur saison de ponte. En France, les deux espèces auxquelles s'intéresse la majorité des laboratoires de recherche sont *Paracentrotus lividus* (« châtaigne de mer ») qui est l'oursin commun en Méditerranée et Atlantique et *Sphaerechinus granularis* (Figure 1.1.) qu'on retrouve également dans la Méditerranée et Atlantique, mais avec une distribution plus limitée, qui inclut notamment la pointe bretonne.

A la Station Biologique de Roscoff, nous utilisons couramment les oursins *S. granularis* qui sont collectés en plongée au niveau de la Rade de Brest ou de l'Archipel des Glénans et maintenus en stabulation pendant plusieurs mois. L'induction expérimentale de la ponte chez *S. granularis* peut être effectuée tout au long de l'année, mais avec un optimum pendant le printemps et l'été, en contraste avec *P. lividus* qui présente une saisonnalité bien marquée au niveau de la production de gamètes : de janvier à juin en Méditerranée et de mars à septembre en Atlantique. La taille des adultes de *S. granularis* est de 2 à 3 fois supérieure par rapport à *P. lividus*. La quantité de ponte de *S. granularis* peut être de 20 à 50 mL d'ovules non fécondés ( $>10^8$  ovules d'un diamètre de  $100\mu\text{m}$ ). Ces aspects sont importants pour les approches biochimiques qui nécessitent une quantité importante de matériel biologique.

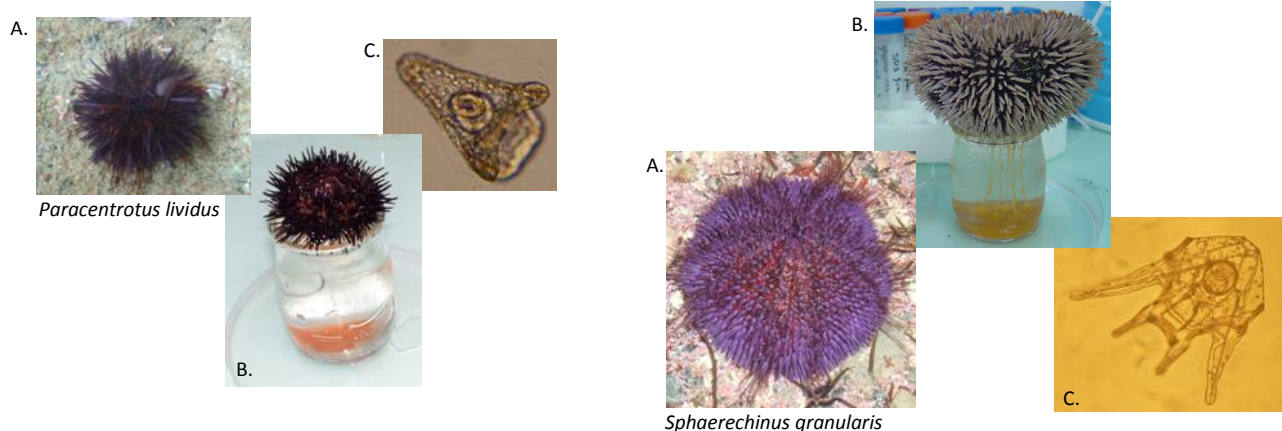


Figure 1.1. Les deux espèces d'oursin majoritairement utilisées en France comme modèle biologique : *Paracentrotus lividus* et *Sphaerechinus granularis*. Les photos montrent les adultes (A), l'induction expérimentale de la ponte chez les femelles (B) et la larve pluteus (C) correspondant à l'espèce (photos : Vlad Costache).

## 1.2. Données génomiques des échinodermes. Ressources disponibles en 2011

La communauté internationale a publié le premier génome d'échinoderme en 2006 (Sodergren et al., 2006). Il s'agit du génome de *Strongylocentrotus purpuratus* (l'oursin commun californien) présent dans l'océan Pacifique, au long de la côte Nord-Américaine. Le séquençage du génome de 814 megabases de l'oursin a permis de mettre en évidence sa position clé dans l'arbre phylogénétique : les échinodermes sont les invertébrés les plus proches de la branche des Chordés. Les 29 144 gènes annotés (Cameron et al., 2009) incluent des représentants de presque toutes les familles de gènes des vertébrés. Certains de ces gènes qui étaient considérés spécifiques des vertébrés, ont été attribués plus largement aux deutérostomes. D'autres gènes identifiés chez l'oursin sont manquants de la lignée des chordés, indiquant une perte de ces gènes chez les vertébrés. L'étude de l'expression des gènes au niveau transcriptomique montre qu'entre 11 000 et 12 000 gènes sont employés pour l'embryogenèse chez l'oursin. Ces gènes codent majoritairement pour des facteurs de transcription et protéines de signalisation, ainsi que pour quelques familles de protéines impliquées dans le métabolisme et le cytosquelette (Samanta et al., 2006).

L'analyse génomique des éléments des voies de signalisation indique une forte ressemblance avec les voies de signalisation des vertébrés, mais souvent sans la complexité de la redondance génétique qui caractérise ces derniers. L'oursin n'a perdu aucune des 158 sous-familles de kinases primordiales des métazoaires, comme c'est le cas chez les insectes et les nématodes (Bradham et al., 2006). Les échinodermes possèdent également un système immunitaire inné très sophistiqué, et des gènes orthologues associés à la vision, l'ouïe, l'équilibre et la chemoreception des vertébrés, ce qui suggère des capacités sensorielles inconnues jusqu'à présent. De plus, il a été montré que 70% des gènes sont communs entre l'oursin et l'homme et beaucoup de voies de signalisation sont conservées. Les gènes associés à de nombreuses maladies humaines sont présents chez l'oursin (Sodergren et al., 2006).

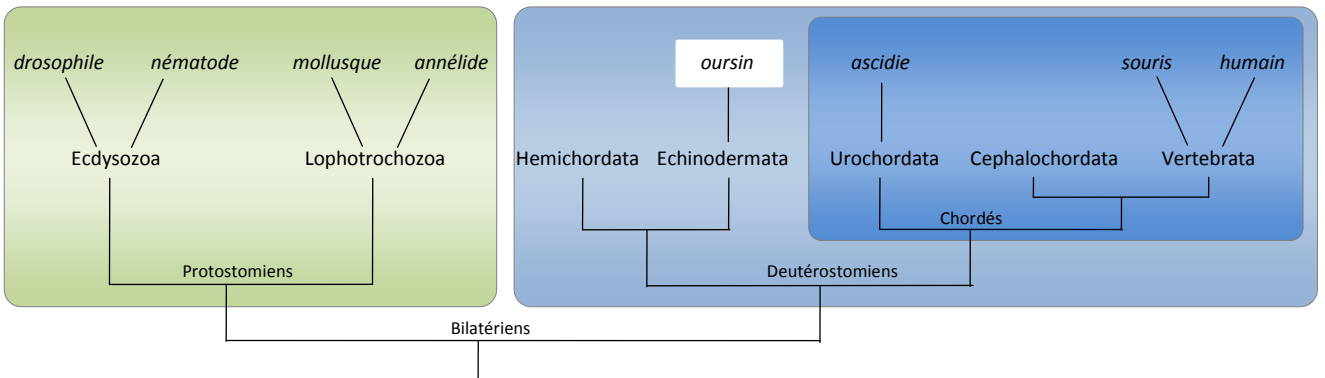


Figure 1.2. La position phylogénétique de l'oursin par rapport aux autres modèles en biologie du développement et par rapport à l'humain. Les taxons situés le plus en haut sur l'arbre ont au moins un représentant du groupe dont le génome est connu (Sodergren *et al.*, 2006).

Le génome de *S. purpuratus* constitue ainsi un outil très important. De plus, aujourd'hui, grâce aux techniques de séquençage à haut débit, plusieurs projets de séquençage des génomes et transcriptomes d'autres espèces d'échinodermes sont en cours. Au niveau européen, une banque EST est disponible pour *P. lividus* et son génome est en cours de séquençage et annotation. Pour *S. granularis*, à ce jour, seulement 47 séquences de protéines sont connues (selon NCBI).

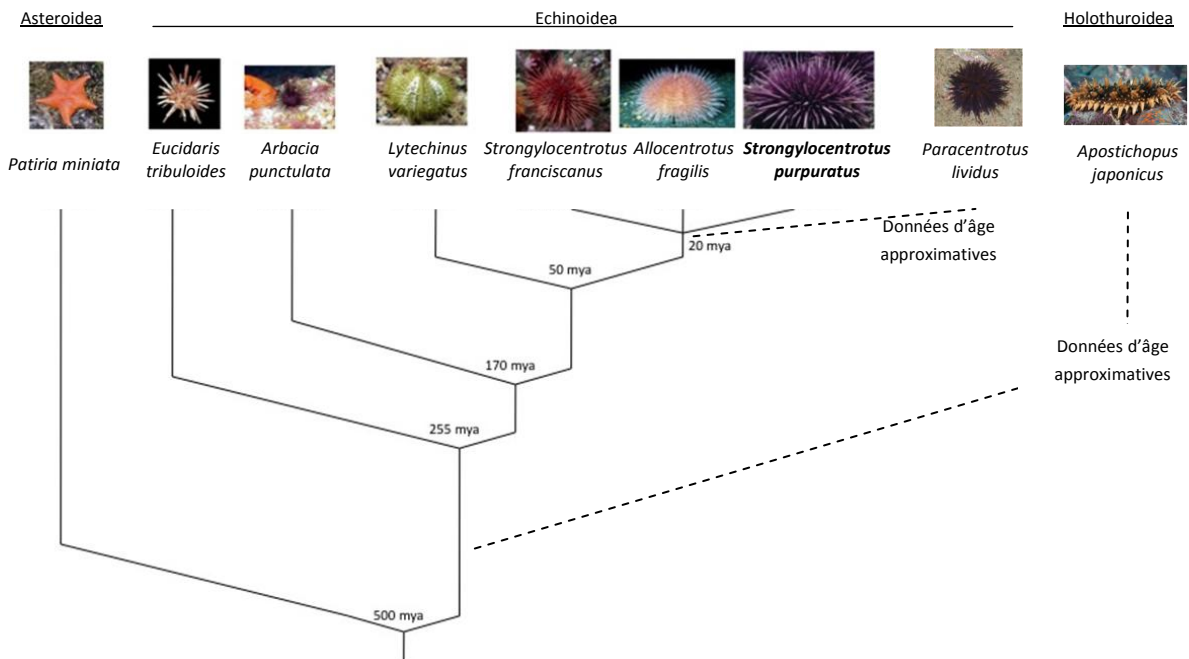


Figure 1.3. Les projets de séquençage des échinodermes, en cours. Les distances phylogénétiques sont indiquées en millions d'années (mya) et mettent en évidence l'écart entre les différents taxons et *S. purpuratus*, qui est le seul génome d'échinoderme publié, à ce jour (voir texte) (crédit données et images : NCBI - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) et Baylor College of Medicine (Richard Gibbs) - [www.hgsc.bcm.tmc.edu](http://www.hgsc.bcm.tmc.edu)). Les positions phylogénétiques de *P. lividus* et *A. japonicus* ont été estimées et insérées selon les données du génome mitochondrial - Perseke *et al.* (2010).

### 1.3. L'ovogénèse et les principales étapes du développement chez l'oursin

Les oursins sont gonochoriques et pour la plupart des espèces, les adultes ne présentent pas de dimorphisme sexuel. C'est le cas également de *P. lividus* et *S. granularis*. Les gamètes sont obtenus lorsqu'on induit la ponte en injectant dans la cavité générale de l'oursin de l'acétylcholine à 100mM. Une femelle pond jusqu'à  $10^8$  ovules qui mesurent 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et qui sont entourés d'une enveloppe de polysaccharides appelée *gangue*. Ils contiennent des pigments caroténoïdes qui leur donnent une couleur orange. Les embryons et les *plutei* sont parfaitement transparents, adaptés à l'observation par microscopie optique.

En conditions naturelles, la maturation méiotique de l'ovocyte d'oursin a lieu avant la ponte, au niveau des ovaires. Le temps nécessaire pour la différenciation et la croissance d'une population d'ovocytes varie entre 1 et 3 mois, en fonction de l'espèce (Harvey, 1956; Walker *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006). Ce processus comporte des modifications majeures au niveau du gamète femelle (*Figure 1.4*), initialement une cellule souche de 10-15 $\mu\text{m}$  caractérisée par des multiplications mitotiques actives. Ces modifications incluent (1) l'entrée en méiose, (2) la vitellogenèse qui se déroule en deux phases : une de croissance lente et de répliation des organelles, et une deuxième phase d'incorporation rapide de nutriments, glycogène, lipides et vitellus, ensuite (3) la fin des divisions méiotiques marquée par l'expulsion successive des deux globules polaires qui mène à la formation du gamète femelle haploïde, concomitant à un changement global du pattern d'expression des ARNm de l'ovule (Song *et al.*, 2006).

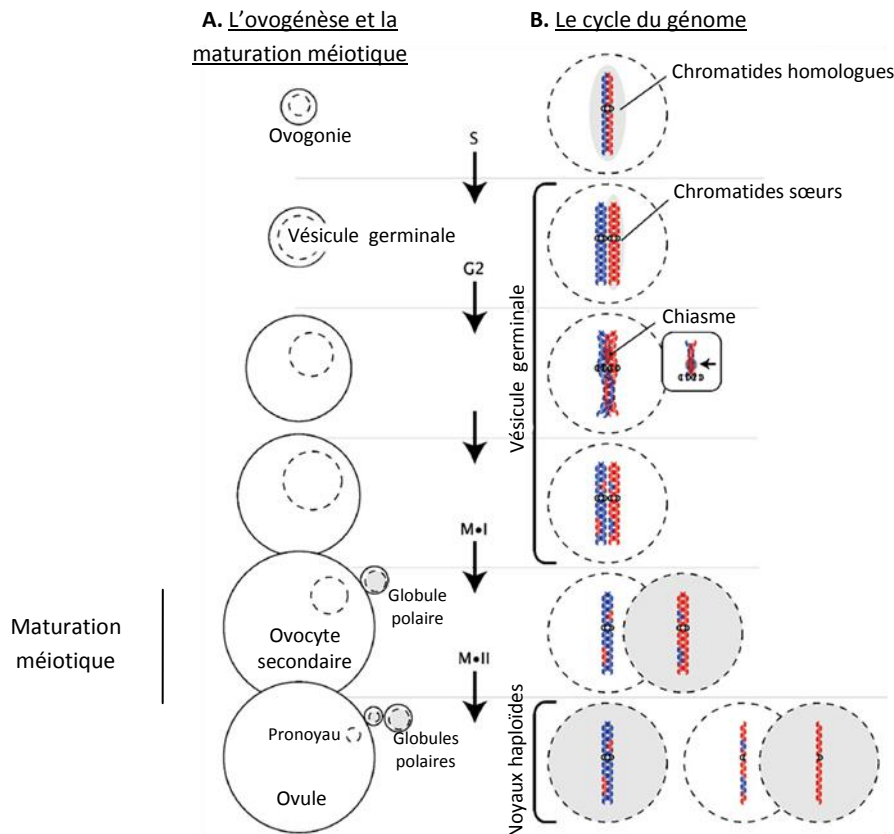


Figure 1.4. L'ovogénèse et la maturation méiotique chez l'oursin. **A.** Les phases majeures de l'ovogonie à l'ovule, au cours du cycle cellulaire méiotique. Les cercles avec une ligne interrompue symbolisent la vésicule germinale ou le pronoyau au niveau de l'ovule. Les globules polaires sont expulsés lors de la méiose. Ils seront dégradés par la suite, par les cellules somatiques des ovaires (non montré). **B.** L'état des chromatides correspondant à chaque étape de l'ovogénèse. Les flèches indiquent les phases du cycle méiotique (S- synthèse de l'ADN, G2- gap 2, M I – méiose I, M II – méiose II). Les noyaux des globules polaires ont le fond en gris. Le carré montre le détail de la recombinaison de l'ADN au niveau d'un chiasme entre les chromatides sœurs (adapté de Song *et al.*, 2006).

Au laboratoire, en conditions expérimentales un ovule d'oursin est viable pendant 2 à 3 jours (Meidel et Yund, 2001) et jusqu'à 7 jours selon d'autres auteurs (Spiegler et Oppenheimer, 1995). Chez un autre échinoderme, l'étoile de mer, la viabilité des ovocytes est plus courte, moins d'une journée. Ces ovocytes sont arrêtés en Prophase I, la reprise de la méiose est stimulée par la 1-méthyle-adénine sous contrôle hormonale (Guerrier et Doree, 1975), et la fécondation peut intervenir ensuite, pendant la méiose. Il a été montré qu'en absence de fécondation, l'ovocyte de l'étoile de mer entre en apoptose 10 heures après la rupture de l'enveloppe germinale (Sasaki et Chiba, 2004). Chez l'oursin, la mort des ovules par mort cellulaire programmée n'a pas été encore observée, même si les mécanismes moléculaires d'induction de l'apoptose sont présents dans l'ovule d'oursin (Voronina et Wessel, 2001; Le Bouffant *et al.*, 2008a).

Après la maturation méiotique, les ovules d'oursin sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire et la fécondation provoque la reprise du cycle cellulaire (section 1.4). La fécondation est externe et déclenche la levée d'une enveloppe qui joue un rôle important contre la polyspermie (Vacquier, 2011). Cependant, en milieu naturel cette fonction de l'enveloppe de fécondation ne serait jamais exercée puisque la présence des conditions de polyspermie chez l'oursin en milieu marin semble impossible à cause de la dilution et du brassage important de l'eau (Dale et Defelice, 2011).

Les deux premiers clivages sont méridionaux selon l'axe AV (pôle animal-pôle végétatif) et aboutissent au stade 4 cellules, 3 heures après la fécondation. Le troisième clivage est équatorial, après lequel 8 blastomères symétriques sont formés. Les divisions suivantes sont asymétriques et forment une *morula* caractérisée par une succession spécifique de ses blastomères selon l'axe AV : mesomères, macromères et les micromères qui jouent un rôle essentiel dans la lignée des cellules germinales et la formation des gonades du futur adulte (Yajima et Wessel, 2011). Au stade *blastula*, l'embryon éclot de son enveloppe et peut nager dans la colonne d'eau grâce à la ciliature de l'ectoderme. La formation de l'archentéron (intestin primitif) se fait par invagination au niveau du pôle végétatif. Cette étape est spécifique du stade *gastrula* qui intervient à 30 heures après fécondation chez *P. lividus* et à 40 heures après fécondation chez *S. granularis*. L'archentéron de la *gastrula* s'allonge jusqu'à atteindre l'ectoderme latéral où se forme l'orifice buccal de la future larve, preuve de l'appartenance aux deutérostomiens. Le pluteus présente une symétrie bilatérale et se nourrit activement dans la colonne d'eau par filtration jusqu'à la formation d'un rudiment à partir de la poche cœlomique gauche (*hydrocoele*), qui donne naissance à un juvénile avec une symétrie pentaradiaire, lors de la métamorphose. Cette étape est simultanée avec sa sédimentation au fond de l'eau, où le futur adulte va mener toute sa vie, en broutant le biofilm et les algues benthiques. (Ebert et Southon, 2003).

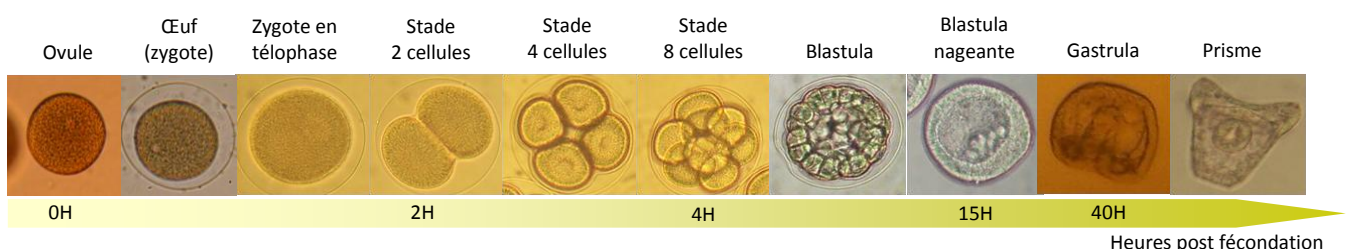


Figure 1.5. Différents stades de développement embryonnaire de l'oursin *P. lividus* (voir texte). L'échelle de temps relatif est non proportionnelle (photos : Vlad Costache).

#### 1.4. L'étude du cycle cellulaire et le développement précoce de l'oursin

Le cycle cellulaire mitotique est constitué de quatre phases : deux phases de *gap* (intervalle) G1 et G2 qui alternent avec la phase S (réplication d'ADN) et la phase M (division mitotique). Le cycle cellulaire méiotique constitue un type particulier de cycle cellulaire, qui intervient pendant l'ovogenèse (voir section 1.3).

Les ovules d'oursins ont donc terminé leur maturation méiotique et sont naturellement bloqués en phase G1 du cycle cellulaire. Les cellules embryonnaires d'oursin possèdent une synchronie naturelle des divisions cellulaires déclenchée par la fécondation, sans ajout de drogues, et constituent un modèle privilégié pour l'étude de la régulation du cycle cellulaire, par rapport à d'autres modèles biologiques comme la levure ou les cellules de mammifères en culture.

Jusqu'au stade gastrula les cycles mitotiques sont relativement rapides et ne présentent pas de phase G (Parisi *et al.*, 1978; Marc *et al.*, 2004).

Chez l'oursin *Arbacia punctulata*, il a été montré qu'une protéine est fortement synthétisée après fécondation. Elle a été appelée cycline, puisqu'elle apparaissait et était dégradée cycliquement (Evans *et al.*, 1983). Cette découverte a valu le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2001 à Tim Hunt. Les cyclines sont des acteurs clés qui régulent la division cellulaire chez les eucaryotes (Pines, 1999).

Précédant la découverte de la cycline, Yoshio Masui avait montré l'existence du facteur cytoplasmique MPF (*Maturation Promoting Factor*), lorsqu'un ovocyte de *Xenopus* bloqué en G2 a été activé et a repris le cycle cellulaire après avoir été microinjecté avec quelques nanolitres de cytoplasme provenant d'un ovocyte en métaphase (Masui et Markert, 1971). Le facteur MPF a été identifié plus tard quand il fut décrit comme étant le complexe formé par la cycline B et la CDK1 (*cyclin dependant kinase1*) également appelée *cdc2* (*cell division control 2*) (Lohka *et al.*, 1988; Doree *et al.*, 1989; Labbe *et al.*, 1989a; Labbe *et al.*, 1989b). Le complexe CDK1/cycline B est un régulateur universel du cycle cellulaire lors de la transition G2/M pour le cycle mitotique et méiotique également (Voronina et Wessel, 2003). Il est maintenu inactif jusqu'en G2/M et désactivé après la mitose. La régulation du complexe CDK1/cycline B peut se réaliser par la phosphorylation de CDK1 (Meijer *et al.*, 1991; Morgan, 1997), par la localisation cellulaire de la cycline B (Takizawa et Morgan, 2000), par dégradation de la cycline B (Hershko, 1999) ou par association à des protéines inhibitrices (Besson *et al.*, 2008).



L'ARNm de la cycline B chez l'oursin est présent dans les ovaires et dans les ovules, persistant dans les embryons jusqu'à la blastula. La synthèse de cycline B n'est pas indispensable à l'entrée en méiose mais elle est nécessaire à la progression méiotique (Voronina et al., 2003). Sa traduction augmente fortement après fécondation et est indispensable à la formation du complexe CDK1/cycline B (Meijer et al., 1989; Voronina et al., 2003). Chez *S. granularis*, l'activité du complexe est nulle dans les ovules, augmente légèrement après la fusion des *pronuclei* mâle et femelle à 30 minutes après fécondation. Par la suite, l'activité du complexe monte rapidement pour atteindre un pic à 60 minutes post fécondation (Genevière-Garrigues et al., 1995).

En dehors de la cycline B et de la CDK1, de multiples types de cyclines, ainsi que de CDKs ont été décrits dans plusieurs modèles et intervenant à différents moments au cours du cycle cellulaire. Le séquençage du génome a permis de savoir que toutes les CDKs humaines, à l'exception de CDK3, possèdent des homologues chez l'oursin. Le complexe CDK2/cycline E, responsable de l'entrée en phase S (synthèse d'ADN) dans les cellules humaines, est constitutivement actif dans l'embryon d'oursin (Sumerel et al., 2001). Le complexe CDK2/cycline E est requis pour la maturation du *pronucleus* mâle mais pas pour la réplication de l'ADN dans le premier cycle mitotique de l'embryon d'oursin (Schnackenberg et al., 2007). La synthèse de la cycline A n'est pas requise non plus pour la phase S et l'activité de la CDK2 est stable durant les premières divisions (Zhang et Ruderman, 1993; Moreau et al., 1998).

Au cours du cycle cellulaire, l'intervention des points de surveillance permet de vérifier l'intégralité de l'ADN, essentielle pour la poursuite du cycle. Lors de la première division mitotique de l'embryon d'oursin l'existence des points de surveillance a longtemps été controversée. Certains auteurs proposent que ces points de surveillance ne soient fonctionnels qu'à partir du stade blastula (Epel, 2003). Notre équipe a montré clairement que la machinerie permettant de bloquer la cellule lors de l'entrée en mitose durant le premier clivage est fonctionnelle dans l'embryon d'oursin *S granularis*. En effet, lorsque des embryons sont traités avec des pesticides (Marc et al., 2002) ou avec des agents génotoxiques (Le Bouffant et al., 2007; Le Bouffant et al., 2008b), le cycle de division cellulaire est arrêté en G2/M, impliquant une inhibition du mécanisme d'activation du complexe CDK1/cycline B. En réponse à l'endommagement de l'ADN, lorsque le cycle cellulaire est arrêté, les mécanismes de réparation de l'ADN ou d'apoptose se mettent en place (Le Bouffant et al., 2007; Le Bouffant et al., 2008a).

La reprise du cycle cellulaire chez l'oursin en conditions physiologiques (réponse à la fécondation) ou perturbées (issue des points de surveillance) est donc sous dépendance de la

synthèse de cycline B. La synthèse protéique constitue ainsi un paramètre cellulaire fondamental et sa liaison au développement embryonnaire de l'oursin sera présentée par la suite.

### 1.5. L'embryon d'oursin et la synthèse protéique

L'oursin constitue un excellent modèle pour étudier les régulations de la synthèse protéique qui se définit comme l'orchestration des acteurs impliqués dans le processus de traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines, puisque les premières étapes du développement embryonnaire précoce ne dépendent que de la synthèse protéique.

Les facteurs de traduction et les mécanismes moléculaires à travers lesquels la synthèse protéique est contrôlée, feront l'objet des sous-chapitres suivants. Dans cette partie, je détaillerai les mesures de synthèse protéique lors du développement embryonnaire de l'oursin.

L'activité de synthèse protéique est très faible dans les ovules et augmente rapidement après fécondation. Cette augmentation dépend uniquement de la traduction des ARNm maternels puisqu'elle est insensible à l'inhibition de la transcription par l'actinomycine D (Gross et Cousineau, 1963; Gross et Cousineau, 1964; Gross *et al.*, 1964a) ou à l'énucléation (Denny et Tyler, 1964).

La synthèse protéique augmente de 5 à 15 fois dans les 20 minutes après la fécondation (Epel, 1967), 40 fois dans les premières heures qui suivent (Nakano et Monroy, 1958) et jusqu'à 113 fois au stade gastrula (Regier et Kafatos, 1977).

L'augmentation de la synthèse protéique induite par la fécondation est nécessaire à la reprise du cycle cellulaire, puisque l'inhibition de la traduction par la puromycine (Hultin, 1961) ou l'émétine (Wagenaar, 1983) provoque l'arrêt du cycle cellulaire. La première division mitotique est complètement bloquée lorsque l'émétine est ajoutée dans les 40 premières minutes après fécondation (Arion et Meijer, 1989). En fait, le temps nécessaire à la première division mitotique est corrélé au niveau de synthèse protéique (Dubé, 1988). Une réduction de 35% de sa valeur normale permet toujours le déroulement du cycle cellulaire mais avec un retard important et les embryons traités avec des concentrations croissantes d'émétine présentent un retard de division mitotique de plus en plus important.

Si la traduction est cruciale pour le premier clivage et le développement précoce de l'embryon d'oursin, la transcription n'est indispensable qu'à partir du stade blastula, environ 15 heures après fécondation (Gross et Cousineau, 1963; Gross *et al.*, 1964b).

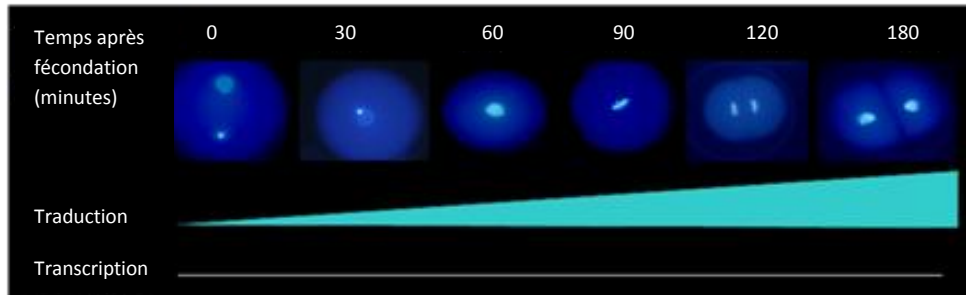


Figure 1.6. Le développement précoce de l'oursin et la synthèse protéique. La première division mitotique dépend de l'augmentation de la traduction et est indépendante de la transcription. Les zygotes d'oursin sont marqués avec Hoechst. On peut visualiser ainsi les étapes du premier cycle cellulaire de la fusion des pronoyaux male et femelle (30 min) jusqu'à la cytotodiérèse (180 min).

L'ovule d'oursin contient dans le cytoplasme une population importante d'ARNm maternels. Ceux-ci ne se trouvent pas engagés dans la traduction avant la fécondation, malgré la présence en excès de ribosomes (Hultin, 1961; Denny et Tyler, 1964). On admet généralement que la traduction des ARNm est proportionnelle à la quantité de polysomes exprimée par le pourcentage de ribosomes assemblés en polysomes. On parle de polysomes lorsque plusieurs ribosomes sont recrutés sur un messageur, constituant une unité fonctionnelle de traduction.

Chez l'oursin, moins de 1% des ribosomes de l'ovule non fécondé sont assemblés en polysomes (Humphreys, 1971). Deux heures après fécondation ce pourcentage atteint 20%. A 12 heures jusqu'à 60% des ribosomes sont dans les polysomes (Goustin et Wilt, 1981). La fécondation provoque donc la mobilisation des ARNm maternels dans les polysomes et ce processus contribue directement à l'augmentation de la synthèse protéique dans les zygotes.

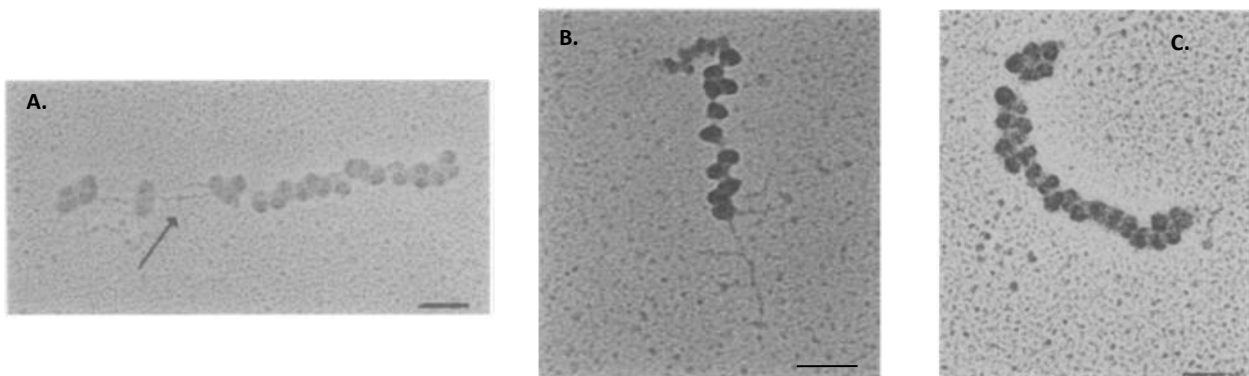
La quantité de messageurs nécessaire à l'augmentation des polysomes a été estimée à 3 - 6 pg représentant 0,4% de l'ARN total d'un ovule de l'oursin *Lytechinus pictus* (Humphreys, 1971). Chez *S. purpuratus*, la quantité totale d'ARN par embryon est de 2,8 ng dont 85% constitue l'ARN ribosomal.

L'incorporation des acides aminés lors de la synthèse peptidique chez l'oursin se réalise au niveau des polysomes (Malkin et al., 1964). Par conséquence, le faible taux de synthèse protéique dans les ovules serait causé par une absence des polysomes. C'est ce qu'il a été considéré dans un premier temps, en calculant le rapport polysomes/monosome. Des mesures de densité optique à 260 nm ont été réalisées après fractionnement des gradients de sucrose qui séparent les messageurs selon le nombre de ribosomes associés à l'ARN. Le rapport polysomes/monosomes varie entre 0,14 pour les ovules et 0,98 pour le stade prisme (gastrula tardive) dans le cas de *L. pictus*. Les rapports mesurés pour *P. lividus* montrent des valeurs plus élevées : entre 0,27 (non fécondés) et 1,29 (gastrula) (Monroy et Tyler, 1963). Ces rapports peuvent être interprétés comme une dominance des

monosomes par rapport aux polysomes lorsque la synthèse protéique est faible, comme au niveau des ovules et l'inverse lorsqu'il y a un fort recrutement polysomal et le rapport dépasse la valeur de 1.

Une approche différente (microscopie électronique et traitement statistique) a permis d'observer des polysomes présents dans les ovules de *L. pictus* (Martin et Miller, 1983). Les auteurs ont décrit la structure et la taille moyenne des polysomes des ovules. Ceux ci auraient une taille moyenne de 11,96 ribosomes et seraient plus longs que les polysomes des zygotes à une heure après fécondation (7,14 ribosomes). Trois types de polysomes ont été ainsi décrits (*Figure 1.7*) : (1) dans les ovules les polysomes présentent des gaps (zones sans ribosomes) et des structures secondaires observables pour 10% de la totalité de polysomes. Ce pourcentage diminue à 1% après fécondation. (2) Les polysomes « avec queue » (*tailed polysomes*) sont représentés par les nouveaux ARNm recrutés dans les polysomes après fécondation et où l'on observe le début de la lecture et l'avancement de nombreux ribosomes mais sur seulement un segment de l'ARN. (3) Une heure après fécondation, les polysomes sont plus « courts » (moins de ribosomes per polysome) mais le nombre total de polysomes est significativement plus important qu'avant la fécondation.

La proportion de ces différents types de polysomes varie au cours du développement précoce de l'oursin. Les auteurs attribuent les changements de synthèse protéique en réponse à la fécondation à ces variations dans la structure des polysomes (Martin et Miller, 1983).



*Figure 1.7.* Différents types de polysomes extraits des ovules et zygotes d'oursin et visualisés par microscopie électronique à transmission (selon Martin et Miller, 1983). **A.** Un polysome dominant dans les ovules non fécondés, qui présente des zones de *gap* (sans ribosomes) avec des structures secondaires de l'ARNm (flèche). **B.** Polysome avec « queue » (*tailed*) qui est caractéristique des œufs après fécondation et qui s'explique par l'avancement des ribosomes récemment recrutés par l'ARNm pour la lecture de la séquence nucléotidique. **C.** Un polysome d'un zygote d'une heure post fécondation. La barre d'échelle indique 0,1  $\mu$ m.

Malgré les nombreuses études et avancées des années '80, la question des mécanismes du recrutement des ARNm maternels après fécondation demeure comme une interrogation majeure.

En effet, l'augmentation de la synthèse protéique après fécondation aurait une cause multifactorielle. Certains niveaux de contrôle ciblent la disponibilité des messagers et d'autres des éléments régulateurs liés à la machinerie de traduction (Winkler et al., 1985). C'est la réunion des deux principaux modèles décrits : « l'hypothèse du messenger masqué » (*masked message hypothesis*) qui énonce le fait que les ARNm sont stockés dans les ovules comme des « particules ribonucléoprotéiques non traductibles » et que le mécanisme de régulation cible la disponibilité des mRNA (Raff, 1980) ; l'autre hypothèse soutient plutôt l'existence d'un élément limitant au niveau de la machinerie de traduction (Moon et al., 1982).

La limitation de l'activité de la machinerie de traduction a été démontrée également par la réintroduction de facteurs de traduction dans un lysat d'ovules d'oursin (Jagus *et al.*, 1992).

Cependant, les acteurs moléculaires clés responsables de la synthèse protéique dans les ovules et embryons d'oursin (dont les facteurs de traduction) ne sont décrits que depuis moins d'une décennie. Les résultats récents obtenus par notre laboratoire apportent un nouveau regard sur ces questions. Ces données impliquent des régulations fines par des acteurs clés de la machinerie traductionnelle, notamment par les facteurs d'initiation, les eIFs (*eukaryotic initiation factors*), qui seront présentés en détail dans les sous-chapitres suivants de l'introduction.

#### 1.6. Exemples d'ARNm recrutés sélectivement dans les polysomes

Les ovules d'oursin comptent une panoplie d'ARNm maternels dont certains seront recrutés sélectivement dans les polysomes pour être traduits en réponse à la fécondation et au cours du développement, lors des événements clés comme le premier clivage, la blastulation ou la gastrulation. Les ovules non fécondés sont caractérisés par une synthèse protéique globale très faible. Même s'il s'agit d'un niveau résiduel, elle est néanmoins existante. Plusieurs études ciblant des acteurs préférentiellement traduits dans les ovules et les embryons d'oursin évoquent parmi les messagers maternels identifiés : les tubulines (Alexandraki et Ruderman, 1985b; Alexandraki et Ruderman, 1985a), les histones (Baker et Infante, 1982; Maxson *et al.*, 1983), les actines (Crain *et al.*, 1981), la ribonucléotide réductase (Noronha *et al.*, 1972; Standart *et al.*, 1985) et les cyclines (Evans *et al.*, 1983).

Les tubulines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) synthétisées pendant l'ovogénèse constituent 1-5% de la quantité totale de protéines de l'ovule d'oursin (Raff *et al.*, 1971), et leur synthèse augmente considérablement après fécondation avec l'augmentation de la traduction des ARNm maternels. Ces

tubulines sont nécessaires pour la formation du premier fuseau mitotique ainsi que pour les cils de la future blastula nageante. Un remarquable polymorphisme des ARNm en fonction de la taille de la séquence peut être observé dans les ovules d'oursin : des classes de taille de 1,75 à 4,2 Kb pour la tubuline  $\alpha$  et entre 1,8 et 2,25 Kb pour la tubuline  $\beta$ . Les séquences de ces tubulines étant bien conservées, les ARNm diffèrent surtout au niveau des régions non codantes mais pas la queue poly(A), cela étant vérifié par traitement avec la RNase H. Cette diversité de messagers serait importante pour la traduction des tubulines avec une spécificité temporelle ou de localisation (Alexandraki et Ruderman, 1985a). Ainsi, dans les ovules il a été observé un recrutement polysomal uniquement des messagers codant pour la tubuline  $\alpha$ , et surtout pour les ARNm avec la séquence la plus longue, de 4,2 Kb. Au niveau des zygotes (30 minutes après fécondation) différents types de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  commencent déjà à être synthétisés. Les messagers plus longs de tubuline  $\beta$  sont en revanche plus rares que les autres types de tubuline (Alexandraki et Ruderman, 1985b). Quantitativement, le recrutement des messagers de tubuline atteint un pic au niveau de la blastula précoce, et reste ensuite relativement constant.

Un autre exemple de traduction sélective est celui du recrutement des ARNm codant pour les histones. Les messagers maternels des histones se localisent au niveau du pronucleus de l'ovule (Showman *et al.*, 1982) et y restent jusqu'à la première division après fécondation quand ils sont massivement recrutés dans les polysomes. En effet, il y a une augmentation importante du recrutement polysomal des ARNm des histones entre 2 et 12 heures après fécondation et ces ARNm sont préférentiellement traduits par rapport à d'autres ARNm. Parmi les quatre types d'histones, il y a également un recrutement différentiel puisque deux sont majoritairement présentes dans les polysomes (H2/H3) (53%) par rapport à H1 et H4 (37%) (Baker et Infante, 1982).

Pendant la phase M de la première division mitotique chez l'oursin, le complexe CDK1/cycline B présente un effet stimulateur pour le recrutement polysomal de certains ARNm. Trois clones (appelés 28, A8 et 6) ont été ainsi isolées. Les messagers 28 et A8 codent respectivement pour la cycline A et Sg-Nek (une homologue des « *NIMA related Kinases* »), molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Le Breton, 2004). Cette traduction sélective a été prouvée par comparaison entre le recrutement polysomal en conditions physiologiques et lors du traitement des zygotes à l'aminopurvalanol, un composé capable d'inhiber l'activité du complexe CDK1/cycline B et le cycle cellulaire dans les embryons précoces d'oursin (Le Breton *et al.*, 2003).

La synthèse de l'actine est régulée au cours du développement embryonnaire de l'oursin. Les deux formes de messagers codant pour l'actine présentes chez l'oursin (1,8 et 2.2 Kb) sont traduites

différemment au cours du développement. L'ARNm plus long est préférentiellement recruté dans les polysomes dans les temps précoces et c'est l'inverse pour le messenger de 1,8 Kb (Crain *et al.*, 1981).

La traduction sélective pendant les temps précoces du développement assure des fonctions enzymatiques indispensables à la progression vers les stades suivantes. Cela a été observé dans le cas de la ribonucléotide réductase (Standart *et al.*, 1985). Cette enzyme intervient dans le recyclage des ribonucléotides qui vont être utilisées dans la synthèse de l'ADN à partir des stades 4 - 8 blastomères, lorsque le stock de désoxyribonucléotides diminue, après les premiers 2 - 3 clivages.

La ribonucléotide réductase est composée de deux sous-unités, essentielles à son activité. L'activité enzymatique est absente dans les ovules et augmente après fécondation, atteignant un pic à 5 heures. Alors que la grande sous-unité est présente dans l'ovule non fécondé, la petite sous-unité n'apparaît qu'après fécondation. L'ARNm codant pour la petite sous-unité est massivement recruté pendant la phase S des premiers cycles cellulaires embryonnaires ce qui permet la formation du complexe et d'avoir ainsi l'activité enzymatique de la ribonucléotide réductase au bon moment (Standart *et al.*, 1985). En bloquant la traduction avec l'émétine (inhibiteur de la traduction) cette activité enzymatique n'est plus enregistrée, alors que le traitement avec l'actinomycine D (inhibiteur de transcription) ne l'affecte pas, indiquant ainsi la dépendance de la traduction pour activer ce système enzymatique (Noronha *et al.*, 1972).

Kelso-Winemiller et ses collaborateurs ont proposé le regroupement en deux classes distinctes, des ARNm recrutés massivement dans les polysomes, au cours du développement de l'oursin. Il y aurait ainsi une classe de messagers maternels traduits d'une manière active pendant les stades précoces caractérisés par le clivage rapide des cellules. La deuxième classe regroupe des transcrits maternels ou synthétisés précocement mais qui sont traduits intensément uniquement à partir du stade blastula, lorsque les cycles cellulaires deviennent plus longs et ne nécessitent plus la traduction active des ARNm appartenant à la première classe (Kelso-Winemiller *et al.*, 1993). D'une manière intéressante, dans les ovules ce sont plutôt les messagers de la première classe qui sont traduits. Après fécondation et une fois les clivages rapides finis, ces messagers sortent des polysomes et s'accumulent pour être stockés comme des particules ribonucléotidiques non traduites.

Parmi les messagers de la première classe, sont ceux qui codent pour la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase (Standart *et al.*, 1985), pour *ets* (*erythroblastosis*), un facteur proto-oncogène homologue de la protéine virale de E26 (Chen *et al.*, 1988), ainsi que les cyclines B et A (Evans *et al.*, 1983). La cycline B est un des ARNm massivement synthétisés pendant l'ovogénèse chez l'oursin : cela constitue 5% de la totalité des ARNm dans l'ovule. Sa concentration après fécondation

diminue significativement après environ 10 heures de développement (Kelso-Winemiller *et al.*, 1993).

La deuxième classe d'ARNm, caractérisés par un pattern de recrutement polysomal plus tardif par rapport à la fécondation, inclue ceux qui codent pour l'actine et la tubuline (présentées plus haut) mais aussi pour la métallothionéine (Nemer *et al.*, 1984), la calmoduline (Floyd *et al.*, 1986), des protéines liées au facteur de croissance épidermique (EGF) (Grimwade *et al.*, 1991) et le collagène (Angerer *et al.*, 1988).

Ces exemples de recrutement polysomal sélectif contribuent à la notion de *transductome* par laquelle on entend la totalité des protéines néo-synthétisées dans la cellule à un moment donné. La régulation du transductome est très importante pour le maintien de l'homéostasie dans un contexte physiologique comme celui du développement embryonnaire, mais aussi dans des situations cellulaires particulières, comme la présence d'un stress cellulaire majeur, ou le déclenchement de l'apoptose.

Le recrutement polysomal est finement régulé par des mécanismes qui s'exercent sur les ARNm et/ou sur la machinerie de traduction. Le chapitre suivant explore les voies de régulation de la synthèse protéique avec une emphase sur le facteur de traduction eIF2.



## I. 2.

---

### Régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes chez les eucaryotes

L'expression d'un gène constitue l'événement qui marque le passage du patrimoine génétique, l'ADN, via l'ARN sous forme des messages, jusqu'au phénotype, les protéines. Ce processus constitue le moteur moléculaire de toute entité vivante. Cette partie de l'introduction présente les principaux éléments de control post-transcriptionnel, puis met en avant les régulations de la traduction des ARN messagers en protéines, en ciblant différents acteurs clés, en particulier les facteurs d'initiation de la traduction.

#### 2.1. L'ARN messenger : de la transcription à la traduction

Les cellules eucaryotes se distinguent des procaryotes par la présence d'un noyau dans le cytoplasme, ce qui implique de multiples niveaux de régulation lorsqu'un gène s'exprime. Ces étapes de contrôle sont orchestrées par de nombreux acteurs moléculaires (facteurs de transcription, facteurs de traduction, polymérase, kinases..).

L'expression d'un gène commence dans le noyau avec la transcription de l'ADN en ARN. La transcription a longtemps été considérée comme seul niveau de régulation de l'expression des gènes. Depuis une quinzaine d'années, de plus en plus d'études mettent en évidence l'importance du control post-transcriptionnel (Moore, 2005; Halbeisen *et al.*, 2008; Keene, 2010). Au niveau post-transcriptionnel, l'ARN transcrit est d'abord mûré en ARN messenger (ARNm). La maturation

commence avec l'épissage, c'est-à-dire l'excision des *introns*, des régions nucléotidiques non codantes. Dans les séquences génomiques, les introns se situent d'une manière alternante avec les *exons*. Ces dernières régions nucléotidiques forment après l'épissage la séquence du messager mature. L'ARNm subit l'ajout d'une queue poly(A) à l'extrémité 3', et acquiert une coiffe m<sup>7</sup>GTP (7-methyl guanosine tri-phosphate) à l'extrémité 5'. L'ARNm maturé contient en 5' et 3' deux régions UTR (*UnTranslated Region*) qui ne seront pas traduites et qui bordent le cadre de lecture ou ORF (*Open Reading Frame*), la région codant pour la protéine.

Les ARN messagers sont associés en permanence à des protéines avec lesquelles ils forment des complexes mRNP (*messenger RiboNucleoProtein*). Ces protéines appelées de manière générale RBPs (*RNA Binding Proteins*) peuvent se lier à beaucoup d'ARNm sur des structures communes comme la coiffe et la queue poly(A) ou d'une façon plus spécifique par reconnaissance des séquences particulières majoritairement situées dans les régions non codantes 5' ou 3'. Les complexes mRNP permettent aux transcrits d'être exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines ou stockés.

De nombreux acteurs clés sont impliqués dans la régulation de chaque étape post-transcriptionnelle. Parmi eux, les RBPs ont un effet décisif pour l'export nucléaire des ARNm et pour leur devenir une fois dans le cytoplasme. L'export des messagers à travers l'enveloppe nucléaire est régulé par des RBPs adaptateur et récepteur d'export, comme Dbp5. Cette ARN hélicase conservée chez les eucaryotes a une activité limitante pour l'export nucléaire des mRNP au niveau des pores nucléaires (Cole et Scarcelli, 2006).

A l'extérieur du noyau, la trajectoire des messagers n'est pas tout à fait linéaire, comme le propose le schéma classique de l'expression des gènes : « l'ADN est transcrit en ARN qui est traduit en protéine... ». En effet, le devenir des mRNP est pluridirectionnel (*Figure 1.8*) : les messagers peuvent effectivement être recrutés directement dans la machinerie traductionnelle pour la synthèse protéique, cependant certains ARNm ne sont pas systématiquement traduits, mais stockés ou transportés via le cytosquelette pour une localisation spécifique subcellulaire (Moore, 2005; McKee et Silver, 2007).

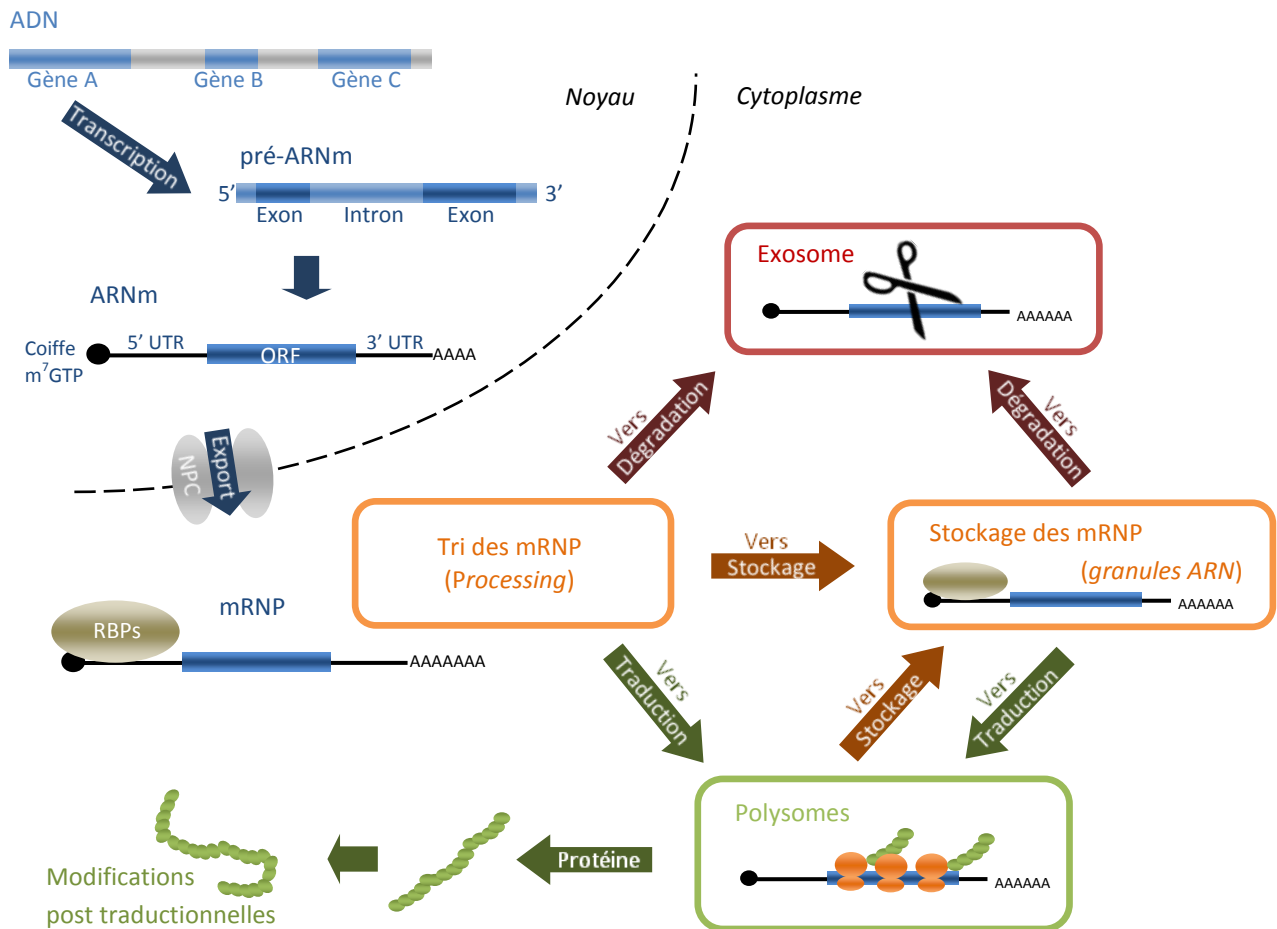


Figure 1.8. Expression d'un gène : la vie d'un ARNm comme mRNP. Les gènes sont transcrits dans le noyau pour donner un pré-ARNm composé d'exons (bleu foncé) et introns (bleu clair). L'ARN est mûré par épissage (élimination des introns) et par ajout d'une coiffe et d'une queue poly(A) avant d'être exporté dans le cytoplasme par les NPC (*Nuclear Pore Complex*). Le devenir de l'ARNm est guidé par les RBPs (*RNA binding proteins*) sous la forme d'un complexe mRNP (*messenger Ribonucleoprotein*). Dans le cytoplasme, les mRNP peuvent être recrutés dans les polysomes pour la synthèse protéique, dirigés vers les granules ARN (*Processing bodies*, *Stress granules*) pour être stockés, ou bien dégradés au niveau de l'exosome. Les protéines synthétisées peuvent subir des modifications post-traductionnelles dans le cytoplasme (Adapté du Idler et Yan, 2011).

La demi-vie des transcrits une fois exportés dans le cytoplasme peut aller de quelques minutes à plusieurs heures et est également un facteur régulateur de l'expression des gènes (Newbury et al., 2006). Les mécanismes engagés dans la stabilité des ARNm au niveau cytoplasmique impliquent des régulations en *cis* et en *trans* (Hollams et al., 2002). Les régulateurs en *cis* sont des éléments de contrôle de la séquence de l'ARNm, présents sous forme de différents motifs nucléotidiques au niveau des UTR. Les régulateurs en *cis* les plus communs sont les régions riches en (AU) au niveau des 3'UTR, appelées ARE pour *Adenylate Uridylate (AU) rich elements*, qui dictent l'efficacité de la traduction, la stabilité ou la dégradation de certains ARNm (Barreau et al., 2005) et

qui sont impliqués dans plusieurs contextes biologiques : de l'ovogénèse (chez le xenope) au cancer et inflammation chronique (Otero *et al.*, 2001; Khabar, 2010).

Les facteurs régulateurs en *trans* sont représentés par des protéines RBPs (Idler et Yan, 2011) comme par exemple PLAUF1 chez *P. lividus* qui est capable de lier et réguler la stabilité du messenger codant pour l'histone H3.3 (Pulcrano *et al.*, 2005). D'autres régulateurs en *trans* sont les micro ARN (miRNA), un type particulier d'ARN non codants (ncRNA), découverts dans les embryons de *C. elegans* et qui font l'objet d'un intérêt de plus en plus accru pour leur rôle en conditions pathologiques et en développement (Sayed et Abdellatif, 2011).

L'implication des miRNA dans différents *processus* cellulaires est très importante chez les eucaryotes parce qu'ils contrôlent environ un quart des ARNm cellulaires (Wehner et Sarnow, 2007), et constituent un moteur évolutif au sein des deutérostomes car ces acteurs seraient capables de moduler la structure des réseaux régulateurs de gènes chez ces taxons (Campo-Paysaa *et al.*, 2011). En effet, les miRNA sont de petits ARN d'une vingtaine de nucléotides et chaque miRNA reconnaît une séquence particulière appelée MRE (*miRNA Recognition Element*) qui est présente sur les ARNm cibles permettant de réguler spécifiquement leur expression. Pour agir sur leur cible, les miRNA recrutent directement la protéine Argonaute autour de laquelle se forme le complexe RISC (*RNA-induced silencing complexes*), capable d'interagir avec la coiffe m<sup>7</sup>GTP de l'ARNm. Dans cette configuration, la traduction de l'ARNm cible est ainsi bloquée (Kiriakidou *et al.*, 2007).

La polyadénylation cytoplasmique joue un rôle particulièrement important dans le métabolisme des ARNm (Edmonds, 2002). Selon l'espèce, la longueur initiale de la queue poly(A) peut varier: 90 nucléotides chez la levure et jusqu'à 250 nucléotides chez l'homme (Brawerman, 1981). En même temps, la longueur moyenne de la queue Poly(A) peut varier dans les cellules en réponse à différents stimuli. Cet effet peut influencer le devenir de l'ARNm puisqu'une longue queue poly(A) favorise le recrutement du messenger dans les polysomes. Ce mécanisme joue un rôle important dans le développement. Chez l'ovocyte de souris ou de xénope, certains ARNm dormants ayant de courtes queues poly(A) d'environ 20 nucléotides deviennent traductionnellement actifs lorsque leur queue poly(A) grandit à environ 80 - 150 nucléotides pendant la maturation méiotique par exemple (revue dans Richter, 1999). En effet, la polyadénylation cytoplasmique est un mécanisme hautement contrôlé. Lors de la maturation méiotique du xénope, ce mécanisme a été décrit dans le cas de certains ARNm dont la cycline B, Mos ou Aurora. La stimulation des ovocytes par la progestérone induit la polyadénylation de ces messagers, grâce à la polymérase PAP, recrutée sur la région 3'UTR indirectement, par un motif CPE (*cytoplasmic polyadenylation element*) (revue dans Oulhen et Cormier, 2006).

Cependant, tous les ARNm ne sont pas polyadénylés. Une exception bien connue est le recrutement des messagers codant pour les histones H2A, H2B, H3 et H4 au cours de la phase S du cycle cellulaire chez les métazoaires (Marzluff *et al.*, 2008). L'ARNm des histones possède en effet un motif particulier et conservé, de 26 nucléotides structurés en tige-boucle, au lieu de la queue poly(A) et cette structure facilite la traduction du messager. De plus, il a été récemment montré que 24% des ARNm purifiés à partir de cellules HeLa n'ont pas de queue poly(A) (Wu *et al.*, 2008). Ces transcrits doivent présenter donc d'autres structures situées à l'extrémité 3', qui permettraient l'initiation de la traduction des ARNm respectifs.

Le recrutement des ARNm dans les polysomes permet leur traduction en protéines. L'activité de la machinerie de traduction constitue un de plus importants niveaux de régulation post-transcriptionnelle.

La traduction d'un messager comporte une phase d'initiation, d'élongation et de terminaison. Le taux de recrutement des ARNm peut être diminué si un ribosome ne libère pas assez rapidement la région d'initiation. La distance minimum entre deux ribosomes sur l'ARNm est d'environ 7 codons. En général, la vitesse d'élongation est considérée constante pour la majorité des ARNm : 3-8 acides aminés incorporés per seconde et par ribosome, chez les eucaryotes en général (Lodish et Jacobsen, 1972; Palmiter, 1974). Cependant, la vitesse peut être moins élevée que ces moyennes pour l'élongation de certains ARNm, comme celui codant pour la sous-unité bêta du facteur de traduction eIF2 (Chiorini *et al.*, 1993). La vitesse d'élongation peut également devenir variable dû à des codons rares ou à des structures secondaires de l'ARN (Wolin et Walter, 1988). En conséquence, si la vitesse d'élongation descend trop, alors l'efficacité de traduction de l'ARNm respectif est affectée. En effet, entre les trois phases de la traduction, l'initiation est la plus limitante, puisqu'en mesurant le temps de transit d'un ribosome, il a été estimé qu'une initiation a lieu tous les 6,5 secondes, alors qu'un ribosome en élongation a besoin de seulement 2 secondes pour libérer le site d'initiation (Palmiter, 1975). Cette observation au niveau de l'ARNm codant pour l'ovalbumine dans les oviductes du poulet prouve clairement qu'un événement d'initiation a lieu plus lentement de ce que le système de traduction est capable et donc démontre que l'étape d'initiation serait la plus limitante pour la traduction.

Chez l'oursin, la traduction dans les embryons semble être plus lente par rapport aux valeurs citées plus haut. La vitesse moyenne d'élongation est de 1,8 acides aminés/seconde (Goustin et Wilt, 1981) ce qui permet d'avoir deux initiations par minute et par molécule d'ARNm. Alors pour traduire un messager d'oursin d'une taille moyenne, c'est-à-dire de 2,5 kb, il faut compter environ 8 minutes

jusqu'à ce que la séquence peptidique entière soit synthétisée (Ben-Tabou de-Leon et Davidson, 2009).

La traduction n'est pas limitée par l'abondance des ARNm disponibles. Dans les cellules de mammifères caractérisées par une activité de traduction élevée, certaines populations d'ARNm ne se trouvent que dans les polysomes, comme dans le cas de l'actine (Endo et Nadal-Ginard, 1987). Dans cette situation, la synthèse de l'actine semble être limitée par la synthèse de son ARNm. Cependant, la quantité d'ARNm cytoplasmiques en général est couramment en excès : 30% des ARNm des cellules en culture sont présents comme des mRNP libres (Geoghegan *et al.*, 1979). Donc la quantité totale d'ARNm ne semble pas être limitante pour le nombre d'initiations traductionnelles.

L'abondance des ribosomes non plus ne constitue pas un élément limitant pour la traduction. Dans beaucoup de tissus de mammifère ainsi que dans certaines cellules en culture prolifératives, les ribosomes non engagés dans la traduction constituent plus de 20% de la population ribosomale totale (Penman *et al.*, 1963). Les cellules pancréatiques des rats non nourris ainsi que les cellules en culture quiescentes sont caractérisées par un faible taux de synthèse protéique ; ces cellules ont moins de la moitié des ribosomes qui traduisent activement. Une augmentation rapide de la synthèse protéique peut être induite dans ces cellules en 20 minutes, avant que l'assemblage de nouveaux ribosomes puisse intervenir (Henshaw *et al.*, 1971; Duncan et McConkey, 1982; Meyuhas *et al.*, 1987). Le nombre de ribosomes ne limite donc pas la synthèse protéique, ce qui permet en effet à la cellule de pouvoir activer rapidement la traduction en cas de besoin, en réponse à des *stimuli* extérieurs.

Les techniques récentes d'analyse à haut débit des acides nucléiques et des protéines, ont permis de quantifier l'implication des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes dans le contrôle de l'abondance en protéines de la cellule et de mettre en avant l'importance de la traduction (revue dans Vogel, 2011). La régulation traductionnelle présente un rôle dominant pour la quantité des protéines dans la cellule, qui a été estimée à environ 60% par rapport à la régulation transcriptionnelle qui compte pour environ 40% seulement (*Figure 1.9.A*). D'une manière surprenante, la dégradation semble avoir un rôle très minoritaire dans le contrôle du protéome (Schwanhauser *et al.*, 2011).

En analysant à haut-débit plus de 5000 gènes, Schwanhauser *et al.* ont réalisé un modèle qui estime que les quantités d'ARNm et de protéines présentes dans les cellules de mammifères étudiées sont corrélées positivement. En revanche, le turn-over des ARNm et des protéines ne sont pas du tout corrélés. La médiane de la vitesse de synthèse d'un ARNm a été estimée à 2 messagers/heure,

avec des extrêmes qui vont jusqu'à 500 messagers/heure dans le cas de certains transcrits. La vitesse médiane de traduction a été estimée à 40 protéines par messager et par heure (Figure 1.9.B). La vitesse de traduction sature vers 180 protéines par messager et par heure selon le modèle établi dans les fibroblastes de souris.

Au niveau des embryons d'oursin, la vitesse maximale de traduction est proche du modèle proposé par Schwanhausser *et al.*, plus précisément 140 copies d'une protéine sont synthétisés par ARNm et par heure (Ben-Tabou de-Leon et Davidson, 2009).

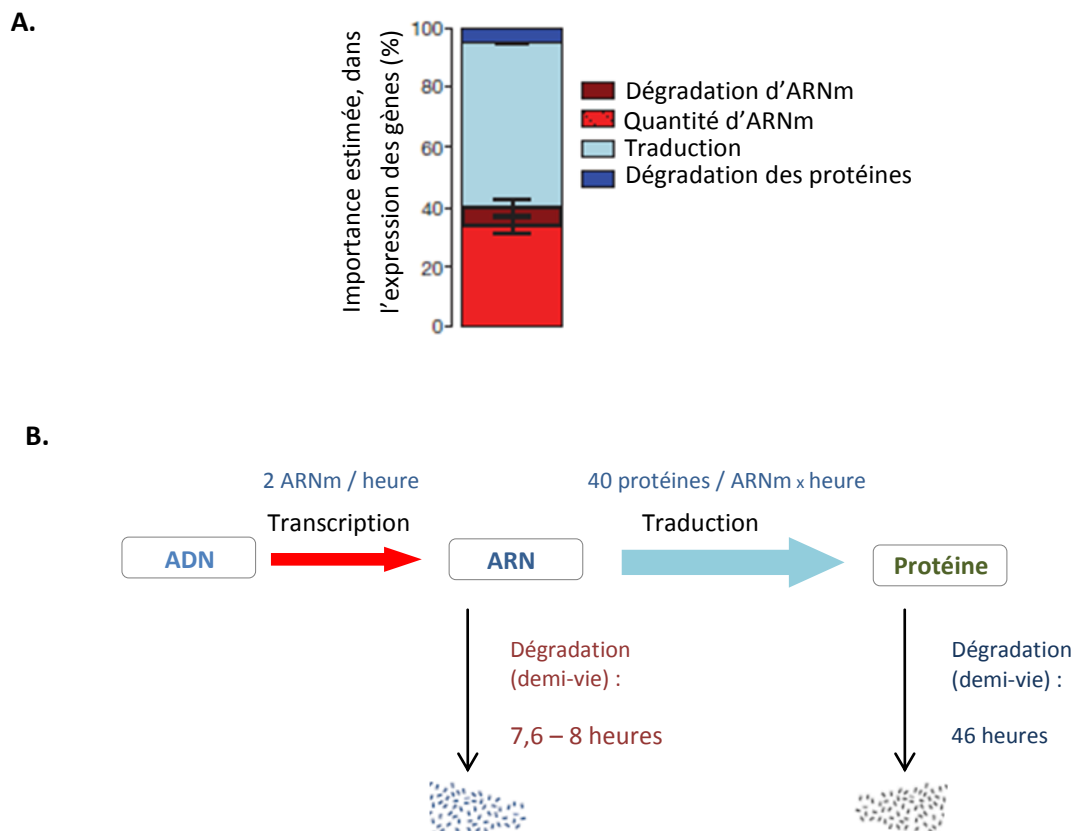


Figure 1.9. L'impact des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes sur l'abondance des protéines, dans des cellules MEF (fibroblastes de souris). **A.** La quantité de protéines dans la cellule est le mieux décrite par l'activité de la traduction, ensuite par la transcription et en moindre mesure par la stabilité des ARNm et des protéines. Les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance à 95%, estimé par *bootstrapping*. **B.** Les proportions des flèches indiquent l'importance des niveaux de régulation (la transcription et la traduction respectivement), dans la production des protéines dans la cellule (Schwanhausser *et al.*, 2011; Vogel, 2011).

Les gènes caractérisés par une faible stabilité de l'ARNm et de la protéine, codent d'une manière générale, pour des acteurs qui doivent assurer une réponse cellulaire ciblée à un *stimulus*. Dans cette catégorie font partie par exemple certains facteurs de traduction et de transcription, les acteurs avec des fonctions spécifiques dans le cycle cellulaire ou les enzymes qui modifient la chromatine.

Enfin, les protéines produites peuvent subir des modifications post-traductionnelles (*Figure 1.8*) qui vont changer leur conformation, leur localisation, leur stabilité ou leur activité. Ces modifications ont un rôle déterminant au niveau cellulaire et extracellulaire dans différents contextes physiologiques et pathologiques (Leeming et al., 2011) ou de stress environnemental (Tomanek, 2011). Il peut s'agir par exemple : de la protéolyse, glycosylation, isomerization, phosphorylation, sumoylation ou ubiquitination.

Les régulations traductionnelles impliquent en général des mécanismes de phosphorylation ou d'autres modifications post-traductionnelles au niveau des acteurs clés de la machinerie de traduction, dont les facteurs de traduction. Les éléments régulateurs de la machine traductionnelle ainsi que leur impact au niveau cellulaire, sont présentés dans la suite de l'introduction.

## 2.2. La régulation de la synthèse protéique

La traduction fait intervenir un engrenage moléculaire complexe composé de ribosomes, ARN de transfert (ARNt) et un nombre important d'acteurs protéiques, dont les facteurs de traduction et les aminoacyl ARNt synthétases. Les ribosomes constituent des plateformes pour l'assemblage correct des ARNm, ARNt, facteurs protéiques et ils coordonnent l'activité peptidyl-transférase qui catalyse l'élongation de la chaîne peptidique naissante. Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques composés d'une grande et d'une petite sous-unité et organisés avec un noyau d'ARN ribosomal auquel de multiples protéines ribosomales sont liées. Les séquences de ces ARN ainsi qu'une partie des protéines ribosomales sont conservés dans les domaines du vivant, ce qui dénote une origine commune et ancestrale de la machinerie de traduction (Marintchev et Wagner, 2005).

Pourquoi se concentre t-on sur la traduction ?

→ La régulation traductionnelle représente un moyen rapide pour contrôler la production des protéines, en utilisant les ARNm stockés dans le cytoplasme.

→ La régulation traductionnelle peut être positive ou négative et la majorité des régulations au niveau de la traduction s'effectuent par des modifications réversibles des facteurs de traduction, majoritairement par phosphorylation (Mathews et al., 2007). Ces mécanismes du control traductionnel sont peu couteux en énergie, ce qui est particulièrement important dans le cas des cellules déprivées en énergie, comme les cellules soumises à différents stress (choque thermique, stress oxydatif, protéines mal-repliées...) (Ron et Harding, 2007).



→ La traduction permet un control fin de l'expression des gènes. Dans le cas des nombreux gènes comme : TNF-alpha, VEGF, ornithine décarboxylase, c-myc, les changements dans le taux de transcription n'induisent pas des variations de la quantité des protéines, signe d'un control fin au niveau traductionnel (Mathews et al., 2007).

→ Dans certains modèles comme les réticulocytes, les ovules et ovocytes, la traduction est responsable du contrôle de l'expression des gènes puisque la transcription n'est peu ou pas du tout présente. C'est également le cas de l'embryon précoce de l'oursin où la régulation traductionnelle est responsable du bon déroulement des premiers clivages, étape critique pour le reste du développement.

→ Le contrôle traductionnel comprend une grande variété de mécanismes qui permet de viser spécifiquement la régulation de l'expression d'un ou de quelques gènes uniquement, mais aussi, qui peut affecter globalement plusieurs familles d'ARNm.

### 2.2.1. L'initiation de la synthèse protéique

La traduction des ARNm en protéines se déroule en trois grandes étapes. D'abord, l'initiation correspond au recrutement des sous unités ribosomales 40 S et 60 S sur l'ARNm. La sous unité 40 S, accompagnée de l'ARNt initiateur et de plusieurs facteurs d'initiation, forment un complexe de pré-initiation qui se fixe sur l'ARNm. Le complexe se déplace jusqu'au codon initiateur AUG où la sous unité 60 S vient rejoindre le 40 S pour constituer un ribosome. Ensuite, l'élongation permet de former une chaîne peptidique. Chaque codon de l'ARNm est reconnu par l'anticodon correspondant au niveau des ARNt. Ces derniers sont spécifiquement liés à un acide aminé qui s'ajoute à la chaîne peptidique en croissance. Enfin, la terminaison consiste en un relargage des acteurs pour un autre cycle de traduction. La séquence protéique complète est libérée du complexe ribosomal et les sous unités 40 S et 60 S se dissocient. Chaque étape est complexe et fait intervenir des facteurs spécifiques : eIFs (eukaryotic Initiation Factors), eEFs (eukaryotic Elongation Factors) et eRFs (eukaryotic Release Factors).

La partie suivante de l'introduction est focalisée sur les acteurs intervenant dans l'initiation de la traduction, qui est l'étape de la synthèse protéique principalement régulée.

L'initiation permet le recrutement et la spécification de la phase de lecture d'un ARNm. Deux mécanismes d'initiation de la traduction sont majoritairement étudiés : l'initiation dépendante de la coiffe et l'initiation dépendante des IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Des travaux récents

décrivent un nouveau mécanisme d'initiation hybride entre l'initiation cap-dépendante et l'initiation IRES-dépendante, mise en évidence pour la traduction de l'histone H4 (Martin et al., 2011).

#### L'initiation dépendante de la coiffe.

La majorité des ARNm eucaryotes sont traduits de façon dépendante de la coiffe (von der Haar et al., 2004). L'interaction de la coiffe  $m^7GTP$  avec les facteurs d'initiation eIFs permet de recruter la sous unité 40 S en 5'UTR des ARNm. L'initiation cap-dépendante fait intervenir au moins douze facteurs protéiques dont eIF2 ainsi que eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, des cibles clés pour contrôler l'initiation de la traduction (Sonenberg et Hinnebusch, 2009).

L'initiation se déroule en plusieurs étapes. Les sous-unités 40 S et 60 S du ribosome (80 S) doivent être dissociées. Cela est possible grâce au facteur eIF6 qui s'associe à la sous-unité 60 S et grâce aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 qui vont s'associer avec la petite sous-unité 40 S. eIF6 est relargué à la fin de l'initiation. eIF1 et eIF1A, une fois liés à la petite sous-unité 40 S, sont responsables de son changement de conformation et facilitent la liaison des autres facteurs. De plus, ces protéines maintiennent la conformation de la sous-unité ribosomale 40 S pour le scan de l'ARNm jusqu'au codon initiateur (Passmore et al., 2007).

Le facteur eIF2 se lie au Methionyl-ARNt (responsable de l'apport de la méthionine initiatrice pour la future protéine synthétisée) et au GTP (Guanosine TriPhosphate) pour former un complexe ternaire. Celui-ci s'associe à la sous-unité ribosomale 40 S pour former le complexe de préinitiation 43 S.

Le complexe 43 S va être recruté sur l'ARNm en 5', qui forme ainsi le complexe 48 S. Cette association est possible uniquement si certains facteurs d'initiation sont déjà liés à la coiffe  $m^7GTP$  de l'ARNm. eIF4E se lie directement à la coiffe et recrute ensuite eIF4G, une protéine d'échafaudage de haut poids moléculaire à laquelle vient s'associer eIF4A, une ARN hélicase, capable de dérouler les structures secondaires du messager. L'ensemble de ces trois facteurs forme le complexe d'initiation eIF4F qui a un rôle essentiel pour la mise en place du complexe 48 S puisqu'eIF4G recrute le complexe de préinitiation 43 S via l'interaction avec eIF3. PABP (*Poly(A) binding protein*) permet la circularisation du messager en s'associant à eIF4G et à la queue poly(A). Dans cette configuration, la petite sous-unité ribosomale 40 S est liée par l'intermédiaire des facteurs d'initiation à l'extrémité 5' de l'ARNm, ainsi qu'à l'extrémité 3', selon le modèle en boucle (« *closed-loop model* ») (Jacobson, 1996) (*Figure 1.10.A.*). Dans la phase suivante, la sous-unité 40 S va scanner la séquence de l'ARNm de 5' vers 3'. L'activité hélicase ATP-dépendante du facteur eIF4A permet le dépliement des

structures secondaires de l'ARNm, indispensable à l'avancement du complexe de préinitiation vers le cadre de lecture. Cette activité est stimulée par l'action d'eIF4B et eIF4H.

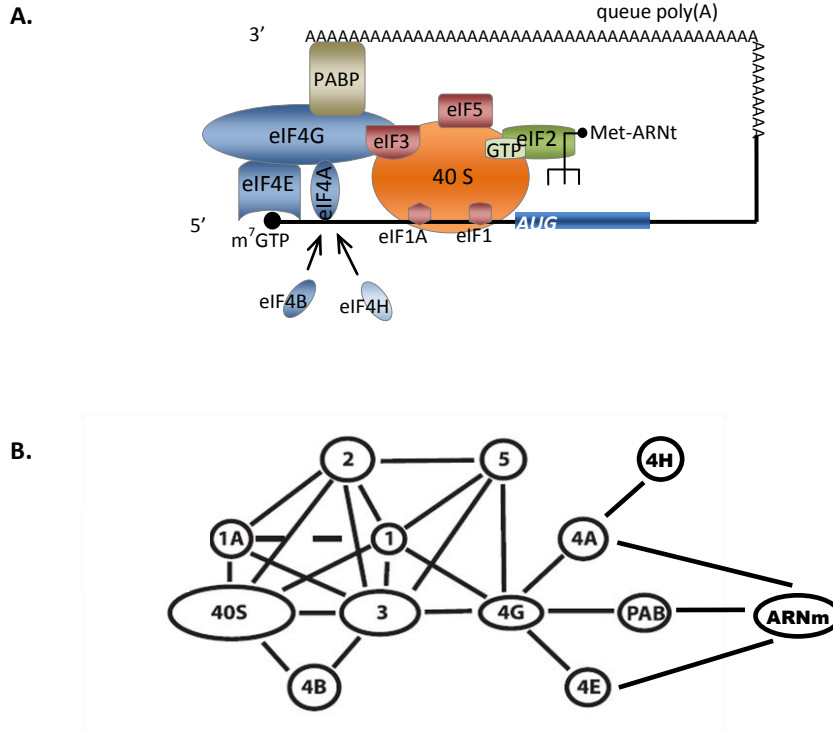
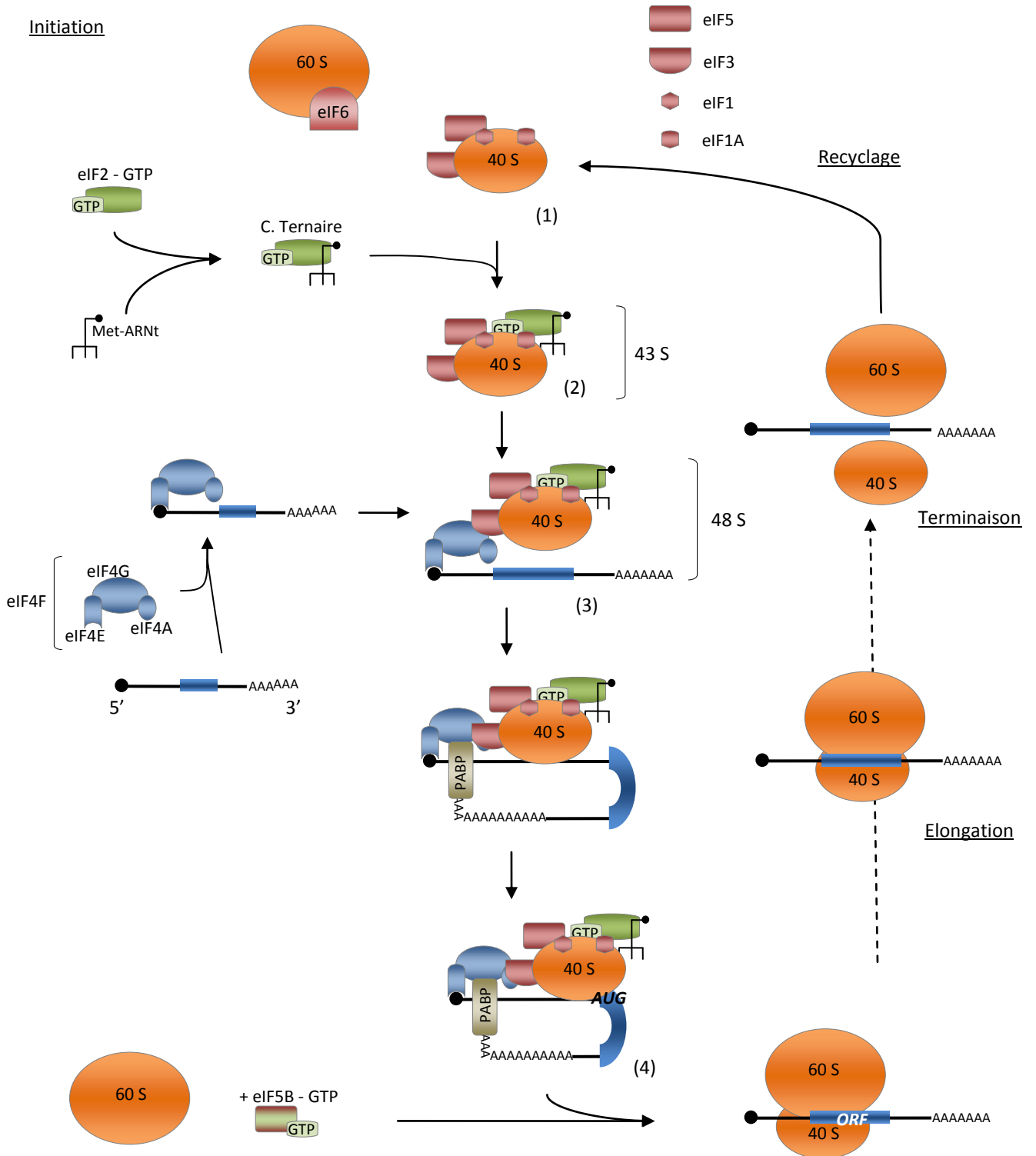


Figure 1.10. Le complexe d'initiation 48 S. **A.** Le modèle « en boucle » de l'ARNm (« closed-loop model ») (Svitkin et Sonenberg, 2004). Lors de l'initiation de la traduction cap-dépendante, la coiffe m<sup>7</sup>GTP en 5' du messager recrute eIF4E, qui va s'associer à eIF4G. Ce dernier facteur est une protéine plateforme qui recrute via eIF3 la petite sous-unité ribosomale 40 S à laquelle sont déjà liés eIF1A, eIF1, eIF5, eIF2-GTP avec le methionyl-ARNt. eIF4A est une ARN hélicase liée à eIF4G dont l'activité est stimulée par eIF4B et eIF4H. PABP vient circulariser l'ARNm lorsqu'il lie eIF4G et la queue poly(A) en 3'. Sous cette configuration, la sous-unité 40 S va scanner l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur AUG. **B.** Carte des interactions des facteurs d'initiation avec la petite sous-unité ribosomale 40 S et l'ARNm. Le trait pointillé entre eIF1 et eIF1A indique que cette interaction est indirecte. Les symboles indiquent les facteurs d'initiation sans « eIF » dans leur nom (Kapp et Lorsch, 2004b).

eIF1 participe à la reconnaissance du codon initiateur (AUG) et les facteurs d'initiation sont libérés à la suite de l'activité GTP-ase d'eIF5 qui stimule l'hydrolyse du GTP lié à eIF2. La dissociation des facteurs d'initiation ainsi que l'activité du facteur eIF5B permet ensuite la fixation de la sous-unité 60 S pour la constitution du ribosome et le début de l'élongation. Le facteur eIF2B est requis pour l'échange GDP/GTP afin de régénérer le complexe actif eIF2-GTP dans le cadre du complexe ternaire pour le cycle d'initiation suivant (Sonenberg et Hinnebusch, 2009; Jackson *et al.*, 2010) (Figure 1.11).



**Figure 1.11.** L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. (1) La sous unité ribosomale 40 S s'associe aux facteurs eIF1, eIF3, eIF5, eIF1A, ensuite (2) au complexe ternaire composé par eIF2, GTP et Methionyl-ARNt. (3) Le complexe 43 S ainsi formé, s'associe à l'ARNm par l'intermédiaire du complexe eIF4F (eIF4E/eIF4G/eIF4A) pour donner le complexe 48 S. PABP permet la circularisation de l'ARNm puisqu'elle lie eIF4G et la queue poly(A). Dans cette configuration, la sous-unité ribosomale 40 S va scanner l'ARNm dans le sens 5'-3'. (4) Lors de la reconnaissance du codon initiateur AUG, les facteurs d'initiation sont relargués et eIF5B lié au GTP intervient pour permettre à la sous unité 60 S de se fixer sur l'ARNm et former ainsi le ribosome. Celui-ci va commencer par la suite la traduction du cadre de lecture (ORF) lors de l'étape d'élongation, à la fin de laquelle, le ribosome est dissocié pendant l'étape de terminaison. Le recyclage de tous les acteurs impliqués dans la traduction permettra l'entrée dans un nouveau cycle de traduction. (modifié de Jackson et al. 2010)

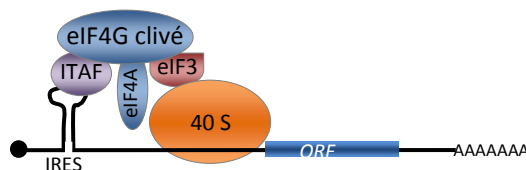
Tableau 1. Les facteurs d'initiation (Jackson et al., 2010) :

Nom	Nombre de sous-unités et leur masse moléculaire (kDa)	Fonction
<i>Principaux facteurs :</i>		
eIF2	3 (36,1 ; 38,4 et 51,1)	Forme le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARN <sub>t</sub> , qui lie la sous-unité ribosomale 40 S
eIF3	13 (800 total)	S'associe au 40 S, eIF1, eIF4G, eIF5 et stimule l'association du complexe ternaire au 40 S. Favorise la formation du 48 S et le scanning de l'ARNm. Préviens l'association des sous-unités ribosomales 40 S et 60 S
eIF1	1 (12,7)	Contribue au scanning de l'ARNm et à la reconnaissance du codon initiateur. Stimule l'interaction du complexe ternaire au 40 S et prévient l'hydrolyse prématurée d'eIF2-GTP par eIF5
eIF1A	1 (16,5)	Stimule la liaison du complexe ternaire avec le 40 S et contribue à la reconnaissance du codon initiateur ensemble à eIF1
eIF4E	1 (24,5)	S'associe à la coiffe m <sup>7</sup> GTP située à l'extrémité 5' de l'ARNm
eIF4A	1 (46,1)	ARN hélicase DEAD-box
eIF4G	1 (175,5)	Lie eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP et l'ARNm. Stimule l'activité d'eIF4A
eIF4F	3 (246,1 total)	C'est un complexe formé par eIF4G, eIF4E et eIF4A, qui lie la coiffe m <sup>7</sup> GTP et favorise l'initiation
eIF4B	1 (69,3)	C'est une RBP ( <i>RNA binding protein</i> ) qui stimule l'activité hélicase d'eIF4A
eIF4H	1 (27,4)	C'est une RBP homologue à une région d'eIF4B, et qui stimule l'activité hélicase d'eIF4A
eIF5	1 (49,2)	Stimule l'activité GTP-ase d'eIF2, induisant l'hydrolyse d'eIF2-GTP en réponse à la reconnaissance du codon initiateur
eIF5B	1 (138,9)	GTP-ase qui stimule l'association des sous-unités ribosomales
eIF2B	5 (33,7 ; 39,0 ; 50,2 ; 59,7 et 80,3)	Facteur d'échange GDP-GTP sur eIF2
<i>Facteurs auxiliaires :</i>		
eIF6	1 (26,6)	Lie la sous-unité 60 S et inhibe son association à 40 S
p97/DAP5/NAT1	1 (102,4)	Similaire à eIF4G sans la région N-ter, lie eIF4A et stimule la l'initiation des ARNm spécifiques
PABP	1 (70,7)	Interagit avec la queue poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm, avec eIF4G et eIF3. Stimule l'association d'eIF4F à la coiffe, et faciliterait la réinitiation des 40 S sur le 5' de l'ARNm, post-terminaison.

*eIF*-eukaryotic initiation factor ; *PABP*- poly(A) binding protein ; *p97/DAP5/NAT1* – *p97/death associated protein 5/Novel Apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC) Target no. 1*

### La traduction IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) dépendante

Certains ARNm sont traduits de façon indépendante de la coiffe en utilisant des structures secondaires de l'ARN présentes dans la région 5'UTR. Les ribosomes sont recrutés sur l'ARNm avec l'aide des protéines ITAFs (*IRES Trans Acting Factors*) et des facteurs d'initiation. Les premières séquences IRES ont été décrites dans la région 5'UTR des différents virus (Pelletier et Sonenberg, 1988). En effet, les virus sont capables d'inhiber la synthèse protéique cellulaire mais continuent à produire leurs propres protéines en détournant la machinerie de traduction à leur profit. Lors de l'infection par certains virus (comme le poliovirus), eIF4G est clivé par des protéases virales et perd son site d'interaction à eIF4E. eIF4G clivé ne peut alors plus participer à l'initiation dépendante de la coiffe mais il est toujours capable d'interagir avec eIF4A et eIF3 pour intervenir dans l'initiation dépendante des IRES.



*Figure 1.12.* Facteurs de traduction impliqués dans l'initiation dépendante de séquence IRES. Les séquences/structures IRES sont reconnues par des ITAFs entraînant le recrutement des protéines eIF4G, eIF3, eIF4A et la sous unité 40 S du ribosome qui pourra ainsi commencer à scanner l'ARNm dans le sens 5'-3' comme pour la traduction cap-dépendante.

Bien qu'ils soient coiffés, les ARNm cellulaires ont eux aussi des IRES : plus de 10% des ARNm seraient capables d'initier la traduction à partir d'un IRES (Stoneley et Willis, 2004). Au total, 70 ARNm cellulaires et 43 ARN viraux contenant un motif IRES, ont été recensés (Mokrejs *et al.*, 2010). La majorité des IRES cellulaires se trouvent au niveau des ARNm codant pour des protéines impliquées dans le contrôle de la croissance (par exemple : FGF2, VEGF-A, IGF-1), dans la réponse cellulaire aux situations de stress ou d'apoptose (par exemple : Apaf-1, XIAP, c-myc, DAP5), mais aussi en mitose (par exemple : ODC, PITSLRE, Cycline D1) (Stoneley et Willis, 2004; King *et al.*, 2010), lorsque la traduction cap-dépendante est inhibée.

### Le modèle hybride d'initiation

Des travaux récents ont décrit un nouveau mécanisme par lequel un domaine N-ter d'eIF4E, distinct de son site de liaison à la coiffe, est recruté par une structure secondaire interne de l'ARNm, appelée *4E-SE* (*eIF4E sensitive element*) (Martin *et al.*, 2011). Au stade initial, la coiffe de l'ARNm n'est pas accessible mais séquestrée dans une structure de l'ARNm repliée en jonction à 3 hélices. Lorsqu'eIF4E se fixe sur 4E-SE, le complexe eIF4F se forme et la structure en jonction triple est dépliée par eIF4A. La coiffe m<sup>7</sup>GTP une fois libérée, va s'associer à eIF4E. Dans cette configuration, la petite sous-unité ribosomale 40 S est recrutée et déposée directement sur l'AUG initiateur, dans la conformation du complexe 43 S. Cette opération appelée « *Tethering* » explique la dépendance vis-à-vis de la coiffe et l'assemblage direct du ribosome au niveau du codon AUG. Ce mécanisme simplifié assure un démarrage immédiat de la traduction sans l'étape d'examen séquentiel, coûteuse en temps et énergie.

Ce modèle d'initiation a été démontré pour l'histone H4, et ça pourrait expliquer la production massive en histone destinée à compacter l'ADN synthétisé juste avant la division cellulaire. Ce modèle montre également que la séparation classique de l'initiation de la traduction des ARNm cellulaires en deux catégories : « dépendante de la coiffe » et « IRES-dépendante » devrait être reconsidérée, puisque les IRES cellulaires pourraient être en effet incorporés dans les modèles d'initiation dépendants de la coiffe, sous la forme de différents systèmes hybrides (Gilbert, 2010).

### 2.3. Acteurs régulateurs clés au niveau de l'initiation

L'initiation de la traduction est principalement régulée à deux niveaux : sur le facteur eIF2 et au niveau du complexe eIF4F. eIF2 régule la traduction par la phosphorylation de sa sous-unité alpha sur un site conservé : la sérine 51, qui agit comme un interrupteur de la synthèse protéique. La formation d'eIF4F peut être inhibée par une petite protéine 4E-BP (*eIF4E-Binding Protein*) qui est capable de s'associer à eIF4E. 4E-BP possède le même site consensus qu'eIF4G pour s'associer à eIF4E. 4E-BP entre ainsi en compétition avec eIF4G et va inhiber la formation du complexe eIF4F (*Figure 1.13.A*).

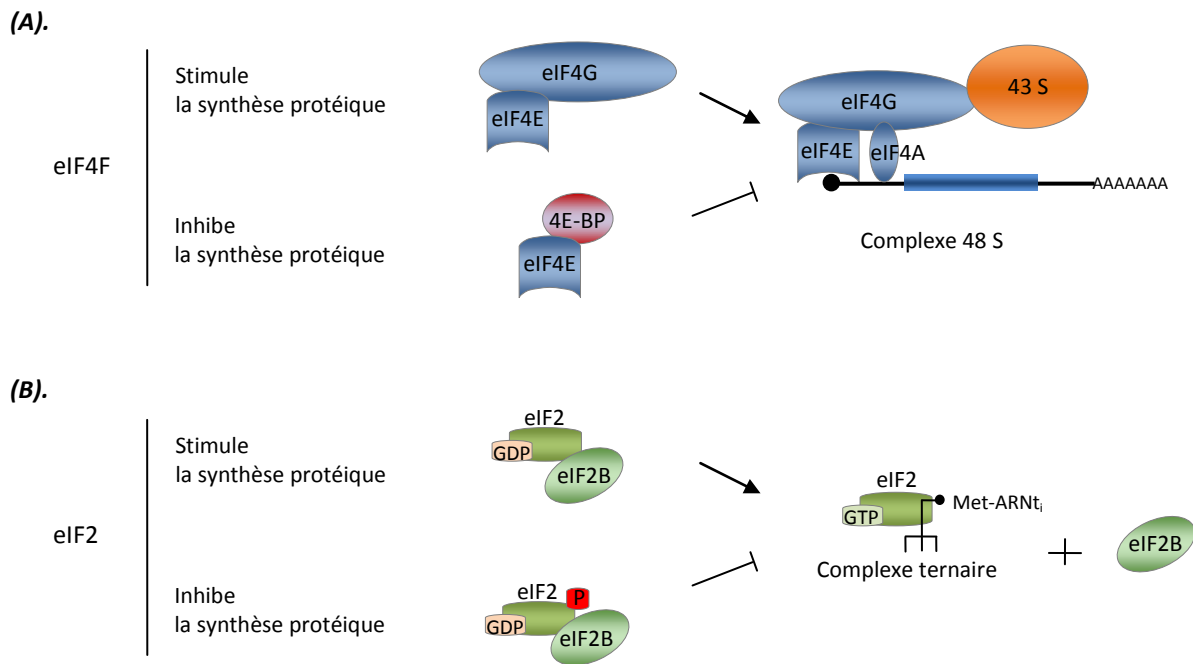


Figure 1.13. Régulateurs clés de l'initiation. **(A).** eIF4F : L'interaction entre eIF4E et eIF4G, nécessaire à la synthèse protéique, peut être inhibée par l'association de 4E-BP avec eIF4E. **(B).** eIF2 : quand eIF2 est phosphorylé, il inhibe la formation du complexe ternaire eIF2-GTP-Méthionyl ARNt<sub>i</sub> en séquestrant eIF2B qui est l'échangeur GDP-GTP d'eIF2.

### 2.3.1. Régulation du complexe eIF4F

Le recrutement du ribosome sur l'ARNm dépend du complexe eIF4F, qui est composé par trois protéines : eIF4E, eIF4G et eIF4A, et de son inhibiteur 4E-BP. Ces quatre protéines sont présentées dans le cadre des mécanismes régulateurs de la traduction dans lesquels ils sont impliqués.

#### Interaction eIF4E-eIF4G. Rôle du facteur 4E-BP

L'association du facteur eIF4E avec eIF4G stimule l'initiation de la traduction cap-dépendante. La disponibilité d'eIF4E est un élément limitant majeur pour cette interaction.

Plusieurs isoformes d'eIF4E ont été identifiées, regroupées en trois classes : eIF4E-1, eIF4E-2, eIF4E-3. En effet, le nombre d'isoformes varie selon l'espèce : une chez la levure *S. cerevisiae*, deux chez le poisson-zèbre, le xénope, trois chez les mammifères, les plantes, l'oursin, cinq chez le nématode *C. elegans*, et huit isoformes chez la drosophile (Hernandez et al., 2005; Morales et al., 2006). La classification en trois classes se base sur les acides aminés présents en position 43 et 56 d'après la numérotation humaine (Joshi et al., 2005). Le tryptophane en position 56 sur eIF4E-1 est l'un des acides aminés qui intervient dans l'interaction d'eIF4E avec la coiffe.



Les trois eIF4E sont capables de se lier à la coiffe m<sup>7</sup>GTP des ARNm même si eIF4E-3 semble avoir une spécificité moins forte que les deux autres puisqu'il se fixe aussi au GTP (Joshi et al., 2004). eIF4E-2 se lie à 4E-BP mais pas à eIF4G. En revanche, eIF4E-3 se lie à eIF4G mais pas à 4E-BP.

Ces particularités suggèrent que chaque isoforme joue un rôle spécifique en fonction de leur expression et de leurs partenaires. Cette hypothèse a été confirmée par les résultats obtenus chez la drosophile (Cho et al., 2005). Malgré les huit isoformes existant chez la drosophile, il a été montré qu'eIF4E-1 est l'acteur principal dans la traduction cap-dépendante (Hernandez et al., 2005). Chez *C. elegans* IFE-3 proche de l'eIF4E-1 de mammifère, est le seul indispensable à la survie des embryons (Keiper et al., 2000).

La disponibilité d'eIF4E pour eIF4G est principalement régulée par la petite protéine 4E-BP, capable d'inhiber l'initiation cap-dépendante. 4E-BP et eIF4G interagissent avec eIF4E au niveau d'un motif consensus conservé YxxxxLΦ (où Φ est un acide aminé aliphatique). Il est admis que l'interaction entre 4E-BP et eIF4E dépend de l'état de phosphorylation de 4E-BP : 4E-BP peut se fixer à eIF4E lorsqu'elle est hypophosphorylée. Son hyperphosphorylation est corrélée avec la dissociation du complexe. L'activité de la kinase FRAP/mTOR (*FKBP12 Rapamycin Associated Protein / mammalian Target Of Rapamycin*) est responsable de la phosphorylation de 4E-BP ; son inactivation par la rapamycine, inhibe la traduction cap-dépendante (Gingras et al., 2001). Cependant, d'autres mécanismes inconnus seraient capables d'intervenir dans l'association eIF4E - 4E-BP puisque de récents travaux montrent qu'un mutant phosphomimétique de 4E-BP est capable de s'associer à eIF4E et d'inhiber la traduction coiffe dépendante dans un lysat d'oursin (Oulhen *et al.*, 2009), et que la structure de 4E-BP serait impliquée dans l'association eIF4E - 4E-BP (Gosselin et al., 2011).

#### La localisation d'eIF4E

eIF4E est une protéine cytoplasmique mais une fraction est nucléaire (Iborra et al., 2001). La protéine eIF4E est localisée dans tout le nucléoplasme mais elle est enrichie dans certaines régions riches en facteurs d'épissage (*speckles*). Cette localisation dans les *speckles* n'est pas modifiée par un traitement des cellules au cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, et serait donc indépendante de son rôle de facteur de traduction (Dostie et al., 2000b). eIF4E se localise dans le noyau grâce à son transporteur : 4E-T (Dostie et al., 2000a). En effet, 4E-T interagit avec eIF4E par le motif consensus YxxxxLΦ (où Φ est un acide aminé aliphatique) et passe dans le noyau avec l'aide d'un complexe α/β importine. En plus de sa fonction de transporteur d'eIF4E dans le noyau, 4E-T joue un rôle important dans le cytoplasme en amenant eIF4E dans des les *P-bodies*, pour la dégradation d'ARNm (Andrei et al., 2005). En effet, 4E-T et eIF4E colocalisent avec les facteurs responsables du décoiffage des ARNm, comme Dcp1 (*eukaryotic mRNA decapping protein 1*). 4E-T est un inhibiteur de traduction puisqu'il

permet de réguler la dégradation des ARNm qui contiennent des séquences ARE (Adenine/uridine Rich Elements) en 3'UTR (Ferraiuolo et al., 2005).

#### La phosphorylation d'eIF4E

eIF4E est phosphorylé sur un seul site, *in vitro*, la Sérine 209. Ceci a été mis en évidence par des traitements avec des facteurs de croissance, des hormones, des mitogènes ou en stress cellulaires (Wang et al., 1998). La Ser 209 est le site majeur de phosphorylation *in vitro* par PKC (*Protein Kinase C*) et cette phosphorylation est inhibée si eIF4E est associé à 4E-BP1 (Wang et al., 1998). Cependant, la seule kinase mise en évidence pour phosphoryler eIF4E *in vivo* est Mnk1 (Pyronnet, 2000), une kinase qui peut aussi être activée par ERK et p38 (Fukunaga et Hunter, 1997). Mnk1 ne lie pas eIF4E mais se fixe sur la région C-terminale d'eIF4G pour se rapprocher d'eIF4E et permettre sa phosphorylation.

La stimulation de la traduction par des facteurs de croissance est corrélée à la phosphorylation d'eIF4E alors que l'inhibition de la synthèse protéique observée en choc thermique, en privation alimentaire, en arrêt du cycle cellulaire ou en infection virale est corrélée à la déphosphorylation d'eIF4E (Gingras et al., 1999). Cependant, le rôle de cette phosphorylation sur la synthèse protéique reste controversé (Scheper et al., 2002).

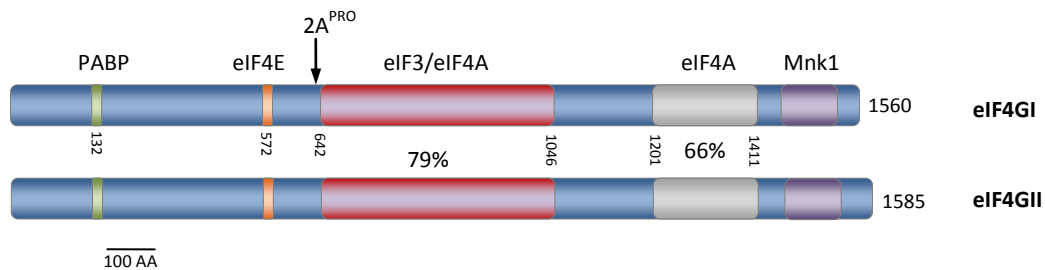
#### eIF4G et ses isoformes

eIF4G est une grande protéine d'échafaudage ou protéine plateforme, qui interagit avec de nombreux facteurs. Sa partie N-terminale interagit avec PABP (Imataka et al., 1998) et eIF4E (Mader *et al.*, 1995). La région centrale d'eIF4G s'associe à eIF3 et eIF4A (Lamphear *et al.*, 1995; Imataka et Sonenberg, 1997). Enfin, sa région C-terminale contient un deuxième site d'association à eIF4A et un site pour la kinase Mnk1 (*mitogen-activated protein kinase-interacting kinase 1*) (Fukunaga et Hunter, 1997).

Lorsqu'eIF4G est clivée par des protéases lors d'une infection virale par le poliovirus (*Figure 1.14*), la formation du complexe eIF4F est affectée. eIF4G clivé perd son site d'interaction à eIF4E et ne peut plus participer à l'initiation dépendante de la coiffe. Cependant, eIF4G est toujours capable d'interagir avec eIF4A et eIF3 pour intervenir dans l'initiation dépendante des IRES.

Deux isoformes ont été identifiées chez les mammifères : eIF4GI et eIF4GII. Les deux eIF4G interagissent avec eIF4E et sont décrits comme des homologues fonctionnels (Gradi et al., 1998; Imataka et al., 1998). Cependant, eIF4GI est principalement responsable du recrutement du ribosome par le complexe eIF4F (Coldwell et Morley, 2006) et eIF4GII serait impliquée dans la traduction sélective. Caron *et al.* (2004) ont observé la différenciation des mégacaryocytes en

plaquettes. En réponse à une cytokine, la thrombopoïétine, la phosphorylation d'eIF4E sur la Ser209 est stimulée, par la suite, eIF4GII est recrutée sur le complexe de la coiffe et des ARNm liés à la différenciation de plaquettes sont traduits spécifiquement.



*Figure 1.14.* Les deux isoformes d'eIF4G et leurs domaines d'interaction. Les deux protéines sont alignées par rapport au domaine central (en rouge) qui interagit avec eIF3/eIF4A. Le pourcentage indique la similitude avec eIF4GI. La flèche indique le site de clivage d'eIF4GI par la protéase 2A<sup>PRO</sup> du poliovirus. Pour les sites d'interaction à PABP et à eIF4E les numéros indiquent la position de l'acide aminé situé vers l'extrémité N-ter du site. (Gingras et al., 1999)

L'analyse récente d'eIF4Gs mutés sur l'un des sites d'interactions avec PABP, eIF3 ou eIF4A montre que ces protéines eIF4G sont toujours capables d'interagir avec eIF4E et de restaurer partiellement la synthèse protéique dans des cellules où l'expression d'eIF4G est altérée par siRNA (Hinton et al., 2007). Cela indique que chaque interaction, prise individuellement, n'est pas essentielle à la synthèse protéique mais participe à la régulation de l'initiation.

Par épissage alternatif, 5 isoformes d'eIF4GI en résultent. Les rôles des cinq isoformes protéiques d'eIF4GI sont encore inconnus mais l'analyse des séquences suggère l'existence de fonctions particulières à chacune puisque, par exemple, la forme la plus courte ne possède plus le domaine de liaison à PABP et pourrait intervenir dans la traduction d'ARNm non polyadénylés. De plus, il a été montré que les isoformes ne restaurent pas de manière identique la synthèse protéique dans des cellules épithéliales humaines Hela préalablement déplétées en eIF4GI. Bien que la forme la plus longue soit la moins exprimée dans ces cellules HeLa, elle est la plus efficace pour restaurer la synthèse protéique. La déplétion des isoformes eIF4GI par siRNA montre également qu'il existe des co-régulations entre les facteurs d'initiation car les quantités d'eIF4GII et d'eIF4E diminuent également et 4E BP1 se retrouve hypophosphorylée. De plus, dans ces conditions, le complexe eIF4E/eIF4GI diminue au profit de eIF4E/4E-BP1 (Coldwell et Morley, 2006).

#### L'interaction eIF4G- PABP. Le rôle des PAIP

L'interaction entre eIF4G et PABP permet la formation du modèle en boucle de l'ARNm, qui stabilise le messager et stimule sa traduction. A ce niveau, l'initiation de la traduction peut être contrôlée par deux protéines PAIP (*PABP interacting proteins*).

PAIP-1 présente des homologies avec la région centrale d'eIF4G, et possède un site d'interaction pour PABP au niveau C ter. Le rôle PAIP-1 consiste en effet de faciliter la circularisation de l'ARNm en liant les extrémités 5' et 3', pour favoriser la stabilité du messager et le recrutement du ribosome lors de l'initiation coiffe dépendante (Craig *et al.*, 1998).

PAIP-2 est une petite protéine qui inhibe la traduction, par deux mécanismes : en dissociant PABP de la queue poly(A) et en entrant en compétition avec eIF4G pour inhiber son interaction avec PABP (Karim *et al.*, 2006).

#### L'interaction eIF4G-eIF4A. Le rôle de Pdcd4

L'activité d'eIF4A n'est pas régulée par phosphorylation comme la majorité des facteurs de traduction. Son activité change en fonction de ses partenaires. Par exemple, l'activité hélicase d'eIF4A augmente après fixation sur eIF4G. Au contraire, l'association d'eIF4A avec Pdcd4 (*Programmed cell death protein 4*) affecte la traduction en inhibant son activité hélicase (Yang *et al.*, 2003). Pdcd4 est une protéine suppresseur de tumeurs dont l'expression est stimulée en apoptose et inhibée dans certaines tumeurs. La dégradation de cette protéine est nécessaire à la synthèse protéique. Pdcd4 possède deux domaines MA3 (MA3-c et MA3-m) qui agissent en synergie pour former un complexe très stable autour d'eIF4A. Ces deux domaines entrent en compétition avec eIF4G: le domaine eIF4G-MA3 ne peut plus interagir avec la région N-terminale d'eIF4A (Waters *et al.*, 2011).

En conditions normales de traduction, les deux domaines d'eIF4G (MA3 et m) interagissent avec les parties N-ter et C-ter d'eIF4A pour former un complexe actif pour la traduction. Pdcd4 grâce à ses domaines MA3, inhibe l'activité ARN hélicase d'eIF4A en empêchant le domaine MA3 d'eIF4G de fixer eIF4A en N-ter.

### 2.3.2. Le facteur eIF2

Le facteur eIF2 a été identifié il y a environ 35 ans (Walton et Gill, 1975) dans les réticulocytes de lapin et un des premiers mécanismes de régulation de la synthèse protéique décrits visait la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2 (Ernst *et al.*, 1978). eIF2-GDP produit lors de l'initiation ne peut pas fixer l'ARNt initiateur pour le prochain cycle de traduction, le GDP doit être échangé par du GTP grâce au facteur d'échange de nucléotide eIF2B. eIF2 $\alpha$  phosphorylé sur le site conservé de la sérine 51 inhibe la traduction en augmentant son affinité avec eIF2B (revue dans Dever *et al.*, 2007).

La protéine multimérique eIF2 forme un complexe ternaire avec le GTP et le Methionyl-ARNt<sub>i</sub>, stimulé par ABC 50 qui est une protéine *ATP-binding cassette* particulière, vu qu'elle ne possède pas de domaine transmembranaire spécifique des transporteurs ABC (Richard *et al.*, 1998). L'activité d'ABC 50 est limitante pour la traduction cap-dépendante et en partie pour la traduction cap-indépendante (Paytubi *et al.*, 2009).

Le complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> forme avec la petite sous-unité ribosomale 40 S le complexe de pré-initiation 43 S (*Figure 1.15*), recruté par l'ARNm lors de l'initiation de la traduction. eIF2 joue un rôle extrêmement important de régulation de la synthèse protéique puisqu'à travers le mécanisme de phosphorylation de sa sous-unité  $\alpha$ , il est capable de contrôler la traduction globale d'ARNm et de favoriser une synthèse spécifique d'ARN messagers.

Dans cette partie de l'introduction, une présentation détaillée du facteur eIF2 sera faite, en s'appuyant sur sa structure, ses interactions, sa régulation par des kinases, dans des contextes de stress, pathologies ou apoptose.

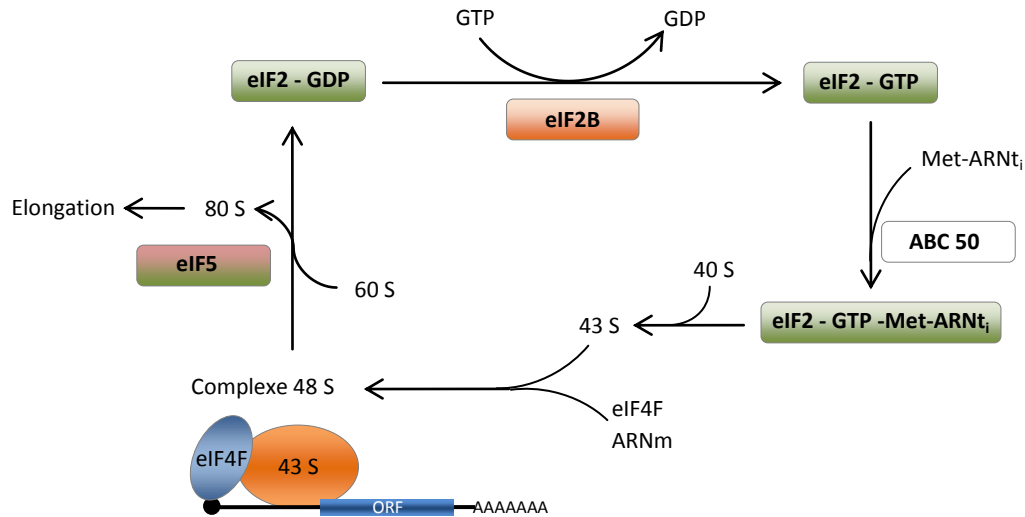


Figure 1.15. Les rôles d'eIF2 et eIF2B dans la traduction, présentés dans l'enchaînement de réactions qui mènent à la synthèse protéique. eIF2 est rechargé en GTP par eIF2B, ce qui permet le recrutement du méthionyl- ARNt<sub>i</sub> stimulé par ABC 50 (*ATP-binding cassette 50*) pour former le complexe ternaire eIF2- GTP- Met-ARNt<sub>i</sub>. L'étape suivante de l'initiation est la mise en place du complexe d'initiation 48 S avec l'ARNm et eIF4F (décrite précédemment). eIF5 intervient à la fin de l'initiation pour relarguer les eIFs. La formation du ribosome 80 S marque le début de l'élongation de la traduction. L'échange du GDP en GTP lié au eIF2 est nécessaire pour un nouveau cycle de traduction (adapté de Proud, 2005).

### 2.3.2.1. La structure d'eIF2

Le facteur eIF2 est un hétérotrimère composé par trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . eIF2 est une des protéines les plus conservées au cours de l'évolution, allant des procaryotes (*Archaea*) jusqu'aux mammifères. Par exemple, les séquences d'eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$  et eIF2 $\gamma$  humaines présentent 58%, 47% et 72% d'identité respectivement avec les sous-unités correspondantes chez la levure *S. cerevisiae* (Kimball, 1999). Les modèles qui ont historiquement contribué d'une manière significative à la compréhension de la structure et du fonctionnement des sous-unités d'eIF2 sont les archaebactéries, les levures et les cellules de mammifères. En conséquence, les données présentées ci-après proviennent majoritairement des études effectuées sur ces modèles.

eIF2 $\gamma$  présente un site de liaison au GTP et un au Méthionyl-ARNt initiateur (Met-ARNt<sub>i</sub>). Le Met-ARNt<sub>i</sub> se différencie du Méthionyl-ARNt d'élongation (Met-ARNt<sub>m</sub>), puisqu'il s'associe spécifiquement à eIF2 et au site P du ribosome grâce à un motif de trois paires consécutives de G-C au niveau de la base de la tige, alors le Met-ARNt<sub>m</sub> interagit avec le facteur d'élongation eEF1A et il ne peut entrer que sur le site A du ribosome (Varshney *et al.*, 1993). Cette spécificité d'interaction et

le fait que les quantités cellulaires des deux Méthionyl-ARNt soient régulés séparément par des mécanismes liés au contrôle transcriptionnel des gènes codant pour l'ARNt<sub>m</sub> et l'ARNt<sub>i</sub> respectivement, permet de maintenir la formation du complexe ternaire comme une étape limitante pour l'initiation (Kanduc, 1997).

La structure de la sous-unité  $\gamma$  d'eIF2 présente trois domaines (Figure 1.16). Le domaine G qui lui confère son activité GTPase est situé en N-terminale où il y a les deux *Switch* du site actif et également un motif en doigt de zinc ; ce motif est intéressant puisqu'il ne se retrouve dans la structure d'aucune autre GTPase (Roll-Mecak et al., 2004). Il semble que cette structure serait impliquée dans l'interaction avec la sous-unité  $\beta$  d'eIF2 (Sokabe et al., 2006). Le domaine II situé en C-terminale, interagit avec la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2. L'extrémité 3' du Met-ARNt<sub>i</sub> est recrutée par eIF2-GTP au niveau d'une fente d'eIF2 $\gamma$  formée en partie par la région *Switch 1* (Roll-Mecak et al., 2004). Les changements structurels au niveau des *Switch 1* et *2*, liés à l'hydrolyse du GTP et au relargage du phosphate inorganique, modifient l'affinité d'eIF2 $\gamma$  pour le Met-ARNt<sub>i</sub> (Yatime et al., 2006). Ceci expliquerait le mécanisme par lequel la méthionine initiateuse se dissocie du complexe suite à l'hydrolyse du GTP en GDP après la reconnaissance du codon AUG.

Le rôle d'eIF2 $\beta$  n'est pas entièrement compris. Cette sous-unité est composée de trois régions. La région N-ter contient un enchaînement caractéristique de lysines, appelé *K-boxes*, qui est impliqué dans l'interaction d'eIF2 avec eIF2B et eIF5, son échangeur de GDP-GTP (appelé GEF pour *guanine exchange factor*) et son activateur de GTPase (appelé GAP pour *GTPase-Activating Protein*) respectivement. Il faut noter qu'eIF2 interagit avec eIF2B et eIF5 via sa sous-unité  $\gamma$  également (Alone et Dever, 2006). La région centrale d'eIF2 $\beta$  se lie à eIF2 $\gamma$  et la région C-ter contient un motif en doigt de zinc important dans l'interaction de la sous-unité  $\beta$  avec l'ARNt. Cette région est impliquée aussi dans la sélection du codon Start de l'ARNm (Donahue et al., 1988). eIF2 peut lier l'ARNm via la sous-unité  $\beta$  et cette activité est déterminante pour l'efficacité de la traduction (Hinnebusch, 2000) par le motif en doigt de zinc et les trois *K-boxes*.

eIF2 $\beta$  et eIF2 $\gamma$  forment ainsi un « cœur fonctionnel » d'eIF2, au regard de ses interactions avec le ribosome, le codon Start, l'ARNt, GTP et avec d'autres facteurs de traduction.

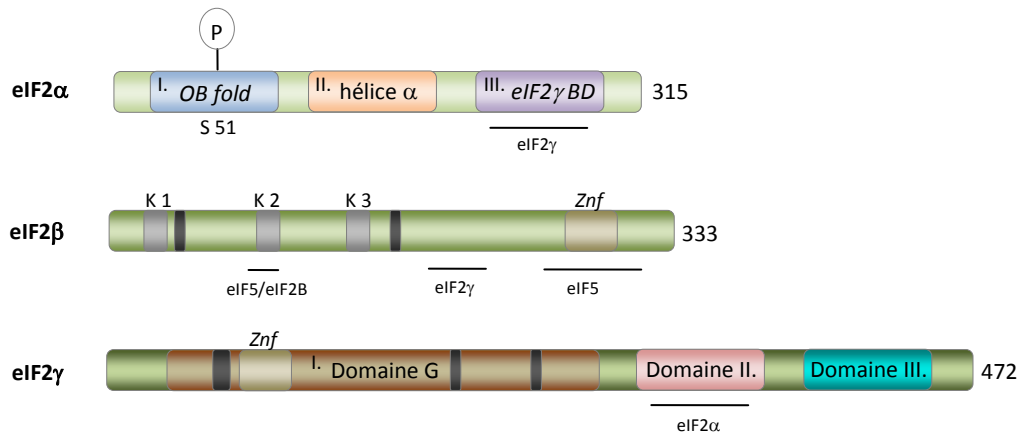


Figure 1.16. Les sous-unités d'eIF2 sont représentées sous forme de rectangles verts symbolisant les chaînes polypeptidiques linéaires. La taille (nombre d'acides aminés) est marquée à droite de chaque rectangle. Les domaines et éléments caractéristiques sont également marqués : les trois domaines spécifiques et le site régulateur de phosphorylation de la serine 51 sur eIF2 $\alpha$  ; les *K*-boxes de polylysine, le motif *Znf* (motif en doigt de zinc) ainsi que les segments d'interaction à eIF2B et eIF5, pour eIF2 $\beta$  ; le domaine G d'eIF2 $\gamma$ , ainsi que ses domaines II et III (voir texte). Les rectangles noirs d'eIF2 $\gamma$  et  $\beta$  symbolisent les sections de liaison au GDP/GTP. Les traits horizontaux marquent des sites de liaison aux acteurs indiqués. (Adapté de Hinnebusch *et al.*, 2007).

eIF2 $\alpha$  présente une activité critique pour la régulation d'eIF2.

Les structures 3D des eIF2 $\alpha$  de l'Archaea à l'humain révèlent trois domaines distincts : le domaine I appelé *OB fold domain* (pour *Oligonucleotide Binding domain*) situé dans la partie N-ter et structuré en tonneau  $\beta$  (Nonato *et al.*, 2002) est capable de lier de manière non spécifique l'ARN et interagit avec le domaine central (II) d'eIF2 $\alpha$ , structuré en hélice ; le domaine III présent dans la partie C-ter interagit avec eIF2 $\gamma$ . Le domaine III favorise la liaison au Met-ARNt, en la stabilisant d'un facteur 50 (Yatime *et al.*, 2006). Le domaine I contient le site régulateur de phosphorylation de la Serine 51 qui joue un rôle essentiel dans l'affinité d'eIF2 pour son facteur GEF eIF2B. eIF2 $\alpha$  forme ainsi un « module régulateur » avec le facteur eIF2B.

La région C-ter d'eIF2 $\alpha$  est caractérisée par une longue queue majoritairement non structurée et une hélice  $\alpha$ .

### 2.3.2.2. Le facteur eIF2B

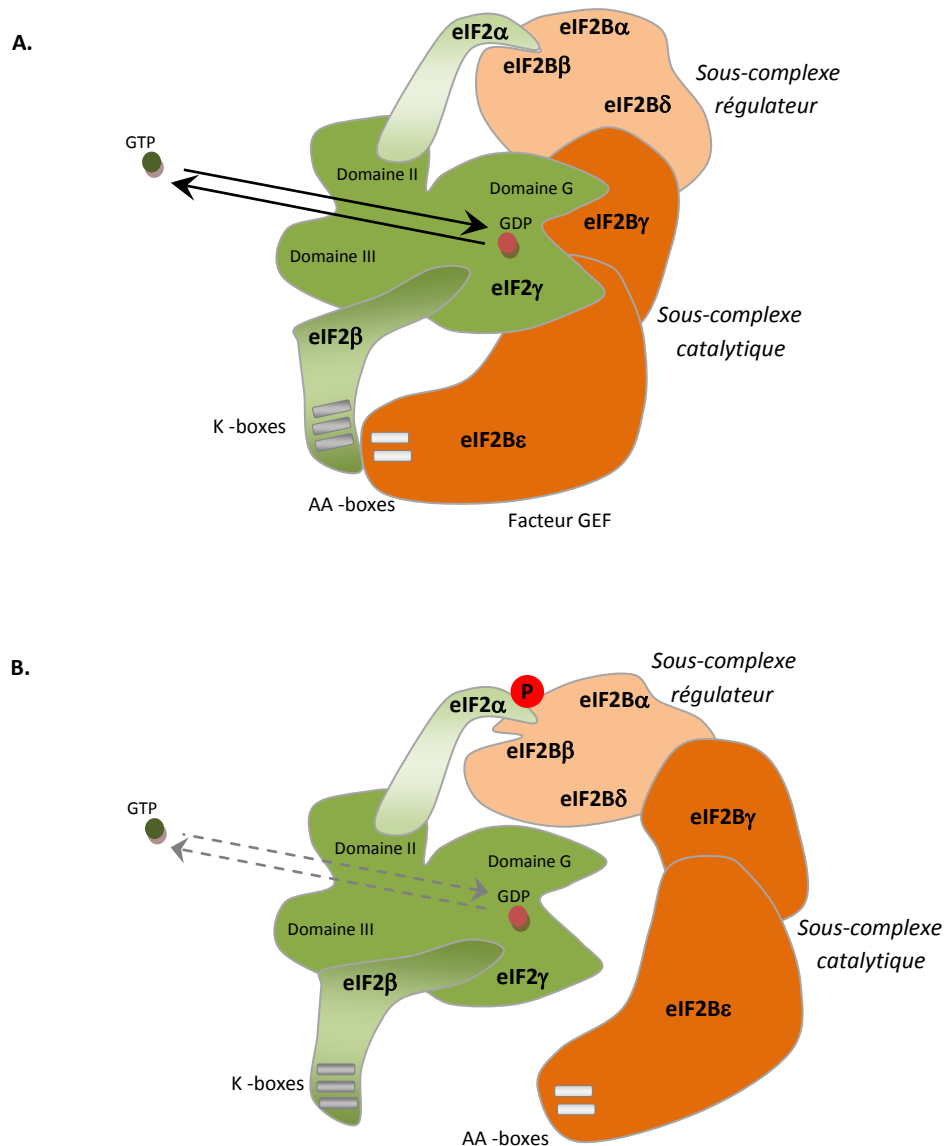
Après chaque cycle d'initiation, eIF2 est relargué comme un complexe inactif lié au GDP. La dissociation du GDP d'eIF2 est une réaction très lente et pour qu'eIF2 puisse participer dans multiples cycles de traduction, il a besoin d'un facteur d'échange du GDP en GTP (GEF). Cette fonction est remplie par eIF2B, un complexe protéique formé par cinq sous-unités différentes :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,



$\delta$  qui sont structurées dans un sous-complexe régulateur ;  $\gamma$  et  $\varepsilon$  qui forment le sous-complexe catalytique (*Figure 1.17*). eIF2B accélère le remplacement du GDP en GTP d'environ 10 fois (Williams et al., 2001).

eIF2B a un rôle clé dans la régulation de l'initiation puisqu'après le remplacement du GDP, eIF2 se trouve dans une forme avec une affinité plus forte pour le Met-ARNT<sub>i</sub> (Kapp et Lorsch, 2004a) nécessaire à la formation du complexe ternaire. L'augmentation d'affinité à la suite de l'association au GTP, s'exerce entre eIF2 et la méthionine du Met-ARNT<sub>i</sub>. Ce mécanisme permet de prévenir l'entrée dans l'initiation des ARNt déchargés (Kapp et Lorsch, 2004a).

Toutes les sous-unités d'eIF2B sauf eIF2B $\alpha$  sont essentielles pour l'activité d'eIF2B. Cependant, eIF2B $\varepsilon$  seule, présente une activité GEF significative par un domaine qui correspond au ¼ de la protéine, équivalent à 195 acides aminés (Gomez et al., 2002). La partie C-terminale de ce segment contient une région appelée *AA-boxes* pour *aromatic and acidic boxes 1 and 2* importants pour la liaison à eIF2. La délétion de cette région entraîne la perte de la liaison à eIF2 ainsi que la perte de l'activité GEF d'eIF2B $\varepsilon$  et la réduction de cette activité au niveau du complexe eIF2B entier (Gomez et al., 2002). L'élimination des AA-boxes d'eIF2B $\varepsilon$  n'inhibe pas complètement l'association d'eIF2B à eIF2, signifie qu'il y a des sites de contact additionnels. En effet, les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  forment un sous-complexe qui est capable de lier eIF2. L'association se réalise entre eIF2 $\alpha$  et eIF2B $\beta$  et le modèle d'interaction a été montré chez la levure (Dev et al., 2010) mais aussi chez les *Archaea* (Dev et al., 2009). Deux types de liaison seraient mises en place entre eIF2 $\alpha$  et eIF2B $\beta$ . L'une qui intervient dans l'activité GEF d'eIF2B et l'autre qui apparaît lorsqu'eIF2 $\alpha$  est phosphorylé sur la Serine 51 (*Figure 1.17*). Cette dernière situation à travers laquelle le facteur eIF2B est séquestré par eIF2 et par conséquent, le chargement en GTP et la traduction sont bloqués, représente un mécanisme de contrôle de la synthèse protéique très important dans différents contextes de stress ou pathologiques et sera traitée plus en détails dans la suite de l'introduction.



**Figure 1.17.** Interaction d'eIF2 avec eIF2B : **A.** la liaison d'eIF2 $\alpha$  avec eIF2B $\beta$  permet l'activité GEF d'eIF2B lorsque son sous-complexe catalytique s'associe à eIF2. **B.** eIF2 $\alpha$  est phosphorylé (rond rouge « P ») et cela implique une interaction entre eIF2 $\alpha$ P et eIF2B $\beta$  ne permettant pas à eIF2B $\epsilon$  de catalyser l'échange GDP-GTP, avec des effets très importants sur la synthèse protéique (Adapté de Dev *et al.*, 2010).

eIF2B peut être régulée par les hormones et les nutriments (Proud, 2005). eIF2B $\epsilon$  contient plusieurs sites de phosphorylation, dont sept qui ont été identifiés dans les cellules de mammifères (HEK293) dans plusieurs études (Wang *et al.*, 2001; Wang et Proud, 2008). Deux sites situés à l'extrémité C-terminale sont nécessaires pour la liaison d'eIF2B à son substrat eIF2 et qui sont conservés dans toutes les séquences connues d'eIF2B $\epsilon$ . Deux autres sites sont présents dans la proximité du site catalytique vers l'extrémité N-ter. Ces sites sont présents chez la drosophile mais pas la levure. La phosphorylation du site le plus N-terminal des deux, par la GSK3 (*glycogen synthase*

*kinase 3*) diminue l'activité d'eIF2B. Comme l'insuline et certains facteurs de croissance peuvent inactiver la GSK3, cela signifie qu'ils devraient être capables d'affecter l'initiation de la traduction. Cependant, le traitement des cellules avec des inhibiteurs spécifiques de GSK3 induit la déphosphorylation du site mais n'active pas eIF2B, ce qui indique que l'implication des mécanismes régulateurs additionnels serait nécessaire (Wang et al., 2002).

D'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation d'eIF2B visent IGF1 (*Insulin-like growth factor 1*) dans les cellules neuronales (Quevedo et al., 2000) et NGF ou EGF dans les cellules PC12 (Kleijn et Proud, 2000), qui passent par la voie de la MAP kinase (Erk). En effet, IGF1 stimule l'interaction de la MAPK avec la PP1 qui active eIF2B par déphosphorylation (Quevedo et al., 2003).

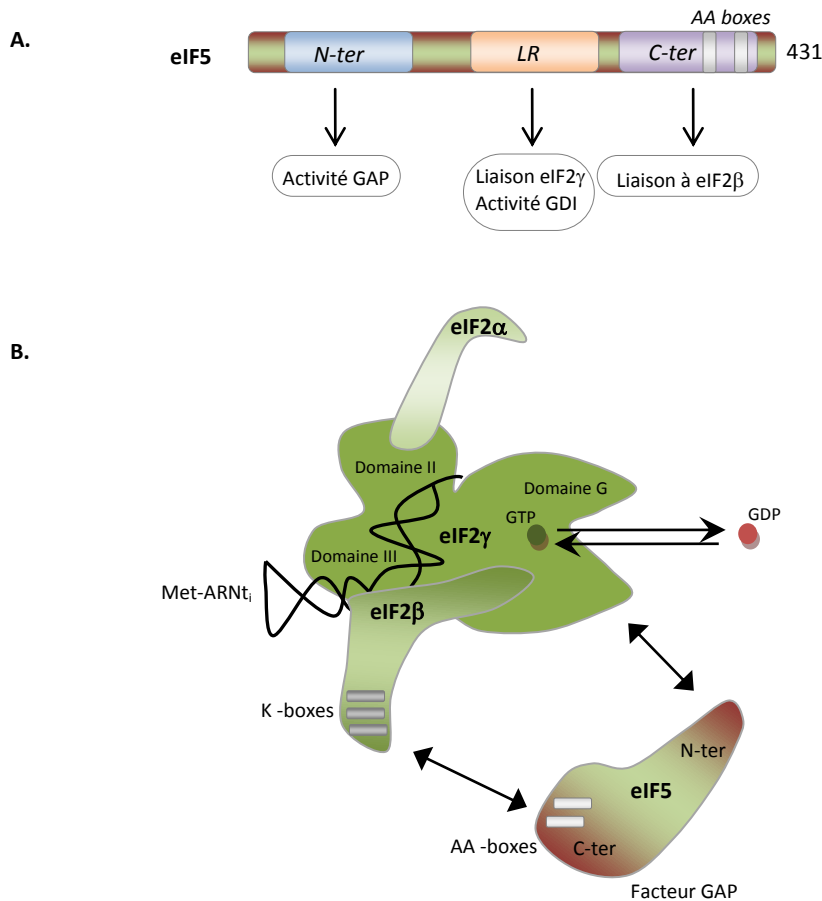
Les acides aminés sont également impliqués dans la modulation d'eIF2B. Dans les cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) l'insuline n'est pas suffisante pour activer eIF2B. Cela est possible si des acides aminés sont présents dans le milieu (Campbell et al., 1999). Kimball et al. ont montré que la privation en histidine et leucine cause une inhibition de l'activité d'eIF2B dans les myoblastes L6 et concluent que la régulation de la synthèse protéique globale était liée plutôt à l'activité d'eIF2B, qu'à des changements dans le complexe d'initiation eIF4F (Kimball et al., 1998). Les acides aminés sont des précurseurs pour la synthèse protéique, mais en jouant un rôle également dans la régulation positive d'eIF2B, ils créent un mécanisme de contrôle de l'initiation supplémentaire.

### 2.3.2.3. Le facteur eIF5

eIF5 agit comme un facteur GAP (*GTPase-Activating Protein*) pour eIF2, mais uniquement lorsqu'eIF2 est lié au ribosome (Marintchev et Wagner, 2005). eIF5 contient trois domaines dont deux qui sont homologues à deux régions d'eIF2 $\beta$  (N-ter et *Znf*). La partie N-terminale d'eIF5 présente une séquence de résidus bien conservée, qui ressemble à un motif de liaison aux nucléotides. Cette région interagit avec le domaine G d'eIF2 $\gamma$  pour stimuler l'hydrolyse du GTP au niveau du facteur ternaire eIF2-GTP-ARN<sub>t</sub><sup>Met</sup>.

Le domaine C-terminale s'associe à la queue non structurée de la région N-terminale d'eIF2 $\beta$  (Alone et Dever, 2006). En effet, eIF5 présente un domaine HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, PR65/A, kinase TOR1) qui est présent aussi au niveau d'eIF2B $\epsilon$  et qui a un rôle majeur dans l'association d'eIF5 avec eIF2. Le domaine HEAT d'eIF5 est également important dans l'interaction avec d'autres facteurs d'initiation : eIF1, eIF3 et eIF4G et constitue en effet un point d'ancrage pour l'assemblage du complexe de préinitiation (Yamamoto et al., 2005).

En plus de son activité GAP, eIF5 a une deuxième fonction, celle d'inhibition de la dissociation du GDP, appelée activité GDI pour *GDP dissociation inhibitor*. En effet, il a été montré récemment qu'eIF5 est nécessaire pour la régulation traductionnelle exercée par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Jennings et Pavitt, 2010a). eIF5 est une protéine bi-fonctionnelle, elle stabilise la liaison du GDP à eIF2 indépendamment de son rôle GAP, dans des conditions normales de traduction.



*Figure 1.18.* Les domaines d'eIF5 et son interaction avec eIF2. **A.** Les flèches indiquent la responsabilité de chaque domaine. **B.** eIF5 est un facteur GAP (*GTPase activating protein*) qui stimule l'hydrolyse du GTP au niveau du complexe ternaire eIF2- GTP- Met-ARNT<sub>i</sub>. Les sous-unités eIF2 $\beta$  et eIF2 $\gamma$  vont se lier à eIF5 comme indiqué par les flèches. Les K-boxes interagissent directement avec les AA-boxes, ce qui permet de fixer d'abord le C-ter d'eIF5 sur eIF2 $\beta$ . (Adapté de Alone et Dever, 2006 ; Jennings et Pavitt, 2010b).

#### 2.3.2.4. Régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$

eIF2 $\alpha$  phosphorylé sur le site conservé de la sérine 51 inhibe la traduction en augmentant son affinité avec eIF2B. La phosphorylation de la Ser-51 dans les cellules eucaryotes transforme eIF2 d'un substrat du facteur GEF eIF2B, en son inhibiteur et donc le complexe ternaire eIF2- GTP- Met-ARNT<sub>i</sub> ne peut plus se former. Dans la majorité des cellules étudiées, c'est la quantité d'eIF2B qui est limitante par rapport à celle d'eIF2. Par conséquence, la phosphorylation d'un petit pourcentage d'eIF2 $\alpha$  suffit pour séquestrer eIF2B dans le complexe inactif phospho-eIF2-eIF2B et ainsi inhiber la synthèse protéique (revue dans Dever *et al.*, 2007). eIF2 $\alpha$ [P] (phospho - eIF2 $\alpha$ ) joue un rôle important dans la séquestration d'eIF2B puisqu'un mutant S51D mimant une protéine phosphorylée (le site de phosphorylation de la Ser-51 est muté en aspartate) séquestre eIF2B en bloquant son activité GEF, et cela sans l'activité d'une kinase eIF2 $\alpha$  (Sudhakar *et al.*, 2000).

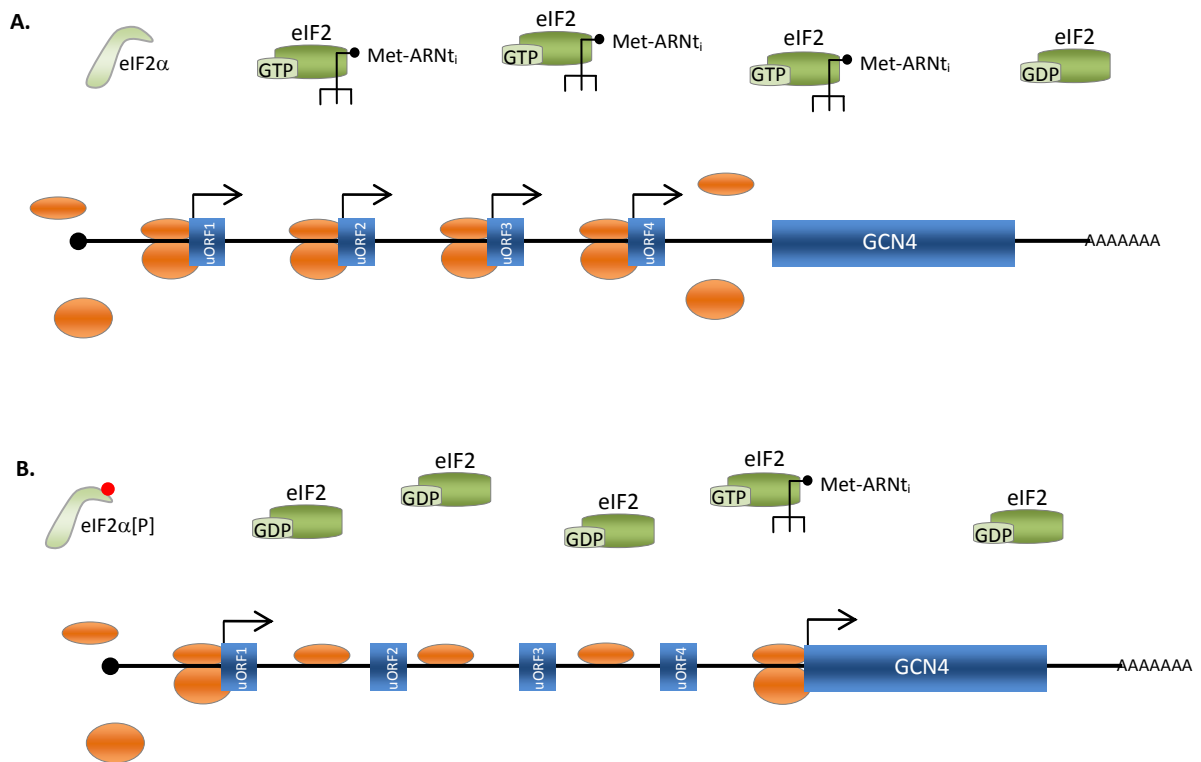
Malgré le ciblage d'un seul acteur moléculaire et un seul site régulateur, l'effet modérateur d'eIF2 $\alpha$ [P] sur la traduction peut impliquer un spectre varié de conséquences biologiques intégrées sous la notion de « réponse intégrée aux stress » ou ISR pour *Integrated Stress Response* (revue dans Ron et Harding, 2007), détaillée dans la partie 2.3.2.6. De plus, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est réversible ce qui constitue une adaptation importante des cellules à divers stress menaçant l'homéostasie énergétique cellulaire, puisque la synthèse protéique a un cout énergétique très élevé (Ron et Harding, 2007).

L'atténuation de la traduction par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  présente un intérêt également vis-à-vis du maintien d'une « réserve » de protéines chaperonnes chargées d'assister les chaînes polypeptidiques sortant des ribosomes. La régulation au niveau de l'initiation permet le recyclage des chaperonnes, contrairement au contrôle de l'élongation pendant laquelle les chaperonnes resteraient associées à des chaînes peptidiques incomplètes (Bukau, 2005). Des considérations similaires sont valables concernant le pool de ribosomes et de facteurs de traduction.

#### 2.3.2.5. Conséquences de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ sur la traduction qualitative d'ARNm

La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  entraîne une inhibition de la synthèse de la majorité des protéines, mais permet d'une manière surprenante la traduction d'ARNm particuliers. Par exemple, chez la levure, à la suite d'une déprivation en acides aminés, la kinase GCN2 (*General Control*

*Nonderepressed 2 kinase*) phosphoryle eIF2 $\alpha$  et induit ainsi l'inhibition globale de la synthèse protéique, alors que la traduction du messenger codant pour GCN4 augmente (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). La protéine GCN4 est un facteur de transcription impliqué dans la synthèse des acides aminés. La région 5'UTR de son messenger contient quatre petits cadres de lecture uORF (*upstream Open Reading Frame*) situés en amont de celui codant pour la protéine GCN4. Quand le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est faible, le ribosome initie le premier uORF et réinitie les uORFs suivants, car des complexes ternaires eIF2- GTP- Met-ARNt<sub>i</sub> sont disponibles pour chaque réinitiation, sans parvenir à l'ORF de GCN4 (Hinnebusch et Dever, 2007) (*Figure 1.19*). Lorsqu'eIF2 $\alpha$  est phosphorylée, la sous unité 40 S du ribosome ne peut plus initier les uORFs, par manque de complexes ternaires disponibles, et continue de scanner l'ARNm jusqu'à l'ORF principal de GCN4 qui est favorisé pour la traduction. D'autres messagers sont régulés de cette manière, comme par exemple, le messenger codant pour la protéine ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) chez les métazoaires (Harding *et al.*, 2000; Vattem et Wek, 2004). Dans les cellules de mammifères, ATF4 ainsi déréprimé va induire la transcription de différents gènes impliqués dans la réponse au stress, parmi lesquels GADD34, la sous-unité régulatrice de la phosphatase 1 qui va induire la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Deux régions régulatrices uORF ont été décrites pour ATF5 (Zhou *et al.*, 2008) et plus récemment, des régulations par uORF ont été mises en évidence lors du contrôle traductionnel de la protéine CHOP (*C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein*) en présence d'eIF2 $\alpha$ [P] (Palam *et al.*, 2011).



**Figure 1.19.** Traduction spécifique du messager GCN4. Le messager codant pour GCN4 présente quatre séquences uORF et sa traduction dépend de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et donc de la quantité de complexes ternaires eIF2- GTP- Met-ARNT<sub>i</sub> formés. **A.** Le nombre de complexes ternaires est très élevé ce qui permet la formation des ribosomes sur les régions uORF mais non pas sur l'ORF principal de GCN4, réprimant ainsi son expression. **B.** eIF2 $\alpha$ [P] réduit le nombre de complexes ternaires et la petite sous-unité ribosomale continue à scanner le 5'UTR jusqu'au cadre de lecture principal en favorisant ainsi l'expression de GCN4 (Holcik et Sonenberg, 2005; Hinnebusch et Dever, 2007).

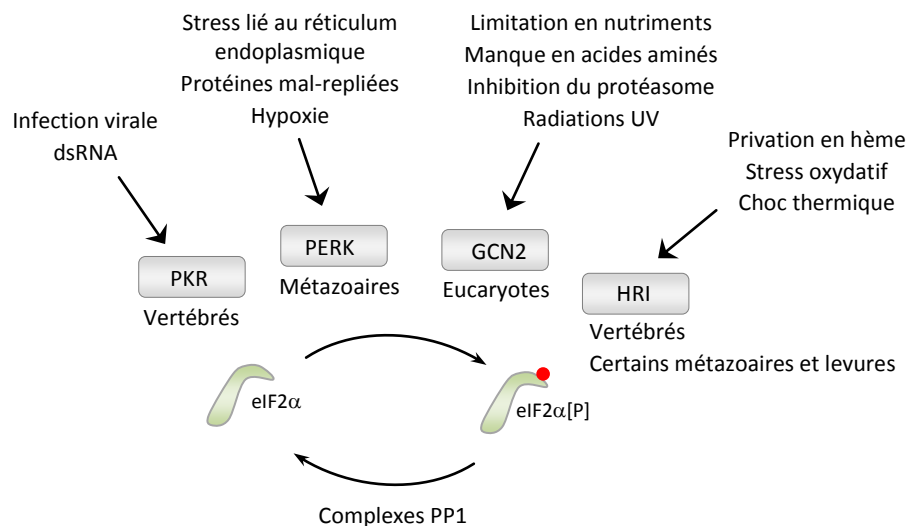
La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  via la traduction spécifique de ATF4, a un rôle au niveau du système nerveux. En effet, en utilisant des souris hétérozygotes eIF2 $\alpha$  +/S51A, l'équipe de N. Sonenberg a démontré l'importance de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans la plasticité synaptique à long terme et dans la mémoire (Costa-Mattioli et al., 2007). L'inhibition de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  chez ces souris entraîne une augmentation de la plasticité synaptique, de la mémoire spatiale, du conditionnement à la peur. De plus, dans l'hippocampe de souris sauvages, eIF2 $\alpha$  est rapidement déphosphorylée après un conditionnement à la peur et l'inhibition de cette déphosphorylation par injection de salubrinal (un inhibiteur de GADD34) limite la mémoire à long terme (Costa-Mattioli et al., 2007).

### 2.3.2.6. Les kinases d'eIF2 $\alpha$

La phosphorylation d'eIF2 a été initialement liée à l'inhibition de la synthèse protéique dans un lysat de réticulocytes de lapin déprivé en hème (Farrell et al., 1977). Cet événement a été ensuite observé dans d'autres cellules et dans différentes situations de stress comme la déprivation en acides aminés ou le stress du réticulum endoplasmique. Il a été découvert par la suite que ce sont des kinases distinctes qui s'activent lors des différents stress.

Quatre kinases spécifiques d'eIF2 $\alpha$  ont été caractérisées : PKR (*Protein kinase R*), PERK (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), HRI (*Heme-Regulated Inhibitor kinase*) et GCN2 (*General Control Nonderepressed 2 kinase*). La répartition phylogénétique de ces quatre kinases indique leur présence inégale dans les génomes des différents taxons eucaryotes (*Figure 1.20*). Ainsi, PKR est limitée aux génomes des vertébrés et au contraire, GCN2 est présente dès les eucaryotes les plus basiques (Rothenburg et al., 2009). Chez l'oursin, seulement GCN2, HRI et PERK ont été trouvées dans le génome (Morales et al., 2006).

Les stress cellulaires agissant comme activateurs de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sont très diversifiés, et peuvent avoir une origine abiotique : comme les radiations UV, le choc thermique, et l'hypoxie, ou bien, une origine biotique, intracellulaire : comme le stress lié au réticulum, l'accumulation des protéines mal-repliées et l'infection virale (Wek et al., 2006; Spriggs et al., 2010).



*Figure 1.20.* Les différents stress qui activent les quatre kinases d'eIF2 $\alpha$ : PKR, PERK, GCN2 et HRI. eIF2 $\alpha$ [P] est déphosphorylé par l'activité phosphatase des complexes liés à la PP1. Les taxons dans les génomes desquels les kinases existent, sont également présentés. (Modifiée de Wek et al. 2006 et Holcik et Sonenberg 2005)



Les domaines catalytiques des quatre protéines kinases ont entre 25-37% d'identité de séquence d'acides aminés et partagent des structures particulières au niveau N-terminal et C-terminal (Dever et al., 2007). La structure cristallographique de la PKR humaine liée à eIF2 $\alpha$  a révélé l'interaction de son domaine kinasique avec un segment d'eIF2 $\alpha$  éloigné du site de phosphorylation Ser-51, ce qui explique la grande spécificité du substrat (Dar et al., 2005).

La propriété des quatre kinases de répondre à différents *stimuli* est conférée par leur domaines régulateurs uniques. Les éléments régulateurs se situent vers les extrémités N-terminale ou C-terminale, ou bien, au niveau du domaine kinasique conservé (Figure 1.21).

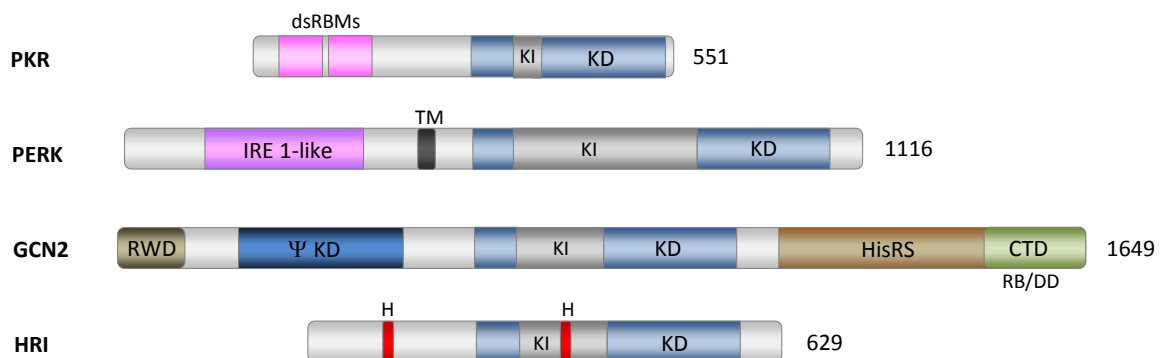


Figure 1.21. Architecture des eIF2 $\alpha$  kinases (mammifères). KD (bleu) : domaines kinasique conservés, au niveau desquels il y a les inserts kinasiques (KI) (gris) impliqués dans la reconnaissance du substrat. PKR : le domaine dsRBM (*dsRNA-binding motif*) (rose clair) est présent dans la partie N-ter. Au niveau de PERK : IRE1-like (rose foncé) est une région avec homologie de séquence avec la IRE1 (*inositol-requiring protein-1*) impliquée dans la UPR (*Unfolded Protein Response*) ; TM (noir) indique le domaine transmembranaire. GCN2 : au niveau N-ter le domaine RWD (*RING finger WD-repeat DEAD*) (marron foncé) impliqué dans la liaison à GCN1 ; Ψ KD (bleu foncé) symbolise le pseudo-domaine kinasique ; HisRS (*Histyl-tRNA synthetase*) (marron clair) est le domaine de reconnaissance des ARNt déchargés et CTD (*Carboxy-terminal domain*) (vert) est le domaine C-ter qui a également une fonction de reconnaissance d'ARNt (RB pour *RNA binding*) mais aussi dans la dimérisation (DD) de GCN2 qui est essentielle pour son activation. La HRI contient deux sites de liaison à hème (H)(rouge). Les numéros indiquent la taille en acides aminés. (Adapté de Dever et al. 2007)

Les quatre kinases partagent le même substrat, eIF2 $\alpha$  et cette spécificité s'explique par des stratégies communes d'activation, qui sont la dimérisation et l'autophosphorylation. Cela permet l'alignement correct des sites actifs liant l'ATP et le substrat peptidique pour la réaction de phosphorylation (Hinnebusch, 2005). La preuve de la spécificité de ces kinases a été montrée historiquement par mutation de la Ser-51 en alanine (eIF2 $\alpha$ <sup>S51A</sup>) qui bloque l'habilité de la kinase GCN2 à phosphoryler eIF2 $\alpha$  chez la levure (Dever et al., 1992) et abolit les conséquences de l'activation de PERK dans les cellules de mammifères (Lu et al., 2004).

### La réponse intégrative au stress

Malgré la diversité des stress activateurs de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , le flux de la signalisation en aval est canalisé par une seule voie qui engage les différentes réponses aux stress. Le schéma de signalisation chez les métazoaires a été appelé ISR pour *Integrated Stress Response* (Ron et Harding, 2007) (Figure 1.22).

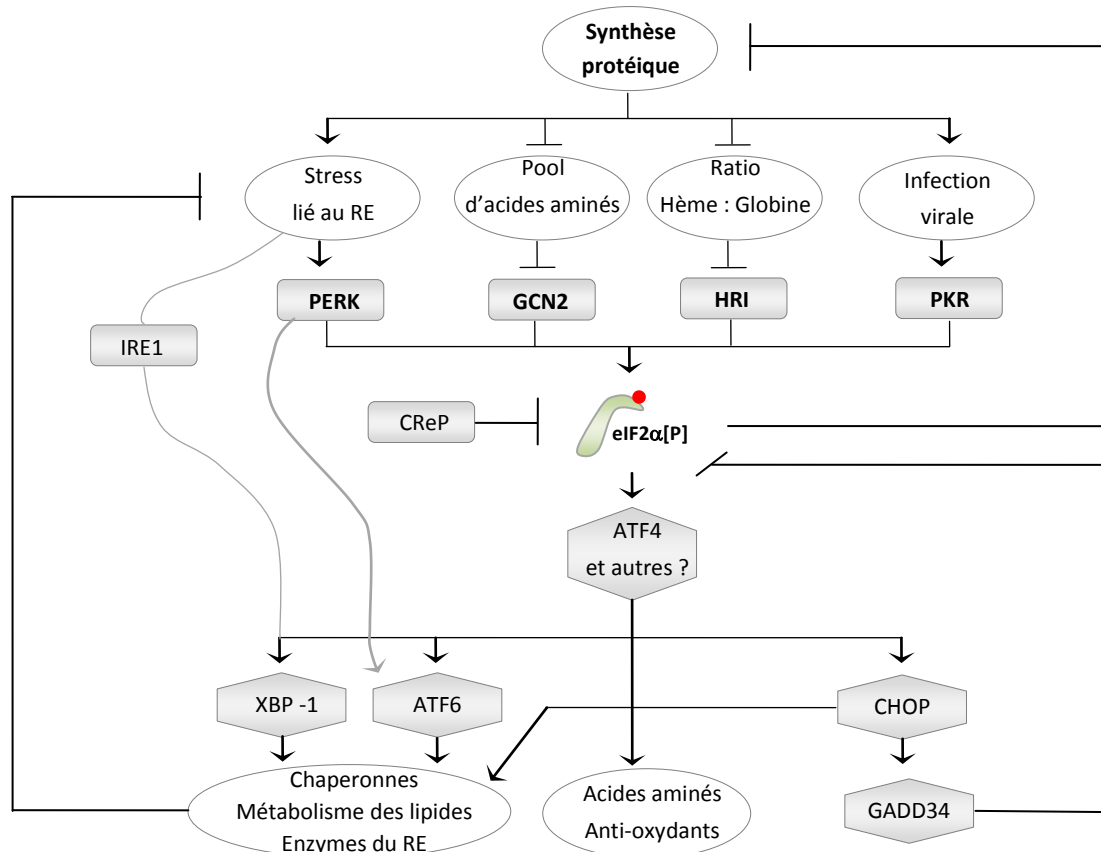


Figure 1.22. Schéma intégratif de la réponse aux stress (ISR) faisant intervenir eIF2 $\alpha$ [P]. Les quatre eIF2 $\alpha$  kinases sont modulées par des signaux de différents stress, qui visent le RE, le pool d'acides aminés, le ration hème/globine ou bien lors d'une infection virale. Par exemple, eIF2 $\alpha$ [P] et l'atténuation de la synthèse protéique sont importants pour limiter le stress du réticulum endoplasmique (RE). L'expression d'ATF4 et probablement d'autres facteurs de transcription est stimulée en présence d'eIF2 $\alpha$ [P], avec activation de différents gènes en aval. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription comme ATF6 et XBP-1 (X-box binding protein 1) qui sont contrôlés également par des voies parallèles avec des signaux venant directement du RE (flèches grises). En aval de ces acteurs ce sont des gènes codant pour des chaperonnes, enzymes du RE, enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, des transporteurs d'acides aminés et des gènes impliqués dans la réponse du stress oxydatif. Le facteur de transcription CHOP est également induit, qui active GADD34, une sous-unité régulatrice de la PP1, inhibant ainsi la signalisation de l'ISR. CReP est également une sous-unité régulatrice d'une phosphatase qui déphosphoryle eIF2 $\alpha$ [P]. (Ron et Harding, 2007)

### La kinase GCN2

GCN2 est impliquée dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  au cours du développement embryonnaire chez la souris (Alves *et al.*, 2009), mais aussi chez l'oursin (cette thèse). Nous avons donc choisi de présenter d'avantage cette kinase.

GCN2 est la plus ancestrale des quatre kinases d'eIF2 $\alpha$  (Dever, 1999) (*Figure 1.20*). En plus des conditions de privation en acides aminés, GCN2 est activée chez les levures en réponse à de forte salinité, limitation en glucose, rapamycine (inhibiteur de mTOR), méthyle méthane sulfonate (MMS) un agent alkylant de l'ADN et chez les mammifères et levure par l'exposition aux rayons UV (Deng *et al.*, 2002; Hinnebusch, 2005). Chez la levure, l'arrêt du cycle en G1/S, à la suite d'un traitement aux UV, est dépendant de la GCN2 et s'accompagne ainsi de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Tvegard *et al.*, 2007). Il est particulièrement intéressant que l'activation de GCN2 en réponse à ces différents stress se base sur la propriété de GCN2 de reconnaître les ARNt grâce au domaine HisRS et sur la dimérisation médiée par le domaine CTD (voir *Figure 1.21*). Ceci a mené à l'idée selon laquelle les ARNt déchargés seraient l'activateur commun de GCN2. En conséquence, les différentes conditions de stress soit activent GCN2 d'une manière indirecte, en modifiant la quantité d'ARNt déchargés dans la cellule, soit modulent la sensibilité de GCN2 aux ARNt déchargés de façon que le niveau basal d'ARNt déchargés normalement présents dans le cytoplasme, active la kinase (Dever *et al.*, 2007). Cette dernière possibilité a été mise en évidence lors de la mutation E803V au niveau du domaine kinasique induisant une hyperactivité de GCN2 pleine taille pour la reconnaissance d'ARNt déchargés (Dong *et al.*, 2000).

### Les phosphatases d'eIF2 $\alpha$

La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est un mécanisme dynamique et hautement régulé. En plus du contrôle exercé par les kinases mentionnées, il y a deux protéines phosphatases capables de déphosphoryler eIF2 $\alpha$ [P]. Un complexe constitutif formé par la sous-unité catalytique de la PP1 (*Protein Phosphatase 1*) avec sa sous-unité régulatrice CReP (*Constitutive Repressor of eIF2 $\alpha$  phosphorylation*) contribue au maintien à un niveau basal du facteur eIF2 $\alpha$  déphosphorylé (Jousse *et al.*, 2003). GADD34 (*Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein*) forme également un complexe avec la sous unité catalytique de la PP1 et contrôlent la reprise de la synthèse protéique pendant les stades tardives de la réponse aux stress cellulaires qui activent les kinases d'eIF2 $\alpha$ , assurant ainsi un feedback négatif (Novoa *et al.*, 2003).

## 2.4. Importance de la régulation traductionnelle dans différents contextes

Les acteurs présentés dans les sections précédentes (2.3.1 et 2.3.2) ont des rôles majeurs pour le maintien de l'homéostasie dans les cellules en conditions physiologiques, mais ils constituent également des régulateurs clés lors des moments décisionnels importants tels que la réponse cellulaire à l'apoptose, à la cancérisation ou encore, à des stress environnementaux (hypoxie, métaux lourds,..). L'oursin est un bon modèle pour étudier les mécanismes traductionnels impliqués dans la réponse apoptotique et de différents stress, puisque les traitements pharmacologiques sont possibles et cela dans le « contexte traductionnel » de l'embryon précoce de l'oursin.

Dans cette partie de l'introduction seront présentés différents exemples de régulations traductionnelles en apoptose et divers stress, dans plusieurs modèles ainsi que dans des situations pathologiques comme le cancer. Les mécanismes traductionnels impliqués s'appuient sur des synthèses protéiques sélectives mais aussi sur la régulation de la synthèse protéique globale.

### 2.4.1. Traduction et apoptose

Les facteurs de traduction sont impliqués dans la réponse cellulaire apoptotique mise en place lors des stress cellulaires comme le choc thermique, l'hypoxie ou encore, lors d'une privation alimentaire (Tettweiler et al., 2005; van den Beucken et al., 2006). Une des réponses cellulaires la plus souvent rencontrée est l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe. Cette inhibition permet de limiter la consommation en énergie de la cellule et de rediriger les efforts vers la réparation des dommages ou la mise en place de mécanismes de survie (Rudra et Warner, 2004). En conséquent, une baisse importante de la synthèse protéique globale est enregistrée en apoptose et les facteurs d'initiation présentent un rôle majeur dans ce processus.

#### 2.4.1.1. Les acteurs de l'apoptose

L'apoptose constitue un phénomène de mort cellulaire programmée ou PCD (*Programmed Cell Death*) qui implique un mécanisme de suicide cellulaire décrit pour la première fois dans les années '70 (Kerr et al., 1972), différent de la mort accidentelle des cellules (revue dans Galluzzi et al., 2011). Les changements physiques subits par une cellule en apoptose sont la condensation de la chromatine et du cytoplasme, qui va bourgeonner sous forme de vésicules extérieures (*blebbing*), phagocytés par la suite. L'importance de l'apoptose est décisive pour de nombreux contextes

biologiques tels que l'embryogénèse, le développement des cancers ou simplement l'homéostasie tissulaire. Deux voies de signalisation apoptotique ont été décrites : l'une appelée extrinsèque, qui est stimulée par des signaux extracellulaires via de récepteurs membranaires et une voie intrinsèque où, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE) déclenchent le processus apoptotique. Tous les signaux apoptotiques font intervenir et convergent vers l'activation des caspases (Figure 1.23) qui sont des protéases à cystéine, utilisées souvent comme marqueurs de l'apoptose.

Toutefois, il existe des voies d'induction de l'apoptose indépendantes des caspases, comme celle qui fait intervenir AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Joza *et al.*, 2001) et ENDOG (Endonuclease G) (Buttner *et al.*, 2007), qui se localisent au niveau du noyau pour stimuler la fragmentation de l'ADN.

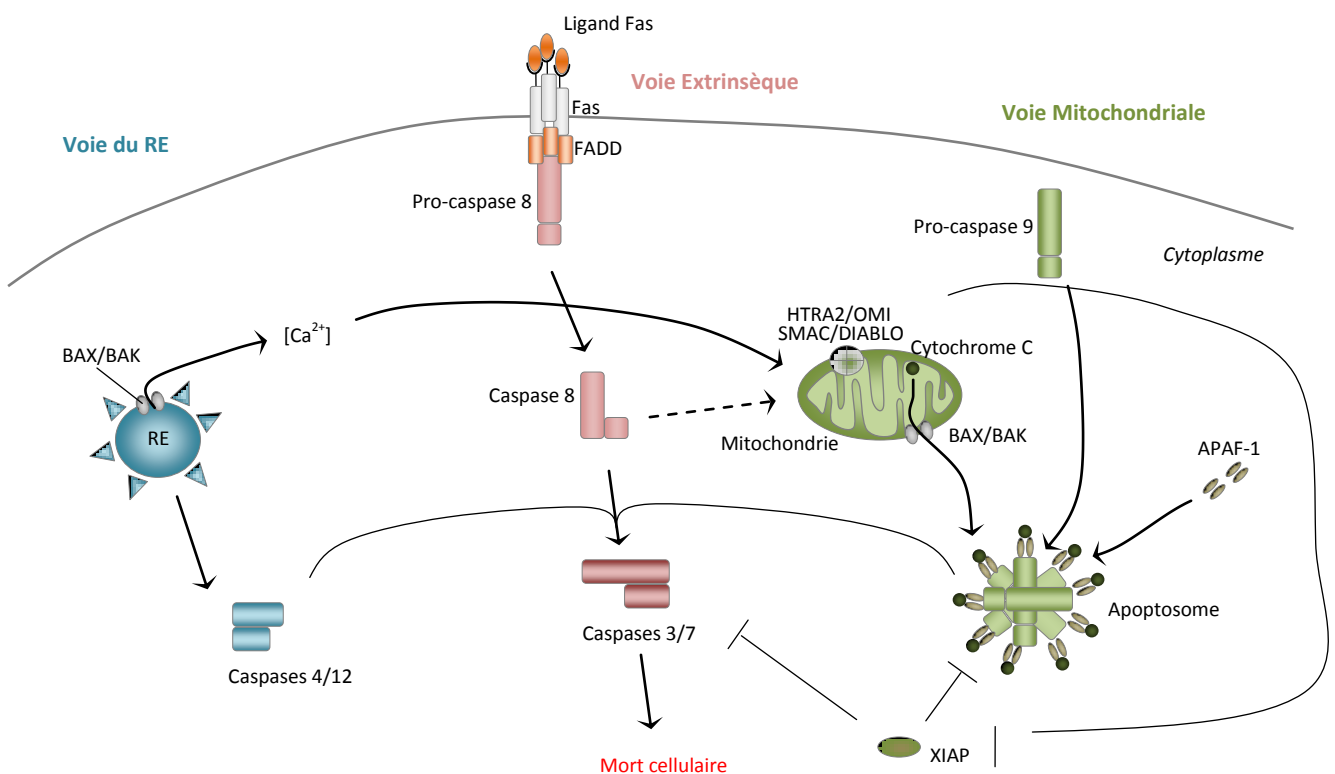


Figure 1.23. Les voies d'induction de l'apoptose. Tous les signaux apoptotiques convergent vers les caspases qui forment des cascades d'activation. Les activateurs de l'apoptose peuvent être extérieurs (voie extrinsèque) faisant appel au récepteur membranaire Fas qui appartient à la famille TNF, (*tumor necrosis factor*) et qui est lié à FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), responsable de l'activation par clivage de la caspase 8 ; les activateurs intracellulaires font intervenir la voie mitochondriale et du RE. La voie mitochondriale est caractérisée par la libération du cytochrome C qui formera l'Apoptosome ensemble à la caspase 9 et APAF-1 (*pro-apoptotic protease activating factor-1*). Le signal de la voie extrinsèque peut amplifier la réponse cellulaire apoptotique via la mitochondrie (flèche pointillée). Le stress du réticulum endoplasmique (RE) active les caspase 4 et 12. Tous les signaux apoptotiques convergent vers l'activation de la caspase 7 et de la caspase 3 qui est l'effecteur apoptotique final induisant la mort cellulaire. Il y a de nombreux points de contrôle de ces voies de signalisation, notamment par les acteurs apoptogéniques de la famille Bcl2 (BAX et BAK), ainsi que les protéines DIABLO/Smac (*direct IAP binding protein with low pI/ second mitochondria-derived activator of caspases*) et la serine protéase HTRA2/OMI. Leur antagoniste XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) est capable d'inhiber l'apoptose. (Holcik et Sonenberg, 2005)

### Les acteurs de l'apoptose chez l'oursin

L'apoptose est à la fois un mécanisme de remodelage tissulaire, surtout en développement, et une réponse de suicide cellulaire face à des stress sévères. Toutes les deux situations peuvent être étudiées dans l'embryon d'oursin (revue dans Agnello et Roccheri, 2010). L'apoptose physiologique ou spontanée au cours du développement a été mise en évidence au stade larvaire, au niveau des bras du *pluteus* (Roccheri *et al.*, 1997) et le traitement à l'ester de phorbol et au choc thermique amplifie le nombre de cellules en apoptose (Roccheri *et al.*, 2002). Le fait que les *plutei* subissent une métamorphose larvaire pendant laquelle la majorité des organes sont éliminés, pourrait expliquer l'induction spontanée de l'apoptose à ce stade. Au niveau des stades précoces, l'apoptose peut être induite par le traitement au MMS (Le Bouffant *et al.*, 2007).

L'annotation du génome de l'oursin a permis d'analyser la conservation des voies mises en place lors du processus apoptotique, ce qui a mené à la conclusion que l'oursin possède une machinerie apoptotique complexe comparable avec celle de l'humain et moins avec celles des arthropodes ou nématodes (Robertson *et al.*, 2006).

La comparaison de séquences (conservation de domaines spécifiques) des protéines humaines avec les protéines prédites d'oursin a mis en évidence l'existence de quatre protéines de la famille APAF chez l'oursin contre une seule chez l'humain. De la même manière, l'oursin possède un nombre important de caspases. En effet, quatre gènes codant pour des protéines de la famille de la caspase 9, un gène codant pour des protéines de la famille des caspases 3/7 et caspase 6, cinq gènes codant pour des protéines de la famille de la caspase 8 ont été trouvés chez l'oursin. De manière intéressante, onze « nouvelles » caspases, dont la fonction est inconnue, sont prédites chez l'oursin. Des gènes codant pour les protéines de la famille des Bcl-2 ou pour les IAPs ont été trouvés chez l'oursin. Pour les acteurs de la voie extrinsèque, sept protéines correspondant aux TNFR (récepteurs au TNF) et quatre au TNF ligand sont prédites chez l'oursin alors que les récepteurs Fas, ou TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) sont absents ainsi que leurs ligands respectifs.

Enfin, les acteurs de la voie de l'apoptose caspase indépendante, comme le facteur AIF, sont présents et bien conservés chez l'oursin.

#### 2.4.1.2. L'implication des facteurs de traduction en apoptose

Ici seront présentées des études effectuées surtout sur des cellules en culture et les données chez l'oursin sont regroupées dans la section 3 de l'introduction.

eIF2 $\alpha$  est phosphorylée en réponse à l'exposition des cellules à différents stimuli proapoptotiques (Morley et Coldwell, 2007). eIF2 $\alpha$ [P] contribue à la synthèse spécifique des acteurs régulateurs pro ou antiapoptotiques.

eIF2 $\alpha$ [P] est essentielle à l'induction de l'apoptose puisque l'expression d'une protéine eIF2 $\alpha$  non phosphorylable (sérine 51 mutée en alanine) inhibe la mise en place de l'apoptose (Srivastava et al., 1998) et induit la transformation des cellules NIH3T3 (fibroblastes embryonnaires de souris) saines en cellules malignes (Donze et al., 1995). L'expression du mutant dominant négatif de la PKR, kinase capable de phosphoryler eIF2 $\alpha$ , entraîne la transformation des cellules NIH3T3 (Koromilas et al., 1992), proposant ainsi la PKR comme un suppresseur de tumeurs (Meurs et al., 1993). De façon corrélée, la surexpression de TRBP (*TAR RNA Binding Protein*) (Benkirane et al., 1997) ou de p58 (Barber et al., 1994), qui sont des inhibiteurs de la PKR, entraîne la transformation de cellules saines en cellules malignes. De plus, la modification de la signalisation de l'insuline par la PKR est corrélée à l'apoptose induite par l'ARN double brin, ce qui suggère que l'activation de cette voie via l'infection virale peut contribuer au développement du diabète (Nakamura et al., 2010).

La région C-ter d'eIF2 $\alpha$  contient un site de clivage par la caspase 3. Le clivage d'eIF2 $\alpha$  en apoptose induit un échange rapide de GDP indépendamment d'eIF2B et *in fine* inactive le complexe eIF2 (Marissen et al., 2000).

eIF4E présente au niveau de la Ser-209 un site de phosphorylation régulateur (Wang et al., 1998). La phosphorylation d'eIF4E par Mnk1 est inhibée en situation de stress, lorsque PAK2 (*p21 Activated protein Kinase 2*) est active (Orton et al., 2004). Lorsque PAK2 phosphoryle la région N-terminale de Mnk1, cette dernière ne peut plus se fixer sur eIF4G, cela inhibe à la fois la phosphorylation d'eIF4E et celle d'eIF4G. L'interaction eIF4E avec eIF4G et par conséquent, le fonctionnement d'eIF4F sont affectés. De plus, PAK2 a été décrite comme une protéine kinase impliquée dans le stress et l'apoptose (Roig et al., 2001).

eIF4G est clivé d'une manière spécifique en apoptose par la caspase-3. Ce clivage est effectué au niveau de deux sites : DLLD<sub>532</sub> et DRLD<sub>1176</sub>, qui diffèrent de celui reconnu par la protéase 2A pendant l'infection virale. Les trois fragments produits par la caspase-3 sont appelés N-FAG, M-FAG et C-FAG (*Fragments of Apoptotic cleavage of eIF4G*), en fonction de leur position initiale au niveau de la protéine non clivée (Morley et al., 2005). Pendant l'apoptose, M-FAG est le fragment minimal capable de soutenir la traduction cap-dépendante. En effet, M-FAG peut lier eIF4E déphosphorylé et former un complexe eIF4F particulier, qui peut s'associer tout de même à eIF4A, eIF3 et la sous-unité

ribosomale 40 S (Morino *et al.*, 2000). Le rôle exact des trois fragments d'eIF4G n'est pas très clair. Le fragment M-FAG serait impliqué dans la régulation de la traduction sélective de c-Myc, XIAP et Apaf-1 mais cette relation reste encore discutée (revu dans Morley et Coldwell, 2007).

Plusieurs études ont montré l'implication d'eIF3 en apoptose. D'une part, la sous-unité *f* d'eIF3 est directement phosphorylé en conditions apoptotiques par la kinase CDK11/p46/PITSLRE sur la Thr119. Cet événement joue un rôle important dans la fonction d'eIF3 pour la traduction, et a pour effet d'inhibition de la synthèse protéique pendant l'apoptose (Shi *et al.*, 2009).

D'autre part, le facteur eIF3 intervient dans l'induction de l'apoptose indépendante des caspases. La sous-unité *g* d'eIF3 est liée spécifiquement par AIF lors de sa translocation de la mitochondrie vers le noyau, et cette interaction provoque l'inhibition de la traduction pendant l'induction de l'apoptose par AIF (Kim *et al.*, 2006).

En plus des facteurs de traduction communs, des facteurs spécifiques interviennent dans la traduction en apoptose, notamment certaines protéines ITAF (*IRES trans-acting factor*) comme PTB (Bushell *et al.*, 2006), qui est nécessaire pour l'induction de l'apoptose et hnRNPC1/C2 (Holcik *et al.*, 2003), responsable de la traduction de XIAP, un inhibiteur majeur de l'apoptose, ou p97/DAP5/NAT1, une protéine homologue avec la partie C-terminale d'eIF4G, donc elle ne peut pas s'associer à eIF4E.

Les ITAFs facilitent le recrutement des ribosomes grâce à une activité chaperonne qui permet à l'IRES d'adopter une conformation idéale pour la traduction (Lopez-Lastra *et al.*, 2005). Cependant, certains ITAFs peuvent avoir un effet inhibiteur sur la synthèse protéique IRES-dépendante (Stoneley et Willis, 2004). Les régulations de ces IRES sont encore peu connues, mais certains résultats indiquent que les ITAFs sont des protéines capables de passer du noyau en cytoplasme en réponse à des stimuli extérieurs. Cela suggère que les IRES et les ITAFs seraient régulés en fonction de leur localisation cellulaire (Lewis et Holcik, 2008). Deux modèles sont proposés où les ITAFs sont d'abord nucléaires. Dans le premier modèle, ces ITAFs nucléaires séquestrent les ARNm dans le noyau et inhibent ainsi leur traduction. Ce n'est qu'en cas de stress que les complexes ITAFs/ARNm passent dans le cytoplasme pour pouvoir synthétiser les protéines correspondantes. Dans le deuxième modèle, les ARNm sont dans le cytoplasme, séparés de leurs ITAFs nucléaires. Les stimuli permettent aux ITAFs de s'accumuler dans le cytoplasme.

Parmi les ITAF, DAP5/p97/NAT1 est un acteur régulateur particulièrement intéressant. L'ARNm de DAP5 comprend un motif IRES et la protéine DAP5 active sa propre traduction. En effet,



DAP5 est clivée par une caspase pour donner un fragment tronqué au niveau de l'extrémité C-terminale, appelé p86 (Figure 1.24), capable de stimuler la traduction dépendante des IRES.

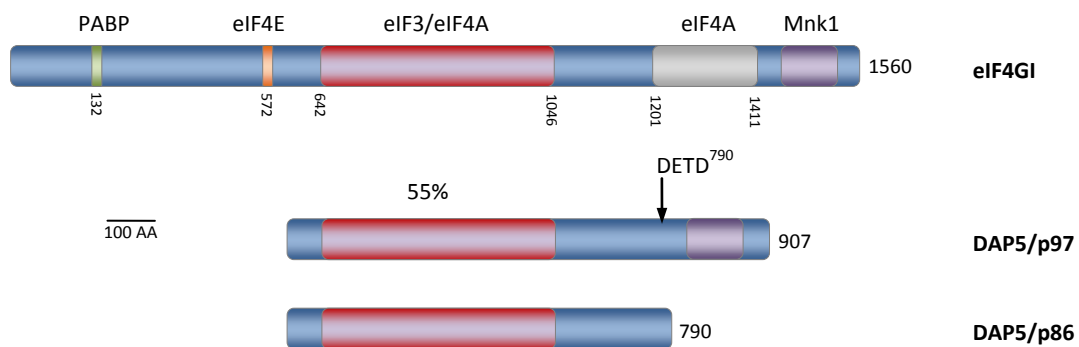


Figure 1.24. Les deux isoformes de DAP5, homologue d'eIF4G. p86 est formé par clivage de l'extrémité C-ter de p97 qui contient le site d'interaction à Mnk1. Les 3 protéines sont alignées par rapport à la région d'interaction avec eIF3/eIF4A et le pourcentage indique la similitude avec eIF4GI. La flèche indique le site de clivage de p97 par la caspase (DETD<sup>790</sup>) (Gingras *et al.*, 1999; Marash et Kimchi, 2005).

Après activation par clivage, DAP5 peut induire la traduction des acteurs pro-apoptotiques : Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*), c-myc (*cellular myelocytomatosis oncogene*) ou des acteurs anti-apoptotiques : XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) et HIAP2/BIRC2 (*Baculoviral IAP repeat-containing protein 2*), qui présentent un rôle important dans la balance décisionnelle du devenir des cellules en apoptose (Figure 1.25) (Marash et Kimchi, 2005).

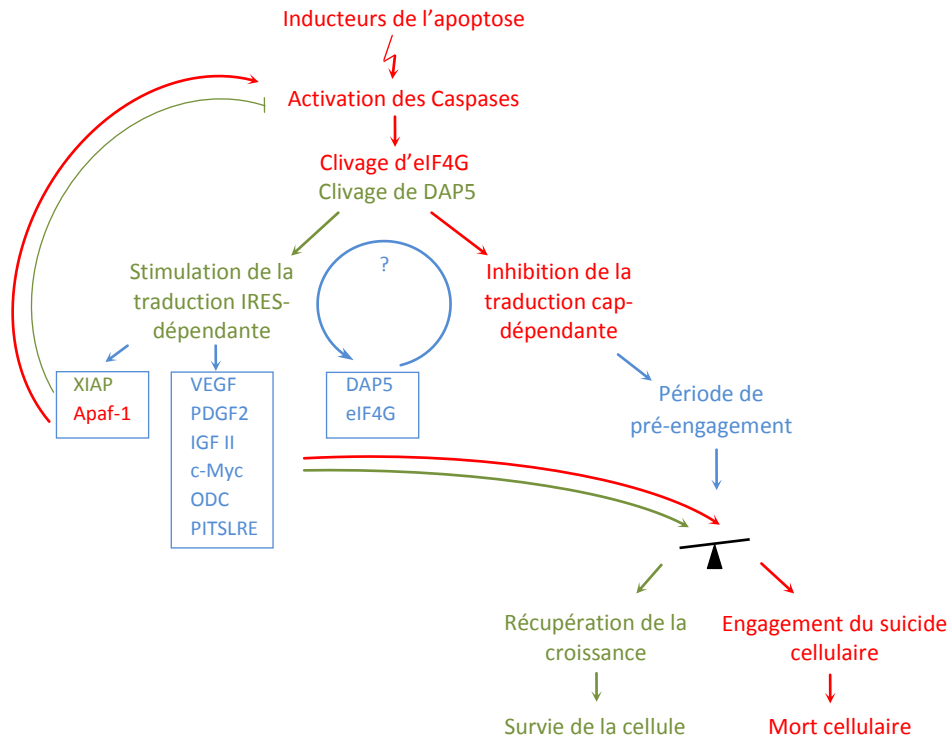


Figure 1.25. L'implication de la régulation traductionnelle IRES-dépendante dans l'apoptose, plus précisément dans la décision du devenir de la cellule (survie ou mort cellulaire) pendant la réponse apoptotique. Les étapes qui mènent à la mort de la cellule sont en rouge et celles qui sont responsables de la décision de survie, en vert. La survie et le rétablissement métabolique de la cellule peut intervenir lorsque la cause du stress cesse et les dommages sont réversibles. La traduction par IRES permet ainsi de maintenir un pouvoir décisionnel dans un contexte où la synthèse protéique globale est inhibée pour réduire les dépenses énergétiques de la cellule. Certains facteurs, comme DAP5 est capable de contrôler leur propre traduction par IRES (Holcik *et al.*, 2000).

D'autre part, la protéine DAP5 non clivée peut agir directement comme activateur de la traduction indépendante de la coiffe et être associée aux polysomes dans des cellules en l'absence de stress (Marash et Kimchi, 2005; Nusch *et al.*, 2007). Elle intervient en mitose pour stimuler la traduction par IRES de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et de la CDK1 (*Cyclin dependant kinase 1*) (Marash *et al.*, 2008; Liberman *et al.*, 2009). DAP5 est déterminante pour le développement embryonnaire, en intervenant sur la voie de l'acide rétinoïque chez la souris (Yamanaka *et al.*, 2000).

DAP5 peut aussi lier Mnk1 mais le rôle de cette interaction reste inconnu puisqu'elle n'interagit pas avec eIF4E. DAP5 pourrait permettre de séquestrer Mnk1 pour inhiber la phosphorylation d'eIF4E (Pyronnet *et al.*, 1999).

En apoptose ainsi que lors de stress cellulaires importants, la synthèse protéique globale est inhibée et des synthèses spécifiques sont mises en place grâce à la modulation des facteurs d'initiation. La traduction spécifique de messagers fait appel à l'initiation IRES-dépendante. Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris, il est démontré que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induite par stress stimule spécifiquement l'activité traductionnelle IRES-dépendante (Fernandez *et al.*, 2002; Gerlitz *et al.*, 2002; Holcik et Sonenberg, 2005). En effet, la décision du devenir des cellules vers la survie ou la mort est dictée par l'équilibre entre la présence de protéines pro-apoptotiques (par exemple : c-myc, DAP5, Apaf-1) et les protéines anti-apoptotiques (par exemple : XIAP, HIAP2, c-IAP, Bag-1, Bcl-2), qui sont activement traduites, indépendamment du taux de traduction cap-dépendante (Elroy-Stein et Merrick, 2007).

Le facteur eIF2A est un acteur fonctionnellement similaire avec IF2 des procaryotes puisque toutes les deux protéines catalysent le recrutement du Met-ARN<sub>t</sub> sur le 40S d'une manière dépendante de l'AUG, en contraste avec eIF2 qui s'associe avec le Met-ARN<sub>t</sub>, GTP et 40S en absence du codon Start AUG. Il a été montré récemment qu'eIF2A stimule la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par la PKR et conditionne la traduction IRES dépendante du virus de l'hépatite C (HCV) dans les conditions de stress cellulaire causé par l'infection virale (Kim *et al.*, 2011).

Dans un contexte de cycle cellulaire, eIF2 $\alpha$ [P] avec la protéine Unr (*upstream of N-ras*) stimule la traduction IRES dépendante de la kinase PITSLRE appartenant à la famille de cdc2 (kinase cycline-dépendante) et de ODC (*ornithine decarboxylase*) lors de l'entrée en mitose, dans des cellules 293T (Tinton *et al.*, 2005).

#### 2.4.2. Traduction et cancer

Les facteurs d'initiation sont impliqués dans la transformation maligne des cellules. Certains eIFs sont considérés oncogènes, comme eIF4E, et d'autres comme suppresseurs de tumeurs : 4E-BP et eIF2 $\alpha$ [P] (Schneider et Sonenberg, 2007).

L'expression d'eIF4E est régulée positivement par transcription par le proto-oncogène c-Myc (Schmidt, 2004) et négativement par le suppresseur de tumeur p53 (Zhu *et al.*, 2005). Cette régulation d'eIF4E par p53 est indirecte, il n'y a pas d'interaction entre p53 et le promoteur d'eIF4E. En effet, p53 interagit avec c-Myc et inhibe son interaction avec le promoteur d'eIF4E. Il faut noter que p53 est muté dans plus de 50% des cancers. L'induction d'eIF4E après une perte de p53 représente un nouveau mécanisme impliqué dans la tumorigénèse et la progression cancéreuse.

L'activité d'eIF4E est perturbée dans les cellules cancéreuses. Il est admis que la régulation d'eIF4E n'est que partiellement effectuée par sa phosphorylation. Cependant, la présence d'un niveau élevé de phospho-eIF4E est corrélée avec la progression des tumeurs, notamment du cancer de prostate. En effet, en analysant le traductome de cellules tumorales par *polysome profiling*, il a été montré que la phosphorylation d'eIF4E présente un rôle important dans le recrutement spécifique de plusieurs ARNm impliqués dans la tumorigénèse (Furic *et al.*, 2010). 35 ARNm sont sélectivement synthétisés dans ce contexte, dont deux chimiokines (Ccl2 et Ccl7). D'une manière intéressante, l'inhibition de Ccl2 induit la régression des tumeurs de la prostate (Loberg *et al.*, 2007).

eIF4G joue un rôle important dans la cancérisation et la division cellulaire. Une surexpression artificielle d'eIF4G entraîne la transformation de cellules NIH3T3 provoquant l'apparition de tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des souris nudes (Fukuchi-Shimogori *et al.*, 1997).

Les cellules déplétées en eIF4G1 sont très grandes et multinucléées. Cela indique que les isoformes d'eIF4G1 joueraient un rôle dans la cytokinèse (Coldwell et Morley, 2006).

eIF2 $\alpha$  est surexprimé dans les cellules cancéreuses (Stumpf et Ruggero, 2011). eIF3, eIF4A, eIF4G, eIF5A et eIF6 présentent également une expression augmentée dans les tumeurs.

La kinase d'eIF2 $\alpha$  HRI a été récemment citée comme un cible anti-oncogénique, puisque le N,N'-diarylurée active la HRI et par conséquent réduit la prolifération et l'expression d'oncogènes dans des lignées cellulaires humaines, via eIF2 $\alpha$ [P] (Chen *et al.*, 2011).

eIF3 est impliqué dans l'oncogénèse et le maintien des tumeurs. Les messagers codant pour ses nombreuses sous-unités (13) sont surexprimés dans différents cancers visant le système digestif, la prostate ou les carcinomes du sein (Hershey, 2010).

### I. 3.

---

## Régulation traductionnelle dans l'embryon d'oursin

Le développement nécessite une expression de gènes spécifiques coordonnée à un temps et à un endroit donné. Cela permet de contrôler par exemple le développement précoce avec notamment la formation des axes embryonnaires ainsi que les différenciations cellulaires ou la formation des gamètes ultérieurement. Les régulations traductionnelles interviennent à chacune de ces étapes (Oulhen et Cormier, 2006). L'oursin est un excellent modèle pour étudier les régulations traductionnelles ; il permet de relier la synthèse protéique au cycle cellulaire et de découvrir ainsi de nouveaux mécanismes de régulation. Le taux de synthèse protéique est très bas dans les ovules d'oursin et augmente rapidement après fécondation. Cette augmentation dépend des ARNm maternels déjà présents dans le cytoplasme des ovules puisqu'elle est insensible à l'inhibition de la transcription (voir sous chapitre 1).

### 3.1. Les eIFs et la fécondation

L'analyse du génome montre qu'il existe chez l'oursin *S. purpuratus* un orthologue de chaque facteur de traduction. Concernant l'initiation, on trouve notamment 3 gènes pour eIF4E (eIF4E-1, eIF4E-2, eIF4E-3). Il existe un seul gène pour eIF4G et également un seul pour 4E-BP (Morales *et al.*,

2006). Le fait de ne pas avoir de multiples isoformes pour chaque facteur facilite l'étude de leur fonction et de leur régulation.

Ces facteurs d'initiation ont été étudiés chez l'oursin *S. granularis*. La protéine 4E-BP, inhibitrice de la traduction, est présente dans les ovules et elle est associée à eIF4E. La fécondation entraîne la phosphorylation de 4E-BP et sa dissociation d'eIF4E (Cormier *et al.*, 2001). De plus, 4E-BP est dégradée après fécondation. La première division mitotique est sous la dépendance de la protéine 4E-BP, car l'inhibition de sa dégradation par la rapamycine, empêche la synthèse de la cycline B (Salaun *et al.*, 2003). La dégradation de 4E-BP ainsi que sa dissociation d'eIF4E, sont donc sensibles à la rapamycine, ce qui suggère l'implication de la voie FRAP/mTOR dans ces processus. La dégradation de 4E-BP, identifiée pour la première fois chez l'oursin, représente un nouveau mode de régulation de la traduction dépendante de la coiffe.

La fécondation induit la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP et eIF4G peut s'associer ainsi à eIF4E (Oulhen *et al.*, 2007). eIF4G présente des modifications post-traductionnelles, notamment l'apparition d'isoformes hautes, capables de s'associer au facteur eIF4E. Ce complexe est important pour la traduction dépendante de la coiffe et pour la première division mitotique (Oulhen *et al.*, 2007).

Les transcrits des facteurs eIF4G et eIF4A présentent des profils d'expression spécifiques chez l'oursin. Dans les étapes précoces de développement, ils sont répartis de façon homogène dans les blastomères. En blastula, ils apparaissent localisés au pôle apical, vers le blastocœle, dans toutes les cellules. De manière remarquable, au stade gastrula, les transcrits sont localisés à la base de l'archentéron. L'analyse plus précise de la localisation des ARNm d'eIF4G par des traitements induisant la ventralisation (extension de l'endoderme) ou l'animalisation (extension de l'ectoderme) et une expression ectopique des messagers d'eIF4G, suggère l'implication du facteur eIF4G dans la différenciation de l'endoderme à la base de l'archentéron (données non publiés ; communication personnelle de Azza Abassi).

La fécondation induit une augmentation significative d'activité du facteur d'échange GDP-GTP eIF2B quand on compare les ovules non fécondés avec des embryons précoces. Cette activation d'eIF2B reflète des changements dans le potentiel redox, causés par l'augmentation du niveau de NADPH qui intervient à la fécondation (Akkaraju *et al.*, 1991). eIF2B est régulée par la voie de la MAPK (Quevedo *et al.*, 2003) et chez l'oursin, la MAPK est activée par phosphorylation en réponse à la fécondation (Zhang *et al.*, 2005).

### 3.2. Les eIFs et les conditions de stress/apoptose

Le répresseur de la traduction 4E-BP est exprimé dans l'embryon d'oursin en réponse à un stress hypoxique, et au chrome (Le Bouffant *et al.*, 2006; Le Bouffant *et al.*, 2008b). L'expression de 4E-BP est régulée traductionnellement et entraîne l'inhibition globale de la synthèse protéique par dissociation du complexe eIF4F et fixation de 4E-BP à eIF4E dans des embryons traités au chrome. eIF2 est impliquée dans la réponse à l'endommagement de l'ADN. La sous unité  $\alpha$  d'eIF2 est phosphorylée en réponse à l'agent génotoxique MMS (*Methyl methane sulfonate*), de façon corrélée à l'inhibition de la synthèse protéique (Le Bouffant *et al.*, 2008a). Ces modifications des facteurs de traduction interviennent dans un contexte d'induction d'apoptose, puisqu'il est possible de visualiser l'activation de la caspase 3 dans ces embryons d'oursin (Le Bouffant *et al.*, 2008a).

## I. 4.

---

### Objectifs de la thèse

L'embryon d'oursin est un modèle avéré pour étudier la régulation de l'expression des gènes au niveau de leur traduction, dans le contexte physiologique du développement précoce, avant et après fécondation, mais aussi lors de l'induction de l'apoptose au niveau des stades précoces.

L'augmentation de la synthèse protéique en réponse à la fécondation est un événement crucial pour le développement embryonnaire de l'oursin. Ce processus se base uniquement sur la traduction des ARNm maternels. Les directions d'investigation dans le cadre de ma thèse gravitent autour des questions suivantes, regroupées dans les deux volets :

(a) Quels sont les mécanismes traductionnels responsables de la synthèse protéique dans les ovules et les embryons précoces d'oursin ? Plus précisément, quel est le rôle de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans le contexte traductionnel du premier clivage embryonnaire de l'oursin ?

(b) Dans les ovules non fécondés la synthèse protéique globale est très faible, mais un niveau résiduel est néanmoins présent. Dans le cadre de cette synthèse protéique, il serait donc intéressant de vérifier à ce stade si des synthèses sélectives sont actives. Quel est l'impact des mécanismes évoqués au point (a) sur le recrutement polysomal des ARNm maternels ? Quels sont les messagers traduits spécifiquement dans les ovules et les embryons d'oursin ?

Comment est modulé le traductome lorsque la synthèse protéique dans les embryons d'oursin est inhibée par des inducteurs apoptotiques ?



CHAPITRE II.



RESULTATS

## II. 1.

---

### **Le rôle de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ dans les ovules et embryons d'oursin, en réponse à la fécondation**

Chez l'oursin les premières divisions mitotiques après fécondation reposent principalement sur la traduction des ARNm maternels. C'est un modèle favorable pour élucider le réseau des acteurs impliqués dans le contrôle traductionnel au cours du développement précoce.

Le facteur de traduction eIF2 (*eukaryotic Initiation Factor 2*) est un régulateur clé de la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes. Lorsque la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2 est phosphorylée, l'étape d'initiation de la traduction est inhibée.

Dans les ovules non fécondés d'oursin, eIF2 $\alpha$  est physiologiquement phosphorylée et la fécondation déclenche sa déphosphorylation. Ce processus se corréle avec une augmentation de la synthèse protéique, qui est indispensable pour la première division mitotique embryonnaire.

Par Western Blot nous avons observé la présence de la forme phosphorylée d'eIF2 $\alpha$  dans les ovules non fécondés et sa diminution significative après fécondation.

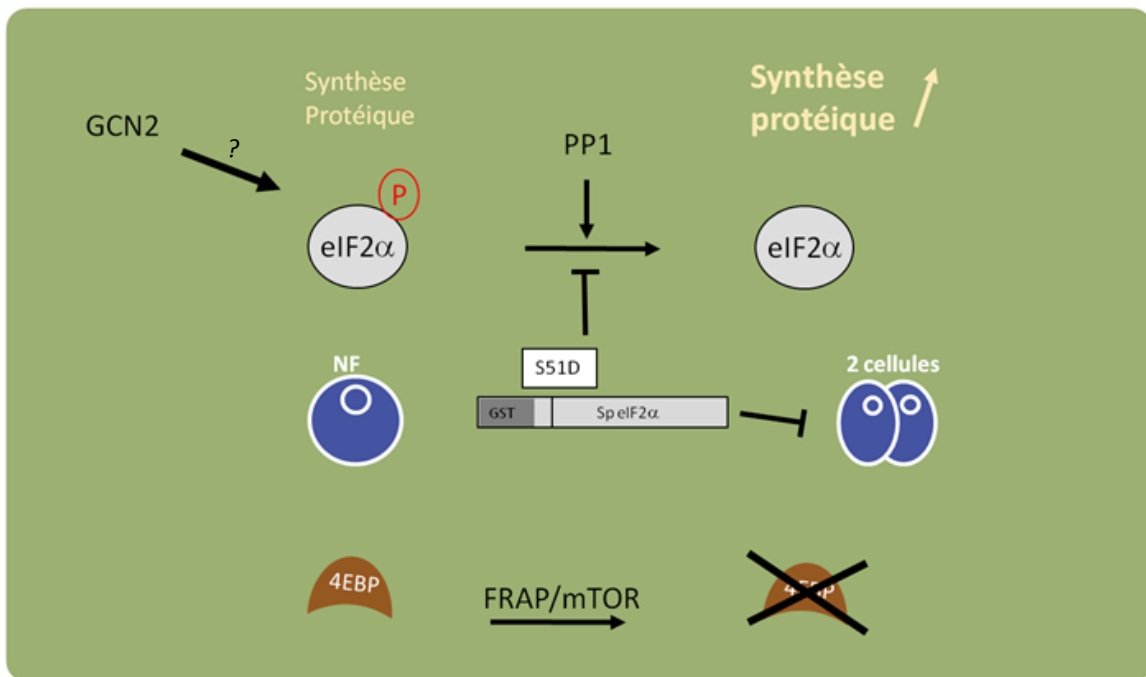
Nous avons montré que l'induction de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  après fécondation est intimement liée à une inhibition de la synthèse protéique et un arrêt du cycle cellulaire.

Nous avons analysé l'impact de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sur le premier clivage des œufs d'oursin. Les ovules ont été microinjectés avec la protéine de fusion eIF2 $\alpha$ -GST clonée et produite dans un système bactérien, sous la forme sauvage ou mutante : un mutant qui mime la phosphorylation (S  $\rightarrow$  D) et un autre qui est non-phosphorylable (S  $\rightarrow$  A). La microinjection du mutant S  $\rightarrow$  D a inhibé la division cellulaire pour 50% des embryons, alors que le mutant S  $\rightarrow$  A n'a pas produit d'effets significatifs. Nous avons également montré que la PP1 (phosphatase 1) est impliquée dans la régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans l'embryon précoce d'oursin. Nous

avons émis l'hypothèse que la kinase GCN2 (*General Control Nondepressible 2*) serait également impliquée dans le contrôle de l'équilibre entre la forme phosphorylée et celle non-phosphorylée avant et après fécondation.

La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  joue donc un rôle important pour la synthèse protéique qui est induite en conditions physiologiques pendant le développement précoce en réponse à la fécondation. Ainsi, s'y dessine un contexte multifactoriel, puisque l'inhibiteur de la traduction coiffe dépendante 4E-BP est présent dans les ovules et dégradé après fécondation (*Figure 2.1*).

Bilan :



*Figure 2.1.* Schéma bilan de la régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les ovules et embryons d'oursin. En conditions physiologiques, la synthèse protéique augmente en réponse à la fécondation. Cette augmentation est sous dépendance de la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  stimulée par la PP1 et qui peut être inhibée par un mutant S->D mimant la phosphorylation sur la Ser 51 d'eIF2 $\alpha$ . La kinase GCN2 serait impliquée dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les ovules non fécondés. Dans ce contexte du développement précoce de l'oursin, l'inhibiteur de la traduction coiffe dépendante 4EBP est présent dans les ovules avant fécondation et dégradé en réponse à la fécondation (Salaun *et al.*, 2003). Ces mécanismes régulateurs de la traduction dessinent un contexte multifactoriel qui contrôle le recrutement des messagers maternels, et par conséquence, le développement précoce de l'oursin.

Article 1 (en révision à *Dev. Biol.*)

**Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  is essential for protein synthesis increase and cell cycle progression after sea urchin fertilization.**

Vlad Costache<sup>1,2,3</sup>, Stefania Bilotto<sup>1,2,3,\*</sup>, Patrick Cormier<sup>1,2,3</sup> and Julia Morales<sup>1,2,3¶</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR7150 Equipe Traduction Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique  
29680 Roscoff France

<sup>2</sup>UPMC Univ Paris 06, UMR 7150, Equipe Traduction Cycle Cellulaire et Développement,  
Station Biologique 29680 Roscoff, France;

<sup>3</sup>Université Européenne de Bretagne, Roscoff, France.

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

Tel : (33) 2 98292369 Fax : (33) 2 98292324

e-mail: [morales@sb-roscoff.fr](mailto:morales@sb-roscoff.fr)

Running title: eIF2 $\alpha$  regulation at fertilization

\* Present address: National Council Research, 83100 Avellino, Italy

## **ABSTRACT**

The eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) is a key regulator of protein synthesis in eukaryotic cells, implicated in the initiation step of translation. Fertilization of the sea urchin eggs triggers a rapid increase in protein synthesis activity, which is necessary for the progress into embryonic cell cycles. Here we demonstrate that fertilization triggers eIF2 $\alpha$  dephosphorylation, concomitant with an increase in protein synthesis and that induction of the eIF2 $\alpha$  phosphorylation is intimately linked with an inhibition of protein synthesis and cell cycle arrest. Using a phospho-mimetic protein microinjected into sea urchin eggs, we showed that dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  is necessary for cell division progression following fertilization. Our results demonstrate that regulation of eIF2 $\alpha$  plays an important role in the protein synthesis rise that occurs during early development following fertilization.

**Keywords:** translation factors / protein synthesis / sea urchin / fertilization/ eIF2

## **INTRODUCTION**

Eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) plays a key role in the regulation of mRNA translation. eIF2 composed of three subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) binds both GTP and initiator methionyl-tRNA to form a ternary complex. eIF2 mediates the binding of initiator methionyl-tRNA to the ribosomes during the initiation step of translation (Pestova et al., 2007; Proud, 2005). Phosphorylation of the alpha subunit of eIF2 at a conserved serine (Ser-51 in mammals) is a widely used mechanism of translational control in many organisms. Phosphorylated eIF2 $\alpha$  has an increased affinity to its guanine nucleotide exchange factor eIF2B, leading to the sequestering of eIF2B as an inactive complex with eIF2 and GDP. General protein synthesis is then inhibited because of the decreased overall rate of guanine nucleotide exchange on the remaining unphosphorylated eIF2; paradoxically the translation of a subset of mRNAs containing upstream short open reading frames is stimulated (Jackson et al., 2010). Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is performed by four known serine/threonine protein kinases that share a related kinase domain but respond to different stimuli through specific regulatory domains : the general control non-derepressible 2 (GCN2) activated by uncharged tRNA, the PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) that is activated by misfolded proteins in endoplasmic reticulum, the double-stranded RNA protein kinase (PKR) that responds to viral infection, and the heme-regulated inhibitor kinase (HRI) that is activated by heme deficiency (Dever et al., 2007). GCN2 is present in all eukaryotes, PERK has been identified in metazoans, HRI is found in vertebrates and in some species of yeasts, insects and invertebrates, PKR is restricted to vertebrates. It is currently accepted that translational control by eIF2 $\alpha$  phosphorylation is a conserved adaptation to cell stress that existed since the onset of eukaryotes (Hernandez et al., 2010).

Fertilization of the sea urchin egg offers the opportunity to address translational regulation in a physiological situation and outside the condition of stress. In unfertilized eggs, protein synthesis occurs at a relatively low rate. Within minutes after fertilization, the rate of protein synthesis is stimulated, independently of mRNA transcription and ribosome biogenesis. Furthermore, protein synthesis is necessary for the onset of first cell division (Wagenaar, 1983). Translational up-regulation is exerted through multifactorial mechanisms, including mRNA recruitment into polysomes and increased rates of translation initiation and elongation (Brandis and Raff, 1979; Hille and Albers, 1979). The stimulation in the rate of protein synthesis in sea urchin egg extracts was observed after the addition of exogenous

eIF2, eIF2B or eIF4 (Akkaraju et al., 1991; Colin et al., 1987; Huang et al., 1987), suggesting that their activities could play a regulatory role after fertilization. The cap-dependent translation inhibitor 4E-BP (Oulhen et al., 2009) is rapidly phosphorylated and degraded following fertilization of sea urchin eggs leading to release of eIF4E (Cormier et al., 2001; Salaun et al., 2003) and its association with the scaffolding protein eIF4G (Oulhen et al., 2007). Therefore eIF4E is now recognized as a crucial actor for the onset of the first mitotic division following fertilization, suggesting that cap-dependent translation is highly regulated during this process (Gilbert, 2006). However translational regulation during fertilization may not be exerted by this one actor only, since the addition of other factors such as eIF2 and eIF2B in sea urchin egg extracts stimulated protein synthesis rate (Akkaraju et al., 1991; Winkler et al., 1985). This observation suggests that the recycling of eIF2 is also an important regulatory step of protein synthesis upon fertilization. Recently, we showed that protein synthesis is inhibited in response to the treatment of embryos with the DNA-damaging agent MMS in correlation with the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  subunit (Le Bouffant et al., 2008). In this paper, we analyze the role of the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  in the translational activation and in the first mitosis following fertilization.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Chemicals***

Rabbit polyclonal antibody directed against full length eIF2 $\alpha$  (FL-315) was obtained from Santa Cruz. Rabbit polyclonal antibody directed against phosphorylated Ser51 eIF2 $\alpha$  (9721) was obtained from Cell Signaling. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from DAKO. Anti-actin antibody, DL-methioninol, L-leucinol and calyculin A were purchased from Sigma.

### ***Handling and treatment of Eggs and Embryos***

Sea urchins (*Sphaerechinus granularis*) were collected in the Brest area (France) and maintained in running seawater. Spawning of gametes was induced by intracoelomic injection of 0.1M acetylcholine. Eggs, collected in 0.22- $\mu$ m Millipore-filtered seawater, were dejellied by swirling for 30 seconds in filtered seawater (pH 5), rinsed twice in fresh seawater and suspended in filtered seawater at 5% (v/v) dilution. Diluted sperm was added to the eggs and withdrawn after 5 min. Experiments were only performed on batches exhibiting greater than

90% fertilization. Each experiment used gametes and eggs from a single female. At the indicated time post-fertilization, inhibitors were added to the incubation medium at the indicated concentration. To obtain total protein extracts at different times following fertilization, 0.2 ml of 5% embryo culture were taken, and the pelleted cells were homogenized in 0.1 ml SDS-fix buffer (2% sodium dodecylsulfate, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8).

### ***Western blot analyses***

Electrophoretic resolution of proteins was performed under SDS denaturing conditions on a polyacrylamide gel. Proteins were electro-transferred from the gel onto nitrocellulose membranes (Amersham). The membranes were saturated for 1 hour in Tris-Buffered Saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 and 1-5% Bovine Serum Albumin. Membranes were incubated overnight with antibodies directed against full-length (FL) eIF2 $\alpha$  (1:1000), phospho-eIF2 $\alpha$  (1:1000) and actin (1:500). Secondary peroxidase conjugated antibodies were used at 1:5000 for full length proteins and 1:2000 for phosphorylated proteins. Revelation was done by ECL or ECL+ methods according to the manufacturer's instructions (Amersham). Quantification was done using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the US National Institutes of Health).

### ***In vivo protein synthesis***

Protein synthesis activity was measured *in vivo*: embryos (5% suspension in seawater) were cultured in continuous presence of [<sup>35</sup>S]-L-methionine at the final concentration of 5  $\mu$ Ci/ml or alternatively, batches of embryos were taken two hours after fertilization and incubated in the presence of [<sup>35</sup>S]-L-methionine for 30 minutes at a final concentration of 10  $\mu$ Ci/ml. [<sup>35</sup>S]-L-methionine incorporation into proteins was measured on duplicate aliquots after 10% TCA precipitation on Whatman 3M filters and counting in a scintillation counter in the presence of Optiphase Supermix scintillation liquid as described in Le Bouffant et al. (2008).

### ***Cloning and site directed mutagenesis***

Forward (5'-GGGGGGGATCCCCGATTCGTGTCGATTCTACGAG-3') and reverse (5'-CCCCCGAATTCTTAGTCTTCCTCGTTTCCAATTTCTTCC-3') primers designed from the *Strongylocentrotus purpuratus* genome were used to amplify a 938-bp fragment by PCR using a *S. purpuratus* cDNA library. The 938-bp fragment (EMBL sequence XP779939) was digested by EcoRI and BamHI and inserted into plasmid pGEX4T-1 (GE HealthCare) cut



with the same enzymes to obtain the wild-type GST-eIF2 $\alpha$  clone. Mutants were obtained by site directed mutagenesis of the plasmids pGEX-eIF2 $\alpha$  using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer, with the following primers:

S51D = 5'- ATGATCCTGCTCAGTGAGCTGGATAGAAGGCGTATCAGATCCATC-3' and 5'-GATGGATCTGATACGCCTTCTATCCAGCTCACTGAGCAGGATCAT-3',

S51A = 5'-CTGCTCAGTGAGCTGGCGAGAAGGCGTATCA-3' and 5'-TGATACGCCTTCTCGCCAGCTCACTGAGCAG-3').

Mutants and wild type inserts were verified by sequencing on an Applied Biosystems AB3130 automatic sequencer at the Génopole Ouest sequencing facility in Roscoff (France).

### ***Fusion protein purification***

Plasmids containing the GST-eIF2 $\alpha$ S51D or GST-eIF2 $\alpha$ S51A or GST alone were inserted into Rosetta competent bacterial strain (Novagen). The proteins were expressed in overnight cultures at 20°C with vigorous shaking. Protein over-expression was induced during 3 hours by adding 0.5mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 1 OD A<sub>600</sub>. Sedimented cells were resuspended in 1x Phosphate-Buffered Saline (PBS) with anti-proteases (1 mM AEBSF, 2  $\mu$ g/ml leupeptin and 10  $\mu$ g/ml aprotinin) and disrupted using a French Press. The lysate was treated with 1% Triton X-100 30 minutes at room temperature. Fusion proteins were purified on glutathione sepharose 4B beads (GE Healthcare; 0.5  $\mu$ l beads for 1 ml of lysate at 4°C for 1 hour with a gentle agitation). After two washings in 1x PBS and anti-proteases, fusion proteins were recovered in elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM reduced glutathione, pH 8).

### ***Microinjection***

Fusion proteins were dialyzed overnight at 4°C against microinjection buffer (10 mM HEPES pH 7.0, 200 mM KCl, 550 mM mannitol) and diluted at 600 ng/ $\mu$ l in the same buffer containing 1 mM Alexa Fluor 488-dextran (Molecular Probes) to allow visualization of injected eggs. The Femtojet microinjection system (Eppendorf) resulted in the injection of approximately 5% of the volume of each egg with an estimated final concentration of the exogenous protein of 0.4  $\mu$ M. Cleavage was scored by observation under a fluorescence microscope (Olympus IX-51). The statistical analysis for measuring significance levels when comparing the different data sets was done by Mann-Whitney (Wilcoxon) test using Statgraphics Plus 5.1 software.

## RESULTS

### *Phosphorylation of highly conserved site of eIF2 $\alpha$ is regulated following fertilization in sea urchin.*

The sea urchin genome has been made available in 2006 (Sodergren et al., 2006) and one gene encoding for eIF2 $\alpha$  is present (SPU\_003646; Morales et al., 2006). Primers were designed to amplify the eIF2 $\alpha$  full open reading frame from a *S. purpuratus* cDNA library, and yielded a 313 aminoacids protein (EMBL#XP779939, fig. 1). The sea urchin protein is 70% identical with the human eIF2 $\alpha$ . Two cystein residues at position 69 and 97 (indicated by a star in fig. 1) are involved in a disulfide bridge thought to stabilize the interaction of two domains in the human eIF2 $\alpha$  protein, the OB domain (oligonucleotide-binding domain consisting of a five-stranded anti parallel  $\beta$ -barrel) and the  $\alpha$ -helical domain (Nonato et al., 2002). It has been suggested that Cys residue in position 69 is characteristic of vertebrate eIF2 $\alpha$ , as it is not conserved in drosophila or yeast (Garner et al., 2003). The sequence of the sea urchin eIF2 $\alpha$  showed that the residue at position 69 is also a cystein. A further search into genome databases from yeast to human showed that this cystein residue is present in deuterostomes from sea urchin to human, in three out four species of nematodes, in cnidarians, but indeed absent in insects and in yeasts. These data therefore exclude the hypothesis that the Cys residue at position 69 is specific of vertebrates and suggest that this residue is conserved throughout metazoans and has been lost in some phyla.

Residues in the phosphorylation loop region surrounding the eIF2 $\alpha$  regulatory phosphorylation site (Ser-51 in the human protein and Ser-50 in the sea urchin protein) is highly conserved among eIF2 $\alpha$  orthologs (fig. 1; Dever et al., 2007) suggesting a possible control of translation at this level in sea urchin. We detected the sea urchin full length eIF2 $\alpha$  protein by western blot using an antibody directed against the human protein: a single band at the expected size of 32kDa was detected (fig. 2A). In order to study the eIF2 $\alpha$  phosphorylation status following fertilization, we used an antibody directed against the phospho-serine 51 of the human protein, which recognized a band in a sea urchin unfertilized egg extract at the expected size (32kDa; fig. 2A). eIF2 $\alpha$  protein was present under a phosphorylated form in unfertilized eggs and fertilization triggered a rapid dephosphorylation with only 50% of the phosphorylated form remaining at 15 minutes and maximal dephosphorylation at 60 minutes following fertilization (fig. 2A and 2B). The

dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  is associated with the increase of protein synthesis activity as shown by the incorporation of labeled methionine into proteins (fig. 2B).

***eIF2 $\alpha$  phosphorylation correlates with the inhibition of protein synthesis activity and cell cycle progression***

To test whether phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  could play a role in the activation of the protein synthesis induced by fertilization and required for the first mitotic division of the sea urchin embryo, we decided to impose changes on the phosphorylation state of this translational factor. It has been shown previously that the phosphatase inhibitor, calyculin A, inhibits the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in mammalian cell (Boyce et al., 2005; Brush et al., 2003). Calyculin A was used to manipulate the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in sea urchin eggs. In the unfertilized sea urchin eggs, the phosphorylation status of eIF2 $\alpha$  remained unchanged by calyculin A treatment suggesting low turnover for the phosphorylation/dephosphorylation mechanism (data not shown). The effect of calyculin A, added 20 minutes post-fertilization, was therefore analyzed in fertilized eggs when most eIF2 $\alpha$  was dephosphorylated (see fig. 2). The phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was analyzed by Western blot using the antibody directed against the phospho-serine 51 of the human protein. Treatment of the embryos with 1  $\mu$ M calyculin A increases the level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation to the one observed in unfertilized eggs (fig. 3A). Protein synthesis activity was inhibited by 68% (s.d. $\pm$  2.8) in presence of calyculin A, when compared to control embryos taken at 2 hours post-fertilization (fig. 3B). Finally, incubation of embryos with calyculin A induced a complete inhibition of the first cell division triggered by fertilization (fig. 3C).

Previous reports showed that alcoholic derivatives of amino acids were able to induce the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  (Kimball et al., 1991; Zhang et al., 2002). Sea urchin embryos taken at 20 minutes post-fertilization (see figure 1) were exposed to the alcohol derivatives of methionine and leucine, methioninol and leucinol, and monitored for eIF2 $\alpha$  phosphorylation status. Incubation of embryos with methioninol or leucinol increased the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  (fig. 4A) and protein synthesis activity was dramatically inhibited in presence of 10 mM methioninol and 4 mM leucinol (fig. 4B). Treatment of the embryos with aminoacid alcohols induced a dose-dependent inhibition of the first cell division triggered by fertilization, with an IC<sub>50</sub> on cell division of 6 mM methioninol and 2.5 mM leucinol respectively (fig. 4C). It is noteworthy that the minimal concentration of amino alcohol acid

that induced the maximal eIF2 $\alpha$  phosphorylation was the concentration that inhibited drastically the protein synthesis activity and the first cell division.

Taken together, these data suggest that eIF2 $\alpha$  must be dephosphorylated to allow the increase of protein synthesis and cell division triggered by fertilization.

***A mutant mimicking phosphorylated eIF2 $\alpha$  impairs the first cell division of sea urchin embryo.***

The above data suggested that the eIF2 $\alpha$  phosphorylation status was important for the first cell division, however we cannot rule out eIF2 $\alpha$ -independent effects of the drug treatments on cell cycle progression. Therefore, we decided to use a phospho-mimetic variant of eIF2 $\alpha$  to assess directly its effect on cell division. eIF2 $\alpha$  from sea urchin was cloned in fusion with the GST protein, and two mutant proteins on the residue corresponding to the phospho-serine were produced using site directed mutation: S51D, mimicking a constitutively phosphorylated protein, and S51A, mimicking a non phosphorylatable protein. The introduction of the exogenous protein was done by microinjection into unfertilized eggs, and the first division was scored during three hours after fertilization. To assess for aspecific effects of the microinjection, the GST moiety alone was injected and showed no effect on the kinetics of the first cell division as compared to non injected eggs after fertilization. While the injection of the non-phosphorylatable mutant (S51A) had no significant effect on the cell division, the injection of the mutant mimicking the phosphorylated protein (S51D) affected the kinetics of cell division (fig. 5A). The S51D mutant induced a significant inhibition (51.9%, s.d. $\pm$  9.4) on the first cell division (fig. 5B).

## **DISCUSSION**

The mechanism by which the rate of protein synthesis increases after fertilization is a long standing and fundamental question in biology. Two decades ago, it was suggested that eIF2 activity could play a role in the protein synthesis regulation occurring at fertilization in sea urchin (Akkaraju et al., 1991; Dholakia et al., 1990). We showed in this report physiological changes of phosphorylation of the eIF2 $\alpha$  subunit during fertilization of the sea urchin egg. By using a phosphomimetic mutant of eIF2 $\alpha$ , we showed that dephosphorylation

of eIF2 $\alpha$  is necessary for the cell cycle division that follows the fertilization of sea urchin eggs. Induction of the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  by phosphatase inhibitor or by activating a kinase signaling pathway leads to the inhibition of protein synthesis, and to subsequent cell cycle arrest. Therefore, our data demonstrate that eIF2 $\alpha$  in sea urchin contributes to the regulation of protein synthesis necessary for the onset of the first cell division.

One major regulation of protein synthesis activity resides on the assembly of initiation factors onto mRNAs (reviewed in Jackson et al., 2010). In sea urchin eggs, protein synthesis stimulation upon fertilization has been shown to depend on the availability of the cap binding protein eIF4E through the release from and degradation of its translational repressor 4E-BP (Cormier et al., 2001; Oulhen et al., 2007; Salaun et al., 2003). One other major regulation of protein synthesis activity resides on the assembly of the 43S complex (Lorsch and Dever, 2010). The initiation factor eIF2 $\alpha$  plays also a role in the translation activation following fertilization, since inducing its phosphorylation is sufficient to inhibit protein synthesis activity in embryos, when the cap binding eIF4E is available for translation. Since both complexes formations are the rate-limiting steps in translation (Hershey and Merrick, 2000), we hypothesize that the unfertilized egg is maintained translationally inactive by two major regulators, namely eIF4E and eIF2 $\alpha$ , to ensure that no inappropriate translation occurs without fertilization.

Our results suggest furthermore that regulators of eIF2 $\alpha$  phosphorylation (kinase and phosphatase activities) are modulated at fertilization. Phosphatase inhibitor calyculin A increased the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  following treatment of fertilized eggs, whereas it did not affect significantly the level of phosphorylated eIF2 $\alpha$  in unfertilized eggs, suggesting that a phosphatase activity acting upon eIF2 $\alpha$  rises after fertilization. In mammalian cells, eIF2 $\alpha$  can be dephosphorylated by PP1 (protein phosphatase 1) associated with two different regulatory proteins: the stress-inducible Ppp1r15a/GADD34 (Brush et al., 2003; Novoa et al., 2001) and the constitutive Ppp1r15b/CREP (Jousse et al., 2003). Salubrinal induces eIF2 $\alpha$  phosphorylation of mammalian cells and inhibits eIF2 $\alpha$  dephosphorylation mediated by both ER stress-induced and constitutive phosphatase complexes (Boyce et al., 2005). In contrast to calyculin A, no effect on eIF2 $\alpha$  phosphorylation is induced by incubation of sea urchin embryos with salubrinal. It should be noted that no homologues of GADD34 or CREP were found in the sea urchin genome (SpBase genome database, <http://spbase.org>; Cameron et al.,

2009). This raises the question of the identity of the *in vivo* phosphatase complex responsible for the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  at fertilization.

An interesting question is which kinase(s) is (are) involved in the regulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation and hence protein synthesis and occurrence of cell cycle at fertilization. Three eIF2 $\alpha$  kinases have been described in the sea urchin genome, namely Sp-GCN2, Sp-HRI and Sp-PERK (Morales et al., 2006). Transcripts encoding for the three kinases have been detected in early embryo (Cameron et al., 2009), however there is no data available for the stored maternal kinases in the unfertilized eggs. An attractive candidate for the eIF2 $\alpha$  kinase in sea urchin eggs could be GCN2 kinase, based on evidence in mouse oocytes. Recently, Alves et al. (2009) showed that GCN2 is highly expressed and active in mouse unfertilized eggs, correlated with a high level of eIF2 $\alpha$  phosphorylation. Moreover eIF2 $\alpha$  phosphorylation is rapidly reduced after fertilization and in two-cell embryos (Alves et al., 2009). In the sea urchin unfertilized egg extract, a high molecular weight protein of the expected size that could correspond to GCN2 reacts with an antibody raised against a phospho-peptide recognizing the active mouse GCN2 kinase (data not shown), suggesting that GCN2 could be implicated in the phosphorylation changes in eIF2 $\alpha$ . Further work is needed to definitely identify the eIF2 $\alpha$  kinase involved at fertilization.

Because eIF2 $\alpha$  phosphorylation has been regarded mainly as a stress-induced event, our finding that eIF2 $\alpha$  regulation is involved in cell cycle progression during fertilization in sea urchin is appealing. Other studies have recently demonstrated physiological role of eIF2 $\alpha$  regulation in various developmental processes, as in mouse meiotic maturation (Alves et al., 2009), epidermal morphogenesis in *C. elegans* (Nukazuka et al., 2008) and aggregation and proliferation in *Dictyostelium* (Bowman et al., 2011; Fang et al., 2003). Impairment of regulated eIF2 $\alpha$  dephosphorylation leads to growth arrest and degeneration of mouse embryos, consistent with the known role of uncontrolled eIF2 $\alpha$  phosphorylation in promoting cell death (Harding et al., 2009; Srivastava et al., 1998). Although phosphorylation of eIF2 $\alpha$  leads to an inhibition of total protein synthesis activity, it triggers the selective translation of specific mRNAs, as exemplified by GCN4 in yeast during amino acid starvation or ATF4 during stress in mammals (reviewed in Jackson et al., 2010). Similarly, during *Dictyostelium* development, translation of mRNAs encoding for chaperones are upregulated in response to eIF2 $\alpha$  phosphorylation (Bowman et al., 2011). An evaluation of the mRNAs that are recruited into polysomes before and after fertilization will bring insights on the role of eIF2 $\alpha$

phosphorylation on global and selective translation in sea urchin embryos, and more generally on the translational controls at fertilization and early cleavage stages of embryo development.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank La Ligue contre le Cancer (coordination du Grand Ouest, comités Finistère, Côtes d'Armor, Deux-Sèvres), Région Bretagne, Conseil Général du Finistère, Europole Mer for research grants. We thank Sandrine Boulben, Floriane Celton and Marine Aguilon for technical assistance. V. Costache is a PhD fellow supported by Région Bretagne.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Sequence alignment of eIF2 $\alpha$  proteins.

Amino acid sequences of eIF2 $\alpha$  from *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_779939.1), *Ciona intestinalis* (XP\_002130619.1), human (P05198) and mouse (Q6ZWX6) were aligned using ClustalW. Identical residues are highlighted in black and conserved ones in grey. The phosphorylation site corresponding to the serine 51 is indicated by an arrow. The stars indicate the conserved cysteins at position 69 and 97, involved in the disulfide bridge connecting the oligonucleotide-binding OB domain (black line) and the helical domain (grey line).

**Figure 2:** eIF2 $\alpha$  is dephosphorylated after fertilization.

A-Eggs were fertilized and embryos were taken for Western blot analysis at indicated times after fertilization. Total extracts were analysed by Western blot using an antibody directed against the Ser-51 phosphorylated form of eIF2 $\alpha$  (P-eIF2 $\alpha$ ) and against the full length eIF2 $\alpha$  protein (FL-eIF2 $\alpha$ ). B- The protein synthesis activity was measured by [<sup>35</sup>S]-L-methionine incorporation (circles); eIF2 $\alpha$  phosphorylation level was quantified on Western blots and expressed as a ratio of the phospho- to total eIF2 $\alpha$  (squares). These data are representative of at least three independent experiments.

**Figure 3:** Effect of phosphatase inhibitor calyculin A on (A) phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , (B) protein synthesis and (C) cell division.

Calyculin A at 1 $\mu$ M was added to the embryo culture 20 minutes after fertilization. A- Aliquots of embryos cultured in the absence (control) or presence of 1 $\mu$ M calyculin A were taken at the indicated times following fertilization and analyzed by Western blot with antibodies against phospho-Ser51 eIF2 $\alpha$ , total eIF2 $\alpha$  and actin. A typical experiment out of three is shown here. B- Calyculin A inhibits protein synthesis activity. Incorporation of [<sup>35</sup>S]-L-methionine into proteins is measured at 2 hours after fertilization and expressed as a percentage of incorporation in treated embryos over control embryos. A mean of three independent experiments is shown here. C- Calyculin A inhibits first cell division of sea urchin embryos. A typical experiment (out of three) is shown here.



**Figure 4:** Effect of alcoholic derivatives of aminoacids on (A) phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , (B) protein synthesis and (C) cell division.

A- Aliquots of embryos cultured in the absence (F control) or presence of the indicated concentration of L-leucinol or DL-methioninol were taken at two hours following fertilization and analyzed by Western blot with antibodies against phospho-Ser51 eIF2 $\alpha$ , and actin. A typical experiment out of three is shown here. B- L-leucinol and DL-methioninol inhibit protein synthesis. Incorporation of [<sup>35</sup>S]-L-methionine into proteins is expressed as a percentage of total methionine, measured at 2 hours after fertilization (a mean of three independent experiments). C- Dose response of L-leucinol and DL-methioninol on the first cell division of sea urchin embryos are shown as a mean of 6 (L-leucinol) or 4 (DL-methioninol) independent experiments.

**Figure 5:** Injection of phospho-mimetic eIF2 $\alpha$  mutant inhibits the first cell division.

A- A kinetic of division of injected embryos (representative of 3 independent experiments) with fusion proteins as indicated. About 40 unfertilized eggs per condition were microinjected with 600ng/ $\mu$ l fusion protein (phosphomimetic mutant GST-eIF2 $\alpha$ S51D, non-phosphorylatable mutant GST-eIF2 $\alpha$ S51A, or GST alone), then fertilized along with uninjected eggs (control), and scored for first cell division. B- Cleavage was assessed by observation under light microscope at 135 minutes after fertilization. The results are expressed as a percentage of uninjected control cell division score, vertical bars indicate standard deviation values. Total number of injected embryos and numbers of independent experiments are indicated. Significance was assessed using Mann-Whitney (Wilcoxon) test comparisons. \*  $p < 0.005$  indicates a significant difference in the first cell division of S51D injected embryos in comparison to the GST-injected one.

## REFERENCES

- Akkaraju, G.R., Hansen, L.J., Jagus, R., 1991. Increase in eukaryotic initiation factor 2B activity following fertilization reflects changes in redox potential. *J Biol Chem* 266, 24451-24459.
- Alves, V.S., Motta, F.L., Roffe, M., Delamano, A., Pesquero, J.B., Castilho, B.A., 2009. GCN2 activation and eIF2 $\alpha$  phosphorylation in the maturation of mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 41-44.
- Bowman, R.L., Xiong, Y., Kirsten, J.H., Singleton, C.K., 2011. eIF2 $\alpha$  kinases control chalone production in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell* 10, 494-501.
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., Yuan, J., 2005. A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-939.
- Brandis, J.W., Raff, R.A., 1979. Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilisation. *Nature* 278, 467-469.
- Brush, M.H., Weiser, D.C., Shenolikar, S., 2003. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 23, 1292-1303.
- Cameron, R.A., Samanta, M., Yuan, A., He, D., Davidson, E., 2009. SpBase: the sea urchin genome database and web site. *Nucleic Acids Res* 37, D750-754.
- Colin, A.M., Brown, B.D., Dholakia, J.N., Woodley, C.L., Wahba, A.J., Hille, M.B., 1987. Evidence for simultaneous derepression of messenger RNA and the guanine nucleotide exchange factor in fertilized sea urchin eggs. *Dev Biol* 123, 354-363.
- 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.
- Dever, T.E., Dar, A.C., Sicheri, F., 2007. The eIF2 $\alpha$  Kinases, in: Mathews, M.B., Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. (Eds.), *Translational Control in Biology and Medicine* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 319-344.
- Dholakia, J.N., Xu, Z., Hille, M.B., Wahba, A.J., 1990. Purification and characterization of sea urchin initiation factor 2. The requirement of guanine nucleotide exchange factor for the release of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2-bound GDP. *J Biol Chem* 265, 19319-19323.

- Fang, R., Xiong, Y., Singleton, C.K., 2003. IfkA, a presumptive eIF2  $\alpha$  kinase of Dictyostelium, is required for proper timing of aggregation and regulation of mound size. *BMC Dev Biol* 3, 3.
- Garner, J.N., Joshi, B., Jagus, R., 2003. Characterization of rainbow trout and zebrafish eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  and its response to endoplasmic reticulum stress and IPNV infection. *Dev Comp Immunol* 27, 217-231.
- Gilbert, S.F., 2006. *Developmental Biology*, Eighth Edition. Sinauer Associates.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.J., Kaufman, R.J., Ron, D., 2009. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1832-1837.
- Hernandez, G., Altmann, M., Lasko, P., 2010. Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 35, 63-73.
- Hershey, J.W., Merrick, W.C., 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, in: Sonenberg, N., Hershey, J.W., Mathews, M.B. (Eds.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 33-88.
- Hille, M.B., Albers, A.A., 1979. Efficiency of protein synthesis after fertilisation of sea urchin eggs. *Nature* 278, 469-471.
- Huang, W.I., Hansen, L.J., Merrick, W.C., Jagus, R., 1987. Inhibitor of eukaryotic initiation factor 4F activity in unfertilized sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6359-6363.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T.V., 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 $\alpha$  phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163, 767-775.
- Kimball, S.R., Antonetti, D.A., Brawley, R.M., Jefferson, L.S., 1991. Mechanism of inhibition of peptide chain initiation by amino acid deprivation in perfused rat liver. Regulation involving inhibition of eukaryotic initiation factor 2  $\alpha$  phosphatase activity. *J Biol Chem* 266, 1969-1976.
- Le Bouffant, R., Boulben, S., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Belle, R., Morales, J., 2008. Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis

- induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos. *Exp Cell Res* 314, 961-968.
- Lorsch, J.R., Dever, T.E., 2010. Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *J Biol Chem* 285, 21203-21207.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C.A., Beane, W.S., Cormier, P., 2006. Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* 300, 293-307.
- Nonato, M.C., Widom, J., Clardy, J., 2002. Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ . *J Biol Chem* 277, 17057-17061.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol* 153, 1011-1022.
- Nukazuka, A., Fujisawa, H., Inada, T., Oda, Y., Takagi, S., 2008. Semaphorin controls epidermal morphogenesis by stimulating mRNA translation via eIF2 $\alpha$  in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 22, 1025-1036.
- Oulhen, N., Boulben, S., Bidinosti, M., Morales, J., Cormier, P., Cosson, B., 2009. A variant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS ONE* 4, e5070.
- Oulhen, N., Salaun, P., Cosson, B., Cormier, P., Morales, J., 2007. After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J Cell Sci* 120, 425-434.
- Pestova, T.V., Lorsch, J.R., Hellen, C.U., 2007. The mechanism of translation initiation in eukaryotes, in: Mathews, M.B., Sonenberg, N., Hershey, J.W. (Eds.), *Translational control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 87-128.
- Proud, C.G., 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16, 3-12.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N., Cormier, P., 2003. eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 255, 428-439.
- Sodergren, E., Weinstock, G.M., Davidson, E.H., Cameron, R.A., Gibbs, R.A., Angerer, R.C., Angerer, L.M., Arnone, M.I., Burgess, D.R., Burke, R.D., Coffman, J.A., Dean, M., Elphick, M.R., Etensohn, C.A., Foltz, K.R., Hamdoun, A., Hynes, R.O., Klein, W.H., Marzluff, W., McClay, D.R., Morris, R.L., Mushegian, A., Rast, J.P., Smith, L.C., Thorndyke, M.C., Vacquier, V.D., Wessel, G.M., Wray, G., Zhang, L., Elsik, C.G.,

Ermolaeva, O., Hlavina, W., Hofmann, G., Kitts, P., Landrum, M.J., Mackey, A.J., Maglott, D., Panopoulou, G., Poustka, A.J., Pruitt, K., Sapojnikov, V., Song, X., Souvorov, A., Solovyev, V., Wei, Z., Whittaker, C.A., Worley, K., Durbin, K.J., Shen, Y., Fedrigo, O., Garfield, D., Haygood, R., Primus, A., Satija, R., Severson, T., Gonzalez-Garay, M.L., Jackson, A.R., Milosavljevic, A., Tong, M., Killian, C.E., Livingston, B.T., Wilt, F.H., Adams, N., Belle, R., Carbonneau, S., Cheung, R., Cormier, P., Cosson, B., Croce, J., Fernandez-Guerra, A., Genevriere, A.M., Goel, M., Kelkar, H., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Robertson, A.J., Goldstone, J.V., Cole, B., Epel, D., Gold, B., Hahn, M.E., Howard-Ashby, M., Scally, M., Stegeman, J.J., Allgood, E.L., Cool, J., Judkins, K.M., McCafferty, S.S., Musante, A.M., Obar, R.A., Rawson, A.P., Rossetti, B.J., Gibbons, I.R., Hoffman, M.P., Leone, A., Istrail, S., Materna, S.C., Samanta, M.P., Stolc, V., Tongprasit, W., Tu, Q., Bergeron, K.F., Brandhorst, B.P., Whittle, J., Berney, K., Bottjer, D.J., Calestani, C., Peterson, K., Chow, E., Yuan, Q.A., Elhaik, E., Graur, D., Reese, J.T., Bosdet, I., Heesun, S., Marra, M.A., Schein, J., Anderson, M.K., Brockton, V., Buckley, K.M., Cohen, A.H., Fugmann, S.D., Hibino, T., Loza-Coll, M., Majeske, A.J., Messier, C., Nair, S.V., Pancer, Z., Terwilliger, D.P., Agca, C., Arboleda, E., Chen, N., Churcher, A.M., Hallbook, F., Humphrey, G.W., Idris, M.M., Kiyama, T., Liang, S., Mellott, D., Mu, X., Murray, G., Olinski, R.P., Raible, F., Rowe, M., Taylor, J.S., Tessmar-Raible, K., Wang, D., Wilson, K.H., Yaguchi, S., Gaasterland, T., Galindo, B.E., Gunaratne, H.J., Juliano, C., Kinukawa, M., Moy, G.W., Neill, A.T., Nomura, M., Raisch, M., Reade, A., Roux, M.M., Song, J.L., Su, Y.H., Townley, I.K., Voronina, E., Wong, J.L., Amore, G., Branno, M., Brown, E.R., Cavalieri, V., Duboc, V., Duloquin, L., Flytzanis, C., Gache, C., Lapraz, F., Lepage, T., Locascio, A., Martinez, P., Matassi, G., Matranga, V., Range, R., Rizzo, F., Rottinger, E., Beane, W., Bradham, C., Byrum, C., Glenn, T., Hussain, S., Manning, G., Miranda, E., Thomason, R., Walton, K., Wikramanayake, A., Wu, S.Y., Xu, R., Brown, C.T., Chen, L., Gray, R.F., Lee, P.Y., Nam, J., Oliveri, P., Smith, J., Muzny, D., Bell, S., Chacko, J., Cree, A., Curry, S., Davis, C., Dinh, H., Dugan-Rocha, S., Fowler, J., Gill, R., Hamilton, C., Hernandez, J., Hines, S., Hume, J., Jackson, L., Jolivet, A., Kovar, C., Lee, S., Lewis, L., Miner, G., Morgan, M., Nazareth, L.V., Okwuonu, G., Parker, D., Pu, L.L., Thorn, R., Wright, R., 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941-952.

- Srivastava, S.P., Kumar, K.U., Kaufman, R.J., 1998. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273, 2416-2423.
- 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.
- Winkler, M.M., Nelson, E.M., Lashbrook, C., Hershey, J.W., 1985. Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev Biol* 107, 290-300.
- Zhang, P., McGrath, B.C., Reinert, J., Olsen, D.S., Lei, L., Gill, S., Wek, S.A., Vattam, K.M., Wek, R.C., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., Cavener, D.R., 2002. The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol* 22, 6681-6688.

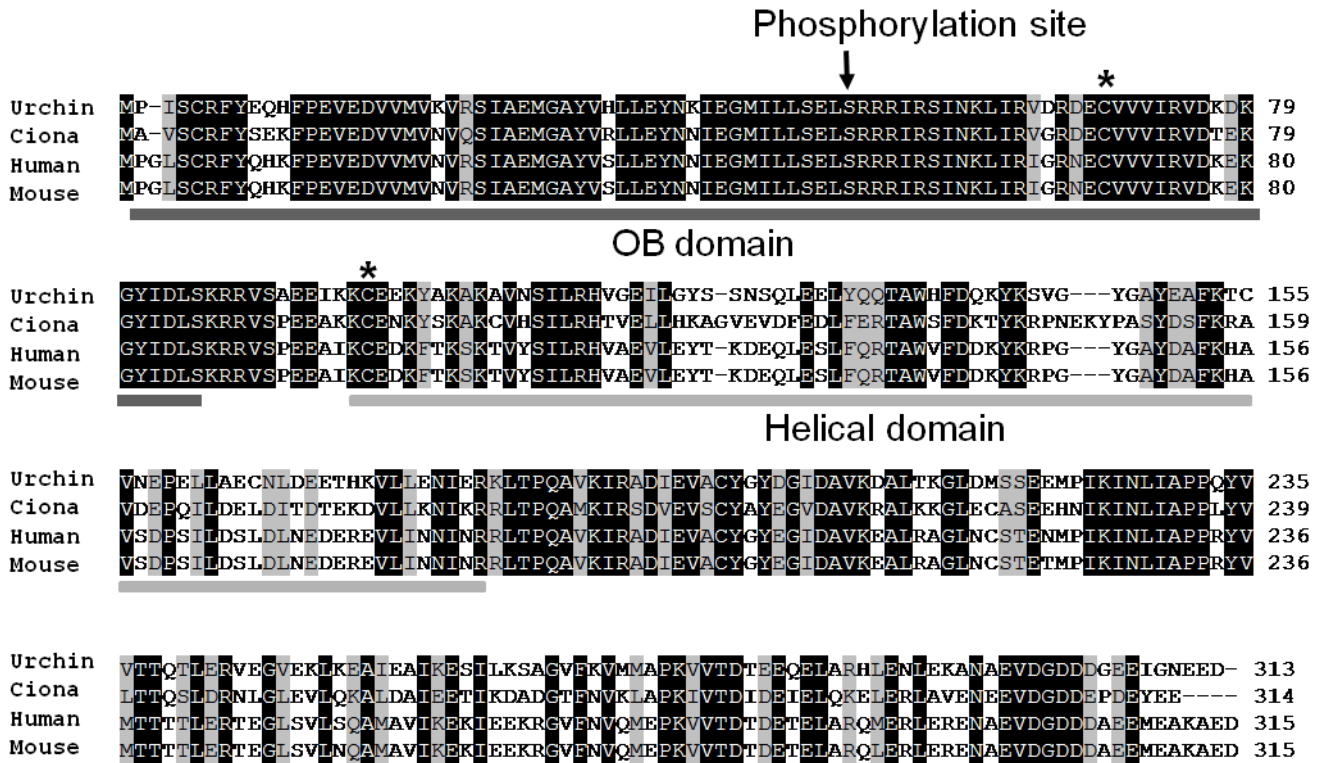


Fig 1

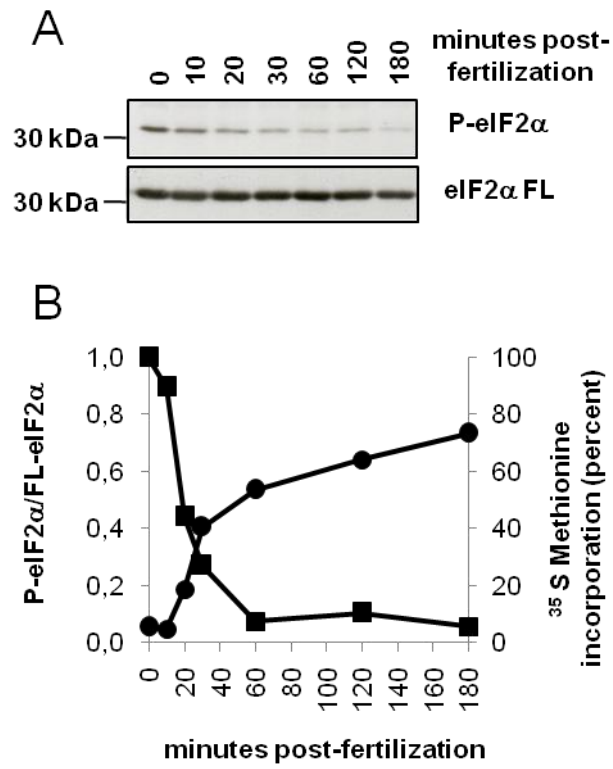


Fig 2



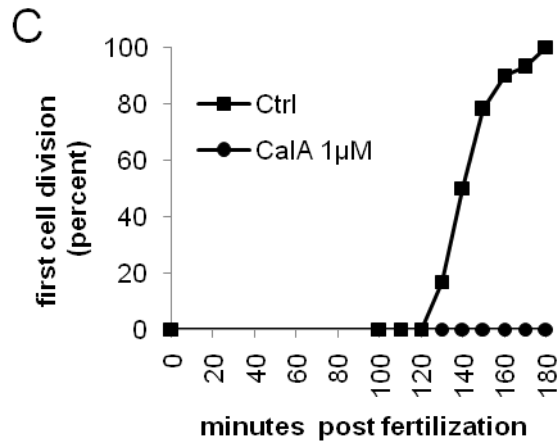
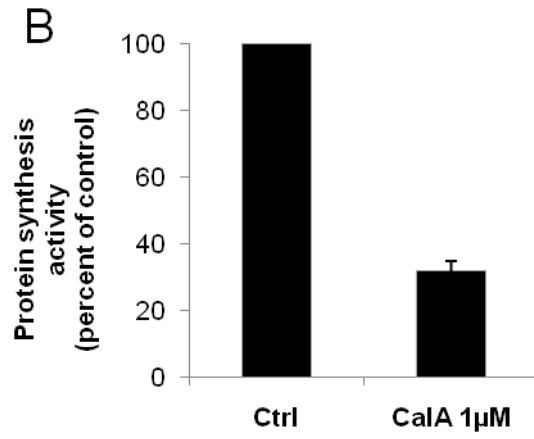
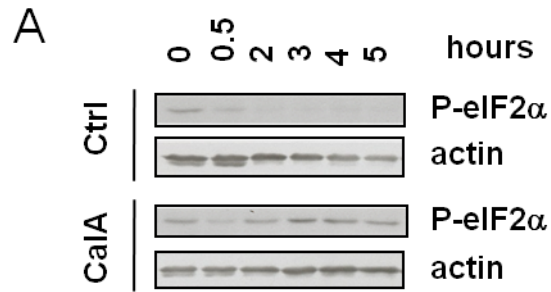


Fig 3

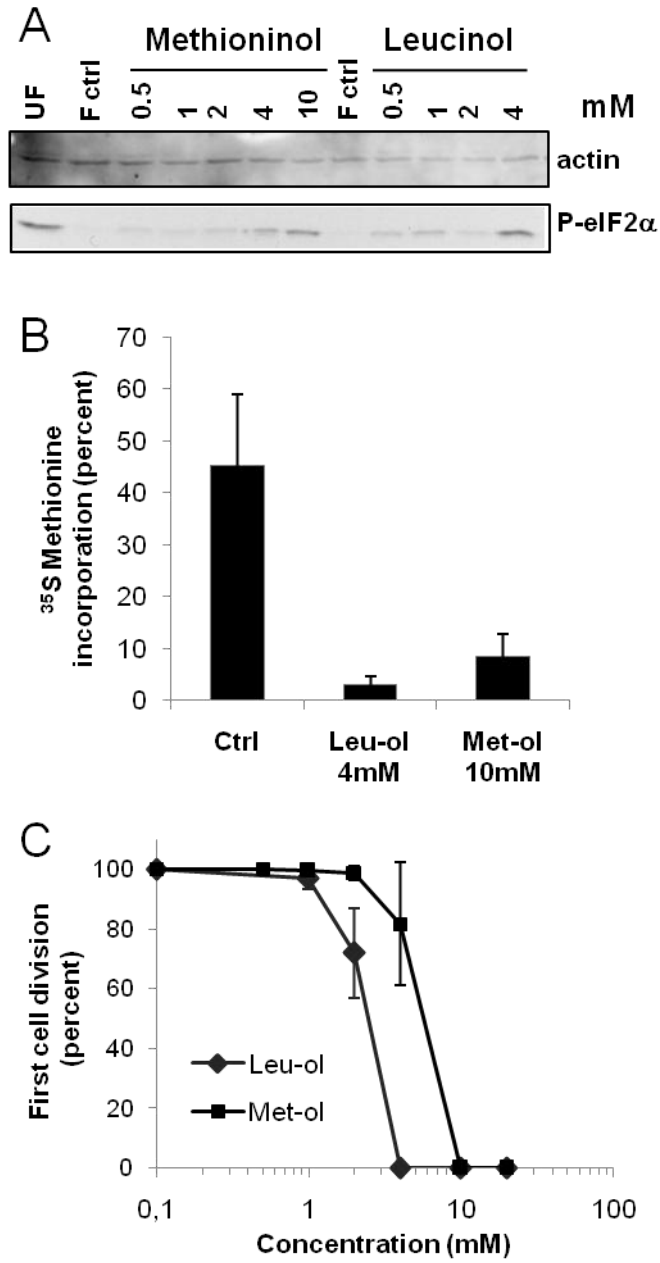


Fig 4

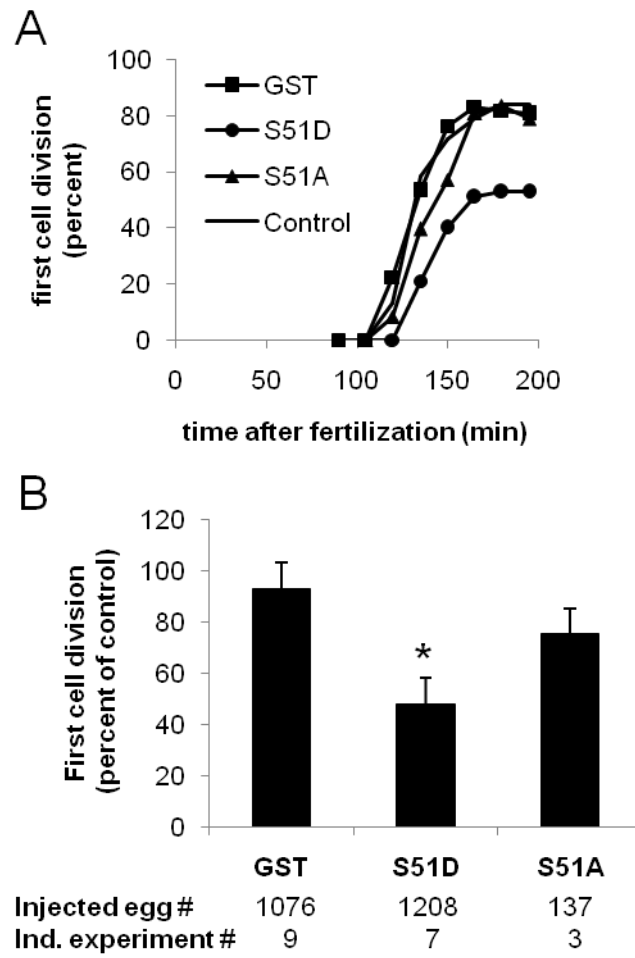
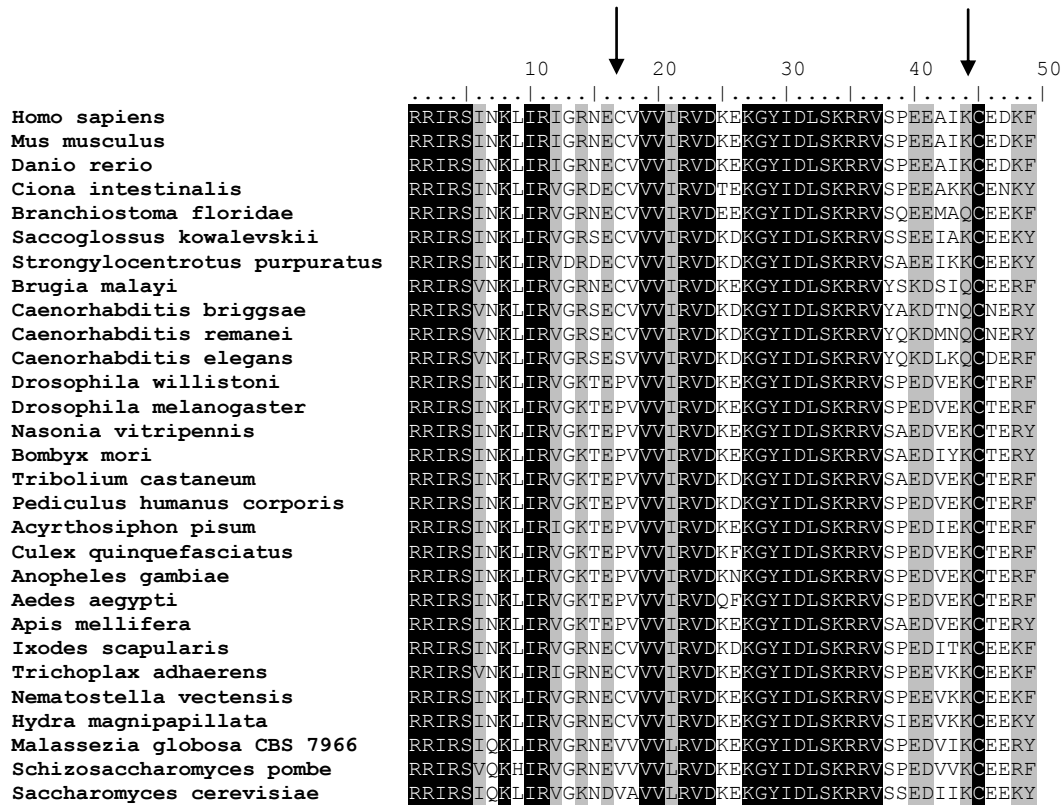
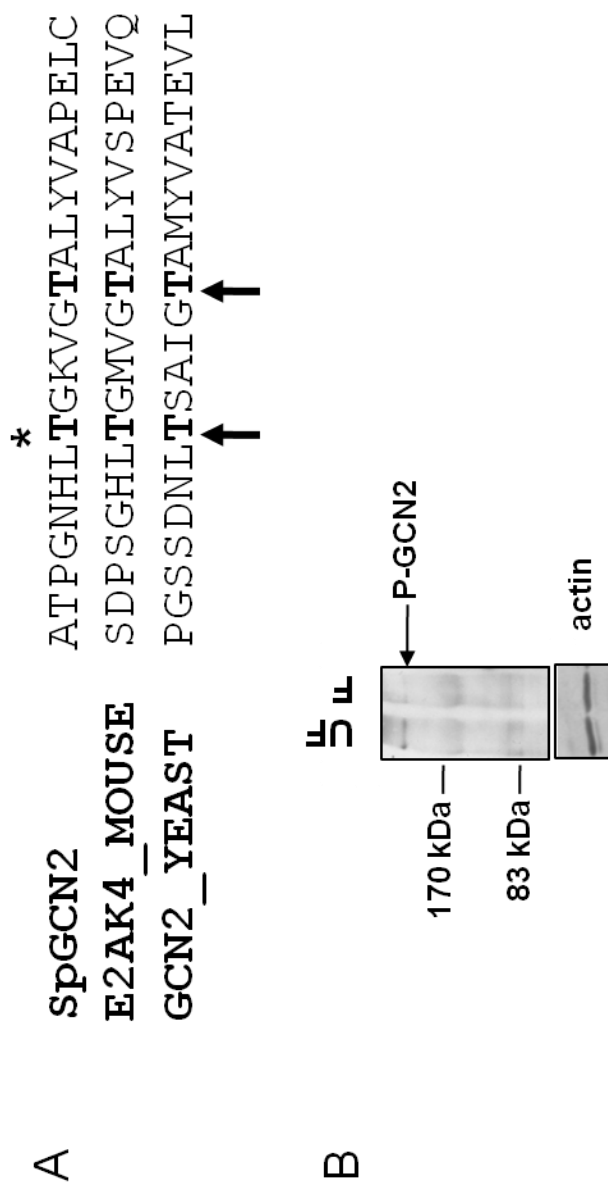


Fig 5



**Alignment of eIF2 $\alpha$  sequences surrounding Cystein residues 69 and 97 (arrows).** The following sequences were used for ClustalW alignment: Homo sapiens P05198, Mus musculus Q6ZWX6, Danio rerio NP\_571875.1, Ciona intestinalis XP\_002130619.1, Branchiostoma floridae XP\_002609596.1, Saccoglossus kowalevskii P\_002730373.1, Strongylocentrotus purpuratus XP\_779939.1, Brugia malayi XP\_001892458.1, Caenorhabditis briggsae XP\_002638834.1, Caenorhabditis remanei XP\_003111411.1, Caenorhabditis elegans NP\_490930.1, Drosophila willistoni XP\_002071219.1, Drosophila melanogaster NP\_573130.1, Nasonia vitripennis XP\_001603365.1, Bombyx mori NP\_001037516.1, Tribolium castaneum XP\_973536.1, Pediculus humanus corporis XP\_002431839.1, Acyrthosiphon pisum XP\_001951950.1, Culex quinquefasciatus XP\_001859687.1, Anopheles gambiae XP\_309455.4, Aedes aegypti XP\_001663853.1, Apis mellifera XP\_001122232.1, Ixodes scapularis XP\_002410599.1, Trichoplax adhaerens XP\_002114113.1, Nematostella vectensis XP\_001633199.1, Hydra magnipapillata XP\_002156465.1, Malassezia globosa CBS 7966 XP\_001729265.1, Schizosaccharomyces pombe NP\_594081.1, Saccharomyces cerevisiae P20459.

**Data not shown**



**GCN2 regulation is present during sea urchin fertilization**

A- Sequence alignment in the activation loop of kinase domain of GCN2 from sea urchin *S. purpuratus* (XP\_785160), mouse (Q9QZ05) and yeast *S. cerevisiae* (P15442). Arrows point at threonine residues which phosphorylation is required for yeast GCN 2 activation (Romano et al, *Mol Cell Biol* 18, 2282-971998). A commercial antibody raised against a phospho-peptide corresponding to residues surrounding Thr898 of mouse GCN2 (indicated by a star) was used for western blot analysis.

B- Western blot analysis was done on unfertilized (UF) and fertilized eggs (F) using antibodies against mouse phospho-Thr898 GCN2 (recognizing the activated kinase) and actin as a loading control. As shown in B, phosphorylated GCN2 is present in unfertilized eggs and absent after fertilization. These data suggest that GCN2 is active in unfertilized eggs and is inactivated following fertilization.

Data not shown

## II. 2.

---

### Le recrutement polysomal dans les embryons d'oursin

Les modifications de la machinerie de traduction entraînent une modulation du profil des protéines synthétisées, à la fois au niveau global et spécifique. Ces modulations de la traduction sont décisives pour le maintien de l'homéostasie ou bien, pour la réponse cellulaire ultime, en cas de stress sévère. C'est pourquoi il est important d'identifier d'une part les ARNm régulés pendant des événements clés tel que la fécondation et le développement embryonnaire précoce et d'autre part, les messagers susceptibles d'intervenir dans le contrôle de la décision de survie ou de mort cellulaire. L'activité traductionnelle et sa régulation se caractérisent par le recrutement des ARNm dans la machinerie de traduction qui permet en effet de produire la protéine. L'entrée d'un ARNm dans les polysomes indique qu'il sera traduit en protéine. Le profil polysomal d'une cellule est caractéristique de l'état physiologique (en division, en apoptose...) et corrélée au taux de synthèse protéique.

Dans le cadre de cette deuxième partie des résultats, j'ai réalisé des purifications de polysomes à partir des embryons de l'oursin *P. lividus*, lors de la reprise du cycle cellulaire après fécondation (partie II.2.2.) et en réponse au MMS (partie II.2.3.), un agent génotoxique capable d'induire l'apoptose dans les embryons d'oursin. J'ai effectué une approche de purification des ARNm contenus dans les polysomes et de retro transcription en ADN complémentaire (ADNc). Ces échantillons ont été séquencés à haut débit (projet en collaboration avec le Génoscope) afin d'identifier les séquences des ARNm purifiés des polysomes. Cette analyse permet d'appréhender le «traductome» correspondant à la population des ARNm en cours de traduction. L'identification des

ARNm présents dans les polysomes s'appuiera sur les banques d'EST (*Expressed Sequence Tagged*) et sur les données génomiques des deux espèces d'oursin *S. purpuratus* (Sodergren *et al.*, 2006) et *P. lividus* (en cours au Génoscope). Les données de séquençage ont été obtenues très récemment et sont en cours d'analyse bioinformatique. Le recrutement polysomal de plusieurs ARNm candidats sera confirmé par analyse de PCR quantitative (PCRq).

Cette partie de ma thèse s'intègre donc dans un projet qui vise à déchiffrer le génome, le transcriptome et le traductome de *P. lividus* par séquençage à haut-débit et qui est mené en collaboration avec le Génoscope, ainsi que d'autres laboratoires européens.

## 2.1. Matériel et Méthodes

### La culture d'embryons

Les oursins *P. lividus* ont été collectés à Villefranche-sur-mer. La ponte a été induite par injection intracelomique d'acétylcholine (0,1M) et les gamètes collectés dans de l'eau de mer filtrée. Les ovules ont été dégangués par passage en eau de mer pH 5 pendant 45 secondes, ensuite lavés en eau de mer et fécondés. Les embryons sont dilués à 5% et laissés se développer sous agitation continue. Au temps de développement désiré, les embryons ont été culotés et congelés en azote liquide et stockés à -70°C.

### La purification des polysomes

Les culots d'embryons ou d'ovules ont été lysés dans un tampon qui permet le maintien des ARNm dans les polysomes (10mM Tris pH7,4, 250mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0,4% Igepal, 5% sucrose, 1mM DTT, 10µg/mL aprotinine, 2µg/mL leupeptine, 1µL/mL RNAsine). La fraction non polysomale est séparée des polysomes dans un gradient linéaire de sucrose 10-40% en présence de 10mM Tris pH7,4, 250mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, pendant 2,5 heures à 38000 rpm dans un rotor Beckmann SW 41 Ti. Le gradient est collecté en 20 fractions (600µL / fraction) à l'aide d'un système ISCO (support Brandel connecté à une unité optique UA-6 et collecteur automatique FoxyR1). Les fractions ont été traitées à la protéinase K (200µg/mL) avant d'extraire l'ARN au phénol chloroforme acide. Par la suite, l'ARN a été précipité à -20°C avec un volume d'isopropanol.

### La préparation d'ADNc double brin

Plusieurs échantillons provenant d'au moins 3 différentes femelles d'oursin, constituant des répliquats biologiques, ont été utilisés pour la préparation de l'ADNc. Les fractions polysomales (de 13 à 20) de ces échantillons ont été regroupées dans un seul échantillon pour en extraire les ARNm poly(A)<sup>+</sup> sur des colonnes d'affinité Nucléospin contenant des billes en latex oligo d(T) (Macherey-Nigel). Les ARNm poly(A)<sup>+</sup> des différentes femelles ont été réunis pour obtenir un pool commun de transcrits, par condition. Cette stratégie permet de niveler la variabilité interindividuelle. L'ADNc a été préparé à partir du pool d'ARNm, en utilisant des primers hexamères *Random* afin de retrotranscrire un nombre maximum d'ARNm. Pour la réaction, la reverse-transcriptase Superscript II (Invitrogen) a été utilisée à 42°C pendant 50 minutes, puis l'ADNc a été incubé avec la DNA Ligase et la DNA Polymerase I pendant 2h à 16°C (SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit –



Invitrogen) pour synthétiser le brin complémentaire d'ADN. L'ADN double brin a été précipité selon les indications du fabricant du kit et repris en eau MiliQ.

### Séquençage à haut-débit et assemblage des séquences

(réalisé au Génoscope par Julie Poulain-séquençage et Corinne Da Silva-assemblage)

- La préparation des librairies Illumina

Les ADNc séparés par classes de 150 à 600 bp (paires de bases) ont été soniqués séparément à l'aide de l'appareil E210 Covaris (Covaris Inc. Etats-Unis). Les librairies *single end* ont été préparées selon les indications du fabricant (Illumina DNA sample kit) : les extrémités des fragments ont été réparées (bouts francs) et adénylés en 3'. Des adaptateurs Illumina y ont été rajoutés. Les produits de ligation de 350-400 pb ont été purifiés sur gel et les fragments d'ADN sélectionnés par taille ont été amplifiés par PCR avec des primers spécifiques des adaptateurs Illumina. Les librairies ont été purifiées et quantifiées avec un Fluoromètre Qubit (Life Technologies) et les profils des librairies ont été évalués au bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Etats-Unis).

Chaque librairie a été séquencée par fragments (*reads*) de 100 bases dans des capillaires *paired-end* (les extrémités sont appariées) avec le système Illumina GA IIx (Illumina, Etats-Unis).

- L'assemblage *de novo* des *reads* Illumina

Les fragments issus du séquençage (*reads*) ayant des extrémités qui se superposent (*paired-end*) ont été fusionnés et les adaptateurs ainsi que les séquences de mauvaise qualité, enlevés.

Les *reads* exploitables ont été assemblés avec le programme Velvet/Oases (versions 1.1.02/0.1.20) avec la valeur de *kmer* fixée à 69 (facteur lié à la longueur maximum approximative des transcrits assemblés) (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/oases/>).

Un deuxième assemblage a été réalisé en utilisant le programme Trinity (version r2011-07-13) (Grabherr *et al.*, 2011).

L'annotation des transcrits ainsi assemblés a été réalisée par Blast contre le génome de *S. purpuratus* (Spur v3.1) et *P. lividus* (couverture 3,8 X – Génoscope 2010), au niveau de la plateforme Génomique et Informatique ABIMS à Roscoff.

L'ensemble des étapes expérimentales pour l'analyse des transcrits des polysomes, est schématisé dans la *figure 2.2*.

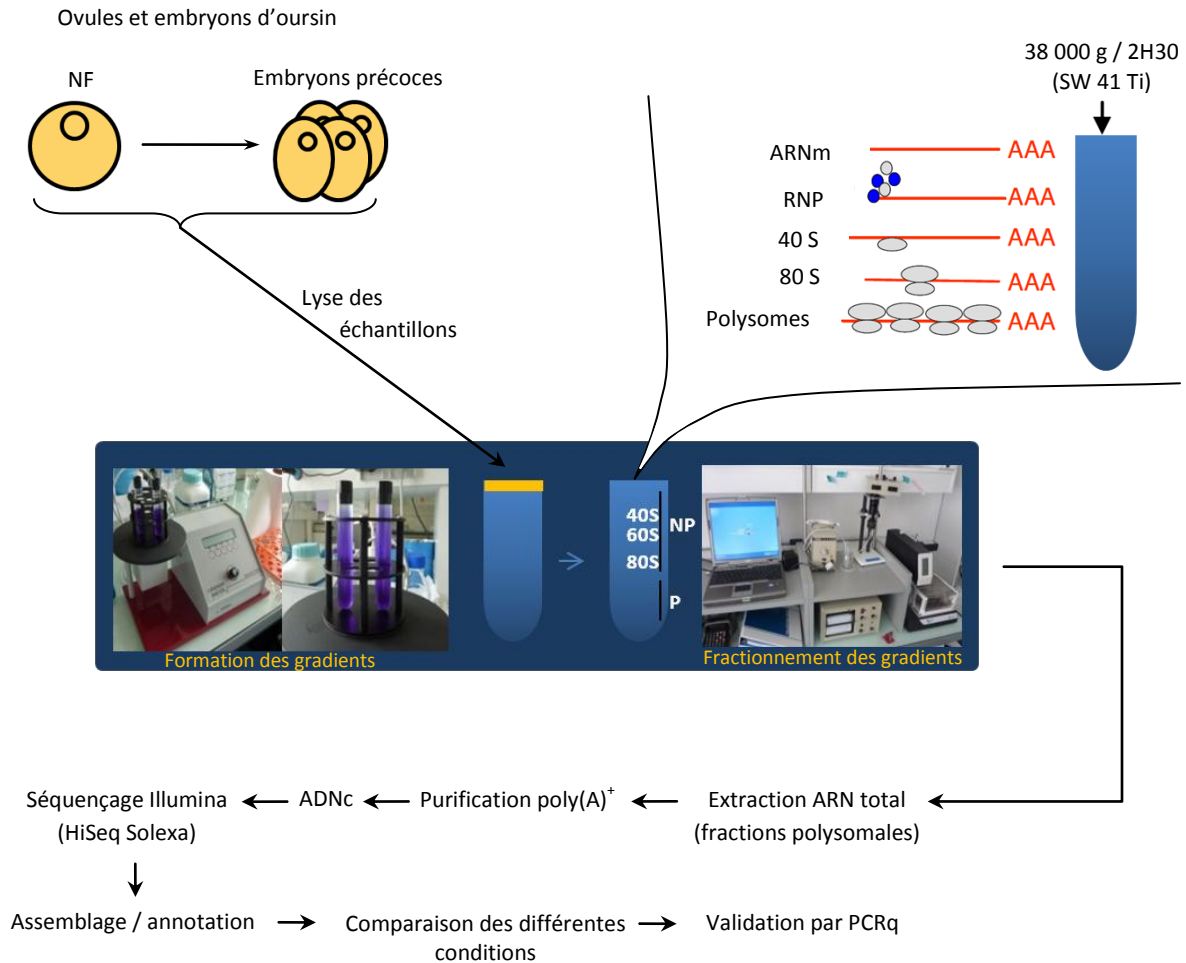


Figure 2.2. Stratégie expérimentale pour analyser le recrutement polysomal. Les échantillons sont lysés, ensuite les polysomes sont séparés dans un gradient de sucrose. Le fractionnement permet l'isolement des polysomes, pour extraire par la suite les ARNm par la queue poly(A). Les messagers sont séquencés à haut débit et l'analyse informatique des séquences permet de mettre en évidence des représentants intéressants, qui seront validés par PCRq par la suite.

## 2.2. Le traductome en conditions physiologiques chez l'oursin

Dans les ovules non fécondés d'oursin la synthèse protéique globale est maintenue à un niveau très bas. La fécondation provoque l'augmentation de la synthèse protéique, d'une manière indépendante de la transcription. Dans ce contexte de développement précoce, les facteurs d'initiation de la traduction (eIFs) jouent un rôle régulateur essentiel. Dans les ovules, eIF2 $\alpha$  est phosphorylée et 4E-BP est présente. Ces deux mécanismes inhibiteurs de la traduction globale sont levés après la fécondation. Nous voulons comprendre comment ces modifications de la machinerie traductionnelle en réponse à la fécondation modulent le recrutement des ARNm dans les polysomes.

### 2.2.1. La synthèse protéique est nécessaire pour le maintien de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et la présence de 4E-BP avant fécondation

Nous avons analysé dans un premier temps la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les ovules non fécondés de *S. granularis*. Nous avons effectué un traitement des embryons à l'émétine (100 $\mu$ M finale) qui bloque la synthèse protéique au niveau de l'élongation lors de la traduction des messagers en chaînes peptidiques. L'émétine ajoutée à 10 minutes après fécondation détermine un arrêt du cycle cellulaire (Wagenaar, 1983). Nous avons regardé l'effet de l'émétine sur la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et sur la présence de 4E-BP dans les ovules non fécondés. Après environ deux heures d'incubation nous observons une baisse de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Figure 2.3). Ce résultat indique que le maintien de l'état phosphorylé d'eIF2 $\alpha$  dans les ovules est dépendant d'un acteur synthétisé *de novo* et qui aurait un temps de demi-vie d'environ deux heures. Dans le cas de 4E-BP, nous avons observé la disparition de la protéine après 60 minutes d'incubation avec émétine. La stabilité de 4E-BP dans les œufs non fécondés dépend donc de la synthèse protéique.

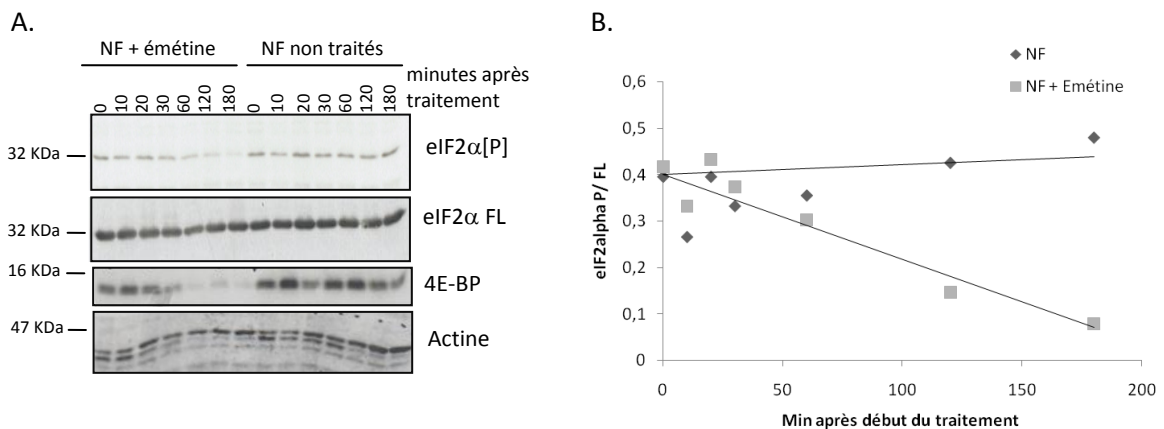


Figure 2.3. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et le maintien de 4E-BP dans les ovules non fécondés dépendent de la synthèse protéique puisque l'inhibition de la traduction en réponse à l'émétine induit la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la disparition de 4E-BP (A.). Ainsi, le *turn-over* de ces régulateurs traductionnels est d'environ 2 à 3 heures pour eIF2 $\alpha$  phosphorylé et 1 heure pour 4E-BP, dans les ovules non-fécondés de l'oursin *S. granularis*. (B.) D'après la quantification des bandes des *Western blots*, le rapport eIF2 $\alpha$  P / FL diminue 4 à 5 fois, 2- 3 heures après rajout de l'émétine sur les ovules non fécondés.

La synthèse protéique serait donc impliquée dans le mécanisme de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et celui de maintien de 4E-BP. Cela signifie que dans les ovules d'oursin on a besoin d'une synthèse protéique sélective pour réduire la synthèse protéique globale. Ces observations dénotent l'existence

des régulations fines au niveau de la machinerie de traduction pour le maintien du niveau basal de synthèse protéique dans les ovules d'oursin.

Il serait intéressant maintenant d'identifier ces acteurs synthétisés dans l'ovule non fécondé qui influencent d'une part l'activité kinase/phosphatase impliquée dans la régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et d'autre part, la régulation de la présence de l'inhibiteur 4E-BP.

### 2.2.2. Modifications des facteurs de traduction en réponse à la fécondation chez *P. lividus*

Des échantillons de *P. lividus* ont été préparés avant et après fécondation afin d'analyser le recrutement polysomal dans les ovules et les embryons d'oursin. Le séquençage des ARNm se faisant chez *P. lividus*, nous avons vérifié que la fécondation s'accompagne de modifications de la machinerie de traduction en analysant par Western Blot les facteurs eIF2 $\alpha$  et 4E-BP. Nous avons ainsi validé la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la dégradation de 4E-BP en réponse à la fécondation chez *P. lividus* (Figure 2.4) et en particulier, dans les échantillons qui ont servi à réaliser les profils de polysomes par la suite.

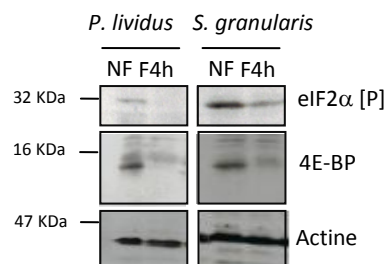


Figure 2.4. Modifications des facteurs d'initiation eIF2 et 4E-BP chez *P. lividus* en réponse à la fécondation, comparé avec les observations par Western blot effectuées chez *S. granularis* : déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et dégradation de 4E-BP visualisées à 4 heures après fécondation.

Les échantillons provenant de plusieurs femelles d'oursin ont servi à obtenir un pool d'ARNm à séquencer afin de diminuer la variabilité interindividuelle dans l'analyse du traductome.

### 2.2.3. Le profil de polysomes dans les ovules et embryons d'oursin

La purification des polysomes en gradient de sucrose a été réalisée grâce à un nouvel équipement acquis au laboratoire. Par conséquent, la majorité des étapes expérimentales ont nécessité une adaptation spécifique par rapport aux échantillons traités. La mise au point du

fractionnement des gradients a visé surtout les paramètres de la calibration de l'enregistrement du profil sur papier et en format numérique, la synchronisation de la collecte des fractions avec l'enregistrement mais aussi l'extraction d'ARN. Nous avons réalisé ces étapes au cours d'environ quinze expériences qui nous ont permis d'obtenir des profils polysomaux reproductibles.

La fécondation induit un recrutement important d'ARNm dans les polysomes, corrélé avec l'augmentation de la synthèse protéique (Stafford *et al.*, 1964). Sur les profils que nous avons obtenus peut être observé un recrutement polysomal plus important dans les embryons d'oursin par rapport aux ovules non fécondés. Les profils permettent de discriminer entre la région des polysomes qui sédimente vers le bas du gradient (*Figure 2.5*) et d'autre part les monosomes (80 S) et les sous-unités ribosomales isolées (40 S et 60 S) situées plutôt vers le haut du gradient. L'intensité des pics correspond à la mesure de densité optique (à 254nm) des gradients, qui est proportionnelle avec la quantité d'ARN présente dans les échantillons.

Lors du fractionnement des gradients, 20 fractions sont obtenues et les polysomes sont collectés au niveau des fractions de 13 à 20. On peut estimer l'intensité du recrutement polysomal en rapportant la surface occupée par les pics des polysomes, au pic des monosomes, au niveau duquel on admet que la synthèse protéique n'est pas significative et qu'il est inversement proportionnel aux polysomes.

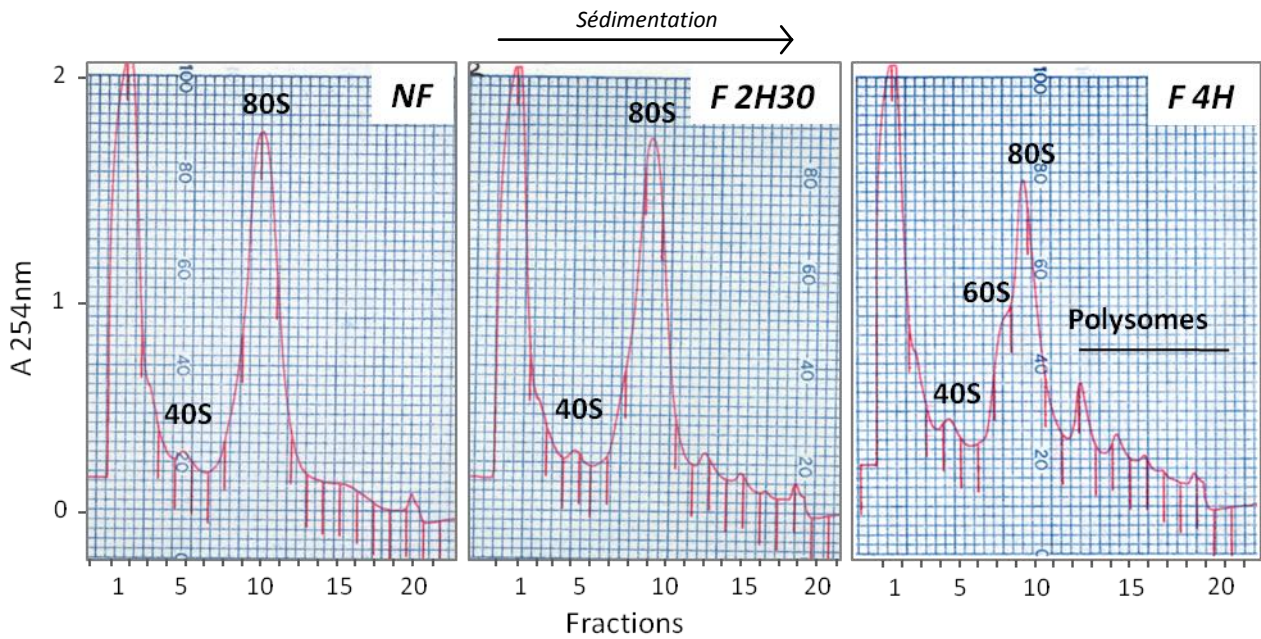


Figure 2.5. Profils des polysomes (densité optique) au cours du développement précoce de l'oursin *P. lividus*. La surface occupée par les pics des polysomes augmente après fécondation alors que celle des pics des monosomes (80 S) diminue. Ici sont présentés des stades de 2,5 et 4 heures (F), en comparaison avec les ovules non fécondés (NF). La flèche indique le sens de sédimentation pendant la centrifugation des gradients.

Nous avons vérifié par la suite que les pics observés dans la partie inférieure du gradient étaient bien des polysomes. En traitant le lysat d'oursin à l'EDTA (200mM finale) qui a pour effet la dissociation des ribosomes, on a observé la disparition des pics correspondant au polysomes au niveau des fractions 13-20 (Figure 2.6).

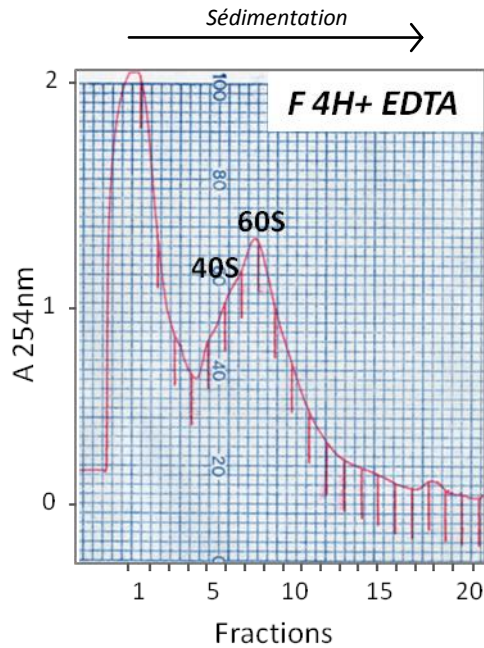


Figure 2.6. Vérification des profils des polysomes des stades 4 heures par le traitement du lysat d'embryons à l'EDTA. On observe la disparition des pics des polysomes (figure 4.4) et leur migration en haut du gradient, au niveau des sous-unités ribosomales 40 S et 60 S libres.

#### 2.2.4. Ratio polysomes/monosomes au cours du développement

Le rapport entre la surface occupée par les polysomes et les monosomes (80 S), mesuré sur les profils de densité optique, constitue une indication universelle de l'intensité du recrutement polysomal global et est corrélé en général avec la synthèse protéique globale. Nous avons mesuré les surfaces des polysomes et des 80 S dans les ovules et au niveau de différents stades de développement après fécondation chez *P. lividus* (1 heure, 2,5 heures, 4 heures, 9 heures et 32 heures). Les valeurs des ratios augmentent de 0,17 dans les ovules, jusqu'à 1,13 au stade gastrula (32 heures) (Figure 2.7).

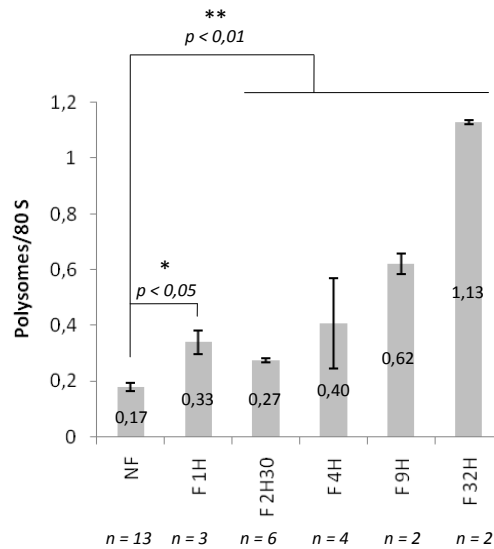


Figure 2.7. L'augmentation du ratio polysomes/monosomes (80 S) après fécondation. Les mesures effectuées à partir de profils de polysomes à différents stades de développement de l'oursin, présentent une augmentation significative (test de Mann-Whitney) par rapport aux ovules non fécondés. Les valeurs moyennes des rapports polysome/80 S mesurées évoluent de 0,17 pour les ovules non fécondés et jusqu'à 1,13 pour le stade gastrula (32 heures après fécondation). Les numéros (n) situés sous le graphique indiquent le nombre de profils de polysomes (gradients) quantifiés par temps de développement.

Les ratios que nous avons obtenus sont cohérents par rapport aux valeurs déjà publiées chez *P. lividus* : 0,27 dans les ovules non fécondés et 1,29 au niveau du stade gastrula (Monroy et Tyler, 1963).

### 2.2.5. Vérification des ARN extraits à partir des fractions polysomales

Nous avons précipité à l'isopropanol l'ARN total des fractions polysomales. Nous avons vérifié sa qualité sur gel d'agarose-formaldéhyde. Dans la *figure 2.8* on peut observer l'ARN provenant des gradients de polysomes à partir d'ovules et d'embryons précoces de *P. lividus*. Les bandes majoritaires sont représentées par l'ARN ribosomale (28 S et 18 S).



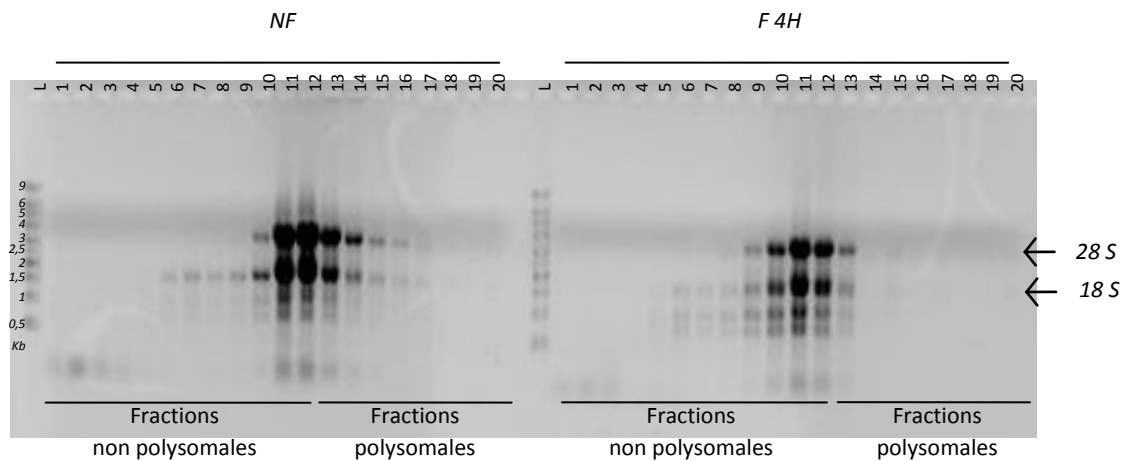


Figure 2.8. Profil des ARN totaux de *P. lividus* extraits des fractions du gradient de sucrose. Les fractions polysomales sont numérotées de 13 à 20.

Le profil ARN des fractions sur gel correspond à la répartition attendue en fonction du profil de polysomes (Figure 2.5).

### 2.2.6. Séquençage à haut débit et données du *tractome*

Les données obtenues jusqu'à présent dans le cadre de cette partie des résultats sont à présent préliminaires. Le traitement informatique des séquences est en cours.

Des contigs assemblés *de novo* à l'aide du programme « Oases », sont disponibles. Deux gigabases de données ont été assemblés, correspondant à une couverture 30x du transcriptome total.

L'estimation de la taille des transcrits indique des valeurs comprises entre ~100 bases et ~10 000 bases avec une valeur médiane qui change après fécondation : ~630 bases au niveau des ovules et ~1000 bases au niveau des embryons précoces, respectivement.

Le nombre de transcrits assemblés (*Oases*) par condition a été estimée :

- dans les ovules non fécondés (NF) : 63 096 séquences uniques  
soit 38,31% des 164 695 transcrits au total ;
- dans les embryons (F) : 56 736 séquences uniques  
soit 47,96% des 118 310 transcrits au total.

Un deuxième assemblage, avec le programme « *Trinity* », est maintenant disponible aussi. Ce programme permet en plus d'estimer la fréquence des transcrits, exprimée comme le paramètre

FPKM (*Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*), qui s'explique par la normalisation du nombre de *reads* par Kb assemblées. La FPKM indique en effet la fréquence des copies de chaque transcrit identifié et constitue une mesure quantitative des résultats du séquençage, vu que pour l'obtention de l'ADNc nous n'avons pas effectué d'étape d'amplification par PCR.

Le nombre de transcrits assemblés (*Trinity*) par condition a été estimée :

- dans les ovules non fécondés (NF) : 26 967 séquences uniques  
soit 44,42 % des transcrits 60 704  
(d'une longueur entre 200 bases et 20 205 bases)
- dans les embryons (F) : 24 005 séquences uniques  
soit 51,68 % des transcrits 46 448  
(d'une longueur entre 200 bases et 17 904 bases)

Dans les ovules le recrutement polysomal est faible mais existant car la synthèse protéique est présente même s'il s'agit d'un niveau basal. Les transcrits présents dans les polysomes à ce stade nous permettent de mieux comprendre par exemple, quels sont les acteurs nécessaires au maintien d'une cellule apte pour la fécondation. Au niveau des embryons, en contraste avec les ovules, la synthèse protéique augmente. La connaissance du traductome dans ce contexte permet une analyse quantitative et synthétique des transcrits recrutés dans les polysomes lorsque la synthèse protéique augmente en réponse à la fécondation.

Le *clustering* (partitionnement de données) des familles de transcrits traduits avant et après fécondation, est en cours. Ceci est important pour identifier les grandes fonctions cellulaires régulées par traduction en réponse à la fécondation. Par la suite, la présence/absence des différents transcrits reste à être confirmée par PCRq.

### 2.3. Le traductome et l'induction de l'apoptose dans les embryons d'oursin

La régulation traductionnelle est impliquée dans la réponse à divers stress et dans le mécanisme d'apoptose. D'un côté, la machinerie de traduction est modifiée en réponse à des stress cellulaires, de manière à orienter la cellule vers la mort programmée. D'un autre côté, des recrutements d'ARN messagers codant pour des protéines pro- ou anti-apoptotiques influencent directement la survie des cellules (Holcik et Sonenberg, 2005).

L'induction de l'apoptose dans les embryons d'oursin s'accompagne de modifications importantes de plusieurs acteurs de la traduction. Nous voulons comprendre le rôle de ces modifications et identifier les ARN messagers dont la traduction est modulée pendant l'induction de l'apoptose

#### 2.3.1. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ et l'induction de l'apoptose dans les traitements au MMS n'est pas sous dépendance transcriptionnelle.

Le traitement des embryons d'oursin au MMS (10mM), un agent génotoxique, induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et déclenche l'apoptose dans les embryons d'oursin (Le Bouffant *et al.*, 2008a).

Le développement précoce de l'oursin dépend uniquement de la traduction, car l'inhibition de la transcription n'inhibe pas la progression des clivages. Cependant, la transcription est présente dès ces stades et sa suppression après fécondation devient limitante pour le développement à partir de la blastula.

Nous avons voulu vérifier dans un premier temps, que l'induction de l'apoptose et les modifications de la machinerie de traduction ne sont pas liés à une régulation transcriptionnelle.

Nous avons utilisé les embryons de l'espèce *S. granularis* et nous avons bloqué la transcription en ajoutant de l'Actinomycine D (200 $\mu$ M), 10 minutes avant la fécondation. Dans ces conditions, nous avons regardé par Western blot l'activation de la caspase 3 ainsi que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la dégradation de 4E-BP après fécondation (*Figure 2.9*), qui constituent d'importantes modifications régulatrices de la machinerie de traduction. L'efficacité du traitement par l'Actinomycine D a été suivie au microscope optique. Mise à part les traitements au MMS où la division des œufs était bloquée, le développement des embryons traités à l'Actinomycine D n'a progressé que jusqu'à la morula, tandis que les contrôles ont continué à se développer normalement.

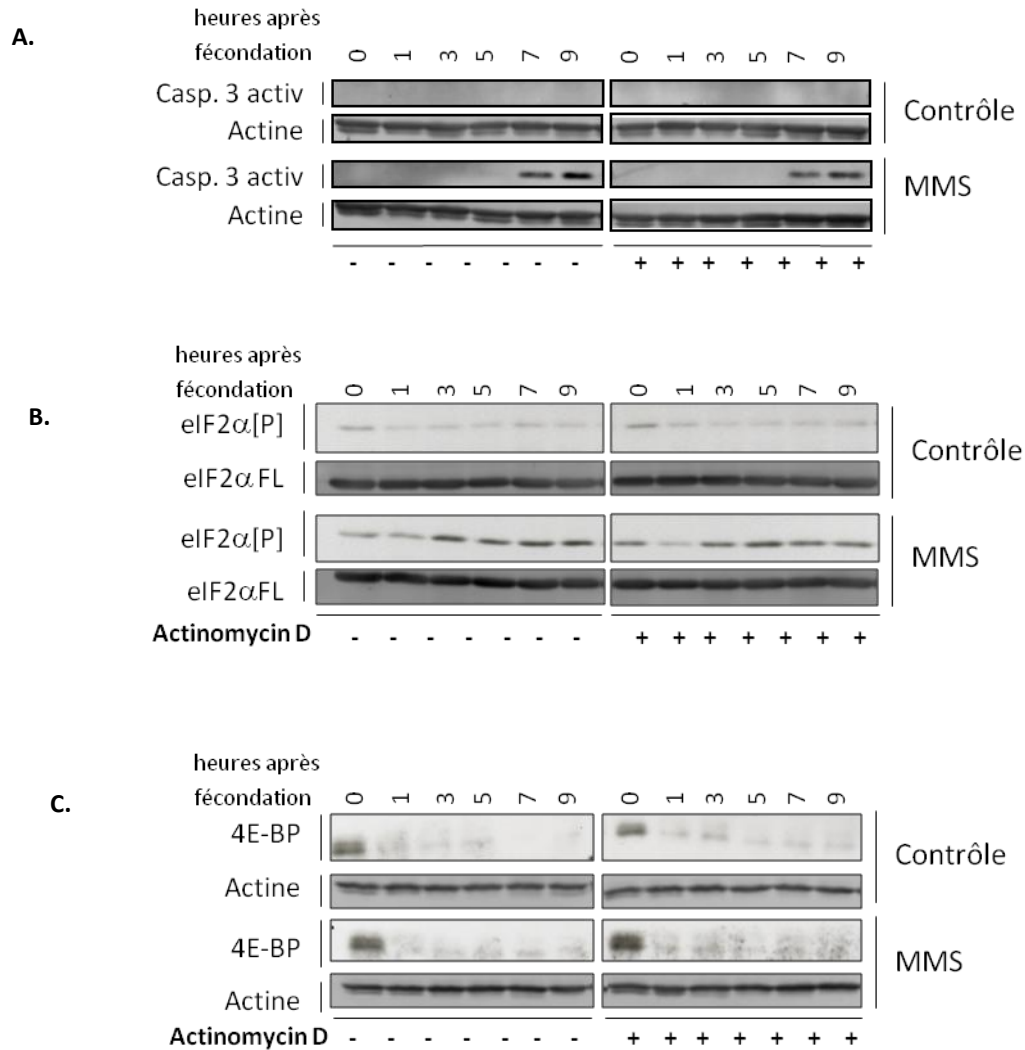


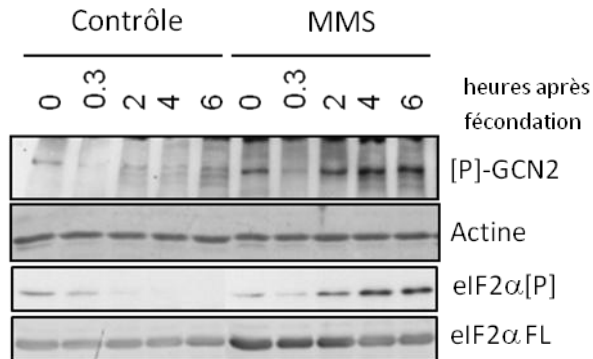
Figure 2.9. L'activation de la caspase 3 (A.), la phosphorylation d'eIF2α (B.) et la dégradation de 4E-BP (C.) dans les embryons traités avec MMS est indépendante de la transcription, inhibée en présence d'Actinomycin D.

L'induction de l'apoptose dans les embryons traités au MMS n'est pas influencée par l'inhibition de la transcription par l'Actinomycin D, ce qui signifie que la réponse au MMS dans ce contexte dépend uniquement des modifications post transcriptionnelles.

### 2.3.2. Activation de GCN2 en réponse au MMS

Quatre kinases sont responsables de la phosphorylation d'eIF2α, dont trois sont présentes dans le génome de l'oursin (GCN2, HRI et PERK). GCN2 (*General control non derepressible 2 kinase*) est la plus ancestrale des trois kinases et s'active lors le traitement au MMS des levures *S. pombe* (Berlanga et al., 2010). Avec un anticorps dirigé contre la forme active de GCN2, nous avons regardé

si l'activation de GCN2 est corrélée avec la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les embryons d'oursin en réponse au MMS (*Figure 2.10*).



*Figure 2.10.* La kinase GCN2 est active (phospho-GCN2) d'une manière corrélée avec la forme phosphorylée d'eIF2 $\alpha$ , dans les embryons d'oursin en réponse au MMS. L'actine et la protéine entière eIF2 $\alpha$  (FL) sont utilisées comme control de charge.

La kinase GCN2 est donc active dans les embryons d'oursin, en réponse au MMS. Cette expérience permet d'avoir une image plus complète des acteurs impliqués dans l'induction de l'apoptose chez l'oursin.

### 2.3.3. L'induction de l'apoptose dans les embryons de *P. lividus*

Des cultures embryonnaires de *P. lividus* ont été effectuées en présence de MMS (10mM) dans le but d'analyser le transcriptome de ces embryons lors de l'induction de l'apoptose. Ces embryons ont été utilisés pour l'isolement des polysomes et le séquençage à haut-débit des ARNm des fractions polysomales, dans le cadre du projet au Génoscope.

Nous avons regardé la morphologie des embryons traités et des embryons contrôles par microscopie optique. Cela a permis d'observer l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose dans les embryons de *P. lividus* (*Figure 2.11*).

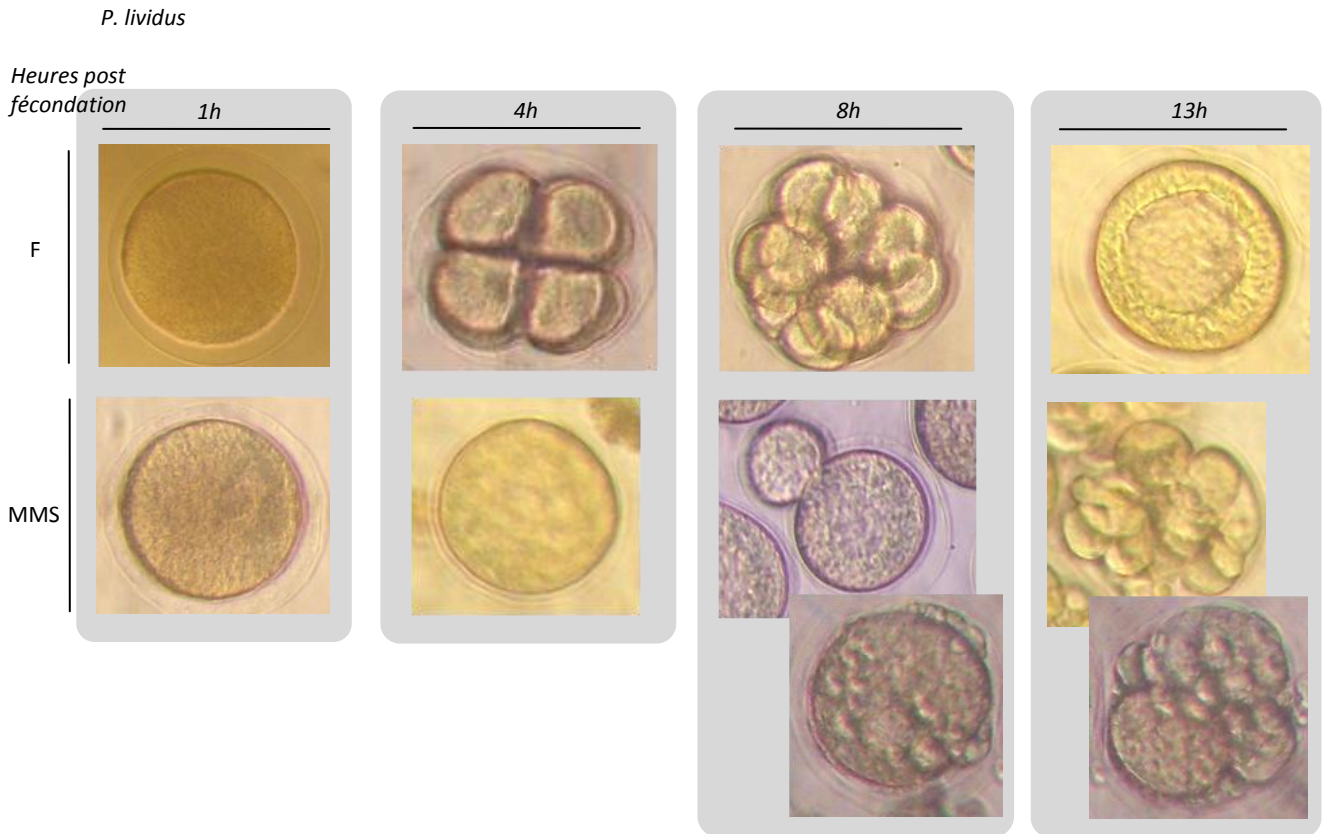


Figure 2.11. Le traitement au MMS induit l'arrêt du cycle cellulaire des embryons de *P. lividus* et le *blebbing* caractéristique des cellules en apoptose (8-13 heures après fécondation). Les images sont réalisées au microscope optique avec contraste interférentiel (DIC). F = contrôle, MMS= embryons traités.

Le MMS ajouté dans l'eau de mer après fécondation a provoqué le blocage de la division cellulaire et à environ 8 heures après fécondation, on a pu observer la formation des morphologies caractéristiques de l'apoptose, comme l'aspect non homogène du cytoplasme (*blebbing*) et celui vésiculeux de la cellule (bourgeonnement).

Lors de l'induction de l'apoptose par le MMS dans les embryons d'oursin, eIF2 $\alpha$  est phosphorylée. C'est une modification importante de la machinerie de traduction puisqu'elle est responsable de l'induction des traductions sélectives. Avant de séquencer les échantillons à haut débit, nous avons vérifié que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  était bien présente après le traitement au MMS (Figure 2.12).

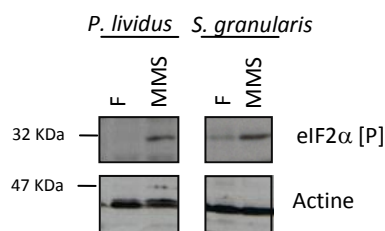
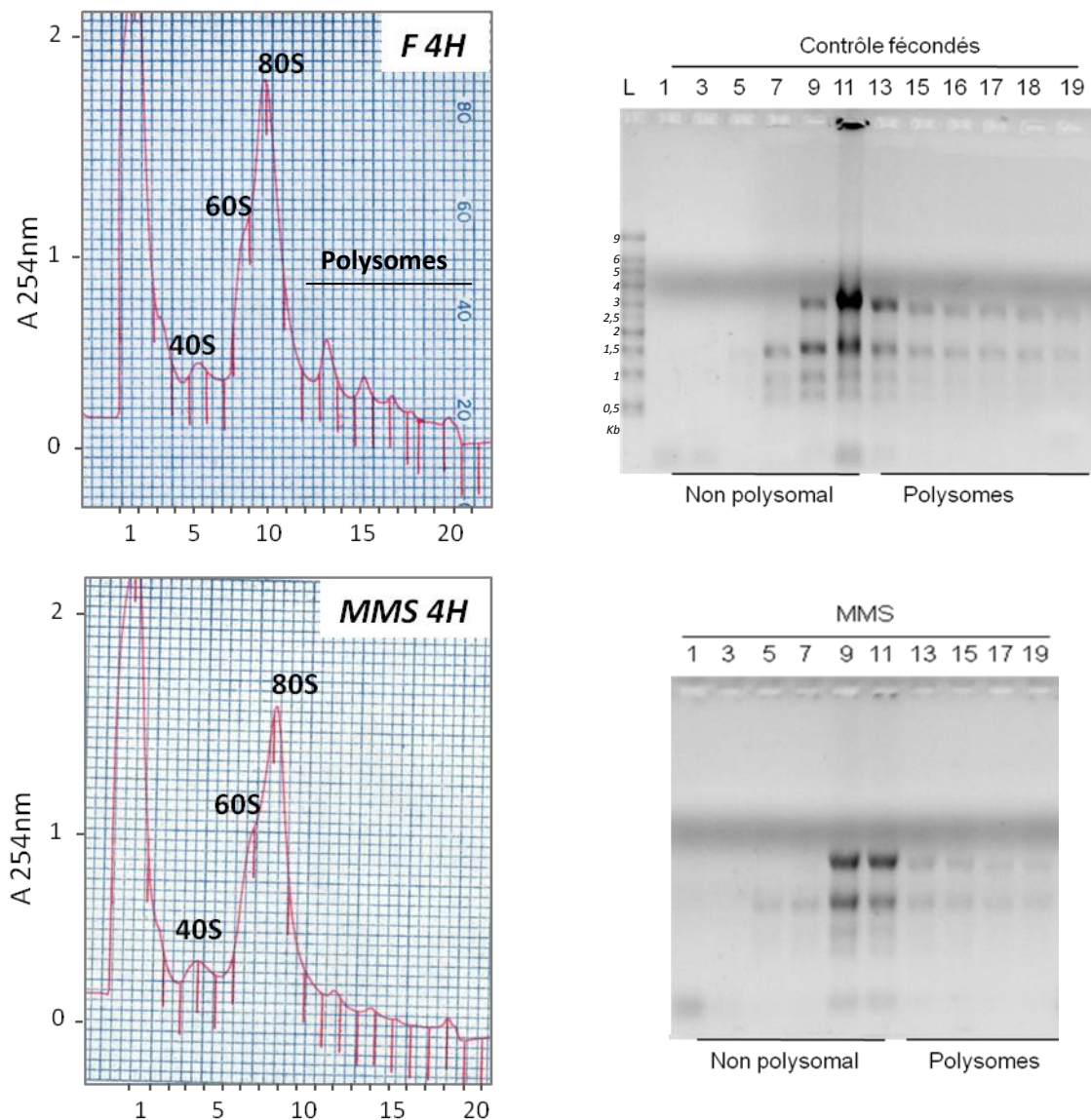


Figure 2.12. Vérification de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les embryons de *P. lividus* traités au MMS.

### 2.3.4. Profil des polysomes lors de l'induction de l'apoptose

Nous avons analysé le profil des polysomes des embryons traités au MMS (*Figure 2.13*). On peut observer sur le profil de densité optique une diminution des pics des polysomes. Cette baisse du recrutement polysomal global est logique puisque l'induction de l'apoptose par le MMS chez l'oursin, s'accompagne d'une diminution de la synthèse protéique.



*Figure 2.13.* Profils de polysomes des embryons d'oursin traités au MMS et non traités (F). Les pics des polysomes en MMS sont réduits en intensité par rapport au contrôle ce qui indique une diminution quantitative du recrutement polysomal lors de l'induction de l'apoptose par le MMS. Sur les gels à droite sont déposés les ARN totaux précipités à partir des fractions polysomales et non polysomales, pour en vérifier la qualité.

### 2.3.5. Séquençage à haut-débit des transcrits traduits lors de l'induction de l'apoptose chez l'oursin

La procédure de séquençage des ARN poly(A)+ purifiés des polysomes provenant des embryons d'oursin traités au MMS est similaire à celle décrite pour les ovules non fécondés et les embryons précoces (section II.2.2.6).

Le nombre de transcrits estimé après l'assemblage à l'aide du programme *Oases* est de 56 830 séquences uniques, soit 36,07 % pour un total de 157 546 transcrits. Ces séquences sont actuellement en cours d'annotation.

L'assemblage avec *Trinity* a produit 53 878 séquences uniques soit 36,27 % des transcrits (148 511 au total) d'une longueur comprise entre 200 bases et 14 253 bases. La valeur médiane de la longueur des séquences dans les embryons traités au MMS est d'environ 400 bases, une valeur inférieure par rapport aux ovules et embryons non traités.

L'analyse de *clustering* des transcrits assemblés est en cours. Par comparaison avec les résultats obtenus pour les embryons contrôles, cette analyse permettra d'identifier d'une manière globale et à haut-débit, les familles d'ARNm régulées au niveau traductionnel lors de l'induction de l'apoptose.

L'aperçu global des transcrits du traductome après le traitement au MMS, permet d'observer des différences au niveau des données par rapport au contrôle, ainsi que par rapport au ovules non fécondés. Grâce à l'assemblage avec *Trinity*, nous pouvons estimer la fréquence des transcrits provenant des polysomes. Nous avons regardé d'une manière globale la distribution de la fréquence (FPKM) par condition, ainsi que la longueur des séquences (*Figure 2.14*).



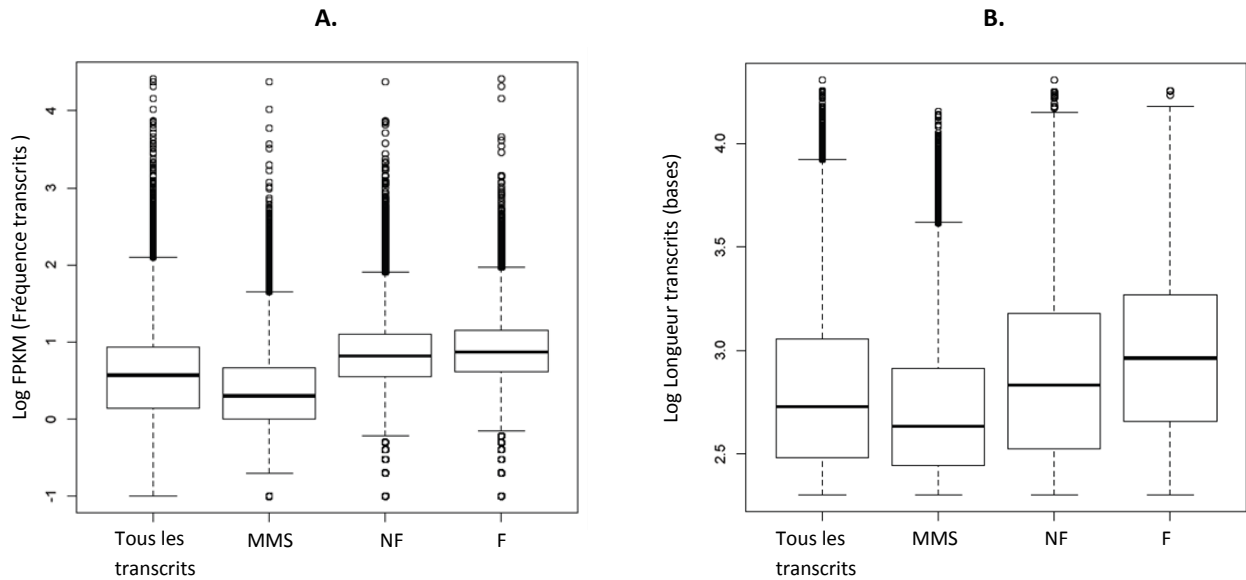


Figure 2.14. Fréquence et taille des transcrits du traductome. **A.** Distribution de la fréquence (FPKM) des transcrits, utilisée comme mesure quantitative des transcrits. **B.** Distribution des longueurs des séquences des transcrits.

Le Boxplot (« boîtes à moustaches ») permet de représenter la distribution des valeurs sous forme simplifiée avec la médiane (trait épais horizontal), une boîte s'étendant du quartile 0,25 au quartile 0,75, et des moustaches qui s'étendent par défaut jusqu'à la valeur distante d'au maximum 1,5 fois la distance interquartile.

Les données sont groupées par condition (MMS, NF, F) et en comparant les valeurs médianes des différentes conditions on observe qu'en MMS la longueur des transcrits ainsi que le nombre de copies de chaque séquence unique (fréquence) est moindre par rapport à NF et F.

La distribution de la longueur et de la fréquence des séquences suggère que d'une façon globale, le traitement au MMS des embryons d'oursin induit la traduction de transcrits plus courts et avec une moindre fréquence par rapport aux embryons non traités (F) et les ovules non fécondés.

## CHAPITRE III.

# SYNTHESE, DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

### III.

---

## Synthèse, discussion, conclusions et perspectives

Le travail effectué dans le cadre de cette thèse vise à comprendre la régulation de la traduction des ARNm en réponse à la fécondation et lors du développement embryonnaire précoce de l'oursin, mais aussi au cours de l'induction de l'apoptose après fécondation. Le contrôle traductionnel au niveau de l'initiation est une étape critique dans la régulation de l'expression des gènes. L'initiation fait intervenir un grand nombre de facteurs d'initiation (eIFs) (Jackson *et al.*, 2010). Ces acteurs jouent un rôle régulateur majeur puisqu'ils sont capables de moduler la synthèse protéique d'une manière globale (stimulation/inhibition), mais également, les eIFs peuvent exercer un contrôle fin de la synthèse protéique, induisant la traduction sélective d'ARNm à un moment donné et à un endroit précis.

Le développement embryonnaire de l'oursin est un modèle dans lequel les premières divisions embryonnaires sont indépendantes de la transcription, ce qui en fait un système idéal pour l'étude des régulations de la traduction et du cycle cellulaire.

### Contexte multifactoriel de la régulation de la traduction chez l'oursin

Les mécanismes qui régulent l'augmentation de la synthèse protéique en réponse à la fécondation constituent une question biologique fondamentale. Chez l'oursin, la fécondation induit une augmentation de la synthèse protéique qui est essentielle pour la première division mitotique et la poursuite du développement. Les facteurs d'initiation de la traduction jouent un rôle particulièrement important dans ce contexte. Dans les années '90 il a été suggéré que l'activité d'eIF2 serait impliquée dans l'augmentation de la synthèse protéique post-fécondation (Dholakia *et*

*al.*, 1990; Akkaraju *et al.*, 1991). Nous avons observé des changements physiologiques de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  lors de la fécondation des ovules d'oursin. En utilisant un variant phosphomimétique, nous avons démontré que la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  après fécondation est nécessaire pour la première division mitotique.

eIF2 $\alpha$  avec eIF2B forme le « module régulateur » du facteur d'initiation eIF2 (voir introduction). Chez l'oursin, l'activité d'eIF2B augmente après fécondation. Cet événement peut être lié à des modifications à la fécondation au niveau de la voie de la MAPK, qui est capable de contrôler eIF2B via la PP1 (Quevedo *et al.*, 2003). La MAPK est activée par phosphorylation en réponse à la fécondation chez l'oursin (Zhang *et al.*, 2005), soutenant ainsi l'hypothèse du rôle activateur de la MAPK sur l'augmentation de l'activité d'eIF2B après fécondation.

Le contrôle exercé par eIF2 contribue à la régulation de la synthèse protéique dans l'embryon d'oursin, et s'inscrit dans un contexte multifactoriel de contrôle. Un autre élément régulateur majeur est constitué au niveau d'eIF4E et intervient lors de l'assemblage des eIFs sur l'ARNm pour la formation du complexe d'initiation 48 S. La stimulation de la synthèse protéique après fécondation chez l'oursin dépend de la disponibilité d'eIF4E pour son partenaire eIF4G. Dans les ovules non fécondés, l'interaction d'eIF4E avec eIF4G est inhibée par 4E-BP, qui est dégradé en réponse à la fécondation (Salaun *et al.*, 2003).

#### Les acteurs qui régulent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$

Chez l'oursin, trois kinases capables de phosphoryler eIF2 $\alpha$  sur le site régulateur de la serine 51, sont présentes dans le génome : GCN2, HRI et PERK (Morales *et al.*, 2006). Leurs transcrits ont été détectés dans les embryons précoces (Cameron *et al.*, 2009) mais il n'y a pas de données concernant la présence de ces kinases comme protéines maternelles dans les ovules. eIF2 $\alpha$  est physiologiquement phosphorylé avant fécondation et déphosphorylé en réponse à la fécondation. Les résultats de ma thèse indiquent que les acteurs qui contrôlent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  sont également modulés en réponse à la fécondation. Un candidat potentiellement responsable de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les ovules d'oursin est la kinase GCN2. Récemment, il a été montré que dans les ovocytes de souris, GCN2 est très exprimée et active, d'une manière corrélée avec la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Alves *et al.*, 2009).

GCN2 est la plus ancestrale des quatre eIF2 $\alpha$  kinases décrites chez les eucaryotes et elle est connue pour réguler la synthèse protéique dans des situations de manque en acides aminés. Chez l'oursin, nous avons montré que le traitement des œufs avec des dérivés alcooliques d'acides aminés (leucinol, methioninol) induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  après fécondation. Le leucinol et le

methioninol miment les conditions de manque en acides aminés dans la cellule puisqu'ils produisent des ARNt déchargés, qui vont activer GCN2.

La fécondation chez l'oursin est caractérisée par une entrée importante d'acides aminés (Timourian et Watchmaker, 1970). Si dans les ovules, GCN2 est active et impliquée dans le maintien du niveau basal de synthèse protéique, la fécondation inactive GCN2, probablement via l'influx d'acides aminés, ce qui permet la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .

Cet évènement serait possible par corroboration avec l'augmentation de l'activité phosphatase après fécondation. Nous avons montré que le traitement des œufs avec l'inhibiteur de phosphatase calyculine A, produit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Cette observation indique qu'une activité phosphatase est capable de contrôler la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les embryons précoces d'oursin et pourrait être impliquée dans la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  en réponse à la fécondation.

L'ensemble de ces données indiquent qu'un équilibre fin entre l'activité kinase/phosphatase est impliqué dans le contrôle de l'augmentation de la synthèse protéique lié à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , en réponse à la fécondation chez l'oursin.

En plus de la situation de manque en acides aminés, GCN2 joue un rôle régulateur au niveau du cycle cellulaire aussi. Chez la levure, GCN2 intervient dans la régulation du point de surveillance G1/S (Tvegard *et al.*, 2007). En effet, certains agents génotoxiques, notamment les radiations UV, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou encore le MMS peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et d'une manière corrélée, GCN2 est activée chez les levures (Menacho-Marquez *et al.*, 2007; Tvegard *et al.*, 2007; Krohn *et al.*, 2008) ou dans des cellules humaines (Deng *et al.*, 2002). Chez l'oursin, le traitement des embryons au MMS induit l'activation de GCN2, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , l'inhibition de la synthèse protéique et l'arrêt du cycle cellulaire.

Dans les ovules d'oursin, qui sont des cellules physiologiquement arrêtées en G1, il a été montré que les kinases des points de surveillance G1/S sont actives (Aze *et al.*, 2010). Ces résultats récents soutiennent une fois de plus l'hypothèse selon laquelle GCN2 serait active dans les ovules d'oursin et impliquée dans le maintien de l'état phosphorylé d'eIF2 $\alpha$ .

Même si GCN2 semble jouer un rôle important dans ce contexte, nous ne pouvons pas exclure que d'autres kinases (PERK ou HRI) pourraient être également impliquées dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les embryons d'oursin.

### Induction de l'apoptose et modifications des facteurs de traduction

Des modifications significatives de la traduction sont produites lors de l'induction de l'apoptose. Chez l'oursin, l'induction de l'apoptose dans les embryons précoces par le traitement au MMS s'accompagne de l'inhibition de la synthèse protéique globale et des modifications au niveau des facteurs d'initiation de la traduction, dont la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Une autre modification de la machinerie de traduction, qui intervient dans des temps plus tardifs est le clivage d'eIF4G, lorsque la caspase-3 est activée (Le Bouffant *et al.*, 2008a). Le clivage d'eIF4G produit une isoforme réduite d'environ 30 KDa. Il serait intéressant d'étudier en perspective quel est le rôle de cette forme clivée d'eIF4G en conditions apoptotiques, quels sont ses partenaires et où est-ce qu'elle se situe sur un gradient de polysomes.

### Recrutement polysomal dans les ovules et embryons d'oursin. Synthèse protéique sélective

La synthèse protéique est une composante fondamentale pour le déroulement du développement précoce chez l'oursin. Nous avons voulu comprendre quel est l'impact de la machinerie de traduction sur le traductome, lorsque des modifications au niveau des facteurs de traduction s'opèrent (par exemple : phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , présence/absence de 4E-BP). Nous avons choisi d'analyser deux situations : (1) la fécondation, dans un contexte d'augmentation physiologique de synthèse protéique et (2) l'induction de l'apoptose, dans un contexte d'inhibition de la synthèse protéique en réponse au traitement des embryons précoces au MMS.

Pour la fécondation, le traductome est comparé entre les ovules non fécondés (eIF2 $\alpha$  est phosphorylé, 4E-BP est présent) et les embryons précoces (eIF2 $\alpha$  est déphosphorylé, 4E-BP est absent). La fécondation provoque l'augmentation du recrutement polysomal d'une façon générale (Humphreys, 1971; Goustin et Wilt, 1981). Il est donc intéressant de déterminer d'une manière qualitative (l'identité des transcrits) et quantitative (la fréquence des transcrits) comment se regroupent d'une part, les familles des transcrits majoritairement présents dans le traductome, et d'autre part, les transcrits minoritaires, absents ou peu représentés dans les polysomes, au niveau des ovules ou lors de l'augmentation de la synthèse protéique après fécondation, chez l'oursin.

Le traitement au MMS des zygotes d'oursin induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et cet évènement va provoquer à la fois une diminution de la synthèse globale, mais en même temps, pourrait également induire des synthèses protéiques sélectives. Nous nous attendons à identifier au niveau du traductome en réponse au MMS, des acteurs pro-apoptotiques comme Bcl-2 ou APAF-1 responsables de stimuler l'activation des caspases par la suite (*Figure 3.1*).

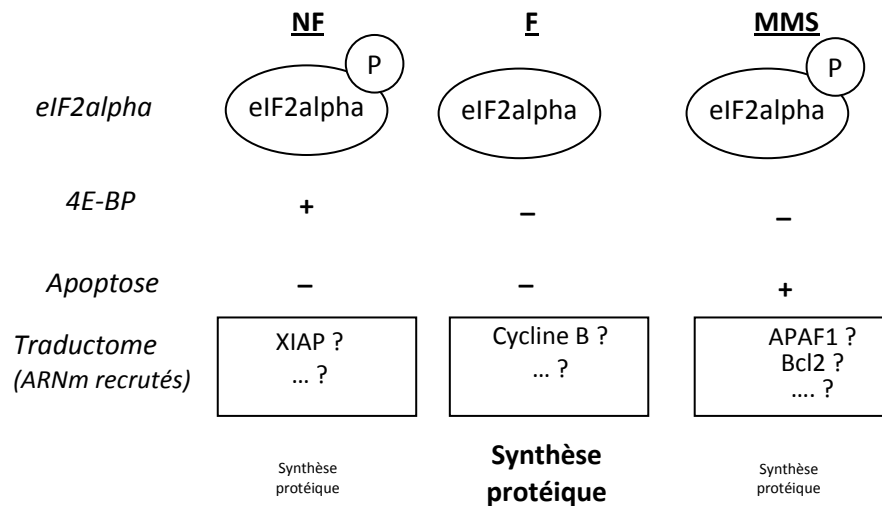


Figure 3.1. Stratégie de recherche des transcrits régulés à la fécondation et lors de l'induction de l'apoptose après séquençage à haut-débit des transcrits purifiés des polysomes, en présence des modifications au niveau des eIFs, notamment eIF2 $\alpha$  et 4E-BP (voir texte), et lorsque la synthèse protéique est modulée (réduite en NF et MMS et importante en F).

Les ARNm différenciellement recrutés dans les polysomes et identifiés par le séquençage devront être validés par analyse RT-PCRq à partir des échantillons d'oursin dans les trois conditions étudiées (NF / F / MMS). Il est en effet nécessaire de pouvoir démontrer que les ARNm séquencés sont effectivement bien présents/absents dans les polysomes, et démontrer une régulation du recrutement polysomal en fonction des diverses conditions expérimentales. Plusieurs paires de primers ont déjà été validés pour la PCRq (eIF4E3, 4E-BP, eIF4G), et l'annotation du génome et du transcriptome de *P. lividus* va nous permettre de dessiner des primers pour d'autres gènes cibles issus de notre criblage.

Dans un deuxième temps, la liste des ARN recrutés identifiés par blast devrait nous permettre de cibler des ARN très fortement recrutés ou réprimés, selon la voie métabolique ou la grande fonction biologique dans laquelle il intervient (apoptose, division, signalisation ....) et de valider ces nouveaux acteurs régulés.

Les données de séquençages nous permettront d'appréhender les mécanismes de régulation du recrutement dans les polysomes. Nous rechercherons des motifs communs au niveau des régions UTR des ARNm (par exemple : uORF, MRE, IRES, CPE) et les transcrits candidats seront également validés par PCRq. Ces motifs particuliers caractéristiques des ARNm sont importants dans la régulation traductionnelle des transcrits respectifs, dans un contexte de synthèse protéique sélective. Le criblage des ARNm contenant ces motifs régulateurs se fera par recherche informatique au niveau du traductome de chaque condition analysée chez l'oursin (NF/ F / MMS).

### Conclusion générale

Le projet développé dans le cadre de cette thèse a permis de déchiffrer les mécanismes qui impliquent l'orchestration de la machinerie traductionnelle, notamment via le rôle régulateur de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et qui sont présents dans les embryons précoces d'oursin et en réponse à l'induction de l'apoptose par le MMS. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au concept de traductome, par une approche à haut débit, le RNAseq. Les résultats du séquençage à haut-débit vont permettre d'appréhender le réseau des gènes régulés au niveau traductionnel lors de la fécondation et lors de l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'agent génotoxique MMS.

Ces éléments de réponse permettront d'avoir une vision synthétique des grandes fonctions cellulaires dépendantes de la traduction au cours du développement précoce, en conditions physiologiques et perturbées.





**BIBLIOGRAPHIE**

- Agnello, M. and Roccheri, M. C.** (2010). Apoptosis: Focus on sea urchin development. *Apoptosis* **15**, 322-30.
- Akkaraju, G. R., Hansen, L. J. and Jagus, R.** (1991). Increase in eukaryotic initiation factor 2B activity following fertilization reflects changes in redox potential. *J Biol Chem* **266**, 24451-9.
- Alexandraki, D. and Ruderman, J. V.** (1985a). Expression of alpha- and beta-tubulin genes during development of sea urchin embryos. *Dev Biol* **109**, 436-51.
- Alexandraki, D. and Ruderman, J. V.** (1985b). Multiple polymorphic alpha- and beta-tubulin mRNAs are present in sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 134-8.
- Alone, P. V. and Dever, T. E.** (2006). Direct binding of translation initiation factor eIF2gamma-G domain to its GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors eIF5 and eIF2B epsilon. *J Biol Chem* **281**, 12636-44.
- Alves, V. S., Motta, F. L., Roffe, M., Delamano, A., Pesquero, J. B. and Castilho, B. A.** (2009). GCN2 activation and eIF2alpha phosphorylation in the maturation of mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **378**, 41-4.
- Andrei, M. A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R. and Luhrmann, R.** (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna* **11**, 717-27.
- Angerer, L. M., Chambers, S. A., Yang, Q., Venkatesan, M., Angerer, R. C. and Simpson, R. T.** (1988). Expression of a collagen gene in mesenchyme lineages of the *Strongylocentrotus purpuratus* embryo. *Genes Dev* **2**, 239-46.
- 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**, 361-375.
- Aze, A., Fayet, C., Lapasset, L. and Genevriere, A. M.** (2010). Replication origins are already licensed in G1 arrested unfertilized sea urchin eggs. *Dev Biol* **340**, 557-70.
- Baker, E. J. and Infante, A. A.** (1982). Nonrandom distribution of histone mRNAs into polysomes and nonpolysomal ribonucleoprotein particles in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2455-9.
- Barber, G. N., Thompson, S., Lee, T. G., Strom, T., Jagus, R., Darveau, A. and Katze, M. G.** (1994). The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4278-82.
- Barreau, C., Paillard, L. and Osborne, H. B.** (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* **33**, 7138-50.
- Beetschen, J. C. and Fischer, J. L.** (2004). Yves Delage (1854-1920) as a forerunner of modern nuclear transfer experiments. *Int J Dev Biol* **48**, 607-612.
- Ben-Tabou de-Leon, S. and Davidson, E. H.** (2009). Modeling the dynamics of transcriptional gene regulatory networks for animal development. *Dev Biol* **325**, 317-28.
- Benkirane, M., Neuveut, C., Chun, R. F., Smith, S. M., Samuel, C. E., Gatignol, A. and Jeang, K. T.** (1997). Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *Embo J* **16**, 611-24.
- Berlanga, J. J., Rivero, D., Martin, R., Herrero, S., Moreno, S. and de Haro, C.** (2010). Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Sty1 in Regulation of Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha Kinases in Response to Environmental Stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* **9**, 194-207.
- Besson, A., Dowdy, S. F. and Roberts, J. M.** (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* **14**, 159-69.
- Bradham, C. A., Foltz, K. R., Beane, W. S., Arnone, M. I., Rizzo, F., Coffman, J. A., Mushegian, A., Goel, M., Morales, J., Genevriere, A. M. et al.** (2006). The sea urchin kinome: a first look. *Dev Biol* **300**, 180-93.

- Brawerman, G.** (1981). The Role of the poly(A) sequence in mammalian messenger RNA. *CRC Crit Rev Biochem* **10**, 1-38.
- Bukau, B.** (2005). Ribosomes catch Hsp70s. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 472-3.
- Bushell, M., Stoneley, M., Kong, Y. W., Hamilton, T. L., Spriggs, K. A., Dobbyn, H. C., Qin, X., Sarnow, P. and Willis, A. E.** (2006). Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis. *Mol Cell* **23**, 401-12.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Frohlich, K. U. et al.** (2007). Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol Cell* **25**, 233-46.
- Cameron, R. A., Samanta, M., Yuan, A., He, D. and Davidson, E.** (2009). SpBase: the sea urchin genome database and web site. *Nucleic Acids Res* **37**, D750-4.
- Campbell, L. E., Wang, X. and Proud, C. G.** (1999). Nutrients differentially regulate multiple translation factors and their control by insulin. *Biochem J* **344 Pt 2**, 433-41.
- Campo-Paysaa, F., Semon, M., Cameron, R. A., Peterson, K. J. and Schubert, M.** (2011). microRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs. *Evol Dev* **13**, 15-27.
- Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N. and Dusanter-Fourt, I.** (2004). Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol Cell Biol* **24**, 4920-8.
- Chen, T., Ozel, D., Qiao, Y., Harbinski, F., Chen, L., Denoyelle, S., He, X., Zvereva, N., Supko, J. G., Chorev, M. et al.** (2011). Chemical genetics identify eIF2alpha kinase heme-regulated inhibitor as an anticancer target. *Nat Chem Biol* **7**, 610-6.
- Chen, Z. Q., Kan, N. C., Pribyl, L., Lautenberger, J. A., Moudrianakis, E. and Papas, T. S.** (1988). Molecular cloning of the ets proto-oncogene of the sea urchin and analysis of its developmental expression. *Dev Biol* **125**, 432-40.
- Chiorini, J. A., Boal, T. R., Miyamoto, S. and Safer, B.** (1993). A difference in the rate of ribosomal elongation balances the synthesis of eukaryotic translation initiation factor (eIF)-2 alpha and eIF-2 beta. *J Biol Chem* **268**, 13748-55.
- Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P. and Sonenberg, N.** (2005). A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* **121**, 411-23.
- Coldwell, M. J. and Morley, S. J.** (2006). Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol Cell Biol* **26**, 8448-60.
- Cole, C. N. and Scarcelli, J. J.** (2006). Unravelling mRNA export. *Nat Cell Biol* **8**, 645-7.
- 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.
- Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K. et al.** (2007). eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **129**, 195-206.
- Craig, A. W., Haghghat, A., Yu, A. T. and Sonenberg, N.** (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**, 520-3.
- Crain, W. R., Jr., Durica, D. S. and Van Doren, K.** (1981). Actin gene expression in developing sea urchin embryos. *Mol Cell Biol* **1**, 711-20.
- Dale, B. and Defelice, L.** (2011). Polyspermy prevention: facts and artifacts? *J Assist Reprod Genet* **28**, 199-207.
- Dar, A. C., Dever, T. E. and Sicheri, F.** (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* **122**, 887-900.
- Deng, J., Harding, H. P., Raught, B., Gingras, A. C., Berlanga, J. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ron, D. and Sonenberg, N.** (2002). Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol* **12**, 1279-86.
- Denny, P. C. and Tyler, A.** (1964). Activation of Protein Biosynthesis in Non-Nucleate Fragments of Sea Urchin Eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **14**, 245-&.

- Derbès, A. A.** (1847). Observations sur le mécanisme et les phénomènes qui accompagnent la formation de l'embryon chez l'oursin comestible. *Ann. Sci. Nat. Zool.* **8**, 80-98.
- Dev, K., Qiu, H., Dong, J., Zhang, F., Barthlme, D. and Hinnebusch, A. G.** (2010). The beta/Gcd7 subunit of eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B), a guanine nucleotide exchange factor, is crucial for binding eIF2 in vivo. *Mol Cell Biol* **30**, 5218-33.
- Dev, K., Santangelo, T. J., Rothenburg, S., Neculai, D., Dey, M., Sicheri, F., Dever, T. E., Reeve, J. N. and Hinnebusch, A. G.** (2009). Archaeal aIF2B interacts with eukaryotic translation initiation factors eIF2alpha and eIF2Balpha: Implications for aIF2B function and eIF2B regulation. *J Mol Biol* **392**, 701-22.
- Dever, T. E.** (1999). Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci* **24**, 398-403.
- Dever, T. E., Dar, A. C. and Sicheri, F.** (2007). The eIF2alpha kinases. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 319-368. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F. and Hinnebusch, A. G.** (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**, 585-96.
- Dholakia, J. N., Xu, Z., Hille, M. B. and Wahba, A. J.** (1990). Purification and characterization of sea urchin initiation factor 2. The requirement of guanine nucleotide exchange factor for the release of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 2-bound GDP. *J Biol Chem* **265**, 19319-23.
- Donahue, T. F., Cigan, A. M., Pabich, E. K. and Valavicius, B. C.** (1988). Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 beta gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process. *Cell* **54**, 621-32.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J. and Hinnebusch, A. G.** (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* **6**, 269-79.
- Donze, O., Jagus, R., Koromilas, A. E., Hershey, J. W. and Sonenberg, N.** (1995). Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. *Embo J* **14**, 3828-34.
- Doree, M., Labbe, J. C. and Picard, A.** (1989). M phase-promoting factor: its identification as the M phase-specific H1 histone kinase and its activation by dephosphorylation. *J Cell Sci Suppl* **12**, 39-51.
- Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S. A. and Sonenberg, N.** (2000a). A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *Embo J* **19**, 3142-56.
- Dostie, J., Lejbkowitz, F. and Sonenberg, N.** (2000b). Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J Cell Biol* **148**, 239-47.
- Dubé, F.** (1988). Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. *J Cell Physiol* **137**, 545-552.
- Duncan, R. and McConkey, E. H.** (1982). Rapid alterations in initiation rate and recruitment of inactive RNA are temporally correlated with S6 phosphorylation. *Eur J Biochem* **123**, 539-44.
- Ebert, T. A.** (2008). Longevity and lack of senescence in the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Exp Gerontol* **43**, 734-8.
- Ebert, T. A. and Southon, J. R.** (2003). Red sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus*) can live over 100 years: confirmation with A-bomb 14 carbon. *Fish. Bull.* **101**, 915-922.
- Edmonds, M.** (2002). A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**, 285-389.
- Elroy-Stein, O. and Merrick, W.** (2007). Translation initiation via cellular internal ribosome entry site. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 155-172. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Endo, T. and Nadal-Ginard, B.** (1987). Three types of muscle-specific gene expression in fusion-blocked rat skeletal muscle cells: translational control in EGTA-treated cells. *Cell* **49**, 515-26.

- Epel, D.** (1967). Protein Synthesis in Sea Urchin Eggs - a Late Response to Fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **57**, 899-906.
- Epel, D.** (2003). Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. *Evol Dev* **5**, 83-8.
- Ernst, V., Levin, D. H. and London, I. M.** (1978). Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione: activation of a protein kinase that phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4110-4.
- 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.
- Farrell, P. J., Balkow, K., Hunt, T., Jackson, R. J. and Trachsel, H.** (1977). Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell* **11**, 187-200.
- Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D. and Hatzoglou, M.** (2002). Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J Biol Chem* **277**, 19198-205.
- Ferraiuolo, M. A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E. L., Schoenberg, D. R. and Sonenberg, N.** (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol* **170**, 913-24.
- Floyd, E. E., Gong, Z. Y., Brandhorst, B. P. and Klein, W. H.** (1986). Calmodulin gene expression during sea urchin development: persistence of a prevalent maternal protein. *Dev Biol* **113**, 501-11.
- Fukuchi-Shimogori, T., Ishii, I., Kashiwagi, K., Mashiba, H., Ekimoto, H. and Igarashi, K.** (1997). Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Cancer Res* **57**, 5041-4.
- 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.
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I. H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L. A. et al.** (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14134-9.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S. et al.** (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*
- Genevière-Garrigues, A. M., Barakat, A., Doree, M., Moreau, J. L. and Picard, A.** (1995). Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. *J Cell Sci* **108 ( Pt 7)**, 2693-703.
- Geoghegan, T., Cereghini, S. and Brawerman, G.** (1979). Inactive mRNA-protein complexes from mouse sarcoma-180 ascites cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5587-91.
- Gerlitz, G., Jagus, R. and Elroy-Stein, O.** (2002). Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* **269**, 2810-9.
- Gilbert, W. V.** (2010). Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry. *J Biol Chem* **285**, 29033-8.
- Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N.** (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-63.
- Gingras, A. C., Raught, B. and Sonenberg, N.** (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* **15**, 807-26.
- Giudice, G.** (1973). *Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo*. New York and London: Academic Press.
- Gomez, E., Mohammad, S. S. and Pavitt, G. D.** (2002). Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: the guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *Embo J* **21**, 5292-301.

- Gosselin, P., Oulhen, N., Jam, M., Ronzca, J., Cormier, P., Czjzek, M. and Cosson, B. (2011). The translational repressor 4E-BP called to order by eIF4E: new structural insights by SAXS. *Nucleic Acids Res* **39**, 3496-503.
- Goustin, A. S. and Wilt, F. H. (1981). Protein synthesis, polyribosomes, and peptide elongation in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **82**, 32-40.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q. et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* **29**, 644-52.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. and Sonenberg, N. (1998). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* **18**, 334-42.
- Grimwade, J. E., Gagnon, M. L., Yang, Q., Angerer, R. C. and Angerer, L. M. (1991). Expression of two mRNAs encoding EGF-related proteins identifies subregions of sea urchin embryonic ectoderm. *Dev Biol* **143**, 44-57.
- Gross, P. R. and Cousineau, G. H. (1963). Effects of Actinomycin D on Macromolecule Synthesis and Early Development in Sea Urchin Eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **10**, 321-326.
- Gross, P. R. and Cousineau, G. H. (1964). Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Exp Cell Res*. **33**, 368-395.
- Gross, P. R., Malkin, L. I. and Moyer, W. A. (1964a). Non-Dependence of Early Protein Synthesis Upon New Rna in Fertilized Egg. *Federation Proceedings* **23**, 268-&.
- Gross, P. R., Malkin, L. I. and Moyer, W. A. (1964b). Templates for the First Proteins of Embryonic Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 407-14.
- Guerrier, P. and Doree, M. (1975). Hormonal control of reinitiation of meiosis in starfish. The requirement of 1-methyladenine during nuclear maturation. *Dev Biol* **47**, 341-8.
- Halbeisen, R. E., Galgano, A., Scherrer, T. and Gerber, A. P. (2008). Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cell Mol Life Sci* **65**, 798-813.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-108.
- Harvey, E. B. (1956). *The American Aracia and Other Sea Urchins*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press.
- Henshaw, E. C., Hirsch, C. A., Morton, B. E. and Hiatt, H. H. (1971). Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosome activity. *J Biol Chem* **246**, 436-46.
- Hernandez, G., Altmann, M., Sierra, J. M., Urlaub, H., Diez del Corral, R., Schwartz, P. and Rivera-Pomar, R. (2005). Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* **122**, 529-43.
- Hershey, J. W. (2010). Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. *Braz J Med Biol Res* **43**, 920-30.
- Hershko, A. (1999). Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1571-5; discussion 1575-6.
- Hinnebusch, A. G. (2000). Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In *Translational control of gene expression*, (ed. N. Sonenberg J. Hershey and M. Mathews), pp. 185-244. New York: CSHL Press.
- Hinnebusch, A. G. (2005). eIF2alpha kinases provide a new solution to the puzzle of substrate specificity. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 835-8.
- Hinnebusch, A. G. and Dever, T. E. (2007). Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 225-268. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hinton, T. M., Coldwell, M. J., Carpenter, G. A., Morley, S. J. and Pain, V. M. (2007). Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. *J Biol Chem* **282**, 1695-708.

- Holcik, M., Gordon, B. W. and Korneluk, R. G.** (2003). The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol Cell Biol* **23**, 280-8.
- Holcik, M. and Sonenberg, N.** (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 318-27.
- Holcik, M., Sonenberg, N. and Korneluk, R. G.** (2000). Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* **16**, 469-73.
- Hollams, E. M., Giles, K. M., Thomson, A. M. and Leedman, P. J.** (2002). mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. *Neurochem Res* **27**, 957-80.
- Hultin, T.** (1961). The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia* **17**, 410-411.
- Humphreys, T.** (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* **26**, 201-8.
- Iborra, F. J., Jackson, D. A. and Cook, P. R.** (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**, 1139-42.
- Idler, R. K. and Yan, W.** (2011). Control of messenger RNA fate by RNA binding proteins: an emphasis on mammalian spermatogenesis. *J Androl*.
- Imataka, H., Gradi, A. and Sonenberg, N.** (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *Embo J* **17**, 7480-9.
- 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.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. and Pestova, T. V.** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-27.
- Jacobson, A.** (1996). Poly(A) Metabolism and Translation: The Closed-loop Model. New York: CSHL 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**, 15530-6.
- Jennings, M. D. and Pavitt, G. D.** (2010a). eIF5 has GDI activity necessary for translational control by eIF2 phosphorylation. *Nature* **465**, 378-81.
- Jennings, M. D. and Pavitt, G. D.** (2010b). eIF5 is a dual function GAP and GDI for eukaryotic translational control. *Small Gtpases* **1**, 118-123.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R.** (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem* **271**, 2189-203.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L. and Jagus, R.** (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* **5**, 48.
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H. P. and Ron, D.** (2003). Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**, 767-75.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L. et al.** (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-54.
- Kanduc, D.** (1997). Changes of tRNA population during compensatory cell proliferation: differential expression of methionine-tRNA species. *Arch Biochem Biophys* **342**, 1-5.
- Kapp, L. D. and Lorsch, J. R.** (2004a). GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol* **335**, 923-36.
- Kapp, L. D. and Lorsch, J. R.** (2004b). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* **73**, 657-704.
- Karim, M. M., Svitkin, Y. V., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Costa-Mattioli, M. and Sonenberg, N.** (2006). A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9494-9.

- Keene, J. D.** (2010). Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic Acid. *Endocrinology* **151**, 1391-7.
- 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.
- Kelso-Winemiller, L., Yoon, J., Peeler, M. T. and Winkler, M. M.** (1993). Sea urchin maternal mRNA classes with distinct development regulation. *Dev Genet* **14**, 397-406.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Khabar, K. S.** (2010). Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2937-55.
- Kim, J. H., Park, S. M., Park, J. H., Keum, S. J. and Jang, S. K.** (2011). eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions. *Embo J* **30**, 2454-64.
- Kim, J. T., Kim, K. D., Song, E. Y., Lee, H. G., Kim, J. W., Kim, J. W., Chae, S. K., Kim, E., Lee, M. S., Yang, Y. et al.** (2006). Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g). *FEBS Lett* **580**, 6375-83.
- Kimball, S. R.** (1999). Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 25-9.
- Kimball, S. R., Horetsky, R. L. and Jefferson, L. S.** (1998). Implication of eIF2B rather than eIF4E in the regulation of global protein synthesis by amino acids in L6 myoblasts. *J Biol Chem* **273**, 30945-53.
- King, H. A., Cobbold, L. C. and Willis, A. E.** (2010). The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation. *Biochem Soc Trans* **38**, 1581-6.
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T. and Mourelatos, Z.** (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**, 1141-51.
- Kleijn, M. and Proud, C. G.** (2000). The activation of eukaryotic initiation factor (eIF)2B by growth factors in PC12 cells requires MEK/ERK signalling. *FEBS Lett* **476**, 262-5.
- Koromilas, A. E., Roy, S., Barber, G. N., Katze, M. G. and Sonenberg, N.** (1992). Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* **257**, 1685-9.
- Krohn, M., Skjolberg, H. C., Soltani, H., Grallert, B. and Boye, E.** (2008). The G1-S checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint. *J Cell Sci* **121**, 4047-54.
- Labbe, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A. and Doree, M.** (1989a). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *Embo J* **8**, 3053-8.
- Labbe, J. C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J. C., Nurse, P. and Doree, M.** (1989b). Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* **57**, 253-63.
- 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.
- Le Bouffant, R., Boulben, S., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. and Morales, J.** (2008a). Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos. *Exp Cell Res* **314**, 961-8.
- Le Bouffant, R., Cormier, P., Cueff, A., Belle, R. and Mulner-Lorillon, O.** (2007). Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1723-34.
- Le Bouffant, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Belle, R.** (2006). Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J Cell Biochem* **99**, 126-32.
- Le Bouffant, R., Mulner-Lorillon, O., Morales, J., Cormier, P. and Belle, R.** (2008b). Chromium(III) triggers the DNA-damaged checkpoint of the cell cycle and induces a functional increase of 4E-BP. *Chem Res Toxicol* **21**, 542-9.



- Le Breton, M.** (2004). Caractérisation et identification des ARNm différentiellement recrutés dans les polysomes en fonction de l'activité du complexe CDK1/cycline B. In *Biologie Cellulaire*, (ed., pp. 84. Roscoff: PARIS 6.
- Le Breton, M., Belle, R., Cormier, P., Mulner-Lorillon, O. and Morales, J.** (2003). M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 880-6.
- Leeming, D. J., Bay-Jensen, A. C., Vassiliadis, E., Larsen, M. R., Henriksen, K. and Karsdal, M. A.** (2011). Post-translational modifications of the extracellular matrix are key events in cancer progression: opportunities for biochemical marker development. *Biomarkers* **16**, 193-205.
- Lewis, S. M. and Holcik, M.** (2008). For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* **27**, 1033-5.
- Liberman, N., Marash, L. and Kimchi, A.** (2009). The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. *Cell Cycle* **8**, 204-9.
- Loberg, R. D., Ying, C., Craig, M., Day, L. L., Sargent, E., Neeley, C., Wojno, K., Snyder, L. A., Yan, L. and Pienta, K. J.** (2007). Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res* **67**, 9417-24.
- Lodish, H. F. and Jacobsen, M.** (1972). Regulation of hemoglobin synthesis. Equal rates of translation and termination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin chains. *J Biol Chem* **247**, 3622-9.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K. and Maller, J. L.** (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3009-13.
- Lopez-Lastra, M., Rivas, A. and Barria, M. I.** (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* **38**, 121-46.
- Lu, P. D., Harding, H. P. and Ron, D.** (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* **167**, 27-33.
- 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.
- Malkin, L. I., Gross, P. R. and Romanoff, P.** (1964). Polyribosomal Protein Synthesis in Fertilized Sea Urchin Eggs: the Effect of Actinomycin Treatment. *Dev Biol* **10**, 378-94.
- Marash, L. and Kimchi, A.** (2005). DAP5 and IRES-mediated translation during programmed cell death. *Cell Death Differ* **12**, 554-62.
- Marash, L., Liberman, N., Henis-Korenblit, S., Sivan, G., Reem, E., Elroy-Stein, O. and Kimchi, A.** (2008). DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis. *Mol Cell* **30**, 447-59.
- Marc, J., Belle, R., Morales, J., Cormier, P. and Mulner-Lorillon, O.** (2004). Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicological Sciences* **82**, 436-442.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. and Belle, R.** (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem Res Toxicol* **15**, 326-31.
- Marintchev, A. and Wagner, G.** (2005). Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* **37**, 1-88.
- Marissen, W. E., Guo, Y., Thomas, A. A., Matts, R. L. and Lloyd, R. E.** (2000). Identification of caspase 3-mediated cleavage and functional alteration of eukaryotic initiation factor 2alpha in apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 9314-23.
- Martin, F., Barends, S., Jaeger, S., Schaeffer, L., Prongidi-Fix, L. and Eriani, G.** (2011). Cap-assisted internal initiation of translation of histone H4. *Mol Cell* **41**, 197-209.
- Martin, K. A. and Miller, O. L., Jr.** (1983). Polysome structure in sea urchin eggs and embryos: an electron microscopic analysis. *Dev Biol* **98**, 338-48.
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J. and Duronio, R. J.** (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**, 843-54.

- Masui, Y. and Markert, C. L.** (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**, 129-45.
- Mathews, M. B., Sonenberg, N. and Hershey, J. W.** (2007). Origins and principles of translational control. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 1-40. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L. and Mohun, T.** (1983). Expression and organization of histone genes. *Annu Rev Genet* **17**, 239-77.
- McKee, A. E. and Silver, P. A.** (2007). Systems perspectives on mRNA processing. *Cell Res* **17**, 581-90.
- Meidel, S. K. and Yund, P. O.** (2001). Egg longevity and time-integrated fertilization in a temperate sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Biological Bulletin* **201**, 84-94.
- Meijer, L., Arion, D., Golsteyn, R., Pines, J., Brizuela, L., Hunt, T. and Beach, D.** (1989). Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *Embo J* **8**, 2275-82.
- Meijer, L., Azzi, L. and Wang, J. Y.** (1991). Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *Embo J* **10**, 1545-54.
- Menacho-Marquez, M., Perez-Valle, J., Arino, J., Gadea, J. and Murguia, J. R.** (2007). Gcn2p regulates a G1/S cell cycle checkpoint in response to DNA damage. *Cell Cycle* **6**, 2302-5.
- Meurs, E. F., Galabru, J., Barber, G. N., Katze, M. G. and Hovanessian, A. G.** (1993). Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 232-6.
- Meyuhas, O., Thompson, E. A., Jr. and Perry, R. P.** (1987). Glucocorticoids selectively inhibit translation of ribosomal protein mRNAs in P1798 lymphosarcoma cells. *Mol Cell Biol* **7**, 2691-9.
- Mokrejs, M., Masek, T., Vopalensky, V., Hlubucek, P., Delbos, P. and Pospisek, M.** (2010). IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res* **38**, D131-6.
- Monroy, A. and Tyler, A.** (1963). Formation of Active Ribosomal Aggregates (Polysomes) Upon Fertilization and Development of Sea Urchin Eggs. *Arch Biochem Biophys* **103**, 431-5.
- Moon, R. T., Danilchik, M. V. and Hille, M. B.** (1982). An assessment of the masked message hypothesis: sea urchin egg messenger ribonucleoprotein complexes are efficient templates for in vitro protein synthesis. *Dev Biol* **93**, 389-403.
- Moore, M. J.** (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**, 1514-8.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C. A., Beane, W. S. and Cormier, P.** (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev Biol* **300**, 293-307.
- Moreau, J. L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J. C., Peaucellier, G., Picard, A. and Genevriere, A. M.** (1998). Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Dev Biol* **200**, 182-97.
- Morgan, D. O.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V. and Sonenberg, N.** (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* **20**, 468-77.
- Morley, S. and Coldwell, M.** (2007). Matters of life and death: Translation initiation during Apoptosis. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 433-458. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morley, S. J., Coldwell, M. J. and Clemens, M. J.** (2005). Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ* **12**, 571-84.
- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C. Z. and Hotamisligil, G. S.** (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* **140**, 338-48.
- Nakano, E. and Monroy, A.** (1958). Incorporation of S35-methionine in the cell fractions of sea urchin eggs and embryos. *Exp Cell Res* **14**, 236-244.

- Nemer, M., Travaglini, E. C., Rondinelli, E. and D'Alonzo, J.** (1984). Developmental regulation, induction, and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. *Dev Biol* **102**, 471-82.
- Newbury, S. F., Muhlemann, O. and Stoecklin, G.** (2006). Turnover in the Alps: an mRNA perspective. Workshops on mechanisms and regulation of mRNA turnover. *EMBO Rep* **7**, 143-8.
- Nonato, M. C., Widom, J. and Clardy, J.** (2002). Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2alpha. *J Biol Chem* **277**, 17057-61.
- Noronha, J. M., Sheys, G. H. and Buchanan, J. M.** (1972). Induction of a reductive pathway for deoxyribonucleotide synthesis during early embryogenesis of the sea urchin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2006-10.
- Nousch, M., Reed, V., Bryson-Richardson, R. J., Currie, P. D. and Preiss, T.** (2007). The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *Rna* **13**, 374-84.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P. and Ron, D.** (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo J* **22**, 1180-7.
- Orton, K. C., Ling, J., Waskiewicz, A. J., Cooper, J. A., Merrick, W. C., Korneeva, N. L., Rhoads, R. E., Sonenberg, N. and Traugh, J. A.** (2004). Phosphorylation of Mnk1 by caspase-activated Pak2/gamma-PAK inhibits phosphorylation and interaction of eIF4G with Mnk. *J Biol Chem* **279**, 38649-57.
- Otero, L. J., Devaux, A. and Standart, N.** (2001). A 250-nucleotide UA-rich element in the 3' untranslated region of *Xenopus laevis* Vg1 mRNA represses translation both in vivo and in vitro. *Rna* **7**, 1753-67.
- Oulhen, N., Boulben, S., Bidinosti, M., Morales, J., Cormier, P. and Cosson, B.** (2009). A variant mimicking hyperphosphorylated 4E-BP inhibits protein synthesis in a sea urchin cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS One* **4**, e5070.
- Oulhen, N. and Cormier, P.** (2006). [eIF4E and developmental decisions: when translation drives the development]. *Med Sci (Paris)* **22**, 507-13.
- Oulhen, N., Salaun, P., Cosson, B., Cormier, P. and Morales, J.** (2007). After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J Cell Sci* **120**, 425-34.
- Palam, L. R., Baird, T. D. and Wek, R. C.** (2011). Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J Biol Chem* **286**, 10939-49.
- Palmiter, R. D.** (1974). Differential rates of initiation of conalbumin and ovalbumin messenger ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* **249**, 6779-87.
- Palmiter, R. D.** (1975). Quantitation of parameters that determine the rate of ovalbumin synthesis. *Cell* **4**, 189.
- 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.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R. and Ramakrishnan, V.** (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* **26**, 41-50.
- Paytubi, S., Wang, X., Lam, Y. W., Izquierdo, L., Hunter, M. J., Jan, E., Hundal, H. S. and Proud, C. G.** (2009). ABC50 promotes translation initiation in mammalian cells. *J Biol Chem* **284**, 24061-73.
- 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.
- Penman, S., Scherrer, K., Becker, Y. and Darnell, J. E.** (1963). Polyribosomes in Normal and Poliovirus-Infected Hela Cells and Their Relationship to Messenger-Rna. *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**, 654-62.
- Perseke, M., Bernhard, D., Fritsch, G., Brummer, F., Stadler, P. F. and Schlegel, M.** (2010). Mitochondrial genome evolution in Ophiuroidea, Echinoidea, and Holothuroidea: insights in phylogenetic relationships of Echinodermata. *Mol Phylogenet Evol* **56**, 201-11.
- Pines, J.** (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* **1**, E73-9.
- Proud, C. G.** (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 3-12.

- Pulcrano, G., Leonardo, R., Aniello, F., Mancini, P., Piscopo, M., Branno, M. and Fucci, L.** (2005). PLAU is a novel *P. lividus* sea urchin RNA-binding protein. *Gene* **347**, 99-107.
- Pyronnet, S.** (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochem Pharmacol* **60**, 1237-43.
- 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.
- Quevedo, C., Alcazar, A. and Salinas, M.** (2000). Two different signal transduction pathways are implicated in the regulation of initiation factor 2B activity in insulin-like growth factor-1-stimulated neuronal cells. *J Biol Chem* **275**, 19192-7.
- Quevedo, C., Salinas, M. and Alcazar, A.** (2003). Initiation factor 2B activity is regulated by protein phosphatase 1, which is activated by the mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in insulin-like growth factor 1-stimulated neuronal cells. *J Biol Chem* **278**, 16579-86.
- Raff, R. A.** (1980). Masked messenger RNA and the regulation of protein synthesis in eggs and embryos. New York: Academic Press.
- Raff, R. A., Greenhouse, G., Gross, K. W. and Gross, P. R.** (1971). Synthesis and storage of microtubule proteins by sea urchin embryos. *J Cell Biol* **50**, 516-27.
- Regier, J. and Kafatos, F.** (1977). Absolute rates of protein synthesis in sea urchins with specific activity measurements of radioactive leucine and leucyl-tRNA. *Dev Biol* **57**, 270-283.
- Richard, M., Drouin, R. and Beaulieu, A. D.** (1998). ABC50, a novel human ATP-binding cassette protein found in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated synoviocytes. *Genomics* **53**, 137-45.
- Richter, J. D.** (1999). Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 446-56.
- Robertson, A. J., Croce, J., Carbonneau, S., Voronina, E., Miranda, E., McClay, D. R. and Coffman, J. A.** (2006). The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology In Press, Accepted Manuscript*.
- Roccheri, M. C., Barbata, G., Cardinale, F., Tipa, C., Bosco, L., Oliva, O. A., Cascino, D. and Giudice, G.** (1997). Apoptosis in sea urchin embryos. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 359-66.
- Roccheri, M. C., Tipa, C., Bonaventura, R. and Matranga, V.** (2002). Physiological and induced apoptosis in sea urchin larvae undergoing metamorphosis. *Int J Dev Biol* **46**, 801-6.
- Roig, J., Tuazon, P. T. and Traugh, J. A.** (2001). Cdc42-independent activation and translocation of the cytosolic p21-activated protein kinase gamma-PAK by sphingosine. *FEBS Lett* **507**, 195-9.
- Roll-Mecak, A., Alone, P., Cao, C., Dever, T. E. and Burley, S. K.** (2004). X-ray structure of translation initiation factor eIF2gamma: implications for tRNA and eIF2alpha binding. *J Biol Chem* **279**, 10634-42.
- Ron, D. and Harding, H. P.** (2007). eIF2alpha Phosphorylation in cellular stress responses and disease. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 369-400. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rothenburg, S., Seo, E. J., Gibbs, J. S., Dever, T. E. and Dittmar, K.** (2009). Rapid evolution of protein kinase PKR alters sensitivity to viral inhibitors. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 63-70.
- Rudra, D. and Warner, J. R.** (2004). What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev* **18**, 2431-6.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N. and Cormier, P.** (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **255**, 428-39.
- Samanta, M. P., Tongprasit, W., Istrail, S., Cameron, R. A., Tu, Q., Davidson, E. H. and Stolc, V.** (2006). The transcriptome of the sea urchin embryo. *Science* **314**, 960-2.
- Sasaki, K. and Chiba, K.** (2004). Induction of apoptosis in starfish eggs requires spontaneous inactivation of MAPK (extracellular signal-regulated kinase) followed by activation of p38MAPK. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1387-1396.
- Sayed, D. and Abdellatif, M.** (2011). MicroRNAs in Development and Disease. *Physiol Rev* **91**, 827-87.

- 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.
- Schmidt, E. V.** (2004). The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* **23**, 3217-21.
- Schnackenberg, B. J., Palazzo, R. E. and Marzluff, W. F.** (2007). Cyclin E/Cdk2 is required for sperm maturation, but not DNA replication, in early sea urchin embryos. *Genesis* **45**, 282-91.
- Schneider, R. J. and Sonenberg, N.** (2007). Translational Control in Cancer Development and Progression. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 401-431. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M.** (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-42.
- Shi, J., Hershey, J. W. and Nelson, M. A.** (2009). Phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 3f by cyclin-dependent kinase 11 during apoptosis. *FEBS Lett* **583**, 971-7.
- Showman, R. M., Wells, D. E., Anstrom, J., Hursh, D. A. and Raff, R. A.** (1982). Message-specific sequestration of maternal histone mRNA in the sea urchin egg. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5944-7.
- Sodergren, E. Weinstock, G. M. Davidson, E. H. Cameron, R. A. Gibbs, R. A. Angerer, R. C. Angerer, L. M. Arnone, M. I. Burgess, D. R. Burke, R. D. et al.** (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**, 941-52.
- Sokabe, M., Yao, M., Sakai, N., Toya, S. and Tanaka, I.** (2006). Structure of archaeal translational initiation factor 2 betagamma-GDP reveals significant conformational change of the beta-subunit and switch 1 region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13016-21.
- Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G.** (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**, 731-745.
- Song, J. L., Wong, J. L. and Wessel, G. M.** (2006). Oogenesis: single cell development and differentiation. *Dev Biol* **300**, 385-405.
- Spiegler, M. A. and Oppenheimer, S. B.** (1995). Extending the Viability of Sea-Urchin Gametes. *Cryobiology* **32**, 168-174.
- Spriggs, K. A., Bushell, M. and Willis, A. E.** (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* **40**, 228-37.
- Srivastava, S. P., Kumar, K. U. and Kaufman, R. J.** (1998). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 2416-23.
- Stafford, D. W., Iverson, R. M. and Sofer, W. H.** (1964). Demonstration of Polyribosomes after Fertilization of Sea Urchin Egg. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **52**, 313-316.
- Standart, N. M., Bray, S. J., George, E. L., Hunt, T. and Ruderman, J. V.** (1985). The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. *J Cell Biol* **100**, 1968-76.
- Stoneley, M. and Willis, A. E.** (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**, 3200-7.
- Stumpf, C. R. and Ruggero, D.** (2011). The cancerous translation apparatus. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 474-83.
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S. E., Kaufman, R. J. and Ramaiah, K. V.** (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* **39**, 12929-38.
- Sumerel, J. L., Moore, J. C., Schnackenberg, B. J., Nichols, J. A., Canman, J. C., Wessel, G. M. and Marzluff, W. F.** (2001). Cyclin E and its associated cdk activity do not cycle during early embryogenesis of the sea Urchin. *Dev Biol* **234**, 425-40.
- Svitkin, Y. V. and Sonenberg, N.** (2004). An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation in vitro. *Methods Mol Biol* **257**, 155-70.

- Takizawa, C. G. and Morgan, D. O.** (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 658-65.
- Tettweiler, G., Miron, M., Jenkins, M., Sonenberg, N. and Lasko, P. F.** (2005). Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. *Genes Dev* **19**, 1840-3.
- Timourian, H. and Watchmaker, G.** (1970). Protein synthesis in sea urchin eggs. II. Changes in amino acid uptake and incorporation at fertilization. *Dev Biol* **23**, 478-91.
- Tinton, S. A., Schepens, B., Bruynooghe, Y., Beyaert, R. and Cornelis, S.** (2005). Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha. *Biochem J* **385**, 155-63.
- Tomanek, L.** (2011). Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Ann Rev Mar Sci* **3**, 373-99.
- Tvegard, T., Soltani, H., Skjolberg, H. C., Krohn, M., Nilssen, E. A., Kearsy, S. E., Grallert, B. and Boye, E.** (2007). A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes Dev* **21**, 649-54.
- Vacquier, V. D.** (2011). Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **78**, 553-64.
- van den Beucken, T., Koritzinsky, M. and Wouters, B. G.** (2006). Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biol Ther* **5**, 749-55.
- Varshney, U., Lee, C. P. and RajBhandary, U. L.** (1993). From elongator tRNA to initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2305-9.
- Vattem, K. M. and Wek, R. C.** (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11269-74.
- Vogel, C.** (2011). Translation's coming of age. *Mol Syst Biol* **7**, 498.
- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G. and McCarthy, J. E. G.** (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 503-511.
- Voronina, E., Marzluff, W. F. and Wessel, G. M.** (2003). Cyclin B synthesis is required for sea urchin oocyte maturation. *Developmental Biology* **256**, 258-275.
- Voronina, E. and Wessel, G. M.** (2001). Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Molecular Reproduction and Development* **60**, 553-561.
- Voronina, E. and Wessel, G. M.** (2003). The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* **58**, 53-110.
- Wagenaar, E. B.** (1983). The Timing of Synthesis of Proteins Required for Mitosis in the Cell-Cycle of the Sea-Urchin Embryo. *Experimental Cell Research* **144**, 393-403.
- Walker, C. W., Harrington, L. M., Lesser, M. P. and Fagerberg, W. R.** (2005). Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. *Biol Bull* **209**, 31-48.
- Walton, G. M. and Gill, G. N.** (1975). Nucleotide regulation of a eukaryotic protein synthesis initiation complex. *Biochim Biophys Acta* **390**, 231-45.
- Wang, X., Flynn, A., Waskiewicz, A. J., Webb, B. L., Vries, R. G., Baines, I. A., Cooper, J. A. and Proud, C. G.** (1998). The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* **273**, 9373-7.
- Wang, X., Janmaat, M., Beugnet, A., Paulin, F. E. and Proud, C. G.** (2002). Evidence that the dephosphorylation of Ser(535) in the epsilon-subunit of eukaryotic initiation factor (eIF) 2B is insufficient for the activation of eIF2B by insulin. *Biochem J* **367**, 475-81.
- Wang, X., Paulin, F. E., Campbell, L. E., Gomez, E., O'Brien, K., Morrice, N. and Proud, C. G.** (2001). Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. *Embo J* **20**, 4349-59.

- Wang, X. and Proud, C. G.** (2008). A novel mechanism for the control of translation initiation by amino acids, mediated by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2B. *Mol Cell Biol* **28**, 1429-42.
- Waters, L. C., Strong, S. L., Ferlemann, E., Oka, O., Muskett, F. W., Veverka, V., Banerjee, S., Schmedt, T., Henry, A. J., Klempnauer, K. H. et al.** (2011). Structure of the tandem MA-3 region of Pdc4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G: molecular mechanisms of a tumor suppressor. *J Biol Chem* **286**, 17270-80.
- Wehner, K. A. and Sarnow, P.** (2007). Regulation of mRNA Molecules by MicroRNA. In *Translational control in biology and medicine*, (ed. M. B. Mathews N. Sonenberg and J. W. Hershey), pp. 297-318. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wek, R. C., Jiang, H. Y. and Anthony, T. G.** (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**, 7-11.
- Williams, D. D., Price, N. T., Loughlin, A. J. and Proud, C. G.** (2001). Characterization of the mammalian initiation factor eIF2B complex as a GDP dissociation stimulator protein. *J Biol Chem* **276**, 24697-703.
- 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.
- Wolin, S. L. and Walter, P.** (1988). Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. *Embo J* **7**, 3559-69.
- Wu, Q., Kim, Y. C., Lu, J., Xuan, Z., Chen, J., Zheng, Y., Zhou, T., Zhang, M. Q., Wu, C. I. and Wang, S. M.** (2008). Poly A- transcripts expressed in HeLa cells. *PLoS One* **3**, e2803.
- Yajima, M. and Wessel, G. M.** (2011). Small micromeres contribute to the germline in the sea urchin. *Development* **138**, 237-43.
- Yamamoto, Y., Singh, C. R., Marintchev, A., Hall, N. S., Hannig, E. M., Wagner, G. and Asano, K.** (2005). The eukaryotic initiation factor (eIF) 5 HEAT domain mediates multifactor assembly and scanning with distinct interfaces to eIF1, eIF2, eIF3, and eIF4G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16164-9.
- Yamanaka, S., Zhang, X. Y., Maeda, M., Miura, K., Wang, S., Farese, R. V., Jr., Iwao, H. and Innerarity, T. L.** (2000). Essential role of NAT1/p97/DAP5 in embryonic differentiation and the retinoic acid pathway. *Embo J* **19**, 5533-41.
- 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 Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* **23**, 26-37.
- Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S. and Schmitt, E.** (2006). Structural switch of the gamma subunit in an archaeal aIF2 alpha gamma heterodimer. *Structure* **14**, 119-28.
- Zhang, H. and Ruderman, J. V.** (1993). Differential replication capacities of G1 and S-phase extracts from sea urchin eggs. *J Cell Sci* **104 ( Pt 2)**, 565-72.
- Zhang, W. L., Huitorel, P., Glass, R., Fernandez-Serra, M., Arnone, M. I., Chiri, S., Picard, A. and Ciapa, B.** (2005). A MAPK pathway is involved in the control of mitosis after fertilization of the sea urchin egg. *Dev Biol* **282**, 192-206.
- Zhou, D., Palam, L. R., Jiang, L., Narasimhan, J., Staschke, K. A. and Wek, R. C.** (2008). Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J Biol Chem* **283**, 7064-73.
- Zhu, N., Gu, L., Findley, H. W. and Zhou, M.** (2005). Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 1272-9.



**ANNEXES**



*Annexe*

## Article 2 :

**mRNA-selective translation induced by FSH in primary Sertoli cells***(soumis à Molecular Endocrinology)*

Cet article est publié en collaboration avec l'équipe du Dr Pascale Crépieux (INRA, Tours) qui s'intéresse à la régulation traductionnelle dans les cellules de Sertoli de rat, en réponse à l'hormone folliculostimulante (FSH). La FSH est un régulateur clé de l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli, qui est importante dans la spermatogenèse.

Nous avons observé que la FSH induit l'augmentation de la synthèse protéique après 90 minutes de stimulation. Cet événement est corrélé avec une augmentation du recrutement des ARNm dans les polysomes. Nous avons également observé la traduction sélective d'acteurs cibles de la FSH. Cette traduction sélective s'expliquerait par l'existence de synthèses protéiques localisées dans les cellules de Sertoli, importantes pour le déroulement de la spermatogenèse.

# Molecular Endocrinology

## mRNA-selective translation induced by FSH in primary Sertoli cells --Manuscript Draft--

Manuscript Number:

Full Title: mRNA-selective translation induced by FSH in primary Sertoli cells

Short Title: FSH regulates mRNA-selective translation

Article Type: Research Paper

Corresponding Author: Pascale Crépieux, Ph.D.  
CNRS  
Nouzilly, FRANCE

Corresponding Author Secondary Information:

Corresponding Author's Institution: CNRS

Corresponding Author's Secondary Institution:

First Author: Astrid Musnier, Ph.D.

First Author Secondary Information:

All Authors: Astrid Musnier, Ph.D.

Kelly Leon, M.Sc.

Julia Morales, Ph.D.

Eric Reiter, Ph.D.

Thomas Boulo, B.Sc.

Vlad Costache, M.Sc.

Patrick Vourc'h, M.D./Ph.D.

Domitille Heitzler, Ph.D.

Nathalie Oulhen, Ph.D.

Anne Poupon, Ph.D.

Sandrine Boulben, B.Sc.

Patrick Cormier, Ph.D.

Pascale Crépieux, Ph.D.

All Authors Secondary Information:

Abstract:

Follicle-stimulating hormone (FSH) is a key hormonal regulator of Sertoli cell secretory activity, required to optimize sperm production. To fulfil its biological function, FSH binds a G protein-coupled receptor, the FSH-R. The FSH-R-transduced signalling network ultimately leads to the transcription or down-regulation of numerous genes. In addition, recent evidence has suggested that FSH might also regulate protein translation. However, this point has never been demonstrated conclusively yet. Here, we have addressed this issue in primary rat Sertoli cells endogenously expressing physiological levels of FSH-R. We observed that, within 90 minutes of stimulation, FSH not only enhanced overall protein synthesis, but also increased the recruitment of mRNA to polysomes. m7GTP pull-down experiments revealed the functional...

1 Title: mRNA-selective translation induced by FSH in primary Sertoli cells

2

3 Abbreviated title: FSH regulates mRNA-selective translation

4

5 Authors: Astrid MUSNIER<sup>1#</sup>, Kelly LEON<sup>1#</sup>, Julia MORALES<sup>2</sup>, Eric REITER<sup>1</sup>, Thomas

6 BOULO<sup>1</sup>, Vlad COSTACHE<sup>2</sup>, Patrick VOUREC<sup>3,4</sup>, Domitille HEITZLER<sup>1</sup>, Nathalie OULHEN<sup>2</sup>,

7 Anne POUPON<sup>1</sup>, Sandrine BOULBEN<sup>2</sup>, Patrick CORMIER<sup>2</sup>, Pascale CREPIEUX<sup>1</sup>

8 # equal contribution

9

10 Affiliations: From <sup>1</sup>BIOS group, INRA, UMR85, Unité Physiologie de la Reproduction et des

11 Comportements, F-37380 Nouzilly, France; CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France;

12 Université François Rabelais, F-37041 Tours, France; IFCE, F-37380 Nouzilly, France- <sup>2</sup>UPMC

13 Univ Paris VI, UMR 7150 Mer et Santé, Equipe Traduction, Cycle Cellulaire et Développement,

14 Station Biologique de Roscoff, F-29239 France; CNRS, UMR 7150 Mer & Santé, Station

15 Biologique de Roscoff, F-29239 France; Université Européenne de Bretagne, Roscoff, F-29239

16 France. <sup>3</sup>UMR INSERM U930, CNRS ERL 3106, Université François Rabelais de Tours, F-37000

17 Tours, France- <sup>4</sup>Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, CHRU de Tours, F-37000

18 Tours, France.

19

20 Corresponding author : Pascale Crépieux, BIOS group, INRA, UMR85, Unité Physiologie de la

21 Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France ; CNRS, UMR6175, F-37380

22 Nouzilly, France ; Université François Rabelais, F-37041 Tours, France ; Haras Nationaux, F-37380

23 Nouzilly, France. Phone: +33 2 47 42 75 14; Fax: +33 2 47 42 77 43; E-mail address:

24 Pascale.Crepieux@tours.inra.fr

25 To whom reprint requests should be addressed.

26

27 **Keywords:** FSH, mRNA translation, Sertoli cells

Powered by Editorial Manager® and Preprint Manager® from Aries Systems Corporation

28

29 Financial supports: A.M. and K.L. were funded by fellowships from the Région Centre and from  
30 the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), N.O. was funded by a fellowship from  
31 the French Ministère de la Recherche et de la Technologie., V.C. was funded by a fellowship from  
32 the Région Bretagne. This work was supported by the INRA AIP AgroBI, AE INRIA/INRA  
33 REGATE, Institut Fédératif de Recherche 135 and by the Centre National de la Recherche  
34 Scientifique (CNRS).

35

36 Disclosure summary: The authors have nothing to disclose.

37

38

39 Abstract

40 Follicle-stimulating hormone (FSH) is a key hormonal regulator of Sertoli cell secretory  
41 activity, required to optimize sperm production. To fulfil its biological function, FSH binds a G  
42 protein-coupled receptor, the FSH-R. The FSH-R-transduced signalling network ultimately leads  
43 to the transcription or down-regulation of numerous genes. In addition, recent evidence has  
44 suggested that FSH might also regulate protein translation. However, this point has never been  
45 demonstrated conclusively yet. Here, we have addressed this issue in primary rat Sertoli cells  
46 endogenously expressing physiological levels of FSH-R. We observed that, within 90 minutes of  
47 stimulation, FSH not only enhanced overall protein synthesis, but also increased the recruitment of  
48 mRNA to polysomes. m<sup>7</sup>GTP pull-down experiments revealed the functional recruitment of  
49 mammalian target of rapamycin (mTOR) and p70 S6 kinase (p70S6K) to the 5' cap, further  
50 supported by the enhanced phosphorylation of one of p70S6K targets, the eukaryotic initiation  
51 factor 4B (eIF4B). Importantly, the scaffolding eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) was also  
52 recruited, whereas eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein (4E-BP1), the eIF4E  
53 generic inhibitor, appeared to play a minor role in translational regulations induced by FSH, in  
54 contrast to what is generally observed in response to anabolic factors. This particular regulation of  
55 the translational machinery by FSH stimulation might support mRNA-selective translation, as  
56 shown here by qRT-PCR amplification of the c-fos and tissue-type plasminogen activator (tPA)  
57 mRNA, but not of all FSH target mRNA, in polysomal fractions. These findings add a new level of  
58 complexity to FSH biological roles in its natural target cells, which has been underappreciated so  
59 far.

60

61 Introduction

62 In the male gonad, follicle-stimulating hormone (FSH) is a critical factor controlling the  
63 environment that leads to the expansion of spermatogenesis. Its receptor, the FSH-R, is expressed  
64 at the surface of Sertoli cells which secrete nutrients for each individual germ cell stage to which  
65 they intimately associate. It has been known for several decades that Sertoli cell stimulation by  
66 peritoneal injection of FSH for one hour, leads to enhanced overall protein synthesis (1). In vitro,  
67 similar results were obtained following 6 hours of FSH stimulation (2) but no data are available  
68 with shorter stimulation time to alleviate mRNA transcriptional up-regulations. FSH likely acts at  
69 multiple regulation levels to enhance the protein content of the cell, as suggested for the androgen  
70 receptor (3). More recently, microarray analyses of *in vitro* stimulated rat Sertoli cells (4) and of  
71 Sertoli cells from hypogonadal mouse stimulated *in vivo* (5) have shown that FSH impacts on the  
72 steady-state level of several mRNA. Although the whole FSH-induced proteome is not available  
73 yet, it is striking to observe that pioneering works on the subject had identify only a limited  
74 number of neo-synthesized proteins, which does not match the several hundreds of genes up-  
75 regulated or down-regulated in response to FSH, as evidenced from transcriptomic analyses. This  
76 suggests that FSH proteome and transcriptome do not match and that regulations take place in  
77 between. Importantly, a recent work has quantified the part of gene regulations occurring at the  
78 level of transcription *versus* translation in the same cell type and in a unique set of experiments.  
79 This work proposed a mathematical model which demonstrates that the protein content of a cell is  
80 predominantly controlled at the level of translation (6).

81 Previous reports have suggested that FSH could regulate the translation efficacy of pre-  
82 existing mRNAs. The signalling mechanisms that control the translational machinery involve  
83 changes in the phosphorylation of translation initiation and elongation factors as well as  
84 protein/protein interactions/ dissociations. One important signaling pathway that control mRNA  
85 translation involves the mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) within the mTORC1 and  
86 mTORC2 complexes, which triggers key regulatory steps of the protein synthesis machinery. One  
87 of them involves the ribosomal protein S6 kinases, which phosphorylate ribosomal protein S6  
88 (rpS6) and eIF4B (7-10), among other proteins. Second, mTOR controls the ability of the 5'

89 methylguanosine triphosphate (m<sup>7</sup>-GTP) cap-binding protein, the eukaryotic Initiation Factor 4E  
90 (eIF4E), to initiate a molecular assembly that recruits the 40S ribosomal subunit to the mRNA,  
91 leading to formation of the 43S pre-initiation complex. Activation of mTOR leads to sequential  
92 hyperphosphorylation of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1) and its  
93 release from eIF4E, allowing eIF4E to bind the scaffolding protein eIF4G and form active pre-  
94 initiation complexes (11). eIF4G scaffolds other proteins such as eIF4A, an RNA helicase which  
95 unwinds secondary structure in mRNA 5'-untranslated regions (5'-UTRs) that may otherwise  
96 impede scanning of the initiator codon by the 43S pre-initiation complex (12).

97 FSH stimulates Sertoli cell division in the neonate, and differentiation in prepubertal  
98 animals, and these biological responses are correlated to qualitative as well as quantitative  
99 differences in FSH signalling. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSH-R) is a G  
100 protein-coupled receptor (GPCR) which activates G protein- and  $\beta$ -arrestin-dependent signalling.  
101 Coupling of the FSH-R to G<sub>s</sub> enables adenylyl cyclase to produce cAMP, whereas  $\beta$ -arrestins have  
102 been shown to stimulate the late phase of extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation  
103 (13, 14). In addition, a subtle interplay between cAMP- and phosphoinositides (PtdIns)-dependent  
104 signalling is required for p70 S6 kinase 1 (p70S6K) activation by FSH in Sertoli cells: both  
105 pathways are co-stimulatory in differentiating cells (15) but they exert opposite effect in  
106 proliferating cells (16). This is partly due to upregulation of phosphatase and tensin homolog  
107 deleted on chromosome 10 (PTEN) expression and activity by FSH in differentiating Sertoli cells,  
108 which prevents the level of phosphatidyl-inositide (3, 4, 5) trisphosphate (PIP3) to raise upon  
109 phosphoinositide-3 kinase (PI3K) activation (17). cAMP and PtdIns are also involved in p70S6K  
110 regulation in granulosa cells, where tuberous sclerosis 2 (TSC2) is a critical regulatory checkpoint  
111 triggered both by protein kinase A (PKA)-stimulated ERK (18) and by Akt (19). Furthermore, in  
112 granulosa cells, FSH exposure also enhanced the phosphorylation of p70S6K and 4E-BP1 on  
113 Ser65 (19, 20). Likewise, FSH stimulation has been shown to inhibit AMPK (AMP-activated  
114 protein kinase) and consequently induces granulosa cell proliferation (21) by reducing the cell  
115 cycle inhibitor p27<sup>kip</sup> level (22). AMPK is a regulator of cell energy consumption. As such, it

116 sustains tuberlin inhibitory effect on the mTOR pathway when the ATP level drops intracellularly,  
117 in order to limit energy-consuming anabolic processes (23).

118 To summarize, several studies have identified that signalling mechanisms classically  
119 involved in translational control can be activated in response to FSH *in vitro*. However, although  
120 the anabolic role of FSH in Sertoli cells is well established, it is still unknown whether FSH  
121 directly impacts on the translational machinery to enhance protein neo-synthesis. Here, we  
122 addressed this question in differentiating Sertoli cells from prepubertal rats, which naturally  
123 express the FSH-R at physiological levels.

124



125 Results

126 FSH enhances protein neosynthesis in Sertoli cells cultured at high density

127 We first sought to determine whether FSH enhanced protein neosynthesis in our culture  
128 conditions. Experiments were performed with short duration of FSH stimulation, i.e. 90 min in order  
129 to minimize transcriptional regulations. This procedure was chosen over actinomycin D treatment,  
130 because this drug inhibits the transcription of translation factors themselves (24). Supplemental figure  
131 1 indicates that, except for immediate-early genes such as tPA or c-fos, well-known FSH target genes  
132 such as transferrin or AMH are not or modestly up-regulated after 90 min. This observation is  
133 consistent with previous works indicating that in mice, the peak of transcriptional regulations by FSH  
134 occurs at 4 hours (5). Incorporation of <sup>35</sup>S-labelled Met/Cys into neosynthesized proteins was  
135 quantified in Sertoli cells (Figure 1) seeded at various densities and stimulated with FSH. In these  
136 conditions, a significant stimulatory impact of FSH on protein neosynthesis was visible. Incorporation  
137 of the radiolabeled aminoacids was moderately enhanced by FSH in the non-precipitable fraction  
138 (Supplemental figure S2), but to a lesser extent than in the TCA-precipitates. Previous evidence had  
139 been obtained that amino acid transport into testicular cells only played a minor role in the increased  
140 protein biosynthesis induced by FSH *in vivo* (1). Surprisingly, the hormone stimulatory effect was  
141 observed only when cells were seeded at high density. Hence, in the following, experiments were  
142 carried out at a cell density higher than 6,250 Sertoli cells per mm<sup>2</sup>.

143

144 FSH enhances the recruitment of mRNA to the polysomes

145 Since we ruled out an important transcriptional component to regulate protein neosynthesis in  
146 response to short FSH stimulation, except for immediate-early genes, we next investigated at which  
147 post-transcriptional level FSH stimulation occurred. To explore whether mRNA translation could be  
148 impacted by FSH-mediated signalling, mRNA from control or FSH-stimulated cells were fractionated  
149 on a sucrose gradient, and the OD at 254 nm of the collected fractions led to discriminate between  
150 free RNA, 40 S and 60 S ribosomal sub-units, 80 S monosomes, and polysomes, which were resolved  
151 as clear peaks (Figure 2A and 2B). Densitometry analysis of agarose gels loaded with aliquots of each  
152 of these fractions indicates that FSH stimulation enhanced the recruitment of mRNA to the polysomal

153 fractions (Figure 2C). EDTA treatment prior to loading the samples on the sucrose gradient  
154 supplemented with EDTA induced a shift towards the light, non-polysomal fractions, indicative of the  
155 dissociation of monosomes and polysomes (Supplemental Figure S3).

156

### 157 Signalling events at the mRNA 5'cap, in response to FSH

158         Since FSH stimulation enhanced polysome formation, hence mRNA translation, we assumed  
159 that the hormone might induce signalling events triggering the translational machinery. FSH  
160 stimulation led to a robust and significant recruitment of mTOR to the cap (Figures 3A and 3B). A  
161 prominent target of mTOR within the initiation complex is p70S6K. Our group has previously shown  
162 that the kinase was activated in Sertoli cells stimulated by FSH (15, 16). Here, we observed that  
163 p70S6K was also recruited to the 5'cap, upon FSH stimulation (Figures 3C and 3D), as soon as 10  
164 minutes of stimulation and even more at 60 minutes. This recruitment appeared to be functional, since  
165 one of p70S6K targets within the pre-initiation complex, eIF4B, was inducibly phosphorylated  
166 (Figures 3E, 3F). Likewise, we previously reported that another p70S6K ribosomal target, rpS6, was  
167 inducibly phosphorylated on one of its regulatory phosphorylation sites, i.e. Ser235/236 (15, 16) upon  
168 FSH stimulation.

169

### 170 FSH induces the recruitment of eIF4G to the pre-initiation complex, but bypasses 4E-BP1 release 171 from the 5'cap

172         Next, we investigated whether FSH-induced signalling could directly impact on proteins of  
173 the translation machinery. m<sup>7</sup>GTP pull-down experiments were performed with extracts from Sertoli  
174 cells stimulated with FSH at various timepoints. eIF4G was clearly recruited by eIF4E (Figures 4A,  
175 4B), as early as 10 minutes of FSH stimulation. When the association of 4E-BP1 to eIF4E was  
176 examined by m<sup>7</sup>GTP column affinity, it appeared that 4E-BP1 was retained on eIF4E (Figure 4C). As  
177 expected, eIF4E was constitutively resident on the 5'cap. We verified that 4E-BP1 could not  
178 aspecifically bind to Sepharose beads (data not shown). This result was surprising because 4E-BP1  
179 binding to the cap-binding protein eIF4E precludes further recruitment of other components of the

180 translation initiation complex, such as eIF4G which competes with 4E-BP1 for a common docking  
181 site on eIF4E (25) (see the discussion).

182

### 183 4E-BP1 phosphorylation profile in FSH-stimulated Sertoli cells

184 4E-BP1 is a prominent target of signalling pathways which ultimately regulate mRNA  
185 translation (26). It has been shown to be phosphorylated in a sequential manner, with phosphorylation  
186 of Ser65 being the ultimate event before 4E-BP1 dissociates from eIF4E (27). Surprisingly however,  
187 in Sertoli cells, we observed that Ser65 was dephosphorylated (Figures 5A and 5B), whereas the  
188 Thr70 site remained unaffected (Figures 5C and 5D) upon FSH stimulation. Altogether, these results  
189 suggest that, be 4E-BP1 phosphorylated or not upon FSH stimulation, it remains associated to the  
190 mRNA 5' cap in Sertoli cells.

191

### 192 FSH stimulation enhances the translatability of selective mRNA

193 Our data on 4E-BP1 phosphorylation and binding to the 5' cap even when eIF4G is recruited  
194 are not consistent with many other reports indicating that their interaction with eIF4E is mutually  
195 exclusive (25). On this basis we hypothesized that only a small fraction of mRNA is being translated  
196 upon FSH stimulation as suggested by the cap column affinity experiments reported above. Therefore,  
197 qRT-PCR experiments were carried on with the actively translated mRNA isolated in the polysomal  
198 fractionation (Figure 2 and Table 1 for the raw data). A set of genes known to have their expression  
199 enhanced at the mRNA and/ or protein level following FSH stimulation has been chosen for this  
200 analysis. In these conditions, three sub-classes of mRNA could be distinguished. First, mRNA such as  
201 tPA (Figure 6A) or LRPR1 (Supplemental Figure 4), for which transcriptional regulation and  
202 polysome recruitment are stimulated by FSH to a similar extent; second, mRNA such as c-fos (Figure  
203 6B) and VEGF (Figure 6B) whose polysome recruitment predominates over transcriptional  
204 regulation. The third category comprises mRNA known to be regulated by FSH, such as Tf, AMH,  
205 CcnD2 (Supplemental Figure 4B, C, D respectively) and PTEN (FigureD) but whose regulation  
206 cannot be visible after 90 min of stimulation. For those, no further effect on polysomal recruitment

207 can be observed. Altogether, these results indicate that FSH stimulation enhances the translation rate  
208 of some selective mRNA.

209

## 210 Discussion

211 Here we provide the first demonstration that FSH enhances protein translation of a subset of  
212 mRNA. Furthermore, we show that FSH stimulation enhances the functional recruitment of signalling  
213 kinases involved in the control of translation, such as mTOR and p70S6K to the mRNA 5' cap. We  
214 propose that the main regulatory step is the recruitment of the eIF4G scaffolding protein, and that the  
215 4E-BP1 inhibitor does not seem to be a major player.

216 Our initial choice for mRNA candidates was based on previous observations that the  
217 corresponding genes were responsive to FSH, as seen by detection of the mRNA or of the protein,  
218 regardless the level of regulation. We confirmed that the effect of FSH is in the same range on total  
219 and in polysome-associated tPA and LRPR1 mRNA. This result suggests that in both cases, the effect  
220 of FSH is primarily at the level of transcriptional, and that all the mRNA which are transcribed are  
221 also translated, without any further active role of FSH signalling. Besides, the c-fos and VEGF  
222 mRNA are upregulated after 90 min of FSH stimulation, but to a much lesser extent than their  
223 expression level in the polysomes. Hence, this result underscores an active role of FSH signalling in  
224 the ability the c-fos and VEGF mRNA to be selectively translated. A third class of mRNA, i.e. the Tf,  
225 AMH, CcnD2 mRNA are not upregulated at all and are not actively recruited to the polysomes. For  
226 some, if not all, of them, it can then be speculated that over longer FSH exposure, an effect on Tf  
227 translatability might have been observed without any detectable increase in total mRNA level. The  
228 PTEN mRNA also falls into this class. It was assayed here because, in a previous report, we had  
229 demonstrated that the PTEN protein level was increased very rapidly, within a few minutes of FSH  
230 stimulation, presumably from a pre-existing pool of mRNA (17). Here, we confirm that the PTEN  
231 gene is not regulated by FSH signalling at the transcriptional level, and we report here that the  
232 regulatory mechanism does not seem to involve an increased recruitment of the PTEN mRNA to the  
233 polysomes, suggesting a post-translational regulation of PTEN by FSH.

234           What is the point of stimulating the translation of some mRNA, and not of all of them? In  
235 Sertoli cells, it is an appealing hypothesis that selective mRNA translation could be related to site-  
236 specific translation. Local translation of spatially restricted mRNA has emerged as a powerful means  
237 to functionally compartmentalize neosynthesized proteins within polarized cells. This mechanism  
238 implicates that mRNA translation is silenced during their intracellular transport, and switched on  
239 when they reach their ultimate destination (28). Epithelial-like Sertoli cells are polarized feeding cells  
240 which constitute a niche for spermatogonial maintenance and differentiation throughout life. They  
241 provide appropriate nutrients to the maturing germ cells that subsequently take place all along  
242 Sertoli cell body, from the lamina to the lumen. It is tempting to speculate that FSH could locally and  
243 tightly regulate translation of pre-existing regionalized pools of mRNA in Sertoli cells. This  
244 assumption is supported by the observation that tPA is locally produced in Sertoli cells, to remodel the  
245 blood-testis barrier during spermatogenesis. Likewise, in the seminiferous tubules, the VEGF mRNA  
246 is only expressed by Sertoli cells, whereas its receptors are found at the surface of germ cells. The role  
247 of the protein might be restricted to proliferation of spermatogonia, which are in intimate contact with  
248 the basal part of Sertoli cells (29).

249           Although prepubertal rat Sertoli cells rarely divide *in vivo*, for an unclear reason they resume  
250 proliferation *in vitro* (30, 31). Cells proliferate more actively at low density. However, cap-dependent  
251 translation is inhibited when cell undergo mitosis, at the benefit of IRES-dependent translation, which  
252 accounts for about 10 % of the translation of cellular mRNA (32). Therefore, we hypothesize that the  
253 FSH stimulatory effect on protein neosynthesis that we observed in cells seeded at high density occurs  
254 mainly by regulation of cap-dependent translation.

255           We observed that eIF4E associates with both 4E-BP1 and eIF4G in m<sup>7</sup>GTP pull-down  
256 experiments. Simultaneous interaction is practically not feasible for the main reason that eIF4G and  
257 4E-BP1 both recognize a similar docking site on eIF4E (25). These observations led us to speculate  
258 that there could be different populations of eIF4E, one bound to 4E-BP1 and the other one not bound  
259 to 4E-BP1 and then free to interact with eIF4G (Figure 7). Supplemental figure S5 provides the  
260 mathematical demonstration that several populations of eIF4E are involved, one being constant, while  
261 the other one evolves through the different complexes induced by FSH. Consistently, in Mammals,

262 eIF4E-2 associates with 4E-BP1 and not with eIF4G, and conversely, eIF4E-3 associates with eIF4G  
263 and not with 4E-BP1 (33). In line with our above-mentioned hypothesis that FSH stimulation could  
264 direct site-specific mRNA translation, the eIF4E pool bound to 4E-BP1 could be linked to silenced,  
265 localizing mRNAs, whereas the eIF4E /eIF4G interaction would permit the formation of functional  
266 translation pre-initiation complexes on mRNA being translated at the site where the encoded protein  
267 needs to be produced.

268           Release of 4E-BP1 from the mRNA 5'cap is primed by growth-factor-induced sequential  
269 phosphorylation on Thr37/46, prior to phosphorylation of Thr70 and of Ser65 (34). In Sertoli cells,  
270 4E-BP1 gets dephosphorylated and rephosphorylated on its Ser65 and remains constitutively  
271 phosphorylated on its Thr70. Very recently, it has been proposed that 4E-BP1 sequence of  
272 phosphorylation was different in physiological situations (35). In line with our results, a mutant  
273 mimicking 4E-BP1 hyperphosphorylation can still interact with eIF4E, in *in vitro* translation assays,  
274 suggesting that other modifications are required for full eIF4E release (36). Therefore, our results  
275 suggest that, in some conditions, phosphorylated 4E-BP1 can still bind eIF4E.

276           In Sertoli cells, mTOR was inducibly recruited to the cap, upon FSH stimulation. In previous  
277 works, mTOR has been shown to be recruited to the translation pre-initiation complex in order to  
278 phosphorylate its targets, i.e. p70S6K and 4E-BP1, *in situ*. Given that 4E-BP1 phosphorylation is not  
279 enhanced upon FSH stimulation, mTOR recruitment may serve here only to phosphorylate p70S6K.  
280 Actually, we have previously shown that p70S6K is phosphorylated on T389 by a PI3K- and mTOR  
281 dependent manner (15). Furthermore, we report here that p70S6K was functionally recruited to the  
282 5'cap (Figure 3). This observation contrasts with previous data showing that active p70S6K is  
283 released from the cap upon insulin stimulation of HEK293 cells (37). Altogether, these observations  
284 support the notion that, in cell models close to physiology, translation may be regulated by  
285 mechanisms which do not entirely match those observed in paradigmatic starved cell lines stimulated  
286 with *bona fide* growth factors. In addition, FSH acts via a GPCR, and we previously reported that, like  
287 LH (38), FSH signalling mediates an unexpected activation mechanism of p70S6K in Sertoli cells  
288 (15, 16), which may be related to its association pattern to the 5'cap. So far, few studies on how  
289 GPCRs control translation have been extensive enough to provide a clear picture of the whole

290 translational network (39). This is quite puzzling because GPCRs are involved in most physiological  
291 processes, by binding a vast array of structurally different agonists, in fully differentiated cells, whose  
292 physiology demands regulation of protein neosynthesis. GPCRs couple to adaptor proteins of their  
293 own, such as  $\beta$ -arrestins, whereby they launch intracellular signalling cascades. Once bound to its  
294 cognate receptor, each agonist promotes a conformational change causing the physical association of  
295 the GPCR with G proteins. In addition, ligand binding also induces a range of conformational changes  
296 that overcomes G coupling and leads to  $\beta$ -arrestin-mediated signaling. Recently, in response to  
297 activation of the ATII-R<sub>1A</sub>,  $\beta$ -arrestins have been shown to intervene in the translational control by  
298 phosphorylating Mnk-1 in an ERK-dependent manner (40). Initially known to convey GPCRs towards  
299 the endocytic machinery,  $\beta$ -arrestins support a temporal hierarchy of signalling events, by scaffolding  
300 various signalling modules (41). Since these observations also come true for the FSH-R (13), whether  
301  $\beta$ -arrestins play a role in FSH-dependent regulation of translation remains to be addressed.

302 In conclusion, our results provide new avenues in understanding cell responses triggered by  
303 FSH. In vivo, regulation of gene expression occurring at the translational level could serve to fine-tune  
304 Sertoli cell protein content, in response to subtle variations of the FSH input, regarding its  
305 concentration or glycosylated isoform (42), and could serve to compartmentalize the mRNA to be  
306 translated at each spermatogenic stage.

307

## 308 Materials and methods

### 309 Primary Sertoli cells

310 Sertoli cells were isolated from testes of 19 day-old Wistar rats (Iffa-Credo, Lyon, France).  
311 Animals were treated following the current ethical guidelines of the European Community  
312 86/609/CEE. Following purification as reported previously (43), Sertoli cells were seeded on CellBind  
313 plates (Corning Life Sciences, Wilkes Barre, PA) in DMEM (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA)  
314 complemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), glutamine (2 mM), retinol (50  
315 ng/ml), vitamin E (200 ng/ml) and human transferrin (5  $\mu$ g/ml), all purchased from Sigma Chemical  
316 Co (St-Louis, MO). In average, our Sertoli cell cultures were 90 % pure, as previously quantified (43).

317 Twenty-four or forty-eight hours after initial seeding, cells were exposed to 100 ng/ ml porcine FSH,  
318 obtained from Dr George R. Bousfield (Wichita State University, KS, USA).

319

### 320 Measurement of protein synthesis by <sup>35</sup>S-labeling

321 Sertoli cells were seeded at various densities the day before labelling and FSH stimulation.  
322 Each condition was assayed in triplicate. Then cells were preincubated in DMEM without Methionine  
323 and without Cysteine (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) for 30 minutes, before the addition of 25  
324  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  L-[<sup>35</sup>S]methionine/L-[<sup>35</sup>S]cysteine (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and 100 ng/ ml FSH  
325 for 1.5 hr. Cells were then washed thrice with ice-cold PBS and were lysed with TNET extraction  
326 buffer (20 mM Tris pH 7.8, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 % v/v Triton X-100, 1 mM  
327 phenylmethylsulfonyl fluoride, 4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pepstatin, and 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   
328 aprotinin). One aliquot of each sample was precipitated with 10 % (w/v) trichloroacetic acid on 3MM  
329 GF/C glass microfiber filters (Whatman, GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) and  
330 precipitated radiolabelled proteins were quantified by scintillation counting with a Packard Tri-Carb  
331 1600 counter. An equivalent aliquot of each sample was directly placed into the scintillation liquid to  
332 quantitate the total incorporation of L-[<sup>35</sup>S]methionine/L-[<sup>35</sup>S]cysteine within cells.

333

### 334 Polysomal fractionation

335 Forty-eight hours after their initial seeding, Sertoli cells ( $15 \times 10^6$  cells per condition) were  
336 treated with FSH for 90 min at 34°C. Fifteen minutes before harvesting, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of cycloheximide  
337 (CHX) was added. Then, cells were washed with ice cold PBS/CHX and resuspended in polysome  
338 lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM KCl, 1 % NP-40, 1 % deoxycholate, 2.5  
339 mM dithiothreitol (DTT), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHX] and 500 U/mL RNasin (Promega, Madison, WI). Cellular  
340 debris were removed by centrifugation at 10, 000 rpm for 5 min and supernatants were layered onto a  
341 12 ml linear sucrose gradient (10-45 % sucrose in 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM  
342 KCl and 1 mM DTT) and centrifuged at 38, 000 rpm in an SW41-Ti rotor at 4°C for 150 min.  
343 Gradients were collected while absorbance was monitored at 254 nm using an density gradient



344 fractionation system (ISCO, Inc.). Fractions were treated with 200 µg/mL proteinase K (Ambion,  
345 Austin, TX) for 25 min at 50°C in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 % SDS, and then  
346 deproteinized with an equal volume of phenol: chloroform (1:1) and precipitated with isopropanol.  
347 The RNA from each fraction was dissolved in 30 µL diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated H<sub>2</sub>O, and  
348 an aliquot was subjected to electrophoresis through a 1 % agarose gel. A control experiment was done  
349 as above, except that the samples were pretreated with 50 mM EDTA for 10 min prior to loading and  
350 that the linear sucrose gradient was supplemented with 10 mM EDTA.

351

### 352 Real-time RT-PCR analysis

353 One microgram of total RNA was treated with DNaseI before reverse transcription  
354 using Superscript II and random primers (all from Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad,  
355 CA) according to manufacturer's instructions. Single-step, real time PCR was performed in a  
356 LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) in a final volume of 10 µL  
357 containing 25 ng of reverse transcribed RNA, 8 µL Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix  
358 UDG (Invitrogen) and 1 µM of each primer. Primers, designed using the Primer3 software  
359 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), have been synthesized by Eurogentec (Liège Science Park,  
360 Seraing, BELGIUM) and are listed in Table 2. Conditions were determined to avoid primer-  
361 dimer formation and optimal dynamic range for quantification. The relative expression of  
362 each target gene was normalized to GAPDH expression and the Cp (crossing point) values  
363 were compared by calculating the  $2^{-\Delta C_p}$  (44). Then  $2^{-\Delta C_p}$  values were compared between  
364 stimulated and unstimulated cells. Alternatively, in Supplemental data, the  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  values were  
365 compared directly, with  $\Delta\Delta C_p = [Cp_{mRNA \text{ of interest}} - Cp_{GAPDH}]_{FSH} - [Cp_{mRNA \text{ of interest}} - Cp_{GAPDH}]_{control}$ .

367

### 368 7-methyl-Guanosine (m<sup>7</sup>GTP) pull-down assay

369           Twenty millions cells at 60 % confluency were rinsed once with PBS and then resuspended in  
370 300 µl of 2X lysis buffer (40 mM Hepes pH 7.4, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 20  
371 mg/ml aprotinin, 20 mg/ml leupeptin, 1 mM Pefablock AEBSF, 2 mM DTT, 100 mM β-  
372 glycerophosphate, 20 mM pyrophosphate, 100 mM NaF, all from Sigma Chemical Co, St-Louis, MO)  
373 and gently sonicated on ice. Cell debris were discarded by centrifugation for 15 min at 13,000 g at  
374 4°C and proteins were quantified in the supernatants by a Bradford assay (Biorad, Hercules, CA,  
375 USA). For each sample, 50 µl of mGTP-coupled Sepharose beads (GE Healthcare UK Ltd,  
376 Buckinghamshire, UK) were equilibrated twice in 1X lysis buffer and were saturated with 10 % BSA.  
377 Then 100 µg of cell lysate were added to the beads in 500 µl 2X buffer, and the samples were tumbled  
378 for 1.5 hr at 4°C. After 3 washes in 1X lysis buffer complemented to 100 mM NaCl, samples were  
379 boiled in 50 µl of 2X Laemmli sample buffer and analyzed by Western blot.

380

#### 381 Western blot analysis

382           Cell lysates corresponding to an equal cell number were resolved by 10 % or 15 % acrylamide  
383 SDS-PAGE, electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel,  
384 Germany) and probed with the appropriate primary antibody, generally diluted 1: 1,000. Antibodies  
385 raised against phospho-eIF4B [S422], phospho-4E-BP1 [S65], [T70], mTOR, eIF4G and 4E-BP1  
386 were purchased from Cell Signaling Technology Inc (Beverly, MA, USA). Antibodies to p70S6K  
387 were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA) and anti-eIF4E was from  
388 BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA).

389 Horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit and anti-mouse antibodies were purchased from GE  
390 Healthcare UK Ltd (Buckinghamshire, UK), and were diluted 1: 3,000 or 1: 5,000 respectively, to  
391 detect antigen-antibody interactions by West Pico chemiluminescence (Thermo Scientific Life  
392 Science, Rockford, IL, USA). Membranes were reprobed with an anti-GAPDH antibody (Santa Cruz,  
393 CA, USA) to monitor gel loading between lanes. All the films were scanned and the optical density of  
394 the signals was measured with the ImageMaster 1D Elite version 4 Software (Amersham Biosciences,  
395 Arlington Heights, IL, USA).

396

397 Data analysis

398 Experiments shown are representative of at least 3 independent experiments, and are  
399 expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare  
400 different samples or two-way ANOVA was used for comparison of different groups. Both analyses  
401 were followed by a Bonferroni's post-test. Differences between two groups were assessed by two-  
402 tailed unpaired t-test. Differences among means were considered as significantly different at  $P < 0.05$ .  
403 Data were analyzed by using the GraphPad PRISM Software (San Diego, CA).

404

405 Acknowledgements

406 The authors thank the technical assistance of the rat breeders Deborah Crespin and Claude  
407 Cahier.

408

409 Bibliography

- 410 1. Means AR, Hall PF 1967 Effect of FSH on protein biosynthesis in testes of the  
411 immature rat. *Endocrinology* 81:1151-1160
- 412 2. DePhilip RM, Kierszenbaum AL 1982 Hormonal regulation of protein synthesis,  
413 secretion, and phosphorylation in cultured rat Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
414 79:6551-6555
- 415 3. Sanborn BM, Caston LA, Chang C, Liao S, Speller R, Porter LD, Ku CY 1991  
416 Regulation of androgen receptor mRNA in rat Sertoli and peritubular cells. *Biol*  
417 *Reprod* 45:634-641
- 418 4. McLean DJ, Friel PJ, Pouchnik D, Griswold MD 2002 Oligonucleotide microarray  
419 analysis of gene expression in follicle-stimulating hormone-treated rat Sertoli cells.  
420 *Mol Endocrinol* 16:2780-2792.
- 421 5. Sadate-Ngatchou PI, Pouchnik DJ, Griswold MD 2004 Follicle-stimulating hormone  
422 induced changes in gene expression of murine testis. *Mol Endocrinol* 18:2805-2816.

- 423 6. Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W,  
424 Selbach M 2011 Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*  
425 473:337-342
- 426 7. Cobb MH 1986 An insulin-stimulated ribosomal protein S6 kinase in 3T3-L1 cells. *J*  
427 *Biol Chem* 261:12994-12999
- 428 8. Tabarini D, Garcia de Herreros A, Heinrich J, Rosen OM 1987 Purification of a  
429 bovine liver S6 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 144:891-899
- 430 9. Jeno P, Ballou LM, Novak-Hofer I, Thomas G 1988 Identification and  
431 characterization of a mitogen-activated S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:406-  
432 410
- 433 10. Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL,  
434 Polakiewicz RD, Sonenberg N, Hershey JW 2004 Phosphorylation of eucaryotic  
435 translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J* 23:1761-  
436 1769.
- 437 11. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence  
438 JC, Jr., Abraham RT 1997 Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by  
439 the mammalian target of rapamycin. *Science* 277:99-101
- 440 12. Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T 2003 Conducting the initiation of protein synthesis:  
441 the role of eIF4G. *Biol Cell* 95:141-156
- 442 13. Kara E, Crépieux P, Gauthier C, Martinat N, Piketty V, Guillou F, Reiter E 2006 A  
443 phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the  
444 follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-  
445 arrestin-mediated ERK activation. *Mol Endocrinol* 20:3014-3026
- 446 14. Tranchant T, Durand G, Gauthier C, Crepieux P, Ulloa-Aguirre A, Royere D, Reiter E  
447 2011 Preferential beta-arrestin signalling at low receptor density revealed by

448 functional characterization of the human FSH receptor A189 V mutation. *Mol Cell*  
449 *Endocrinol* 331:109-118

450 15. Lécureuil C, Tesseraud S, Kara E, Martinat N, Sow A, Fontaine I, Gauthier C, Reiter  
451 E, Guillou F, Crépieux P 2005 Follicle-stimulating hormone activates p70 ribosomal  
452 protein S6 kinase by protein kinase A-mediated dephosphorylation of Thr 421/Ser  
453 424 in primary Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 19:1812-1820

454 16. Musnier A, Heitzler D, Boulo T, Tesseraud S, Durand G, Lecureuil C, Guillou H,  
455 Poupon A, Reiter E, Crépieux P 2009 Developmental regulation of p70 S6 kinase by a  
456 G protein-coupled receptor dynamically modeled in primary cells. *Cell Mol Life Sci*  
457 66:3487-3503

458 17. Dupont J, Musnier A, Decourtye J, Boulo T, Lécureuil C, Guillou H, Valet S,  
459 Fouchécourt S, Pitetti JL, Nef S, Reiter E, Crépieux P 2010 FSH-stimulated PTEN  
460 activity accounts for the lack of FSH mitogenic effect in prepubertal rat Sertoli cells.  
461 *Mol Cell Endocrinol* 315:271-276.

462 18. Kayampilly PP, Menon KM 2007 Follicle-stimulating hormone increases tuberin  
463 phosphorylation and mammalian target of rapamycin signaling through an  
464 extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in rat granulosa cells.  
465 *Endocrinology* 148:3950-3957

466 19. Alam H, Maizels ET, Park Y, Ghaey S, Feiger ZJ, Chandel NS, Hunzicker-Dunn M  
467 2004 FSH activation of HIF-1 by the PI3-kinase/AKT/Rheb/mTOR pathway is  
468 necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol*  
469 *Chem* 279:19431-19440

470 20. Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee EJ, Ashcroft M, Hunzicker-Dunn M 2009  
471 Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways  
472 in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target

- 473 vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-  
474 stimulating hormone. *Endocrinology* 150:915-928
- 475 21. Kayampilly PP, Menon KM 2009 Follicle-stimulating hormone inhibits adenosine 5'-  
476 monophosphate-activated protein kinase activation and promotes cell proliferation of  
477 primary granulosa cells in culture through an Akt-dependent pathway. *Endocrinology*  
478 150:929-935
- 479 22. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I 2005 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-  
480 D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-  
481 activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:39582-39593
- 482 23. Inoki K, Zhu T, Guan KL 2003 TSC2 mediates cellular energy response to control  
483 cell growth and survival. *Cell* 115:577-590
- 484 24. Raught B, Gingras AC 1999 eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J*  
485 *Biochem Cell Biol* 31:43-57
- 486 25. Hahghat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N 1995 Repression of cap-dependent  
487 translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic  
488 initiation factor-4E. *Embo J* 14:5701-5709.
- 489 26. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., Sonenberg N  
490 1994 Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a  
491 regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-767
- 492 27. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N 2001 Regulation of translation initiation by  
493 FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15:807-826.
- 494 28. Besse F, Ephrussi A 2008 Translational control of localized mRNAs: restricting  
495 protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:971-980

- 496 29. Nalbandian A, Dettin L, Dym M, Ravindranath N 2003 Expression of vascular  
497 endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the  
498 mouse. *Biol Reprod* 69:985-994
- 499 30. Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter  
500 E 2001 The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH,  
501 during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 20:4696-4709.
- 502 31. Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van  
503 Pelt AM, de Rooij DG 2009 Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate  
504 that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent  
505 cells. *Biol Reprod* 80:1084-1091
- 506 32. Pyronnet S, Dostie J, Sonenberg N 2001 Suppression of cap-dependent translation in  
507 mitosis. *Genes Dev* 15:2083-2093
- 508 33. Joshi B, Cameron A, Jagus R 2004 Characterization of mammalian eIF4E-family  
509 members. *Eur J Biochem* 271:2189-2203
- 510 34. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz  
511 RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N 2001 Hierarchical  
512 phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 15:2852-2864
- 513 35. Ayuso MI, Hernandez-Jimenez M, Martin ME, Salinas M, Alcazar A 2010 A new  
514 hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding  
515 protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress. *J Biol Chem*, 285: 34355-63
- 516 36. Oulhen N, Boulben S, Bidinosti M, Morales J, Cormier P, Cosson B 2009 A variant  
517 mimicking hyperphosphorylated 4E-BP1 inhibits protein synthesis in a sea urchin  
518 cell-free, cap-dependent translation system. *PLoS One* 4:e5070

- 519 37. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J 2005 mTOR and S6K1 mediate assembly of  
520 the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered  
521 phosphorylation events. *Cell* 123:569-580.
- 522 38. Hou X, Arvisais EW, Davis JS 2010 Luteinizing hormone stimulates mammalian  
523 target of rapamycin signaling in bovine luteal cells via pathways independent of AKT  
524 and mitogen-activated protein kinase: modulation of glycogen synthase kinase 3 and  
525 AMP-activated protein kinase. *Endocrinology* 151:2846-2857
- 526 39. Musnier A, Blanchot B, Reiter E, Crepieux P 2010 GPCR signalling to the translation  
527 machinery. *Cell Signal* 22:707-716.
- 528 40. DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ 2008 Beta-arrestin-  
529 mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem* 283:10611-10620
- 530 41. Reiter E, Lefkowitz RJ 2006 GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing,  
531 trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17:159-165
- 532 42. Ulloa-Aguirre A, Crepieux P, Poupon A, Maurel MC, Reiter E 2011 Novel pathways  
533 in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev Endocr Metab Disord*  
534 Apr 28. [Epub ahead of print]
- 535 43. Guillou F, Martinat N, Combarrous Y 1986 Study of the superactivity of equine  
536 follicle-stimulating hormone in in vitro stimulation of rat Sertoli cells. *Biochemical*  
537 *and Biophysical Acta* 887:196-203
- 538 44. Schmittgen TD, Livak KJ 2008 Analyzing real-time PCR data by the comparative  
539 C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101-1108
- 540 45. Kitano H, Funahashi A, Matsuoka Y, Oda K 2005 Using process diagrams for the  
541 graphical representation of biological networks. *Nat Biotechnol* 23:961-966  
542  
543  
544



545 Figure legends

546

547 Figure 1. Short FSH stimulation enhances protein neo-synthesis, as a function of Sertoli cell density.

548 Cells were seeded at increasing density, as indicated, prior to stimulation with 100 ng/ml FSH along  
549 with <sup>35</sup>S-labeled Methionine and Cysteine. Ninety minutes later, cells were harvested and radiolabeled  
550 proteins were quantitated as trichloroacetic precipitable counts per minute. Results were expressed as  
551 in A, as means +/- SEM of triplicates. Statistical difference was calculated using two-way ANOVA  
552 with a Bonferroni post-test to compare control versus FSH-stimulated cells, with\* for P value < 0.05.

553

554 Figure 2. FSH stimulation enhances the assembly of polysomes in Sertoli cells. Sertoli cells were

555 treated with FSH for 90 min and cell lysates were separated on a sucrose gradient. In (A) is  
556 shown an experiment done with control Sertoli cells while in (B) FSH-stimulated cells have  
557 been fractionated. Upper panel: Representative absorbance profile at OD = 254 nm, of each  
558 collected fraction of RNA separated by velocity sedimentation through a 10-45 % sucrose  
559 gradient. The positions of the 40S and 60S ribosomal subunits, 80S single ribosomes and  
560 polysomes containing 2 to 9 ribosomes are indicated. The non-polysomal fractions also  
561 contain free ARN. Lower panel: electrophoresis in a 1% agarose gel of an aliquot of RNA  
562 isolated from each of the twenty fractions. The 28S and 18S ribosomal RNAs, and the tRNA  
563 are visible upon GelRed staining (Interchim, France). (C) Quantification of the band intensity in  
564 each fraction by scanning densitometry of the agarose gels. The histogram represents the ratio of  
565 intensity in the polysome versus 80S fraction, and the results are expressed as the means +/- SEM of 5  
566 independent experiments. Statistical difference was calculated using a two-tailed unpaired t-test to  
567 compare control versus FSH-stimulated cells, with P value = 0.0503.

568

569 Figure 3. FSH increases the functional recruitment of mTOR and of p70S6K to the mRNA 5' cap.

570 Sertoli cells were treated with FSH for 60 min before lysis. Cap-binding proteins were precipitated  
571 using m<sup>7</sup>GTP-Sepharose-coated beads and analyzed by Western blot to detect the recruitment of

572 mTOR in (A) and of p70S6K in (C) as indicated. Western blots were reprobed with an anti-eIF4E  
573 antibody to detect eIF4E constitutively bound to the cap as a control. (E) Western blot analysis of  
574 eIF4B phosphorylation on Ser 422, in Sertoli cells stimulated by FSH for the indicated period of time.  
575 Membranes were reprobed with an anti-GAPDH antibody to monitor gel loading. (B), (D) and (F).  
576 Densitometry analysis of Western blots probed with antibodies raised against mTOR and p70S6K  
577 normalized by the eIF4E amount or raised against phosphorylated Ser 422 of eIF4B, respectively.  
578 Values are expressed as means +/- SEM of 3 independent experiments. Statistical difference was  
579 calculated using a two-tailed unpaired t-test in control versus FSH-stimulated cells, with \*\*\* for P<  
580 0.005 in (B) and using one-way ANOVA with a Bonferroni post-test in control versus FSH-  
581 stimulated cells, with \* for P< 0.05, in (D) and (F).

582  
583 **Figure 4.** FSH stimulation leads to the recruitment of eIF4G to the mRNA 5' cap, without apparent  
584 displacement of 4E-BP1. Sertoli cells were stimulated with FSH for 10 to 60 min before lysis. Cap-  
585 binding proteins were precipitated using m7GTP -Sepharose-coated beads and analyzed by Western  
586 blot to detect the recruitment of eIF4G and eIF4E in (A) and of 4E-BP1 and eIF-4E in (C), as  
587 indicated. WCL = whole cell lysate. (B) Quantification of the eIF4G signal normalized by the eIF4E  
588 amount, in 3 independent experiments. Values are expressed as means +/- SEM. Statistical difference  
589 was calculated using a two-tailed unpaired t-test in control versus FSH-stimulated cells, with \* for P<  
590 0.05. C. Here is shown one representative experiment out of 5.

591  
592 **Figure 5.** Analysis of 4E-BP1 phosphorylation profile in Sertoli cells. Lysates were prepared from  
593 cells stimulated in time-course of FSH stimulation. (A) The phosphorylation of 4E-BP1 was analyzed  
594 by Western blot using a specific antibody raised against phospho-Ser65. In (B) is shown the  
595 densitometry analysis of three independent kinetics, and the results are expressed as mean values +/-  
596 SEM. (C) Representative Western blot using a specific antibody raised against phosphorylated Thr70.  
597 (D) Densitometry analysis of 6 independent kinetics. Membranes were reprobed with an anti-GAPDH  
598 antibody to monitor gel loading. Values are expressed as means +/- SEM. Statistical difference was

599 calculated using one-way ANOVA with a Bonferroni post-test in control versus FSH-stimulated cells,  
600 with \* for  $P < 0.05$ .

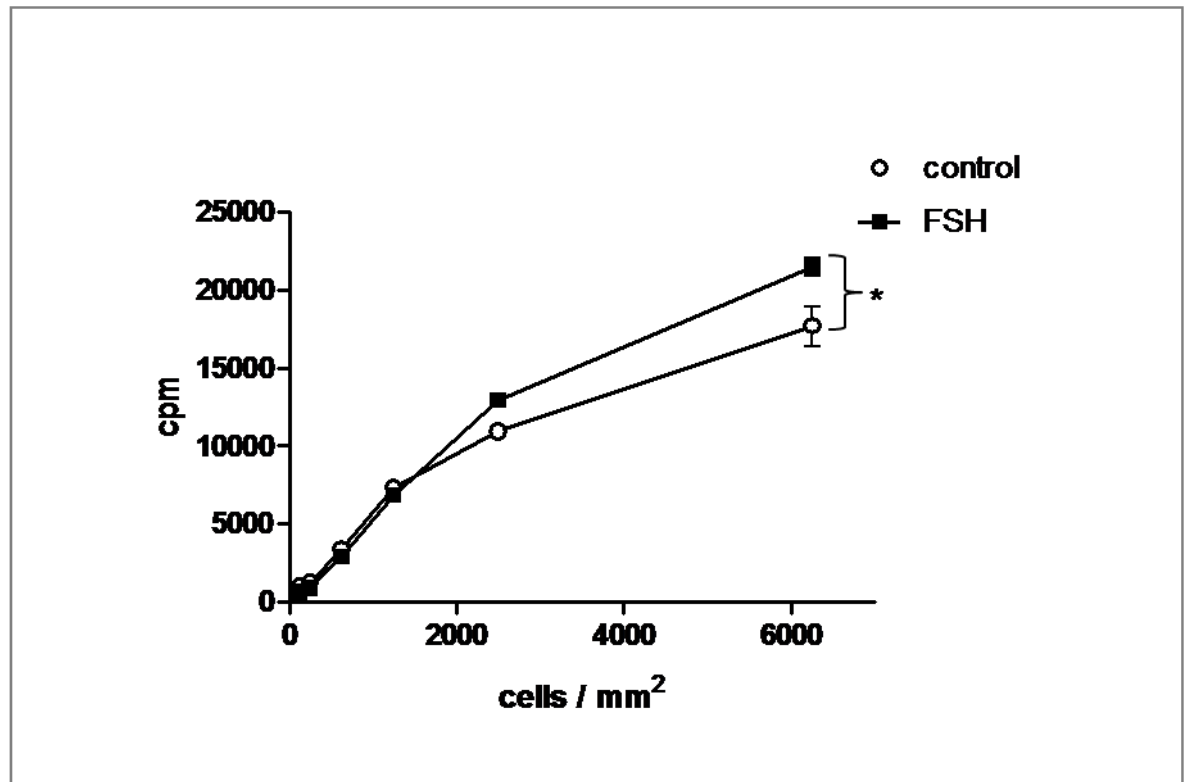
601

602 Figure 6. Selective recruitment of mRNA to the polysomes in FSH-stimulated Sertoli cells. The  
603 presence of the tPA (A), c-fos (B), VEGF (C) and PTEN (D) mRNA was assayed by qRT-PCR in  
604 the polysomal fractions. Results are expressed as the means relative expression level relative to  
605 GAPDH expression +/- SEM in 3 to 5 independent experiments. Each qRT-PCR reaction was done  
606 twice. Statistical difference was calculated using one-way ANOVA with a Bonferroni post-test in  
607 control versus FSH-stimulated cells, with \*\* for  $P < 0.01$  and \*\*\* for  $P < 0.005$ .

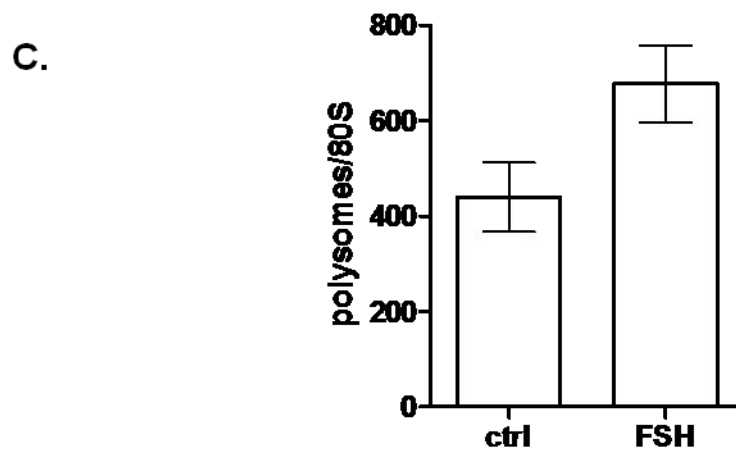
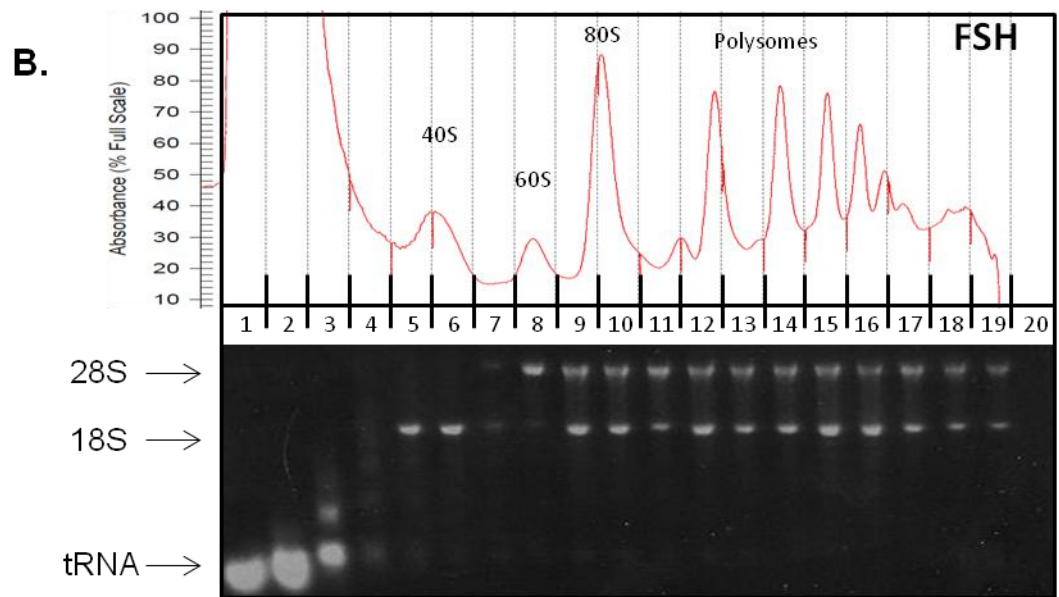
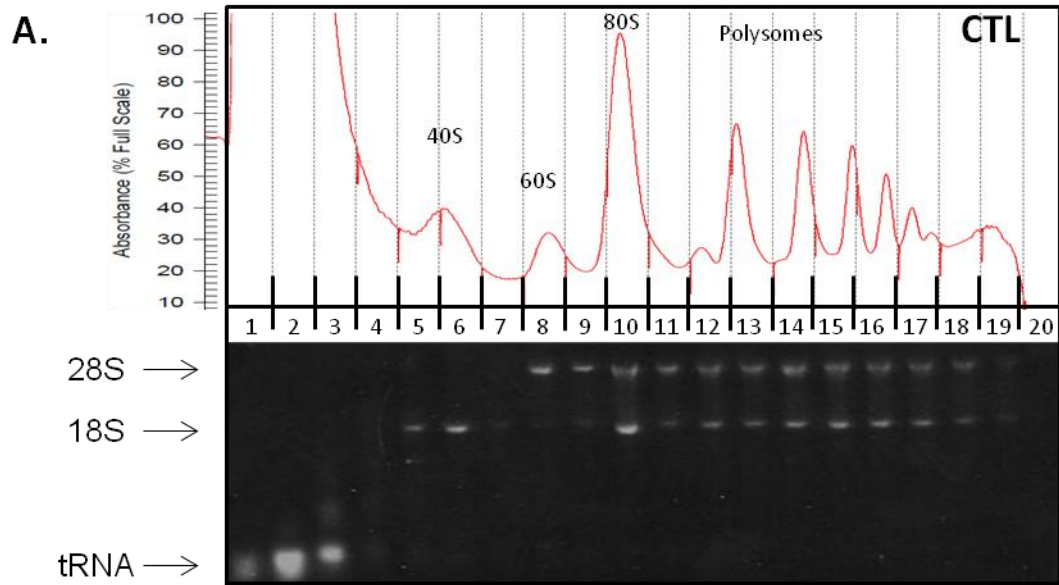
608

609 Figure 7. Hypothetical scheme of the regulation of the mRNA translational machinery by FSH-  
610 induced signalling. The Cell Designer software (<http://celldesigner.org>) (45) has been used to  
611 formalize the topology of the signalling network. The legend is as follows: stimulatory catalyses are  
612 indicated by a line ended in a circle, while inhibitory catalyses are figures by a blind line. Dashed  
613 lines mean indirect reactions. The active molecular species are surrounded by black dots. P means  
614 phosphorylation, with the position of the phosphorylated residue being indicated when known.  
615 Complexes are surrounded by a box. Double arrows indicate reversible reactions. FSH triggers cap-  
616 dependent translation by enhancing p70S6K, mTOR and eIF4G recruitment to the cap. p70S6K  
617 activation by FSH has been reported elsewhere (15). The proteins analyzed in this study are in colour.  
618

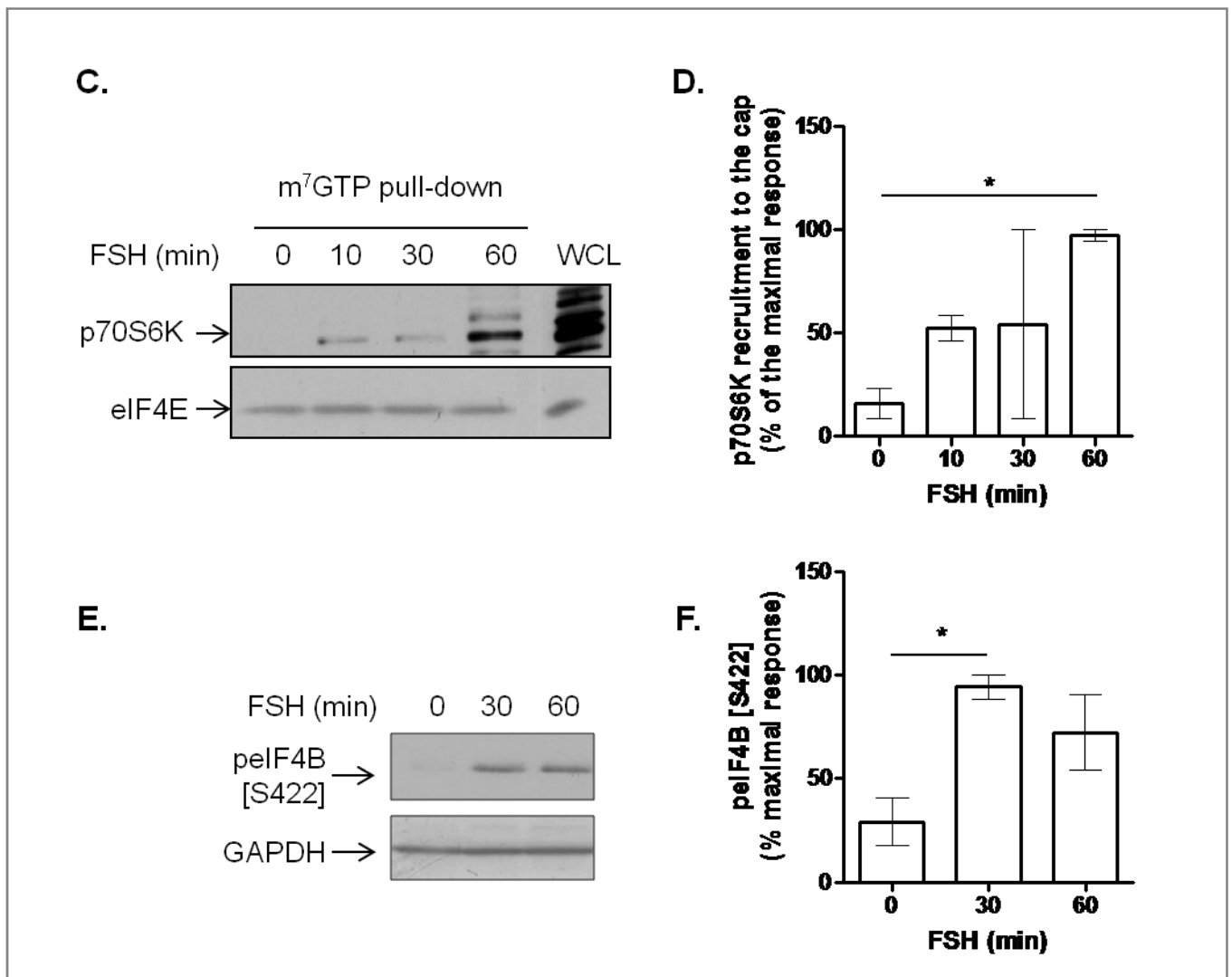
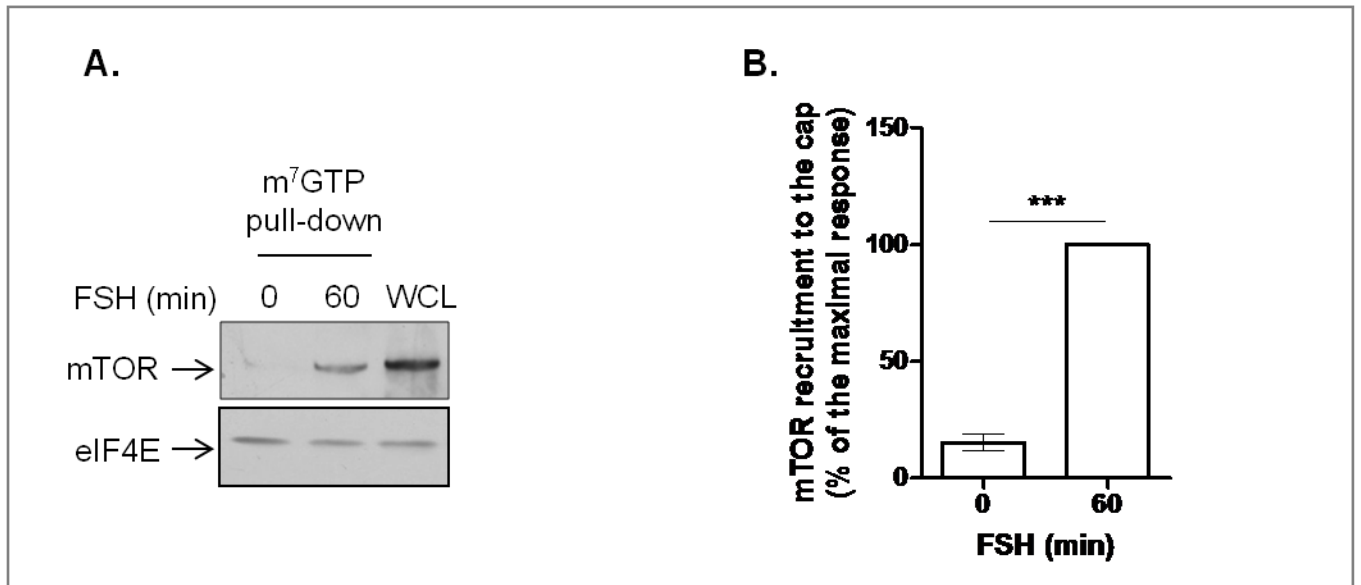
Figure 1



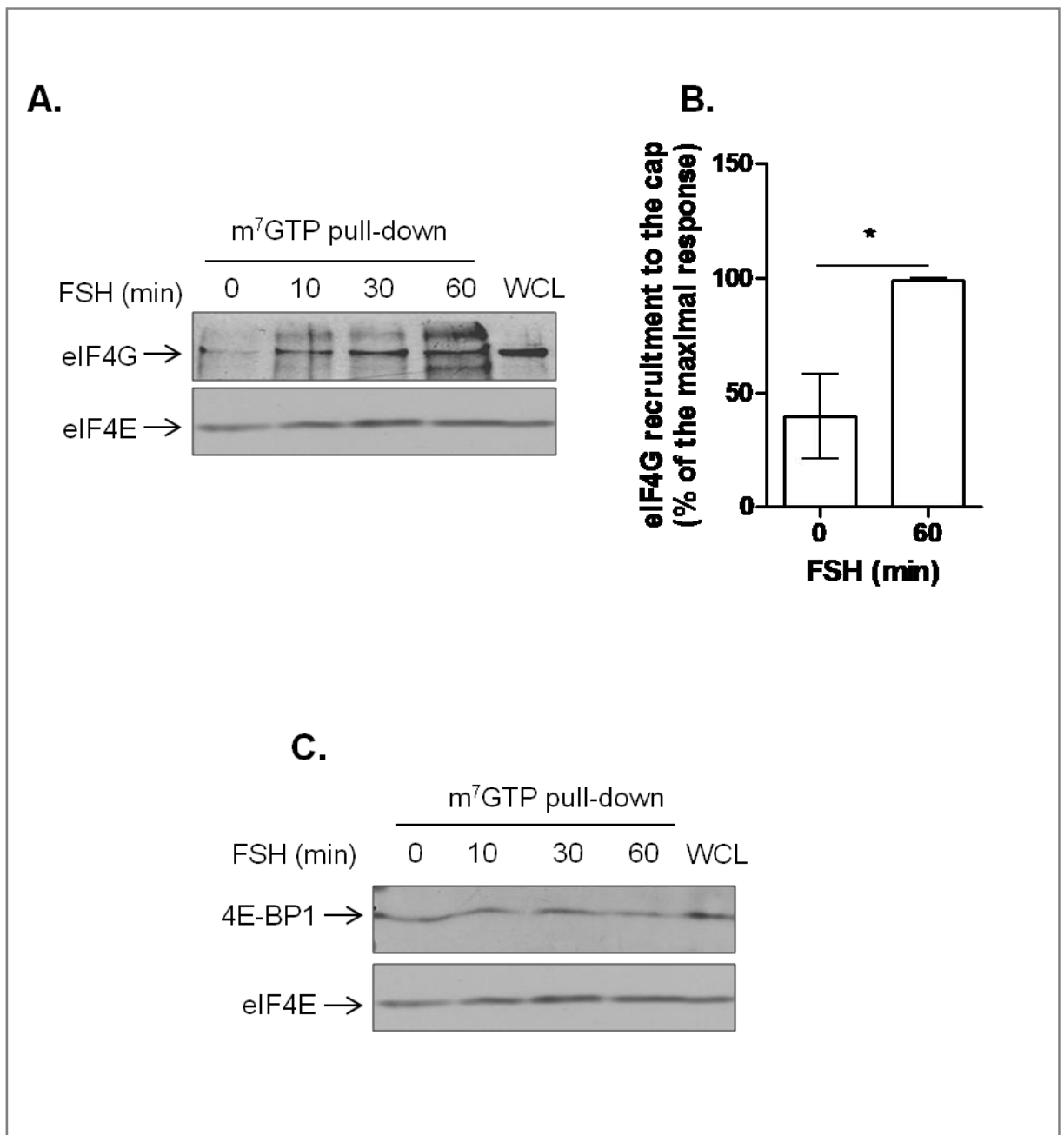
# Figure 2



# Figure 3



# Figure 4



# Figure 5

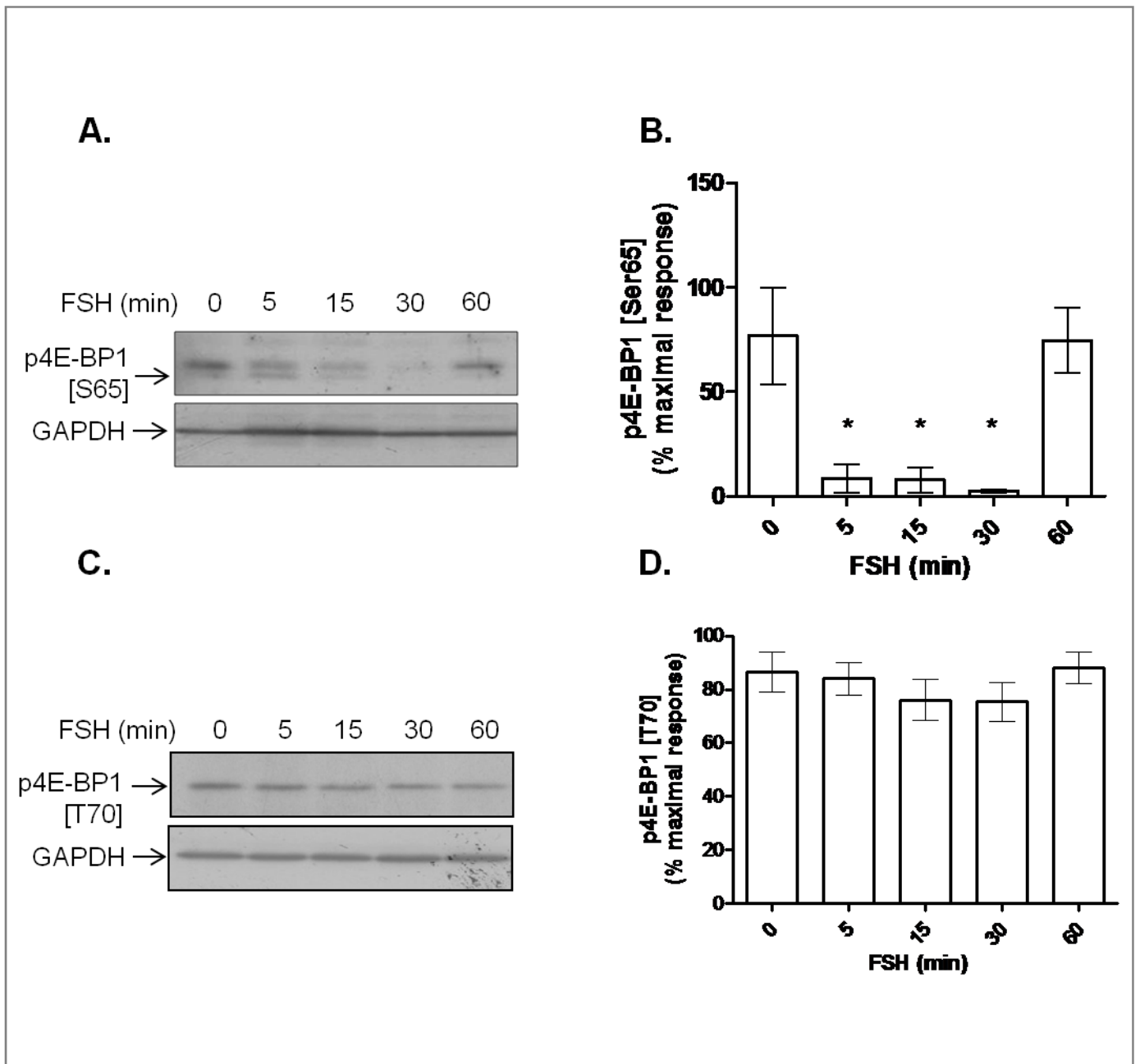




Figure 6

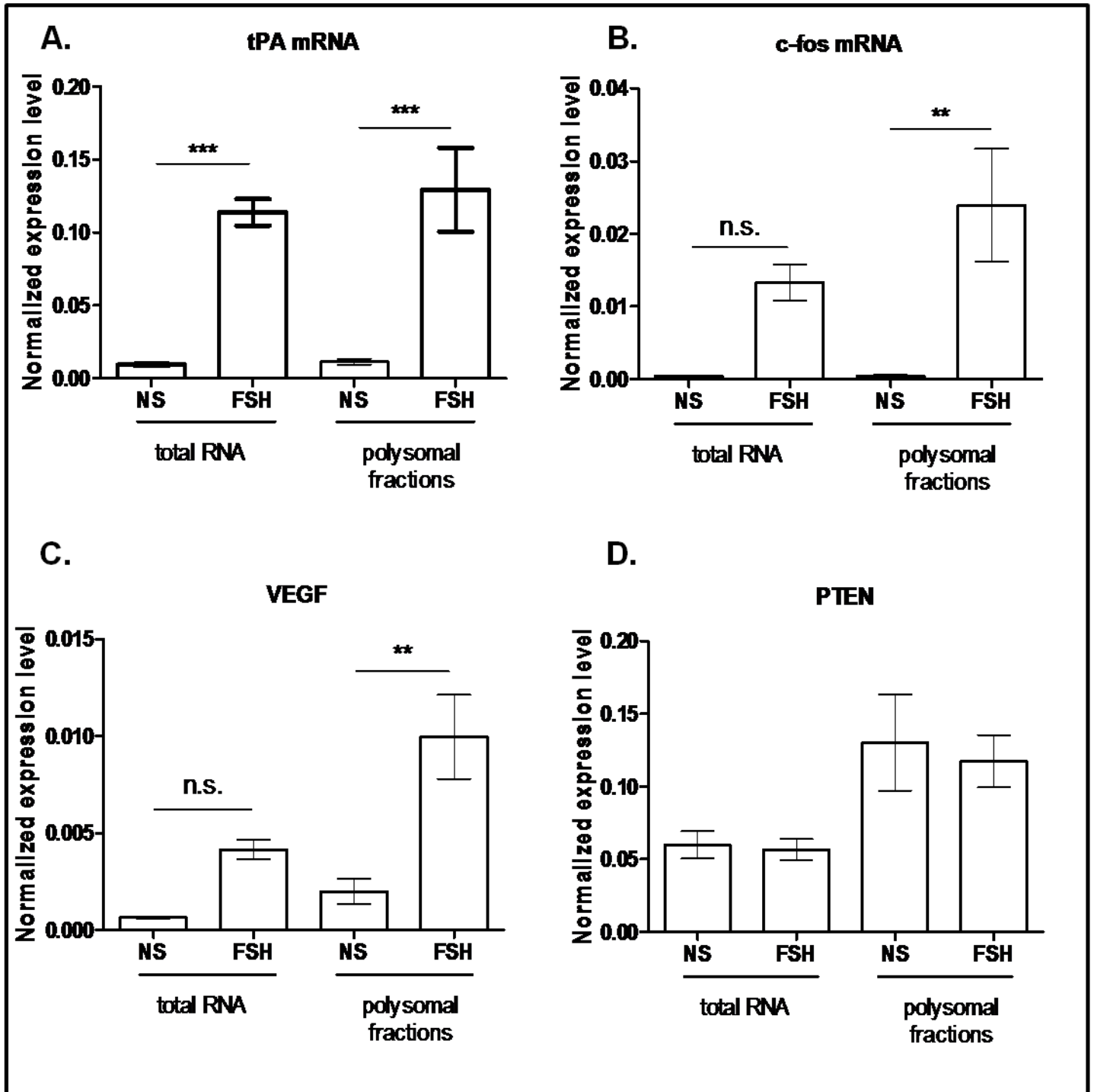
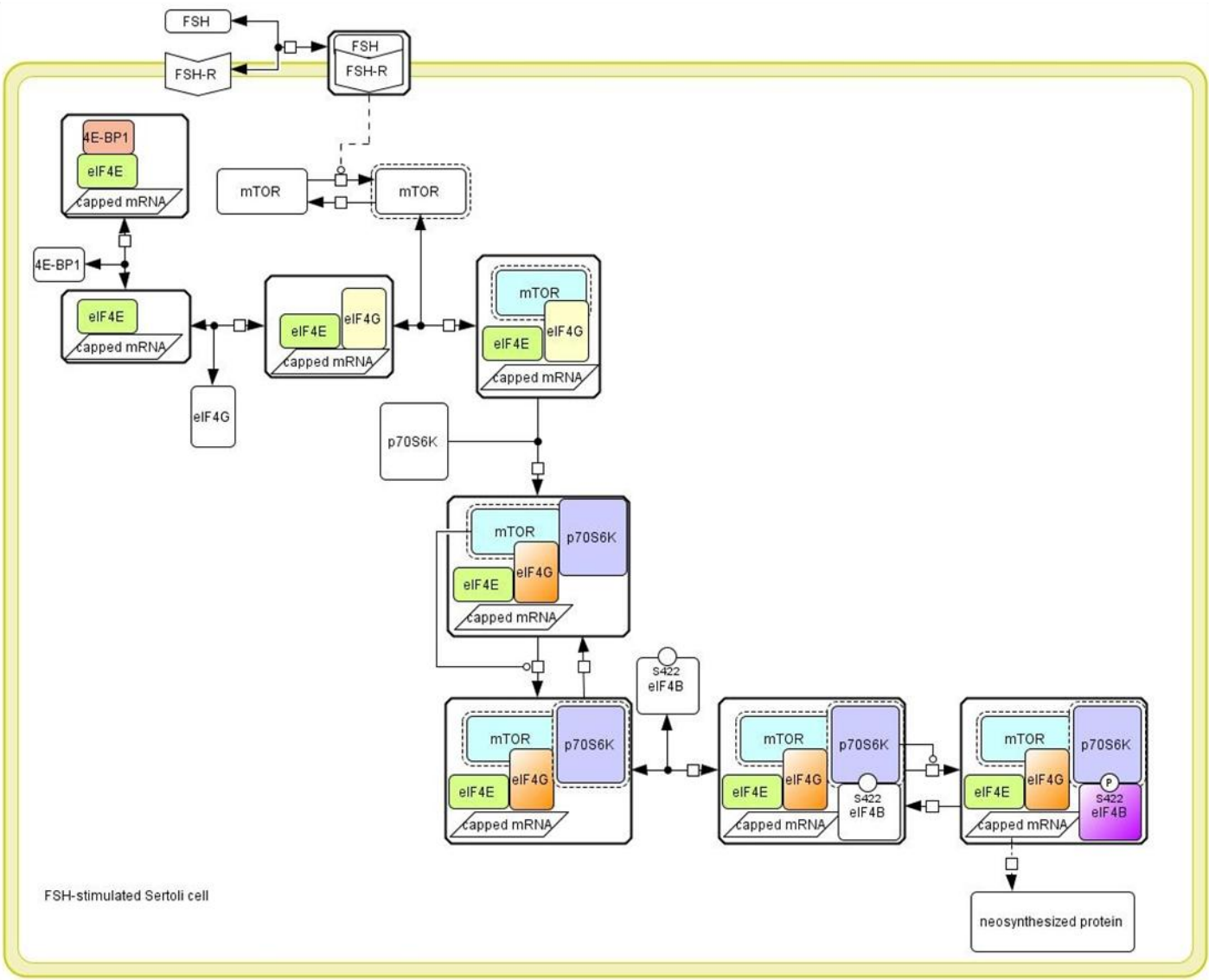
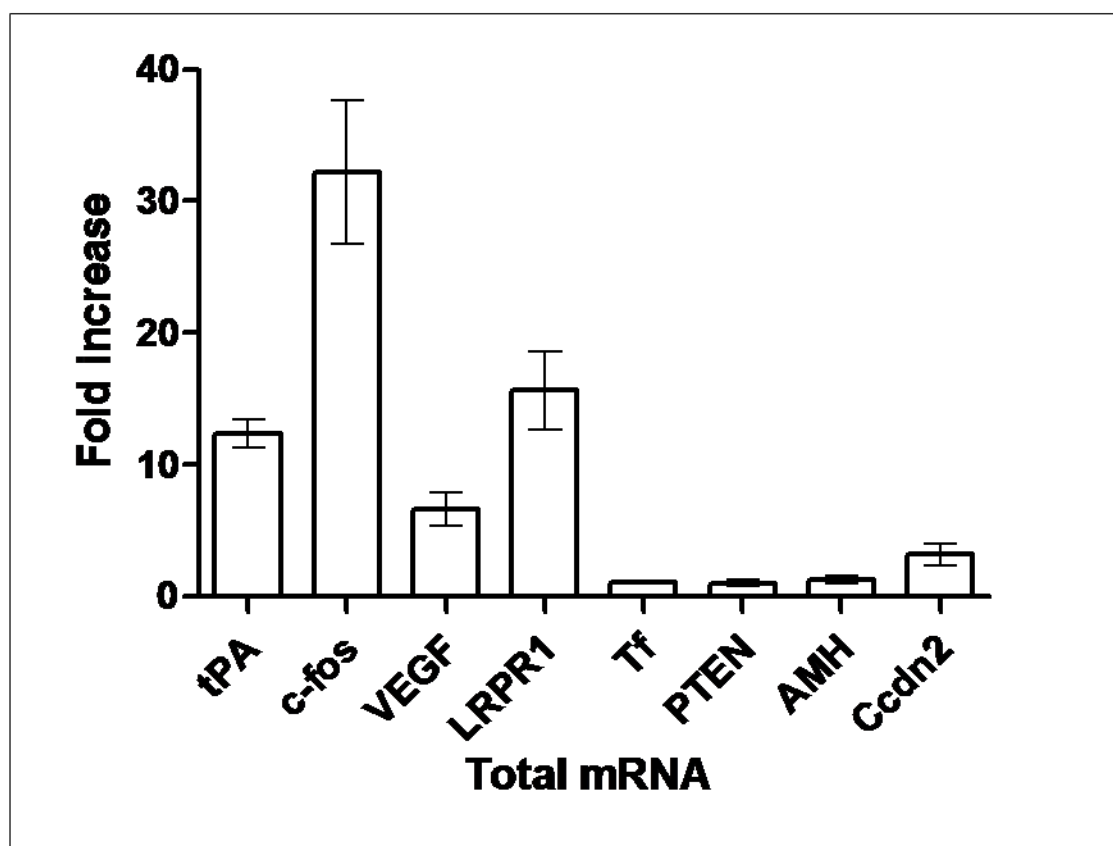


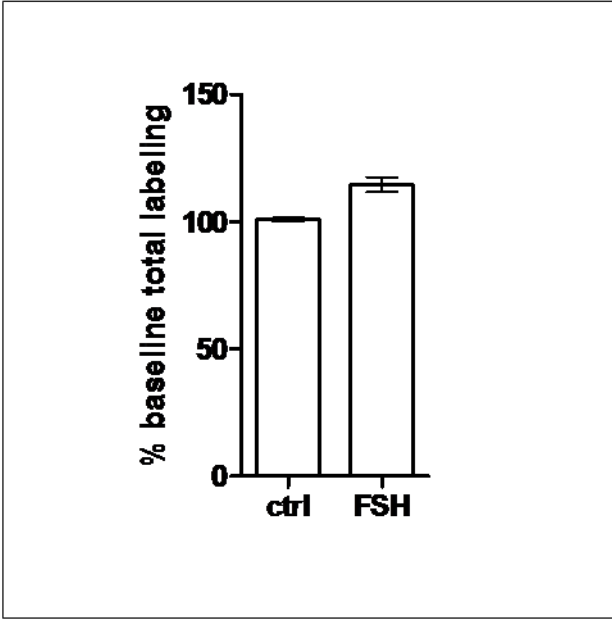
Figure 7



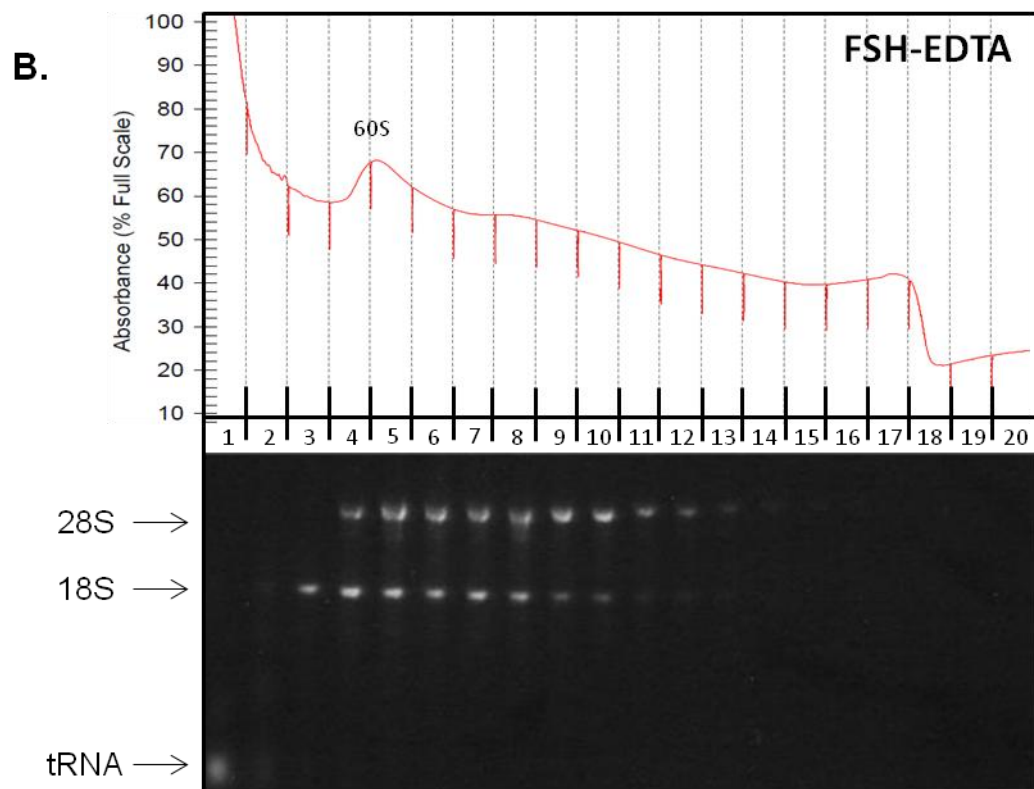
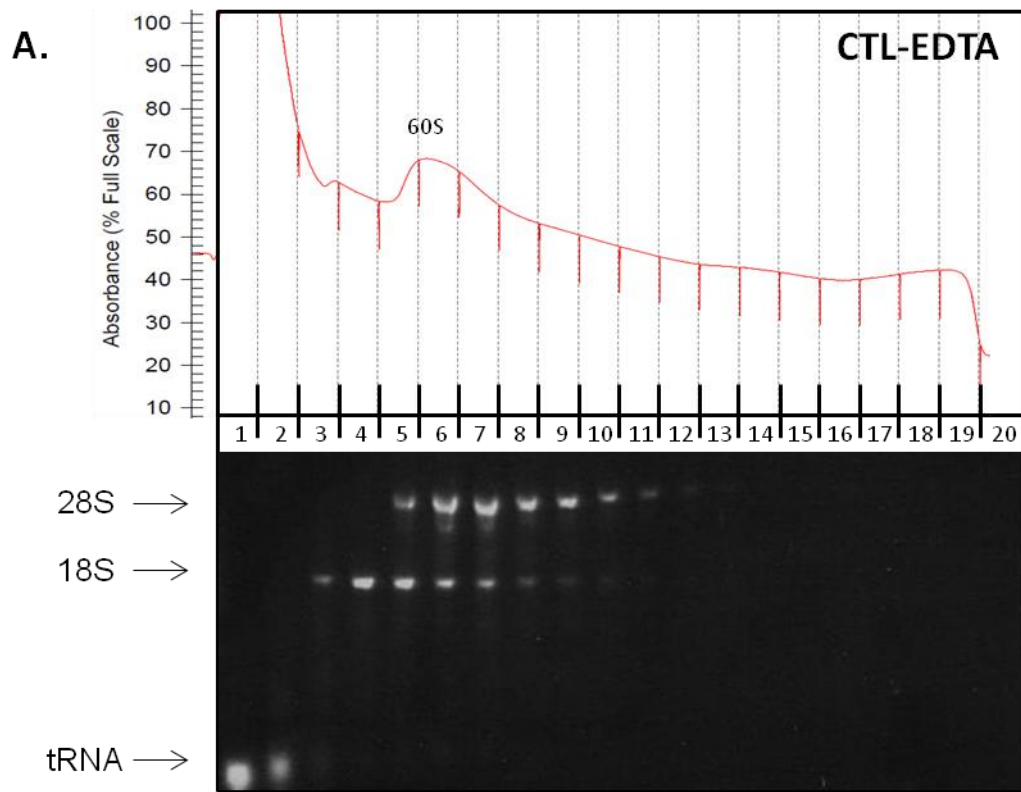
# Supplemental figure 1



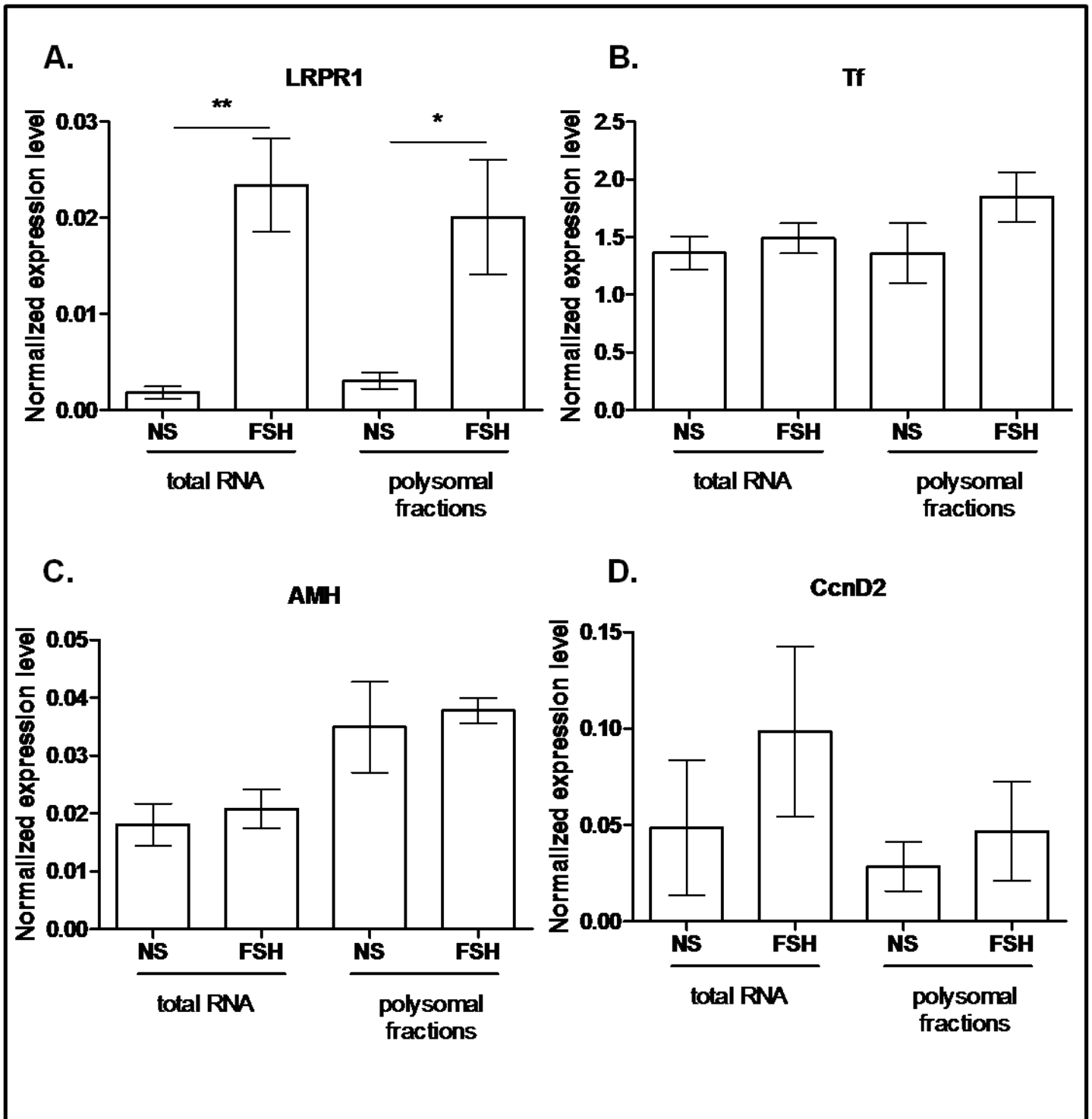
# Supplemental figure 2



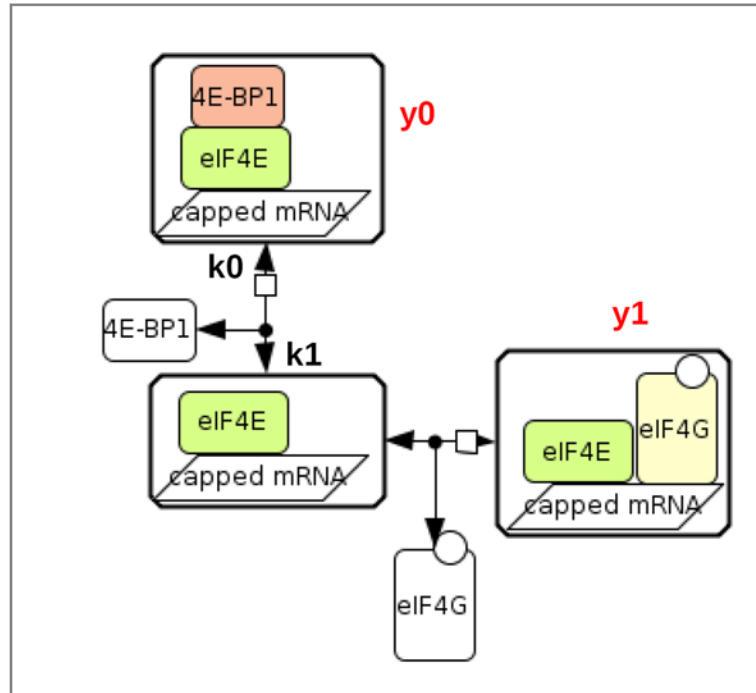
# Supplemental figure 3



# Supplemental figure 4



## Supplemental figure 5



The total amounts of eIF4E and 4E-BP1 are considered as constant over the time of the experiments (60 min max), and can be expressed as  $E_T$  and  $B_T$ , respectively.

$y_0$  = amount of eIF4E bound to 4E-BP1

$y_1$  = amount of eIF4E bound to eIF4G

$$eIF4E = E_T - y_0 - y_1$$

$$4E - BP1 = B_T - y_0$$

Then, complexation of  $y_0$  can be expressed using a mass action law :

$$dy_0 = k_0.(E_T - y_0 - y_1).(B_T - y_0) - k_1.y_0$$

Since the amount of 4E-BP1 complexed to eIF4E is constant, the kinetics of  $y_0$  formation is null :

$$\begin{aligned} dy_0 &= 0 \\ \Leftrightarrow k_0.(E_T - y_0 - y_1).(B_T - y_0) - k_1.y_0 &= 0 \\ \Leftrightarrow k_0.(E_T - y_0 - y_1).(B_T - y_0) &= k_1.y_0 \\ \Leftrightarrow y_1 &= (E_T - y_0) - \frac{k_1.y_0}{k_0.(B_T - y_0)} = \text{constant } t \end{aligned}$$

If  $y_0$  and  $y_1$  shared the same eIF4E isoforms, then constant amounts of 4E-BP1 bound to eIF4E would dictate the stability of the eIF4E/eIF4G complexes, which is not what is observed in this work ( $dy_1 \neq 0$ ). Therefore, this implies that the eIF4E/eIF4G complexes do not share similar eIF4E isoforms with the eIF4E/4E-BP1 complexes.

### ***Legends of supplemental figures***

**S1.** Genes regulated at the transcriptional level after FSH stimulation for 90 min. The relative expression level of the indicated mRNA was determined by qRT-PCR. The fold-increase is obtained by calculating the  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  values. The results are expressed as the means +/- SEM of 3 to 5 independent experiments.

**S2.** The total radioactivity incorporated in unstimulated *versus* FSH-stimulated Sertoli cells was compared in 3 pooled experiments each performed in triplicates. Results are expressed as mean values +/- SEM of percent of baseline radiolabeled aminoacid incorporation, taken as 100 %.

**S3.** EDTA disassembles FSH-enhanced polysome formation in **(A)** control *versus* **(B)** FSH-stimulated Sertoli cells, as measured with the OD at 254 nm of each collected fraction, in the upper panels. In **(A)** and **(B)**, the lower panels show the corresponding agarose gel, to monitor ARN integrity and for quantification. Here is shown one representative experiment out of two.

**S4.** qRT-PCR analysis of mRNA recruited or not to the polysomes, upon FSH stimulation. Results are expressed as in Figure 6.

**S5.** Formal demonstration of the distribution of different eIF4E populations among the eIF4E/ 4E-BP1 and eIF4E-eIF4G complexes



---

## ABSTRACT

Translation is a critical step in gene expression regulation. In sea urchin embryos, fertilization induces an increase in protein synthesis, which depends mainly on the translation of maternal messenger RNAs. This protein synthesis is essential for the first cell cycles. Embryonic development of the sea urchin is an excellent model for studying translational control. In this thesis, translational regulation in sea urchin embryos was studied in two situations: the physiological context of fertilization and the context of apoptosis induction.

We first examined the regulatory mechanisms involved in protein synthesis after fertilization. Initiation is one of the limiting steps of translation. In this context, the initiation factor eIF2 plays a key role. eIF2 is responsible for bringing the initiator methionine to the ribosome. When the alpha subunit of eIF2 is phosphorylated, global protein synthesis is inhibited and the selective translation of certain mRNAs is stimulated. In the sea urchin unfertilized eggs, eIF2alpha is physiologically phosphorylated and fertilization induces its dephosphorylation. By microinjecting a variant mimicking the phosphorylated state of eIF2alpha into the unfertilized eggs, we showed that dephosphorylation of eIF2alpha is required for the first mitotic division in the sea urchin.

We were interested in the relationship between the phosphorylation of eIF2alpha and induction of apoptosis in the sea urchin. Indeed, the translation of mRNAs encoding proteins pro- or anti-apoptotic directly influences cell survival. The sea urchin has the molecular tool kit for apoptotic induction. Exposing embryos to MMS, a DNA-damaging agent, causes phosphorylation of eIF2alpha and apoptosis activation. In this situation, we found that the GCN2 kinase is involved in the phosphorylation of eIF2alpha.

In order to study how the translational machinery modulates the polysomal recruitment, we analyzed the translome in response to fertilization and after exposure to MMS. We conducted deep sequencing of transcripts that are present in polysomes. Analysis of these transcripts, following annotation, will allow a better understanding of the genes regulatory network at the translational level during fertilization and the induction of apoptosis in sea urchin embryos.

Keywords: translational control, eIF2, embryo, sea urchin, translome, polysome profiling, selective translation

---

---

## RESUME

La traduction est une étape critique de la régulation de l'expression des gènes. Chez l'oursin, la fécondation induit une augmentation de la synthèse protéique, qui dépend essentiellement de la traduction d'ARN messagers maternels. Cette synthèse protéique est indispensable au déroulement des cycles cellulaires du développement précoce. Le développement embryonnaire de l'oursin constitue ainsi un modèle de choix pour étudier la régulation de la traduction. Dans le cadre de cette thèse, le contrôle de la traduction a été étudié chez l'oursin dans deux situations : le contexte physiologique de la fécondation et le contexte de l'induction de l'apoptose.

Nous nous sommes interrogés d'abord sur les mécanismes régulateurs impliqués dans la synthèse protéique après fécondation. L'une des étapes limitantes de la traduction est l'initiation. Dans ce cadre, le facteur d'initiation eIF2 joue un rôle clé. eIF2 est responsable de l'apport de la méthionine initiatrice au niveau du ribosome. Lorsque la sous-unité alpha d'eIF2 est phosphorylée, la synthèse protéique globale est inhibée et la traduction sélective de certains ARNm est stimulée. Dans les ovules non fécondés d'oursin, eIF2alpha est physiologiquement phosphorylé et la fécondation provoque sa déphosphorylation. En microinjectant dans les ovules non fécondés un variant d'eIF2alpha mimant l'état phosphorylé, nous avons montré que la déphosphorylation d'eIF2alpha est nécessaire pour la première division mitotique chez l'oursin.

Nous nous sommes intéressés au lien entre la phosphorylation d'eIF2alpha et l'induction de l'apoptose chez l'oursin. En effet, la traduction d'ARNm codant pour des protéines pro- ou anti-apoptotiques influence directement la survie des cellules. L'embryon d'oursin possède la machinerie nécessaire pour le déclenchement de l'apoptose, après induction par l'agent génotoxique MMS. Le traitement au MMS des embryons provoque la phosphorylation d'eIF2alpha. Dans cette situation, nous avons trouvé que la kinase GCN2 est impliquée dans la phosphorylation d'eIF2alpha.

En fin, dans le but d'étudier comment la machinerie traductionnelle module le recrutement polysomal, nous avons analysé le traductome en réponse à la fécondation et après le traitement au MMS. Nous avons effectué une approche de séquençage à haut-débit des transcrits purifiés par gradients de polysomes. L'analyse de ces transcrits nous permettra d'appréhender le réseau des gènes régulés au niveau traductionnel lors de la fécondation et de l'induction de l'apoptose dans les embryons d'oursin.

Mots-clés : régulation traductionnelle, eIF2, développement embryonnaire, oursin, traductome, *polysome profiling*, traduction sélective

---