

Régulation de l'expression des gènes au niveau de la traduction : intérêt des modèles marins

par Nathalie Oulhen, Julia Morales, Bertrand Cosson, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé & Patrick Cormier

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 Mer et Santé; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7150; Équipe Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff, F-29682 France.

Correspondance : Nathalie Oulhen, Station Biologique, Place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tél. : +33 2 98 29 23 23. Fax : +33 2 98 29 23 24. E-mail : oulhen@sb-roscoff.fr

Reçu le 22 juin 2007

RÉSUMÉ

La régulation de l'expression des gènes est cruciale pour la survie des organismes, chaque étape doit être finement régulée, depuis les gènes jusqu'à la formation des protéines. Les ARNm peuvent être stockés dans une cellule sans être traduits automatiquement. Cela permet à la cellule de réagir rapidement pour produire les protéines nécessaires au bon endroit et au bon moment en régulant l'étape de traduction. La cellule dépense beaucoup d'énergie pour synthétiser des protéines, il est essentiel de contrôler ces processus en fonction des besoins cellulaires. L'étape d'initiation de la traduction représente une étape régulatrice importante dans l'expression des gènes. Elle fait intervenir de nombreux facteurs protéiques capables de se lier aux ARNm et de recruter différents part-

naires pour inhiber ou stimuler la synthèse protéique. Les océans contiennent une diversité d'organismes qui constituent d'excellents modèles pour étudier les bases de l'expression des gènes au niveau de la traduction. Ces organismes ont permis d'étudier des mécanismes de régulation traductionnelle dans différents processus physiologiques : cycle cellulaire (méiose lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer, mitose en réponse à la fécondation chez l'oursin), et de mieux comprendre le fonctionnement du système nerveux (aplysie). Toutes ces données permettront de trouver de nouveaux acteurs indispensables à la régulation de la traduction et de fournir de nouvelles cibles de thérapie dans la lutte contre les maladies chez l'Homme.

SUMMARY Gene expression regulation at the translational level: contribution of marine organisms

Gene expression regulation is crucial for organism survival. Each step has to be regulated, from the gene to the protein. mRNA can be stored in the cell without any direct translation. This process is used by the cell to control protein synthesis rapidly at the right place, at the right time. Protein synthesis costs a lot of energy for the cell, so that a precise control of this process is required. Translation initiation represents an important step to regulate gene expression. Many factors that can bind mRNA and recruit different partners are involved in the inhibition or stimulation of protein synthesis. Oceans contain an

important diversity of organisms that are used as important models to analyse gene expression at the translational level. These are useful to study translational control in different physiological processes for instance cell cycle (meiosis during meiotic maturation of starfish oocytes, mitosis following fertilization of sea urchin eggs) or to understand nervous system mechanisms (aplysia). All these studies will help finding novel actors involved in translational control and will thus be useful to discover new targets for therapeutic treatments against human diseases.

RÉGULATION TRADUCTIONNELLE

L'expression des gènes est finement régulée tout au long de la vie d'un organisme. Chaque gène doit s'exprimer au bon moment et au bon endroit. Toutes les étapes sont rigoureusement contrôlées depuis le gène jusqu'à la

formation de la protéine correspondante. Lors de la transcription, l'ADN donne un ARNm. Cet ARNm va ensuite subir des modifications (épissage, ajout d'une coiffe m⁷GTP et d'une queue polyA, transport,...) avant de donner une protéine lors de la traduction. La synthèse protéique est parmi les dernières étapes de la régulation,

elle permet de moduler rapidement l'expression des gènes en activant ou en inhibant la formation des protéines à partir d'un stock d'ARNm déjà présent dans une cellule. La régulation de la synthèse protéique peut s'exercer à deux niveaux : sur les ARNm (localisation, masquage, polyadénylation) ou sur la machinerie de traduction (Proud, 2007). Dans beaucoup de processus biologiques, le contrôle de la machinerie de traduction s'exerce principalement lors de l'étape d'initiation (Fig. 1). La majorité des ARNm sont traduits de façon dépendante de la coiffe (Von der Haar *et al.*, 2004). La

coiffe est formée d'une guanosine modifiée par ajout d'un méthyle en position 7. L'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation (eIFs : eukaryotic Initiation Factors) permet de recruter la sous unité 40S en 5'UTR (5' UnTranslated Region) des ARNm. Cette étape fait intervenir au moins onze facteurs protéiques (Gingras *et al.*, 1999a) dont eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, une cible clé pour réguler l'initiation de la traduction. eIF4G est une protéine de haut poids moléculaire qui recrute des partenaires tels que eIF4A, eIF3 et PABP (Fig. 2). Le facteur eIF3 recrute la sous-unité

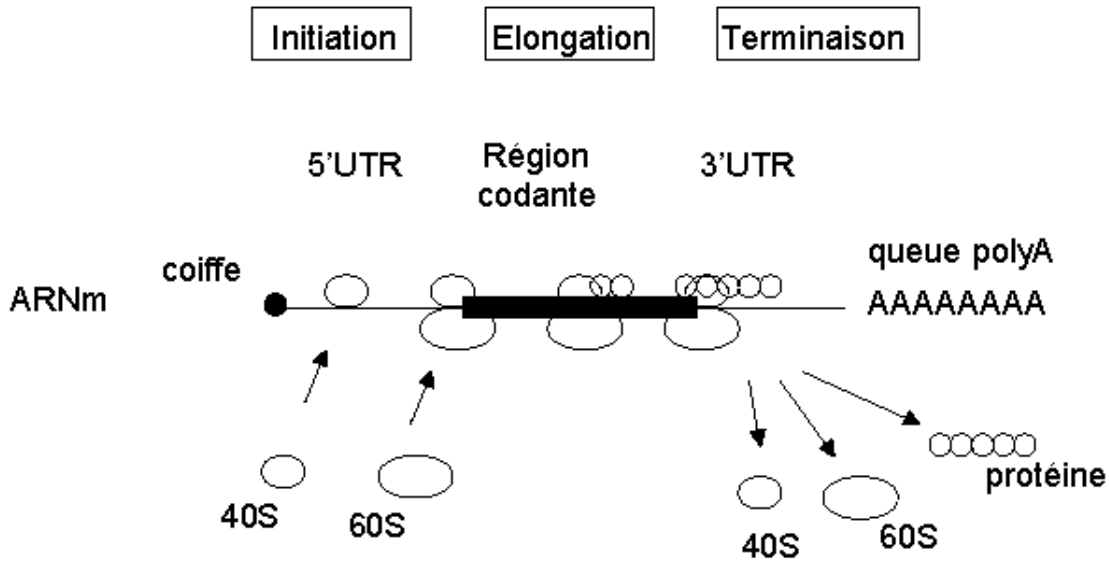


FIG. 1. – Les trois étapes de la traduction.

L'ARNm se compose d'une coiffe m⁷GTP d'une région 5'UTR, d'une séquence codante, et d'une région 3'UTR qui se termine par une queue polyA. La synthèse protéique se décompose en trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. La sous-unité ribosomique 40S est recrutée en 5'UTR lors de l'initiation. En arrivant au début de la séquence codante, la deuxième sous-unité ribosomique 60S est recrutée. La chaîne d'acides aminés est produite durant l'étape d'élongation. Puis, les éléments sont libérés à la fin de la séquence codante lors de la terminaison.

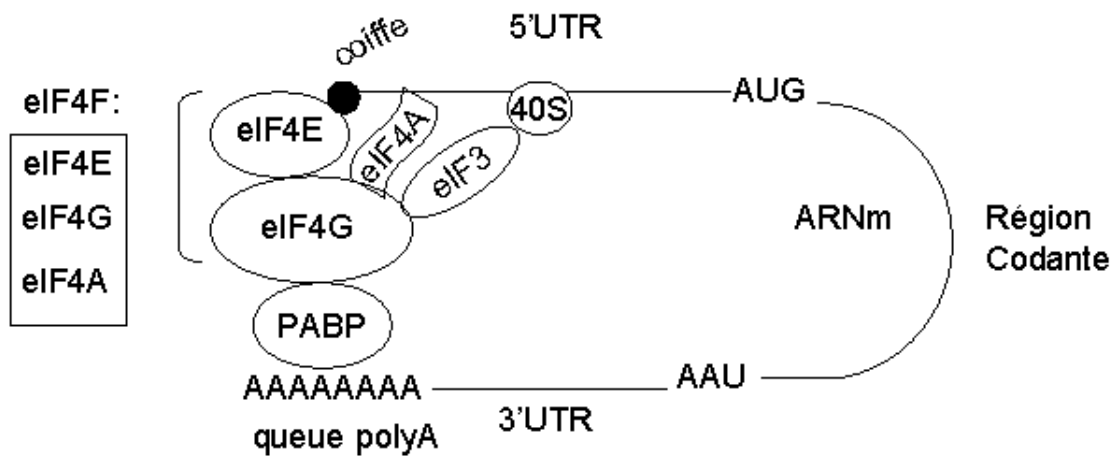


FIG. 2. – Le modèle en boucle.

eIF4E lie la coiffe des ARNm. Il fait partie du complexe eIF4F (eIF4E-eIF4G-eIF4A). eIF4G lie eIF4E et recrute les autres protéines. eIF4A défait les structures secondaires en 5'UTR des ARNm. eIF3 recrute la petite sous-unité ribosomique 40S sur l'ARNm. eIF4G s'associe également à PABP pour stimuler la traduction des ARNm polyadénylés en 3'UTR.

ribosomique 40S à l'extrémité 5' de l'ARNm. La protéine PABP (Poly-Adenylated Binding Protein) se lie à la queue polyA des messagers et relie l'extrémité 3' et 5'UTR (Kahvejian *et al.*, 2005).

La disponibilité de eIF4E pour ses partenaires est le point essentiel dans la régulation de la traduction dépendante de la coiffe. Des petites protéines 4EBP (eIF4E Binding Protein) sont capables d'interagir avec eIF4E et d'inhiber la fixation de eIF4G sur eIF4E par compétition pour un même site (Haghighat *et al.*, 1995). En effet, 4EBP et eIF4G possèdent le site consensus d'interaction sur eIF4E : 4EBP empêche la formation du complexe eIF4F et inhibe la synthèse protéique. L'association eIF4E/4EBP dépend surtout de l'état de phosphorylation de 4EBP. Par exemple, dans les cellules de mammifères stimulées par des facteurs mitotiques, 4EBP est hyperphosphorylé par la kinase FRAP/mTOR (*FKBP12 Rapamycin Associated Protein/mammalian Target of Rapamycin*) et se dissocie de eIF4E (Gingras *et al.*, 1999b). La protéine eIF4E peut aussi être phosphorylée, sous l'effet de la kinase Mnk1 pour réguler la traduction dépendante de la coiffe (Pyronnet *et al.*, 1999).

Certains organismes marins représentent d'excellents modèles d'étude pour mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes. Ils ont permis de déterminer les contrôles de la traduction dans divers processus physiologiques tels que la méiose, la mitose et le fonctionnement du système nerveux. Les travaux réalisés chez l'étoile de mer mettent à jour l'importance des relations entre la polyadénylation et la traduction au cours de la maturation méiotique des ovocytes. L'embryon d'oursin permet de découvrir un nouveau mécanisme de régulation de la synthèse protéique affectant les facteurs 4EBP et eIF4G en réponse à la fécondation. Et enfin, l'aplysie nous apprend les régulations de la synthèse protéique du système nerveux à la base de la plasticité synaptique. Ces différents modèles biologiques mettent aussi en évidence une double régulation de la synthèse protéique : une régulation temporelle au cours des différents stades de développement (maturation méiotique chez l'étoile de mer, fécondation chez l'oursin) et une régulation spatiale (système nerveux de l'aplysie).

LES MODÈLES MARINS

L'étoile de mer : traduction et maturation méiotique

Chez la plupart des animaux, les ovocytes contiennent des stocks d'ARNm qui ne seront traduits qu'après la fécondation et qui seront nécessaires au développement embryonnaire. Il existe aussi des espèces chez qui les ARNm stockés dans les ovocytes sont traduits avant fécondation, lors de la maturation méiotique : succession d'étapes, finement contrôlées, qui aboutit à un gamète mature. Ce processus de maturation a été étudié à partir d'ovocytes de divers organismes tels que les mollusques, le xénope et l'étoile de mer (Colas & Guerrier, 1995). Ces deux derniers modèles sont particulièrement manipulés pour analyser la régulation de l'expression des

gènes lors de la maturation méiotique. Par rapport au xénope, l'étoile de mer constitue un système de régulation simplifié pour comprendre les fondements de la maturation méiotique : un nombre limité d'acteurs interviennent dans l'étoile de mer et il y a moins de redondance. Par exemple, une seule cycline est mise en jeu dans les ovocytes d'étoile de mer alors qu'il y en a quatre dans les ovocytes de xénope (Hochegger *et al.*, 2001).

Les ovocytes immatures d'étoile de mer sont arrêtés en prophase de première division méiotique. C'est l'hormone 1-méthyladénine, sécrétée par les cellules folliculaires environnantes, qui provoque la poursuite de la méiose en activant des voies de signalisation qui vont stimuler la synthèse protéique (Lee *et al.*, 2000) en agissant à la fois sur les ARNm stockés et sur les acteurs de la machinerie de traduction. La 1-méthyladénine provoque la rupture de la vésicule germinative et l'émission du premier globule polaire. La reprise de la méiose n'est pas dépendante des synthèses protéiques, contrairement à la progression vers la deuxième division méiotique. La fin de la méiose est marquée par l'émission du deuxième globule polaire.

La traduction de la cycline B est l'élément essentiel de la progression méiotique, elle résulte d'une modification des ARNm préexistants. Le contrôle de la traduction de la cycline B se fait principalement par la régulation de la polyadénylation des ARNm *via* des interactions entre la région 3'UTR des ARNm et des protéines régulatrices. C'est le cas de la séquence CPE (*Cytoplasmic Polyadenylation Element*) qui est reconnue par la protéine CPEB (*CPE Binding protein*) (Mendez & Richter, 2001). Les travaux sur les ovocytes d'étoile de mer ont mis en évidence un nouveau facteur responsable de la régulation de la traduction de la cycline B lors de la maturation méiotique (Lapasset *et al.*, 2005). La rupture de la vésicule germinative provoque la libération d'une protéine nucléaire, l'inhibiteur 2, qui est un inhibiteur de phosphatase. Cela facilite la phosphorylation de CPEB, son association à d'autres protéines et conduit à la polyadénylation de l'ARNm de la cycline B pour stimuler sa traduction (Fig. 3). La synthèse de la cycline B dépend donc des interactions entre la séquence CPE de l'ARNm et la protéine CPEB. Cette régulation se fait en 3'UTR de l'ARNm mais cela est-il le seul niveau de régulation ? La région 5'UTR, intervenant dans la traduction dépendante de la coiffe, est-elle également impliquée dans le contrôle traductionnel de la cycline B comme cela a été démontré en réponse à la fécondation chez l'oursin (Salaun *et al.*, 2004) ? Et y a-t-il d'autres protéines dont les synthèses sont indispensables à la progression méiotique ?

L'oursin : traduction et fécondation

L'embryon d'oursin est un modèle remarquable pour l'étude du développement embryonnaire. Les oursins sont des organismes gonochoriques (sexes séparés) qui produisent une grande quantité de gamètes matures toute l'année. Les œufs sont gros (100 µm de diamètre) et translucides, ce qui facilite les manipulations de microinjection et de microscopie. Ces embryons, utilisés comme

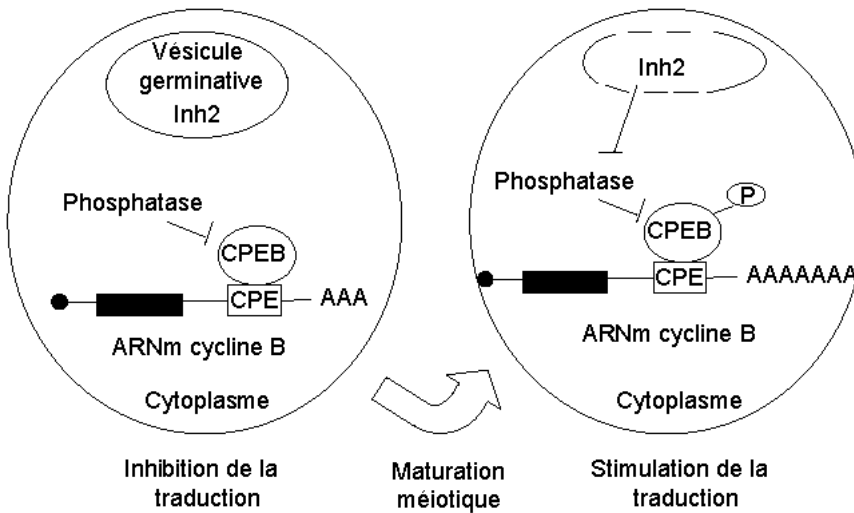


FIG. 3. – La traduction de la cycline B lors de la maturation méiotique de l'étoile de mer.

Dans les ovocytes arrêtés en prophase de méiose I, la phosphorylation de CPEB est inhibée par une phosphatase cytoplasmique, la synthèse de cycline B est inhibée. La 1-méthyladénine provoque la progression méiotique et la rupture de la vésicule germinative. Cela libère l'inhibiteur 2 (Inh2) dans le cytoplasme, un inhibiteur de phosphatase. CPEB peut alors être phosphorylée pour entraîner la polyadénylation de l'ARNm de la cycline B et activer sa traduction (le cercle noir représente la coiffe en 5'UTR du messenger, le rectangle noir correspond à la séquence codante).

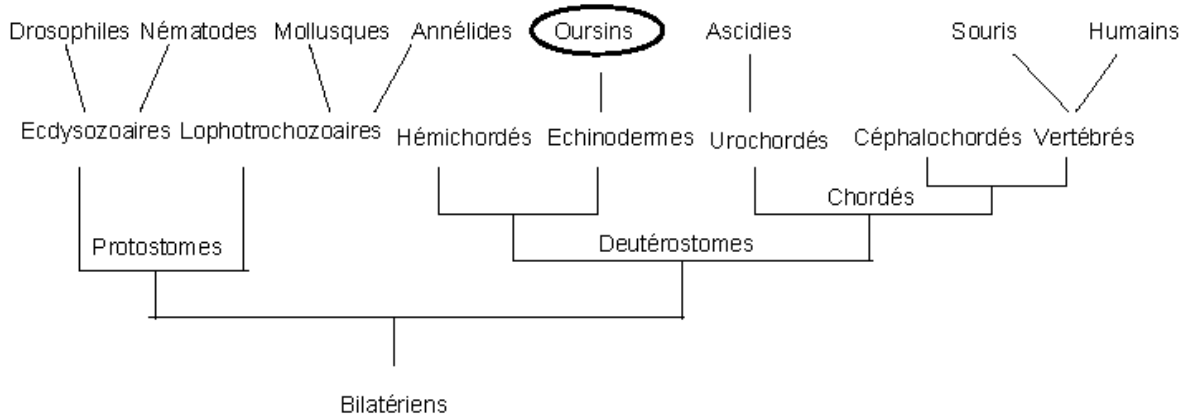


FIG. 4. – Le génome de l'oursin est très proche de celui des humains.

L'oursin est le premier Echinoderme séquencé, il appartient aux Deutérostomes tout comme les Vertébrés (d'après Sodergren *et al.*, 2006).

modèle depuis plus d'un siècle, ont permis de définir des principes de bases de la biologie du développement. C'est grâce à l'oursin qu'O. Hertwig a observé pour la première fois en 1875 la fécondation avec l'entrée d'un seul spermatozoïde dans l'ovule. Puis, T. Boveri a montré, à partir de cellules d'oursin, que le développement normal n'est possible que si chaque cellule embryonnaire possède tous les chromosomes. Il a émis l'hypothèse qu'une tumeur cancéreuse commence par une seule cellule dont la répartition des chromosomes ne s'est pas correctement déroulée. Et récemment, Tim Hunt a obtenu le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2001 (avec Paul Nurse et Lee Hartwell) pour la découverte, grâce à l'oursin, de la cycline B, une protéine cruciale dans la régulation du cycle cellulaire.

L'oursin est un invertébré marin appartenant à l'embranchement des Echinodermes. Il occupe une place intéressante dans l'évolution puisque l'embranchement des Echinodermes représente une radiation proche de celle des Vertébrés. Les Echinodermes sont plus appa-

rentés aux êtres humains et aux autres Vertébrés que la drosophile et le nématode, deux organismes dont les génomes ont été séquencés (Fig. 4). Le génome de l'oursin violet, *Strongylocentrotus purpuratus*, vient d'être entièrement séquencé. L'analyse de ce génome a mobilisé 240 chercheurs de 11 pays différents et les résultats ont été présentés dans un numéro spécial de la revue *Science* (Sodergren *et al.*, 2006). Le génome d'oursin qui représente le premier génome d'Echinoderme séquencé révèle une forte similarité avec le génome humain : l'oursin possède 70 % de gènes en commun avec l'homme et de nombreuses voies de signalisation se retrouvent chez les deux organismes.

Ce séquençage va permettre d'obtenir de nouvelles données sur la structure et la fonction de notre propre génome et d'étudier la régulation de l'expression des gènes pour comprendre les mécanismes de fécondation ainsi que les différentes étapes du développement embryonnaire. Deux axes de recherche permettent d'analyser l'expression des gènes chez l'embryon d'oursin : l'ana-

lyse des régulations transcriptionnelles lors du développement embryonnaire tardif et l'analyse des régulations traductionnelles lors du développement embryonnaire précoce.

L'oursin a permis de fournir le premier réseau de régulation des gènes relié au développement animal. Le laboratoire de Eric Davidson en Californie a initié un projet permettant de déterminer expérimentalement les régulations transcriptionnelles responsables de la spécification de territoires embryonnaires tel que l'endomésoderme (Ben-Tabou de-Leon & Davidson, 2007). Chaque gène possède des séquences régulatrices qui définissent où et quand il sera exprimé. Les réseaux de régulation consistent à analyser, de façon spatiale et temporelle, les facteurs de transcription et leur fixation sur des séquences spécifiques d'ADN pour comprendre l'activation ou la répression d'un gène et son rôle au cours du développement.

L'oursin est aussi un modèle unique pour étudier la régulation de l'expression des gènes au niveau traductionnel lors des premières divisions mitotiques embryonnaires et de relier ces régulations au cycle cellulaire. Les femelles pondent jusqu'à 10^8 ovules qui sont physiologiquement arrêtés au stade G1 du cycle cellulaire. La fécondation provoque l'entrée dans le cycle cellulaire. Les premières divisions sont rapides et synchrones chez l'oursin. La fécondation provoque une augmentation de synthèse protéique qui est indispensable à l'entrée dans le cycle cellulaire. Ces processus sont indépendants de la transcription durant les premières divisions. La synthèse protéique est finement régulée, le contrôle s'exerce prin-

cipalement lors de l'étape d'initiation. Le rôle de ces facteurs d'initiation chez l'oursin a beaucoup été étudié dans les mécanismes de fécondation et de régulation de la traduction dépendante de la coiffe.

L'annotation du génome de l'oursin montre qu'il existe un orthologue pour chaque facteur d'initiation identifié chez les mammifères (Morales *et al.*, 2006). De plus, l'oursin est avantageux puisque beaucoup de gènes codant pour les facteurs de traduction ne sont pas redondants, cela facilite les analyses fonctionnelles. Par exemple, chez l'oursin, il n'existe qu'un gène codant pour 4EBP ou eIF4G alors que l'Homme en possède 3 et 2 respectivement.

Dans les ovules, eIF4E est lié à 4EBP (Cormier *et al.*, 2001). La fécondation induit la dissociation de 4EBP, cette dernière est phosphorylée et dégradée. La rapamycine est un inhibiteur de la kinase FRAP/mTOR, elle est utilisée en thérapie en tant qu'agent immunosuppresseur et antiprolifératif. La rapamycine inhibe la dégradation de 4EBP et la dissociation du complexe eIF4E/4EBP, suggérant une conservation des voies de signalisation dans la régulation de la traduction dépendante de la coiffe au cours de l'évolution. L'inhibiteur limite l'augmentation de synthèse protéique post fécondation, il affecte la synthèse de la cycline B nécessaire à la poursuite du cycle cellulaire et inhibe la première division des embryons d'oursin (Salaun *et al.*, 2004). Ces données permettent de relier la traduction dépendante de la coiffe à la première division mitotique après fécondation (Fig. 5). De plus, la dégradation de 4EBP, démontrée

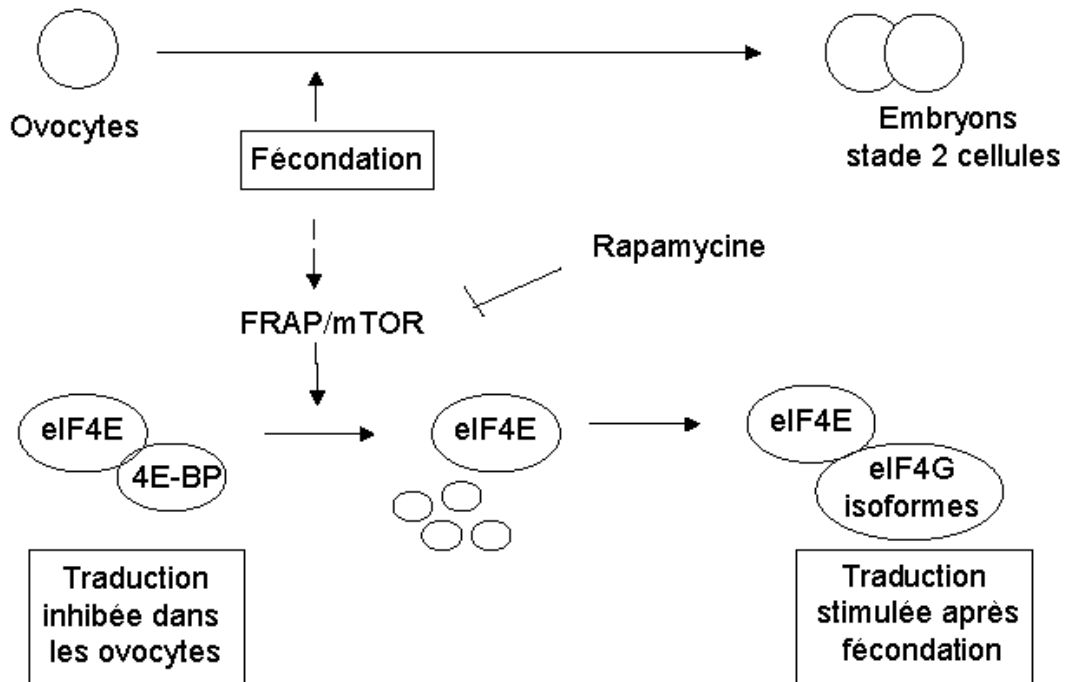


FIG. 5. – Régulation de l'initiation de la traduction en réponse à la fécondation chez l'oursin.

Avant fécondation, la protéine eIF4E est liée au répresseur 4E-BP. Après fécondation, 4E-BP est dissociée de eIF4E et dégradée par un mécanisme dépendant de la kinase FRAP/mTOR sensible à la rapamycine. Par la suite, eIF4G vient se fixer sur eIF4E pour permettre le bon déroulement du cycle cellulaire et de la division mitotique.

pour la première fois chez l'oursin, représente un nouveau moyen de réguler la traduction dépendante de la coiffe. L'oursin est le seul modèle qui permet d'analyser des modifications d'expression de la protéine 4EBP de façon physiologique : 4EBP diminue peu de temps après la fécondation pour permettre la synthèse protéique et le cycle cellulaire mais plus tard au cours du développement, 4EBP réapparaît et se réassocie avec eIF4E (Salaun *et al.*, 2005). De plus, les stress tels que l'hypoxie ou la bléomycine (agent radiomimétique) induisent une surexpression de 4EBP qui pourrait inhiber la traduction dépendante de la coiffe pour favoriser la traduction dépendante des IRES et permettre de synthétiser des ARNm spécifiques (Le Bouffant *et al.*, 2006). L'analyse de ces modifications d'expression chez l'oursin nous permettra de comprendre la régulation et le rôle de 4EBP :

- dans la prolifération cellulaire : l'expression ectopique de 4EBP reverse les phénotypes malins induits par eIF4E, Src ou Ras (Rousseau *et al.*, 1996);
- dans la balance apoptose/survie cellulaire : 4EBP est surexprimée dans des lignées cancéreuses mammaires stimulées par la cytokine proapoptotique TRAIL (Clemens, 2004), l'expression ectopique de 4EBP dans des fibroblastes transformés par le facteur antiapoptotique Ras induit l'apoptose (Polunovsky *et al.*, 2000).

Chez l'oursin, la dissociation de eIF4E/4EBP après fécondation permet à eIF4E de recruter d'autres partenaires nécessaires à l'activation de la synthèse protéique. eIF4G est une grosse protéine qui vient se fixer sur eIF4E dans les 10 minutes qui suivent la fécondation (Oulhen *et al.*, 2007). L'oursin a permis de mettre en évidence l'apparition de nombreuses isoformes de eIF4G en moins de 2 minutes après fécondation et la capacité de toutes ces isoformes à lier eIF4E. De plus la rapamycine, qui agit sur la phosphorylation de 4EBP, inhibe la dissociation de eIF4E/4EBP et empêche l'association de eIF4G sur eIF4E mais n'affecte pas l'apparition des isoformes de eIF4G bien que trois sites de phosphorylation sensibles à la rapamycine aient été déterminés sur eIF4G1 de mammifères (Raught *et al.*, 2000). Peu de régulations sont connues sur eIF4G. Le gène eIF4G1, trouvé chez les mammifères, contient trois promoteurs et génère des sites d'épissage alternatif sur chaque ARNm pour former 5 isoformes ayant des activités traductionnelles différentes (Coldwell & Morley, 2006). Chez l'oursin, l'addition d'émétine, un inhibiteur de la traduction, n'inhibe pas l'apparition de ces isoformes eIF4G; ce qui indique qu'elles résultent d'une modification des protéines déjà présentes avant fécondation et non d'une nouvelle synthèse. Ces isoformes pourraient être responsables d'une nouvelle voie de régulation du facteur eIF4G, voie spécifique du développement embryonnaire.

L'oursin devrait aussi permettre d'identifier de nouveaux acteurs de la traduction dépendante de la coiffe. Par exemple, l'obtention du génome complet a permis de lancer une recherche informatique dans le but de découvrir de nouveaux partenaires de eIF4E ayant le motif consensus de liaison à cette protéine.

L'aplysie : traduction et système nerveux

L'aplysie est un mollusque gastéropode plus connu sous le nom de Lièvre de mer. Au début des années 1950, le chercheur Ladislav Tauc décide de se lancer dans la neurobiologie cellulaire et de se tourner vers l'aplysie, un modèle idéal pour étudier les phénomènes complexes de l'intégration neuronale. Il mit en évidence les principes fondamentaux de la neurobiologie. Ses travaux sur l'aplysie furent suivis par Eric Kandel qui fut récompensé du prix Nobel en 2000.

Le cerveau des hommes ou des mammifères est trop complexe pour étudier les processus d'apprentissage. Kandel avait besoin d'un organisme modèle doté d'un système nerveux peu complexe et capable d'apprendre des choses simples. L'aplysie présente plusieurs avantages de ce point de vue.

- Elle ne possède que 20 000 cellules nerveuses alors qu'un cerveau de mammifères en possède mille milliards, elle est dotée d'un système nerveux très simple qui ne fait intervenir qu'une centaine de cellules dans un comportement donné.
- De plus, ces cellules nerveuses sont géantes, ce sont les plus grandes du règne animal. Elles sont visibles à l'œil nu (1 mm de diamètre). Elles peuvent être facilement isolées et manipulées.
- Et enfin, beaucoup de ces cellules nerveuses sont facilement identifiables au même endroit dans chaque animal de l'espèce.

Les travaux sur l'aplysie *Aplysia californica* ont permis de mieux comprendre la régulation de l'expression des gènes dans le système nerveux. Ils ont mis en évidence pour la première fois l'utilisation de la traduction IRES dépendante dans le système nerveux en condition physiologique. Les IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) représentent un système alternatif à la traduction dépendante de la coiffe (voir article Saad *et al.*, dans cet ouvrage). Ce sont des séquences particulières en 5'UTR de certains ARNm, elles sont reconnues par des protéines spécifiques qui vont amener la sous unité ribosomique 40S sur l'ARNm concerné, sans passer par le complexe d'initiation relié à la coiffe. Chez l'aplysie, on trouve des cellules neuroendocrines appelées BCN pour Bag Cell Neurons (Wayne *et al.*, 2004). Ces cellules interviennent dans la reproduction en synthétisant et en sécrétant l'hormone responsable de la ponte, ELH (*Egg Laying Hormone*) en réponse à des signaux électriques provenant des ganglions de la tête. L'ELH agit sur l'ovotestis pour stimuler l'ovulation et sur le système nerveux central pour moduler le comportement de ponte (Fig. 6). L'aplysie vit seulement un an et présente une seule saison de reproduction. Les BCN sécrètent alors 1 à 2 µg de l'hormone ELH chaque jour. La synthèse de ELH nécessite un mécanisme spécial permettant de maintenir une forte production de cette hormone. Par Northern Blot, il a été démontré que le niveau d'ARNm d'ELH n'était pas modifié par la stimulation des BCN, il s'agit en fait d'une régulation traductionnelle exercée sur un pool préexistant d'ARNm d'ELH. De manière surprenante, lorsque la

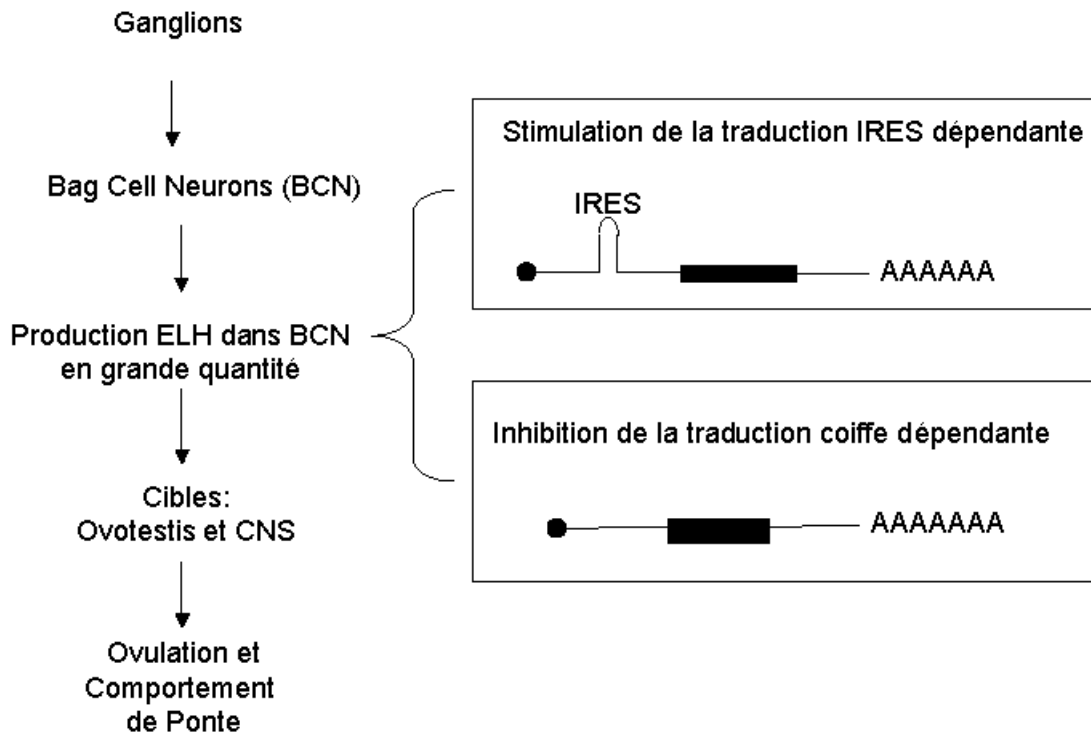


FIG. 6. – La traduction de l'ELH chez l'aplysie.

Après stimulation par des ganglions dans la tête, les *Bag Cell Neurons* (BCN) de l'aplysie produisent une grande quantité d'ELH (*Egg Laying Hormone*). Cette hormone est sécrétée par ces BCN et va agir sur l'ovotestis et le CNS (*Central Nervous System*) et provoquer l'ovulation et le comportement de ponte. En période de reproduction, la synthèse protéique globale diminue par inhibition de la traduction coiffe dépendante, mais la synthèse de l'hormone ELH se maintient grâce à une traduction IRES dépendante.

synthèse d'ELH est stimulée, le taux de traduction globale est inhibé. Ces travaux montrent aussi que la stimulation des BCN entraîne la déphosphorylation du facteur eIF4E (Dyer *et al.*, 2003). En injectant une construction bicistronique contenant la région 5'UTR de l'ARNm de l'ELH dans les BCN, permettant de produire un signal fluorescent bleu en présence de traduction dépendante de la coiffe et un signal fluorescent vert en présence de traduction IRES dépendante, Dyer *et al.* ont montré que la région 5'UTR de l'ARNm de l'ELH contenait un IRES. Ce passage à une traduction indépendante de la coiffe se fait au détriment des autres protéines nécessaires à l'organisme pour favoriser la production de l'ELH, l'hormone qui va permettre la transmission du matériel génétique et la survie de l'espèce.

L'aplysie est aussi le modèle de choix utilisé pour décrypter la régulation de l'expression des gènes au cours des processus de facilitation dans le système nerveux. L'aplysie réagit aux stimulations qu'elle juge dangereuses par un réflexe. Lorsque le siphon de l'aplysie est stimulé de façon tactile, elle retire celui-ci ainsi que les ouïes dans la cavité du manteau pour les protéger. La sensibilisation est une forme de crainte apprise, grâce à laquelle une personne ou un animal apprend à répondre de manière intense à un stimulus extérieur. Par exemple, lorsque l'aplysie reçoit un choc sur la queue, elle reconnaît un danger et augmente son réflexe de défense par

rapport à d'autres stimulus qui sont normalement anodins (Kandel, 2003). Un choc unique donne naissance à une mémoire qui ne dure que quelques minutes et ne requiert pas de synthèse protéique. Au contraire, une répétition espacée de chocs conduit à une mémoire à long terme qui nécessite une synthèse protéique.

Pour étudier ce phénomène, des expériences ont été réalisées en substituant les chocs sur la queue par des incubations de sérotonine (le neurotransmetteur libéré lors de ces chocs) sur des cultures contenant des synapses entre une cellule sensorielle et un neurone moteur. En effet, une application de 5 minutes de sérotonine sur les synapses est suffisante pour entraîner une phase de facilitation à long terme (de 72 h) qui requiert une synthèse protéique. À partir de synaptosomes (structures artificielles correspondant aux terminaisons nerveuses, obtenues après fractionnement cellulaire d'extraits de tissus nerveux) mis en présence de sérotonine, l'équipe de John Dyer a mis en évidence le rôle de 4EBP dans la régulation de la traduction au niveau des cellules nerveuses (Carroll *et al.*, 2006).

Le clonage puis le séquençage de 4EBP chez l'aplysie ont montré la conservation des sites connus de phosphorylation. À partir d'un anticorps spécifique du 4EBP de l'aplysie, la protéine totale a été détectée aussi bien dans le corps cellulaire (soma) des neurones que dans les terminaisons synaptiques. Cependant, les formes hypo-

phosphorylées de 4EBP se retrouvent préférentiellement au niveau des terminaisons synaptiques. 4EBP aurait donc un rôle différent en fonction de sa localisation dans le soma ou au niveau des synapses. Pour comprendre le rôle de la phosphorylation de 4EBP au niveau des synapses, les synaptosomes ont été mis en présence de sérotonine. Après 10 minutes d'incubation, 4EBP est devenue hyperphosphorylée après activation de la kinase FRAP/mTOR puisque la rapamycine est capable de bloquer cet effet de la sérotonine. Cependant, cette hyperphosphorylation de 4EBP ne se maintient que 35 minutes avant de revenir à un niveau basal. En parallèle, la phosphorylation du facteur eIF4E diminue progressivement pour devenir significativement affectée après 35 minutes d'incubation avec la sérotonine. Cela a permis de mettre en évidence la réponse biphasique des synaptosomes en réponse à la sérotonine : il y a d'abord une activation transitoire de 10 minutes de la traduction dépendante de la coiffe qui résulte de l'hyperphosphorylation de 4EBP puis une phase d'inhibition de la traduction avec une baisse de phosphorylation de 4EBP et de eIF4E au bout de 35 minutes.

L'aplysie nous a montré que dans les cellules nerveuses, 4EBP est associée à eIF4E et de manière intéressante, cette 4EBP endogène liée à eIF4E n'est phosphorylée sur aucun de ses quatre sites potentiels. Par contre, pour dissocier le complexe 4EBP/eIF4E, les quatre sites doivent être phosphorylés sur 4EBP. Un nouveau mécanisme de régulation entre 4EBP et eIF4E a aussi été découvert grâce à l'aplysie. La surexpression de 4EBP diminue la traduction dépendante de la coiffe dans les cellules nerveuses mais augmente la quantité de eIF4E endogène. Cela suggère que le taux de eIF4E dans les neurones est finement régulé et que 4EBP protégerait eIF4E de la dégradation en agissant comme protéine chaperonne.

En parallèle, le rôle de la kinase Mnk a été analysé chez l'aplysie en réponse à la sérotonine (Ross *et al.*, 2006). Mnk est reconnue comme la kinase capable de phosphoryler eIF4E *in vivo* (Pyronnet *et al.*, 1999). Les neurones d'aplysie démontrent pour la première fois un rôle inhibiteur de Mnk dans la traduction dépendante de la coiffe. Mnk est capable de phosphoryler eIF4E dans les neurones de l'aplysie mais l'augmentation de l'expression de Mnk entraîne une baisse de la traduction dépendante de la coiffe. La traduction IRES dépendante est aussi réduite mais de façon moindre, ce qui favorise le rapport traduction IRES/traduction coiffe dépendante. En condition normale, Mnk et eIF4E sont associés à eIF4G. La phosphorylation de eIF4E se déroulerait pendant le processus d'initiation de la traduction. La phosphorylation de eIF4E sur la sérine 209 apporterait une charge négative responsable d'une répulsion électrostatique entre cette protéine et le groupe phosphate de la structure m⁷GTP, cela pourrait diminuer l'interaction de eIF4E sur la coiffe suivie d'une augmentation de la synthèse protéique (Scheper & Proud, 2002). Cette phosphorylation serait responsable du relargage des complexes d'initiation, après le recrutement de la sous-unité ribosomique 40S sur l'ARNm, permettant le recrutement

d'un nouveau complexe d'initiation avant même la fin du premier tour. La phosphorylation prématurée de eIF4E pourrait entraîner le relargage des facteurs d'initiation de la traduction avant le recrutement de la sous-unité 40S sur un ARNm donné, inhibant ainsi la traduction. La surexpression de Mnk provoquerait la phosphorylation prématurée de eIF4E et d'autres substrats, qui serait responsable de l'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe.

Les études sur ce mollusque marin permettent de déterminer les modifications des facteurs intervenant dans la machinerie de traduction du système nerveux, elles mettent en évidence l'importance de l'activation locale de 4EBP lors des phases tardives de plasticité synaptique. L'aplysie est un modèle idéal pour mieux comprendre les mécanismes régulant la formation de la mémoire à long terme.

PERSPECTIVES

L'étude de la régulation de l'expression des gènes à partir de modèles marins simples à analyser s'avère très enrichissante, non seulement pour comprendre les bases des systèmes de régulation chez les Vertébrés puisque l'on retrouve des voies de signalisation conservées, mais aussi pour découvrir de nouveaux systèmes de régulations originaux grâce à la diversité des organismes marins.

Beaucoup de protéines interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. Des analyses réalisées sur des embryons d'oursin vont permettre de découvrir de nouveaux acteurs qui régulent la synthèse protéique en réponse à la fécondation. Par exemple, la déphosphorylation du facteur eIF2- α , qui intervient dans la régulation de l'initiation de la traduction, participe aussi à l'augmentation de la synthèse protéique post-fécondation (données non publiées). L'oursin permettra ainsi de déterminer les voies de signalisation impliquées dans cette régulation au cours du développement embryonnaire précoce.

De plus, l'initiation n'est pas la seule étape régulatrice de la synthèse protéique. L'étape d'élongation qui correspond à la formation de la chaîne d'acides aminés fait intervenir les eEFs (eukaryotic Elongation Factors). Parmi eux, le facteur eEF1B présente une localisation particulière en fonction des phases du cycle cellulaire lors de la fécondation chez l'oursin (Boulben *et al.*, 2003). D'autres facteurs d'élongation sont régulés dans les embryons d'oursin, c'est le cas de eEF2 qui est déphosphorylé après fécondation et qui pourrait participer à l'augmentation de synthèse protéique (données non publiées). L'oursin représente donc un bon modèle pour comprendre les régulations traductionnelles à plusieurs niveaux au cours du développement embryonnaire.

Les océans abritent près de 15 % des espèces actuellement connues sur le globe. On y trouve une grande diversité d'organismes marins qui représentent d'excellents réservoirs pour y découvrir de nouvelles molécules

d'intérêt pharmacologique. De nombreuses molécules provenant d'organismes marins sont utilisées pour étudier la régulation de l'expression des gènes. Par exemple, l'hippuristanol, un inhibiteur de l'activité ARN hélicase de eIF4A, a été purifié à partir du corail *Isis Hippuris* (Bordeleau *et al.*, 2006). Lorsque des œufs d'oursin sont pré-incubés avec l'hippuristanol avant fécondation, les embryons ne passent pas la première division mitotique. Ces analyses soulignent le lien entre la régulation de la synthèse protéique et le contrôle du cycle cellulaire.

Enfin, les modèles marins constituent des modèles simples à analyser et permettent de faire le lien avec les pathologies humaines. De nouvelles données sont apparues en neurobiologie avec l'analyse de souris knock out n'exprimant pas la protéine 4EBP2. Ces souris démontraient des défauts de fonctionnement concernant la plasticité synaptique à long terme, l'apprentissage et la mémoire (Banko *et al.*, 2005). Ces données démontrent l'importance du contrôle traductionnel au niveau du cerveau. Les analyses à partir de modèles simples comme l'aplysie permettront de comprendre l'importance de ces régulations dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre les maladies humaines affectant le système nerveux.

CONCLUSION

Des dérégulations de la machinerie de traduction sont responsables de maladies chez les humains. Par exemple, une mutation du facteur eIF2B (le facteur d'échange de nucléotide pour eIF2) entraîne la mort des nouveaux-nés, causée par une perte progressive de matière blanche dans le cerveau (Ainsworth, 2005). De plus, de nombreux cancers sont reliés à une surexpression du facteur eIF4E : cancer de l'œsophage (Salehi & Mashayekhi, 2006), cancer du sein (Li *et al.*, 2002). Les différents modèles marins contenant des gènes et des voies de signalisations similaires à ceux des humains permettront de mieux comprendre ces maladies et de mettre au point de nouvelles thérapies. Les protéines eIF4E et 4EBP ont récemment été impliquées dans les mécanismes de survie et d'apoptose : eIF4E est anti-apoptotique, et 4EBP est pro-apoptotique (Holcik & Sonenberg, 2005). La leucémie lymphoïde chronique B-CD5⁺ est caractérisée par une perte d'apoptose. L'étude des facteurs de traduction eIF4E et 4EBP et de leur interaction permettront de définir des peptides qui pourront être testés en laboratoire pour évaluer leurs effets sur la leucémie lymphoïde chronique (voir article Saad *et al.*, dans cet ouvrage). De plus, l'oursin représente un bon modèle pour étudier l'origine de la cancérisation (voir article Bellé *et al.*, dans cet ouvrage).

Enfin, l'utilisation des modèles marins permettra de définir des réseaux de régulation traductionnelle pour déterminer où et quand des ARNm spécifiques sont recrutés dans les polysomes pour être traduits, ou pour identifier les ARNm recrutés dans les polysomes à un instant donné.

Remerciements. – Les travaux de l'équipe ont été permis grâce aux financements des tutelles (CNRS et Université Pierre et Marie Curie), de l'Association de Recherche sur le Cancer (ARC), de la Ligue contre le Cancer, du Conseil Général du Finistère et de la région Bretagne.

Nous remercions l'ensemble des membres de l'équipe et la Station Biologique de Roscoff.

BIBLIOGRAPHIE

- Ainsworth C., Molecular medicine: lost in translation. *Nature*, 2005, 435, 556-558.
- Banko J. L., Poulin F., Hou L., DeMaria C. T., Sonenberg N. & Klann E., The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 2005, 25, 9581-9590.
- Ben-Tabou de-Leon, S. & Davidson E. H., Gene regulation: gene control network in development. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2007, 36, 191-212.
- Bordeleau M. E., Mori A., Oberer M., Lindqvist L., Chard L. S., Higa T., Belsham G. J., Wagner G., Tanaka J. & Pelletier J., Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2, 213-220.
- Boulben S., Monnier A., Le Breton M., Morales J., Cormier P., Belle R. & Mulner-Lorillon O., Sea urchin elongation factor 1delta (EF1delta) and evidence for cell cycle-directed localization changes of a sub-fraction of the protein at M phase. *Cell Mol. Life Sci.*, 2003, 60, 2178-2188.
- Carroll M., Dyer J. & Sossin W. S., Serotonin increases phosphorylation of synaptic 4EBP through TOR, but eukaryotic initiation factor 4E levels do not limit somatic cap-dependent translation in aplysia neurons. *Mol. Cell Biol.*, 2006, 26, 8586-8598.
- Clemens M. J., Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene*, 2004, 23, 3180-3188.
- Colas P. & Guerrier P., The oocyte metaphase arrest. *Prog. Cell Cycle Res.*, 1995, 1, 299-308.
- Coldwell M. J. & Morley S. J., Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol. Cell Biol.*, 2006, 26, 8448-8460.
- Cormier P., Pyronnet S., Morales J., Mulner-Lorillon O., Sonenberg N. & Belle R., eIF4E association with 4E-BP decreases rapidly following fertilization in sea urchin. *Dev. Biol.*, 2001, 232, 275-283.
- Dyer J. R., Michel S., Lee W., Castellucci V. F., Wayne N. L. & Sossin W. S., An activity-dependent switch to cap-independent translation triggered by eIF4E dephosphorylation. *Nat. Neurosci.*, 2003, 6, 219-220.
- Gingras A. C., Gygi S. P., Raught B., Polakiewicz R. D., Abraham R. T., Hoekstra M. F., Aebersold R. & Sonenberg N., Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* 1999b, 13, 1422-1437.
- Gingras A. C., Raught B. & Sonenberg N., eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999a, 68, 913-963.
- Haghighat A., Mader S., Pause A. & Sonenberg N., Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *Embo J.*, 1995, 14, 5701-5709.
- Hocheleger H., Klotzbucher A., Kirk J., Howell M., le Guellec K., Fletcher K., Duncan T., Sohail M. & Hunt T., New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation. *Development*, 2001, 128, 3795-3807.
- Holcik M. & Sonenberg N., Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, 6, 318-327.

- Kahvejian A., Svitkin Y. V., Sukarieh R., M'Boutchou M. N. & Sonenberg N., Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts *via* multiple mechanisms. *Genes Dev.*, 2005, 19, 104-113.
- Kandel E., La biologie moléculaire de la mémoire: un dialogue entre gènes et synapses. *Medicine Sciences*, 2003, 19, 625-633.
- Lapasset L., Pradet-Balade B., Lozano J. C., Peaucellier G. & Picard A., Nuclear envelope breakdown may deliver an inhibitor of protein phosphatase 1 which triggers cyclin B translation in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 2005, 285, 200-210.
- Le Bouffant R., Cormier P., Mulner-Lorillon O. & Belle R., Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J. Cell Biochem.*, 2006, 99, 126-132.
- Lee S. J., Stapleton G., Greene J. H. & Hille M. B., Protein kinase C-related kinase 2 phosphorylates the protein synthesis initiation factor eIF4E in starfish oocytes. *Dev. Biol.*, 2000, 228, 166-180.
- Li B. D., Gruner J. S., Abreo F., Johnson L. W., Yu H., Nawas S., McDonald J. C. & DeBenedetti A., Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann. Surg.*, 2002, 235, 732-738; discussion 738-739.
- Mendez R. & Richter J. D., Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 521-529.
- Morales J., Mulner-Lorillon O., Cosson B., Morin E., Belle R., Bradham C. A., Beane W. S. & Cormier P., Translational control genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 293-307.
- Oulhen N., Salaun P., Cosson B., Cormier P. & Morales J., After fertilization of sea urchin eggs, eIF4G is post-translationally modified and associated with the cap-binding protein eIF4E. *J. Cell Sci.*, 2007, 120, 425-434.
- Polunovsky V. A., Gingras A. C., Sonenberg N., Peterson M., Tan A., Rubins J. B., Manivel J. C. & Bitterman P. B., Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 24776-24780.
- Proud C. G., Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem. J.*, 2007, 403, 217-234.
- Pyronnet S., Imataka H., Gingras A. C., Fukunaga R., Hunter T. & Sonenberg N., Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *Embo J.*, 1999, 18, 270-279.
- Raught B., Gingras A. C., Gygi S. P., Imataka H., Morino S., Gradi A., Aebersold R. & Sonenberg N., Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G. *Embo J.*, 2000, 19, 434-444.
- Ross G., Dyer J. R., Castellucci V. F. & Sossin W. S., Mnk is a negative regulator of cap-dependent translation in Aplysia neurons. *J. Neurochem.*, 2006, 97, 79-91.
- Rousseau D., Gingras A. C., Pause A. & Sonenberg N., The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth. *Oncogene*, 1996, 13, 2415-2420.
- Salaun P., Boulben S., Mulner-Lorillon O., Belle R., Sonenberg N., Morales J. & Cormier P., Embryonic-stage-dependent changes in the level of eIF4E-binding proteins during early development of sea urchin embryos. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 1385-1394.
- Salaun P., Le Breton M., Morales J., Belle R., Boulben S., Mulner-Lorillon O. & Cormier P., Signal transduction pathways that contribute to CDK1/cyclin B activation during the first mitotic division in sea urchin embryos. *Exp. Cell Res.*, 2004, 296, 347-357.
- Salehi Z. & Mashayekhi F., Expression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and 4E-BP1 in esophageal cancer. *Clin. Biochem.*, 2006, 39, 404-409.
- Scheper G. C. & Proud C. G., Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, 5350-5359.
- Sodergren E., Weinstock G. M., Davidson E. H., Camero, 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., Ettensohn 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. *et al.*, The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 2006, 314, 941-952.
- Von der Haar T., Gross J. D., Wagner G. & McCarthy J. E., The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, 11, 503-511.
- Wayne N. L., Lee W., Michel S., Dyer J. & Sossin W. S., Activity-dependent regulation of neurohormone synthesis and its impact on reproductive behavior in Aplysia. *Biol. Reprod.*, 2004, 70, 277-281.